



HAL
open science

Electrophorèse capillaire couplée ou non à la spectrométrie de masse pour l'évaluation ou le contrôle qualité de protéines à visée thérapeutique

Anne-Lise Marie

► **To cite this version:**

Anne-Lise Marie. Electrophorèse capillaire couplée ou non à la spectrométrie de masse pour l'évaluation ou le contrôle qualité de protéines à visée thérapeutique. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT: 2015SACLS044 . tel-01385191

HAL Id: tel-01385191

<https://theses.hal.science/tel-01385191>

Submitted on 21 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS044

UNIVERSITE PARIS-SACLAY

ECOLE DOCTORALE N°571

Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes

Spécialité : Chimie

Proteins and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS)

Institut Galien Paris-Sud - UMR CNRS 8612

Faculté de Pharmacie

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 20 octobre 2015

par

Anne-Lise MARIE

**« Electrophorèse capillaire couplée ou non à la spectrométrie de masse
pour l'évaluation ou le contrôle qualité de protéines à visée thérapeutique »**

Composition du Jury :

Rapporteur : **Anne Varenne**, Professeur à Chimie ParisTech - ENSCP - Paris

Rapporteur : **Emmanuelle Leize-Wagner**, Directrice de Recherche au CNRS - LSMIS - Strasbourg

Examineur : **Christophe Junot**, Directeur de Recherche au CEA - LEMM - Saclay

Examineur : **Govert W. Somsen**, Professeur à l'Université d'Amsterdam (Pays-Bas)

Examineur : **Jean-Luc Plantier**, Docteur - Entreprise pharmaceutique LFB - Lille

Président du Jury : **Fathi Moussa**, Professeur au LETIAM - IUT d'Orsay

Directrice de Thèse : **Myriam Taverna**, Professeur à l'Université Paris-Sud

Membre invité : **Nguyet Thuy Tran**, Maître de conférences à l'Université Paris-Sud

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Professeur Myriam Taverna de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ces nombreuses années. Elle m'a accordé sa confiance et a toujours su me guider avec beaucoup de tact et de bienveillance. Myriam, tu ne cesseras jamais de m'étonner par la grande connaissance que tu as dans des domaines variés, notamment celui des protéines. Pour moi, tu es comme un grand chef étoilé, tu sais toujours apporter la petite touche finale qui sublime le plat. A tes côtés, j'ai appris énormément tant sur le plan scientifique qu'humain. Je souhaite à toute personne d'avoir une directrice de thèse comme toi.

Je voudrais ensuite remercier le Professeur Anne Varenne, le Docteur Emmanuelle Leize-Wagner, le Docteur Christophe Junot, le Professeur Govert Somsen, le Docteur Jean-Luc Plantier et le Professeur Fathi Moussa d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je suis honorée que ces personnes fassent partie de mon jury.

Mes remerciements s'adressent également à Thuy Tran qui m'a encadrée durant ces trois années de thèse. Je la remercie pour sa patience, sa grande disponibilité et les connaissances qu'elle m'a apportées. Thuy, j'ai appris à te connaître au fil des années et j'ai particulièrement apprécié ton soutien et ton aide lors de mes derniers mois de thèse. Tu es quelqu'un avec qui il est agréable de travailler.

Je tiens aussi à remercier les personnes de l'entreprise pharmaceutique LFB avec qui j'ai partagé les "aventures" albumine et antithrombine. Je pense tout d'abord à Rémi Urbain, grâce à qui j'ai pu finir mon doctorat. J'ai beaucoup d'estime pour lui, cela a été très constructif de travailler à ses côtés. Je pense ensuite à Sylvie Jorieux et Jean-Luc Plantier, avec qui j'ai beaucoup dialogué. Leurs points de vue et leurs réflexions m'ont beaucoup aidée. Je n'oublie pas Guillaume Chevreux qui m'a appris de nombreuses choses en spectrométrie de masse. Enfin, je voudrais remercier toutes les autres personnes du LFB qui ont participé au projet Therat, notamment Toufik Abache et Alexandre Fontayne.

Je voudrais remercier tout particulièrement le Professeur Delphine Borgel, coordinatrice du projet Therat. Delphine, cela a été un plaisir de travailler avec vous. Votre connaissance du domaine pharmaceutique, votre rigueur scientifique, vos conseils toujours avisés ont été pour moi d'une aide précieuse. Grâce à vous, j'ai pu finir ma troisième année de doctorat et je vous en suis très reconnaissante. Je souhaite bien sûr remercier les membres de votre équipe, en particulier Elsa Bianchini et François Saller. Elsa, je te remercie pour tout ce que tu m'as expliqué sur l'antithrombine, avec beaucoup de pédagogie. Merci également pour ta participation aux études d'affinité. François, cela a été un vrai plaisir de travailler avec toi. Tu m'as énormément appris sur l'antithrombine et ses dimères. Tes préparations d'antithrombine ont été capitales dans mes différentes expériences. Enfin, une pensée chaleureuse à Allan de Carvalho pour son aide dynamique dans les études d'affinité, à Stéphane Pautus pour sa patience lors de la purification des variants, et à Claudine Deloménie pour son aide lors de nos études sur le bioanalyzer.

Je souhaite également remercier le Docteur Régis Daniel de m'avoir accueillie au sein de son unité à l'université d'Evry. Régis, j'ai particulièrement apprécié de travailler avec vous. Vos remarques toujours très pertinentes m'ont été très utiles. Je remercie bien sûr également Florence Gonnet et Cédric Przybylski. J'ai appris énormément sur la spectrométrie de masse des protéines à leurs côtés. Régis, Florence et Cédric, vos connaissances, votre rigueur scientifique et vos réflexions analytiques ont participé fortement à mon cheminement dans le domaine de la spectrométrie de masse. Je vous remercie chaleureusement pour votre aide, vos conseils et votre disponibilité.

Bien sûr, je n'oublie pas les membres de mon équipe. Je pense tout d'abord aux maîtres de conférences Claire Smadja, Isabelle Le Potier et Antoine Pallandre. Je vous remercie tous les trois pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées, et cela toujours dans la bonne humeur. Je remercie Marie-Claude Anmella pour son sourire quotidien et son aide précieuse. Je pense ensuite à mes collègues doctorants : Ludivine Bol, Kiarach Mesbah, Sonia Korchane, Dimitri Brinet, Emmanuel Jaccoulet, Monica Araya, Nacéra Aboud et Jeanne Bataille. Cela a été un plaisir d'évoluer à vos côtés. Ludivine, je te remercie pour ce que tu m'as appris concernant les cultures cellulaires et le domaine pharmaceutique, et pour toutes les discussions agréables que nous avons partagées. Je pense bien sûr aussi à notre formidable post-doc Thanh Duc Mai, et à notre nouveau chef d'entreprise Romain Verpillot. Une pensée également à Youmna Mohamed Abdou, pour son aide indispensable dans l'analyse des AT concurrentes, et à nos stagiaires Cédric Crosnier, Alison Alazard et Ibtissam Saïh.

Une pensée toute particulière à mon ami Farid Oukacine. Farid, tes connaissances et ton raisonnement scientifique m'épateront toujours. À tes côtés, j'ai appris et je continue d'apprendre énormément. Je te remercie pour toutes ces discussions passionnées et passionnantes.

Je voudrais remercier les personnes de l'entreprise Stratégik et Numérik, notamment Julie Marc pour son aide indispensable lors de la rédaction de la revue albumine. Julie, je te remercie également pour la construction du poster sur l'albumine, qui reste pour moi un très bon souvenir.

Je souhaite également remercier Joseph Chamieh de l'université de Montpellier avec qui nous avons réalisé une étude TDA sur l'antithrombine. Joseph, je te remercie pour toutes tes explications sur la TDA et pour le temps que tu as consacré au retraitement de mes électrophérogrammes. Grâce à toi, la TDA me semble un peu moins complexe.

Une pensée chaleureuse à Rabah Gahoual, qui m'a appris énormément sur la spectrométrie de masse en conditions non-dénaturantes. Rabah, je te remercie pour ces merveilleuses discussions partagées ensemble.

Let's go abroad now, direction Amsterdam. I would like to thank very much Professor Govert Somsen for welcoming me in his lab with kindness and delicacy. Govert, as I told you one day, to have a boss like you is a real source of motivation. My visit in your lab was full of surprises not only from a scientific point of view but also for the persons I met. To begin with, I would like to acknowledge Elena Dominguez-Vega for her precious help. Elena, you were just wonderful ! You guided me in a very efficient manner, with a lot of kindness and availability. It was really a pleasure to work with you. I also would like to thank very much Rob Haselberg. Rob, your amazing work in CE-MS with Govert has helped me to understand and to analyze my experiments. I am also grateful to you for all the nice discussions we had together. Now, a thought for the other members of the team : Amir Prior, Laura Bertolotti, Sarah Tengattini, Giacomo Guitti, Jordy Van Angeren, Bennie Klomp and Laura Verspeelt. If I wanted to sum up my acknowledgments, I would say : Dank u wel les Hollandais, Gracias les Espagnols, Grazie mille les Italiens, תודה les Israéliens et Merci les Belges !

D'autre part, il me tient à cœur de remercier toutes les personnes rencontrées au cours de congrès ou de réunions scientifiques, qui ont contribué à mon envie d'aller toujours plus loin dans le domaine scientifique.

Et maintenant trois petites notes de musique... Une pensée toute joyeuse pour mon Professeur de musique, Lionnel Dujour, avec qui j'ai partagé des moments fabuleux. Lionnel, tu ne peux imaginer à quel point tes cours de musique ont été une bouffée d'oxygène pour moi. Je te remercie également pour les compositeurs que tu m'as fait découvrir. Et vive la flûte partagée !

Je voudrais maintenant remercier mes parents. Je voudrais remercier mon père pour m'avoir transmis sa logique scientifique et son sens de l'organisation. Je voudrais remercier ma mère pour avoir toujours cru en moi et pour son soutien et ses encouragements permanents. Je les remercie tous deux de m'avoir communiqué leur goût de l'effort et leur ténacité.

Une pensée bien sûr pour mes deux sœurs et mon frère qui m'ont apporté beaucoup chacun à leur manière. Bien évidemment une dédicace spéciale pour ma sœur multifonction. Patricia, tes talents variés m'épateront toujours. Ils m'ont été particulièrement utiles durant ces années de thèse. Je te remercie pour ton aide et ton soutien exceptionnels, qui m'ont permis de franchir la ligne d'arrivée.

Now the last but not the least : mon Yves. Yves, tu as été constamment présent durant toutes ces années, dans les moments heureux comme dans les moments difficiles. Ton soutien, tes encouragements, tout ce que tu as entrepris pour me remonter le moral sont gravés à vie dans ma mémoire. Et si « fluctuat nec mergitur », c'est grâce à toi. Et merci également au Paradis qui, je pense, à jouer un rôle non négligeable dans mon inspiration et ma créativité.

Anne-Lise

Abréviations

ACE, électrophorèse capillaire d'affinité
AT, antithrombine
ATR, réflexion totale atténuée
BGE, électrolyte support
BPE, base peak electropherogram
BSA, albumine de sérum bovin
CD, dichroïsme circulaire
CE, électrophorèse capillaire
CEC, circulation extracorporelle
CE-MS, électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse
CGE, électrophorèse capillaire en gel
CIEF, isoélectrofocalisation capillaire
CZE, électrophorèse capillaire de zone
DS, sulfate de dextran
EIE, extracted ion electropherogram
ELISA, enzyme linked immunosorbent assay
EOF, flux électroosmotique
EpDMA, époxy/poly(diméthylacrylamide)
EPO, érythropoïétine
ESI, électrospray
FA, analyse frontale
FACCE, électrophorèse capillaire en mode frontal continu
FTIR, infrarouge à transformée de Fourier
GH, hormone de croissance
HBPM, héparine de bas poids moléculaire
HDX, échange hydrogène/deutérium
HEC, hydroxyéthylcellulose
HEK, lignée cellulaire de rein d'embryon humain
HEMA, 2-hydroxyéthylméthacrylate
HIC, chromatographie liquide d'interactions hydrophobes
HPC, hydroxypropylcellulose
HPLC, chromatographie liquide haute performance
HPMA, 2-hydroxypropylméthacrylamide
HPMC, hydroxypropylméthylcellulose

HSA, albumine de sérum humain
ICP, torche à plasma (« inductively coupled plasma »)
IEF, isoélectrofocalisation en gel
IExC, chromatographie d'échange d'ions
IFN, interféron
IgG, immunoglobuline
IL, interleukine
IM, spectrométrie à mobilité ionique
IM-MS, spectrométrie à mobilité ionique-spectrométrie de masse
LC, chromatographie liquide
LC-MS, chromatographie liquide-spectrométrie de masse
LOD, limite de détection
LPA, polyacrylamide linéaire
mAb, anticorps monoclonal
MALDI, ionisation-désorption laser assistée par matrice
MDS, médicament dérivé du sang
MEKC, électrophorèse capillaire en milieu micellaire
MPT, modification post-traductionnelle
MS, spectrométrie de masse
NECEEM, électrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre
PAGE, électrophorèse en gel de polyacrylamide
PAM, polyacrylamide
PB, polybrène
PDADMAC, chlorure de poly(diallyldiméthylammonium)
PDMA, polydiméthylacrylamide
PEI, polyéthylène imine
PEO, oxyde de polyéthylène
PHEA, poly-N-hydroxyéthylacrylamide
PSS, poly(sodium-4-styrènesulfonate)
PVA, alcool polyvinylique
PVS, acide polyvinylsulfonique
RCL, boucle réactive (« reactive center loop »)
rh, humain recombinant
RMN, résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC, chromatographie liquide haute performance en phase inverse

RSD, déviation standard relative
SDS, dodécylsulfate de sodium
SEC, chromatographie d'exclusion stérique
SERPIN, inhibiteur des sérine-protéases
SL, liquide additionnel (« sheath liquid »)
SMIL, succession de couches de polymères ioniques
SPR, résonance plasmonique de surface
TEDETAMA, tétraéthyl-diéthylène-triamine-méthacrylamide
tPA, activateur tissulaire du plasminogène
UHPLC, chromatographie liquide ultra haute pression
Ultra Trol™ HR, ultra trol « high reverse »
Ultra Trol™ LN, ultra trol « low normal »
VACE, électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance
VP, électrophorèse capillaire des pics de vacance

Symboles

D, coefficient de diffusion moléculaire
E, champ électrique
K, constante d'association
K_d, constante de dissociation
L_{eff}, longueur effective du capillaire
L_{tot}, longueur totale du capillaire
η, viscosité
q, charge électrique
R_h, rayon hydrodynamique
t_d / t_R, temps d'élution
t_m, temps de migration
μ_{app}, mobilité électrophorétique apparente
μ_{EOF}, mobilité électroosmotique
μ_{ep} / μ_{eff}, mobilité électrophorétique effective
V, tension appliquée
v_{EOF}, vitesse électroosmotique
v_{ep}, vitesse électrophorétique effective

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| Introduction générale..... | p17 |
| Partie bibliographique..... | p23 |
| <i>Chapitre 1 : Les protéines thérapeutiques : généralités, classification et modes d'obtention.....</i> | p25 |
| I.A. Rappels sur la structure d'une protéine..... | p25 |
| I.B. Modes d'obtention des protéines thérapeutiques..... | p27 |
| I.B.1. Fractionnement plasmatique..... | p27 |
| I.B.1.a. Principe..... | p27 |
| I.B.1.b. Procédés de fabrication..... | p28 |
| <i>I.B.1.b.1. La cryoprécipitation.....</i> | <i>p29</i> |
| <i>I.B.1.b.2. La précipitation par l'éthanol.....</i> | <i>p30</i> |
| I.B.2. Recombinaison génétique..... | p31 |
| I.B.2.a. Systèmes d'expression..... | p31 |
| <i>I.B.2.a.1. Les bactéries.....</i> | <i>p32</i> |
| <i>I.B.2.a.2. Les levures.....</i> | <i>p33</i> |
| <i>I.B.2.a.3. Les champignons.....</i> | <i>p33</i> |
| <i>I.B.2.a.4. Les cellules d'insectes et de plantes.....</i> | <i>p33</i> |
| <i>I.B.2.a.5. Les cellules de mammifères.....</i> | <i>p34</i> |
| <i>I.B.2.a.6. Les plantes et animaux transgéniques.....</i> | <i>p34</i> |
| I.B.2.b. Les différentes étapes de la production..... | p36 |
| <i>I.B.2.b.1. La clarification et la purification primaire.....</i> | <i>p36</i> |
| <i>I.B.2.b.2. La purification fine.....</i> | <i>p37</i> |
| <i>I.B.2.b.3. Les techniques de filtration.....</i> | <i>p37</i> |
| <i>I.B.2.b.4. Les méthodes d'inactivation et d'élimination virale.....</i> | <i>p38</i> |
| I.C. Les biosimilaires et les biobetters..... | p40 |
| I.D. Présentation de l'albumine de sérum humain..... | p41 |
| I.D.1. Structure de l'albumine..... | p42 |
| I.D.2. Fonctions biologiques de l'albumine..... | p43 |
| I.D.3. Article 1 : « Specific antioxidant properties of human serum albumin ».... | p43 |
| I.E. Présentation de l'antithrombine..... | p59 |
| I.E.1. Origine et fonctions biologiques..... | p59 |
| I.E.2. Structure primaire et glycosylation..... | p60 |

| | |
|---|------------|
| I.E.3. Les différents conformères et dimères de l'antithrombine..... | p62 |
| I.E.3.a. La forme native..... | p62 |
| I.E.3.b. La forme latente..... | p63 |
| I.E.3.c. La forme clivée..... | p63 |
| I.E.3.d. Les hétérodimères..... | p64 |
| I.E.3.e. Les formes polymérisées..... | p65 |
| I.E.4. Indications thérapeutiques..... | p66 |

Chapitre 2 : Méthodes d'analyse des protéines thérapeutiques intactes..... p67

II.A. Article 2 : « Characterization of chemical and physical modifications of human serum albumin by capillary zone electrophoresis »..... p67

II.B. Méthodes d'analyse des protéines apparentées..... p78

II.B.1. Chromatographie liquide..... p78

II.B.1.a. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
(RP-HPLC)..... p78

II.B.1.a.1. Principe de la RP-HPLC et exemples..... p78

II.B.1.a.2. Les particules core-shell..... p81

II.B.1.a.3. Les monolithes..... p82

II.B.1.a.4. La chromatographie liquide ultra haute pression (UHPLC)..... p83

II.B.1.b. Chromatographie d'échange d'ions (IEXC)..... p84

II.B.1.c. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)..... p86

II.B.2. Techniques électrophorétiques conventionnelles..... p88

II.B.2.a. SDS-PAGE..... p88

II.B.2.b. Isoélectrofocalisation en gel (IEF)..... p90

II.B.3. Electrophorèse capillaire..... p92

II.B.3.a. Bases fondamentales de la CE..... p92

II.B.3.a.1. L'électromigration..... p93

II.B.3.a.2. L'électroosmose..... p95

II.B.3.a.3. Les phénomènes de dispersion..... p98

II.B.3.a.4. Efficacité de séparation..... p99

II.B.3.b. Problèmes d'adsorption..... p100

II.B.3.b.1. Les revêtements dynamiques..... p101

II.B.3.b.2. Les revêtements permanents ou semi-permanents..... p101

II.B.3.b.3. Les revêtements multicouches..... p103

II.B.3.c. Electrophorèse capillaire de zone (CZE)..... p106

II.B.3.d. Electrophorèse capillaire en gel (CGE)..... p110

II.B.3.e. Isoélectrofocalisation capillaire (CIEF)..... p112

| | |
|--|--------------------|
| II.B.4. Spectrométrie de masse et techniques couplées..... | p114 |
| II.B.4.a. Spectrométrie de masse (MS)..... | p115 |
| II.B.4.b. Chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS)..... | p116 |
| II.B.4.c. Electrophorèse capillaire-spectrométrie de masse (CE-MS)..... | p119 |
| <i>II.B.4.c.1. Les différents types d'interface.....</i> | <i>p119</i> |
| <i>II.B.4.c.2. Problèmes rencontrés en CE-MS.....</i> | <i>p121</i> |
| <i>II.B.4.c.3. Analyses de protéines apparentées par CE-MS.....</i> | <i>p122</i> |
| II.B.4.d. Spectrométrie de masse à mobilité ionique (IM-MS)..... | p125 |
| II.C. Méthodes d'analyse de structures secondaires..... | p126 |
| II.C.1. Dichroïsme circulaire..... | p126 |
| II.C.2. Infrarouge à transformée de Fourier..... | p128 |
| II.D. Méthodes d'analyse de structures tertiaires..... | p131 |
| II.D.1. Spectrométrie de masse..... | p131 |
| II.D.1.a. Echange hydrogène/deutérium-spectrométrie de masse (HDX-MS)..... | p132 |
| II.D.1.b. Spectrométrie de masse à mobilité ionique (IM-MS)..... | p133 |
| II.D.2. Electrophorèse capillaire..... | p136 |
| II.D.2.a. Electrophorèse capillaire de zone (CZE)..... | p136 |
| II.D.2.b. Electrophorèse capillaire en gel (CGE)..... | p138 |
| II.D.3. Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)..... | p139 |
| Travaux de thèse..... | p141 |
| | |
| <i>Chapitre 3 : Développement d'une méthode de détermination de constante d'affinité entre l'héparine et l'antithrombine thérapeutique.....</i> | <i>p143</i> |
| III.A. Rappels sur les différents modèles d'affinité et techniques CE utilisées...p147 | |
| III.A.1. Les différents modèles d'affinité..... | p147 |
| III.A.1.a. Notion d'équilibre..... | p147 |
| III.A.1.b. Modèle des équilibres successifs..... | p148 |
| III.A.1.c. Notion de coopérativité..... | p149 |
| III.A.2. Les différentes méthodes CE pour les études d'affinité..... | p150 |
| III.A.2.a. Electrophorèse capillaire d'affinité..... | p151 |
| <i>III.A.2.a.1. Principe.....</i> | <i>p151</i> |
| <i>III.A.2.a.2. Méthodes de linéarisation dans le cas d'une stœchiométrie 1 : 1.....</i> | <i>p153</i> |
| <i>III.A.2.a.3. Cas des interactions multi-sites (stœchiométrie 1 : n).....</i> | <i>p153</i> |
| III.A.2.b. Méthodes basées sur l'analyse frontale..... | p154 |
| III.A.2.c. Méthodes des pics de vacance..... | p156 |
| III.A.2.d. Electrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre..... | p157 |

| | |
|--|-------------|
| III.B. Article 3 : « A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants »..... | p159 |
| III.C. Etudes complémentaires : détermination de constantes d'affinité de différents variants de l'AT..... | p178 |
| III.D. Exploration d'une méthode TDA pour l'étude de l'affinité..... | p180 |
| III.D.1. Principe de la TDA..... | p180 |
| III.D.2. Application de la TDA à l'AT..... | p182 |
| III.E. Conclusion..... | p185 |

Chapitre 4 : Développement de méthodes CE pour évaluer la qualité de préparations commerciales de protéines thérapeutiques issues du fractionnement plasmatique..... **p187**

| | |
|---|-------------|
| IV.A. Article 4 : « Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin »..... | p190 |
| IV.B. Article 5 : « A capillary zone electrophoresis method to detect conformers and dimers of antithrombin in therapeutic preparations »..... | p213 |
| IV.C. Discussion..... | p231 |

Chapitre 5 : Développement de méthodes CE-MS pour caractériser l'AT plasmatique..... **p233**

| | |
|--|-------------|
| V.A. Analyse des glycoformes et dimères de l'AT..... | p234 |
| V.A.1. Matériels et méthodes..... | p234 |
| V.A.1.a. CE-MS en conditions acides..... | p235 |
| V.A.1.b. CE-MS en conditions basiques..... | p236 |
| V.A.2. Identification de glycoformes et formes apparentées de l'AT..... | p237 |
| V.A.2.a. CE-MS en conditions acides..... | p238 |
| V.A.2.b. CE-MS en conditions basiques..... | p243 |
| V.A.3. Détection de dimères de l'AT..... | p244 |
| V.A.3.a. CE-MS en conditions acides..... | p244 |
| V.A.3.b. CE-MS en conditions non-dénaturantes..... | p247 |

V.B. Article 6 : « Characterization of conformers and dimers of antithrombin by capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry ».....p252

Conclusion générale..... p271

Références..... p279

Annexes..... p301

Introduction générale

Dans le domaine pharmaceutique, les protéines à visée thérapeutique, issues du fractionnement plasmatique ou recombinantes, sont en plein essor. Les procédés de fabrication, les techniques de purification, les méthodes d'inactivation/élimination virale sont sans cesse en train d'évoluer et de s'améliorer. En parallèle, les industries pharmaceutiques cherchent à développer de nouvelles protéines thérapeutiques afin d'améliorer l'efficacité et/ou la pharmacocinétique d'un médicament déjà existant, ou encore pour répondre à des besoins nouveaux suite aux découvertes faites dans le domaine de la recherche médicale. Les protéines à visée thérapeutique répondent le plus souvent à un besoin lié aux maladies graves ou chroniques.

Dès lors qu'une cible est trouvée, le développement d'une protéine thérapeutique va nécessiter plusieurs étapes. Cela commence par une évaluation de la capacité de la protéine à être un candidat médicament. De multiples tests vont être réalisés afin de déterminer l'activité biologique, la biodisponibilité et la toxicité de la protéine. On va également travailler sur la formulation du produit fini. Des études *in vivo* vont être effectuées au préalable sur des modèles animaux (essais précliniques), avant d'entamer les essais cliniques sur l'humain. Ces essais seront d'abord réalisés sur des volontaires sains (phase I), puis sur un petit groupe homogène d'une centaine de malades (phase II), et enfin sur un large groupe de malades (phase III). Une fois le médicament mis sur le marché, une pharmacovigilance (phase IV) va être mise en place afin de repérer des effets indésirables rares, non détectés lors des phases précédentes.

Les protéines thérapeutiques peuvent subir au cours de leur fabrication ou de leur stockage diverses modifications chimiques (oxydation, déamidation, fragmentation, glycation...) ou physiques (dimérisation, oligomérisation, agrégation...). Ceci va conduire à ce que l'on appelle des protéines apparentées. Très souvent, les formes apparentées de la protéine auront une efficacité thérapeutique amoindrie, voire totalement supprimée. Quelquefois cependant, les formes apparentées pourront avoir une efficacité thérapeutique identique, voire meilleure que celle de la protéine native. La conformation d'une protéine est également un aspect clé à prendre en compte. En effet, une conformation spécifique est souvent essentielle à sa fonction biologique. Pour contrôler la qualité d'une protéine thérapeutique en tant que produit fini,

c'est-à-dire non seulement détecter les impuretés, les formes apparentées et/ou les conformères (incluant les formes dépliées ou mal repliées) de la protéine, mais également vérifier son identité et son dosage, des méthodes analytiques spécifiques doivent être développées. Généralement, en raison de la complexité structurale et fonctionnelle d'une protéine, une méthode unique ne suffit pas et il faut avoir recours à une combinaison de méthodes physiques, chimiques et biologiques, chacune apportant une information différente.

Lorsque l'on développe une méthode pour analyser ou contrôler une protéine, il faut tenir compte au préalable de son mode d'obtention, de sa structure, de sa stabilité, des impuretés potentielles qui peuvent l'accompagner, et de ses possibles modifications post-traductionnelles. Il faut donc s'adapter à chaque cas et à chaque protéine. Ainsi, pour certaines, il est parfois crucial de pouvoir détecter des formes particulières (par exemple des formes oxydées) ou des conformères inactifs de la protéine, alors que pour d'autres on va chercher à évaluer leur affinité pour tel ou tel ligand ou vérifier leur activité. Cela dépend bien sûr de la connaissance que l'on a de la structure de la protéine, de ses possibles modifications chimiques ou physiques, ainsi que de ses fonctions biologiques. Un élément également à prendre en considération est le procédé de fabrication, que ce soit durant les étapes du *downstream* ou de l'*upstream process*. En particulier, il est important de connaître quelles molécules risquent de polluer la protéine purifiée ou d'interférer avec elle lors des analyses. Dans le cas d'un produit fini, on va s'intéresser également à la nature des excipients présents dans la formulation.

Dans tous les cas, il est préférable d'analyser la protéine thérapeutique dans un milieu proche de son milieu naturel. Ceci n'est pas forcément facile. Le développement d'une méthode pour analyser une protéine thérapeutique demande donc une longue réflexion, qui permet de définir quelles techniques analytiques existantes et quelles méthodes seront les plus adaptées pour répondre à l'objectif que l'on s'est fixé.

Dans la partie bibliographique de cette thèse, nous commençons par parler des protéines thérapeutiques de manière générale, en décrivant leurs structures, leur classification et leurs modes d'obtention. Deux types de protéines sont présentés : celles issues du fractionnement du plasma humain et celles produites par génie génétique. Dans chaque cas, nous décrivons les procédés de fabrication utilisés. Dans le cas des protéines recombinantes, une partie est consacrée à la description des différents systèmes d'expression envisageables, avec leurs

avantages et inconvénients respectifs. Nous décrivons ensuite les deux protéines thérapeutiques étudiées au cours de cette thèse : l'albumine de sérum humain (HSA) et l'antithrombine (AT). Nous parlons de leur structure, de leur glycosylation, de leurs fonctions biologiques et de leurs propriétés thérapeutiques.

Le deuxième chapitre de la partie bibliographique est consacré à la description des techniques analytiques utilisées pour analyser les protéines thérapeutiques intactes. Il se divise en trois parties. Dans la première partie, nous décrivons les méthodes analytiques les plus fréquemment employées pour analyser des protéines apparentées. Ces méthodes peuvent être utilisées seules ou en couplage avec d'autres techniques telles que la spectrométrie de masse (MS). Les deuxième et troisième parties décrivent respectivement les méthodes analytiques permettant de caractériser la structure secondaire et tertiaire des protéines thérapeutiques. Dans chaque partie, nous expliquons très brièvement le principe de chaque technique, puis donnons des exemples qui illustrent son potentiel. Les techniques utilisées au cours de cette thèse, c'est-à-dire l'électrophorèse capillaire (CE) et l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS), sont décrites de manière plus détaillée. Pour la CE, nous rappelons quelques principes théoriques de la méthode et expliquons les principaux problèmes liés au développement d'une méthode CE pour analyser une protéine. Pour la CE-MS, nous décrivons les modes d'ionisation principalement utilisés pour l'analyse des protéines intactes ainsi que les différentes interfaces développées pour l'ionisation électrospray (ESI). Nous évoquons également les problèmes liés au couplage CE-MS.

La partie expérimentale se divise en trois chapitres (chapitres 3, 4 et 5). Le premier concerne les études d'affinité entre l'antithrombine et l'héparine menées dans le cadre du projet ANR THERAT (RPIB « Recherches Partenariales et Innovation Biomédicale »), qui a permis de financer cette thèse. Ce projet a pour objectif de développer des molécules recombinantes dérivées de l'antithrombine naturelle afin d'une part de dissocier les activités anticoagulante et cytoprotectrice de l'AT dans le cadre d'une prise en charge du sepsis sévère, et d'autre part de développer des molécules antidotes des dérivés hépariniques administrés lors d'une circulation extracorporelle (CEC). Dans ces deux contextes, il est nécessaire de conserver voire augmenter l'affinité de l'AT pour l'héparine. Le projet THERAT est un partenariat entre quatre équipes : le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) représenté par Rémi Urbain et Jean-Luc Plantier, l'équipe UMR S1176 - INSERM U1176 dirigée par le Professeur Delphine Borgel, l'équipe du Professeur Myriam Taverna (PNAS) de

l'Institut Galien - UMR CNRS 8612, et le groupe hospitalier UPRES EA 3859 dirigé par le Professeur Nicolas Lerolle. Dans le cadre du projet THERAT, il a été nécessaire de développer une méthode analytique permettant de déterminer la constante d'association entre des variants d'AT nouvellement produits à partir des techniques de l'ADN recombinant et l'héparine. Notre choix s'est porté dans un premier temps sur l'électrophorèse capillaire. Nous commençons donc le chapitre 3 par une partie bibliographique présentant les différents modèles d'affinité protéine/ligand et les méthodes CE permettant de déterminer une constante d'association entre une protéine et un ligand. La deuxième partie décrit la méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) que nous avons développée et optimisée pour étudier l'affinité de différents variants d'AT pour l'héparine, directement à partir des surnageants de culture cellulaire utilisés pour les produire. Cette méthode a fait l'objet d'un article publié en 2015 dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. La troisième partie présente les résultats obtenus par analyse d'une quinzaine de variants d'AT synthétisés dans le cadre du projet THERAT avec la méthode ACE développée. Enfin, une dernière partie décrit l'exploration d'une méthode plus nouvelle par analyse de la dispersion de Taylor (TDA) pour déterminer une constante d'association entre l'AT et l'héparine.

Le deuxième chapitre de la partie expérimentale (chapitre 4) est consacré à l'analyse de la qualité de préparations commerciales d'HSA et d'AT thérapeutiques issues du fractionnement du plasma humain. Dans le cadre de cette thèse, deux méthodes d'électrophorèse capillaire de zone (CZE) ont été développées afin d'analyser les formes apparentées ou les conformères de ces deux protéines. Ces méthodes CZE ont conduit à deux articles. Le premier, consacré à l'HSA, a fait l'objet d'une publication dans le journal *Analytica Chimica Acta* en 2013. Les résultats présentés sont une poursuite des travaux effectués au laboratoire dans le cadre de la thèse de Youssef Alahmad. En effet, les travaux décrits dans cette précédente thèse avaient permis de mettre au point une méthode CZE conduisant à la séparation de nombreuses formes dans une préparation d'HSA commerciale. Nous avons poursuivi ces travaux en cherchant à identifier les différentes formes séparées. La méthode CZE a ensuite été appliquée à la comparaison qualitative et quantitative de préparations d'HSA commerciales produites par cinq laboratoires pharmaceutiques différents. Il est important de souligner que dans le cadre de cette étude sur l'HSA un travail de collaboration a été entrepris avec l'équipe du Docteur Régis Daniel, directeur de recherche au CNRS, du Laboratoire d'Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE - UMR CNRS 8587). Cette collaboration était destinée à développer une méthode CE-MS afin d'identifier plus finement les formes

apparentées présentes dans les préparations d'HSA commerciales. Dans le deuxième article, qui vient d'être soumis au journal *Electrophoresis*, nous présentons la méthode CZE développée au cours de cette thèse pour analyser des préparations commerciales d'AT plasmatisée. Jusqu'à présent, les méthodes CE développées pour analyser l'AT ont permis de séparer uniquement des glycoformes de l'AT. Or l'AT se caractérise non seulement par une hétérogénéité de glycosylation mais également une hétérogénéité de conformation. Nous avons donc cherché à développer une méthode CZE dans des conditions non-dénaturantes afin de détecter la forme latente de l'AT (un conformère de la forme native) mais également une forme hétérodimérique de l'AT, tous deux étant des formes inactives de la protéine. Ces études ont été effectuées en collaboration avec l'équipe du Professeur Delphine Borgel (UMR INSERM U1176), qui a réalisé des préparations enrichies en formes latente ou hétérodimérique de l'AT. La méthode CZE développée a ensuite été appliquée à la comparaison qualitative et quantitative de préparations d'AT commerciales produites par cinq laboratoires pharmaceutiques différents.

Enfin, le troisième chapitre de la partie expérimentale (chapitre 5) concerne les analyses et développements CE-MS que nous avons réalisés sur des préparations commerciales d'AT plasmatisée. Ces analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse hybride quadripôle-temps de vol (Q-TOF) et une ionisation ESI. Ces études ont été réalisées pour différentes raisons. Tout d'abord, bien que la glycosylation de l'AT plasmatisée soit déjà bien décrite dans la littérature, aucune étude n'a été faite avec un spectromètre de masse Q-TOF et les seules analyses effectuées avec un TOF ont utilisé non pas une ionisation ESI mais une ionisation-désorption assistée par matrice (MALDI). De plus, la plupart des analyses de l'AT par spectrométrie de masse ont été réalisées non pas sur de la protéine intacte mais sur des glycopeptides, après digestion enzymatique de l'AT. Il semblait donc intéressant de voir ce que pourraient apporter des analyses CE-MS avec de l'ESI-Q-TOF sur de l'AT non digérée, non seulement par rapport aux types de glycoformes détectées, mais également par rapport aux formes apparentées détectées. D'autre part, dans le cadre du projet THERAT, nous nous intéressions aux conformères et dimères de l'AT. Nous avons donc voulu savoir s'il serait possible de les détecter par CE-MS sachant qu'aucune méthode MS ou CE-MS n'a encore été décrite dans la littérature afin d'analyser des conformères ou dimères de l'AT. Enfin, nous étions désireux d'identifier les formes séparées par CZE. Une première série d'expériences CE-ESI-Q-TOF-MS a été réalisée au sein de notre laboratoire, puis une deuxième série dans un laboratoire néerlandais. En effet, nous avons entrepris un travail en collaboration avec

l'équipe du Professeur Govert Somsen (VU University, Amsterdam, Pays-Bas), qui m'a accueillie dans son laboratoire durant deux mois et demi. Le but de cette collaboration était de savoir s'il était possible de séparer les conformères et dimères de l'AT en ajustant certains paramètres de couplage CE-MS. La première partie de ce chapitre décrit les méthodes CE-MS que nous avons développées afin d'analyser non seulement les glycoformes et formes apparentées de l'AT, mais également ses formes dimériques. Ces analyses ont été réalisées en conditions acides ou basiques. La deuxième partie décrit le développement d'une méthode CE-MS en conditions non-dénaturantes afin de séparer les conformères et dimères de l'AT. Cette méthode a conduit à la rédaction d'un article, qui est actuellement en cours de soumission.

Ce mémoire se termine par une conclusion générale, qui est une discussion sur les résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche. Nous explicitons les problèmes auxquels nous avons été confrontés et les choix que nous avons dû faire. Nous évoquons également ce qu'il serait envisageable d'effectuer pour compléter les résultats obtenus durant cette thèse.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les protéines thérapeutiques : généralités, classification et modes d'obtention

I.A. Rappels sur la structure d'une protéine

Une protéine est un polypeptide constitué d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques (Fig. 1). La structure primaire d'une protéine correspond donc à la séquence de ces acides aminés (squelette peptidique). Cependant une protéine adopte, par repliement, une géométrie tridimensionnelle complexe et va donc se caractériser par des structures secondaires et tertiaires spécifiques. Dans certains cas il y a aura même formation de structures quaternaires (Walsh 2007).

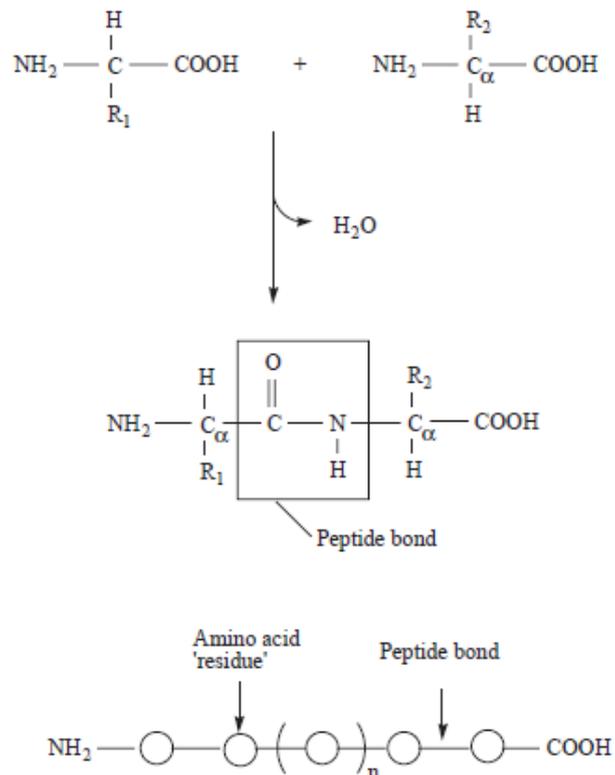


Figure 1 : Structure primaire d'une protéine et liaison peptidique. Issu de Walsh 2007.

On parle de structure secondaire lorsque des segments peptidiques adoptent localement des conformations stables en forme, par exemple, d'hélices ou de feuilletts. Plusieurs types d'hélice existent mais l'hélice alpha (α) est la plus courante. Dans l'hélice α , le squelette peptidique s'enroule de façon hélicoïdale avec 3,6 acides aminés par tour d'hélice. L'hélice α est stabilisée par des liaisons hydrogènes (Fig. 2). Le feuillet beta (β) est une autre structure

secondaire très courante chez les protéines. Dans un feuillet β , un brin de protéine s'étend de manière adjacente à un autre brin, interagissant latéralement avec celui-ci par des liaisons hydrogènes. Les deux brins peuvent être parallèles ou antiparallèles (Fig. 2). La structure tertiaire correspond au repliement tridimensionnel de la protéine. La stabilisation de cette structure peut se faire par des interactions faibles telles que des liaisons hydrogènes ou des interactions de Van der Waals, des interactions hydrophobes, des interactions électrostatiques entre un groupement cationique et un groupement anionique des chaînes latérales, ou encore par formation covalente de ponts disulfures entre deux groupements cystéines (Walsh 2007, Crommelin 2008). Une protéine n'aura pas la même conformation selon que le milieu dans lequel elle se trouve est hydrophile ou hydrophobe. Enfin, la structure quaternaire correspond à l'association de segments polypeptidiques. Cette structure est principalement stabilisée par des interactions faibles entre les résidus présents à la surface des polypeptides à l'intérieur de la molécule. La structure quaternaire peut avoir un rôle crucial dans l'activité biologique de la protéine.

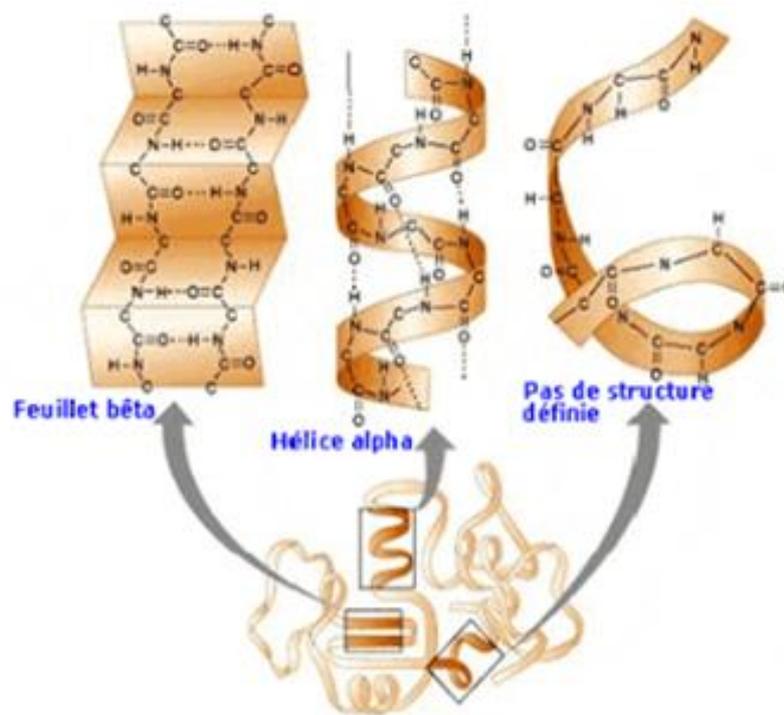


Figure 2 : Représentation schématique d'une hélice α et d'un feuillet β d'une protéine. La figure de gauche représente deux portions de brins antiparallèles qui forment un feuillet β via des liaisons hydrogènes.

Les protéines sont des molécules dynamiques qui peuvent subir des changements conformationnels. Ces modifications structurales, parfois considérables, sont indispensables à

leurs fonctions biologiques. Des techniques analytiques sont donc nécessaires afin de caractériser au mieux la structure des protéines. Nous décrivons dans le chapitre 2 les techniques les plus couramment utilisées pour étudier notamment les structures secondaires et tertiaires.

I.B. Modes d'obtention des protéines thérapeutiques

Nous allons décrire dans ce chapitre les deux modes les plus couramment utilisés pour produire des protéines thérapeutiques : le fractionnement plasmatique et la recombinaison génétique.

I.B.1. Fractionnement plasmatique

I.B.1.a. Principe

Une première classe de biomédicaments regroupe les produits obtenus par fractionnement du plasma humain. On parle dans ce cas de médicaments dérivés du sang (MDS). Les MDS se répartissent en cinq classes : l'albumine, les immunoglobulines, les facteurs de la coagulation, les inhibiteurs des protéases (parmi lesquels l'antithrombine), et les colles à base par exemple de fibrine (Brochure LFB 2011, Dossier CNIMH 1997). Ceux-ci exercent une fonction thérapeutique souvent essentielle, comme le traitement des troubles hémorragiques de l'hémophilie ou des troubles immunologiques.

Le plasma est un mélange complexe de plus d'un millier de protéines présentes en quantités très différentes (Tableau 1). Le fractionnement du plasma consiste en une séparation des différentes protéines plasmatiques. Le premier fractionnement est apparu pendant la seconde guerre mondiale afin de produire de l'albumine purifiée. Le fractionnement plasmatique occupe une place prépondérante dans la préparation des produits utilisés en thérapeutique humaine. Les méthodes de fractionnement doivent fournir des produits sûrs et efficaces, éviter les pertes, nuisibles à une valorisation optimale du plasma, et assurer un niveau de pureté suffisant de tous les dérivés (Burnouf 2007). Pour diminuer les risques infectieux, les procédures de sélection des donneurs, de contrôles microbiologiques des dons, des produits intermédiaires ou des produits finis, ainsi que les techniques de fabrication et d'élimination/inactivation virale ont été améliorées au cours des années. En parallèle, les

perfectionnements apportés aux procédés de fractionnement ont conduit à l'obtention de concentrés protéiques spécifiques de plus en plus purs, présentant une meilleure tolérance.

Tableau 1 : Composition protéique du plasma humain (mg/L).

| Protéine plasmatique | Concentration (mg/L) |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Albumine | 35000 à 50000 |
| IgG | 8000 à 18000 |
| Fibrinogène | 2000 à 4500 |
| α -1 Antitrypsine | 1300 à 3000 |
| IgA | 900 à 4500 |
| IgM | 600 à 2500 |
| Antithrombine | 220 à 390 |
| Inhibiteur de C1 estérase | 20 à 70 |
| Facteur Willebrand | 4 à 6 |
| Facteur IX | 3 à 7 |
| Protéine C | 3 à 7 |
| Facteur VIII | 0,1 à 0,2 |

En France, le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) est la seule entreprise pharmaceutique à pouvoir réaliser du fractionnement plasmatique (www.lfb.fr). Le LFB produit et commercialise une large gamme de MDS, prescrits essentiellement dans les domaines de l'immunologie, l'hémostase et les soins intensifs.

I.B.1.b. Procédés de fabrication

Les MDS sont produits selon un arbre de fractionnement (Fig. 3), qui est un procédé ramifié partant d'un même pool de plasma. Il est constitué de multiples étapes, qui vont permettre d'isoler, de purifier et de concentrer les protéines d'intérêt contenues dans le plasma. Ce plasma est issu de plusieurs milliers de poches de sang provenant de donneurs différents. Pour produire une protéine donnée, différentes branches de l'arbre peuvent être exploitées : on parle de voie principale et de voies secondaires.

Avant de lancer la production, les pools de plasma issus des dons de sang sont maintenus en quarantaine pendant plusieurs mois à une température inférieure à - 30°C. Cette période permet le recueil et la gestion de toute nouvelle information postérieure au don de sang. Selon la nature des informations obtenues, le laboratoire pharmaceutique, en accord avec les

autorités de santé, peut décider de la destruction des unités de plasma concernées (Brochure LFB 2011).

La première étape de préparation des MDS débute en principe toujours par une cryoprécipitation, conduisant à un cryosurnageant et à un cryoprécipité (Fig. 3). Puis des étapes successives vont être mises en place selon la branche de l'arbre à favoriser. Il s'agit de la précipitation à l'éthanol, de méthodes chromatographiques, de méthodes d'inactivation ou d'élimination virale et de méthodes de filtration.

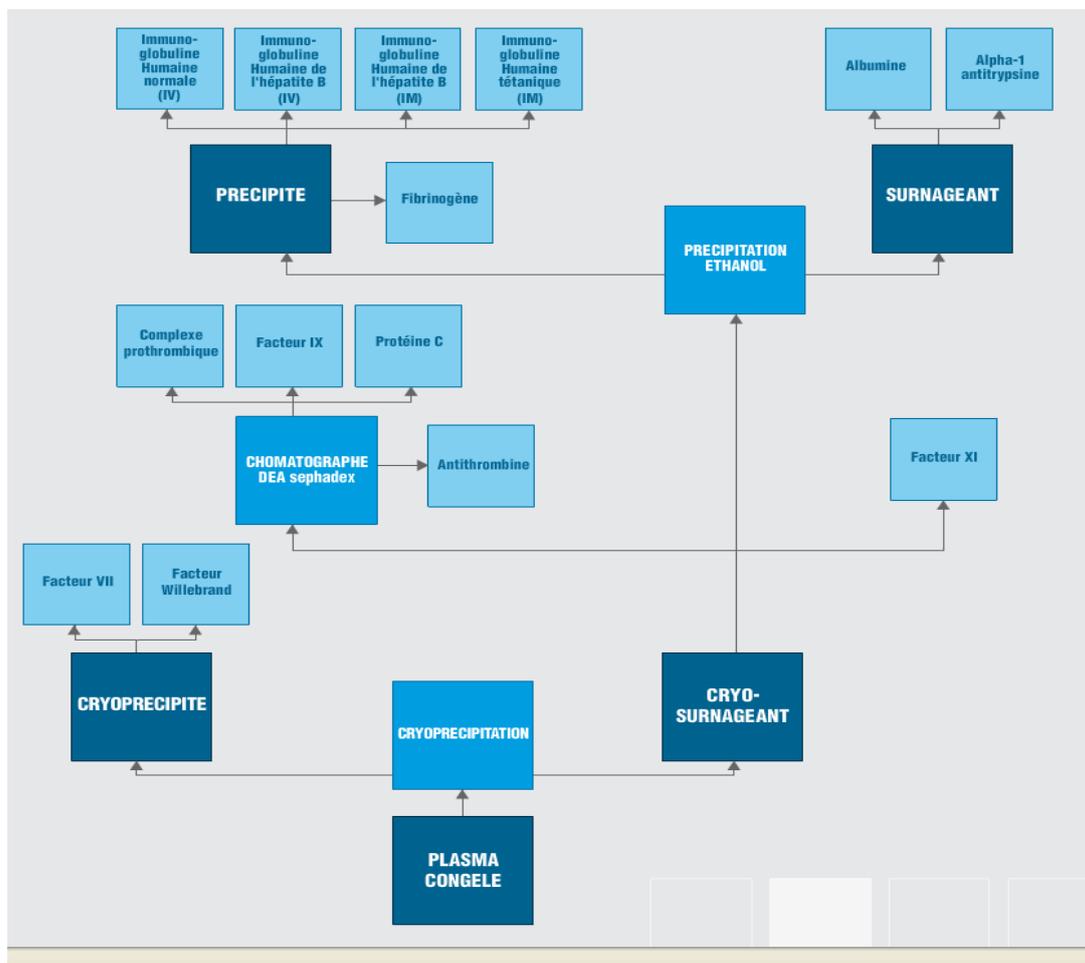


Figure 3 : Arbre du fractionnement plasmatique utilisé pour la purification de protéines à visée thérapeutique (source LFB).

1.B.1.b.1. La cryoprécipitation

La cryoprécipitation a été décrite pour la première fois par Pool en 1964 (Pool 1964). Elle est fondée sur une congélation du plasma à -70°C suivie d'une étape de décongélation lente à une température comprise entre $+1$ et $+4^{\circ}\text{C}$. Cette technique permet l'isolement :

- d'un cryoprécipité, qui contient essentiellement le facteur VIII, le facteur Willebrand et le fibrinogène,
- d'un cryosurnageant, qui contient les autres protéines d'intérêt (complexe prothrombique, antithrombine, immunoglobulines, albumine...).

Ses inconvénients sont le faible degré de purification, le manque de spécificité et l'absence d'inactivation virale. La cryoprécipitation est donc toujours suivie de méthodes de purification et d'inactivation.

1.B.1.b.2. La précipitation par l'éthanol

Développée dans les années 40 aux États-Unis par Cohn, la précipitation par l'éthanol est une méthode basée sur l'exploitation de la différence de solubilité existant entre certaines protéines plasmatiques (Cohn 1946). Cette solubilité est dépendante de plusieurs paramètres tels que la concentration d'éthanol, le pH, la température, la concentration protéique et la force ionique du tampon. La technique est généralement mise en place de manière séquentielle, selon différentes étapes au cours desquelles ces différents paramètres sont modifiés, permettant par exemple d'obtenir cinq fractions de compositions différentes (Tableau 2).

Tableau 2 : Les différentes étapes de la méthode de Cohn (Denizli 2011, Cohn 1946).

| Paramètres physico-chimiques | Fraction I* | Fraction II | Fraction III* | Fraction IV* | Fraction V |
|------------------------------|----------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------------|------------|
| % d'éthanol | 8 | 25 | 18 | 40 | 40 |
| pH | 7,2 | 6,9 | 5,2 | 5,8 | 4,8 |
| Force ionique | 0,14 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,11 |
| Température (°C) | -3 | -5 | -5 | -5 | -5 |
| Fraction protéique (%) | 5,1 | 3,0 | 1,6 | 1,0 | 0,8 |
| Protéines obtenues | Facteurs de la coagulation | IgG | IgM / IgA Plasminogène | α 1- Antitrypsine | Albumine |

*Les protéines obtenues dans les fractions I, III et IV furent identifiées par la suite.

Chaque précipitation est suivie d'une étape de séparation, par centrifugation ou filtration, isolant le précipité du surnageant. La remise en solution du précipité permet de poursuivre la purification d'une fraction. Les températures utilisées doivent être inférieures à 0°C afin de limiter les phénomènes de dénaturation protéique ou d'agrégation. Les concentrations d'éthanol utilisées assurent un effet bactériostatique. Par ailleurs, il a été ultérieurement

vérifié que les étapes de fractionnement par l'alcool sont des étapes d'élimination virale. De plus, le fractionnement pourrait fragiliser certains virus et renforcer l'effet des étapes d'inactivation virale ultérieures. Il existe de nombreuses variantes à la méthode de Cohn telles que la méthode de Kistler-Nitschmann (Gregori 2004), couramment utilisée dans les procédés de fabrication en Europe.

Pour purifier davantage les protéines plasmatiques au cours de leur fabrication, on a recours à différentes méthodes chromatographiques et différents procédés de filtration. Ces méthodes sont identiques à celles utilisées pour purifier les protéines recombinantes et sont décrites dans la section I.B.2.b. L'un des risques des MDS est la transmission d'agents infectieux (bactéries, parasites, virus, mais également des agents pathogènes non conventionnels tels que les prions). La transmission virale est la plus difficile à contrôler. Afin d'assurer l'innocuité virale des MDS, différents procédés d'élimination/inactivation virale sont utilisés. Nous les décrivons dans la section I.B.2.b.

Malgré toutes les précautions prises, la sécurité microbiologique reste le problème majeur des MDS. Les produits issus de la recombinaison génétique offrent théoriquement une plus grande sécurité virale et permettent de combler certaines pénuries liées à l'approvisionnement en sang, très dépendant des dons volontaires.

I.B.2. Recombinaison génétique

La plupart des protéines thérapeutiques sont désormais produites par recombinaison génétique. Nous allons présenter dans les paragraphes suivants les différents systèmes d'expression existant ainsi que les étapes industrielles conduisant à la production d'une protéine recombinante à visée thérapeutique. Il y a beaucoup de systèmes d'expression mais tous ne sont pas équivalents en terme de coût, de capacité à effectuer des modifications post-traductionnelles (MPT) ou le bon repliement des protéines, de taux de production de protéines hétérologues, ou de type de culture (cellules en suspension ou sur support).

I.B.2.a. Systèmes d'expression

Les systèmes d'expression pour les protéines à visée thérapeutique incluent à la fois les cellules procaryotes et eucaryotes (bactéries, levures, champignons, cellules de plantes,

d'insectes ou de mammifères, animaux et plantes transgéniques) (Crommelin 2008). Le choix du système d'expression est déterminé en grande partie par la nature de la protéine souhaitée (en particulier sa complexité), l'usage envisagé, la quantité désirée et le coût de production. En principe, toute protéine peut être produite par recombinaison génétique, mais n'importe quel type de protéine ne peut pas être produit par n'importe quel type de cellules. Dans la majorité des cas, la protéine est étrangère à la cellule hôte qui doit la produire et, bien que la traduction du code génétique puisse être réalisée par la cellule hôte, les MPT de la protéine recombinante peuvent être différentes comparées à celles de la protéine originelle humaine.

A l'heure actuelle, plus de soixante MPT des protéines sont connues mais ces modifications sont spécifiques des espèces et du type de cellule. Le métabolisme qui conduit à ces modifications est déterminée génétiquement par la cellule hôte. Par exemple, les cellules procaryotes telles que les bactéries ne sont pas capables de produire des protéines glycosylées. Pour les protéines humaines, composées à 50 % de glycoprotéines, on préfère donc souvent utiliser des cellules de mammifères ou des animaux transgéniques, étant donné que ces types de cellules sont proches de ceux produisant la protéine naturelle. Cependant, même si un type de cellules est capable d'engendrer de la glycosylation, le schéma de glycosylation de la protéine recombinante peut s'avérer différent de celui de la protéine originelle.

1.B.2.a.1. Les bactéries

Escherichia coli (*E. coli*) a été le premier système d'expression de protéines recombinantes, grâce à une bonne connaissance de son génome et sa culture peu exigeante (Walsh 2007). Aujourd'hui, ce système cellulaire est notamment employé pour produire l'insuline (premier médicament produit par génie génétique), les hormones de croissance et les interférons. *E. coli*, en tant que système d'expression, offre plusieurs avantages : hauts niveaux d'expression des protéines recombinantes (pouvant atteindre 30 % des protéines cellulaires totales), manipulation génétique facile, technologie de fermentation bien établie. Cependant, *E. coli* présente différents inconvénients, notamment son incapacité à générer des MPT telles que la glycosylation et le fait que les protéines produites se retrouvent souvent sous la forme de corps d'inclusion. De plus, ce système d'expression peut entraîner des variants méthionyl (présence d'une méthionine supplémentaire formylée ou non) du côté N-terminal de la protéine (Spector 2003, Endo 2001).

I.B.2.a.2. Les levures

Les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* sont également des systèmes d'expression attractifs (Walsh 2007, Mochizuki 2001). Tout comme *E. coli*, leur manipulation génétique est relativement facile et leur croissance est rapide dans des milieux de culture peu onéreux. De plus, ce sont des organismes considérés comme sains, étant donné qu'ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire (fabrication de pain ou de bière). Contrairement à *E. coli*, les levures offrent l'avantage de pouvoir effectuer des MPT. Cependant, celles-ci sont très différentes de celles retrouvées chez l'homme, en particulier la glycosylation. De nombreuses protéines thérapeutiques ont été produites avec succès dans les levures (insuline, anticoagulants, vaccins). Un des inconvénients majeurs de ces systèmes d'expression est leur faible niveau d'expression (moins de 5 % des protéines cellulaires totales).

I.B.2.a.3. Les champignons

En général, les champignons sont capables d'exprimer, à de hauts niveaux, diverses protéines, qu'ils sécrètent dans leur milieu extracellulaire. Cela est particulièrement avantageux en termes de purification ultérieure. Les champignons possèdent également la capacité de réaliser des MPT. Cependant, ces MPT vont différer des protéines d'origine naturelle entraînant, par exemple, des temps de vie plus courts ou des réactions immunologiques indésirables. Ces systèmes d'expression ne sont pas encore utilisés dans les industries pharmaceutiques.

I.B.2.a.4. Les cellules d'insectes et de plantes

Une grande variété de protéines a été produite, à l'échelle du laboratoire, dans des cellules d'insectes. Cette approche consiste généralement à infecter des cellules d'insectes (par exemple cellules de *Spodoptera frugiperda*) par un baculovirus portant le gène codant pour la protéine désirée. Ces systèmes baculovirus/cellules d'insectes présentent divers avantages : hauts niveaux d'expression (pouvant atteindre 30 à 50 % des protéines intracellulaires totales), croissance rapide et milieux de culture peu onéreux, absence d'agents pathogènes humains. Un des inconvénients est que les MPT générées peuvent être incomplètes ou différentes de celles des protéines humaines. De plus, l'infection par le virus peut provoquer la mort d'un certain nombre de cellules en culture.

Les protéines thérapeutiques peuvent également être exprimées dans des cellules de plantes. Cependant, à l'heure actuelle, une seule protéine recombinante issue de cellules de plantes a été mise sur le marché. Il s'agit d'une protéine produite dans une lignée cellulaire de racines de carotte (Walsh 2014). Le médicament appelé Elelyso, commercialisé par Pfizer, est préconisé dans le traitement de la maladie de Gaucher.

I.B.2.a.5. Les cellules de mammifères

La culture de cellules de mammifères est techniquement plus complexe et plus coûteuse que la fermentation des cellules microbiennes. On la réserve donc à la production de protéines thérapeutiques qui présentent des MPT essentielles à leur activité biologique. De nombreuses protéines thérapeutiques qui sont naturellement glycosylées (érythropoïétine, gonadotrophines, cytokines, anticorps monoclonaux) sont désormais produites dans des lignées de cellules animales telles que les cellules d'ovaires d'hamsters chinois (CHO), de reins de bébés hamsters (BHK), ou de reins d'embryons humains (HEK). La culture de cellules animales diffère de celle des cellules microbiennes par de nombreux aspects : milieux de culture plus complexes, durée de fermentation plus longue, fragilité accrue due à l'absence d'une barrière cellulaire externe, et coûts de production plus élevés. De plus, la glycosylation n'est pas identique en tous points à celle retrouvée chez les humains, et peut varier d'une lignée cellulaire à une autre.

I.B.2.a.6. Les plantes et animaux transgéniques

Des gènes étrangers peuvent être introduits dans des animaux (souris, lapins, cochons, brebis, chèvres et vaches) grâce à des techniques de clonage. La protéine souhaitée est alors exprimée dans divers liquides biologiques (sang, urine, lait). Le plus exploité actuellement est le lait. Durant la lactation, le lait est collecté afin d'en extraire la protéine d'intérêt. A titre d'exemple, l'interleukine-2 et le facteur IX ont pu être produits dans du lait de lapine et de brebis, respectivement (Walsh 2007), et la société LFB a quant à elle mis sur le marché une antithrombine recombinante (ATryn[®]) produite dans du lait de chèvre. L'avantage de cette technologie est que l'on peut produire de grandes quantités de protéines thérapeutiques à un moindre coût. Un des inconvénients est lié à la santé de l'animal. En effet, certaines protéines exprimées dans les glandes mammaires se retrouvent dans la circulation et provoquent des effets secondaires sur l'animal lui-même. Cela a été le cas lors de la production d'érythropoïétine (EPO) dans le lait de vache.

Les protéines thérapeutiques peuvent également être produites dans des plantes transgéniques. Par exemple, l'albumine de sérum humain recombinante a déjà été produite dans des pommes de terre, du tabac et du riz (Zhang 2013 a, He 2011 a). Selon les promoteurs utilisés, l'expression peut être obtenue uniformément dans toute la plante ou peut être limitée aux graines de végétaux, aux feuilles ou aux racines. Les plantes sont particulièrement intéressantes pour la production de protéines recombinantes car le coût des cultures de plantes est relativement faible et que ce sont des systèmes d'expression exempts d'agents pathogènes pour l'homme, mis à part les alcaloïdes. Cependant, des problèmes de stabilité génétique peuvent quelquefois survenir. De plus, la plupart des plantes contiennent des oxydases phénoliques qui peuvent endommager les protéines exprimées. D'autre part, les cultures de plantes nécessitent la construction de serres afin d'éviter la dissémination des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'environnement.

Le tableau 3 suivant est une synthèse des systèmes d'expression que nous venons de décrire, avec leurs caractéristiques respectives.

Tableau 3 : Comparaison des principaux systèmes d'expression utilisés pour produire des protéines recombinantes à visée thérapeutique (+, critère de qualité). Issu de Houdebine 2009.

| Points to consider | Production systems | | | | | |
|----------------------------------|--------------------|---------|----------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| | Bacteria | Yeast | Insect cells + baculovirus | Animal cells (CHO cells) | Transgenic plants | Transgenic animals |
| Theoretical production level | +++++ | +++++ | +++ | + | +++++ | +++++ |
| Practical production level | ++ (+) | ++ (+) | + | + | ++ | ++++ |
| Investment cost | +++++ | +++++ | ++ | + | ++++ | +++ |
| Production cost | +++++ | +++++ | ++ | ++ | +++++ | ++++ |
| Flexibility | +++++ | +++++ | ++ | + | +++++ | ++++ |
| Line conservation | +++++ | +++++ | +++ | +++ | +++++ | +++++ |
| Line stability | +++++ | +++++ | ++++ | +++ | +++++ | +++++ |
| Delay for the first production | +++++ | +++++ | +++ | +++++ | ++++ | +++ (+) |
| Scaling up | +++++ | +++++ | ++ | + | +++++ | ++++ |
| Collection | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | ++++ |
| Effect on organism | +++ (+) | +++ (+) | +++ (+) | +++ (+) | +++ (+) | +++ |
| Post-translational modifications | + | ++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ |
| Glycosylation | + | ++ | +++ | ++++ | ++ | ++++ |
| Stability of product | +++++ | +++++ | +++ | +++ | ++++ | ++++ |
| Purification | +++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | +++ |
| Contaminant pathogens | +++++ | +++++ | +++++ | ++++ | +++++ | ++++ |
| Intellectual property | ++++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| Products on the market | ++++ | +++ | +++ | +++++ | + | +++ |

I.B.2.b. Les différentes étapes de la production

La production de protéines recombinantes commence par le développement par génie génétique de la lignée cellulaire. Les plasmides contenant le gène d'intérêt sont tout d'abord transfectés chez des bactéries. Puis les plasmides sont sélectionnés, clonés et multipliés. Ils vont ensuite être utilisés pour transfecter la cellule hôte, formant ainsi les systèmes d'expression et la lignée cellulaire productrice. Ceci va permettre de créer des banques cellulaires (Mccue 2014). Celles-ci seront stockées dans l'azote liquide afin d'assurer leur stabilité. La banque de cellules appelée Master Cell Bank (MCB) est généralement dérivée du clone cellulaire sélectionné et contenant le gène d'expression. La banque de cellules de travail (WCB) est produite par l'expansion d'un ou plusieurs aliquots de la MCB. La phase initiale de la production (appelée *upstream process*) s'enclenche par la décongélation d'un aliquot de la banque de travail et sa mise en culture. Les étapes suivantes (*downstream process*) sont une succession d'opérations de filtration et de purification, qui sont divisées en deux grandes étapes : la purification primaire et la purification fine.

I.B.2.b.1. La clarification et la purification primaire

Après avoir été exprimées dans leurs cellules hôtes, puis soit sécrétées dans le surnageant de culture cellulaire soit produites à l'intérieur des cellules, les protéines recombinantes doivent être séparées du système biologique qui contient des particules en suspension (cellules entières ou lysats de cellules, et organites selon les cas). Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont la centrifugation et la filtration (ultrafiltration, diafiltration et microfiltration) (Crommelin 2008, Mccue 2014). La filtration permet de concentrer la biomasse avant l'étape de purification fine. La centrifugation est utile lorsque l'on veut séparer des particules cellulaires et organelles en suspension dans un milieu visqueux (par exemple particules provenant de cellules lysées par des procédés mécaniques). Des techniques de précipitation utilisant des agents chaotropiques (sulfate d'ammonium par exemple) peuvent également être employées. Ces techniques consistent à augmenter la force ionique du milieu afin de faire précipiter les protéines d'intérêt.

1.B.2.b.2. La purification fine

Pour purifier les protéines recombinantes et éliminer les protéines de la cellule hôte (HCP), ainsi que les virus pathogènes, diverses techniques sont utilisées de manière séquentielle, leur choix et leur ordre étant particulièrement important. Il s'agit de la chromatographie d'échanges d'ions, d'affinité, d'exclusion stérique, d'interactions hydrophobes, ou encore de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (Dave 2008, Mochizuki 2005). Par exemple, la chromatographie d'échange d'ions est une étape très utile en début de purification. Elle peut être utilisée en mode négatif, c'est-à-dire que ce sont les contaminants qui sont sélectivement retenus sur le support chromatographique et non la protéine d'intérêt. Certains agents pathogènes tels que le prion peuvent être éliminés de cette façon (Chou 2015). La chromatographie d'affinité est également une méthode très performante pour la purification des protéines, mais cette méthode est sensible aux contaminants et coûteuse. Elle n'intervient donc pas aux stades initiaux de la purification fine. Par exemple, on utilise des colonnes greffées avec des lectines pour purifier les glycoprotéines et des colonnes greffées avec des lysines pour purifier les sérine-protéases possédant des sites de liaison à la lysine. Dans le cas de l'AT, on utilise des colonnes d'affinité greffées avec de l'héparine (Mochizuki 2005). La chromatographie d'interactions hydrophobes intervient pour éliminer les formes mal repliées, tandis que la chromatographie d'exclusion stérique opère une purification selon la taille des protéines.

1.B.2.b.3. Les techniques de filtration

L'ultrafiltration est utilisée pour éliminer les composants de faible poids moléculaire (sels, alcools) et permet la concentration des solutions de protéines en continu. Ce procédé, relativement ancien, peut être réalisé de manière frontale ou tangentielle. La filtration en profondeur consiste à retenir des particules sur des filtres de cellulose, qui peuvent contenir des adjuvants comme la silice ou des terres diatomées (Brochure LFB 2011). La nanofiltration est une filtration développée plus récemment. Elle est réalisée sur des membranes dont le diamètre de pores est de l'ordre de 15 à 35 nanomètres. Elle permet d'éliminer les virus de petite taille, parmi lesquels se trouvent des virus très résistants. La nanofiltration fait partie des nouvelles technologies de rétention virale (Cai 2014). Elle est applicable à une large gamme de virus puisqu'elle dépend de la taille du virus et très peu du type de virus. Cette technique permet de conserver l'intégrité et l'efficacité des protéines.

I.B.2.b.4. Les méthodes d'inactivation et d'élimination virale

Afin d'assurer l'innocuité virale des protéines thérapeutiques, différents procédés d'inactivation et/ou d'élimination virale sont utilisés. Ces techniques doivent protéger les produits des virus pathogènes sans affecter leur activité biologique. Plusieurs techniques sont applicables en cours de fabrication ou sur le produit fini. Leur choix est particulièrement important puisque certaines ne sont efficaces que partiellement et donc insuffisantes quand utilisées seules.

Pour inactiver c'est-à-dire détruire les virus, on utilise des méthodes spécifiques telles que la pasteurisation ou le chauffage à sec, le traitement solvant/détergent ou encore le traitement « pepsine à pH acide ». Pour éliminer les virus, on a recours à la nanofiltration. Certaines méthodes utilisées au cours de la fabrication de la protéine thérapeutique peuvent également contribuer de manière significative à l'inactivation et/ou l'élimination des agents infectieux. Ces méthodes contributives sont la filtration en profondeur, l'ultrafiltration, la lyophilisation mais également certaines méthodes chromatographiques.

Pour illustrer les différentes étapes nécessaires à la production d'une protéine recombinante, la figure 4 page suivante représente de façon schématique les différentes étapes de la biosynthèse d'un interféron recombinant.

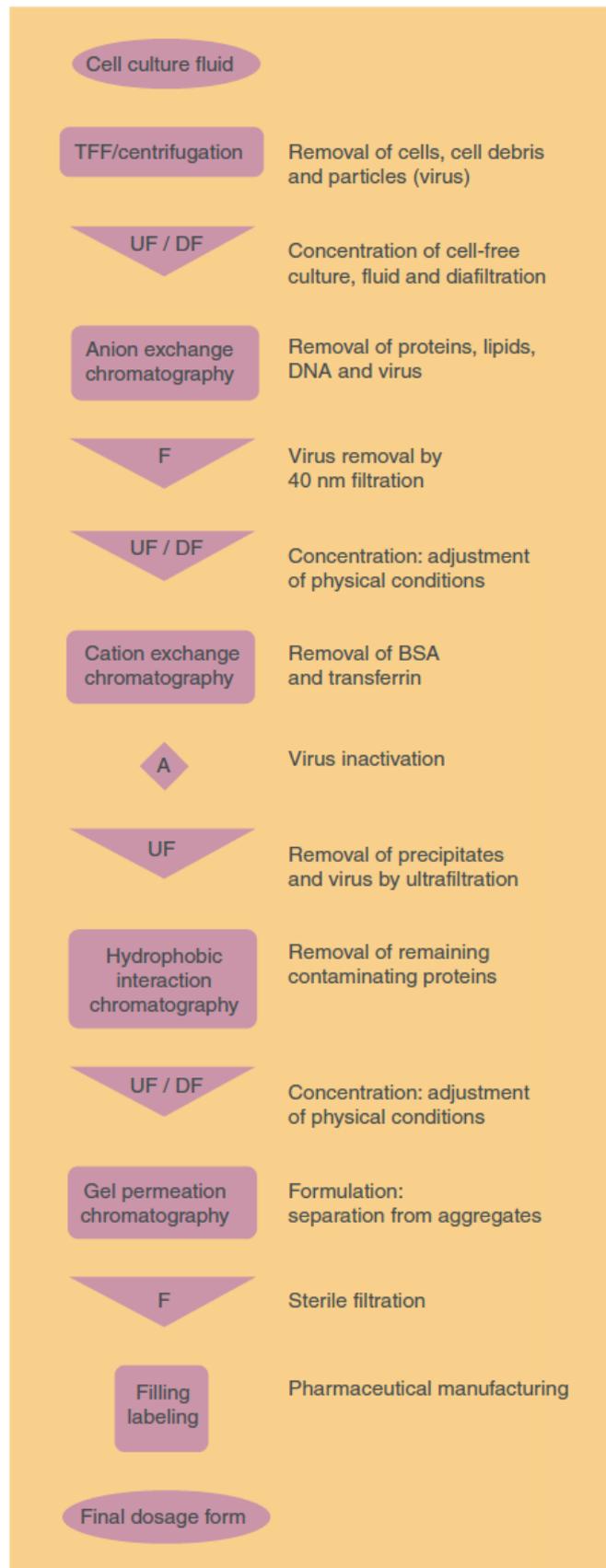


Figure 4 : Etapes du *downstream process* pour produire un interféron recombinant (F, filtration ; TFF, filtration frontale tangentielle ; UF, ultrafiltration ; DF, diafiltration). Issu de Crommelin 2008.

I.C. Les biosimilaires et les biobetters

Un biosimilaire est défini en Europe comme une copie d'un médicament biologique déjà autorisé, appelé produit de référence. Aux Etats-Unis, le terme employé n'est pas biosimilaire mais « follow-on biologic ». L'Agence européenne du médicament a publié des recommandations officielles pour les biosimilaires en 2005, et le premier biosimilaire d'anticorps monoclonal (« Hospira's Inflectra ») a été commercialisé en 2013 (Beck 2013 a, Creamer 2014). Aujourd'hui, étant donné que les brevets des principales protéines thérapeutiques arrivent à expiration, les grandes compagnies pharmaceutiques ou les starts-up sont libres de produire des biosimilaires.

Le principal problème dans la production d'un biosimilaire est de prouver que le médicament biosimilaire est la copie conforme de la protéine brevetée. Contrairement aux petites molécules pharmaceutiques, la composition des protéines thérapeutiques est fortement dépendante du procédé de fabrication (Shaltout 2014). Le moindre changement dans celui-ci peut avoir un impact considérable sur la qualité du médicament. Par exemple, la présence d'impuretés, de formes agrégées ou de MPT telles que la glycosylation peut entraîner des réactions immunologiques. La conformation de la protéine est également un facteur à prendre en compte étant donné qu'elle est souvent essentielle à sa fonction biologique. Ceci entraîne une difficulté supplémentaire dans la réalisation d'un biosimilaire en raison de la complexité de la structure d'une protéine (organisée en structures secondaire, tertiaire et parfois quaternaire). Il peut donc être très difficile de créer une copie conforme sans connaître de façon détaillée le procédé de fabrication de la molécule de référence.

Parmi les biosimilaires les plus commercialisés actuellement, nous pouvons citer l'érythropoïétine (12 % des ventes d'EPO sont des biosimilaires). L'EPO est une protéine qui présente une très grande hétérogénéité de glycosylation. Afin de différencier les nombreuses formulations d'EPO ou prouver la similarité entre la copie et la molécule originelle, Taichrib et al. ont comparé deux approches statistiques multivariées basées sur des données analytiques obtenues par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (Taichrib 2012). Les deux approches se sont révélées efficaces pour comparer une large gamme de protéines EPO issues de diverses techniques de production ou lignées cellulaires, mais également différents lots d'une même production entre eux. Les anticorps monoclonaux sont également visés par les fabricants de biosimilaires (Beck 2011). Par exemple, des

biosimilaires du rituximab, trastuzumab et infliximab ont été produits. Les anticorps monoclonaux sont caractérisés par une grande hétérogénéité de charge et de glycosylation et tout un panel de techniques analytiques doit donc être déployé pour caractériser au mieux ces protéines et leurs biosimilaires (Gahoual 2014 a, Espinoza de la Garza 2013).

Les « biobetters » sont une catégorie de médicaments qui contiennent des différences dans la structure primaire ou des différences majeures dans le schéma de glycosylation, comparé aux produits déjà commercialisés. Comme leur nom l'indique, les biobetters représentent des candidats médicaments idéaux pour traiter une pathologie spécifique, en améliorant l'efficacité ou la pharmacocinétique et pharmacodynamique, ou faciliter le mode d'administration. Ce sont des protéines recombinantes issues de la mutagenèse dirigée ou aléatoire. Les industries pharmaceutiques cherchent à réaliser des versions biobetters de protéines déjà sur le marché comme les anticorps monoclonaux. Par exemple, un variant glycosylé du trastuzumab, possédant la même séquence d'acides aminés que le trastuzumab mais portant une chaîne fucosylée, a démontré une plus grande activité cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses (Beck 2012). Des versions biobetters du cetuximab et bevacizumab avec des temps de vie augmentés ont également été développées. Des molécules cetuximab et bevacizumab mutées à deux endroits de la séquence peptidique du domaine Fc ont démontré des temps de vie augmentés d'un facteur cinq dans les souris transgéniques.

I.D. Présentation de l'albumine de sérum humain

L'albumine de sérum humain (HSA) est la protéine la plus abondante de la circulation sanguine. C'est une molécule qui a un rôle physiologique considérable, notamment dans le maintien de la pression oncotique intravasculaire et dans le transport de nombreuses substances endogènes et exogènes. En thérapeutique, elle est principalement utilisée pour traiter des hypovolémies et hypoalbuminémies sévères. Elle peut être administrée par exemple dans le cas du syndrome de Lyell et de l'ictère du nourrisson, mais également chez les femmes enceintes et les grands brûlés. La protéine médicament est produite généralement par fractionnement du plasma humain.

I.D.1. Structure de l'albumine

L'HSA est une protéine non glycosylée produite par le foie. Elle est composée de 585 acides aminés et sa masse moléculaire est de 66 kDa. Elle possède une structure tridimensionnelle compacte, stabilisée par 17 ponts disulfures (Fig. 5) (Carballal 2003). Sa structure secondaire est riche en hélices α (55 à 60 %) (Lin 2000). Elle comporte trois domaines, chacun constitué de deux sous-domaines A et B (avec 6 et 4 hélices α respectivement) (Fasano 2005) (Fig. 5). Par contre, elle ne possède pas de feuillets β . L'HSA possède une seule cystéine avec un groupement thiol libre, la Cys34. Certaines régions de la protéine sont connues pour leur affinité à des ligands exogènes ou endogènes (acides gras, bilirubine, hormones, métaux, médicaments...) (Oetl 2007, Fasano 2005). La figure 5 présente deux domaines de Sudlow : le domaine I, qui fixe des molécules telles que la warfarine, un anticoagulant, et le domaine II, qui fixe des molécules anti-inflammatoires telles que l'ibuprofène. Le site de fixation des métaux tels que le cuivre, le zinc ou le cobalt se situe sur le côté N-terminal de la molécule.

Le point isoélectrique (pI) de l'HSA est acide (entre 4,8 et 5,2). La charge électrique globale de l'albumine, qui résulte de la présence d'acides aminés chargés à la surface de la molécule, lui assure une hydrophilie élevée : 1 gramme d'albumine retient environ 15 à 18 mL d'eau (Bold 2010).

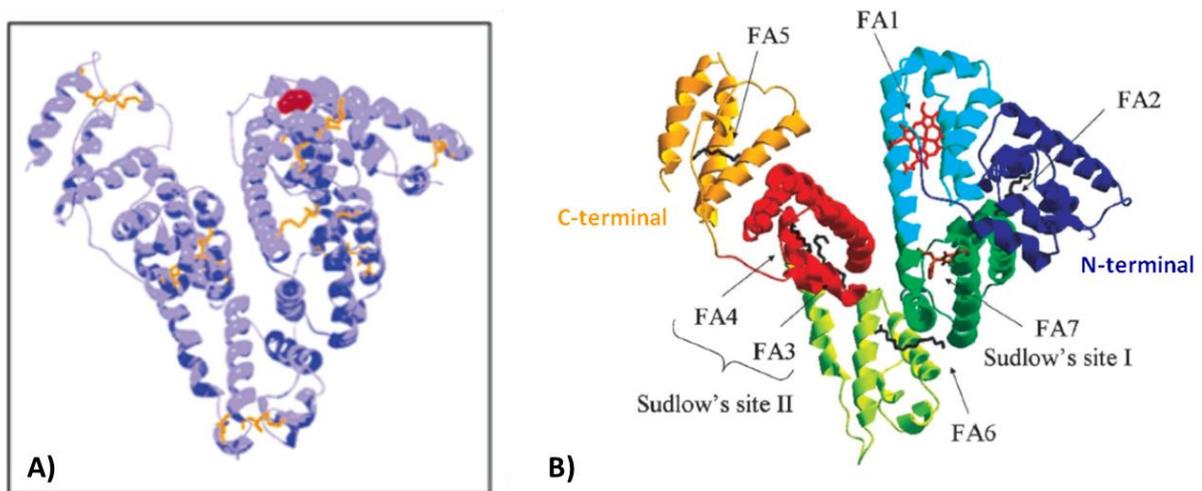


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de l'HSA. A) Représentation des ponts disulfures en orange et de la Cys34 en rouge. Issu de Carballal 2003. B) Les six différents sous-domaines de l'HSA : IA en bleu, IB en cyan, IIA en vert foncé, IIB en vert clair, IIIA en rouge, et IIIB en orange. Sont indiqués également les sites de Sudlow I (liaison à la warfarine) et II (liaison à l'ibuprofène). Les lettres FA représentent les sites de liaison aux acides gras. Adapté de Fasano 2005.

I.D.2. Fonctions biologiques de l'albumine

L'HSA est présente dans le plasma à une concentration de 42 g/L, ce qui représente environ 60 % des protéines plasmatiques totales (Walsh 2007). Elle possède un pouvoir oncotique très élevé puisqu'elle est responsable de plus de 80 % de la pression osmotique du sang. C'est une protéine très soluble et fortement concentrée, dont la masse et la rigidité l'empêchent de passer à travers les parois des vaisseaux sanguins. Son rôle dans le maintien de la volémie et de l'équilibre entre les compartiments plasmatique et interstitiel est essentiel.

L'albumine a également un rôle de transporteur (Oetl 2007, Fasano 2005). De nombreuses molécules endogènes ou exogènes se déplacent dans le système vasculaire sous forme liée à l'albumine. Ces molécules incluent les acides gras, les acides aminés, les hormones, les métaux lourds (cuivre, zinc) et de nombreux médicaments. Etant la plus importante des protéines de liaison, elle joue un rôle essentiel dans la régulation du profil thérapeutique de nombreux médicaments et dans leur biodistribution.

Mais ces propriétés biologiques ne s'arrêtent pas là. On lui reconnaît également des fonctions anti-oxydantes importantes, dues aux propriétés redox de sa Cys34 et à sa capacité de fixer des métaux lourds tels que le cuivre (Colombo 2012). La revue suivante, publiée dans le journal *Annals of Intensive Care* en 2013, présente de façon détaillée les propriétés thérapeutiques de l'albumine, en insistant notamment sur ses propriétés anti-oxydantes encore peu exploitées au niveau thérapeutique.

I.D.3. Article 1 : « Specific antioxidant properties of human serum albumin »

Annals of Intensive Care 2013, 3:4

Myriam Taverna^{1,2*}, Anne-Lise Marie^{1,2}, Jean-Paul Mira^{3,4,5} and Bertrand Guidet^{6,7,8}

¹ Université Paris Sud - Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France.

³ Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Universitaire Cochin-Broca-Hôtel Dieu, Medical Intensive Care Unit, 75014 Paris, France.

⁴ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, 75006 Paris, France.

⁵ Cochin Institute, INSERM U1016/CNRS UMR 8104, 75014 Paris, France.

⁶ Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Medical Intensive Care Unit, 75012 Paris, France.

⁷ Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, 75005 Paris, France.

⁸ INSERM, Unité de Recherche en Épidémiologie Systèmes d'Information et Modélisation (U707), 75012 Paris, France.

*Correspondence: myriam.taverna@u-psud.fr

Abstract

Human serum albumin (HSA) has been used for a long time as a resuscitation fluid in critically ill patients. It is known to exert several important physiological and pharmacological functions. Among them, the antioxidant properties seem to be of paramount importance as they may be implied in the potential beneficial effects that have been observed in the critical care and hepatological settings. The specific antioxidant functions of the protein are closely related to its structure. Indeed, they are due to its multiple ligand-binding capacities and free radical-trapping properties. The HSA molecule can undergo various structural changes modifying its conformation and hence its binding properties and redox state. Such chemical modifications can occur during bioprocesses and storage conditions of the commercial HSA solutions, resulting in heterogeneous solutions for infusion. In this review, we explore the mechanisms which are responsible for the specific antioxidant properties of HSA in its native form, chemically modified forms and commercial formulations. To conclude, we discuss the implication of this recent literature for future clinical trials using albumin as a drug and for elucidating the effects of HSA infusion in critically ill patients.

Keywords: Human serum albumin, Antioxidant force, Oxidized albumin, Critically ill patients.

Abbreviations: Cys, Cysteine; CZE, Capillary Zone Electrophoresis; GSH, Glutathione; HPLC, High-Performance Liquid Chromatography; HSA, Human Serum Albumin; ICU, Intensive Care Units; Met, Methionine; MS, Mass Spectrometry; NO, Nitric Oxid; RNS, Reactive Nitrogen Species; ROS, Reactive Oxygen Species; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Introduction

Clinically, Human Serum Albumin (HSA) is used for the restoration of blood volume, emergency treatment of shock, acute management of burns and other situations associated with hypovolemia [1]. Many studies have focused on the use of albumin as a resuscitation fluid and its effects on patient outcomes in Intensive Care Units (ICU). Some of them have revealed that use of either albumin or normal saline for resuscitation fluid results in similar outcomes [2]. Others have shown negative impacts: for example, in a prospective cohort

study, hyperoncotic albumin infusion was associated with harmful effects on renal function and outcome [3]. Conversely, other studies have demonstrated positive effects or beneficial trends of albumin infusion [4]. In a large controlled randomized trial, the administration of albumin may have decreased the risk of death in patients with severe sepsis compared to saline [5]. Furthermore, a randomized controlled trial in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis has shown that the addition of an albumin infusion to an antibiotic treatment significantly reduced the incidence of renal impairment and death [6]. The several meta-analyses assessing the effectiveness of albumin solutions for resuscitation in critically ill patients failed to clarify this issue [7-10]. In this context, the choice of a resuscitation fluid in ICU patients is still a conflicting matter under debate, and it is not the scope of the present review to provide an answer to this issue. Our objective is rather to highlight the mechanisms by which albumin might exert its potential beneficial effects in the critical care and hepatological settings.

Among the hypotheses that have been proposed to explain the positive effects of albumin, its antioxidant properties seem to be of paramount importance [11-14]. This hypothesis is supported by the central role of oxidative stress in critical pathologies such as sepsis or liver failure [1,15]. Indeed, the pathophysiology of sepsis may be characterized by the negative role of free radicals during the onset, progression and outcome of sepsis [16,17]. Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) exert their detrimental effects at least partially, through endothelial dysfunction with alterations of vascular tone, increased cell adhesion and vascular permeability [18,19]. The activation of endothelial cells contributes to maintain the oxidant-rich environment at the inflammatory locus [20]. Moreover, high levels of ROS and RNS can result in organ damages [21], the ROS amount being related to the severity of sepsis and mortality [20]. In the same way, oxidative stress is very high in cirrhotic patients and plays an important role in the pathophysiological mechanisms involved in the hemodynamic disturbances observed [16,22]. Indeed, excessive systemic Nitric Oxide (NO) production is involved in peripheral vasoplegia which induces portal hypertension, an important complication of cirrhosis [23]. The detrimental role of oxidative stress occurs during both the onset of hepatic alterations and during progression stages of the disease, in correlation with the severity of cirrhosis [24].

The detrimental role of oxidative damage in critical pathologies, added to the demonstration of potential positive effects of albumin infusion in these patients, constitute a strong rationale

that justifies for addressing the specific antioxidant capacities of HSA [11-14]. Our review summarizes the state of the art on this topic and focuses on the antioxidant properties of HSA related to (i) first its native form, (ii) the chemically modified-HSA (iii) the commercial HSA. The implication of this recent literature for future clinical trials using albumin as a drug is finally discussed.

Specific antioxidant capacities of native HSA

Albumin is a non-glycosylated protein of 66 kDa [25,26]; its normal plasma concentration is between 35 and 50 g/l constituting up to 60% of total plasma proteins [27]. Its half-life is ~ 20 days in normal conditions. The HSA structure consists of a single-chain polypeptide of 585 amino acid residues and about 67% alpha-helix and no beta-sheet [28,29]. Native HSA contains 6 methionines and 35 cysteine residues involved in the formation of 17 disulfide bonds. The Cys-34 residue is the only free cysteine in the whole molecule. HSA exerts specific antioxidant functions due to its multiple ligand-binding capacities and free radical-trapping properties, both closely related to its structure [16,29].

HSA antioxidant properties related to ligand-binding capacities

HSA is well known for binding a large variety of molecules including fatty acids, drugs, hormones and metal ions [27]. The main ligands of HSA implied in direct or indirect antioxidant functions of the protein are transition metal ions (copper and iron essentially) [15]. The high affinity site for Cu(II) ions is composed of the first four amino acids Asp-Ala-His-Lys (DAHK) from the N-terminus of HSA [30,31]. Free redox-active transition metal ions (Cu(II) and Fe(II)) can potentially be extremely pro-oxidant. Indeed, through the Fenton reaction, they can interact with hydrogen peroxide (H_2O_2) catalyzing the formation of aggressive ROS. The net result of the reaction sequence is known as the Haber-Weiss reaction, showing that iron and copper are the most important transition metals in human disease and play a key role in the production of hydroxyl radicals *in vivo* [30,32]. The binding of free transition metals to proteins can control their reactivity and limit their availability for the Fenton reaction [30,32]. HSA might then be able to limit damage caused by hydroxyl radicals produced from Fenton reaction between iron/copper and H_2O_2 [31].

Other aspects of the antioxidant activity of albumin result from its ability to bind bilirubin, homocysteine and lipids, but are of minor importance compared to metal ion involvement in HSA antioxidant properties. HSA contains one high affinity site (Lys240) for bilirubin [33]. The resulting HSA-bound bilirubin acts as an inhibitor of lipid peroxidation and thus represents an indirect antioxidant property of HSA [34]. Another aspect of HSA antioxidant properties is its capacity to bind homocysteine, a sulfur-containing amino acid resulting from the catabolism of methionine residue [35]. Some previous studies have suggested that the binding of HSA to polyunsaturated fatty acids and sterols could contribute to its antioxidant properties, by preventing lipid peroxidation. Additional studies are however needed to document this HSA protective capacity [36,37].

HSA antioxidant properties related to free radical-trapping properties

Upon secretion in physiological conditions, one-third of the HSA pool exists as disulfides mixed with cysteine, homocysteine or glutathione (GSH) (HSA-S-S-R) and two-thirds of the HSA molecules exist in a reduced form with a free thiol in the Cys-34 residue (HSA-SH), known as human mercaptalbumin [37,38]. This redox thiol group, in connection with the high concentration of HSA in the circulation, accounts for 80% thiols in plasma, constituting the major extracellular source of reactive free thiol [16,25,39]. Working as a free radical scavenger, the Cys34 residue is able to trap multiple ROS and RNS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^-$), superoxide or hypochlorous acid ($HOCl$) [15,16,40]. Under oxidative stress by peroxynitrite or hydrogen peroxide, Cys34 thiol shifts to an exposed conformation and is oxidized itself resulting in sulfenic acid (HSA-SOH) formation. HSA-SOH is a central intermediate in the redox modulation by reactive species. The final outcome of the oxidative process depends on whether the sulfenic acid is further oxidized, or whether it is reduced leading to the initial HSA-SH. Sulfenic acid may be oxidized to either sulfinic (HSA-SO₂H) or sulfonic (HSA-SO₃H) acids, by usually irreversible processes leading to end products [41,42]. Sulfenic acid can also be converted into a disulfide (HSA-S-S-R), through reactions with low-molecular-mass-thiol (RSH, glutathione or free cysteine) allowing the return to the HSA-SH reduced form [37,43]. This HSA implication in disulfides formation supports a relevant function of HSA-SH as an extracellular redox regulator (Fig. 1) [42]. HSA could also protect cells against oxidative stress by modulating the cellular GSH level. Indeed, catabolism of HSA could potentially represent a source of sulfur-containing amino acids for cells in the synthesis of thiol-containing molecules such as GSH [44].

Under nitrosative stress by NO or other nitrosylating agents, mercaptalbumin can be converted into nitroso-HSA (HSA-S-NO) [37]. HSA-S-NO can transfer the nitrosonium cation to low-molecular-mass-thiol RSH (glutathione or free cysteine). The HSA-mediated catalysis of RSH allows the return to the HSA-SH form and makes the protein a major reservoir of NO (Fig. 1) [37,45].

As cysteine amino acid, methionine is also a sulfur-containing residue, representing an oxidation-sensitive amino acid [46,47]. HSA contains 6 methionines residues which can be oxidized leading to methionine sulfoxide [48].

The two sulfur-containing residues in HSA, Met and Cys, have then been proved to account for 40-80% of the total antioxidant activity of the protein which is responsible for more than 70% of the free radical-trapping activity in serum [28,46,47]. In conclusion, HSA is considered as the main extracellular molecule responsible for maintaining the plasma redox state [11,37,49].

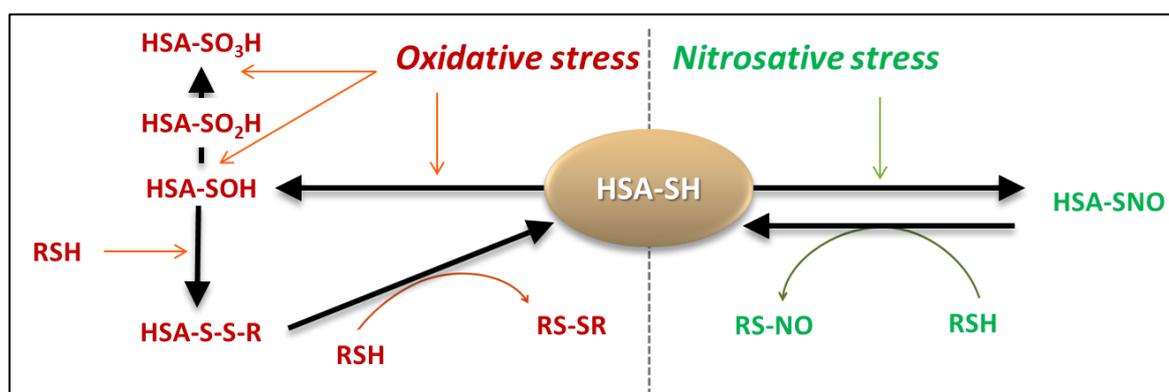


Fig.1. Scheme gives an overview of the steps leading to Cys-34 oxidation and thiolation (highlighted in red). Steps involved for the nitrosylation of Cys-34 of human serum albumin (HSA) are highlighted in green. Formation of higher oxidation states of HSA is also shown. RSH, glutathione or free cysteine.

Impairments of specific antioxidant capacities of HSA

The various structural modifications that HSA can undergo during its *in vivo* life time or during the processes employed to isolate therapeutic HSA from plasma, modify not only its conformation and hence its binding properties but also its redox state [16,50,51]. Kawakami *et al.* have clearly shown that reduced HSA and oxidized HSA have different ligand-binding properties [50]. These authors have also investigated the potential effect of oxidation on the

antioxidant capacity of HSA by comparing the radical scavenging activities of HSA in various states of oxidation [50]. By using electron spin resonance, they have observed that the hydroxyl radical signal is reduced from 68.7% with highly oxidized cysteinylated HSA (proportion of HSA reduced = 8%) to 54.4% with non-oxidized HSA (proportion of HSA reduced = 73%). They have then demonstrated that the radical scavenging activity of reduced HSA is greater than that of cysteinylated HSA [50]. Those results are in accordance with other reports establishing that oxidized HSA decreases scavenging ability against highly ROS (hydroxyl radicals). Similarly, HSA nitrosylation leads to a significant loss of its buffering capacity [52]. Moreover, the loss of aspartate-alanine from the N-terminus of albumin completely abolishes the ability of albumin to chelate free copper and is associated with the loss of its free radical scavenging ability [52]. Finally, Iwao *et al.* (2006) demonstrated that oxidation of several amino acids of albumin had an impact on its pharmacokinetics by decreasing its half-life [53].

Beyond oxidation and nitrosylation, HSA may undergo other chemical modifications affecting its structure which is closely related to its specific antioxidant properties [27]. One of them is a non-enzymatic glycation consisting in the attachment of free carbohydrate (glucose, galactose, fructose...) on an amine residue leading to the formation of a stable fructosamine residue [54]. Accumulation of numerous studies has permitted to identify up to 29 sites that can be glycated *in vivo* in the HSA [34]. Due to their high nucleophile properties, lysine, arginine and cysteine are the main residues prone to glycation and the two principal sites are Arg410 and Lys525 [55,56]. Glycation-induced modifications have an important impact on HSA functional properties mainly related to alteration of its conformation. These conformational changes affect HSA binding properties since affinity of glycated HSA for different ligands (long chain fatty acids, bilirubin, copper) undergoes an important decrease [57]. Therefore, through these various processes, the antioxidant capacities of glycated HSA are dramatically reduced [54,58,59].

In physiological conditions, due to the large amount of HSA in plasma, impairments in the protein molecule and its antioxidant properties have been considered as biologically insignificant [31]. However, antioxidant properties of modified HSA may be related to pathological conditions in particular in septic and cirrhotic conditions in which the decline of HSA plasma antioxidant force is also mediated by the quantitative reduction of the HSA concentration [16,20,28,60].

Specific antioxidant capacities of commercial HSA

The finding that HSA exerts a plasma antioxidant force is also important regarding its possible therapeutic effects, as it may provide the opportunity to enhance endogenous antioxidant protection in pathological conditions by HSA infusion [61]. Commercially available HSA solutions are complex products that contain not only native HSA but also various species of HSA under different redox states, as well as several minor degradation products [46,62]. Significant HSA variability has been reported between the commercial HSA solutions (Table 1). Bioprocesses and storage conditions increase heterogeneity of HSA: truncated, cysteinylated, nitrosylated and glycated forms or HSA-HSA dimers may be found in commercialized products [29]. These frequently encountered modifications can change HSA antioxidant properties and its binding capacity to endogenous or exogenous molecules [29,51,63]. The observed heterogeneity can also potentially influence clinical outcome and should be correlated with morbidity/mortality in randomized trials [47,63,64]. The use of an antioxidant in the treatment of sepsis has been considered as a new interesting adjunctive therapy and constitutes a challenge in the clinical management of these patients [17]. However, it is still unclear if the administration of commercially available HSA that is largely oxidized, increases or decreases oxidative stress burden in critically ill patients [52].

Until now, several analytical techniques have been employed to monitor the heterogeneity or the degradation profiles of HSA. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Mass Spectrometry (MS), Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analyses, or Capillary Zone Electrophoresis (CZE) have contributed to point out this heterogeneity of commercial HSA [51,62]. Aggregation or chemical degradation can be induced during sample preparation or purification. Procedures such as temperature variations, freeze-thawing process, mechanical agitation or lyophilisation may affect HSA structure and composition of therapeutic HSA. Anraku *et al.* studied the protective effect of sodium N-acetyl-L-tryptophanate against albumin oxidation, using HPLC. They partially resolved mercaptalbumin (reduced form of HSA) from two populations of non-mercaptalbumin (oxidized forms), demonstrating that it is possible to improve the quality of the solutions [65]. Ogasawara *et al.* used SDS-PAGE and Western blot analyses to detect albumin disulfide dimers in plasma, considered to be a biomarker of oxidative stress [66]. More recently, Qian *et al.* (2008) reported a size exclusion HPLC method to estimate the

proportion of HSA dimers and oligomers suitable for a quality control [67]. MS and MS coupled to HPLC have also been employed to characterize different variants of HSA in commercial HSA preparations. In particular, six related proteins have been identified but the method provided only qualitative data and did not detect any dimer form of HSA [52]. Finally, Alahmad *et al.* developed a reproducible CZE method to separate HSA from most of its variants. This method proved to be useful in detecting quantitative differences in the proportion of native HSA present in batches produced according to different fractionation ways [51]. As an increased percentage of oxidized HSA is responsible for impaired HSA functions [28], the development of a reliable method providing qualitative and quantitative data on HSA variants in commercial preparations, especially the ratio of native HSA to degraded forms, is of paramount importance for optimizing the clinical use of HSA.

Table 1: Characteristics of commercial HSA (available solutions for infusion in France) [29]

| | Human Albumin Baxter 200 g/l[®] | Albunorm[®] | Vialebex[®] |
|-------------------------|---|--|--|
| Manufacturer | Baxter | Octapharma | LFB |
| Available presentations | <i>Newborns and infants:</i> | | |
| | | | 20% (200 mg/ml): 10 ml vial (2 g) |
| | <i>Adults:</i> | | |
| | 20% (200 mg/ml): 50 ml vial (10 g) 100 ml vial (20 g) | 20% (200 mg/ml): 50 ml vial (10 g) 100 ml vial (20 g) | 20% (200 mg/ml): 50 ml vial (10 g) 100 ml vial (20 g) |
| | 5% (50 mg/ml): 100 ml vial (5 g) 250 ml vial (12.5 g) 500 ml vial (25 g) | 5% (50 mg/ml): 250 ml vial (12.5 g) 500 ml vial (25 g) | |
| | 4% (40 mg/ml): 100 ml vial (4 g) 250 ml vial (10 g) 500 ml vial (20 g) | 4% (40 mg/ml): 100 ml vial (4 g) 250 ml vial (10 g) 500 ml vial (20 g) | |
| Indications (EMA) | Restoration and maintenance of circulating blood volume where volume deficiency has been demonstrated and the use of a colloid is appropriate. The choice of albumin rather than an artificial colloid will depend on the clinical situation of the individual patient, based on official recommendations | | |

Implications for further studies

As we have previously mentioned, studies using HSA as a resuscitation fluid have shown conflicting results in septic and cirrhotic conditions. The relative contribution of resuscitation fluid capacity and antioxidant properties should be further investigated since it may influence the design of future trials. As a matter of fact, the rationale for infusing HSA was different in recent albumin trials and that may account for different results. Should we rely on albuminemia and at what threshold: 30 g/l, or specific plasma concentrations (thiols, markers of ROS aggression...)? The clinical studies have used different quantities of HSA infusion and various commercial forms of HSA. Regarding the HSA quality, it is well established that significant variability exists between the different commercial HSA solutions. They contain native HSA associated with various species of HSA in different redox states. They also contain several minor degradation products [47,63]. These modifications are known to change the antioxidant capacities of HSA and may account for the observed heterogeneity in the results of clinical trials [29,46,51,63,64]. It would be interesting to conduct an analysis correlating, for each clinical trial, the qualitative and quantitative characteristics of HSA infusion with the observed results in critically ill patients.

Moreover, the main characteristics of commercially available HSA should be tested *in vitro* since they may differ from one product to another with different *in vivo* effect. The elucidation of the composition of commercialized HSA used in critically ill patients, with particular attention to the oxidized forms of HSA, is of great interest for the understanding of the observed variability in the results of clinical trials.

Finally, it is relevant to pursue the investigations concerning HSA antioxidant functions in physiological and pathophysiological conditions. Accumulative evidence suggests that HSA may interfere with microcirculation and endothelium function through an interaction with glycocalyx and specific antioxidant properties [68]. As a consequence, monitoring of endothelial function and microcirculation may guide HSA administration and contribute to the optimization of tissue perfusion in septic shock. The preliminary results of the Albios trial (presented orally at the ESICM meeting in Lisbon October 2012) suggest that HSA was effective in the subgroup of patients with the most severe form of sepsis that is septic shock. Future trials should probably focus on that specific high risk population [69].

Conclusions

It is well established that, among plasma antioxidants, endogenous HSA is considered as the main extracellular molecule responsible for maintaining the plasma redox state [16,29]. Its specific antioxidant functions are due to its multiple ligand-binding capacities and free radical-trapping properties and are closely related to the structure and the redox state of the molecule [16,29]. Some clinical studies have revealed positive effects or beneficial trends of HSA infusion [4,5]. Importantly, these trials have been conducted in critical pathologies in which oxidative stress plays a central detrimental role [1,15]. It seems then relevant to consider that the specific antioxidant properties of the HSA molecule are involved in the positive therapeutic effects of HSA infusion, reported in the critical care and hepatological setting. In this hypothesis, using HSA as a resuscitation fluid could represent an opportunity to enhance endogenous antioxidant protection in critical pathological conditions [1,61]. As an increased percentage of oxidized HSA is responsible for impaired HSA functions [50], we propose that preference should be given to preparations with a higher reduced HSA percentage.

Competing interests

Pr Myriam Taverna, Anne-Lise Marie and Pr Bertrand Guidet have received honorarium from LFB Biomédicaments and Fresenius Kabi. Pr Jean-Paul Mira has received honorarium from LFB Biomédicaments and Baxter.

Authors' contributions

All authors contributed to the drafting of the manuscript and approved the final version.

Acknowledgements

This review article was supported by LFB Biomedicaments. We would like to thank Julie Marc for editorial assistance in the preparation of the manuscript.

References

1. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P: **Human serum albumin: from bench to bedside.** *Mol Aspects Med* 2012, **33**:209-290.
2. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R; SAFE Study Investigators: **A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit.** *N Engl J Med* 2004, **350**:2247-2256.
3. Schortgen F, Girou E, Deye N, Brochard L; CRYCO Study Group: **The risk associated with hyperoncotic colloids in patients with shock.** *Intensive Care Med* 2008, **34**:2157-2168.
4. Dubois MJ, Orellana-Jimenez C, Melot C, De Backer D, Berre J, Leeman M, Brimiouille S, Appoloni O, Creteur J, Vincent JL: **Albumin administration improves organ function in critically ill hypoalbuminemic patients: a prospective, randomized, controlled, pilot study.** *Crit Care Med* 2006, **34**:2536-2540.
5. SAFE Study Investigators, Finfer S, McEvoy S, Bellomo R, McArthur C, Myburgh J, Norton R: **Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis.** *Intensive Care Med* 2011, **37**:86-96.
6. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, Castells L, Vargas V, Soriano G, Guevara M, Gines P, Rodes J: **Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis.** *N Engl J Med* 1999, **341**:403-409.
7. Tollefson BJ, Jones AE: **Does resuscitation with albumin-containing solutions improve mortality in sepsis?** *Ann Emerg Med* 2012, **59**:432-433.
8. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, Finfer S: **The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis.** *Crit Care Med* 2011, **39**:386-391.
9. Vincent JL, Navickis RJ, Wilkes MM: **Morbidity in hospitalized patients receiving human albumin: a meta-analysis of randomized, controlled trials.** *Crit Care Med* 2004, **32**:2029-2038.
10. Perel P, Roberts I: **Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients.** *Cochrane Database Syst Rev* 2012, **6**:CD000567.
11. Quinlan GJ, Margaron MP, Mumby S, Evans TW, Gutteridge JM: **Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion.** *Clin Sci (Lond)* 1998, **95**:459-465.
12. Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JM, Evans TW: **Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury.** *Crit Care Med* 2004, **32**:755-759.
13. Jain RK, Chakravorty N, Chakravorty D, Bhattacharya PK, Yadava A, Agarwal RC: **Albumin: an overview of its place in current clinical practice.** *Indian J Anaesth* 2004, **48**:433-438.

14. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Bourlet T, Illouz E, Benmaadi A: **Modulation of oxidative stress and microinflammatory status by colloids in refractory dialytic hypotension.** *BMC Nephrol* 2011, **12**:58.
15. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E: **The antioxidant properties of serum albumin.** *FEBS Lett* 2008, **582**:1783-1787.
16. Oetl K, Stauber RE: **Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties.** *Br J Pharmacol* 2007, **151**:580-590.
17. Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F: **The role of free radicals in sepsis development.** *Front Biosci* 2009, **1**:277-287.
18. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J: **Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis.** *Front Biosci* 2011, **16**:1986-1995.
19. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G: **The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis.** *Intensive Care Med* 2010, **36**: 1286-1298.
20. Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaut E, Mira JP, Duranteau J: **Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock.** *Crit Care Med* 2007, **35**:821-826.
21. Galley HF: **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis.** *Br J Anaesth* 2011, **107**:57-64.
22. Parola M, Robino G: **Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis.** *J Hepatol* 2001, **35**:297-306.
23. Izzet T, Osman K, Ethem U, Nihat Y, Ramazan K, Mustafa D, Hafize U, Riza KA, Birsen A, Habibe G, Seval A, Gonul S: **Oxidative stress in portal hypertension-induced rats with particular emphasis on nitric oxide and trace metals.** *World J Gastroenterol* 2005, **11**:3570-3573.
24. Lieber CS: **Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases.** *Adv Pharmacol* 1997, **38**:601-628.
25. Peters T Jr: **Serum albumin.** *Adv Protein Chem* 1985, **37**:161-245.
26. Carter DC, Ho JX: **Structure of serum albumin.** *Adv Protein Chem* 1994, **45**:153-203.
27. Peters TJ: **All about albumin.** *Academic press San diego* 1996.
28. Otagiri M, Chuang VT: **Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin.** *Biol Pharm Bull* 2009, **32**:527-534.
29. Guidet B: **Albumin. Acute circulatory failure.** In *Réanimation*. Edited by Richard C, Teboul JL, Vincent JL: Elsevier; 2009:343-356.

30. Stohs SJ, Bagchi D: **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** *Free Radic Biol Med* 1995, **18**:321-336.
31. Halliwell B: **Albumin-an important extracellular antioxidant?** *Biochem Pharmacol* 1988, **37**:569-571.
32. Young IS, Woodside JV: **Antioxidants in health and disease.** *J Clin Pathol* 2001, **54**:176-186.
33. Jacobsen C: **Lysine residue 240 or human serum albumin is involved in high-affinity binding of bilirubin.** *Biochem J* 1978, **171**: 453-459.
34. Neuzil J, Stocker R: **Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for a-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation.** *J Biol Chem* 1994, **269**:16712-16719.
35. Papatheodorou L, Weiss N: **Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia.** *Antioxid Redox Signal* 2007, **9**:1941-1958.
36. Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanar-aman B, Freeman BA: **Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives.** *Arch Biochem Biophys* 1995, **324**:15-25.
37. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW: **Albumin: biochemical properties and therapeutic potential.** *Hepatology* 2005, **41**:1211-1219.
38. Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I: **Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **17**:1515-1527.
39. King TP: **On the sulfhydryl group of human plasma albumin.** *J Biol Chem* 1961, **236**:PC5.
40. Gutteridge JM: **Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis.** *Biochim Biophys Acta* 1986, **869**:119-127.
41. Turell L, Botti H, Carballal S, Ferrer-Sueta G, Souza JM, Durán R, Freeman BA, Radi R, Alvarez B: **Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin.** *Biochemistry* 2008, **47**:358-367.
42. Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B: **Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite.** *Biochemistry* 2003, **42**:9906-9914.
43. Turell L, Carballal S, Botti H, Radi R, Alvarez B: **Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment.** *Braz J Med Biol Res* 2009, **42**:305-311.

44. Cantin AM, Paquette B, Richter M, Larivée P: **Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**:1539-1546.
45. Rafikova O, Rafikov R, Nudler E: **Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:5913-5918.
46. Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D: **Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin.** *Free Radic Res* 2005, **39**:15-20.
47. Bourdon E, Blache D: **The importance of proteins in defense against oxidation.** *Antioxid Redox Signal* 2001, **3**:293-311.
48. Berlett BS, Stadtman ER: **Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.** *J Biol Chem* 1997, **272**:20313-20316.
49. Holt ME, Ryall ME, Campbell AK: **Albumin inhibits human polymorphonuclear leucocyte luminol-dependent chemiluminescence: evidence for oxygen radical scavenging.** *Br J Exp Pathol* 1984, **65**:231-241.
50. Kawakami A, Kubota K, Yamada N, Tagami U, Takehana K, Sonaka I, Suzuki E, Hirayama K: **Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions.** *FEBS J* 2006, **273**:3346-3357.
51. Alahmad Y, Tran NT, Le Potier I, Forest E, Jorieux S, Taverna M: **A new CZE method for profiling human serum albumin and its related forms to assess the quality of biopharmaceuticals.** *Electrophoresis* 2011, **32**:292-299.
52. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Gardner DK, Slone DS, Craun ML: **Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use.** *Crit Care Med* 2005, **33**:1638-1641.
53. Iwao Y, Anraku M, Yamasaki K, Kragh-Hansen U, Kawai K, Maruyama T, Otagiri M: **Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1764**:743-749.
54. Rondeau P, Bourdon E: **The glycation of albumin: structural and functional impacts.** *Biochimie* 2011, **93**:645-658.
55. Iberg N, Fluckiger R: **Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites.** *J Biol Chem* 1986, **261**:13542-13545.
56. Ahmed N, Dobler D, Dean M, Thornalley PJ: **Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity.** *J Biol Chem* 2005, **280**:5724-5732.
57. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF: **Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function.** *J Biol Chem* 1984, **259**:3812-3817.

58. Rondeau P, Singh N, Caillens H, Bourdon E: **Oxidative stresses induced by glycated human or bovine serum albumins on human monocytes.** *Free Radic Biol Med* 2008, **45**:799-812.
59. Sakata N, Moh A, Takebayashi S: **Contribution of superoxide to reduced antioxidant activity of glycoxidative serum albumin.** *Heart Vessels* 2002, **17**:22-29.
60. Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, Slone DS, Craun ML: **The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient.** *Clin Chim Acta* 2006, **365**:346-349.
61. Evans TW: **Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure.** *Aliment Pharmacol Ther* 2002, **16**(Suppl 5):6-11.
62. Flan B: **Quality control of human albumin solutions.** *Ann Fr Anesth Reanim* 1996, **15**:547-552.
63. Otagiri M, Kragh-Hansen U, Imai T: **Albumins with new functions and clinical applications.** *Drug Metab Pharmacokinet* 2009, **24**:285-286.
64. Bar-Or D, Thomas GW, Bar-Or R, Rael LT, Scarborough K, Rao N, Shimonkevitz R: **Commercial human albumin preparations for clinical use are immunosuppressive in vitro.** *Crit Care Med* 2006, **34**:1707-1712.
65. Anraku M, Kouno Y, Kai T, Tsurusaki Y, Yamasaki K, Otagiri M: **The role of N-acetylmethionine as a new stabilizer for albumin products.** *Int J Pharm* 2007, **329**:19-24.
66. Ogasawara Y, Namai T, Togawa T, Ishii K: **Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **340**:353-358.
67. Qian J, Tang Q, Cronin B, Markovich R, Rustum A: **Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of Human Serum Albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b.** *J Chromatogr A* 2008, **1194**:48-56.
68. Kremer H, Baron-Menguy C, Tesse A, Gallois Y, Mercat A, Henrion D, Andriantsitohaina R, Asfar P, Meziani F: **Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties.** *Crit Care Med* 2011, **39**:1414-1422.
69. Gattinoni L: **Albumin in Severe Sepsis and Septic Shock: the ALBIOS Study.** *ESICM 25th annual congress*, 13-17 October 2012. Oral communication.

I.E. Présentation de l'antithrombine

L'antithrombine (AT) est une protéine plasmatique possédant notamment des propriétés anticoagulantes. A l'heure actuelle, on l'utilise en thérapeutique pour soigner des troubles de la coagulation. Le mode d'obtention de cette protéine thérapeutique le plus couramment utilisé est le fractionnement du plasma humain, mais depuis quelques années la société LFB a mis sur le marché une AT recombinante (ATryn[®]), produite par transgénèse animale au sein de sa filiale américaine GTC.

I.E.1. Origine et fonctions biologiques

L'AT est une glycoprotéine plasmatique produite essentiellement par le foie (Hepner 2013). C'est l'un des principaux inhibiteurs physiologiques de la coagulation. Elle fait partie de la famille des inhibiteurs des sérine-protéases (SERPINs) (Huntington 2003). Elle circule dans le sang à une forte concentration (2-4 μ M) et inhibe de nombreuses sérine-protéases de la coagulation, notamment les facteurs IIa (la thrombine), Xa et IXa (Fig. 6) (Borgel 2013). Le mécanisme d'inhibition est le même pour chaque enzyme et consiste en la formation d'un complexe équimoléculaire, enzyme-inhibiteur, dans lequel l'enzyme est inactivée (Boyer-Neumann 1987). La formation de ces complexes implique une liaison covalente entre le site sérine des protéases et le site actif de l'AT (Arg393-Ser394) situé dans la partie C-terminale de la molécule.

L'inhibition des sérine-protéases par l'AT, relativement lente, est fortement accélérée par l'héparine, un glycosaminoglycane (GAG) polysulfaté (Huntington 2003, Desai 1998, Olson 1992). L'héparine, extraite par exemple des muqueuses intestinales de porc, a été la première utilisée en thérapeutique comme anticoagulant puisqu'elle potentialise l'effet anticoagulant de l'AT. A l'heure actuelle, on utilise plutôt des héparines de bas poids moléculaire (HBPM) ou du fondaparinux (un pentasaccharide synthétique). *In vivo*, des analogues structuraux de l'héparine sont présents à la surface des cellules endothéliales, il s'agit des héparans sulfates (Huntington 2003). Cette variété de GAG possède le motif pentasaccharidique de l'héparine, acteur majeur de son activité anticoagulante. Il est communément admis que les héparans sulfates pourraient jouer un rôle dans la régulation de la coagulation *in vivo*, étant donné qu'ils potentialisent l'activité inhibitrice de l'AT *in vitro* (Levi 2008).

En plus de son rôle dans la régulation de la coagulation, d'autres activités biologiques de l'AT ont été décrites, notamment un effet anti-angiogénique (O'Reilly 2007, Zhang 2006 a, Larsson 2001) et un effet anti-inflammatoire (Borgel 2013, Levi 2008, Wiedermann 2002, Okajima 1998).

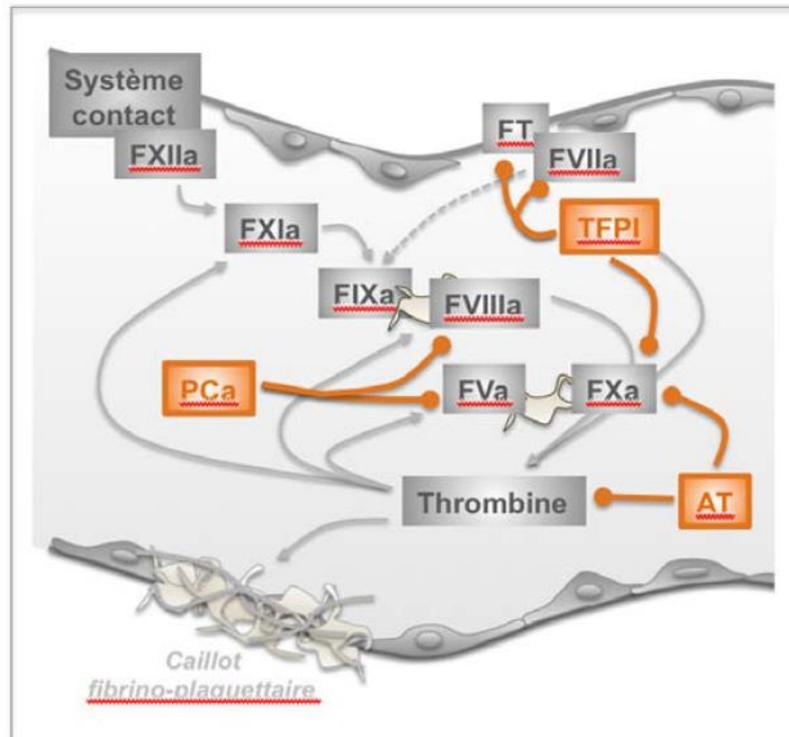


Figure 6 : Régulation de la coagulation par ses principaux inhibiteurs physiologiques. Les flèches terminées par une sphère symbolisent une inhibition. AT, antithrombine ; FT, facteur tissulaire ; PCa, protéine C activée ; TFPI, « tissue factor pathway inhibitor ». Issu de Borgel 2013.

I.E.2. Structure primaire et glycosylation

L'antithrombine (AT) est une glycoprotéine composée de 432 acides aminés dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par trois ponts disulfures (Cys8-Cys128, Cys21-Cys95, Cys247-Cys430) (Zhou 1990). Deux groupes de glycoformes existent : les glycoformes α -AT (MW ~ 58 kDa), formes plasmatiques majoritaires, et les glycoformes β -AT (MW ~ 56 kDa), qui possèdent une chaîne glycane en moins et représentent moins de 10 % de l'AT circulante chez l'homme (Kleinova 2004). La partie protéique de l'AT représente environ 85-87,5 % de sa masse moléculaire (soit ~ 49 kDa). Quatre sites consensus de N-glycosylation sont présents sur la protéine en position 96, 135, 155 et 192. Au cours de ces dernières années, de nombreuses glycoformes de l'AT ont été caractérisées (Plematl 2005, Demelbauer 2005,

Demelbauer 2004 a). Certaines proviennent de la perte d'acides sialiques en bout de chaînes glycanes. D'autres sont des glycoformes tri-antennées en position N135 ou N155. Enfin, une fucosylation en position N155 a également été décrite (Fig. 7). Chacune de ces glycoformes possède un point isoélectrique (pI) différent, variant de 4,7 à 5,4 (Kremser 2003).

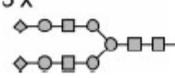
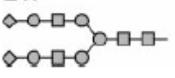
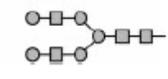
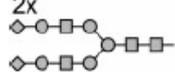
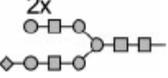
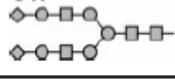
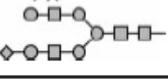
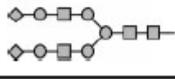
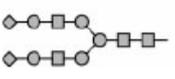
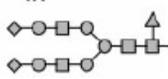
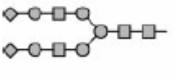
| Symbol | Glycans | |
|---------------------|--|---|
| β -AT | 3 x  | |
| β -AT(+ fuc) | 2 x  | 1 x  |
| α -AT(-2SA) | 3 x  | 1 x  |
| | 2x  | 2x  |
| α -AT(-1SA) | 3 x  | 1 x  |
| α -AT | 4 x  | |
| α -AT(+ fuc) | 3 x  | 1x  |
| α -AT(1tri) | 3 x  | 1 x  |

Figure 7 : Quelques exemples de glycoformes de l'AT plasmatique. SA, acide sialique ; fuc, fucose ; tri, tri-antennée (losange, acide sialique ; rond, hexose ; carré, N-acétylhexosamine ; triangle, fucose). Adapté de Demelbauer 2004 a).

Il a été démontré que la glycosylation de l'AT peut modifier sa liaison à l'héparine et donc avoir un impact sur son activité anticoagulante (Pol-Fachin 2011). Par exemple, l'absence d'une chaîne glycanes, comme c'est le cas dans la forme β -AT, augmente l'affinité à l'héparine et donc l'effet anticoagulant (McCoy 2003, Turk 1997). Une fucosylation réduirait au contraire l'affinité pour l'héparine (Garone 1996).

I.E.3. Les différents conformères et dimères de l'antithrombine

Comme toutes les serpins, la forme native de l'AT est thermodynamiquement instable et subit des réarrangements conformationnels afin d'adopter des conformations beaucoup plus stables. Deux conformères de l'AT ont été décrits : la forme latente et la forme clivée. En plus de ces conformères, il existe des formes dimériques (homodimères ou hétérodimères) et des formes polymériques.

I.E.3.a. La forme native

Depuis la résolution de la 1^{ère} structure cristallographique de l'AT native par l'équipe de Carrell (Carrell 1994), plusieurs structures des différentes conformations de l'AT humaine ont été publiées et sont accessibles dans la base de données des protéines RCSB PDB Protein Data Bank. Toutes les structures cristallographiques de l'AT montrent l'arrangement tridimensionnel caractéristique des serpins avec 3 feuillets β (A, B, C) (Fig. 8) et 9 hélices α . Les feuillets β A, B et C de l'AT (notés fA, fB et fC sur la figure 8) sont organisés respectivement en 5, 6 et 4 brins. Enfin, une séquence de 24 acides aminés, organisée en une boucle très mobile exposée à la surface de la molécule, est responsable de sa fonction inhibitrice. Cette boucle réactive (RCL, reactive center loop), située dans la partie C-terminale de la protéine, comprend l'arginine en position 393, qui constitue le site actif de l'AT.

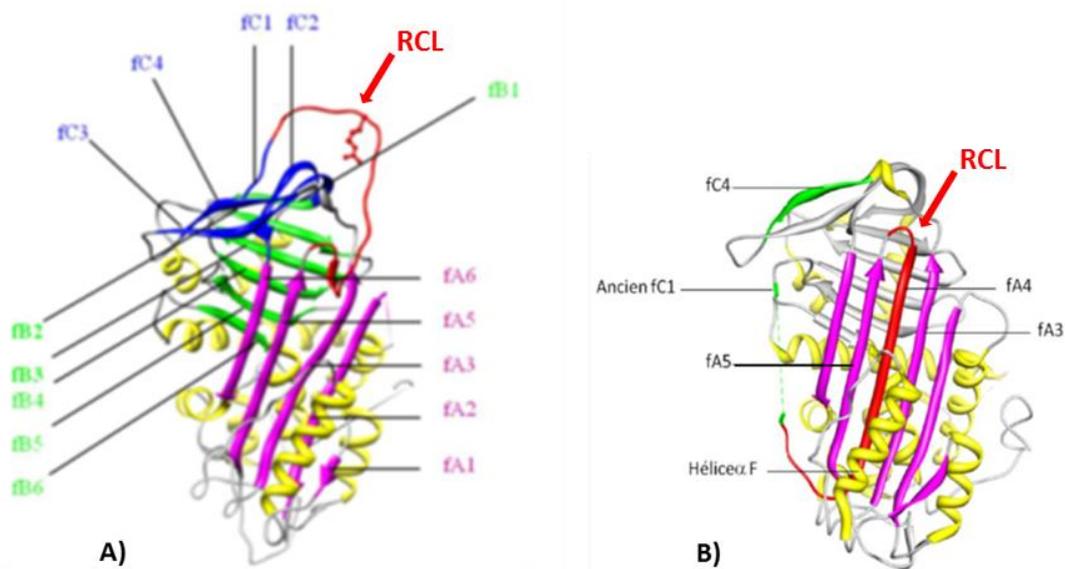


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de A) la forme native de l'AT avec ses différents feuillets β : feuillet β A en magenta, feuillet β B en vert, feuillet β C en bleu ; B) la forme latente de l'AT : en rouge, insertion de la boucle réactive dans le feuillet β A (brin 4A). En jaune sont représentées les hélices α . Adapté de Fazavana 2012.

I.E.3.b. La forme latente

L'AT peut adopter une conformation dite « latente » qui correspond à l'insertion de la RCL non clivée dans le feuillet β A. Un brin supplémentaire, appelé brin 4A, est alors formé. L'insertion de la RCL entraîne l'extraction du brin 1 du feuillet β C (Fig. 8B). Selon l'équipe de Carrell, la conversion de la forme native en la forme latente se fait en deux étapes (Wardell 1997). Lors de la première étape, cinétiquement rapide, la boucle réactive s'insère partiellement dans le feuillet β A. Dans la deuxième étape plus lente, la boucle réactive s'insère totalement dans le feuillet β A et des réseaux ioniques avec les structures adjacentes (brins 5 et 3 du feuillet β A, hélice α F) permettent de stabiliser la conformation.

La forme latente est une structure « hyper stable », résistante aux agents dénaturants (Wardell 1997). Il a été démontré qu'environ 3 % de l'AT totale circulant dans le sang d'un individu normal serait de la forme latente (Mushunje 2004). Cette forme est dépourvue d'activité anti-coagulante en raison de l'insertion de la RCL. Il est décrit que certains variants naturels d'AT (AT Wibble, AT Wobble) sont très thermolabiles et se convertissent facilement en forme latente (Beauchamp 1998). Cette instabilité pourrait participer au risque thrombotique élevé observé chez les porteurs de ces mutations. *In vitro*, la forme latente de l'AT peut être obtenue en chauffant une préparation contenant de l'AT à 60°C pendant 72 heures (Karlsson 2002). Ainsi, des études ont montré que des quantités importantes de forme latente (pouvant aller jusqu'à 40 %) étaient susceptibles d'être présentes dans certaines préparations d'AT thérapeutiques suite aux étapes de pasteurisation (Heger 2002).

I.E.3.c. La forme clivée

Lorsque l'AT se fixe à une protéase de la coagulation, celle-ci clive le site actif au niveau de la RCL de l'AT. Ceci provoque un réarrangement conformationnel de l'AT, qui aboutit à l'insertion du fragment de la boucle réactive attaché à l'enzyme dans le feuillet β A, pour former le brin supplémentaire 4A. Ce changement conformationnel a pour conséquence un déplacement de l'enzyme, alors expulsée vers le bas de l'AT, et empêche la dissociation du complexe enzyme/AT (Fig. 9) (Huntington 2003). La structure de la protéase est déformée par la force de traction exercée par le réarrangement conformationnel de l'AT et le frottement entre le corps de la protéase et celui de l'AT thermodynamiquement stable. Ainsi, l'enzyme se trouve piégée dans un complexe covalent inactif (Stratikos 1999).

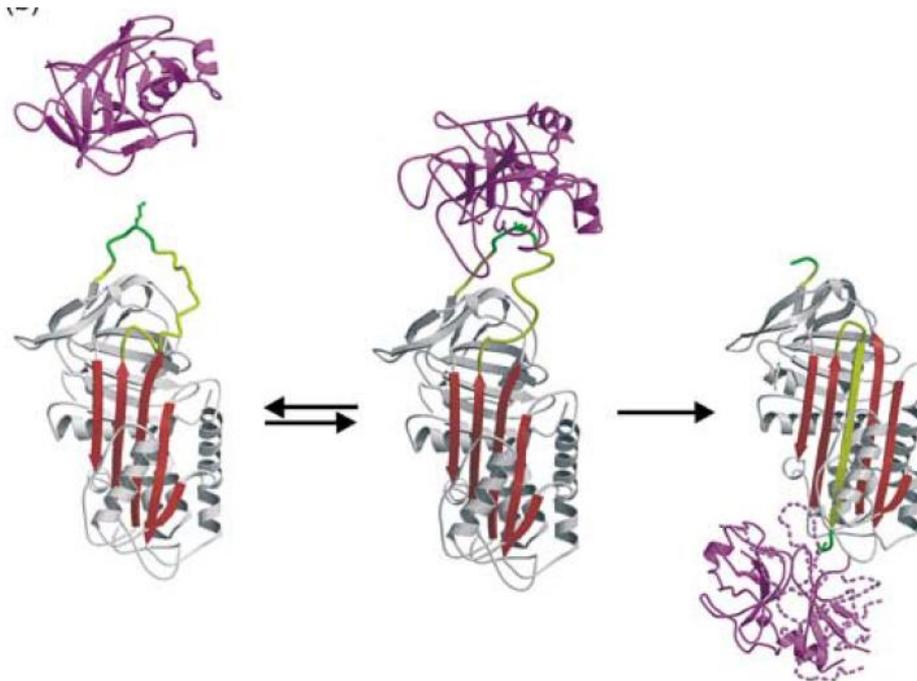


Figure 9 : Mécanisme d'inhibition d'une sérine-protéase par l'AT conduisant à la forme clivée. Issu de Huntington 2003.

I.E.3.d. Les hétérodimères

L'équipe de Carrell fut l'une des premières à décrire la formation des hétérodimères de l'AT (Carrell 1994). Ceux-ci correspondent à l'association d'une forme native (active) et d'une forme latente de l'AT (Fig. 10). Les deux molécules sont reliées ensemble par la boucle réactive de la molécule native, qui s'insère dans le brin 1 du feuillet β C vacant de la molécule latente (Johnson 2006). Des études ont montré que la conversion de la forme native en la forme latente passait par la formation d'un hétérodimère (Zhou 1999). La formation des hétérodimères entraîne une perte d'activité puisqu'elle s'accompagne de l'inactivation de la molécule d'AT.

In vitro, les hétérodimères peuvent être obtenus en chauffant une préparation d'AT à 60°C pendant 9 heures (Karlsson 2002), ou en mélangeant une quantité équimolaire de forme native et de forme latente (Zhou 1999). Certaines mutations pourraient faciliter la formation de dimères par établissement de ponts disulfures (Corral 2004), mais dans ce cas il s'agirait plutôt d'homodimères.

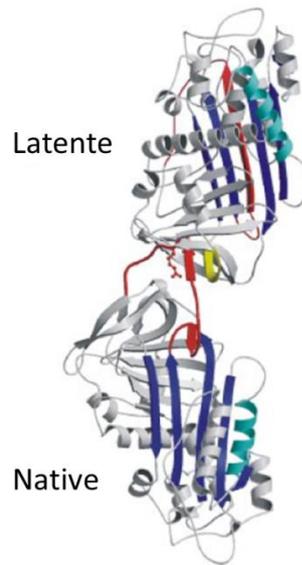


Figure 10 : Représentation d'un hétérodimère d'AT. Adapté de Johnson 2006.

I.E.3.e. Les formes polymérisées

La polymérisation des serpins donne des protéines inactives, « hyper stables ». In vivo, ce processus de polymérisation des serpins est impliqué dans des pathologies appelées serpinopathies (Huntington 2009, Yamasaki 2008). Dans le cas de l'AT, la transformation de la protéine en ces formes thermodynamiquement stables est associée à un déficit en AT et donc à des manifestations thrombotiques.

Les formes polymérisées conduisent à une conformation inactive, donc à une incapacité de l'AT à inhiber ses enzymes cibles, ce qui laisse imaginer que la boucle réactive est inaccessible, donc éventuellement insérée dans le feuillet β A, comme dans les formes clivée et latente. Plusieurs modèles moléculaires de polymérisation ont été proposés, basés notamment sur des études cristallographiques. Les deux modèles les plus décrits sont la « polymérisation boucle-feuillet β A » et la « polymérisation des formes polymérogènes ». Dans le 1^{er} modèle, la polymérisation résulte de l'insertion partielle de la RCL d'une molécule d'AT dans le feuillet β A d'une autre AT, qui à son tour va s'insérer dans une 3^{ème} molécule (Whisstock 2010) (Fig. 11A). Dans le 2^{ème} modèle, l'AT adopte une conformation particulière : la forme « polymérogène », caractérisée par un détachement du brin 5 du feuillet β A et de la boucle réactive, qui s'insèrent dans le feuillet β A d'une autre molécule polymérogène, qui à son tour va s'insérer dans une autre molécule polymérogène (Yamasaki 2008, Huntington 2009) (Fig. 11B).

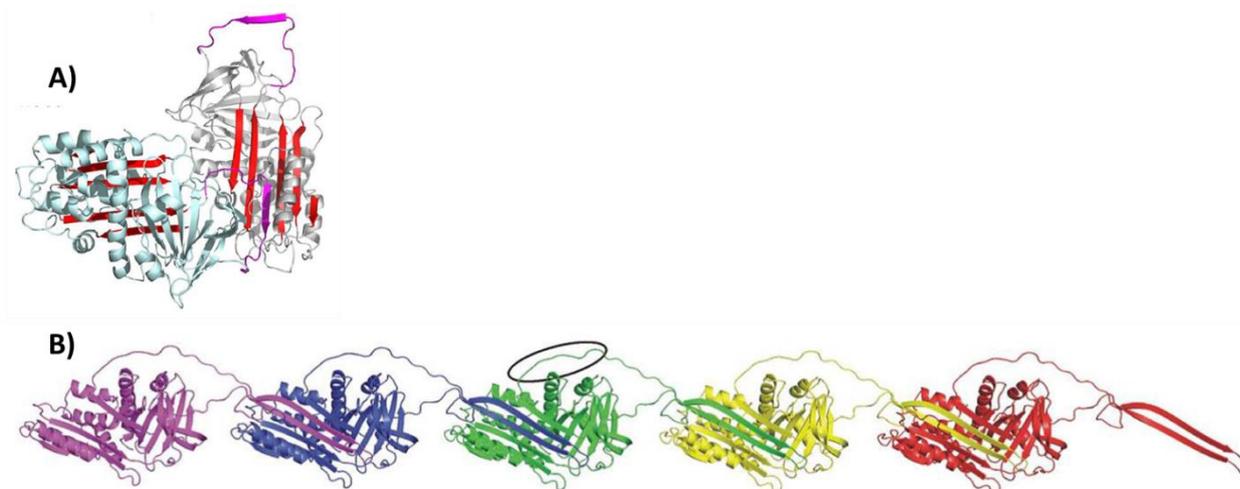


Figure 11 : Deux des modèles de polymérisation des serpins proposés. A) Modèle « boucle-feuillet β A ». En magenta : boucle réactive. En rouge : feuillet β A. B) Modèle de polymérisation des formes polymérogènes. Adapté respectivement de Whisstock 2010 et Huntington 2009.

I.E.4. Indications thérapeutiques

L'antithrombine est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation. En thérapeutique, les solutions pharmaceutiques d'AT sont utilisées pour traiter des déficits constitutionnels ou acquis en AT (Brochure LFB 2011). Les solutions pharmaceutiques d'AT peuvent être utilisées en prévention de thromboses veineuses en cas de situation à risque élevé (chirurgie, grossesse,...), lorsque le risque hémorragique ne permet pas d'utiliser des doses suffisantes d'héparine. Elles sont également utilisées en traitement curatif dans le cas d'accidents thrombo-emboliques, en association avec l'héparine lorsque l'héparine, utilisée seule, est inefficace. Enfin, elles peuvent être utilisées en curatif pour traiter des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) graves ou évolutives, notamment associées à un état septique. L'usage de solutions pharmaceutiques d'AT est également courant dans d'autres types de situations telles que :

- un déficit en AT lorsque une circulation extracorporelle (CEC) est nécessaire,
- un déficit en AT au cours d'une hémofiltration,
- un déficit en AT suite à un traitement par la L-asparaginase.

Chapitre 2 : Méthodes d'analyse des protéines thérapeutiques intactes

Dans ce chapitre, nous allons présenter dans un premier temps les techniques les plus couramment utilisées pour analyser les formes apparentées de protéines intactes. Ces formes peuvent être obtenues par différentes voies de dégradations chimiques ou physiques, qui sont explicitées dans la section II.A. correspondant à un extrait de l'article soumis à *Methods in Molecular Biology*. Puis, dans un deuxième temps, nous aborderons les techniques permettant d'analyser les structures secondaires et tertiaires des protéines.

II.A. Article 2 : « Characterization of chemical and physical modifications of human serum albumin by capillary zone electrophoresis »

Submitted to *Methods in Molecular Biology*

Anne-Lise Marie, N. Thuy Tran, and Myriam Taverna*

Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie - CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France

*Corresponding author: myriam.taverna@u-psud.fr

Abstract

Therapeutic proteins can easily undergo chemical or physical changes during their manufacturing, purification and storage. These modifications might change or reduce their biological activity. Therefore, it is important to have analytical methodologies that are able to reliably detect, characterize and quantify degradation products in formulations. Capillary Zone Electrophoresis (CZE) is very well suited for the analysis of proteins due to its relatively easiness of implementation, separation efficiency and resolving power. We describe here a CZE method that allows separating more than nine forms in therapeutic albumin, including oxidized, glycosylated and truncated forms. This method uses a polyethylene oxide (PEO) coating and a buffer composed of HEPES and SDS at physiological pH. The method is reproducible (RSD < 0.5 and 4 % for migration times and peak areas, respectively), and allows quantitation of albumin forms in pharmaceutical preparations.

1. Introduction

Human serum albumin (HSA) is a therapeutic protein used to correct hypovolemia and hypoalbuminemia, which are symptoms associated with liver failure, renal diseases or sepsis. Apart maintaining oncotic pressure, HSA exhibits many other important physiological functions such as transport of endogen and exogen ligands (fatty acids, hormones, bilirubin, drugs...), and powerful antioxidant activity mostly due to its single free cysteine (Cys34) (1). The commercial HSA preparations, obtained from fractionation of human plasma, are very heterogeneous. Indeed, during biotechnological production and storage, the HSA molecule can undergo various physical or chemical modifications like aggregation, cleavage, and oxidation (2). The donor population represents another source of heterogeneity. For example, it has been shown that albumin undergoes increased glycation in diabetic subjects (3), and liver diseases are accompanied by high levels of cysteinylated or sulfonic HSA forms (4). These modifications may affect the binding properties of the molecule, and thereby have an impact on its therapeutic activity. Analytical methods are therefore required to detect, characterize and quantify the different forms present in HSA preparations. Recently, our laboratory has developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method, which allows to separate and quantify more than nine HSA forms in a commercial preparation (2). After a brief overview summarizing the different chemical or physical modifications that a therapeutic protein may undergo, this chapter will focus on HSA, with a detailed description of the developed CZE protocol.

1.1. Chemical and physical modifications in therapeutic proteins

The clinical use of therapeutic proteins has enabled the treatment of a wide range of life-threatening diseases. Many of these diseases were considered incurable only a few decades ago. Almost half of the new drugs recently approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) are therapeutic proteins (5). Due to their unique physico-chemical properties, therapeutic proteins are prone to modifications such as denaturation, aggregation, oxidation, deamidation, racemization, fragmentation or glycation. These modifications may lead to a potential loss of therapeutic efficacy or unwanted immunogenic reactions.

1.1.1. Physical modifications

Proteins, because of their polymeric nature and their ability to form superstructures (e.g., secondary, tertiary, and quaternary) can undergo structural changes without any change in their chemical composition (6, 7). These modifications include denaturation, aggregation, and precipitation.

Denaturation corresponds to the loss of the globular or three-dimensional structure of the protein. This globular structure is referred to as the native state, which, in most cases, is the active form of the protein (6). The denaturation phenomenon induces the unfolding of the protein, which may lead to its aggregation, and even to its precipitation. A variety of factors like heat or light exposure, lyophilisation, freezing/thawing, organic solvents, salts and chaotropic agents may cause denaturation (8, 9). Elevated temperature is probably the most common stress that causes the unfolding of the protein. Heat-induced denaturation is often irreversible as the unfolded proteins rapidly associate to form aggregates (6, 10). High concentration of chaotropes (e.g. urea) is another important cause of denaturation. Chaotropic agents denature proteins into a totally unordered and unfolded state (9, 11-13). Recently, much more attention has been paid to less common phenomena like cold denaturation (6, 14) and pressure-induced denaturation (6, 15, 16). The main consequence of protein denaturation is a loss of therapeutic activity, but cytotoxic effects have also been observed with several biotherapeutic proteins (5, 10).

Proteins may aggregate through several mechanisms, classified as soluble/insoluble, covalent/noncovalent, reversible/irreversible, and native/denatured. For therapeutic proteins, the presence of aggregates is undesirable because the aggregates may lead to a loss of activity, an immunogenic reaction, or cause adverse effects during administration (17, 18). **Aggregation** is a phenomenon routinely encountered during purification, sterilization, formulation, and storage. Stresses to the proteins such as freezing/thawing, ultrafiltration/diafiltration, agitation, exposure to air or interactions with metal surfaces (6, 10), but also bioprocess-related impurities may result in the formation of aggregates (19, 20). The size of protein aggregates varies from soluble submicron range to visible precipitates. Numerous proteins have strong tendency to aggregate. For example, insulin is prone to aggregate under various conditions (21, 22). We can also mention the serpins, which typically aggregate when polymerized *in vitro* under heat exposure or low concentrations of chaotropes (23, 24).

1.1.2. Chemical modifications

Chemical modifications correspond to the change or loss of specific functional groups or the breakage of covalent bonds. They encompass oxidation, deamidation, racemization, fragmentation, and glycation.

Protein **oxidation** is a covalent modification of amino acids that is induced by reactive oxygen species (6). This chemical degradation is catalyzed by metals and light. Almost all amino acids can be oxidized, but cysteine and methionine, the two sulfur-containing amino acids, are particularly prone to oxidation. Cysteine oxidation may lead to the formation of disulfide linkages (25), but also to a wide variety of oxidized forms (see section 1.2.). Methionine can be oxidized into sulfoxides, and, in more drastic conditions, sulfone forms. The list of oxidants that directly or indirectly attack methionine is large and includes chloramines, hydrogen peroxide, hypochlorous acid, oxygen and ozone (26). Methionine oxidation is observed in many therapeutic proteins. For example, the recombinant human growth factor filgrastim contains four methionine residues susceptible to be oxidized to their sulfoxide derivatives, three of which are more prone to oxidation because they can interact with solvent molecules, whereas the fourth methionine is located at a hydrophobic region of the protein (27). Nowadays, it is well recognized that oxidation of therapeutic proteins may limit their clinical efficiency or stability.

Deamidation is a spontaneous non-enzymatic process, which involves either asparagine (Asn) or glutamine (Gln) residues. During deamidation, an Asn residue is converted into aspartic (Asp) or isoaspartic (isoAsp) acid, whereas a Gln residue is converted into glutamic acid. The reaction produces an intermediate compound which is a cyclic succinimide. The rates of deamidation depend on the primary sequence and 3D structure of the protein, and on solution properties like pH, temperature or ionic strength (28). Deamidation has been observed and characterized in a wide variety of proteins, such as recombinant growth factors or hormones (29, 30) and IgG antibodies (31, 32).

Racemization is the transformation of *L*-Asp (or *L*-isoAsp) into *D*-Asp (or *D*-isoAsp). It is a chemical modification which is related to deamidation, since it follows the same chemical pathway with the formation of a succinimide intermediate. Racemization may be induced by

high temperature or pH stresses (8). For example, racemization of aspartate residue in a thermally stressed antibody has been reported (33).

Fragmentation corresponds to disruption of a covalent bond in a protein. This degradation is a function of the primary sequence, the flexibility of the local structure, the solvent conditions (pH, temperature), and the presence of metals or radicals (34). Two distinct mechanisms may induce fragmentation: hydrolysis and β -elimination. For example, the hinge region of monoclonal antibodies may undergo fragmentation by direct hydrolysis (35) or β -elimination (36).

Glycation is a slow non-enzymatic reaction that initially involves the addition of a reducing sugar, or its derivatives, to amine groups of proteins. This leads to the formation of a Schiff base, which can subsequently undergo rearrangement into irreversible conjugates, called advanced glycation end products (AGEs) (37, 6). The formation of AGEs affects the structure and functionality of proteins. It has been reported that excipient like sucrose could potentially cause protein glycation, due to the formation of glucose and fructose upon sucrose hydrolysis (38-40).

Although it is very convenient to distinguish chemical from physical modifications, the fact remains that they may be interrelated (6). For example, methionine oxidation can lead to destabilization of the native structure of a given protein, and thereby increase its aggregation rate. This has been reported for recombinant human growth hormones (41) and immunoglobulins (42).

1.2. Chemical and physical modifications in HSA preparations

The commercial HSA preparations, obtained from fractionation of human plasma, are very heterogeneous. Indeed, for intrinsic (natural source) or extrinsic reasons (bioprocess, storage), the HSA molecule can undergo various physical or chemical modifications like aggregation, polymerization, truncation, oxidation and glycation.

It has been reported that the bioprocessing steps may affect the stability of the HSA molecules obtained from pooled human plasma. In particular, thermal treatments like viral inactivation and lyophilization perturb the secondary structure of HSA, leading to its **aggregation** (43-45).

HSA dimerization and **polymerization** are likely to occur during purification and storage, and are often correlated with the aggregation process (46-48). It has been shown that dimer and polymer formation may contribute to rare instances of allergic reactions (49).

The HSA molecule can be cleaved by reaction with proteases. The first **truncated forms** described in the literature were HSA-L (loss of leucine from the C-terminus) and HSA-DA (loss of aspartic acid and alanine from the N-terminus) (50, 51, 46), but recently many other truncated forms have been reported by our group (2).

The free sulfhydryl residue (SH) of the Cys34 of native albumin is implicated in a great number of **oxidation** reactions (52). For instance it can bind other thiol-containing compounds like cysteine, homocysteine or glutathione (leading to the so-called HSA+Cys, HSA+HCys and HSA+G species, respectively) (53, 54, 50), interact with nitric oxide (NO) and thereby form S-nitrosothiols (HSA-SNO) (55), or be oxidized into sulfenic (HSA-SOH), sulfinic (HSA-SO₂H) or sulfonic (HSA-SO₃H) acids (56, 57, 1) (Fig. 1).

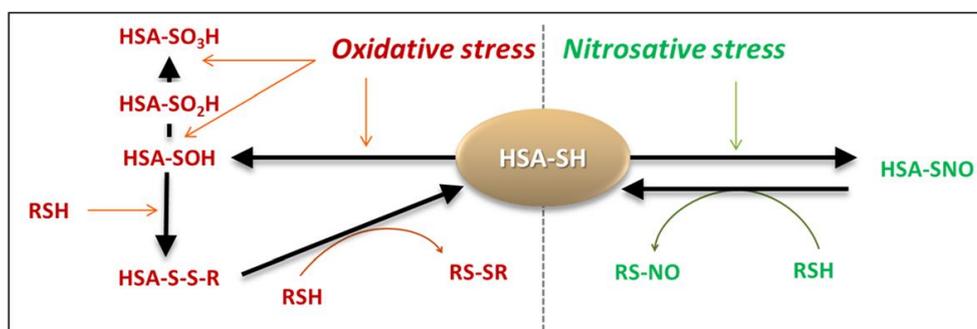


Fig.1. Overview of the steps leading to Cys34 oxidation and thiolation (highlighted in red). Steps involved in the nitrosylation of Cys34 of HSA are highlighted in green. Formation of higher oxidation states of HSA is also shown (issued from (1), with permission).

In addition, serum albumin is a plasma protein highly sensitive to **glycation** in the blood. Numerous studies have identified the main sites on HSA molecule modified by glycation *in vivo* (58, 59). Because of their high nucleophile properties, lysine, arginine and cysteine are the sole residues prone to glycation. Fig. 2 describes the different structures of AGEs reported in the literature (60, 61). Recently, our group has characterized, in commercial albumin, new AGE derivatives that had not been reported yet (2).

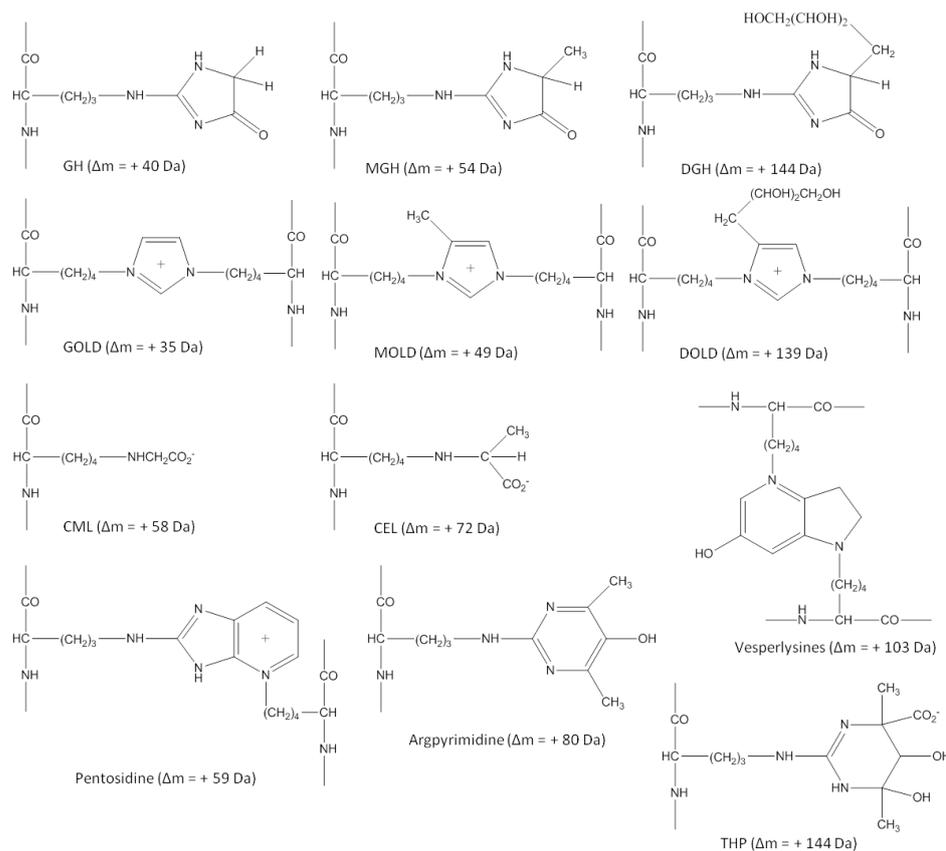


Fig.2. Examples of AGE chemical structures of proteins (Δm , mass difference between AGE derivative and native protein). AGEs derived from lysine residues: GOLD, MOLD, DOLD, CML, CEL and Vesperlysines. AGEs derived from arginine residues: GH, MGH, DGH, Argpyrimidine, Pentosidine and THP (issued from (2), with permission).

References

1. Taverna M., Marie A.L., Mira J.P., Guidet B. (2013) Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care* 3, 1-7.
2. Marie A.L., Przybylski C., Gonnet F., Daniel R., Urbain R., Chevreaux G., Jorieux S., Taverna M. (2013) Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin. *Anal Chim Acta* 800, 103-110.
3. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P. (2012) Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab* 38, 171-178.
4. Oetl K., Marsche G. (2010) Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol* 474, 181-195.
5. Fekete S., Beck A., Veuthey J.L., Guillaume D. (2014) Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal* 101, 161-173.
6. Manning M.C., Chou D.K., Murphy B.M., Payne R.W., Katayama D.S. (2010) Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 27, 544-575.

7. Staub A., Guillaume D., Schappler J., Veuthey J.L., Rudaz S. (2011) Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *J Pharm Biomed Anal* 55, 810-822.
8. Manning M.C., Patel K., Borchardt R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res* 6, 903-918.
9. Guerini Rocco A., Mollica L., Ricchiuto P., Baptista A.M., Gianazza E., Eberini I. (2008) Characterization of the protein unfolding processes induced by urea and temperature. *Biophys J* 94, 2241-2251.
10. Wang W. (2005) Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* 289, 1-30.
11. O'Brien E.P., Dima R.I., Brooks B., Thirumalai D. (2007) Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: lessons for protein denaturation mechanism. *J Am Chem Soc* 129, 7346-7353.
12. Zhang Y., Cremer P.S. (2006) Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol* 10, 658-663.
13. Majumdar R., Manikwar P., Hickey J.M., Samra H.S., Sathish H.A., Bishop S.M., Middaugh C.R., Volkin D.B., Weis D.D. (2013) Effects of salts from the Hofmeister series on the conformational stability, aggregation propensity, and local flexibility of an IgG1 monoclonal antibody. *Biochemistry* 52, 3376-3389.
14. Luan B., Shan B., Baiz C., Tokmakoff A., Raleigh D.P. (2013) Cooperative cold denaturation: the case of the C-terminal domain of ribosomal protein L9. *Biochemistry* 52, 2402-2409.
15. Harano Y., Yoshidome T., Kinoshita M. (2008) Molecular mechanism of pressure denaturation of proteins. *J Chem Phys* 129, 1-9.
16. Boonyaratanakornkit B.B., Park C.B., Clark D.S. (2002) Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim Biophys Acta* 1595, 235-249.
17. Cromwell M.E.M., Hilario E., Jacobson F. (2006) Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J* 8, 572-579.
18. Ratanji K.D., Derrick J.P., Dearman R.J., Kimber I. (2014) Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immuno* 11, 99-109.
19. Wang W., Ignatius A.A., Thakkar S.V. (2014) Impact of residual impurities and contaminants on protein stability. *J Pharm Sci* 103, 1315-1330.
20. Kumar S., Zhou S., Singh S.K. (2014) Metal ion leachates and the physico-chemical stability of biotherapeutic drug products. *Curr Pharm Des* 20, 1173-1181.
21. Xu Y., Yan Y., Seeman D., Sun L., Dubin P.L. (2012) Multimerization and aggregation of native-state insulin: effect of zinc. *Langmuir* 28, 579-586.

22. Pryor E., Kotarek J.A., Moss M.A., Hestekin C.N. (2011) Monitoring insulin aggregation via capillary electrophoresis. *Int J Mol Sci* 12, 9369-9388.
23. Huntington J.A., Sendall T.J., Yamasaki M. (2009) New insight into serpin polymerization and aggregation. *Prion* 3, 12-14.
24. Yamasaki M., Li W., Johnson D.J.D., Huntington J.A. (2008) Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature* 455, 1255-1259.
25. Chalker J.M., Bernardes G.J.L., Lin Y.A., Davis B.G. (2009) Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem Asian J* 4, 630-640.
26. Levine R.L., Moskovitz J., Stadtman E.R. (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *Life* 50, 301-307.
27. Holzmann J., Hausberger A., Rupprechter A., Toll H. (2013) Top-down MS for rapid methionine oxidation site assignment in filgrastim. *Anal Bioanal Chem* 405, 6667-6674.
28. Taichrib A., Pelzing M., Pellegrino C., Rossi M., Neusüß C. (2011) High resolution TOF MS coupled to CE for the analysis of isotopically resolved intact proteins. *J Proteom* 74, 958-966.
29. Santana H., González Y., Targon Campana P., Noda J., Amarantes O., Itri R., Beldarraín A., Páez R. (2013) Screening for stability and compatibility conditions of recombinant human epidermal growth factor for parenteral formulation: effect of pH, buffers, and excipients. *Int J Pharm* 452, 52-62.
30. Haselberg R., Brinks V., Hawe A., De Jong G.J., Somsen G.W. (2011) Capillary electrophoresis-mass spectrometry using noncovalently coated capillaries for the analysis of biopharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem* 400, 295-303.
31. Vlasak J., Bussat M.C., Wang S., Wagner-Rousset E., Schaefer M., Klinguer-Hamour C., Kirchmeier M., Corvaia N., Ionescu R., Beck A. (2009) Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal Biochem* 392, 145-154.
32. Zhang Y.T., Hu J., Pace A.L., Wong R., Wang Y.J., Kao Y.H. (2014) Characterization of asparagine 330 deamidation in an Fc-fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping. *J Chromatogr B* 965, 65-71.
33. Zhang J., Yip H., Katta V. (2011) Identification of isomerization and racemization of aspartate in the Asp-Asp motifs of a therapeutic protein. *Anal Biochem* 410, 234-243.
34. Vlasak J., Ionescu R. (2011) Fragmentation of monoclonal antibodies. *mAbs* 3, 253-263.
35. Cordoba A.J., Shyong B.J., Breen D., Harris R.J. (2005) Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr B* 818, 115-121.

36. Gaza-Bulseco G., Liu H. (2008) Fragmentation of a recombinant monoclonal antibody at various pH. *Pharm Res* 25, 1881-1890.
37. Vistoli G., De Maddis D., Cipak A., Zarkovic N., Carini M., Aldini G. (2013) Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47, 3-27.
38. Fischer S., Hoernschemeyer J., Mahler H.C. (2008) Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 70, 42-50.
39. Gadgil H.S., Bondarenko P.V., Pipes G., Rehder D., McAuley A., Perico N., Dillon T., Ricci M., Treuheit M. (2007) The LC/MS analysis of glycation of IgG molecules in sucrose containing formulations. *J Pharm Sci* 96, 2607-2621.
40. Gadgil H.S., Bondarenko P.V., Treuheit M.J., Ren D. (2007) Screening and sequencing of glycated proteins by neutral loss scan LC/MS/MS method. *Anal Chem* 79, 5991-5999.
41. Mulinacci F., Poirier E., Capelle M.A.H., Gurny R., Arvinte T. (2013) Influence of methionine oxidation on the aggregation of recombinant human growth hormone. *Eur J Pharm Biopharm* 85, 42-52.
42. Liu D., Ren D., Huang H., Dankberg J., Rosenfeld R., Cocco M.J., Li L., Brems D.N., Remmele R.L. (2008) Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry* 47, 5088-5100.
43. Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Böhm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. (1980) Temperature behaviour of human serum albumin. *Eur J Biochem* 104, 469-478.
44. Lin J.J., Meyer J.D., Carpenter J.F., Manning M.C. (2000) Stability of human serum albumin during bioprocessing: denaturation and aggregation during processing of albumin paste. *Pharm Res* 17, 391-396.
45. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. (2007) Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. *Eur Biophys J* 36, 717-725.
46. Alahmad Y., Tran N.T, Le Potier I., Forest E., Jorieux S., Taverna M. (2011) A new CZE method for profiling human serum albumin and its related forms to assess the quality of biopharmaceuticals. *Electrophoresis* 32, 292-299.
47. Ogasawara Y., Namai T., Togawa T., Ishii K. (2006) Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress. *Biochem Biophys Res Comm* 340, 353-358.
48. Oliva A., Santoveña A., Llabres M., Fariña J.B. (1999) Stability study of human serum albumin pharmaceutical preparations. *J Pharm Pharmacol* 51, 385-392.
49. Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. (2005) Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41, 1211-1219.

50. Bar-Or D., Bar-Or R., Rael L.T., Gardner D.K., Slone D.S., Craun M.L. (2005) Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit Care Med* 33, 1638-1641.
51. Bar-Or D., Rael L.T., Bar-Or R., Slone D.S., Craun M.L. (2006) The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient. *Clin Chim Acta* 365, 346-349.
52. Kawakami A., Kubota K., Yamada N., Tagami U., Takehana K., Sonaka I., Suzuki E., Hirayama K. (2006) Identification and characterization of oxidized human serum albumin: A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J* 273, 3346-3357.
53. Oettl K., Stauber R.E. (2007) Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 151, 580-590.
54. Naldi M., Giannone F.A., Baldassarre M., Domenicali M., Caraceni P., Bernardi M., Bertucci C. (2013) A fast and validated mass spectrometry method for the evaluation of human serum albumin structural modifications in the clinical field. *Eur J Mass Spectrom* 19, 491-496.
55. Ishima Y., Hiroshima S., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Sawa T., Akaike T., Kai T., Otagiri M. (2010) One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. *Nitric Oxide* 23, 121-127.
56. Turell L., Carballal S., Botti H., Radi R., Alvarez B. (2009) Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz J Med Biol Res* 42, 305-311.
57. Turell L., Botti H., Bonilla L., Torres M.J., Schopfer F., Freeman B.A., Armas L., Ricciardi A., Alvarez B., Radi R. (2014) HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 944, 144-151.
58. Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S., Hoy K.S., Wa C., DeBolt E., Koke M., Hage D.S. (2013) Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 425, 64-76.
59. Rondeau P., Bourdon E. (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 93, 645-658.
60. Wa C., Cerny R.L., Clarke W.A., Hage D.S. (2007) Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 385, 48-60.
61. Ahmed N., Argirov O.K., Minhas H.S., Cordeiro C.A.A., Thornalley P.J. (2002) Assay of advanced glycation end products (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N ϵ -carboxymethyl-lysine- and N ϵ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J* 364, 1-14.

II.B. Méthodes d'analyse des protéines apparentées

Comme nous venons de le décrire dans le chapitre précédent, une protéine thérapeutique peut subir, au cours de sa production, des modifications physiques (dimérisation, oligomérisation, agrégation) ou chimiques (oxydation, déamidation, racémisation, fragmentation, glycation). Les formes issues de ces dégradations vont être appelées des protéines apparentées. Ces formes apparentées peuvent être moins actives que la forme native de la protéine, voire inactives, et il est donc nécessaire de les détecter dans le produit fini.

Les protéines thérapeutiques sont beaucoup plus complexes à analyser que les petites molécules médicamenteuses. Ainsi, des outils analytiques performants sont nécessaires afin de caractériser au mieux le produit fini et étudier l'impact des étapes de production sur la structure et l'activité de la protéine. Nous allons décrire dans ce chapitre les principales techniques utilisées pour analyser les protéines intactes ainsi que leurs produits de dégradation, incluant les techniques séparatives telles que la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire, mais également des techniques telles que la spectrométrie de masse.

II.B.1. Chromatographie liquide

La chromatographie liquide (LC) est devenue un outil incontournable pour les analyses de protéines intactes en raison de sa rapidité, son haut pouvoir de résolution et sa grande reproductibilité. Les modes les plus fréquemment utilisés pour l'analyse de protéines apparentées sont : la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC), la chromatographie d'échange d'ions (IExC) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

II.B.1.a. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

II.B.1.a.1. Principe de la RP-HPLC et exemples

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) est une technique séparative dans laquelle les analytes sont séparés selon des interactions hydrophobes entre des ligands hydrophobes greffés sur la colonne chromatographique et les

régions hydrophobes de la protéine (Fekete 2014 a). Dans le cas des protéines, il s'agit plutôt d'un processus d'adsorption-désorption et non d'un phénomène de partage comme c'est le cas pour les petites molécules. Les colonnes chromatographiques sont généralement composées de particules de silice greffées avec des groupements C4, C8 et C18. Ces phases stationnaires ont des pores larges (de l'ordre de 300 Å) afin d'avoir une grande surface spécifique. Les solvants d'élution les plus utilisés sont l'acétonitrile et le propanol.

La RP-HPLC est très utilisée en industrie pharmaceutique pour le contrôle qualité des protéines thérapeutiques en tant que produit fini (Sandra 2014). Cette méthode est capable de détecter des changements mineurs dans une protéine. Il y a vingt ans, des articles décrivaient déjà l'utilisation de la RP-HPLC pour l'analyse de produits de dégradation de protéines (Reubsaet 1998, Klyushnichenko 1994). Par exemple, en 1999, Karlsson et al. ont développé une méthode RP-HPLC capable de séparer, dans une hormone de croissance recombinante (rhGH), différentes formes parmi lesquelles deux formes oxydées et une forme déamidée (Karlsson 1999). La colonne utilisée fut une C18 avec des particules de granulométrie de 5 µm et un diamètre de pores de 300 Å.

Malgré l'arrivée de techniques plus modernes, la RP-HPLC demeure de nos jours une technique de choix pour l'analyse des protéines apparentées (Li 2014, Shaltout 2014, Souto 2012, Skrlin 2010). Par exemple, Joshi et al. ont récemment développé une méthode RP-HPLC permettant de séparer les formes oxydées et réduites d'un facteur de croissance recombinant, le filgrastim (Joshi 2015). Ces formes dégradées de la protéine sont connues pour diminuer l'efficacité thérapeutique du produit. La RP-HPLC permet de les séparer grâce à leur différence d'hydrophobie. Joshi et al. sont parvenus à améliorer la méthode décrite dans la pharmacopée européenne en utilisant des colonnes avec des particules de 1,7 µm de diamètre et en optimisant le modificateur organique ainsi que la composition et le gradient de la phase mobile. La méthode développée est ainsi plus résolutive et diminue considérablement les temps d'analyse (Fig. 12).

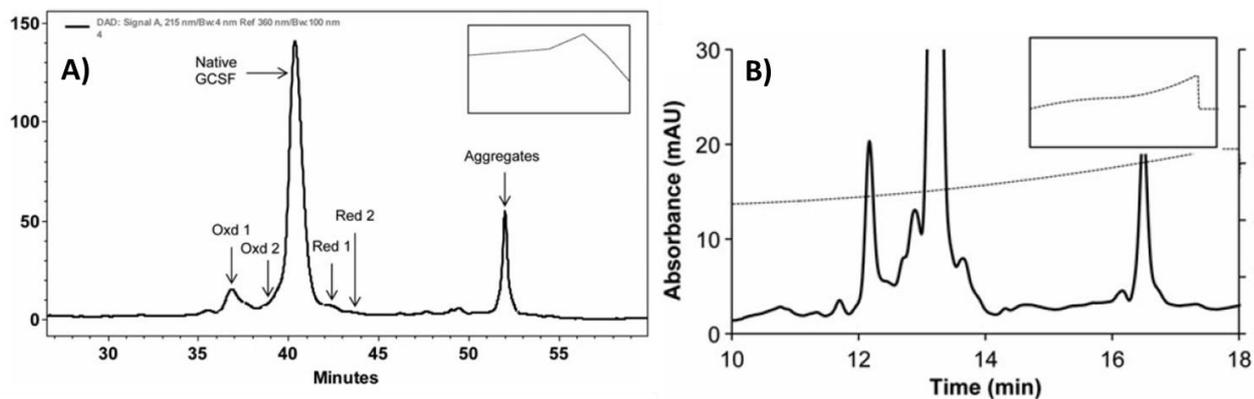


Figure 12 : Analyse de filgrastim par RP-HPLC selon : A) la méthode de la pharmacopée européenne (colonne C4, particules de granulométrie de 5 μm), B) la méthode développée par Joshi et al. (colonne C4 BEH300, particules de granulométrie de 1,7 μm). Les inserts correspondent aux gradients utilisés. Adapté de Joshi 2015.

La RP-HPLC permet également d'analyser des protéines de taille élevée telles que les anticorps monoclonaux. Par exemple, un groupe américain a exploité la RP-HPLC pour détecter les produits de dégradation d'un anticorps monoclonal (Ren 2008). L'emploi d'une colonne diphenyle a permis de séparer les chaînes lourdes et légères de l'anticorps, mais également cinq formes oxydées de la chaîne lourde (correspondant à une oxydation des résidus méthionine) (Fig. 13).

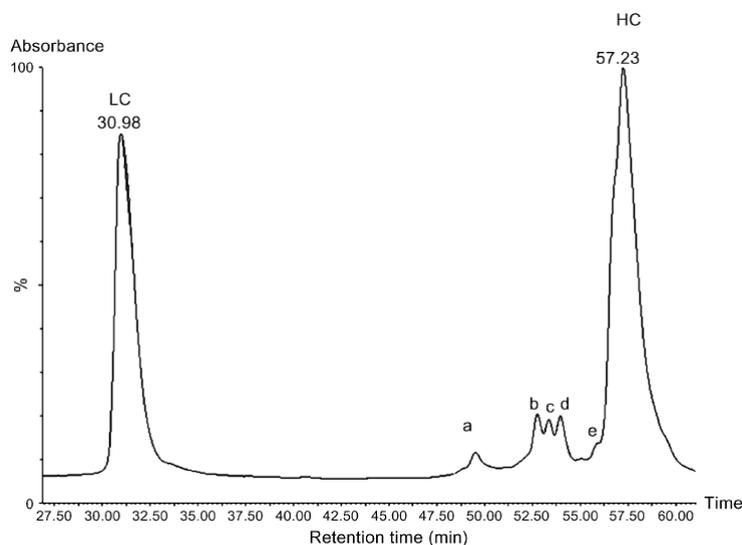


Figure 13 : Analyse d'un anticorps monoclonal par RP-HPLC. L'anticorps a été réduit avant son analyse (HC, chaîne lourde ; LC, chaîne légère). Les pics a à e correspondent à des formes oxydées de la chaîne lourde. Issu de Ren 2008.

Ces dernières années, des phases stationnaires de RP-HPLC de plus en plus adaptées à l'analyse des protéines intactes ont vu le jour : particules de granulométrie inférieure à 2 μm greffées avec des chaînes alkyles courtes, augmentation de la taille des pores, utilisation de

nouveaux matériaux de remplissage (Fekete 2012 a, Staub 2011). Pour l'analyse de protéines basiques, des phases mixtes, des colonnes avec des greffages polymériques se sont également développées. Nous allons décrire dans ce qui suit deux nouveaux supports chromatographiques récemment apparus : les particules core-shell et les monolithes, et également parler de la chromatographie liquide ultra haute pression (UHPLC).

II.B.1.a.2. Les particules core-shell

Les particules core-shell sont des particules contenant un noyau non poreux et recouvertes d'une couche poreuse (Fig. 14). Le concept des particules shell fut décrit pour la première fois par Horvath et ses collaborateurs à la fin des années 1960, l'idée étant d'augmenter l'efficacité des colonnes chromatographiques en réduisant le chemin de diffusion des molécules et d'augmenter la cinétique de transfert de masse des molécules (Fekete 2012 a). De nos jours, les particules core-shell commercialement disponibles ont des diamètres variés (compris entre 1,7 et 5 μm) avec différentes épaisseurs de couche poreuse (comprises entre 0,15 et 0,5 μm) (Fekete 2012 b). L'épaisseur de la couche poreuse joue un rôle crucial. En effet, les efficacités cinétiques (telles que le nombre de plateaux théoriques et la capacité de pics) des colonnes remplies avec ces particules shell augmentent lorsque l'épaisseur de la couche poreuse diminue.

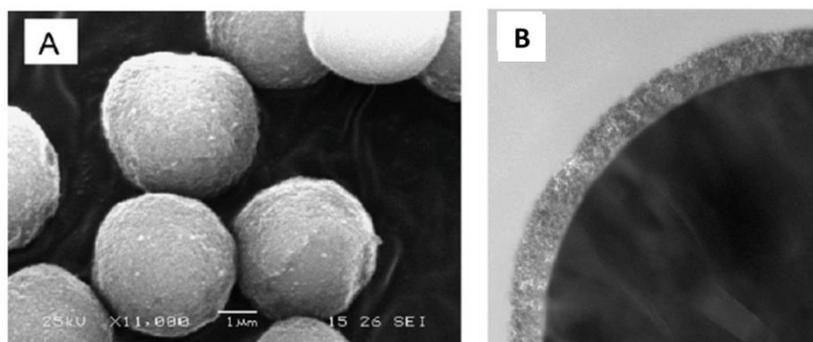


Figure 14 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage de la phase stationnaire de la colonne Aeris WP (Widepore) C18 à base de particules core-shell (granulométrie : 3,6 μm , couche poreuse : 0,2 μm). B) Image en coupe de la particule core-shell. Adapté de Fekete 2012 b.

A titre d'exemple, la figure 15 présente l'analyse d'un interféron α -2A sur colonne chromatographique Aeris WP C18 à base de particules core-shell de granulométrie de 3,6 μm (Fekete 2014 a, Fekete 2012 b). L'analyse permet de séparer différentes formes dégradées (oxydées et réduites) de la protéine en seulement cinq minutes.

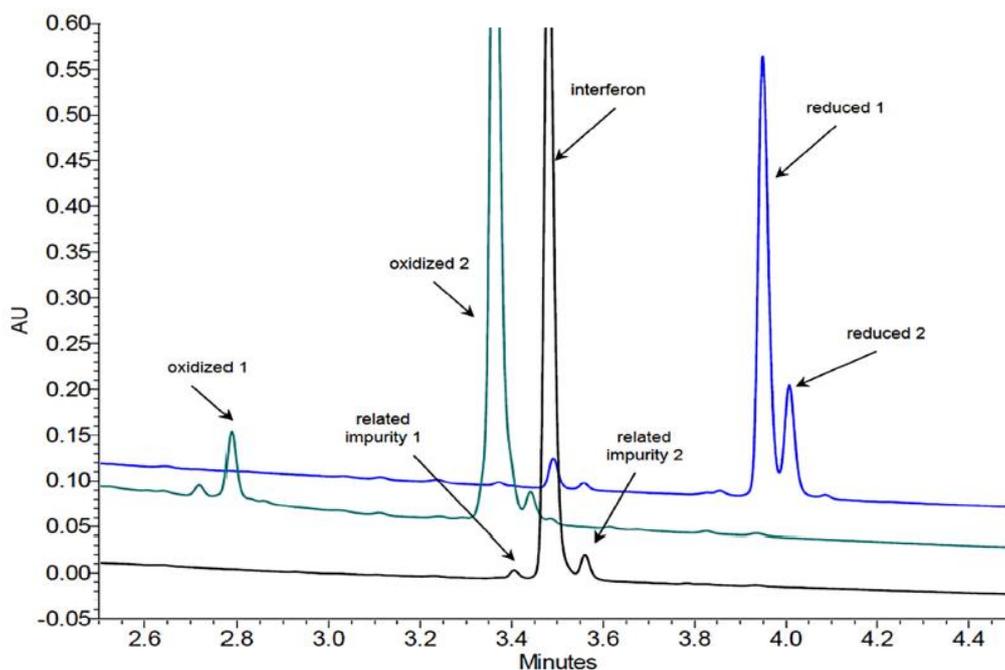


Figure 15 : Chromatogramme de l'interféron α -2A sur colonne Aeris WP C18 à base de particules core-shell (granulométrie : 3,6 μm , épaisseur de couche poreuse : 0,2 μm). Issu de Fekete 2014 a.

II.B.1.a.3. Les monolithes

Comparés aux phases stationnaires classiques à base de particules, les monolithes à base de polymères organiques offrent plusieurs avantages, incluant une grande perméabilité et un transfert de masse rapide (Fekete 2012 a, Staub 2011). Les phases stationnaires à base de monolithes polymériques ont montré un grand potentiel pour les séparations RP-HPLC des protéines intactes. En théorie, ce matériau est bien adapté à la séparation par gradient de grosses molécules, étant donné que le transfert de masse est principalement régi par convection plutôt que par diffusion, dû à l'absence de cavités poreuses. Depuis les premiers monolithes développés par Hjerten et al., qui étaient composés de gels macroporeux synthétisés par copolymérisation d'acide acrylique et de N,N'-méthylèneacrylamide, de nombreuses variétés ont vu le jour à base, par exemple, de styrène, d'acrylate ou de divinylbenzène.

Cependant, à notre connaissance, les monolithes à base de polymères organiques n'ont pas encore été appliqués à l'analyse de protéines apparentées.

II.B.1.a.4. La chromatographie liquide ultra haute pression (UHPLC)

Très tôt, soit dans les années 1940, il fut reconnu qu'une des approches potentielles pour améliorer la chromatographie en phase inverse des protéines intactes était l'utilisation de petites particules. Cependant, en pratique, l'utilisation de particules possédant un diamètre très faible (c'est-à-dire autour de 1 ou 2 μm) conduisait certes à une amélioration des performances chromatographiques mais s'accompagnait en contrepartie d'une forte augmentation de la pression. Pour pallier les limitations de pression de la HPLC conventionnelle avec une pression limite de 400 Bar, Jorgenson et al. construisirent des colonnes remplies avec des particules non poreuses très petites et réalisèrent des analyses à très haute pression (jusqu'à 7200 Bar) (Fekete 2014 a, Fekete 2012 a). Le premier instrument permettant de la chromatographie liquide ultra haute pression (UHPLC) est apparu en 2004, et aujourd'hui les appareils commerciaux permettent de délivrer des pressions de l'ordre de 1200-1400 Bar.

A titre d'exemple, Sandra et al. ont développé une méthode RP-UHPLC afin d'analyser une protéine thérapeutique de 30 kDa (Sandra 2014). Ils ont montré que la méthode RP-UHPLC développée, utilisant une colonne avec des particules de granulométrie inférieure à 2 μm , permettait d'augmenter fortement la résolution comparativement à une méthode classique RP-HPLC utilisant une colonne avec des particules de granulométrie de 5 μm (Fig. 16).

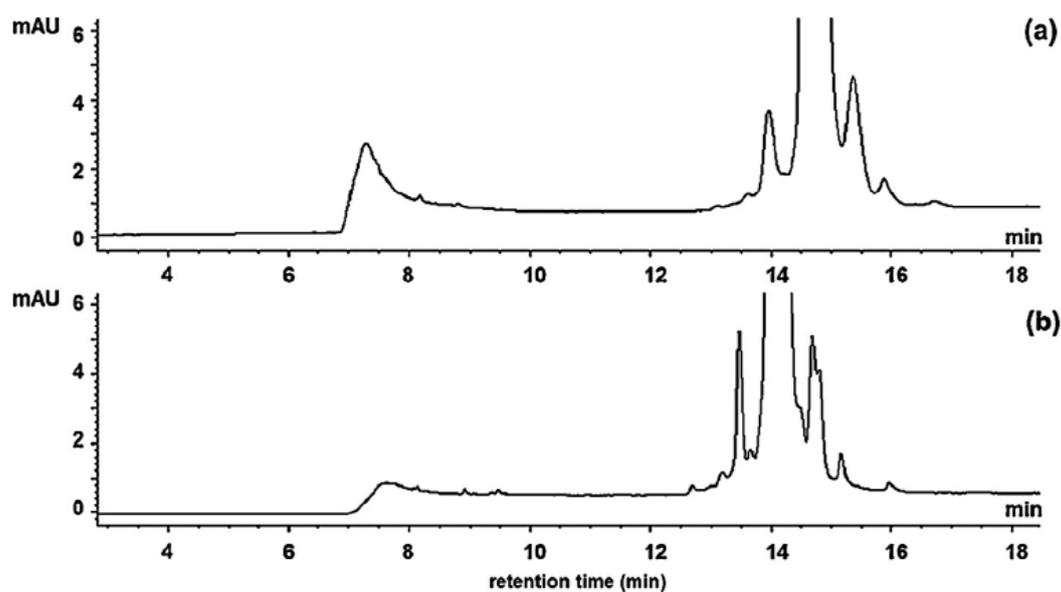


Figure 16 : Analyse d'une protéine thérapeutique de 30 kDa avec a) une méthode RP-HPLC classique utilisant une colonne avec des particules de granulométrie de 5 μm , b) une méthode RP-UHPLC utilisant une colonne avec des particules de granulométrie inférieure à 2 μm . Issu de Sandra 2014.

La UHPLC est compatible avec des modes chromatographiques autres que la RP-HPLC, tels que la chromatographie d'échange d'ions (IExC) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) que nous allons décrire dans les paragraphes suivants.

II.B.1.b. Chromatographie d'échange d'ions (IExC)

La chromatographie d'échange d'ions (IExC) est une technique chromatographique qui permet de séparer les protéines de leurs produits de dégradation selon une différence de charges de surface. Le principe de séparation est basé sur des interactions électrostatiques entre les chaînes latérales des acides aminés et la phase stationnaire (Jungbauer 2009, Ahrer 2006). Selon la charge nette de la protéine, on emploiera une colonne échangeuse d'anions ou de cations forts (colonne greffée avec des groupements SO_3^- ou NR_4^+ , respectivement), ou une colonne échangeuse d'anions ou de cations faibles (colonne greffée avec des groupements ionisables COOH ou NH_3^+ , respectivement).

Dans le domaine des protéines thérapeutiques, l'IExC demeure une technique de choix pour analyser l'hétérogénéité de charge d'une protéine (Fekete 2015, Sandra 2014, Talebi 2013, Du 2012, Zhang 2003, Perkins 2000). Par exemple, Zhang et al. ont récemment développé une méthode IExC qui permet de caractériser l'hétérogénéité de charge d'anticorps monoclonaux (Zhang 2013 b). Cette méthode utilise une colonne échangeuse de cations et est basée non pas sur un gradient de sels, comme c'est le cas classiquement en IExC, mais sur un gradient de pH. Ainsi, ils ont réussi non seulement à analyser une grande variété d'anticorps ayant des pI très différents (entre 6,2 et 9,4) mais également étudier les variants de charge de chacun d'eux (Fig. 17).

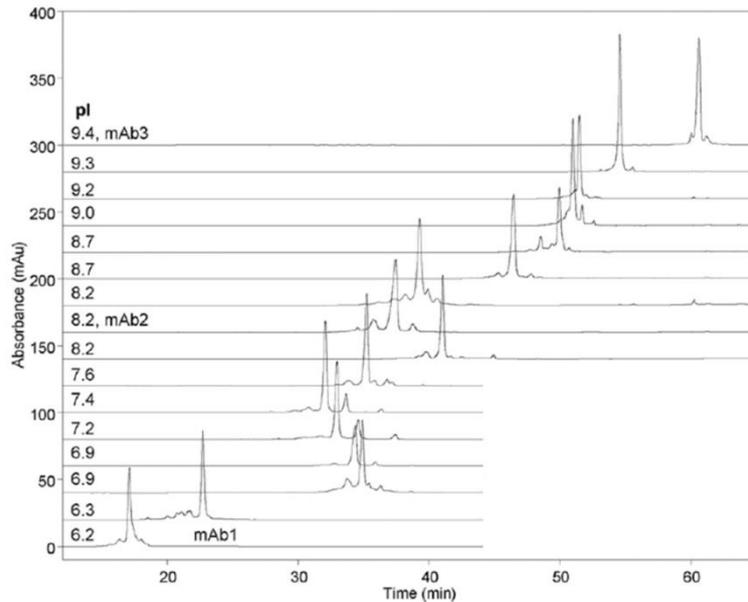


Figure 17 : Analyse de l'hétérogénéité de charge de seize anticorps monoclonaux par chromatographie d'échange de cations. Adapté de Zhang 2013 b.

L'hétérogénéité de charge des anticorps monoclonaux est souvent due à la déamidation des résidus asparagines ou à la perte de lysines C-terminales des chaînes lourdes. Par exemple, Harris et al. sont parvenus à séparer cinq variants de charge d'un anticorps humanisé rhuMAb HER2 par chromatographie échangeuse de cations (Harris 1995). La figure 18 présente la comparaison de trois lots différents d'anticorps. Le pic principal (pic 3) correspond à une forme qui n'a aucun résidu lysine, les pics 4 et 5 (formes les plus basiques) correspondent respectivement à des formes avec un ou deux résidus lysine, et les pics 1 et 2 (formes les plus acides) sont des formes déamidées (avec aucun résidu lysine pour le pic 1 et un seul résidu lysine pour le pic 2).

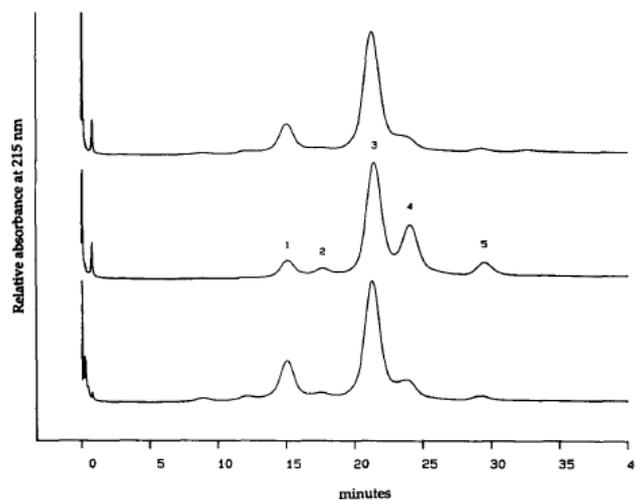


Figure 18 : Analyse de trois lots d'anticorps monoclonaux rhuMAb HER2 par chromatographie d'échange de cations. Les pics séparés correspondent à des variants de lysine et des formes déamidées. Issu de Harris 1995.

En 2001, Harris et al. ont caractérisé de manière plus fine les formes déamidées de cet anticorps, avec différentes techniques chromatographiques dont de l'échange de cations (Harris 2001).

II.B.1.c. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Dans la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la séparation s'effectue selon la taille ou le volume hydrodynamique de la protéine et la taille ou la forme des pores de la phase stationnaire. Ce mode est principalement utilisé pour séparer et quantifier des dimères, des oligomères ou des agrégats (Fekete 2014 b, Shaltout 2014, Lu 2013, Mark 2012, Hong 2012, Skrlin 2010, Gysler 1999), mais il permet également de détecter de la fragmentation (Sandra 2014). Le principal avantage de la SEC provient des conditions douces employées pour la phase mobile, qui permettent de préserver au mieux la structure de la molécule et son environnement local. Cependant, il est nécessaire d'ajuster la phase mobile afin de minimiser les interactions (affinité ou répulsion) entre la phase stationnaire et les protéines.

La SEC est couramment utilisée en contrôle d'identité en comparant le chromatogramme du produit fini avec celui de la substance de référence. C'est également une méthode de choix pour détecter et quantifier des dimères de protéines. Par exemple, l'équipe de Girard a développé une méthode SEC permettant de séparer la forme active de l'interféron α de ses produits de dégradation, parmi lesquels un dimère (Fig. 19) (Diress 2010). La méthode présente une bonne résolution entre ces différentes espèces. De plus, elle est très sensible avec des limites de détection (LOD) inférieures à 32 ng/mL, et présente une bonne répétabilité avec des déviations standard relatives (RSDs) inférieures à 1 % sur les temps de migration et inférieures à 3 % sur les aires de pics, pour des analyses intra-journalières. Cette méthode SEC peut donc être utilisée en tant que méthode de contrôle de la stabilité des interférons thérapeutiques.

En 1999, Oliva et al. ont développé une méthode SEC permettant de séparer le monomère et dimère de l'HSA (Oliva 1999). Différentes équipes ont exploité la SEC pour détecter et quantifier des dimères et oligomères de molécules d'EPO recombinantes (Gunturi 2007, Derby 1996). Mais la SEC peut également servir à détecter de la fragmentation. Par exemple, Filipe et al. sont parvenus à séparer et quantifier, grâce à la SEC, des fragments d'anticorps

issus d'une oxydation catalysée par les ions cuivre (Filipe 2012). Ces ions sont en effet présents dans l'air ambiant et peuvent contaminer les surfaces ou les tampons. Torosantucci et al. ont, quant à eux, exploité la SEC pour étudier la capacité de certains excipients à diminuer voire supprimer ces phénomènes d'oxydation qui conduisent à des fragments (Torosantucci 2013). Leur article décrit deux exemples, celui de l'IgG mais également celui de l'insuline (Fig. 20).

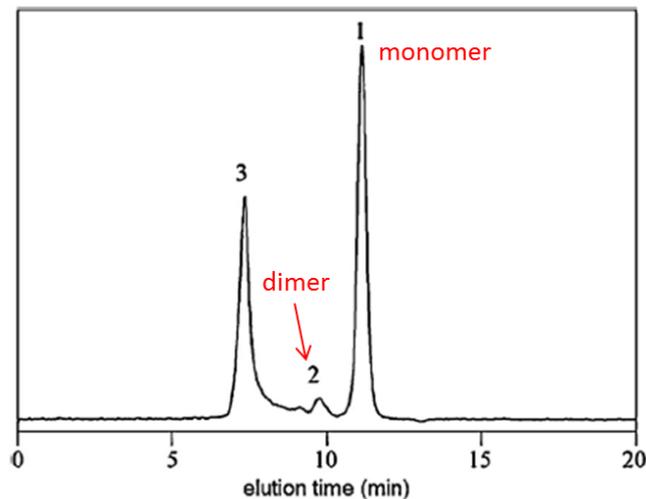


Figure 19 : Analyse par SEC d'un interféron α . Le pic 3 correspond à des agrégats. Adapté de Diress 2010.

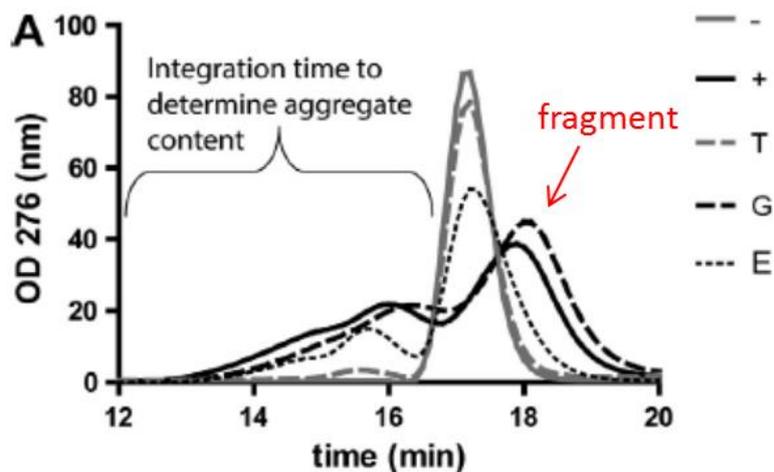


Figure 20 : Analyse SEC d'échantillons d'insuline incubés pendant 72 h avec ou sans cuivre. Le contrôle négatif correspond à de l'insuline incubée dans un tampon phosphate de sodium (PB). Les autres échantillons ont été incubés dans le PB avec 40 μ M de cuivre en absence (contrôle positif) ou en présence de triéthylène tétramine (TETA, noté T), ou de glutathion réduit (GSH, noté G) ou d'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA, noté E). L'oxydation catalysée par le cuivre induit la formation de fragments. Parmi les excipients testés, seul le TETA supprime complètement ces phénomènes d'oxydation. Adapté de Torosantucci 2013.

II.B.2. Techniques électrophorétiques conventionnelles

II.B.2.a. SDS-PAGE

Pour séparer des protéines selon leur taille, on emploie classiquement la technique de dodécylsulfate de sodium-électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Dans cette technique, les échantillons sont chauffés au préalable en présence de SDS, ce qui va les dénaturer (par rupture des liaisons non-covalentes) tout en leur conférant une charge négative uniforme proportionnelle à leur taille. Ainsi, les protéines complexées au SDS vont être séparées selon leur masse (leur densité de charges étant approximativement la même) dans le gel de polyacrylamide soumis à un champ électrique (Brunelle 2014, Zhu 2012). Les protéines peuvent être analysées sous une forme réduite ou non. Dans le premier cas on utilisera un agent réducteur tel que le β -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol, et un agent alkylant pour empêcher le réappariement des ponts disulfures durant la préparation des échantillons. La détection est généralement réalisée avec une coloration du gel au bleu de Coomassie ou avec du nitrate d'argent.

Le SDS-PAGE est une méthode très utilisée pour contrôler la pureté, l'homogénéité des lots et la stabilité d'une protéine thérapeutique (Nebija 2014, Hunt 1996, Derby 1996, Bennett 1994). Par exemple, Filipe et al ont réalisé des études de stabilité d'une immunoglobuline G (IgG) (Filipe 2012). L'IgG a été soumise à différents stress physiques ou chimiques : congélation/décongélation, variation de pH, exposition à la chaleur, agitation et oxydation catalysée par un métal (Fig. 21). Dans des conditions non-réductrices (Fig. 21A), toutes les formulations présentent une bande majeure autour de 150 kDa, qui correspond au monomère de l'IgG. Des bandes fines sont également observées à des masses plus faibles, en particulier pour l'échantillon oxydé, indiquant de la fragmentation. Dans des conditions réductrices (Fig. 21B), toutes les formulations présentent deux bandes principales autour de 50 et 25 kDa, issues des chaînes lourdes et légères. Les formulations non soumises à des stress ou ayant subi un cycle de congélation/décongélation, une exposition à la chaleur ou une agitation présentent également des bandes à 75, 125 et 150 kDa. Ces bandes correspondent à une combinaison de fragments issus des chaînes lourdes et légères, prouvant que tous les ponts disulfures n'ont pas été rompus.

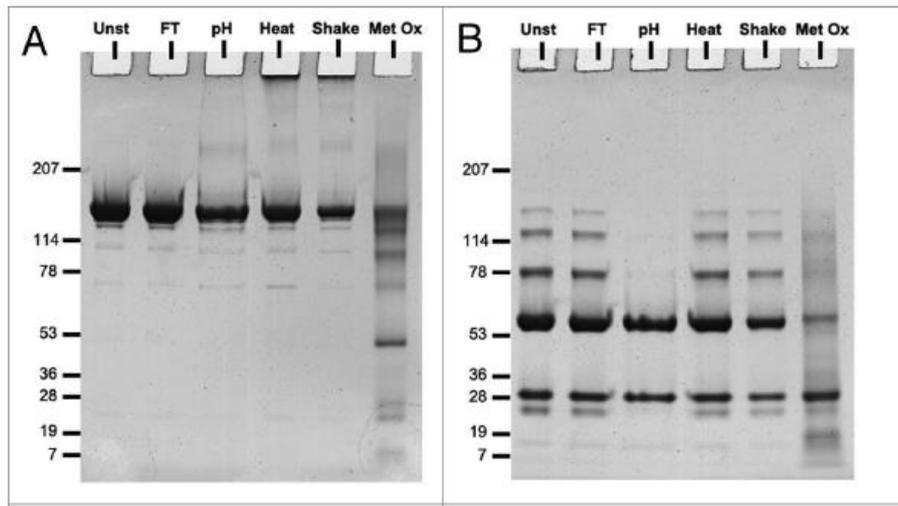


Figure 21 : Analyses SDS-PAGE d'une IgG soumise ou non à différents stress : A) conditions non-réductrices, B) conditions réductrices. Adapté de Filipe 2012.

La technique PAGE peut également être réalisée sans emploi de SDS, dans ce cas on parle de PAGE natif. Cette variante permet de ne pas dénaturer la protéine et donc de préserver sa conformation, ou encore d'éviter de dissocier des dimères ou polymères non-covalents. Très récemment, Naldi et al. ont développé une méthode en PAGE natif permettant de séparer les monomères et dimères de l'HSA, par analyse d'échantillons d'albumine provenant de sujets sains ou atteints de maladie du foie (Naldi 2015). Bien que cela ne concerne pas l'analyse d'HSA en tant que médicament, il nous semble intéressant d'évoquer cette méthode qui permet une jolie séparation des monomères et dimères de l'HSA. Le PAGE natif a également été employé pour analyser l'hétérodimère de l'AT (voir chapitre 1). La figure 22 suivante en est une illustration.

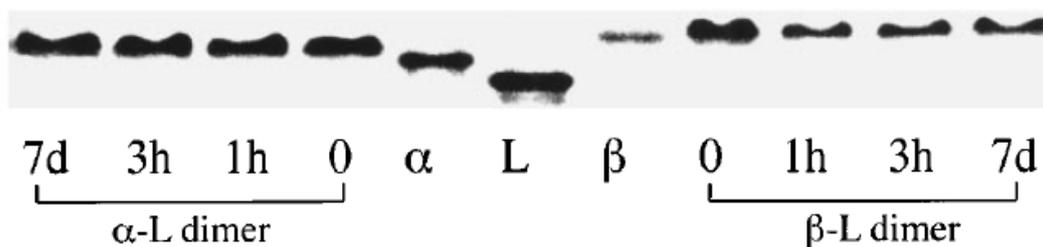


Figure 22 : Analyse par PAGE natif de mélanges équimolaires d' α -AT (à gauche) ou de β -AT (à droite) et de forme latente (L). Ce gel montre que, dans les deux cas, il y a formation instantanée d'hétérodimère et que celui-ci reste intègre après avoir été exposé pendant 7 jours à température ambiante. Issu de Zhou 1999.

Le PAGE natif permet également de séparer des isoformes de charge qui ne seraient pas séparées par SDS-PAGE. Par exemple, Radko et al. ont comparé l'analyse d'une protéine recombinante fluorescente, la rEGFP, par SDS-PAGE et PAGE natif (Radko 1999). Ils ont ainsi montré que la technique de PAGE natif permettait de séparer quatre composés (quatre bandes) alors que le gel obtenu par SDS-PAGE ne présentait qu'une seule bande (Fig. 23).

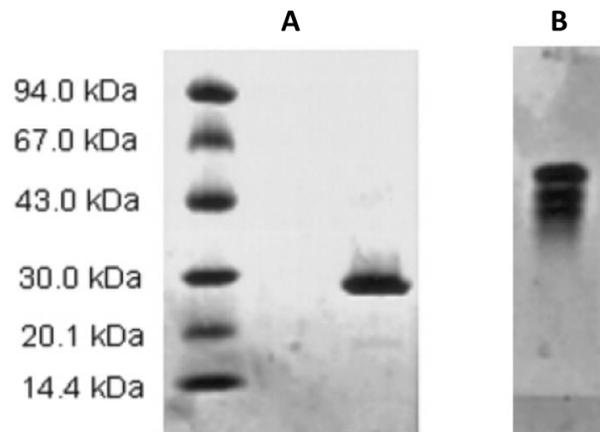


Figure 23 : Analyses PAGE de rEGFP (« recombinant red-shifted green fluorescent protein ») : A) par SDS-PAGE, B) par PAGE natif. Issu de Radko 1999.

Bien que très utilisée dans les industries pharmaceutiques, la technique de SDS-PAGE présente plusieurs inconvénients tels que l'emploi d'agents toxiques, une faible reproductibilité associée aux étapes de coloration/décoloration, des temps d'analyse longs et la difficulté d'automatisation.

II.B.2.b. Isoélectrofocalisation en gel (IEF)

La technique d'isoélectrofocalisation en gel (IEF) est une autre technique électrophorétique couramment utilisée pour caractériser les protéines thérapeutiques (Taverna 1998). Cette méthode sépare les protéines dans un gradient de pH créé par des molécules ampholytes porteuses (Gianazza 1995). Les molécules chargées migrent dans le champ électrique appliqué jusqu'à ce qu'elles atteignent la région de pH correspondant à leur point isoélectrique (pI). Leur charge nette devient alors nulle et elles s'immobilisent. Les molécules qui diffusent hors de leur région isoélectrique deviennent chargées et migrent à nouveau dans leur zone d'équilibre, où elles vont se focaliser en bandes étroites. Ces bandes sont alors visualisées à l'aide d'agents colorants et évaluées par densitométrie. Une autre option consiste à incuber les gels, juste après l'étape de séparation, dans un tampon à base de SDS afin de les

soumettre à une analyse par SDS-PAGE (on parle dans ce cas d'analyse en gel bidimensionnelle).

L'IEF est très utilisée pour étudier l'hétérogénéité de charge d'une protéine. Par exemple, les anticorps monoclonaux sont souvent analysés par cette technique (Staub 2011, Li 2007, Hunt 1996), qui permet de séparer des molécules dont la différence de pI est seulement de 0.01 unité de pH. A titre d'exemple, la figure 24 présente l'analyse d'une protéine de fusion recombinante par gel IEF (Sosic 2008). Dans cette expérience, 10 µg d'échantillon ont été déposés par bande de gel. Différents marqueurs, dont le pI est compris entre 3 et 10, ont été déposés en parallèle. L'analyse par IEF permet de séparer un grand nombre de variants de charge de la protéine de fusion. Ces variants peuvent être dus, entre autres, à de la déamidation ou à une hétérogénéité en N-terminal.

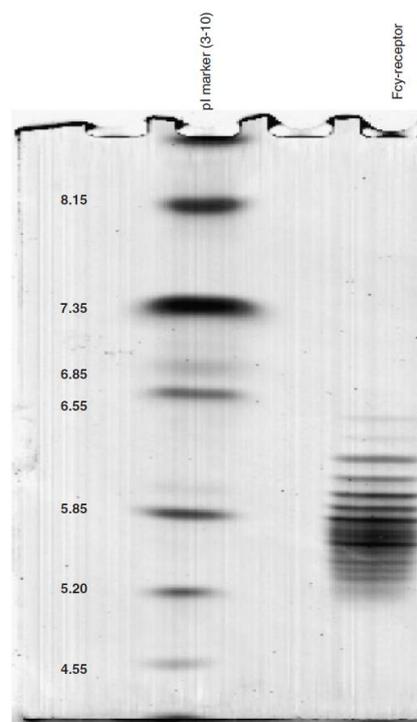


Figure 24 : Analyse d'une protéine de fusion recombinante par gel IEF. Séparation de nombreuses bandes qui correspondent à des variants de charge. Issu de Sosic 2008.

Un des principaux inconvénients de l'IEF est que cette méthode est semi-quantitative. La séparation est en outre assez sensible à la présence de sels ou de contaminants de l'échantillon. De plus, les temps de préparation et d'analyse sont longs. Dans de nombreux cas, on préférera donc avoir recours à une méthode d'IEF en capillaire.

II.B.3. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE) est devenue une technique couramment utilisée par les chimistes ou biochimistes pour analyser des protéines. Cette technique possède un haut pouvoir de résolution et présente les avantages de ne pas utiliser de solvants dénaturants, d'être peu consommatrice d'échantillon et relativement rapide. Différents modes existent pour l'analyse des protéines intactes : l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse capillaire en gel (CGE), l'isoélectrofocalisation capillaire (CIEF), l'électrochromatographie capillaire (CEC) et l'électrophorèse capillaire en milieu micellaire (MEKC). Tous sont basés sur la séparation des molécules sous un champ électrique (Creamer 2014). Dans le chapitre suivant nous allons décrire les trois principaux modes utilisés pour l'analyse des protéines apparentées, à savoir les modes CZE, CGE et CIEF. La figure 25 présente la proportion d'articles publiés exploitant ces trois modes.

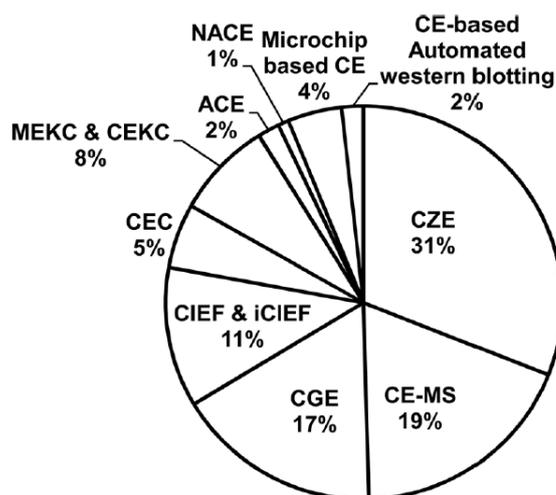


Figure 25 : Pourcentages des articles publiés exploitant les différents modes de CE pour la caractérisation et le contrôle qualité de protéines thérapeutiques sur les vingt dernières années (de 1994 à 2014). Issu de Tamizi 2015.

II.B.3.a. Bases fondamentales de la CE

L'électrophorèse capillaire est une technique d'analyse qui consiste à séparer des molécules en solution selon leur différence de mobilité électrophorétique sous l'action d'un champ électrique. Les analyses se font dans des capillaires de silice fondue de très faible diamètre (entre 20 et 100 μm) et les tensions appliquées peuvent aller jusqu'à 30 kV. En CE, la séparation des analytes résulte de deux mécanismes de transport : l'électromigration et l'électroosmose.

II.B.3.a.1. L'électromigration

L'électromigration ou migration électrophorétique correspond au déplacement d'une espèce chargée sous l'action d'un champ électrique. La vitesse électrophorétique résultante (v_{ep}), linéaire et constante, est donc fonction du champ électrique appliqué (E) et de la mobilité électrophorétique propre à l'espèce ionique (μ_{ep}) :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1)$$

avec v_{ep} la vitesse électrophorétique ($m.s^{-1}$), μ_{ep} la mobilité électrophorétique ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$), et E le champ électrique ($V.m^{-1}$).

La migration électrophorétique des composés cationiques s'effectue dans le sens du champ électrique ($\mu_{ep} > 0$, soit de l'anode vers la cathode) et celle des composés anioniques dans le sens inverse ($\mu_{ep} < 0$). La mobilité électrophorétique est propre à chaque composé et aux propriétés physico-chimiques de l'électrolyte. Dans le cas d'une dilution infinie, la μ_{ep} d'une particule chargée assimilée à une sphère peut s'exprimer par l'équation 2 suivante :

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

avec q la charge électrique globale de l'analyte (C), R_h son rayon hydrodynamique (m), et η la viscosité de l'électrolyte (Pa.s).

Dans le cas des protéines, il est nécessaire d'adapter l'équation 2, étant donné la taille et les caractéristiques structurales propres à celles-ci. Différents modèles ont été proposés pour estimer la μ_{ep} d'une protéine. Tout d'abord, on peut utiliser le modèle semi-empirique classique reliant la μ_{ep} à la charge (q) et la masse (M) de l'analyte (Adamson 1997, Hilser 1995, Rickard 1991), soit μ_{ep} proportionnelle à q/M^α . Trois modèles ont été proposés :

$$\text{La loi de Stokes : } \mu_{ep} \propto q/M^{1/3} \quad (3)$$

$$\text{La loi d'un polymère classique : } \mu_{ep} \propto q/M^{1/2} \quad (4)$$

$$\text{La loi d'Offord : } \mu_{ep} \propto q/M^{2/3} \quad (5)$$

La loi d'Offord considère que la force de friction qui retarde la protéine dans son mouvement électrophorétique est fonction de son aire de surface. Pour les protéines, c'est cette relation qui semble la plus appropriée.

La charge d'une protéine est généralement assimilée à son nombre de valence, calculé d'après sa séquence peptidique. Cependant, cette estimation ne prend pas en compte les phénomènes de suppression ionique et, par conséquent, la charge calculée d'une protéine est surestimée. Cette surestimation est particulièrement importante dans le cas des protéines étant donné que la suppression ionique est proportionnelle à la taille de la molécule. Il est donc nécessaire d'introduire un facteur correctif qui correspond au rapport entre la valence calculée (Z_c) et la valence réelle (Z_a) (Adamson 1997). La μ_{ep} d'une protéine a donc été exprimée par l'équation 6 suivante :

$$\mu_{ep} = \frac{Z_c}{K \left(\frac{Z_c}{Z_a}\right) M^{2/3}} \quad (6)$$

avec K une constante dépendante des conditions expérimentales, Z_c la valence calculée, Z_a la valence réelle, et M la masse de la protéine.

Grossman et al. ont proposé un autre modèle reliant la μ_{ep} à la charge de la protéine et au nombre d'acides aminés de la séquence peptidique (n), et ont introduit le terme $\ln(Z_c+1)$ pour compenser la suppression de charge :

$$\mu_{ep} \propto \ln(Z_c+1)/n^{0.43} \quad (7)$$

Adamson et al. ont modifié quelque peu le modèle de Grossman pour aboutir à l'équation :

$$\mu_{ep} \propto \ln(Z_c+1)/M^{0.435} \quad (8)$$

Bien qu'aucun modèle ne soit parfait, ceux-ci sont très utiles non seulement pour prédire la μ_{ep} d'une protéine mais également pour optimiser les séparations électrophorétiques, étudier les modifications structurales (phosphorylation, glycosylation, déamidation ...) ou encore les caractéristiques de charge de surface et la conformation des protéines.

La μ_{ep} d'une protéine est dépendante de plusieurs paramètres liés au milieu tels que le pH, la force ionique de l'électrolyte, sa viscosité et ses propriétés de solvation (qui influent sur le rayon hydrodynamique de la protéine). La température influe également sur la μ_{ep} à travers son influence sur la viscosité de l'électrolyte. Le pH du tampon d'analyse est particulièrement important puisqu'il détermine l'état d'ionisation de la protéine. Différents cas de figures se présentent. Si le pH est égal au pI de la protéine, celle-ci peut précipiter ou aura une μ_{ep} trop faible voire nulle, et par conséquent ne pourra être détectée. Si le pH est extrêmement acide ou basique, la protéine aura respectivement une charge positive ou négative très élevée et la séparation de différentes isoformes ne sera pas possible, car leur charge sera trop proche. L'idéal est donc de travailler à un pH relativement peu éloigné du pI de la protéine.

II.B.3.a.2. L'électroosmose

L'électroosmose ou écoulement électroosmotique (EOF) correspond à l'écoulement du liquide contenu dans le capillaire sous l'action d'un champ électrique. L'EOF est directement lié à la présence d'une double couche, appelée couche de Helmholtz, à la surface du capillaire rempli d'un électrolyte (Fig. 26).

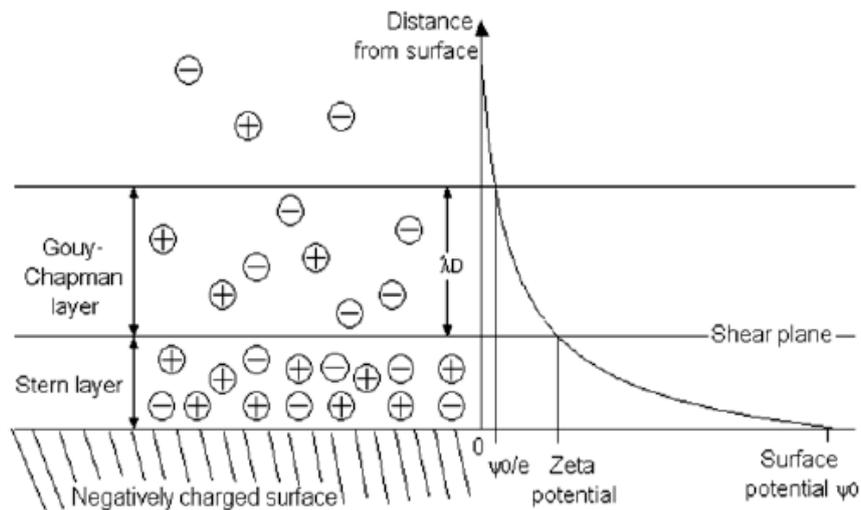


Figure 26 : Représentation de la double couche électrique et du potentiel zêta à la surface d'un capillaire de silice vierge. Issu de Pallandre 2006.

En effet, les capillaires de silice vierge étant composés de groupements silanols ionisés à partir de pH 2-3, la charge de surface négative exerce un pouvoir d'attraction sur les ions chargés positivement et un pouvoir de répulsion sur les ions chargés négativement dans

l'électrolyte. Selon le principe de l'électroneutralité, une grande partie des charges négatives de surface est compensée par des ions de charge opposée, formant ainsi une première couche stable et organisée, appelée couche de Stern. Cette couche compacte est composée d'ions oxoniums (H_3O^+), de molécules d'eau polaires et des cations les plus mobiles de l'électrolyte. Une seconde couche plus épaisse et plus éloignée, nommée couche de Gouy-Chapman ou couche diffuse, se compose de cations solvatés et de molécules d'eau. La limite entre la couche de Stern et la couche de Gouy-Chapman est appelée le plan de cisaillement. Ce plan représente la distance à la surface à partir de laquelle les cations de la double couche vont migrer vers la cathode sous l'effet du champ électrique. Au niveau du plan de cisaillement, le potentiel électrique est appelé potentiel zêta (ζ) (Kirby 2004). Ce potentiel est caractéristique de la double couche électrique présente à la surface du capillaire et s'exprime selon les équations 9 et 10 suivantes :

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon_r\varepsilon_0} \quad (9)$$

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon_r\varepsilon_0RT}{2IF^2}} \quad (10)$$

où ζ est le potentiel zêta (V), δ l'épaisseur de la double couche électrostatique (m), σ la densité de charges de surface du capillaire (C.m^{-2}), ε_r la constante diélectrique de l'électrolyte, ε_0 la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), R la constante des gaz parfait ($8,325 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T la température absolue (K), F la constante de Faraday (96500 C.mol^{-1}), et I la force ionique de l'électrolyte (mol.L^{-1}).

Le potentiel zêta est inversement proportionnel à la force ionique de l'électrolyte et dépend de la nature des contre-ions qui vont former la double couche. Dans le cas des capillaires de silice vierge, le potentiel zêta est négatif du fait de la charge de surface négative. Il est pH-dépendant car la charge de surface augmente avec le pH du fait de l'ionisation des groupements silanols.

Sous l'action d'un champ électrique, les cations de la couche diffuse sont donc attirés vers la cathode, tandis que les cations de la couche compacte sont retenus par des interactions électrostatiques fortes les liant aux groupements silanols. Cette migration de la couche extérieure va entraîner, sous l'influence de forces de frottement, l'ensemble des composés de

l'électrolyte vers la cathode. Cette migration représente l'écoulement électroosmotique (EOF) et s'effectue donc dans le sens de migration des cations (migration cationique). La vitesse linéaire de l'EOF (v_{EOF}) dépend du potentiel zêta et obéit à la relation de Helmholtz-Smoluchowski :

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E = - \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (11)$$

avec v_{EOF} la vitesse électroosmotique ($m.s^{-1}$), μ_{EOF} la mobilité électroosmotique ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$), E le champ électrique ($V.m^{-1}$), ζ le potentiel zêta (V), η la viscosité de l'électrolyte (Pa.s), ε_0 la permittivité du vide ($8,85.10^{-12} C^2.N^{-1}.m^{-2}$), et ε_r la constante diélectrique de l'électrolyte.

Plusieurs facteurs peuvent donc influencer la μ_{EOF} , notamment le pH de l'électrolyte, sa force ionique, sa composition et sa viscosité. La vitesse de l'EOF peut également être modifiée par le potentiel zêta de surface. Il est en effet possible de modifier la surface des capillaires en silice vierge afin de modifier ses charges de surface et donc de réduire ou inverser le potentiel zêta.

Le profil de l'EOF est plat comparé au profil parabolique obtenu par les techniques de séparation chromatographique, où l'écoulement des fluides se fait par pression hydrodynamique. Ce profil plat s'explique par le fait que la vitesse de l'EOF est indépendante de la distance à la surface, ce qui favorise des résolutions élevées.

En présence de l'EOF, la mobilité apparente de l'espèce en solution (μ_{app}) est la résultante de sa mobilité électrophorétique effective (μ_{ep}) et de la mobilité électroosmotique (μ_{EOF}) :

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{EOF} = \frac{L_{tot} L_{eff}}{V t_m} \quad (12)$$

avec L_{tot} la longueur totale du capillaire (m), L_{eff} sa longueur effective (m), V la tension appliquée (V), et t_m le temps de migration de l'analyte (s).

Comme décrit dans l'équation 13 suivante, la résolution (R_s) en CE est inversement proportionnelle à la μ_{EOF} :

$$R_s = 0.18 \Delta\mu_{ep} \sqrt{\frac{|V|}{D |\mu_{EOF} + \overline{\mu}_{ep}|}} \quad (13)$$

avec $\Delta\mu_{ep}$ la différence de mobilité électrophorétique effective entre les deux isoformes, V la tension appliquée, D le coefficient de diffusion moyen de la protéine, et $\overline{\mu}_{ep}$ la mobilité électrophorétique moyenne des deux isoformes.

Ainsi, si l'on travaille en mode contre-osmose, c'est-à-dire avec la protéine migrant en sens opposé à l'EOF, de très hautes résolutions de séparation peuvent être obtenues si la valeur absolue de la μ_{ep} de la protéine est très proche de celle de la μ_{EOF} . Dans le cas d'un mode co-osmose, où la protéine migre dans le même sens que l'EOF, une séparation optimale des différentes isoformes peut être obtenue si l'EOF est négligeable. Cette condition est respectée par emploi d'un capillaire de silice vierge en combinaison avec un tampon à pH acide.

II.B.3.a.3. Les phénomènes de dispersion

L'électrophorèse capillaire offre des séparations de grande efficacité qui présentent souvent de hautes résolutions, dû notamment au profil d'écoulement plat. Cependant, les performances électrophorétiques peuvent être limitées par des phénomènes de dispersion (Sanzgiri 2006). Les principaux facteurs de dispersion rencontrés en CE sont : la diffusion longitudinale, l'injection, l'effet Joule, les phénomènes d'adsorption sur la paroi du capillaire, et la différence de conductivité entre l'électrolyte et l'échantillon (Equation 14).

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{diff. long.}^2 + \sigma_{injection}^2 + \sigma_{effet Joule}^2 + \sigma_{adsorption}^2 + \sigma_{\Delta conductivité}^2 \quad (14)$$

où chaque σ^2 représente les variances apportées par chaque phénomène.

La diffusion longitudinale de l'échantillon est liée à l'introduction d'une zone concentrée qui génère un gradient de concentration lors du transfert de masse par diffusion des molécules. C'est certainement le facteur de dispersion le plus important. La dispersion liée à l'injection est généralement négligeable en CE du fait des très faibles volumes injectés, de l'ordre du nanolitre. L'effet Joule provient du passage d'un courant à travers un électrolyte. Il se manifeste par une augmentation de l'énergie interne et conduit à une augmentation générale de la température au sein du capillaire. Il génère également un gradient radial de température

découlant du transport de la chaleur vers l'extérieur. La puissance dissipée par effet Joule peut être décrite selon l'équation 15 suivante :

$$P = V I = G V^2 = \frac{\sigma \pi \phi_I^2 V^2}{4L} \quad (15)$$

avec P la puissance (W), I le courant (A), V la tension électrique (V), G la conductance (S), σ la conductivité ($S.m^{-1}$), Φ_I le diamètre interne du capillaire (m), et L la longueur du capillaire (m).

L'élévation de la température influence plusieurs paramètres clés tels que la viscosité de l'électrolyte et le potentiel zêta (Evenhuis 2006). En pratique, la viscosité d'un électrolyte diminue avec la température, alors que le potentiel zêta augmente. L'effet Joule doit donc être régulé par des systèmes de refroidissement permettant un contrôle précis de la température au sein du capillaire. L'utilisation de capillaires de faible diamètre ou d'électrolytes de force ionique modérée constituent également une solution à ce problème.

L'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire est une source importante de dispersion, entraînant notamment une asymétrie des pics et une perte de résolution. Ces phénomènes d'adsorption seront explicités en détails dans la section II.B.3.b.

II.B.3.a.4. Efficacité de séparation

En CE, si l'on considère le cas idéal où les phénomènes de dispersion sont dus uniquement à la diffusion longitudinale, l'efficacité de séparation est inversement proportionnelle au coefficient de diffusion des molécules (Equation 16) (Xuan 2005). Dans le cas de l'analyse des protéines intactes, de hautes efficacités de séparation peuvent ainsi être obtenues puisqu'elles ont des coefficients de diffusion faibles.

$$N = \frac{L_{eff}}{H} = \frac{\mu_{app} V L_{eff}}{2DL_{tot}} \quad (16)$$

avec H la hauteur de plateau théorique (m), L_{eff} la longueur effective du capillaire (m), L_{tot} sa longueur totale (m), V la tension appliquée (V), D le coefficient de diffusion moléculaire ($m^2.s^{-1}$), μ_{app} la mobilité électrophorétique apparente ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$).

II.B.3.b. Problèmes d'adsorption

Un des principaux inconvénients de la CE pour l'analyse des protéines est que celles-ci ont tendance à s'adsorber sur la paroi interne du capillaire de silice vierge. Il en résulte une diminution importante des performances électrophorétiques, liée essentiellement à une perturbation de l'EOF et à un élargissement des pics, conduisant à une mauvaise reproductibilité des temps de migration et des aires de pics (Lucy 2008, Stutz 2009). La figure 27 suivante décrit le model le plus simple et le plus réaliste pour l'adsorption des protéines sur une surface solide non poreuse. La 1^{ère} étape est le transport de la protéine vers la surface. La 2^{ème} étape implique l'interaction et l'attachement de la protéine à la surface. Cette forme adsorbée de la protéine peut, de manière réversible, désorber de la surface ou se relaxer en une conformation d'équilibre qui est irréversiblement retenue à la surface.

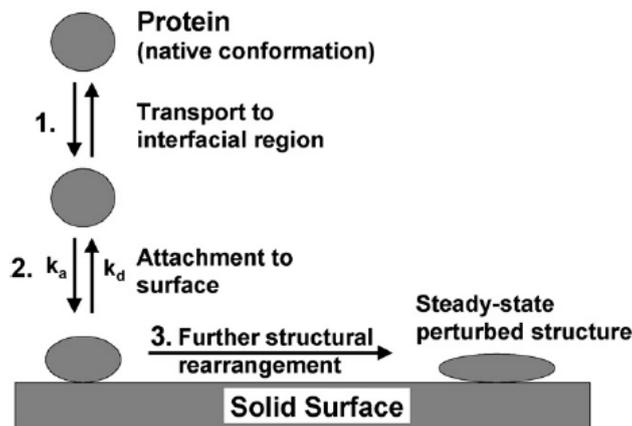


Figure 27 : Représentation schématique de l'adsorption des protéines sur une surface solide. Issu de Lucy 2008.

Ces phénomènes d'adsorption sont souvent liés à des interactions électrostatiques entre les groupements silanols du capillaire et les analytes, et dépendent de l'état de charge des protéines et de la surface du capillaire, ces deux paramètres étant corrélés au pH, à la force ionique et à la nature de l'électrolyte utilisé (Van der Veen 2004). Des liaisons hydrogènes, des interactions dipôle-dipôle, des forces de Van der Waals et des interactions hydrophobes peuvent également contribuer aux phénomènes d'adsorption (Gray 2004, Malmsten 1998). Des effets coopératifs entre des molécules déjà adsorbées et des molécules nouvellement analysées ont également été décrits (Verzola 2000 a). Cela proviendrait d'un changement conformationnel de la protéine adsorbée exposant ainsi d'autres sites d'interaction possibles vis-à-vis des protéines analysées par la suite. Pour minimiser les phénomènes d'adsorption, différentes stratégies existent. Un des moyens les plus simples consiste à augmenter la force

ionique de l'électrolyte. Ainsi, une compétition s'établit entre les ions de l'analyte et les co-ions de l'électrolyte pour les sites de liaison de surface. L'utilisation d'électrolytes à pH extrêmes peut également être envisagée. A pH très acide, les groupements silanols du capillaire seront protonés (donc neutres) et les interactions électrostatiques seront donc diminuées. Un pH très alcalin limitera l'adsorption des protéines acides, par répulsion électrostatique entre les protéines et la surface, toutes deux chargées négativement. Mais, comme nous l'avons expliqué, l'emploi de pH extrêmes n'est pas toujours favorable à la séparation de protéines apparentées. L'emploi d'additifs tels que des surfactants permet de réduire l'adsorption en diminuant la charge nette de la protéine ou en empêchant celle-ci d'approcher de la surface. On peut aussi optimiser les rinçages entre chaque analyse afin de désorber les protéines adsorbées à la surface du capillaire. Cependant, l'approche la plus efficace pour éviter ou minimiser les problèmes d'adsorption est de greffer les capillaires de manière dynamique ou permanente (Dolnik 2008).

II.B.3.b.1. Les revêtements dynamiques

Les revêtements dynamiques consistent à ajouter des petites molécules ou des polymères dans la solution électrolyte pour masquer, lors de la séparation, les charges de surface de manière éphémère. Ce type de revêtement présente les avantages d'être simple à préparer, de se régénérer facilement en surface et de coûter peu cher. Une simple étape de rinçage avant la séparation suffit dans la plupart des cas. Les principaux composés utilisés pour les greffages dynamiques sont les monoamines, les alkylamines, les surfactants et les polymères neutres ou cationiques (Lucy 2008, Righetti 2001 a). Selon le type d'additif utilisé, la charge négative de surface du capillaire sera réduite, neutralisée ou encore inversée (Stutz 2009). Dans le cas d'une adhésion physique, les polymères peuvent également augmenter la viscosité de la double couche électrique et modifier la constante diélectrique.

II.B.3.b.2. Les revêtements permanents ou semi-permanents

Un greffage permanent peut être réalisé de différentes manières : soit par adsorption physique avec un simple protocole de rinçage, soit par modification chimique de la surface du capillaire avec établissement de liaisons covalentes. Celui-ci est généralement réalisé en amont de la séparation.

Dans le cas des greffages covalents, des étapes complexes, multiples et longues sont souvent nécessaires. De plus, la reproductibilité entre les différents capillaires est souvent mauvaise (Nehmé 2011). Les revêtements adsorbés physiquement sont, quant à eux, fortement attachés à la paroi du capillaire par interactions électrostatiques, hydrogènes ou hydrophobes. Ils présentent plusieurs avantages tels qu'une procédure de greffage simple, une possibilité d'automatisation et régénération du greffage, mais également une modification possible de l'EOF. On peut classer les revêtements permanents en différentes catégories : polymères neutres, cationiques ou anioniques.

Les polymères neutres se lient par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes entre les groupements silanols protonés de la surface du capillaire et les groupements propres aux polymères. Dans ce cas, le prétraitement de la surface du capillaire est essentiel afin de maximiser les interactions et la stabilité des revêtements (Stutz 2009). Une catégorie de polymères neutres est représentée par les dérivés de la cellulose tels que l'hydroxyéthylcellulose (HEC), l'hydroxypropylcellulose (HPC) et l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). D'autres polymères neutres appartiennent à la famille des éthers d'oxygène, parmi laquelle l'oxyde de polyéthylène (PEO). En tant qu'accepteurs d'hydrogène, ces polymères sont plus favorables aux interactions par liaisons hydrogènes que les polymères à base de cellulose, qui sont plutôt des donneurs d'hydrogène. Enfin, une dernière catégorie inclut les polymères à base d'acrylamide : polydiméthylacrylamide (PDMA), polyacrylamide linéaire (LPA) et poly-N-hydroxyéthylacrylamide (PHEA).

Les polymères cationiques interagissent de manière électrostatique avec la surface chargée négativement des capillaires de silice vierge (Lucy 2008). Souvent, la solution polymérique est très longuement mise en contact avec la paroi du capillaire afin que le recouvrement soit total. Parmi les polymères cationiques, on peut citer le polyéthylène imine (PEI) qui est un polymère branché, et le polybrène (PB) et le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMAC), qui contiennent tous deux des amines quaternaires.

Afin d'améliorer la stabilité, la reproductibilité et les temps de vie des revêtements physisorbés, Katayama et al. ont introduit en 1998 les greffages multicouches appelés SMIL (« Successive multiple ionic-polymer layer ») (Katayama 1998 a). Ces types de revêtements seront traités en détails dans la section II.B.3.b.3.

Enfin une dernière classe de revêtements existe, celle des copolymères. A titre d'exemple nous pouvons citer l'époxy-poly(diméthylacrylamide) (Ep/DMA), qui est un copolymère neutre synthétisé dans le but d'augmenter l'hydrophilie du PDMA (Chiari 2001). Les groupements oxirane présents au sein du copolymère ont une interaction plus forte avec les groupements silanols du capillaire comparativement à d'autres copolymères d'acrylamide, conférant ainsi au revêtement une grande stabilité au cours du temps, tout en réduisant les interactions protéines/surface. Récemment, Acunha et al. ont développé, pour l'analyse des protéines basiques, un nouveau type de copolymère associant un polymère cationique, le tétraéthyl-diéthylène-triaminéthacrylamide (TEDETAMA), avec un polymère neutre, le 2-hydroxypropylméthacrylamide (HPMA) (Acunha 2015). Ces copolymères TEDETAMA/HPMA, avec un EOF inversé, permettent des séparations rapides et efficaces, et peuvent être utilisés lors du couplage de la CE à la spectrométrie de masse.

II.B.3.b.3. Les revêtements multicouches

Le principe d'un revêtement multicouche, appelé SMIL, consiste à emprisonner un polymère cationique entre un polymère anionique et la surface chargée négativement du capillaire. Le premier SMIL fut introduit par Katayama en 1998 (Katayama 1998 a). Composé d'une couche de PB et d'une couche de sulfate de dextran (DS), ce revêtement présentait une surface négative et permettait d'analyser des protéines acides à pH neutre. La même équipe a ensuite développé un revêtement triple couche PB-DS-PB, chargé positivement, pour l'analyse de protéines basiques à pH acide (Katayama 1998 b). Ce revêtement PB-DS-PB sera exploité quelques années plus tard par le groupe de Somsen pour des analyses par CE et CE couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) (Haselberg 2010 a, Haselberg 2011 a). D'autres groupes ont par la suite développé des revêtements SMIL. Catai et al. ont utilisé un revêtement double couche composé de PB et d'acide polyvinylsulfonique (PVS) pour analyser des protéines intactes (Catai 2007, Catai 2005). Ce revêtement anionique PB-PVS avait été développé au préalable par Bendahl et al. pour l'analyse de petites molécules organiques (Bendahl 2001). Graul et al. ont développé un revêtement multicouche à base de PDADMAC et de poly(sodium 4-styrènesulfonate) (PSS) pour former des revêtements anioniques ou cationiques (Graul 1999). Ce revêtement PDADMAC-PSS sera exploité ultérieurement par le groupe de Fabre, qui étudiera l'influence de paramètres expérimentaux tels que la concentration en polyélectrolyte et le nombre de couches (de 1 à 5) (Nehmé 2011).

Très récemment, l'équipe de Cottet a étudié l'influence de la nature des polyélectrolytes utilisés dans les SMIL sur les performances de séparation de protéines (Bekri 2015). Plus de vingt paires de polyélectrolytes ont été étudiées. Ils ont constaté que la nature du polyanion avait une importance primordiale sur la performance du revêtement, en termes d'efficacité de séparation et de stabilité, même si le SMIL se terminait par un polycation.

Les revêtements SMIL présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, contrairement aux revêtements covalents, ils sont faciles à préparer et peuvent être régénérés. De plus, ils permettent d'obtenir un EOF très reproductible et indépendant du pH, et sont beaucoup plus efficaces que les greffages monocouches. Ceci peut s'expliquer par un meilleur recouvrement des groupements silanols qui conduit à une surface plus hydrophile, diminuant ainsi l'adsorption des protéines (Gassner 2013).

Le tableau 4 suivant présente les différents types de revêtements permanents ou semi-permanents décrits dans la littérature pour l'analyse de protéines intactes. Afin d'être plus exhaustif, nous ne nous sommes pas limités à la séparation de protéines apparentées mais avons élargi le panel à l'analyse de mélanges de protéines (incluant des protéines non thérapeutiques) ou la séparation de glycoformes.

| Type de greffage | Charge | Protéines analysées | Références |
|------------------|--------|---|-------------------------------|
| HEC et HPMC | neutre | myoglobine | Verzola 2000 b |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Iki 1996 |
| HPC | neutre | mAb | Gassner 2013 Sanzgiri 2006 |
| LPA | neutre | rhIL-6 | Gysler 1999 |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Katayama 1998 b |
| PEO | neutre | HSA | Marie 2013, Alahmad 2011 |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Iki 1996 |
| PVA | neutre | mAb | Gassner 2013 Lin 2011 |
| | | AT | Kremser 2003 |
| | | lysozyme, cytochrome c, lactalbumine, α -chymotrypsinogène | Feldmann 2004 |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Katayama 1998 b |
| | | rtPA | Thorne 1996 |

| | | | |
|------------------|-----------------------|---|-------------------------------------|
| HEMA | neutre | lysozyme, cytochrome c, lactalbumine, α -chymotrypsinogène | Feldmann 2004 |
| Ultra Trol™ LN | neutre | mAb | Gassner 2013 |
| | | rhEPO | Balaguer 2006 |
| PB | positive | rhEPO | Balaguer 2006 Neusüß 2005 |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Katayama 1998 b |
| | | ribonucléase | Kelly 1996 |
| PEI | positive | mAb | Gassner 2013 |
| | | insuline, lysozyme, ribonucléase, anhydrase carbonique | Haselberg 2010 b |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase | Spanilá 2006 |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Erim 1995 |
| Ultra Trol™ HR | positive | mAb | Gassner 2013 |
| PB-DS | négative | lactalbumine, lactoglobuline | Katayama 1998 a |
| PB-PVS | négative | rhGH | Haselberg 2011 a Catai 2007 |
| | | insuline, lactalbumine, lactoglobuline, interféron- α , HSA | Catai 2005 |
| PB-DS-PB | positive | mAb | Gassner 2013 |
| | | rhIFN- β | Haselberg 2011 a |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Haselberg 2010 a Katayama 1998 b |
| PEI-DS-Protamine | positive | ribonucléase, cytochrome c | Kitagawa 2006 |
| PDADMAC-PSS | positive ou négative | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, lactalbumine, myoglobine | Nehmé 2011 |
| | | lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Graul 1999 |
| Ep/DMA | copolymère neutre | phycoérythrine | Chiari 2001 |
| PAM/PDMA | copolymère neutre | insuline, lysozyme, cytochrome c, ribonucléase, α -chymotrypsinogène | Zhang 2006 b |
| TEDETAMA/HPMA | copolymère cationique | lysozyme | Acunha 2015 |

Tableau 4 : Les différents revêtements permanents ou semi-permanents utilisés pour l'analyse de protéines (mAb, anticorps monoclonal ; IL, interleukine ; tPA, activateur tissulaire du plasminogène ; EPO, érythropoïétine ; GH, hormone de croissance ; IFN, interféron ; PVA, alcool polyvinylique ; HEMA, 2-hydroxyéthyl méthacrylate ; PAM, polyacrylamide).

II.B.3.c. Electrophorèse capillaire de zone (CZE)

L'électrophorèse capillaire de zone (CZE), encore appelée électrophorèse capillaire en solution libre, est le mode le plus simple et le plus fréquemment utilisé pour la séparation de protéines. Dans ce mode, les capillaires sont préalablement remplis avec un électrolyte et les protéines injectées vont se déplacer dans un champ électrique grâce à leur mobilité électrophorétique.

La CZE est une méthode de choix pour séparer les protéines thérapeutiques de leurs produits de dégradation (Creamer 2014, Alahmad 2011, Sanzgiri 2006, Catai 2005, Frenz 1989). Par exemple, Catai et al. ont développé une méthode CZE afin de caractériser une hormone de croissance humaine recombinante (rhGH) (Catai 2007). Leur méthode, qui repose sur les conditions de la pharmacopée européenne, utilise un capillaire double couche greffé de manière non-covalente PB-PVS, chargé négativement. Ainsi, ils sont parvenus à séparer la rhGH de ses produits de dégradation, parmi lesquels une forme clivée et une forme déamidée. Comparativement à la méthode décrite dans la pharmacopée européenne, la méthode développée a permis d'améliorer l'efficacité de la séparation (nombre de plateaux théoriques supérieur à 300 000 pour le pic majoritaire) ainsi que la résolution (Fig. 28). Une amélioration de la répétabilité a également été observée avec une RSD inférieure à 0,68 % pour les temps de migration du composé principal et ses formes apparentées.

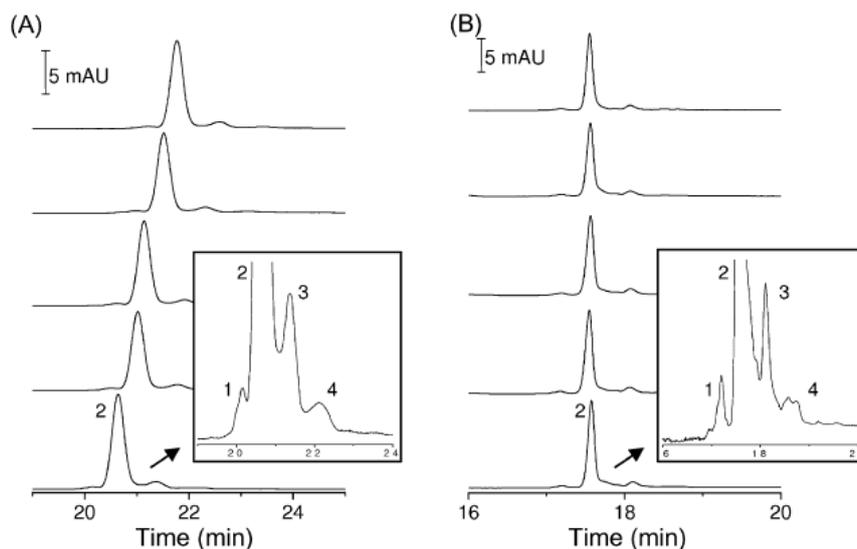


Figure 28 : Analyses CZE de la rhGH selon les conditions de la pharmacopée européenne avec A) un capillaire de silice vierge, B) un capillaire double couche PB-PVS. Les pics détectés correspondent probablement à : pic 1, forme clivée ; pic 2, rhGH intacte ; pic 3, isoforme Gln-18 ; pic 4, forme déamidée. Issu de Catai 2007.

Dans le domaine des protéines thérapeutiques, le mode CZE est désormais souvent utilisé pour étudier l'hétérogénéité de charge des anticorps monoclonaux (Moritz 2015, Shi 2012, He 2011 b). Par exemple, une équipe mexicaine a exploité le mode CZE afin de caractériser l'hétérogénéité de charge de plusieurs anticorps (Espinoza de la Garza 2013). Leur méthode utilise un capillaire neutre afin de minimiser les phénomènes d'adsorption et d'avoir un EOF très faible, favorable à une bonne résolution. Pour chaque anticorps, une optimisation de différents paramètres tels que la force ionique et le pH de l'électrolyte tampon a été effectuée. La figure 29 présente l'exemple de l'infliximab. On constate qu'une diminution de la force ionique accompagnée d'une augmentation du pH de l'électrolyte tampon améliore fortement la résolution.

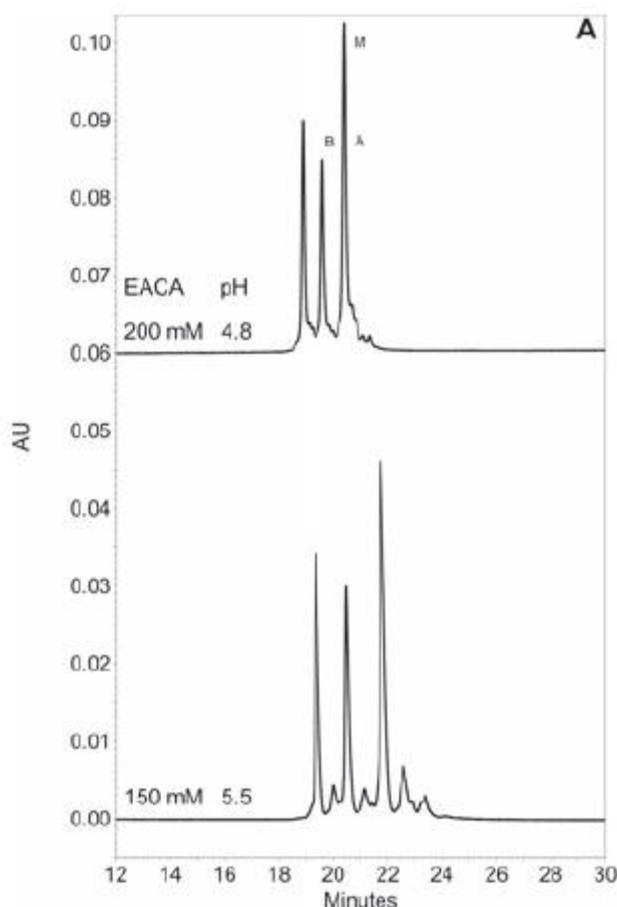


Figure 29 : Développement d'une méthode CZE permettant d'étudier l'hétérogénéité de charge de l'infliximab (Remicade[®]). Effet de la concentration en acide 6-aminocaproïque (EACA) et du pH du tampon d'analyse sur la résolution. Issu de Espinoza de la Garza 2013.

La CZE peut également servir à des études de stabilité. Par exemple, Dalmora et al. ont développé une méthode CZE afin de pouvoir quantifier les possibles dégradations d'un facteur de croissance rhG-CSF (« recombinant human granulocyte-colony stimulating factor ») (Dalmora 2009). Ils ont donc soumis la molécule thérapeutique à différentes dégradations chimiques (hydrolyse acide ou basique, incubation à température élevée, stress oxydant avec du peroxyde d'hydrogène), puis l'ont analysée par CZE. Les réactions de dégradation ont conduit à une forte diminution du pic de la forme active de la protéine et à l'apparition d'un nouveau pic dans le cas d'une hydrolyse basique et d'un stress thermique.

Mais la CZE peut également permettre de détecter de la dimérisation. Par exemple, en 1999, Gysler et al. ont développé une méthode CZE couplée avec de l'isotachophorèse (ITP) qui a permis de détecter, en plus de la forme monomérique, deux formes dimériques de l'interleukine-6 recombinante, qui n'avaient pas pu être séparées par SEC (Gysler 1999). Ils ont montré que la quantité des deux dimères augmentait très fortement par incubation de la protéine à 45°C. La même équipe a ensuite tenté de caractériser la structure de ces dimères par couplage de la méthode CZE développée avec la spectrométrie de masse (voir section V.A.3.b. chapitre 5).

Très peu de publications relatent l'analyse d'antithrombine par CZE. Le mode CZE a été appliqué pour la 1^{ère} fois à l'analyse d'AT en 1994 par l'équipe de Freitag (Reif 1994). Le but de leurs travaux consistait à contrôler la production d'AT recombinante, c'est-à-dire vérifier sa présence dans le surnageant de culture cellulaire. La méthode développée ne permet pas de séparer différentes formes d'AT. En 2001, Dönges et al. ont développé une méthode d'électrophorèse capillaire en milieu micellaire (MEKC) avec un capillaire de silice vierge et un tampon composé de borate de sodium, SDS et β -cyclodextrine à pH 9 (Dönges 2001). Cette méthode, qui peut être considérée comme de la CZE puisque les protéines ne pénètrent pas dans les micelles, a permis de séparer avec une bonne résolution deux pics correspondant aux glycoformes α et β de l'AT (Fig. 30). La même équipe appliquera par la suite cette méthode au dosage des glycoformes d'AT contenues dans des plasmas de donneurs sains ou présentant un sepsis (Römisch 2002).

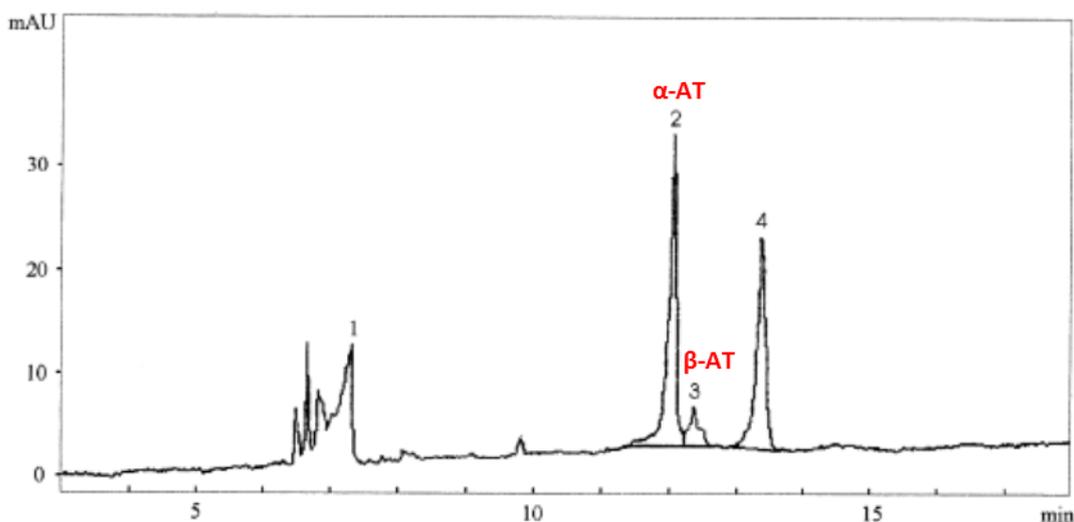


Figure 30 : Analyse d'AT issue du plasma par MEKC. Le pic 4 correspond à de l'albumine présente dans le plasma. Conditions expérimentales : capillaire de silice vierge ; tampon : borate de sodium 60 mM, SDS 40 mM, cyclodextrine 20 mM, diaminopentane 1 mM, pH 9. Adapté de Dönges 2001.

En 2003, Kremser et al. ont développé une méthode CZE utilisant un capillaire neutre et un tampon à base d'acide acétique et d'urée à pH 2,5 (Kremser 2003). Cette méthode a permis de séparer six glycoformes d'AT avec une résolution moyenne (Fig. 31). La même équipe a par la suite couplé cette méthode à la spectrométrie de masse afin d'identifier les glycoformes séparées (Demelbauer 2004 a) (voir chapitre 5).

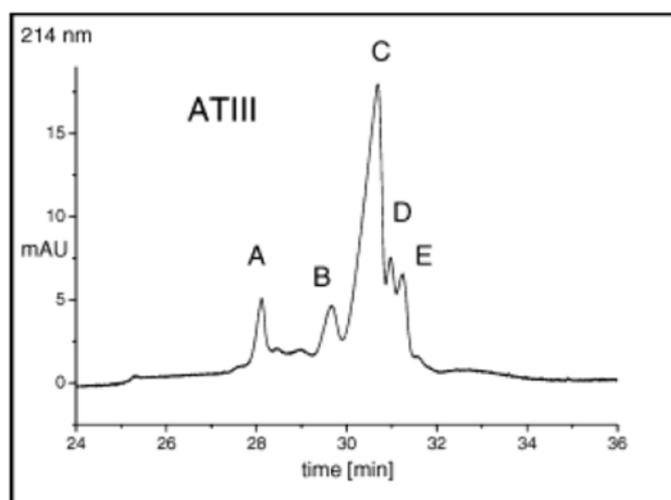


Figure 31 : Analyse d'AT par CZE. Le pic A correspond à une glycoforme β -AT et les pics B, C, D et E à des glycoformes α -AT. Conditions analytiques : capillaire PVA ; tampon, acide acétique 1M, urée 4 M, pH 2,5. Adapté de Kremser 2003.

Finalement, jusqu'à présent, aucune des méthodes CZE décrites dans la littérature n'a permis de détecter des formes apparentées de l'AT.

II.B.3.d. Electrophorèse capillaire en gel (CGE)

L'électrophorèse capillaire en gel (CGE) est l'adaptation de l'électrophorèse en gel conventionnelle au format du capillaire. En effet, dans ce mode, l'échantillon est injecté dans un capillaire rempli d'un gel composé d'un polymère linéaire ou branché (par exemple polyacrylamide, polyéthylène glycol, dextran), afin de créer un réseau enchevêtré utilisé comme tamis moléculaire (Krull 1997). Deux variantes existent dans ce mode. On peut travailler en conditions dénaturantes avec emploi de SDS (dans ce cas les molécules sont séparées uniquement selon leur taille puisqu'elles ont toutes la même densité de charges), ou alors en conditions non-dénaturantes (dans ce cas les molécules sont séparées selon leur taille mais également selon le rapport charge sur taille).

Actuellement, ce sont surtout des gels dits « remplaçables » qui sont utilisés pour la séparation et ajoutés dans l'électrolyte support. Ces types de gels sont constitués d'un réseau de polymères de faible viscosité tels que le polyacrylamide linéaire ou l'agarose à bas point de fusion (Zhu 2012). Par simple rinçage du capillaire, ces gels peuvent être remplacés par une solution neuve. La reproductibilité des analyses s'en trouve ainsi améliorée. Le mode CGE possède plusieurs avantages tels qu'une automatisation envisageable, une précision élevée ainsi qu'une grande vitesse d'analyse. De plus, comparé au SDS-PAGE ou à la SEC, ce mode présente l'avantage d'être plus résolutif (Staub 2011). La CGE est fréquemment utilisée dans les laboratoires pharmaceutiques pour l'analyse des protéines apparentées. Elle permet notamment de séparer des variants de taille (dimères ou fragments) d'anticorps (Creamer 2014, Shi 2012, Hunt 1999, Krull 1997, Hunt 1996).

En 1994, Bennett et al exploitèrent le mode CGE en conditions dénaturantes (SDS-CGE) pour séparer différentes formes d'une IgG, notamment les formes monomérique et dimérique de l'anticorps, mais également les chaînes lourdes et légères (Bennett 1994). En 2000, Lee et al. réussirent, quant à eux, à séparer un nombre important de fragments d'IgG. La figure 32 montre les électrophérogrammes obtenus par SDS-CGE de deux anticorps monoclonaux murins IgG1 et IgG2 (Lee 2000). Ces analyses ont été réalisées sans agent réducteur. Dans les deux cas, le pic majoritaire correspond à l'anticorps intact. Les autres pics détectés correspondent à des fragments. Cette fragmentation peut être due à l'absence de certains ponts disulfures intermoléculaires, un assemblage incomplet, ou une dégradation de l'anticorps par

protéolyse. Le pic supplémentaire qui migre après le pic majoritaire de l'IgG2 provient certainement d'une population hétérogène qui lie moins le SDS.

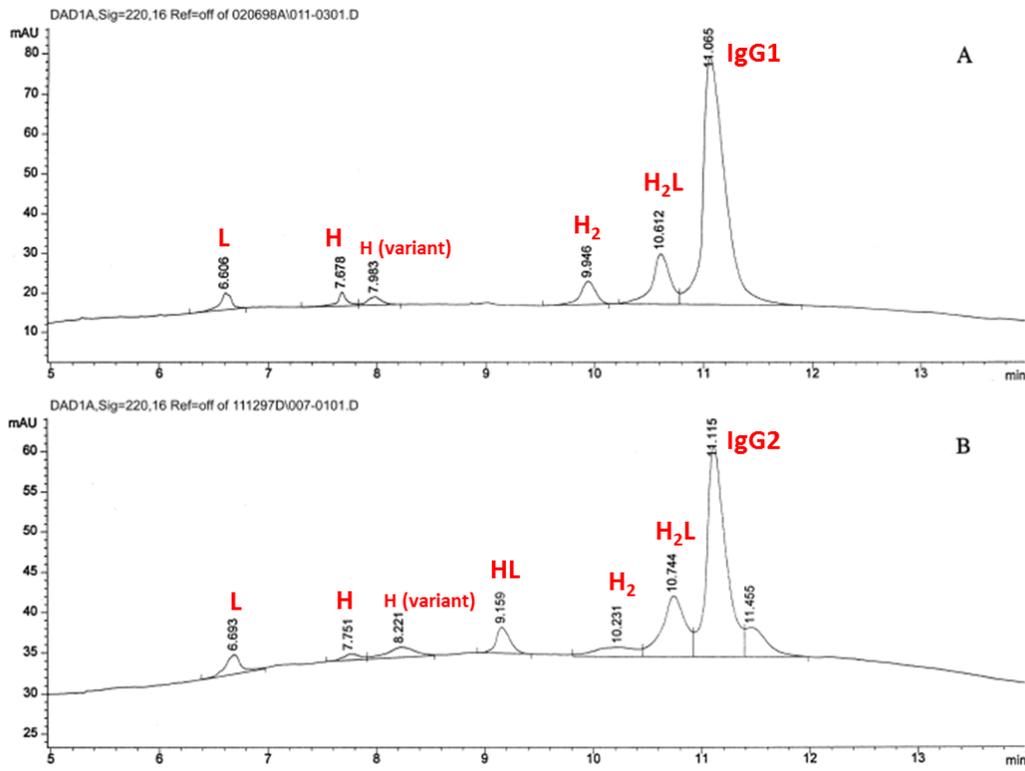


Figure 32 : Analyses SDS-CGE de deux anticorps monoclonaux murins : A) IgG1, B) IgG2. (L, chaîne légère ; H, chaîne lourde). Adaptée de Lee 2000.

Les anticorps monoclonaux sont connus pour se cliver dans la région hinge sous l'effet de pH extrêmes, de températures élevées ou en présence de métaux tels que le cuivre. Ce clivage va affecter le temps de vie des anticorps thérapeutiques et par conséquent diminuer la qualité des préparations pharmaceutiques. En 2011, Rustandi et al. ont développé une méthode SDS-CGE qui permet d'étudier l'impact des différents facteurs de stress précités (Rustandi 2011). De plus, cette méthode permet de distinguer les clivages dus à une oxydation par le cuivre de ceux engendrés par des températures ou pH élevés.

II.B.3.e. Isoélectrofocalisation capillaire (CIEF)

L'isoélectrofocalisation capillaire (CIEF) combine le haut pouvoir de résolution de l'isoélectrofocalisation en gel conventionnelle avec les avantages de l'électrophorèse capillaire. Dans cette technique, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique (pI) dans un gradient de pH formé par des ampholytes sous l'influence d'un champ électrique (Wehr 1996). Lorsque les protéines atteignent la zone du capillaire où le pH est égal à leur pI, elles deviennent neutres et arrêtent leur migration, c'est l'étape de focalisation. Après cette étape, les analytes sont poussés vers le détecteur (étape de mobilisation) soit en appliquant une pression, soit en exploitant l'EOF qui dans ce cas est maintenu, ou encore par mobilisation chimique (Wehr 1996). En CIEF, les capillaires sont souvent greffés afin de réduire l'EOF et de diminuer les phénomènes d'adsorption (Staub 2011). Des standards internes sont très souvent co-injectés afin de pouvoir déterminer le pI des protéines.

La CIEF est une technique très utilisée dans les laboratoires pharmaceutiques pour l'analyse des protéines apparentées (Creamer 2014). Elle permet notamment de déterminer le pI des protéines et caractériser des variants de charge (Suba 2015, Shaltout 2014, Kinoshita 2013, Lin 2011). Elle est souvent préférée à l'IEF conventionnelle en raison de sa rapidité d'analyse, sa plus grande résolution (de l'ordre de 0,005 unité de pH) et surtout sa grande précision quantitative. Récemment, Cao et al. ont développé une méthode CIEF rapide, capable de déterminer l'hétérogénéité de charge d'un biosimilaire du trastuzumab, un anticorps monoclonal (Cao 2014) (Fig. 33). Différents paramètres furent optimisés, tels que le temps de focalisation et la température de séparation, afin de produire une méthode rapide et robuste. La méthode présente une bonne précision sur la valeur des pI estimés pour chaque variant de charge, avec des RSDs inférieures à 0,16 % pour des analyses intra-journalières (n=6) et inférieures à 0,18 % pour des analyses inter-journalières (n=9).

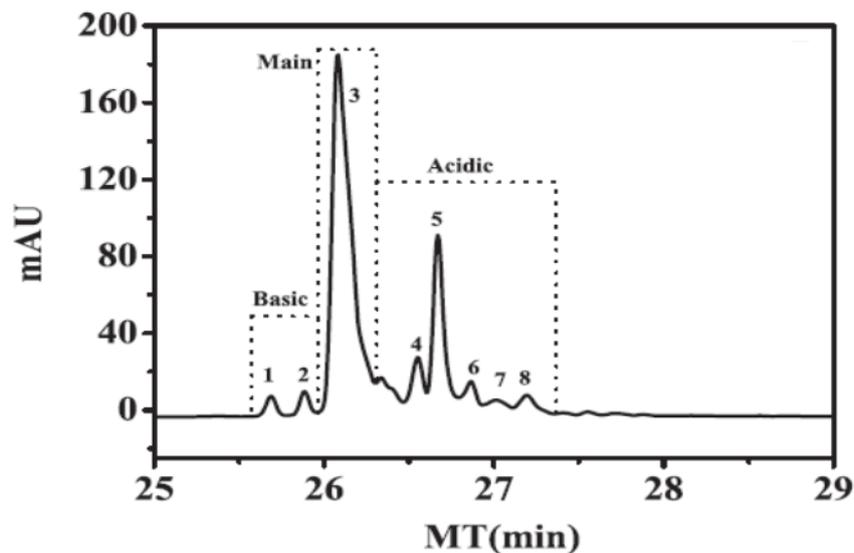


Figure 33 : Analyse CIEF d'un biosimilaire du trastuzumab, permettant de séparer différents variants de charge. Adapté de Cao 2014.

La CIEF est particulièrement adaptée à la détection de formes déamidées (Lasdun 2001, Frenz 1989). Par exemple, une équipe américaine a récemment publié une méthode CIEF permettant d'analyser les formes déamidées d'une enzyme ErA tétramérique (protéine thérapeutique utilisée dans le traitement de la leucémie) (Gervais 2014). Leur méthode CIEF utilise des conditions complètement dénaturantes. En effet, certains résidus asparagine de la protéine se trouvent dans des régions partiellement enfouies et une variation de charge sur ces résidus (suite à une déamidation) risquerait de ne pas être détectée par CIEF. De plus, cela permet de s'affranchir des variations de charge dues à un changement structural de la protéine. Leur méthode a été appliquée à l'analyse de variants déamidés de l'enzyme. Comme on le voit sur la figure 34, chaque mutant déamidé a un profil électrophorétique différent et un pI différent. La méthode développée a également été appliquée à l'analyse d'un échantillon d'ErA soumis à des dégradations forcées, ce qui a permis de mettre en évidence la formation de plusieurs formes déamidées. Cette méthode CIEF permet donc de contrôler, de manière qualitative et quantitative, les formes déamidées de l'ErA.

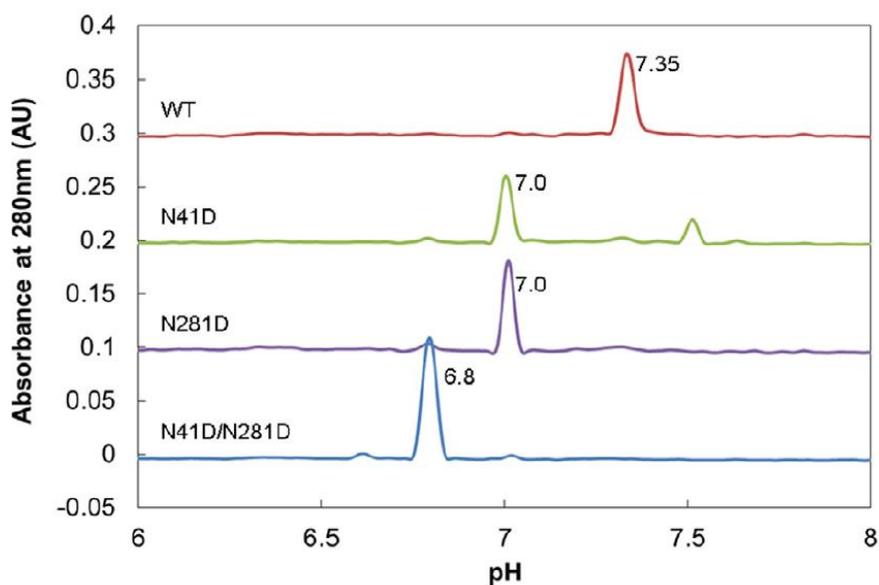


Figure 34 : Analyses CIEF de mutants déamidés d’une enzyme ErA (« *Erwinia chrysanthemi* *L-Asparaginase* »). WT, ErA wild type ; N41D, ErA déamidée en position N41 ; N281D, ErA déamidée en position N281 ; N41D/N281D, ErA déamidée en position N41 et N281. Issu de Gervais 2014.

En CIEF, l’étape de mobilisation par pression peut conduire à des distorsions de bande, ce qui augmente les RSDs des temps de migration et entraîne une diminution de la résolution. Pour pallier ce problème les fabricants d’appareils ont développé des techniques d’imagerie couplée au mode CIEF : on parle alors d’iCIEF. Ce mode spécial évite l’étape de mobilisation et a pour avantage de visualiser la séparation dès que la focalisation est terminée, la gaine de polyimide étant brûlée sur toute la longueur du capillaire (Anderson 2012, Salas-Solano 2012, Sosic 2008, Li 2007). Il permet également de réduire la durée des analyses.

II.B.4. Spectrométrie de masse et techniques couplées

Pour analyser des protéines thérapeutiques par spectrométrie de masse (MS), deux approches existent : soit les protéines d’intérêt sont préalablement digérées par une enzyme (trypsine, LysC, papaine…) et les peptides générés sont analysés par MS ou MS/MS (ce qui permet de faire de la cartographie peptidique), soit les protéines intactes sont analysées directement après les avoir ionisées par une technique d’ionisation électrospray (ESI) ou d’ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI). Dans les industries pharmaceutiques, la 1^{ère} approche est appelée “bottom-up” et la seconde “top-down” (Srebalus Barnes 2007). Nous ne traiterons pas dans ce qui suit les analyses réalisées sur des protéines digérées, pour se concentrer sur l’analyse des protéines apparentées intactes.

II.B.4.a. Spectrométrie de masse (MS)

Très peu d'exemples sont décrits dans la littérature concernant l'analyse de protéines thérapeutiques intactes par MS seule dans le cadre d'une recherche de formes apparentées. Notre groupe a publié en 2013 une analyse d'albumine plasmatique commerciale par MS en infusion directe, permettant de mettre en évidence, entre autres, différentes formes oxydées et tronquées de l'albumine (voir section IV.A.). Comparativement à ce qui avait été décrit par Bar-Or et al. en 2005 par analyse LC-MS d'échantillons d'albumine (voir section II.B.4.b.), cette analyse par infusion directe avait permis de détecter deux nouvelles formes oxydées de l'albumine.

En 2010, Kükrrer et al. ont développé une méthode MS en condition native pour détecter les oligomères d'une IgG intacte (Kükrrer 2010). Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre de masse à temps de vol (TOF) et une ionisation ESI en mode positif. Les échantillons d'IgG ont été dilués dans un tampon à base d'acétate d'ammonium et injectés directement dans le spectromètre de masse. Deux types d'IgG ont été analysés : une IgG non soumise à un stress et une IgG soumise à un stress par variation de pH. Le spectre de masse de l'IgG non stressée a mis en évidence, en plus du monomère, une petite quantité de dimère (0,2 %) (Fig. 35). Le spectre de masse de l'IgG stressée a montré la présence d'une plus grande quantité de dimère (9,5 %) mais également d'une petite quantité de trimère (0,4 %). Des analyses par SEC ont également été réalisées et les fractions obtenues ont été analysées par la méthode MS développée. Ces analyses ont permis de détecter des formes mono, di-, tri- mais également tétramériques de l'IgG, et calculer leur masse respective.

En 2015, le groupe de Bertucci a développé une méthode MS avec une ionisation MALDI en mode positif et un spectromètre de masse TOF afin d'analyser des échantillons plasmatiques contenant de l'albumine (Naldi 2015). La méthode MALDI-TOF-MS développée a permis de détecter la forme dimérique de l'HSA.

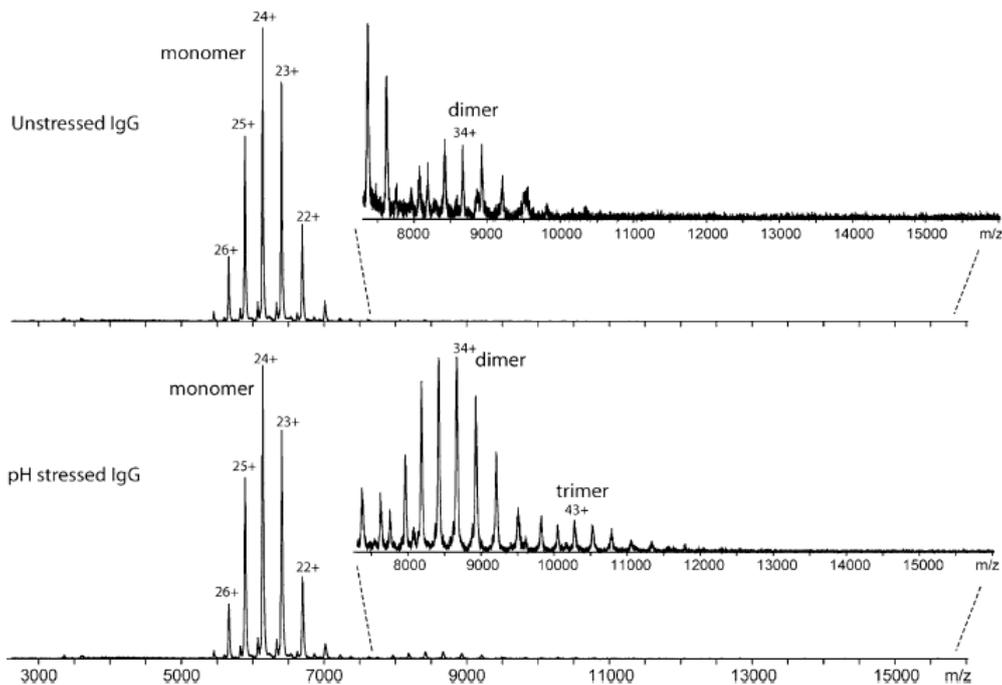


Figure 35 : Spectres de masse ESI-TOF-MS en condition native d'échantillons d'IgG soumis ou non à un stress par variation de pH. Issu de Kükrer 2010.

L'inconvénient d'analyser des protéines apparentées par MS est qu'on ne les sépare pas. De plus, les analyses MS par infusion directe engendrent une perte de signal par suppression ionique, et donc une perte d'information. Ainsi, pour contrôler la qualité ou la stabilité des protéines thérapeutiques, la MS est désormais souvent précédée d'une étape séparative (on-line ou off-line) réalisée avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire.

II.B.4.b. Chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS)

Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenu une technique incontournable pour caractériser les protéines apparentées, mais dans la majorité des cas l'échantillon protéique est digéré avant son analyse. Pour cela, différentes enzymes peuvent être utilisées (trypsine, papaïne, carboxypeptidases, LysC, ideS, ...). Selon leur nature, la protéine ne sera pas clivée au même endroit. Par exemple, dans le cas d'un anticorps monoclonal, l'utilisation de papaïne permettra de libérer les domaines Fab et Fc, alors que l'ideS libérera deux domaines Fab reliés ensemble ou deux demi-domaines Fc (Fig. 36) (Beck 2013 b).

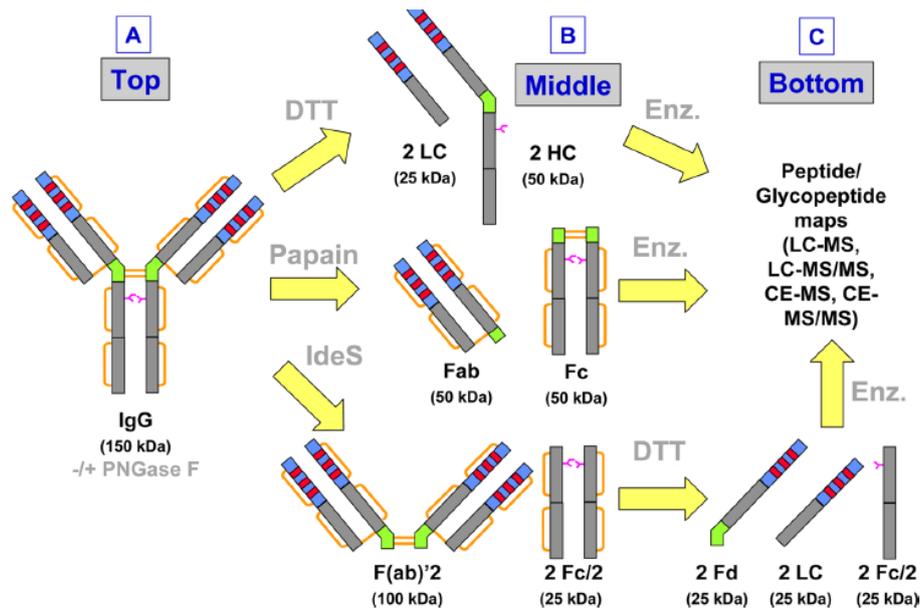


Figure 36 : Fragments provenant de la digestion enzymatique d'un anticorps monoclonal. Issu de Beck 2013 b.

Relativement peu d'exemples sont décrits dans la littérature concernant l'analyse de protéines thérapeutiques intactes par LC-MS (Karlsson 1999, Reubsæet 1998). En 2005, Bar-Or et al. ont développé une méthode LC-MS afin d'analyser des échantillons d'albumine commerciaux ou issus de donneurs sains (Bar-Or 2005). Cette méthode, utilisant de la RP-HPLC, une ionisation ESI positive et un analyseur TOF, a permis de détecter et quantifier des formes oxydées et tronquées de l'albumine (Fig. 37). Des préparations d'albumine produites par six laboratoires pharmaceutiques différents ainsi que des échantillons d'albumine issus de sang de donneurs volontaires ont été analysés et comparés de manière qualitative et quantitative. Leur étude a ainsi montré que les albumines commerciales présentaient une proportion beaucoup plus importante de formes oxydées (c'est-à-dire formes dans laquelle la Cys34 est liée à un autre composé).

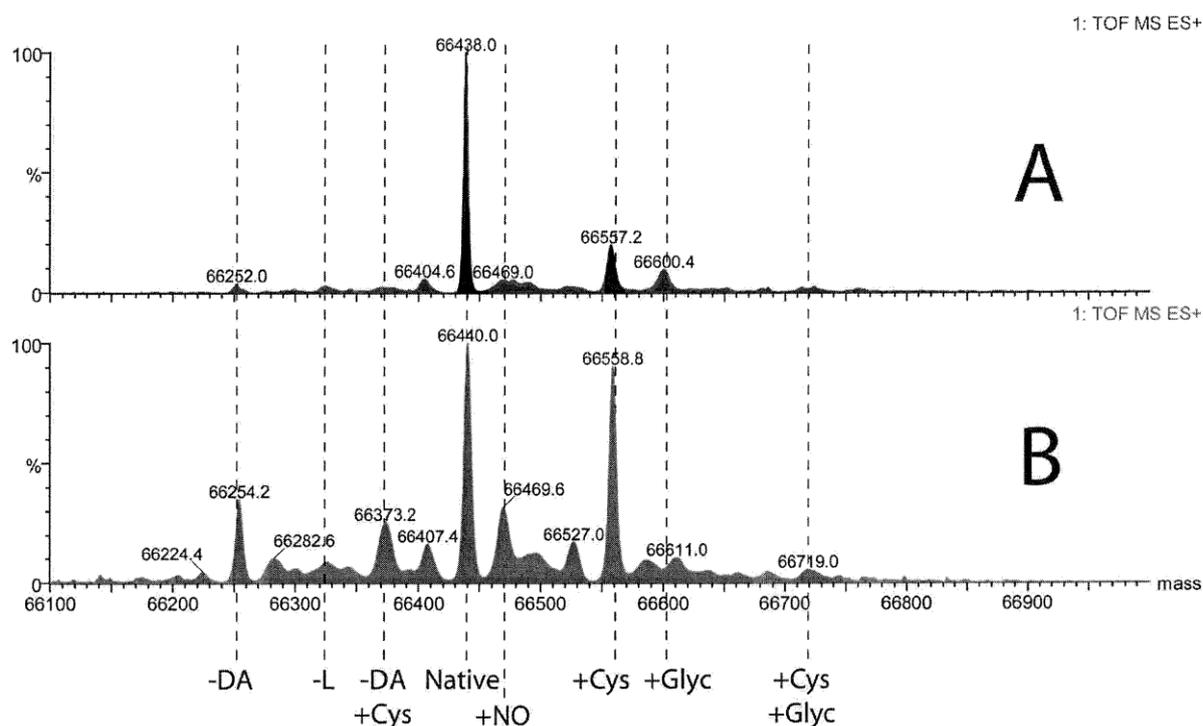


Figure 37 : Analyse LC-ESI-TOF-MS de A) un échantillon d'albumine issu du plasma d'un donneur volontaire sain, B) une préparation d'albumine commerciale. Les formes d'albumine sont les suivantes : -DA, absence des résidus aspartate et alanine en N-terminal ; -L, absence d'un résidu leucine en C-terminal ; +Cys, Cys34 liée à une cystéine libre ; +NO, Cys34 liée à un oxyde nitrique ; +Glyc, forme glyquée. Issu de Bar-Or 2005.

Plus récemment, Turell et al. ont développé une nouvelle méthode LC-MS permettant également de séparer des formes oxydées de l'HSA (Turell 2014). La méthode LC mise en jeu a été du chromatofocusing et le spectromètre de masse utilisé une orbitrappe, en mode ESI positif. Le couplage a été réalisé en mode off-line. Leur méthode a permis de séparer et identifier des formes sulfoniques de l'HSA, dont une forme tronquée (ces formes avaient déjà été décrites par notre groupe par MS en infusion directe). Naldi et al. ont développé quant à eux une méthode LC-MS, avec une ionisation ESI positive et un spectromètre de masse quadripôle-temps de vol (Q-TOF), capable de détecter des dimères de l'HSA (Naldi 2015). Bien que leur étude ne porte pas sur de l'albumine thérapeutique mais sur des échantillons plasmatiques issus de donneurs sains ou malades, il nous a semblé intéressant de l'évoquer en raison de la grande variété de dimères détectés.

En 2008, Ren et al. ont développé une méthode RP-HPLC permettant de séparer deux isoformes d'un anticorps monoclonal : une forme cystéinylée et une forme non-cystéinylée (Ren 2008). Le couplage de cette méthode RP-HPLC avec la MS, avec une ionisation ESI

positive et un TOF, a permis de montrer que les deux isoformes présentaient une différence de masse correspondant à deux cystéines. En 2010, Skrlin et al. ont publié une belle étude exploitant différents modes de LC couplés à la MS afin d'analyser les formes apparentées du filgrastim (facteur de croissance recombinant) (Skrlin 2010). Deux types de spectromètres de masse ont été utilisés : un quadripôle et un Q-TOF, en mode ESI positif. Une 1^{ère} méthode a consisté à séparer et identifier les différentes formes oxydées du filgrastim par RP-HPLC-MS. Une 2^{ème} méthode a utilisé un couplage SEC-MS pour séparer et identifier le dimère du filgrastim. Enfin, une 3^{ème} méthode a permis de séparer et identifier, par IExC-MS avec une colonne échangeuse de cations, une forme portant un groupement formyle sur la méthionine en N-terminal du filgrastim.

II.B.4.c. Electrophorèse capillaire-spectrométrie de masse (CE-MS)

Le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS) combine les hautes efficacités de séparation de la CE avec la grande sensibilité et sélectivité de la MS. La CE-MS commence à s'imposer comme une technique de choix pour contrôler la pureté des protéines thérapeutiques. Elle est également particulièrement attractive dans les contrôles de stabilité puisqu'elle permet d'identifier les modifications chimiques ou physiques des protéines en temps réel.

II.B.4.c.1. Les différents types d'interface

Le couplage de la CE avec la MS ne peut pas se faire sans quelques ajustements, dû notamment au très faible débit de la CE (de l'ordre du nL/min) et de la nécessité d'établir un circuit électrique fermé afin de maintenir, au sein du capillaire, la haute tension nécessaire à la séparation. Depuis la 1^{ère} interface de couplage CE-MS développée par Smith et ses collaborateurs (Smith 1988), des interfaces variées ont été conçues pour différentes sources d'ionisation. Pour l'analyse des protéines, les interfaces ayant été utilisées à ce jour sont les interfaces à ionisation électrospray (ESI), à ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI) et à ionisation par torche à plasma (ICP) (Haselberg 2007). La principale différence entre un couplage CE-ESI-MS et un couplage CE-MALDI-MS provient du fait que le processus d'ionisation en MALDI est physiquement découplé du processus de séparation (Ramautar 2012). L'ionisation MALDI est très bien adaptée à l'analyse de protéines intactes. Cependant, comme ce type d'ionisation doit généralement être réalisé sous vide poussé, il est

très difficile de réaliser des analyses CE-MALDI-MS en ligne (Biacchi 2014, Pourhaghighi 2011). De plus, une ionisation efficace des protéines nécessite de les cristalliser dans une matrice. Une ionisation ICP est classiquement utilisée pour analyser des protéines contenant ou liées à des ions métalliques (Haselberg 2011 b). L'ionisation ESI est la technique la plus couramment utilisée en CE-MS des protéines. Trois types d'interface à source ESI existent actuellement : l'interface à liquide additionnel, l'interface à jonction liquide et l'interface « sheathless » (Ramautar 2012, Haselberg 2011 b, Haselberg 2007) (voir Annexe 1).

Dans la 1^{ère} configuration, un liquide additionnel est utilisé pour maintenir le contact électrique à l'extrémité du capillaire, par établissement d'une jonction entre le liquide additionnel et l'électrolyte issu du capillaire. Cette interface à liquide additionnel, la plus couramment utilisée à l'heure actuelle, présente plusieurs avantages tels qu'une facilité d'ionisation et un spray stable. Cependant, en raison de la dilution de l'analyte en sortie de capillaire par le liquide additionnel, la sensibilité de détection, qui en ESI est fortement dépendante de la concentration en analyte, est compromise (Haselberg 2010 b). Pour gagner en sensibilité la société Agilent a développé une technologie appelée « Jetstream », qui permet d'optimiser la quantité d'ions entrant dans le spectromètre de masse.

L'interface à jonction liquide reprend certaines caractéristiques de l'interface à liquide additionnel, le contact électrique étant également maintenu grâce au liquide additionnel. Cependant, ces types d'interfaces permettent de réduire considérablement le débit du liquide additionnel, ce qui évite une trop grande dilution de l'analyte.

L'interface sheathless, comme son nom l'indique, n'utilise pas de liquide additionnel. Plusieurs types d'interface sheathless ont été développés. La société Beckman a récemment mis sur le marché une interface sheathless basée sur un concept développé par Moini (2007). Dans cette interface, le capillaire de silice est rendu poreux à son extrémité, ce qui permet aux électrons et aux ions de faible diamètre de traverser la paroi du capillaire. Ainsi, le contact électrique est maintenu par l'intermédiaire de la partie poreuse du capillaire. D'autre part, la pointe du capillaire est positionnée plus près de l'entrée du spectromètre de masse. Ce type d'interface permet d'obtenir une très grande sensibilité. Par exemple, des analyses réalisées sur des protéines modèles avec une source ESI conventionnelle ont permis d'obtenir des LOD de l'ordre du nM, alors que les LOD obtenues avec une interface à liquide additionnel étaient de 30 à 100 nM (Haselberg 2010 b). Gahoual et al. ont montré que cette interface sheathless

pouvait être utilisée en tant que plateforme d'infusion nanoESI, et que la sensibilité de détection d'une protéine intacte modèle était augmentée d'un facteur 46 lorsque l'on diminuait le débit d'infusion de 457 à 14 nL/min, ceci pouvant s'expliquer par une réduction de la suppression ionique (Gahoual 2014 b). Cette interface sheathless est donc particulièrement adaptée à des analyses MS en conditions non-dénaturantes car celles-ci entraînent une perte de sensibilité. L'inconvénient de l'interface sheathless commercialisée par Beckman est principalement dû au fait que l'on est limité quant au choix du greffage (les capillaires étant insérés dans une cartouche commerciale, il est difficilement concevable de les greffer soi-même). De plus, la pointe poreuse du capillaire est extrêmement fragile.

En couplage CE-ESI-MS, les 1^{ers} analyseurs de masse utilisés étaient des quadripôles et des trappes ioniques. Aujourd'hui, on a plutôt recours à des analyseurs de très haute résolution tels que les analyseurs à temps de vol (TOF) ou à résonance cyclotronique ionique et transformée de Fourier (FTICR).

II.B.4.c.2. Problèmes rencontrés en CE-MS

Les composants du tampon électrolyte sont un aspect important en CE-ESI-MS. Les tampons volatils de faible force ionique sont préférables pour une analyse MS sensible. Cependant, ces tampons ne conduiront pas forcément à une bonne séparation CE (Haselberg 2013 a). De plus, certains ions comme l'ammoniaque, très utilisé pour ajuster le pH des solutions tampons, peuvent engendrer de la suppression ionique. Dans le cas de l'interface à liquide additionnel, étant donné que les compositions de la solution électrolyte et du liquide additionnel sont en général très différentes, les performances de la CE (largeur de pic, ordre de migration) peuvent être affectées. Enfin, un autre problème qui affecte les analyses CE-MS est l'effet siphon engendré par le couplage (Huikko 2002). Cet effet, qui se traduit par une aspiration du contenu du capillaire dans le spectromètre de masse, est au détriment de la résolution CE. Il est fortement diminué dans le cas d'une interface sheathless. Une autre cause de perte de résolution est liée à la pression additionnelle qu'il est souvent nécessaire d'appliquer durant les analyses CE-MS.

En CE-MS, différentes stratégies existent pour pallier les problèmes d'adsorption des protéines sur la paroi interne du capillaire. Celles-ci sont bien évidemment communes à celles utilisées en CE seule mais plus restreintes. Comme nous l'avons expliqué auparavant (voir

section II.B.3.b.), un des moyens les plus simples pour diminuer les phénomènes d'adsorption consiste à employer des solutions électrolytes de force ionique élevée. Cependant, dans le cas de la CE-MS, la présence d'une grande quantité de sels dans l'électrolyte va entraîner une perte de sensibilité (Huhn 2010). De même, l'emploi d'additifs tels que des surfactants risque de poser des problèmes de suppression ionique. L'utilisation de solutions électrolytes avec des valeurs de pH extrêmes reste une option envisageable. Un pH très acide va permettre de diminuer les interactions électrostatiques entre les protéines et les groupements silanols, alors qu'un pH alcalin va limiter l'adsorption des protéines acides. Cependant, en CE-MS, une ionisation en mode positif (mode le plus couramment utilisé) est favorisée par un pH acide. Il est donc moins facile et donc beaucoup moins fréquent de travailler à pH basique.

Tout comme en CE seule, le meilleur moyen de lutter contre les phénomènes d'adsorption est de greffer les capillaires. Les revêtements dynamiques ne sont pas recommandés en CE-MS car les agents de greffage, continuellement présents dans l'électrolyte, peuvent entraîner un bruit de fond intense, une suppression ionique et une contamination de la source. Les revêtements semi-permanents tels que le PEO, qui nécessitent des régénérations avec l'agent de greffage entre chaque analyse, ne sont également pas conseillés pour les mêmes raisons. Le choix se porte donc sur des capillaires revêtus de manière permanente. Les revêtements permanents utilisés en CE-MS sont les mêmes que ceux utilisés en CE (voir section II.B.3.b.2.). Parmi les capillaires les plus utilisés en CE-MS pour l'analyse de protéines apparentées, nous pouvons citer le PB-PVS et le PB-DS-PB (Catai 2007, Haselberg 2011 a, Balaguer 2006).

II.B.4.c.3. Analyses de protéines apparentées par CE-MS

La CE-MS permet de séparer et identifier, de manière fiable et rapide, les formes dégradées des protéines thérapeutiques (formes oxydées, déamidées, acétylées...) (Haselberg 2013 a, Pioch 2012, Catai 2007). Par exemple, l'équipe de Somsen a développé une méthode CE-MS afin de caractériser en détails les produits de dégradation d'une hormone de croissance humaine recombinante (rhGH) sous l'effet de stress thermiques (Haselberg 2011 a). Leur méthode utilise un capillaire greffé double couche PB-PVS, une interface à liquide additionnel, une ionisation ESI en mode positif et un spectromètre de masse TOF. Les spectres de masse d'échantillons de rhGH chauffés à 40°C pendant 24 H puis placés à -18°C

pendant un an montrent que la rhGH s'est complètement dégradée au profit de formes oxydées et déamidées (Fig. 38).

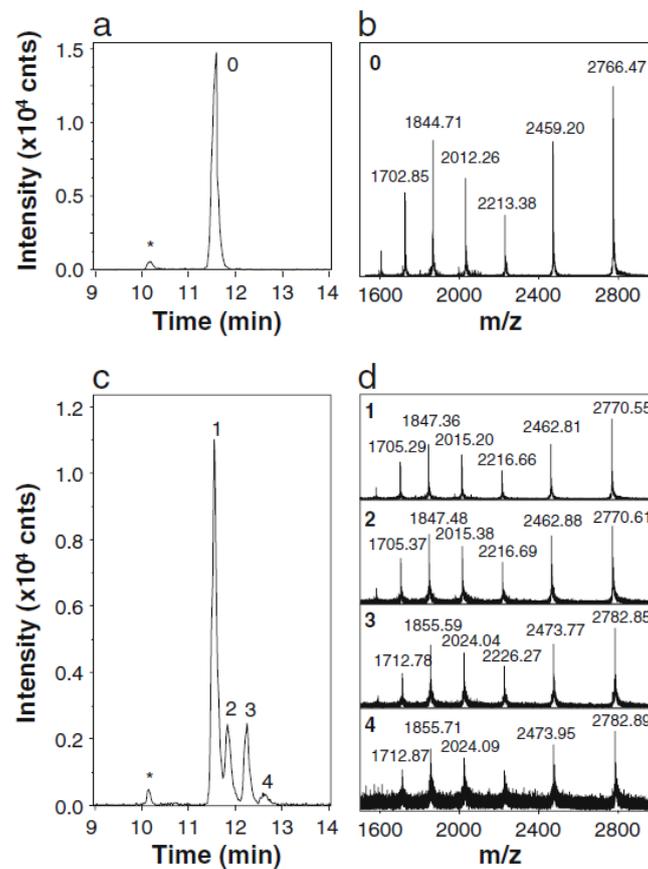


Figure 38 : Analyses CE-ESI-TOF-MS de a,b) rhGH, c,d) rhGH soumise à un stress thermique et stockée pendant un an. Le pic 0 correspond à la rhGH non dégradée. Les pics 1 et 3 correspondent à des formes oxydées de la rhGH (respectivement +32 et +128 Da). Les pics 2 et 4 sont les formes déamidées des pics 1 et 3 (respectivement +33 et +129 Da). Issu de Haselberg 2011 a.

Balaguer et al. ont, quant à eux, mis en évidence par CE-ESI-TOF-MS, avec une interface à liquide additionnel, de nombreuses formes oxydées et acétylées d'une EPO humaine recombinante (rhEPO) (Balaguer 2006). La méthode CE-MS optimisée utilise un capillaire neutre greffé avec une solution d'Ultra TrolTM LN (« low normal »). Ce greffage, qui engendre un EOF proche de zéro, a permis de séparer, avec une très bonne résolution, les différentes isoformes de l'EPO recombinante (pour comparaison, des analyses réalisées avec un greffage positif PB furent moins résolutive). La figure 39 présente un exemple de spectre de masse sur lequel on voit, après déconvolution, les nombreuses formes oxydées et acétylées de la glycoforme principale.

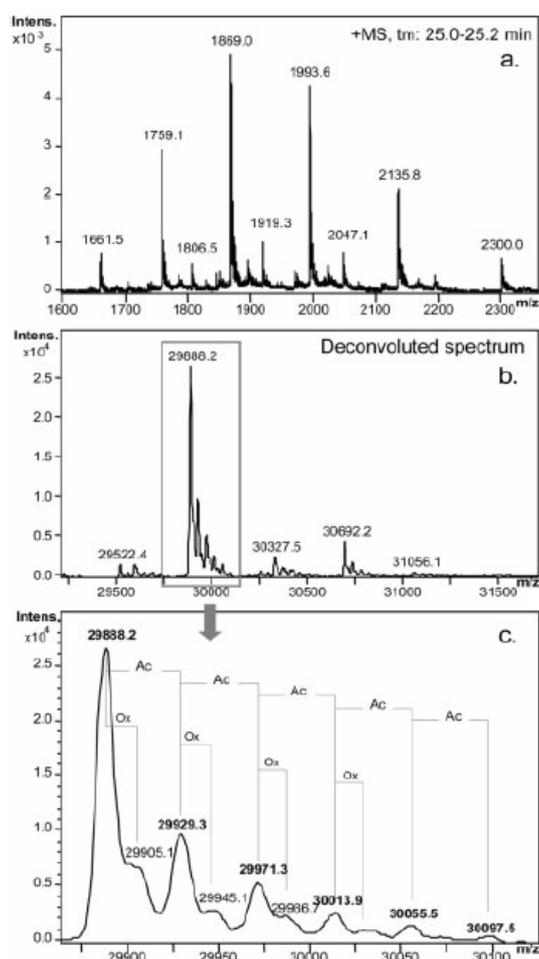


Figure 39 : Spectre de masse obtenu par analyse CE-ESI-TOF-MS de rhEPO : a) avant déconvolution, b) après déconvolution, c) zoom du spectre déconvolué montrant les formes oxydées (+16 Da) et acétylées (+42 Da) de la glycoforme principale. Issu de Balaguer 2006.

Dans le cadre de cette thèse, notre groupe est parvenu, grâce au couplage CE-ESI-MS et l'utilisation d'une trappe ionique, à mettre en évidence des formes tronquées de l'albumine plasmatique qui n'avaient encore jamais été décrites dans la littérature. Nous détaillons ces expériences dans l'article publié dans le journal *Analytica Chimica Acta* section IV.A.

Malgré les très belles avancées de la CE-MS (nouvelles interfaces, revêtements des capillaires stables et performants), cette approche reste compliquée. Deux des principaux problèmes sont la limitation dans le choix des tampons utilisés et la perte de résolution engendrée par le couplage. Ainsi, de très jolies séparations obtenues par CE seule ne pourront pas forcément être reproduites par CE-MS. De plus, en CE-MS, il est difficile de travailler en conditions natives, c'est-à-dire dans des conditions proches des conditions physiologiques, étant donné que ces conditions vont souvent conduire à une perte de sensibilité, dû aux tampons et liquides additionnels utilisés qui ne favorisent pas une bonne ionisation.

II.B.4.d. Spectrométrie de masse à mobilité ionique (IM-MS)

L'IM-MS consiste à coupler la spectrométrie de masse avec la spectrométrie à mobilité ionique (voir Annexe 1). Cette technique permet de séparer les protéines selon leur différence de mobilité ionique à travers un gaz soumis à un champ électrique (May 2015, Kanu 2008). Elle sera plus amplement explicitée dans la section II.D.1.b.

L'IM-MS est désormais fréquemment utilisée pour caractériser les formes oligomériques de protéines thérapeutiques. Par exemple, Ekeowa et al. ont exploité l'IM-MS pour étudier la polymérisation de l' α_1 -antitrypsine sous l'effet de la chaleur (Ekeowa 2010). Leur méthode permet de distinguer les monomères, dimères et trimères de cette protéine, mais également une forme monomérique intermédiaire, qui fait partie du processus de polymérisation (Fig. 40).

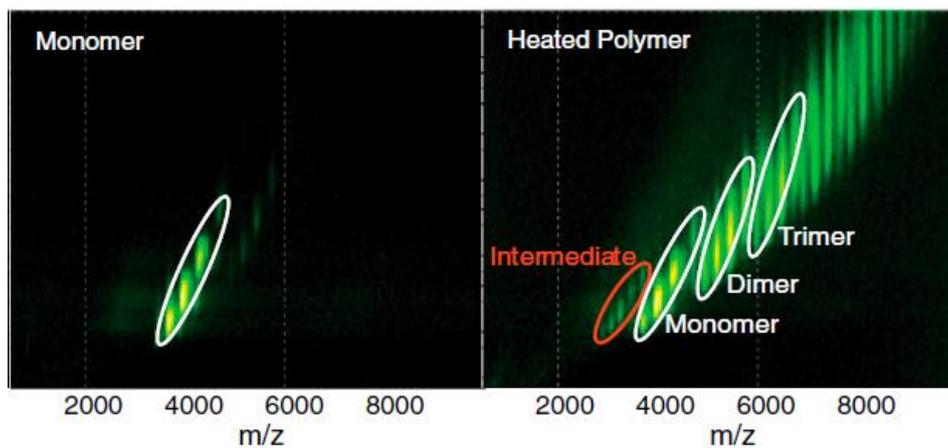


Figure 40 : Spectres IM-MS de l' α_1 -antitrypsine. Les analyses ont été réalisées avec une source nanoESI et un spectromètre de masse quadripôle-trappe ionique. Issu de Ekeowa 2010.

Pritchard et al. ont, quant à eux, séparé des monomères, dimères et trimères d'hormones de croissance recombinantes (Pritchard 2013). Un autre exemple concerne la détection de petite quantité de dimères d'anticorps monoclonaux dans des préparations de tratuzumab et cetuximab (Beck 2012).

II.C. Méthodes d'analyse de structures secondaires

La conformation d'une protéine est un aspect clé à prendre en compte. En effet une conformation spécifique est souvent essentielle à sa fonction biologique. Des techniques analytiques qui permettent d'étudier les protéines dans un milieu proche de celui dans lequel elles sont opérationnelles sont donc nécessaires. De nombreuses méthodes permettent de caractériser la structure secondaire d'une protéine, parmi lesquelles se trouvent la spectroscopie d'absorbance, la spectrofluorimétrie, le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. La spectroscopie d'absorbance et la spectrofluorimétrie sont des méthodes qui manquent de sélectivité. Par contre, le dichroïsme circulaire (CD) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sont des méthodes de choix pour étudier la structure secondaire d'une protéine. Nous allons les décrire dans les paragraphes suivants.

II.C.1. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est un excellent outil pour une caractérisation rapide de la structure secondaire et des propriétés de repliement des protéines. L'application du CD aux protéines la plus utilisée consiste à déterminer si une protéine exprimée et purifiée est bien repliée, ou si une mutation affecte sa conformation ou sa stabilité (Greenfield 2006, Mark 2012, Bertucci 2011, Mochizuki 2001).

Le dichroïsme circulaire mesure l'absorption différentielle de la lumière polarisée circulairement à droite et à gauche. Si après passage à travers l'échantillon examiné, les composants droit et gauche de la lumière polarisée ne sont pas absorbés ou sont absorbés de manière égale, la radiation résultante sera plane. Par contre, si les composants droit et gauche sont absorbés de manière différente la radiation résultante sera elliptique (Kelly 2005). Un signal de CD est observé quand un chromophore est chiral, c'est-à-dire optiquement actif, pour les raisons suivantes :

- a) il est intrinsèquement chiral en raison de sa structure, par exemple il contient un atome de carbone portant quatre constituants différents ou un pont disulfure qui est chiral en raison des angles diédriques de la chaîne d'atomes C-S-S-C,
- b) il est lié de manière covalente à un centre chiral présent dans la molécule,
- c) il est placé dans un environnement asymétrique en vertu de la structure tridimensionnelle de la molécule.

Un des avantages du CD dans l'étude des protéines est que les analyses se font en solution, dans un environnement proche du milieu naturel. Un autre avantage est que des informations structurales complémentaires peuvent être obtenues à partir d'un grand nombre de régions spectrales. Dans les protéines, les chromophores d'intérêt incluent les liaisons peptidiques (absorption en dessous de 240 nm), les groupements aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (absorption entre 260 et 320 nm), et les ponts disulfures (bandes d'absorption faible autour de 260 nm). De plus, des co-facteurs non protéiques peuvent absorber sur une large gamme spectrale (Kelly 2005, Kelly 2000).

La figure 41A ci-dessous montre que les différents éléments structuraux d'une protéine ont des spectres CD spécifiques (Greenfield 2006). Par exemple, l'hélice α se traduit par deux bandes négatives à 222 et 208 nm et une bande positive à 193 nm; alors que les feuillets β antiparallèles vont engendrer une bande négative à 218 nm et une bande positive à 195 nm. La figure 41B présente les spectres CD de l'AT recombinante et plasmatique. On y retrouve les bandes négatives et positives caractéristiques des hélices α et feuillets β (Edmunds 1998).

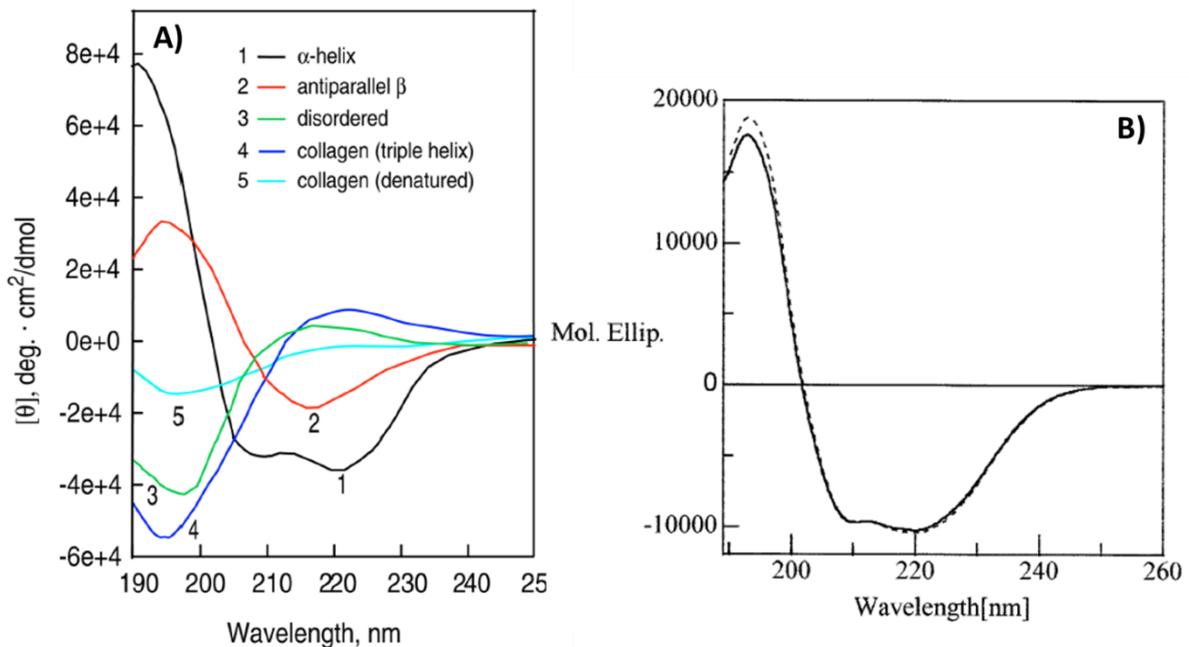


Figure 41 : Spectres CD dans le lointain UV de : A) poly-L-lysine (noir, rouge et vert) et collagène (bleu et cyan), B) AT recombinante (ligne pleine) et AT plasmatique (ligne pointillée). Adapté respectivement de Greenfield 2006 et Edmunds 1998.

Le dichroïsme circulaire peut être utilisé pour contrôler les changements conformationnels d'une protéine sous l'effet de la chaleur (Fincke 2014, Ramani 2005). Par exemple, en 2010, Rao et al. ont étudié les changements structuraux d'un anticorps monoclonal murin, l'antiCD40, soumis à différentes températures (Rao 2010). La figure 42 montre les spectres CD obtenus dans le lointain UV. A température ambiante, le spectre de l'anticorps montre une forte bande négative autour de 217 nm, indiquant que la protéine a une conformation organisée en feuillets β . Lorsque l'échantillon est chauffé à plus de 60°C, l'intensité de la bande négative augmente. Pour une température comprise entre 80 et 90°C, le profil des spectres indique la formation d'agrégats.

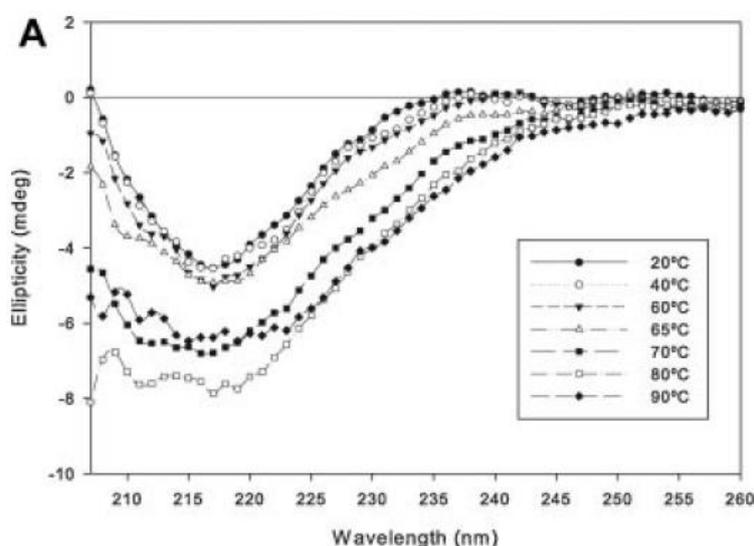


Figure 42 : Spectres CD dans le lointain UV d'un anticorps monoclonal soumis à des dégradations thermiques. Issu de Rao 2010.

II.C.2. Infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet, via la détection de vibrations caractéristiques, d'identifier les fonctions chimiques présentes au sein d'une molécule (Byler 1986).

La spectroscopie FTIR est une technique sensible à la structure secondaire des protéines et a été très utilisée pour étudier les phénomènes de mauvais repliement (« misfolding ») ou d'agrégation des protéines *in vitro* (Miller 2013). Un spectre FTIR d'une protéine possède deux bandes caractéristiques principales : une bande amide I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) et une bande amide II ($\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$), la première bande étant due principalement à la vibration d'élongation de la

liaison C=O, alors que la deuxième bande est attribuée aux vibrations de déformation N-H et d'élongation C-N du squelette peptidique (Glassford 2013). La fréquence de la bande amide I est particulièrement sensible à la structure secondaire, dû à un environnement différent en liaisons hydrogènes pour l'hélice α , le feuillet β , les tours, ou une conformation désordonnée. Par exemple, les hélices α et les feuillets β ont des fréquences vibrationnelles amide I respectives autour de 1655 et 1630 cm^{-1} (Fig. 43). La principale difficulté dans l'obtention d'un spectre FTIR de protéines en solution dans l'eau provient des interférences provoquées par la bande de déformation O-H de l'eau, qui se superpose au mode vibrationnel amide I.

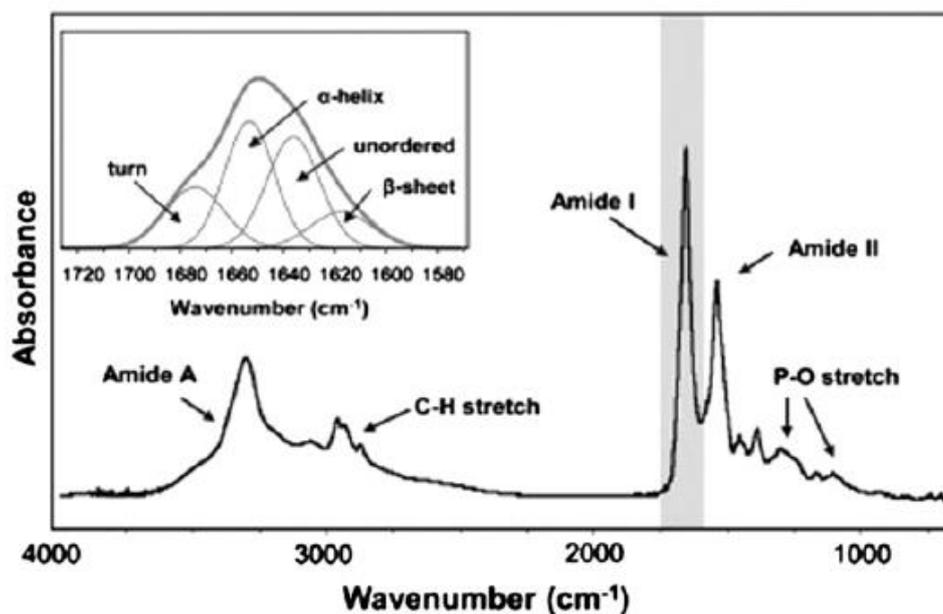


Figure 43 : Spectre FTIR d'une protéine type illustrant les bandes amide I et amide II autour de 1650 cm^{-1} et 1540 cm^{-1} , respectivement. Le rectangle en haut présente la déconvolution de la bande amide I. Issu de Glassford 2013.

En 2014, Fincke et al. étudièrent la stabilité conformationnelle d'un anticorps bispécifique par FTIR (Fincke 2014). Pour cela ils soumièrent l'anticorps à des températures élevées et analysèrent les modifications de sa structure secondaire. La figure 44 présente les spectres FTIR, dans la région amide I, de l'anticorps natif et incubé à 40°C pendant cinq semaines. Dans les deux cas, les bandes IR à 1637 et 1691 cm^{-1} peuvent être attribuées à des feuillets β intramoléculaires. Le décalage du spectre de l'échantillon incubé dans la zone 1660-1700 cm^{-1} n'est pas significatif. L'anticorps stocké à température élevée ne semble donc subir aucune modification structurale.

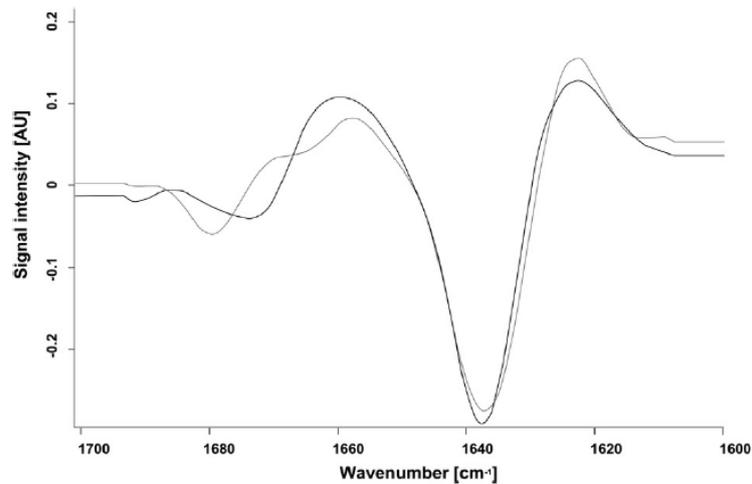


Figure 44 : Spectre FTIR d'un anticorps bispécifique natif (ligne noire) et soumis à un stress thermique (ligne grise). Issu de Fincke 2014.

A l'heure actuelle, des techniques plus modernes supplantent la FTIR conventionnelle telle que l'ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-FTIR) (Glassford 2013, Goormaghtigh 2006, Goldberg 2005). Par exemple, un article récent décrit l'utilisation de cette technique pour détecter dans une molécule d'albumine de sérum bovin (BSA) des changements conformationnels induits par la chaleur. Comparée à la FTIR classique, l'ATR-FTIR a permis de mettre en évidence une deuxième température de dénaturation (Lu 2015). La figure 45 présente les spectres ATR-FTIR de la BSA obtenus à différentes températures. Cette figure permet de déterminer deux températures de dénaturation (entre 50 et 52°C et entre 80 et 82°C) auxquelles la protéine subit un changement structural.

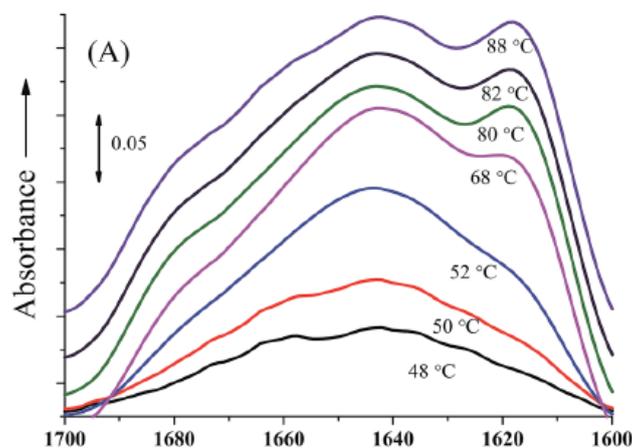


Figure 45 : Spectres ATR-FTIR de BSA en fonction de la température. Adapté de Lu 2015.

II.D. Méthodes d'analyse de structures tertiaires

Nous allons aborder dans ce chapitre l'analyse de la structure tertiaire d'une protéine et donc parler de l'analyse de conformères. Par conséquent, il nous faut préciser ce que nous entendons par conformère. Dans ce qui suit, il sera appelé conformère d'une protéine toute molécule possédant la même masse et la même séquence que la protéine native mais avec une conformation spatiale différente. Ainsi, cette définition englobe non seulement les conformères qui correspondent à la transition de la forme native vers une autre forme (incluant les formes dépliées ou mal repliées), mais également les formes issues, par exemple, d'un appariement différent des ponts disulfures.

L'approche classique pour déterminer la structure tertiaire d'une protéine est la cristallographie aux rayons X. Cependant, cette méthode fournit essentiellement des images statiques, avec peu d'informations sur la flexibilité des protéines étant donné que les molécules sont figées dans le cristal. De plus, cette technique nécessite des quantités considérables de protéines et leur cristallisation n'est pas toujours possible (par exemple on ne peut pas cristalliser des macromolécules ou des complexes) (Vandermarliere 2014, Glassford 2013, Shi 2014). Pour étudier l'environnement et la flexibilité d'une protéine, il faut avoir recours à la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, cette technique s'effectue sur des échantillons en solution et la flexibilité des protéines est donc préservée (Konrat 2014, Mispelter 2007). Cependant, un des inconvénients majeurs de la RMN est sa faible sensibilité (en termes de rapport signal sur bruit). Par conséquent, les analyses par RMN requièrent des concentrations élevées de protéines aussi pures que possible (entre 2 et 5 mM), or de nombreuses molécules biologiques s'agrègent à ces concentrations (Vandermarliere 2014). De plus, les molécules de masse supérieure à 30 kDa sont difficilement analysables par RMN, les spectres devenant trop complexes (la RMN 2D permet d'interpréter plus facilement les spectres mais est plus difficile à effectuer). Dans l'industrie ou les laboratoires de recherche on aura donc plutôt recours à des techniques rapides et sensibles telles que la spectrométrie de masse (MS).

II.D.1. Spectrométrie de masse

La MS est principalement utilisée pour étudier la structure primaire des protéines, c'est-à-dire leur séquence en acides aminés. Cependant, des modes spéciaux permettent d'avoir accès à la

conformation des protéines. La MS dite « native » est certainement l'approche la plus évidente. Dans ce cas, une protéine intacte ou un complexe protéique est analysé. Des techniques alternatives existent telles que la protéolyse partielle et l'échange hydrogène/deutérium, celles-ci permettant d'obtenir des détails structuraux supplémentaires. Bien que la technique d'échange hydrogène/deutérium implique une digestion de la protéine, il nous a semblé intéressant de la décrire car elle a beaucoup été employée pour caractériser la dynamique conformationnelle des Serpins, famille de protéines dont fait partie l'antithrombine.

II.D.1.a. Echange hydrogène/deutérium-spectrométrie de masse (HDX-MS)

Une expérience d'échange hydrogène/deutérium (HDX) est basée sur l'échange permanent des atomes d'hydrogène de la protéine impliqués dans les liaisons O-H, N-H et S-H avec les atomes de deutérium présents dans le solvant environnant. Etant donné qu'un atome de deutérium est deux fois plus lourd qu'un atome d'hydrogène, la masse de la protéine va être augmentée.

Dans une protéine, ce sont les hydrogènes des groupes amides (principalement les hydrogènes du squelette peptidique) qui sont les plus souvent impliqués dans les échanges hydrogène/deutérium. Les taux d'échange hydrogène/deutérium dépendent essentiellement de l'accessibilité du solvant et du statut des liaisons hydrogènes des groupes amides. Ainsi, selon la localisation du groupe amide, le taux d'échange ne sera pas le même. Les échanges hydrogène/deutérium dépendent donc de la structure de la protéine. Le couplage de la MS avec cette technique permet de détecter les ajouts de masse apportés par les atomes de deutérium, et donc de détecter le nombre d'hydrogènes échangés (Vandermarliere 2014, Brock 2012).

Depuis son introduction par Katta et Chait en 1991, le couplage HDX-MS est désormais fréquemment utilisé pour contrôler les changements conformationnels ou les dynamiques de pliage/repliement des protéines (Tang 2013, Houde 2009, Zheng 2008, Tsutsui 2006). Par exemple, Tsutsui et al. ont décrit une méthode HDX-MS pour étudier la flexibilité des inhibiteurs des sérine-protéases (Serpins). La figure 46 détaille les différences de flexibilité à l'intérieur d'une molécule d' α_1 -antitrypsine (Tsutsui 2011).

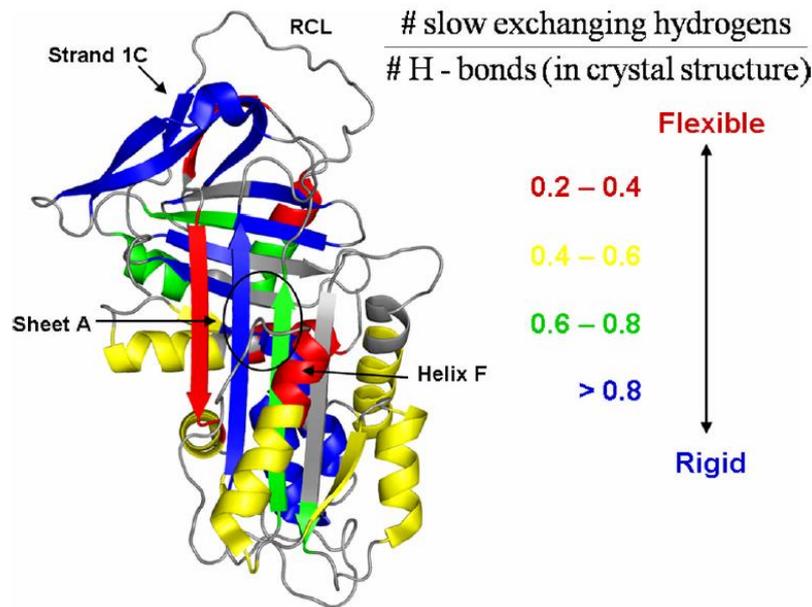


Figure 46 : Analyse de la forme native (forme métastable) de l' α_1 -antitrypsine wild type par HDX-MS. Issu de Tsutsui 2011.

Une variante du couplage HDX-MS, appelé « MS footprinting », existe (Vandermarliere 2014, Tsutsui 2011, Zheng 2008). Dans ce cas, le marquage des atomes d'hydrogène se fait non pas avec des atomes de deutérium mais avec des radicaux hydroxyles, et concerne les chaînes latérales et non le squelette peptidique de la protéine.

II.D.1.b. Spectrométrie de masse à mobilité ionique (IM-MS)

La MS en condition native permet d'analyser des protéines intactes dans des conditions qui permettent de préserver leur conformation, on parle encore de MS en conditions non-dénaturantes. Contrairement à l'analyse des peptides qui s'effectue à l'aide de spectromètres de masse avec des gammes de masse faibles, la MS en condition native nécessite des spectromètres de masse avec des gammes de masse élevées. Ainsi, les analyseurs TOF sont classiquement utilisés pour cette application. Pour l'analyse de protéines thérapeutiques en condition native, on a désormais souvent recours à des techniques couplées telles que la spectrométrie de masse à mobilité ionique (IM-MS).

L'IM-MS consiste à coupler la spectrométrie de masse avec la spectrométrie à mobilité ionique (voir Annexe 1). Cette technique permet de séparer les protéines selon leur différence de mobilité ionique à travers un gaz soumis à un champ électrique (May 2015, Lanacura

2014, Kanu 2008). Avant d'entrer dans l'analyseur de masse, les protéines sont ionisées par électrospray. Durant cette étape d'ionisation, les protéines les plus volumineuses subissent un plus grand nombre de collisions avec le gaz tampon qui remplit la chambre à mobilité ionique, elles sont donc davantage freinées comparativement aux protéines plus compactes de masse moléculaire similaire. Etant donné que l'état de charge d'une protéine dépend fortement de sa structure, l'IM-MS permet de séparer des conformères, dont la différence structurale est parfois très subtile. L'IM-MS permet également d'étudier la dynamique conformationnelle, c'est-à-dire la flexibilité de la protéine ou ses mécanismes de repliement (Dickinson 2015, Debaene 2013).

En 2010, le laboratoire pharmaceutique Amgen est parvenu à séparer deux conformères d'un anticorps monoclonal IgG2, dont la différence structurale est liée à un arrangement différent en liaisons disulfures au niveau de la région hinge de l'anticorps (Bagal 2010). Les analyses IM-MS ont été réalisées avec une source nanoESI et un spectromètre de masse Q-TOF. Comme le montre la figure 47, pour l'anticorps IgG2, deux conformères (IgG2-A et IgG2-B) sont séparés, alors que l'anticorps IgG1 ne présente qu'un seul conformère. L'isoforme IgG2-A correspond au modèle classique d'un anticorps, avec les domaines Fab et Fc reliés ensemble au niveau de la région hinge, alors que dans l'isoforme IgG2-B les chaînes lourdes et légères sont liées de manière covalente à la région hinge par des ponts disulfures.

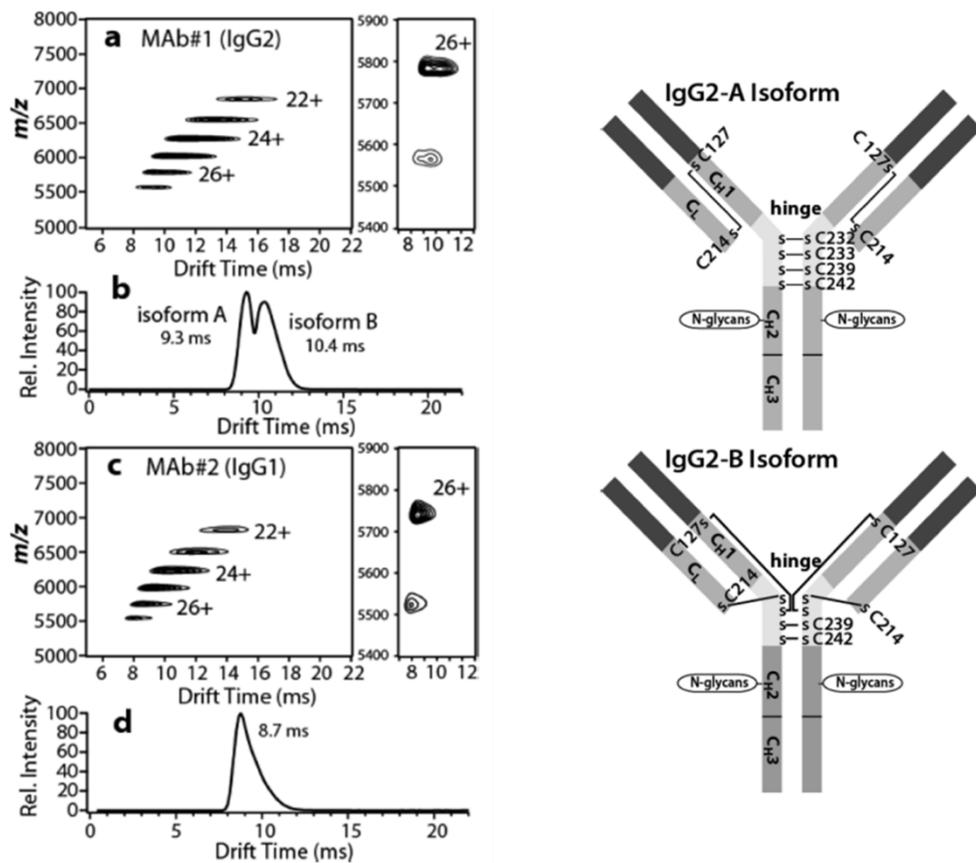


Figure 47 : Analyse des deux anticorps IgG2 (a,b) et IgG1 (c,d) par IM-MS. Les figures b et d correspondent aux spectres de mobilité à l'état de charge +26. A droite sont représentés les deux conformères de l'IgG2. Adapté de Bagal 2010.

Pritchard et al. ont développé, quant à eux, une méthode IM-MS afin d'analyser des hormones de croissance humaines recombinantes (rhGH) produites par quatre laboratoires pharmaceutiques différents (Pritchard 2013). Leur méthode a permis de mettre en évidence une forme monomérique « allongée », correspondant probablement à un intermédiaire de repliement (Fig. 48).

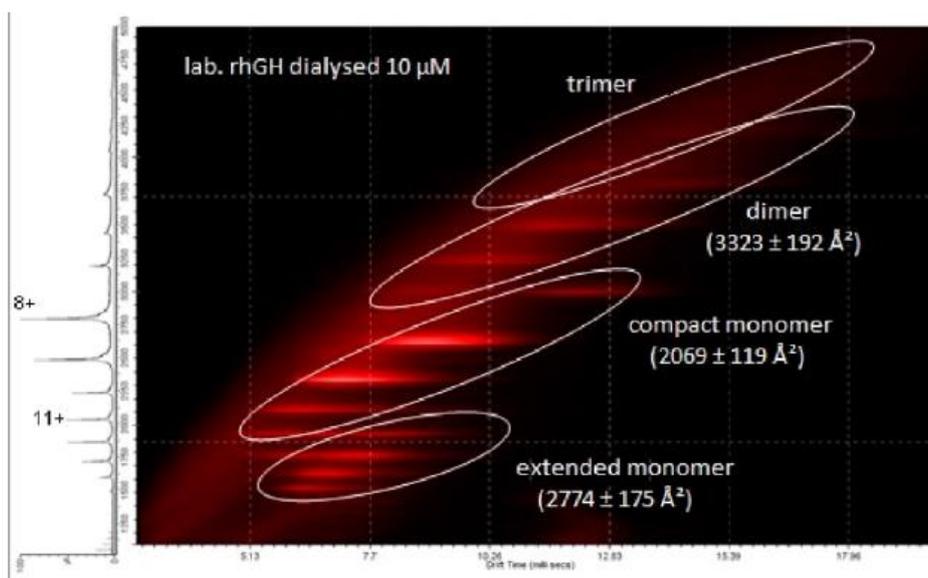
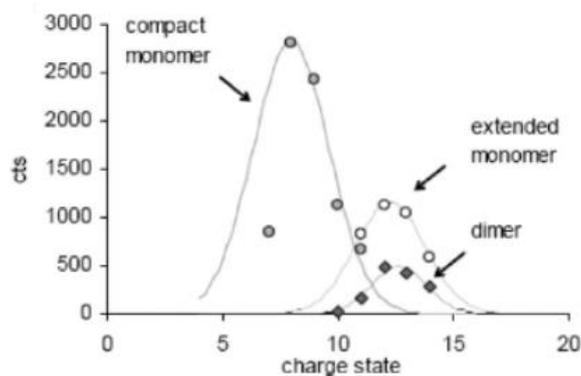


Figure 48 : Analyses IM-MS de rhGH. Les analyses ont été réalisées avec une source nanoESI en mode positif. La figure en haut représente l'intensité maximale des pics de dérive aux différents états de charge. Adapté de Pritchard 2013.

Ekeowa et al. ont étudié par IM-MS la polymérisation de l' α_1 -antitrypsine (Ekeowa 2010) (voir section II.B.4.d.). Leur méthode a permis de mettre en évidence une forme monomérique intermédiaire, qui fait partie du processus de polymérisation.

II.D.2. Electrophorèse capillaire

II.D.2.a. Electrophorèse capillaire de zone (CZE)

La CZE a été employée à plusieurs reprises pour contrôler les transitions de repliement/dépliement des protéines (Righetti 2001 b). Dans certains cas, les transitions de dépliement ont été étudiées en présence d'agents dénaturants classiques ou par application

d'un gradient de température (Stutz 2005). Hilser et Freire ont montré, par simulation ou analyse de données expérimentales réelles, que l'on pouvait quantifier les transitions de repliement/dépliement des protéines (Hilser 1995). Cependant, ce genre d'études a rarement été appliqué aux protéines thérapeutiques. En 2001, Sergeev et al. ont tenté d'analyser les états dépliés et repliés d'une protéine de fusion utilisée dans la production d'insuline recombinante (Sergeev 2001). Leur méthode a permis de séparer, par analyse CZE d'une forme dépliée de la protéine, un grand nombre de formes, bien que l'efficacité de séparation n'ait pas été optimale (Fig. 49). Ces formes correspondent probablement à des conformations différentes liées à un arrangement différent en ponts disulfures. Ainsi, ces formes, que l'on peut appeler des conformères, seraient séparées par CZE en raison d'une taille différente.

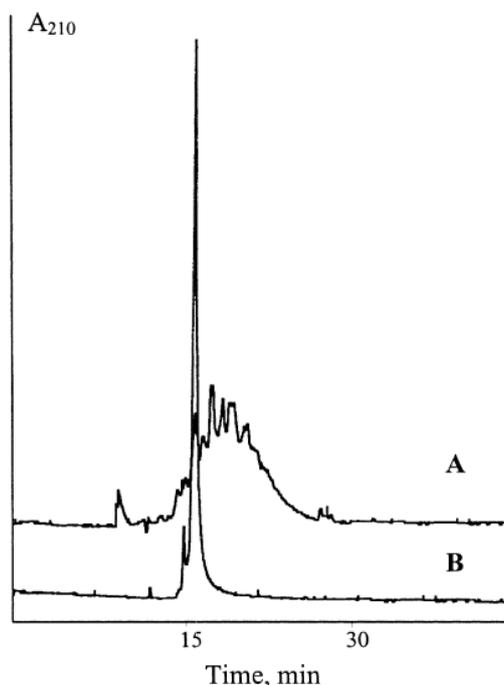


Figure 49 : Analyse CZE d'une protéine de fusion : A) dans un état déplié, B) dans un état replié. Issu de Sergeev 2001.

A notre connaissance, la CZE n'a jamais été appliquée à l'analyse de conformères de l'AT, qui est une des protéines analysées au cours de ces travaux de thèse.

II.D.2.b. Electrophorèse capillaire en gel (CGE)

Dans la section II.B.3.d., nous avons décrit le principe de la CGE et son utilité pour la séparation de formes dégradées de protéines thérapeutiques. Mais la CGE peut également servir à la séparation de conformères de protéines. Par exemple, plusieurs articles décrivent la séparation de conformères d'anticorps, dont la différence structurale est due à un appariement différent des ponts disulfures (Lacher 2010, Guo 2008, Martinez 2008). La figure 50 présente l'analyse de deux anticorps, IgG1 et IgG2, par SDS-CGE (Guo 2008). La technique permet de séparer deux isoformes dans l'anticorps IgG2. Lorsque l'IgG2 est réduite et analysée par la même technique, il n'y a plus qu'un seul pic. Ceci a permis de prouver que les isoformes de l'IgG2 étaient bien des conformères issus d'un appariement différent des liaisons disulfures.

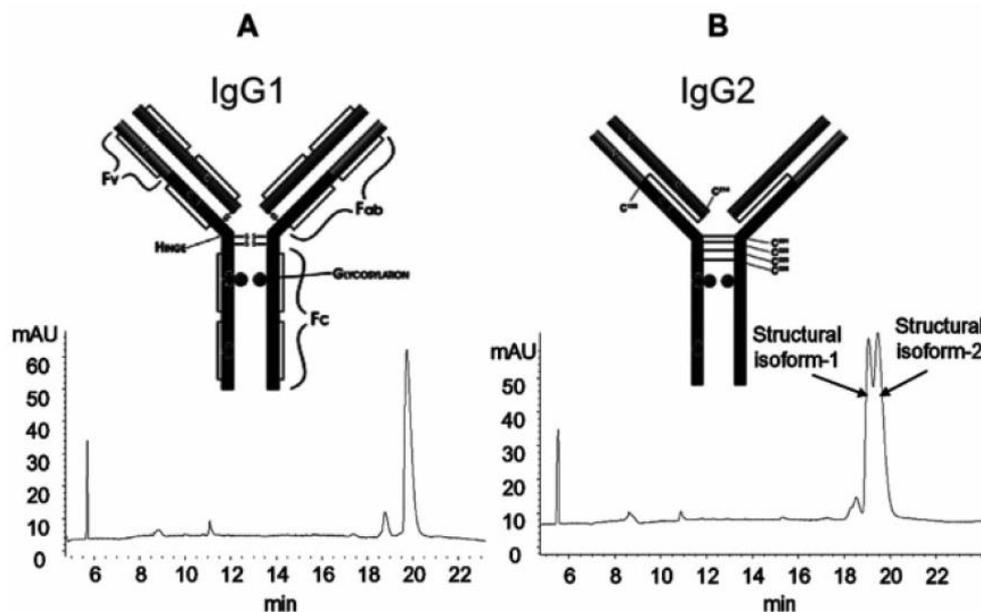


Figure 50 : Analyse des deux anticorps IgG1 et IgG2 par SDS-CGE. Deux isoformes de structure sont séparées pour l'IgG2. Issu de Guo 2008.

La CGE a également été appliquée à la recherche de mauvais repliement d'une protéine thérapeutique. En 2011, Hapuarachchi et al. ont développé une méthode SDS-CGE en conditions non-réductrices permettant de détecter des formes mal repliées d'une protéine de fusion recombinante produite dans *E. Coli* (Hapuarachchi 2011). Leur méthode peut ainsi être utilisée pour contrôler l'efficacité des techniques de purification à éliminer les formes mal repliées lors de la production de cette protéine.

II.D.3. Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)

La chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC) sépare les molécules selon leur degré d'hydrophobie. Comparée à la RP-HPLC, les solvants d'élution sont beaucoup plus polaires. Les conditions utilisées (pH neutre, solution aqueuse saline, température ambiante) sont favorables à la préservation de la structure des protéines. Ainsi l'HIC est très souvent utilisée pour différencier des formes dénaturées et non-dénaturées.

Par exemple, plusieurs articles décrivent la séparation des formes native et latente de l'antithrombine par HIC (Fig. 51) (Mochizuki 2005, Karlsson 2002, Karlsson 2001). La forme latente de l'AT n'est pas une forme dénaturée dans le sens classique du terme, bien qu'elle puisse être obtenue par dénaturation thermique. Cependant, sa différence structurale (insertion de la boucle réactive à l'intérieur de la molécule, voir chapitre 1) permet de la séparer de la forme native par HIC.

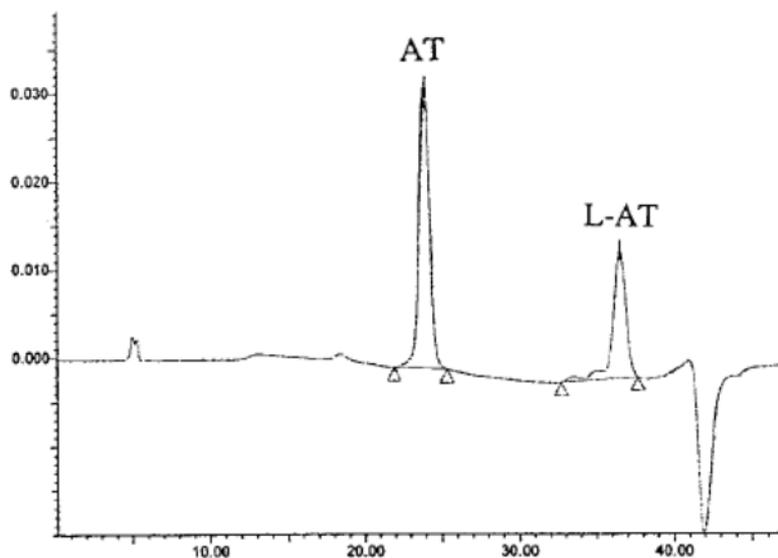


Figure 51 : Séparation des formes native et latente de l'AT par HIC. Issu de Karlsson 2001.

Comme nous venons de le voir dans ce chapitre bibliographique, de nombreuses méthodes existent pour analyser des formes apparentées de protéines intactes. Concernant l'HSA, une des deux protéines étudiées au cours de cette thèse, il apparaît que plusieurs méthodes ont été développées par le passé pour analyser, par exemple, des formes oxydées ou tronquées de la protéine, mais également ses formes dimériques. Ce travail de thèse est donc une prolongation des études déjà réalisées sur l'albumine, avec pour objectif de développer une méthode analytique qui puisse être utilisée, de manière fiable et reproductible, en contrôle qualité. Concernant l'AT, nous avons vu qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes CZE ou CE-MS permettant de détecter les formes apparentées de l'AT, y compris les formes dimériques de la protéine. De même, aucune méthode CZE ou CE-MS n'a à ce jour été décrite dans la littérature afin d'analyser la forme latente de l'AT, un conformère inactif de la forme native.

TRAVAUX DE THESE

Chapitre 3 : Développement d'une méthode de détermination de constante d'affinité entre l'héparine et l'antithrombine thérapeutique

Dans le cadre de cette thèse, nous avons participé à un projet ANR nommé projet THERAT (janvier 2012 - décembre 2015). Ce projet consiste à développer des molécules recombinantes « biobetters » dérivées de l'antithrombine naturelle avec des activités thérapeutiques plus intéressantes dans le cadre de deux situations cliniques : le sepsis sévère et la circulation extracorporelle (CEC).

Le sepsis sévère résulte d'une infection entraînant une réaction inflammatoire d'abord localisée qui va déborder les systèmes de défense de l'organisme et se généraliser pour aboutir à un ensemble de symptômes systémiques. Lorsque des défaillances d'organes sont observées, on parle de sepsis sévère. Il est aujourd'hui admis que le sepsis implique non seulement l'inflammation mais aussi la coagulation qui tient une place essentielle dans la physiopathologie du sepsis sévère, ces deux composantes étant intimement liées (Borgel 2013). De plus, il est maintenant clairement établi que les inhibiteurs de la coagulation, dont l'AT, possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Levi 2008, Borgel 2013). Cependant, certaines études cliniques de phase III telles que l'essai Kybersept (Warren 2001) ont montré une absence d'efficacité de l'AT sur des patients atteints de sepsis sévère. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait que les effets cytoprotecteurs de l'AT au niveau cellulaire sont observés à des concentrations beaucoup plus importantes que celles utilisées dans l'essai Kybersept. Or, l'utilisation de telles doses n'est pas envisageable en traitement clinique car le risque hémorragique associé à la protéine anticoagulante est trop élevé. Un des objectifs du projet THERAT est de développer des molécules dérivées (« variants ») d'AT possédant des propriétés cytoprotectrices et non-anticoagulantes dans le cadre d'une prise en charge du sepsis sévère.

La CEC est un circuit artificiellement créé par aspiration du sang qui passe par une pompe avant d'être réinjecté au patient. Cette boucle permet des interventions de chirurgie cardiaque ou des hémodialyses. Les variants d'AT générés dans le cadre du projet THERAT pourraient jouer le rôle d'antidote des dérivés hépariniques administrés lors d'une CEC (Fig. 52). Les dérivés hépariniques à usage médical comprennent les héparines non fractionnées (HNF), moins utilisées actuellement, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) et le

fondaparinux sodique (Arixtra[®]) qui, mis sur le marché il y a une dizaine d'années, est très intéressant de par son origine synthétique et sa pharmacocinétique favorable. L'utilisation de ces médicaments est associée à un risque hémorragique non négligeable. Pour les HNF et les HBPM il existe un antidote, le sulfate de protamine, qui permet de les neutraliser en cas de surdosage, même si cette neutralisation n'est que partielle dans le cas des HBPM. Par contre, le sulfate de protamine est totalement inefficace vis-à-vis du fondaparinux.

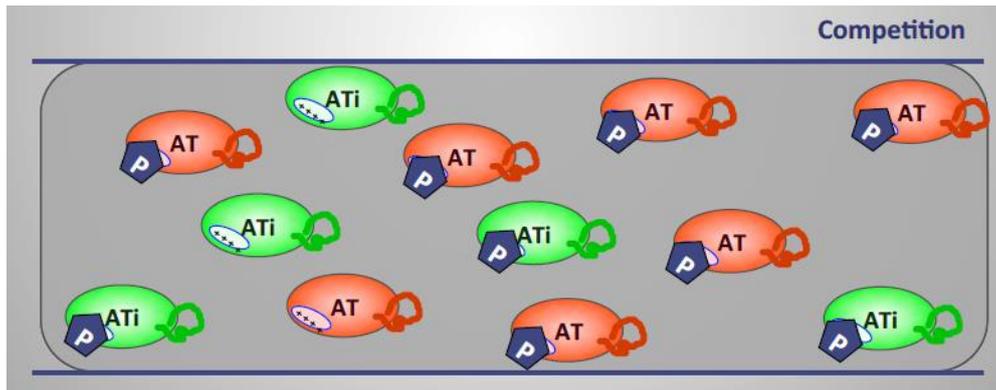


Figure 52 : Principe d'un variant d'AT antidote de l'héparine. Le variant inactif de l'AT (en vert) déplace l'interaction entre l'AT native du patient (en rouge) et le dérivé héparinique responsable du surdosage. La lettre P représente le fondaparinux, qui est un pentasaccharide de forte affinité pour l'AT.

L'objectif du projet THERAT est de développer, par deux stratégies parallèles de mutagenèse aléatoire et dirigée, des variants d'AT à fort potentiel thérapeutique, puis de les tester *in vitro* et *in vivo* dans les deux contextes précités, le sepsis sévère et la CEC. Les différentes mutations réalisées sont destinées à faire perdre à l'AT son activité anticoagulante (afin de diminuer les risques hémorragiques) tout en conservant ou augmentant sa liaison à l'héparine. En effet, les propriétés cytoprotectrices de l'AT sont médiées par sa liaison aux héparans sulfates présents à la surface des cellules endothéliales (Kaneider 2003, Huntington 2003, Wiedermann 2002). De même, le développement d'un antidote anti-héparine nécessite d'augmenter l'affinité de l'AT aux dérivés hépariniques. Pour diminuer l'activité anticoagulante de l'AT il a été envisagé, entre autres, une mutation aléatoire ou ciblée au niveau de la boucle réactive de l'AT. Pour augmenter l'affinité à l'héparine, il a été envisagé de modifier par mutagenèse ciblée la séquence consensus au niveau des sites de glycosylation de l'AT (Fig. 53).

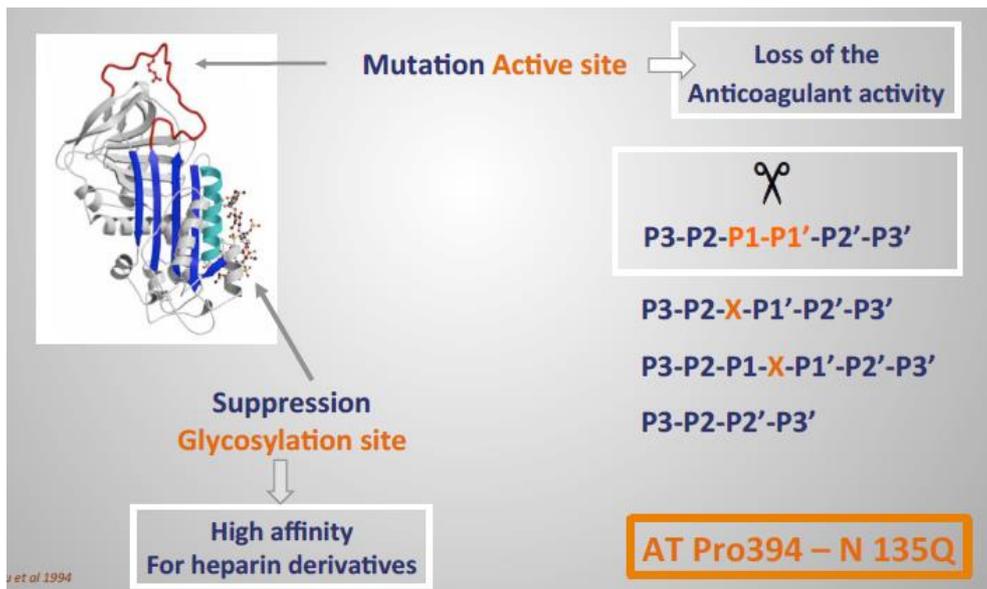


Figure 53 : Exemple de stratégies de mutagenèse pour produire un variant d’AT possédant une affinité élevée pour les dérivés hépariniques mais dépourvu d’activité anticoagulante. Le variant d’AT Pro394-N135Q, synthétisé par l’équipe du Professeur Borgel, a fait l’objet d’une publication dans le journal *Blood* (Bianchini 2011).

Le projet THERAT est un partenariat entre quatre équipes : le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) représenté par Rémi Urbain et Jean-Luc Plantier, l’équipe UMR S1176 - INSERM U1176 dirigée par le Professeur Delphine Borgel, l’équipe du Professeur Myriam Taverna (PNAS) de l’Institut Galien - UMR CNRS 8612 (Directeur Elias Fattal), et le groupe hospitalier UPRES EA 3859 dirigé par le Professeur Nicolas Lerolle. La figure 54 suivante présente les tâches attribuées à chaque équipe.

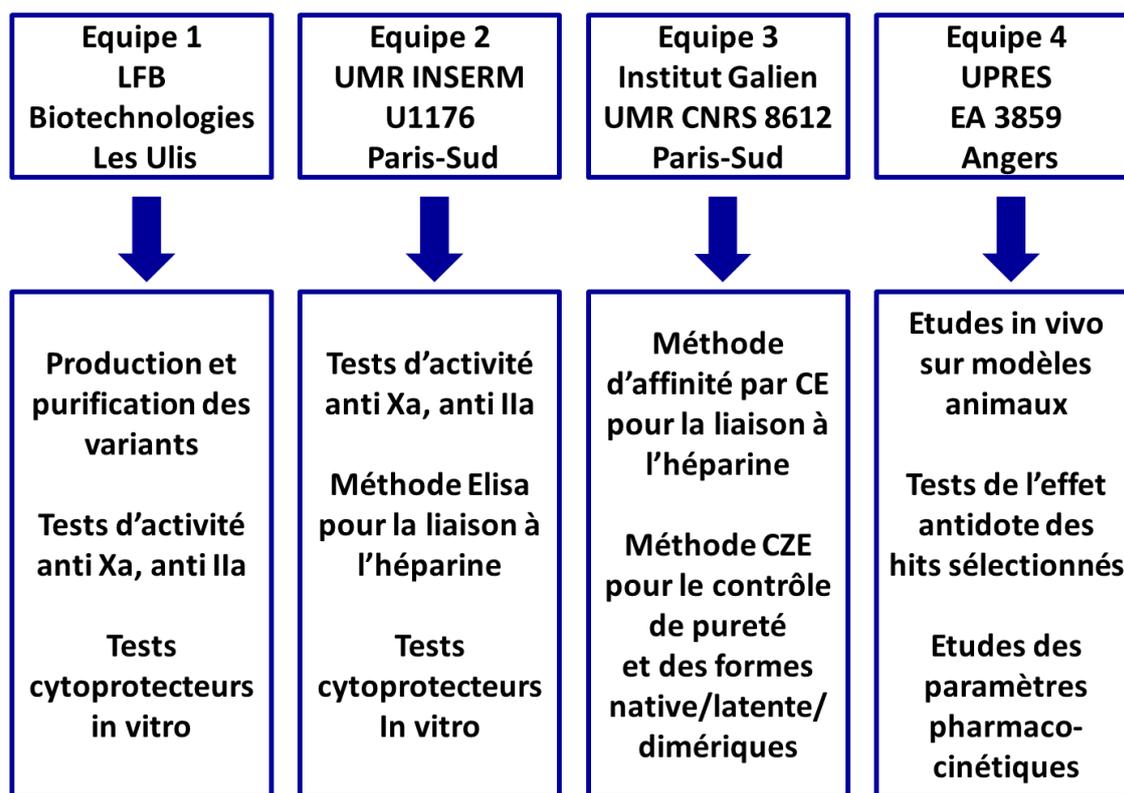


Figure 54 : Les équipes impliquées dans le projet THERAT et leurs tâches respectives.

Depuis le début du projet, démarré en janvier 2012, environ 300 variants d'AT ont été produits puis leur liaison à l'héparine a été estimée. Notre équipe a contribué à ce criblage en développant une méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité. En effet, à l'époque, seulement deux techniques étaient disponibles : la spectrofluorimétrie et de l'ELISA en cours de développement.

Dans le chapitre suivant, nous commençons par une partie bibliographique présentant les différents modèles d'affinité protéine/ligand et les méthodes CE permettant de déterminer une constante d'association entre une protéine et un ligand. Puis une seconde partie décrit la méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) que nous avons développée et optimisée pour étudier l'affinité de différents variants d'AT pour l'héparine, directement à partir des surnageants de culture cellulaire utilisés pour les produire. Cette méthode a fait l'objet d'un article publié en 2015 dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. En troisième partie, nous présentons les résultats obtenus par analyse d'une quinzaine de variants d'AT synthétisés dans le cadre du projet THERAT (non dévoilés dans cette thèse pour des raisons de propriété industrielle) avec la méthode ACE développée. Enfin, une quatrième partie décrit l'exploration d'une méthode nouvelle par analyse de la dispersion de Taylor (TDA) pour déterminer la constante d'association entre l'AT et l'héparine.

III.A. Rappels sur les différents modèles d'affinité et techniques CE utilisées

III.A.1. Les différents modèles d'affinité

III.A.1.a. Notion d'équilibre

Considérons un ligand L et un substrat S en interaction en solution. Le substrat S est un terme général pour qualifier le partenaire se trouvant en nombre unitaire dans le complexe. Ainsi, nous nous limiterons dans ce qui suit aux systèmes 1 : n, où par convention le 1^{er} chiffre correspond au nombre de substrats impliqués dans le complexe et n au nombre de ligands liés au substrat. n est aussi appelé la stœchiométrie du complexe. L'équilibre des systèmes 1 : n peut se définir par l'équation 17 suivante (Le Saux 2004) :



avec SL_n le complexe portant n ligands et β_n la constante d'association de cet équilibre définie par :

$$\beta_n = \frac{[SL_n]}{[S][L]^n} \quad (18)$$

Ainsi, le rapport R (encore appelé fraction molaire) entre la concentration de substrat lié et la concentration totale de substrat est défini par l'équation 19 :

$$R = \frac{[SL_n]}{[S] + [SL_n]} = \frac{\beta_n [L]^n}{1 + \beta_n [L]^n} \quad (19)$$

avec [S] et $[SL_n]$, les concentrations respectives en substrat libre et complexé au ligand.

Une approche générale, souvent utilisée pour étudier les interactions, consiste à tracer l'isotherme d'adsorption représentant $\bar{n} = f([L])$, en réalisant différents mélanges substrat/ligand. \bar{n} représente le nombre moyen de ligands liés par molécule de substrat et se détermine selon l'équation 20 suivante :

$$\bar{n} = \frac{[L]_b}{[S]_{tot}} = \frac{[L]_{tot} - [L]}{[S]_{tot}} \quad (20)$$

où $[L]_{tot}$ et $[S]_{tot}$ sont respectivement les concentrations totales en ligand et en substrat introduites dans le mélange, et $[L]_b$ et $[L]$ sont respectivement les concentrations en ligands liés et en ligands libres. Connaissant $[L]_{tot}$ et $[S]_{tot}$, la détermination de $[L]$ pour chaque mélange substrat/ligand est suffisante pour tracer l'isotherme d'adsorption.

Il existe différents modèles permettant d'accéder aux paramètres d'interaction à partir de l'isotherme d'adsorption. Le choix du modèle le plus adapté dépend des connaissances préalables du système, des données expérimentales disponibles et de la nature physique des partenaires. Nous allons décrire dans les paragraphes suivants le modèle très général des équilibres successifs et expliquer ce que l'on appelle la coopérativité.

III.A.1.b. Modèle des équilibres successifs

Lorsque l'on dispose de peu d'informations sur le système étudié, le modèle des équilibres successifs est particulièrement adapté, car il s'affranchit de toute hypothèse de départ. Ce modèle définit l'équilibre de l'équation 17 comme une succession d'équilibres intermédiaires, menant du substrat associé à $i-1$ ligands (SL_{i-1}) au substrat lié à i ligands (SL_i) :



avec K_i la constante d'équilibres successifs correspondant à la constante d'association de cet équilibre intermédiaire :

$$K_i = \frac{[SL_i]}{[SL_{i-1}][L]} \quad (22)$$

Le lien entre la constante d'association β_i et les constantes d'équilibres successifs a été défini par (Le Saux 2004) :

$$\beta_i = \prod_{j=1}^{j=i} K_j \quad (23)$$

L'isotherme d'adsorption permet d'accéder aux paramètres d'interaction par ajustement non linéaire au moyen de l'équation 24 suivante (Le Saux 2004, He 2004) :

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^n i\beta_i [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \beta_i [L]^i} \quad (24)$$

ou encore

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^n i(\prod_{j=1}^{j=i} K_j) [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n (\prod_{j=1}^{j=i} K_j) [L]^i} \quad (25)$$

L'ajustement non linéaire de l'isotherme permet alors d'accéder à la stœchiométrie n et aux constantes d'équilibres successifs K_j .

III.A.1.c. Notion de coopérativité

Pour un substrat possédant plusieurs sites d'interaction avec un ligand (et d'énergies initialement identiques lorsque ces sites sont vacants), la coopérativité est une description de l'influence de l'occupation de l'un des sites du substrat sur l'interaction du ligand avec les sites restants disponibles. La coopérativité est représentée par trois états :

- l'état non-coopératif, pour lequel l'occupation d'un site n'influe pas sur les sites vacants, c'est-à-dire que les sites sont indépendants,
- l'état coopératif, pour lequel l'occupation d'un site favorise l'occupation des sites vacants, c'est-à-dire que les complexes d'ordre supérieur sont stabilisés,
- l'état anti-coopératif, pour lequel l'occupation d'un site gêne l'occupation des sites vacants, c'est-à-dire que les complexes d'ordre inférieur sont stabilisés.

Pour un substrat macromoléculaire, tel qu'une protéine, les systèmes coopératifs et anti-coopératifs peuvent être dus à un changement conformationnel de la molécule de substrat ou à des gênes stériques, modifiant ainsi l'accès du ligand en solution aux sites vacants.

La figure 55 présente une simulation des isothermes d'adsorption obtenues en fonction des états de coopérativité (pour un cas où $n=2$). On constate que la coopérativité entre les sites modifie la forme de l'isotherme d'adsorption. Ainsi, un état coopératif engendre une pente à l'origine plus abrupte et une courbe qui tend rapidement vers la saturation, contrairement à un état anti-coopératif.

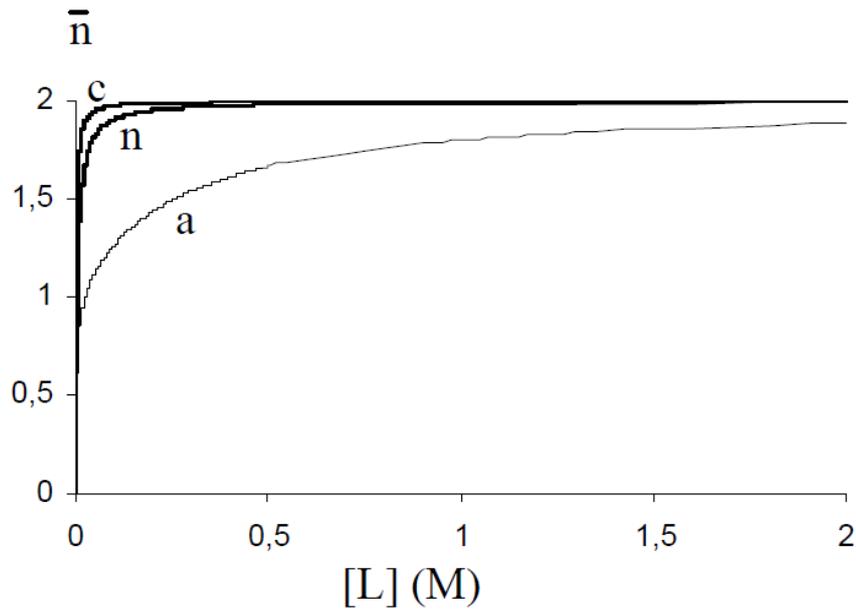


Figure 55 : Représentation, par simulation, des isothermes d'adsorption obtenues dans le cas $n=2$ en fonction de l'état de coopérativité entre les sites de liaison : c, état coopératif ; n, état non-coopératif ; a, état anti-coopératif. Issu de Le Saux 2004.

Nous allons maintenant décrire les principales méthodes d'électrophorèse capillaire utilisées pour les études d'affinité. Dans ce qui va suivre, nous désignerons par substrat une protéine à analyser, et par conséquent parlerons d'interaction protéine/ligand.

III.A.2. Les différentes méthodes CE pour les études d'affinité

Pour déterminer les paramètres d'interaction entre une protéine et un ligand, une variété de méthodes CE existent telles que l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE), l'électrophorèse capillaire en mode frontal (FA) et en mode frontal continu (FACCE) (Štěpánová 2015, Jiang 2010, He 2004). Pour toutes ces méthodes, différents modes opératoires peuvent être utilisés. Si la cinétique d'association entre la protéine et son ligand est rapide, on injecte en général la protéine dans un électrolyte contenant le ligand. Par contre, si cette cinétique est lente, il est préférable d'incuber la protéine avec le ligand avant de l'injecter. Enfin, il existe des méthodes un peu particulières et plus complexes telles que les méthodes d'Hummel-Dreyer (Berger 2003), des pics de vacance et l'électrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre (NECEEM). Le tableau 5 suivant est une synthèse des différents modes CE envisageables pour les études d'affinité.

| Mode | Sample | Running buffer | Quantitative foundation | Applicability |
|------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|
| CZE | Analyte + ligand | Blank buffer | Area or height | Fast or slow on-off kinetics |
| ACE | Analyte | Buffer containing ligand | Mobility | Fast on-off kinetics |
| HD | Analyte or (analyte + ligand) | Buffer containing ligand | Area or height | Fast on-off kinetics |
| FA | Analyte + ligand | Blank buffer | Height | Fast on-off kinetics |
| VP | Blank buffer | Analyte + ligand | Area or height | Fast on-off kinetics |

Tableau 5 : Détails expérimentaux des différents modes CE pour les études d'affinité protéine/ligand (HD, Hummel-Dreyer ; VP, vacancy peak).

III.A.2.a. Electrophorèse capillaire d'affinité

III.A.2.a.1. Principe

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) est la méthode CE la plus simple et la plus utilisée pour déterminer des constantes d'association entre une protéine et un ligand (Jiang 2010). Cette méthode est basée sur la différence de mobilité entre le complexe formé et le partenaire à l'état libre.

Si nous supposons que l'interaction entre la protéine et son ligand est de stœchiométrie 1 : 1, la constante d'association K peut être définie simplement par :

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (26)$$

avec $[PL]$, $[P]$ et $[L]$ les concentrations d'équilibre du complexe protéine/ligand, de la protéine libre et du ligand libre, respectivement.

Dans le mode ACE, lorsque la protéine libre est injectée dans l'électrolyte de séparation contenant le ligand, la mobilité électrophorétique effective μ_{eff} de la protéine en équilibre dynamique avec le ligand est la moyenne des mobilités de la protéine libre μ_f et de la protéine

complexée μ_c , pondérées par leur fraction molaire respective χ_f et χ_c (Le Saux 2006, Karakasyan 2005) :

$$\mu_{eff} = \chi_f \mu_f + \chi_c \mu_c \quad (27)$$

En exprimant les fractions molaires en fonction des concentrations en protéine libre et en protéine complexée, l'équation 27 devient :

$$\mu_{eff} = \frac{[P]}{[P] + [PL]} \mu_f + \frac{[PL]}{[P] + [PL]} \mu_c \quad (28)$$

ou encore :

$$\mu_{eff} = \frac{1}{1 + K[L]} \mu_f + \frac{K[L]}{1 + K[L]} \mu_c \quad (29)$$

Le tracé de μ_{eff} , déterminée expérimentalement, en fonction de la concentration en ligand libre dans l'électrolyte permet de déterminer, par régression non-linéaire, la constante d'association K . Pour que l'équation 29 puisse être appliquée, il faut que la concentration en ligand libre soit connue et constante durant la séparation. Généralement, on considère que cette concentration correspond à la concentration du ligand introduite dans l'électrolyte (Le Saux 2006). De plus, il faut que la concentration de la protéine injectée ne dépasse pas celle du ligand dans l'électrolyte de plus d'un ordre de magnitude (Le Saux 2005). Il peut être difficile de respecter cette condition si des concentrations relativement élevées de protéine doivent être injectées (en raison d'une faible sensibilité de détection), ou dans le cas de constantes d'affinité élevées, étant donné que la gamme de concentration du ligand doit encadrer la valeur de la constante de dissociation $K_d (= 1/K)$ avec environ un ordre de magnitude.

Afin de déterminer un K_d qui ne soit pas erroné, il faut s'assurer qu'il n'y a pas d'interactions secondaires comme par exemple celles provenant de l'adsorption de la protéine analysée sur les parois du capillaire. Ce genre d'interactions conduirait en effet à une modification de la μ_{eff} de la protéine qui ne serait pas due à une interaction avec le ligand. De plus, des corrections de viscosité doivent être effectuées, soit par une mesure réelle de la viscosité du tampon utilisé, soit par une mesure de courant (Lemesle-Lamache 1996).

Dans le cadre du projet THERAT, nous avons développé une méthode d'affinité basée sur le mode ACE, afin d'étudier l'affinité entre des variants d'AT et l'héparine. Nous présentons cette méthode dans l'article section III.B.

III.A.2.a.2. Méthodes de linéarisation dans le cas d'une stœchiométrie 1 : 1

Il existe quatre méthodes de linéarisation des isothermes d'adsorption permettant d'accéder à la constante d'association K : la méthode de l'isotherme linéarisée, la méthode x-réciproque (encore appelée méthode de Scatchard), la méthode y-réciproque et la méthode double réciproque (Le Saux 2006). Le tableau 6 décrit les équations correspondantes et la façon d'accéder à K .

Tableau 6 : Les méthodes de linéarisation permettant d'accéder à la constante d'association K par ACE (cas d'une stœchiométrie 1 : 1).

| | $y = ax + b$ | a | b | K |
|--------------------------|---|------------------------------|------------------------------|-------|
| isotherme linéarisée | $\frac{\mu_f - \mu_{eff}}{\mu_{eff} - \mu_c} = K[L]$ | K | - | a |
| x-réciproque (Scatchard) | $\frac{\mu_{eff} - \mu_f}{[L]} = -K(\mu_{eff} - \mu_f) + K(\mu_c - \mu_f)$ | $-K$ | $K(\mu_c - \mu_f)$ | $-a$ |
| y-réciproque | $\frac{[L]}{\mu_{eff} - \mu_f} = \frac{1}{\mu_c - \mu_f}[L] + \frac{1}{K(\mu_c - \mu_f)}$ | $\frac{1}{\mu_c - \mu_f}$ | $\frac{1}{K(\mu_c - \mu_f)}$ | a/b |
| double réciproque | $\frac{1}{\mu_{eff} - \mu_f} = \frac{1}{K(\mu_c - \mu_f)}\frac{1}{[L]} + \frac{1}{\mu_c - \mu_f}$ | $\frac{1}{K(\mu_c - \mu_f)}$ | $\frac{1}{\mu_c - \mu_f}$ | b/a |

III.A.2.a.3. Cas des interactions multi-sites (stœchiométrie 1 : n)

Dans le cas d'une stœchiométrie supérieure à 1, le complexe formé présente différentes mobilités en fonction de son état de complexation. Afin de prendre en compte les mobilités des complexes correspondant aux équilibres intermédiaires, Bowser et al. ont proposé un modèle non-linéaire pour une stœchiométrie 1 : 2, permettant d'ajuster l'isotherme d'adsorption au moyen de l'équation 30 suivante (Bowser 1998) :

$$(\mu_{eff} - \mu_f) = \frac{(\mu_{SL_1} - \mu_f)K_1[L] + (\mu_{SL_2} - \mu_f)K_1K_2[L]^2}{1 + K_1L + K_1K_2[L]^2} \quad (30)$$

Cependant, pour pouvoir utiliser l'équation 30, il faut que les complexes intermédiaires présentent des mobilités suffisamment différentes. Par conséquent, il est préférable que le ligand apporte une charge supplémentaire et/ou un ajout de masse significatif par rapport au

complexe précédant, pour modifier la mobilité du complexe de manière suffisante. Dans le cas général d'une interaction 1 : n, la représentation de $\mu_{eff} = f([L])$ peut être ajustée par l'équation 31 (Le Saux 2004) :

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_f + \sum_{i=1}^n \beta_i \mu_{SL_i} [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \beta_i [L]^i} \quad (31)$$

III.A.2.b. Méthodes basées sur l'analyse frontale

Contrairement aux méthodes reposant sur l'électrophorèse capillaire de zone, pour lesquelles un faible volume d'échantillon est injecté, les méthodes d'analyse frontale par électrophorèse capillaire (FA) consistent à injecter un grand volume d'échantillon. Pour étudier des interactions protéine/ligand, on peut utiliser une méthode basée sur la FA. Dans ce cas, la protéine est souvent incubée avec son ligand avant d'être injectée dans un capillaire ne contenant que l'électrolyte support. L'injection d'un créneau long permet, au cours de la migration, de ne séparer que partiellement les partenaires de l'interaction. Ainsi, l'intégrité de l'équilibre protéine/ligand est conservée. Il existe une variante à la méthode FA qui consiste à injecter en permanence l'échantillon sous l'effet de l'application du champ électrique. On parle dans ce cas d'analyse frontale continue par électrophorèse capillaire (FACCE).

Dans les méthodes basées sur l'analyse frontale, la quantité élevée d'échantillon injecté donne lieu à des fronts dont la hauteur de plateau est proportionnelle à la concentration de l'espèce correspondante. Une courbe de calibration permet alors d'accéder à la concentration en ligand libre dans les mélanges.

La figure 56 ci-dessous présente des électrophérogrammes obtenus en FA pour la détermination de la constante d'association entre l'HSA et la diphènehydramine (DPH, un médicament) (Jia 2002). Les analyses ont été réalisées par injection d'un grand volume (~80 nL) d'un mélange HSA/DPH. La concentration initiale en DPH a été fixée à 50 μM alors que la concentration en HSA a varié de 0 à 400 μM . L'augmentation de la concentration en HSA a conduit à une consommation de DPH lors de la formation du complexe, qui s'est traduite par une baisse de la hauteur du plateau correspondant à la DPH libre.

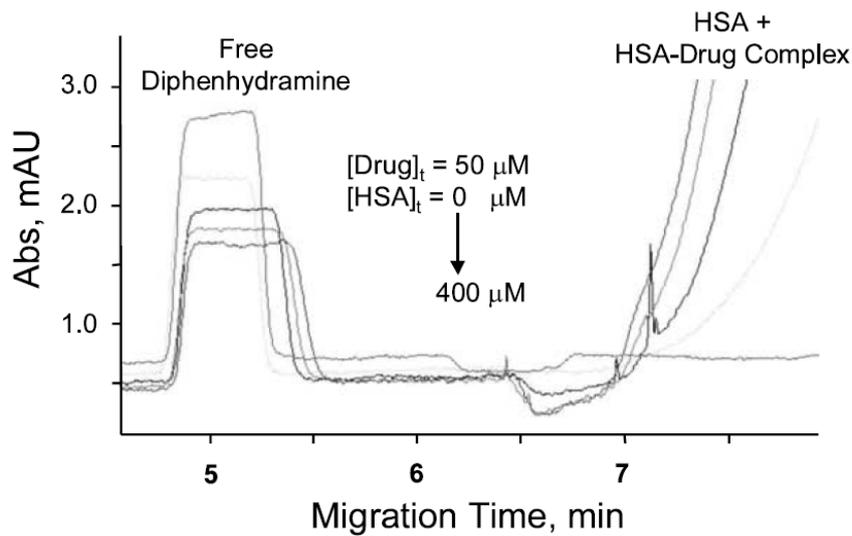


Figure 56 : Analyses frontales (FA) par CE de mélanges HSA/diphènehydramine afin de déterminer la constante d'association. Les mélanges protéine/ligand ont été injectés par pression hydrodynamique de 1 psi pendant 40 sec (volume injecté : 80 nL). Issu de Jia 2002.

La figure 57 présente des électrophérogrammes obtenus par FACCE pour la détermination de la constante d'association entre l'AT plasmatique et une héparine fractionnée (masse moléculaire 4200 Da) (Le Saux 2006). Les analyses ont été réalisées par incubation d'AT avec l'héparine, puis le mélange incubé a été injecté en continu par application d'une tension de 10 kV. On remarque sur la figure 57 que plus il y a d'héparine dans le mélange injecté, plus la hauteur de plateau correspondant à l'AT libre diminue.

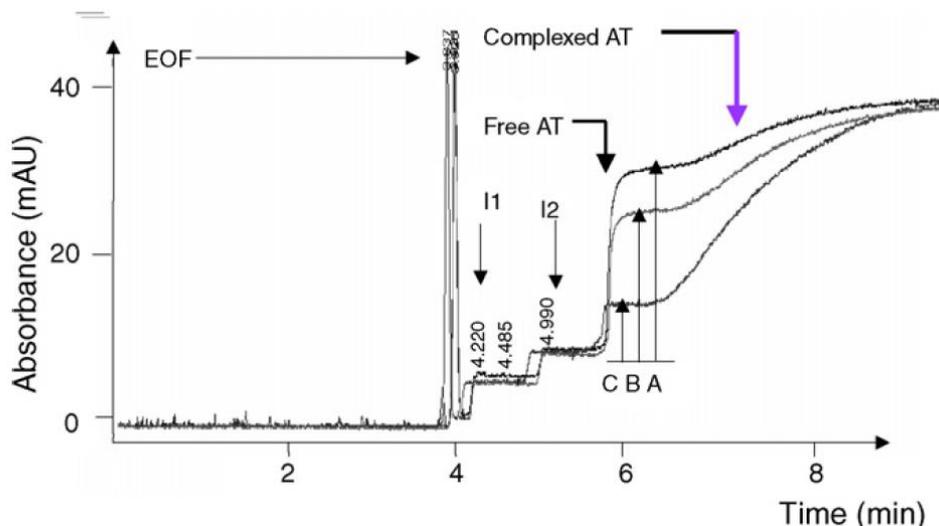


Figure 57 : Superposition d'électrophérogrammes obtenus par FACCE montrant la variation des hauteurs de plateau de l'AT libre en fonction de la concentration d'héparine dans le mélange d'incubation AT/héparine. A, B et C représentent différentes concentrations en héparine : A, $4,8 \cdot 10^{-6}$ M ; B, $7,5 \cdot 10^{-6}$ M ; C, $2,1 \cdot 10^{-5}$ M. Concentration d'AT : $3,5 \cdot 10^{-6}$ M. Tampon : phosphate de sodium à 45 mM. I₁ et I₂ sont des impuretés présentes dans l'échantillon commercial d'AT, qui n'engendrent pas d'interférences. Issu de Le Saux 2006.

III.A.2.c. Méthodes des pics de vacance

Deux méthodes CE basées sur l'analyse des pics de vacance existent : l'électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance (VACE) et l'électrophorèse capillaire des pics de vacance (VP) (Busch 1997). Le principe de ces deux méthodes est identique. Il consiste à conditionner un capillaire avec un électrolyte support contenant la protéine et le ligand, puis à injecter un faible volume d'électrolyte support ne contenant aucun des deux partenaires avant l'application d'une tension séparative, induisant la migration des espèces. Un défaut local des espèces va entraîner la présence de pics négatifs, appelés pics de vacance. Ces pics peuvent être des pics de vacance du ligand et/ou de la protéine, selon les partenaires détectés. Une série d'expériences, réalisées en fixant la concentration d'un des deux partenaires (par exemple la protéine) et en faisant varier celle de l'autre partenaire, permet de tracer l'isotherme d'adsorption. Contrairement à l'ACE, la concentration en ligand libre ne peut pas être supposée égale à la concentration introduite dans l'électrolyte support et doit donc être calculée (Dvořák 2013).

La différence entre la VACE et la VP provient du fait que dans la VACE on exploite la mobilité des pics de vacance, alors que dans la VP on exploite l'aire des pics de vacance (Busch 1997). Dans le mode VP, l'aire des pics de vacance est proportionnelle à la concentration en partenaire libre. Les méthodes VACE et VP consomment des quantités importantes de protéine et de ligand. De plus, des calculs assez complexes et des courbes de calibration sont nécessaires. Ces méthodes sont donc peu employées.

A titre d'exemple, la figure 58 présente l'analyse d'un mélange d'albumine de sérum bovin (BSA) et de warfarine à l'aide d'une méthode VP (Busch 1997). Bien que la BSA ne soit pas une protéine thérapeutique, cet exemple est intéressant puisque, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 1, l'HSA possède un site de liaison à la warfarine (voir section I.D.1.).

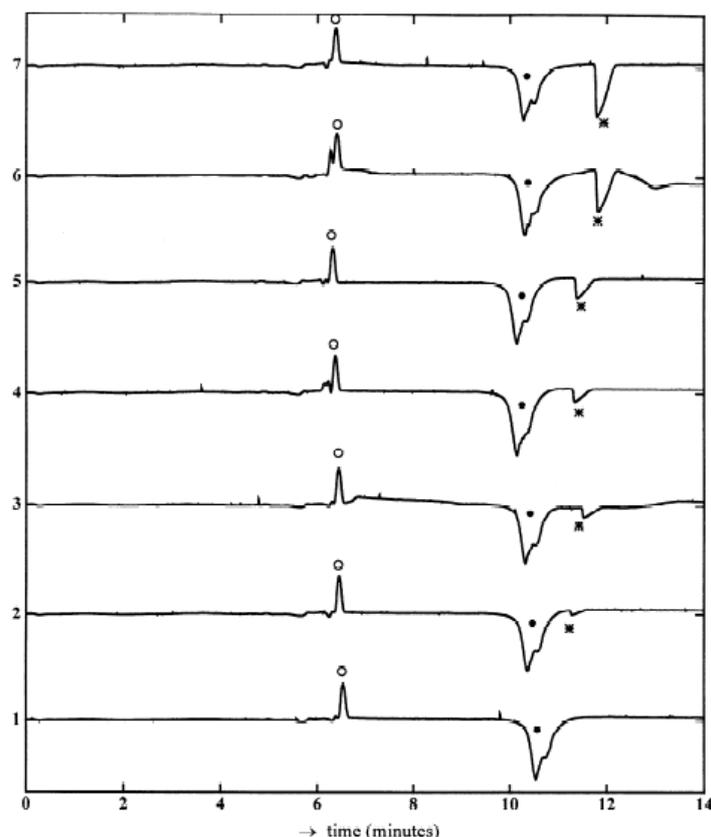


Figure 58 : Analyses par VP de mélanges BSA/warfarine. Electrolyte de séparation : tampon phosphate 67 mM, pH 6,7 avec 40 μ M de BSA et différentes concentrations de warfarine : 102, 136, 204, 272, 509, 611 et 815 μ M (correspondant aux électrophérogrammes du bas vers le haut). Echantillon injecté : oxyde de mésityle (marqueur neutre pour corriger les variations de l'EOF) dilué dans l'électrolyte support. Rond creux : oxyde de mésityle, rond plein : complexe BSA/warfarine et BSA libre, astérisque : warfarine libre. Issu de Busch 1997.

III.A.2.d. Electrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre

L'électrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre (NECEEM) a été développée plus récemment par le groupe de Krylov (Kanoatov 2015, Krylov 2006). Dans la méthode NECEEM, un faible volume d'un mélange protéine/ligand en équilibre, est injecté dans un capillaire préalablement rempli avec un électrolyte tampon. Une tension est alors appliquée aux extrémités du capillaire, qui plongent dans une solution composée uniquement de tampon, sans protéine ni ligand. Dès que les zones de la protéine libre, du ligand libre et du complexe protéine/ligand sont séparées, le complexe n'est plus en équilibre avec les deux partenaires libres. Par conséquent, il dissocie continuellement avec une constante k_{off} . Plus la séparation est efficace, moins la protéine et le ligand se réassocient. Bien que les fractions d'équilibre de la protéine libre, du ligand libre et du complexe migrent en bandes étroites, la

protéine et le ligand libres, issus de la dissociation du complexe, ont des profils de concentration exponentiels (Fig. 59A). Ainsi, les électrophérogrammes obtenus en NECEEM permettent d'accéder au K_d mais également au k_{off} ($K_d = k_{off}/k_{on}$) (Krylov 2006).

La figure 59 présente un électrophérogramme obtenu expérimentalement par analyse NECEEM d'un mélange brin d'ADN/protéine liant l'ADN, afin d'étudier les paramètres d'interaction entre ces deux partenaires. Comme on le voit, dans l'électrophérogramme obtenu expérimentalement, les pics ont un profil Gaussien et non rectangulaire, contrairement au profil théorique.

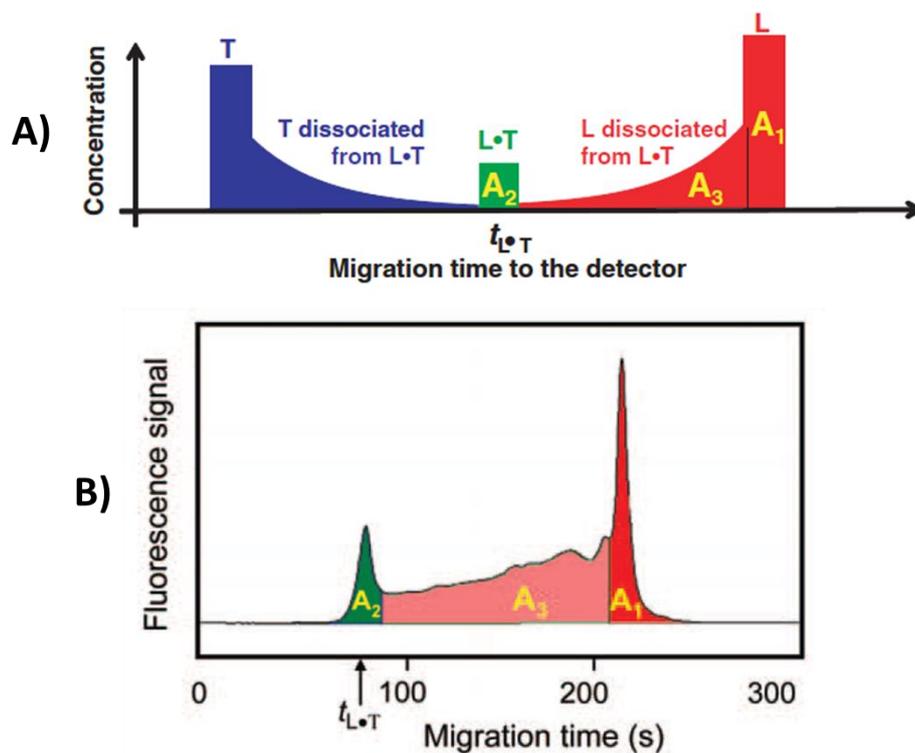


Figure 59 : Principe de la méthode NECEEM. A) Représentation schématique de la méthode (T, protéine substrat ; L, ligand ; L•T, complexe protéine/ligand). B) Exemple d'électrophérogramme obtenu expérimentalement par analyse NECEEM d'un mélange brin d'ADN/protéine liant l'ADN. Adapté de Krylov 2006.

Nous allons désormais présenter la méthode ACE que nous avons développée durant cette thèse afin d'étudier l'affinité entre des variants d'AT et l'héparine. Nous avons considéré une stœchiométrie 1 : 1 car c'est celle utilisée dans les publications portant sur les mesures d'affinité AT/héparine. Un capillaire de silice vierge a été utilisé afin de bénéficier d'un EOF élevé permettant de réduire le temps des analyses et une optimisation des protocoles de conditionnement et de rinçage du capillaire a été entreprise afin de limiter les phénomènes d'adsorption. La répétabilité, la justesse et la précision de la méthode ont été étudiées.

III.B. Article 3 : « A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants »

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 111 (2015) 64-70

Anne-Lise Marie^{a,b}, Nguyet Thuy Tran^{a,b}, Elsa P. Bianchini^c, François Saller^c, Stéphane Pautus^c, Toufik Abache^d, Jean-Luc Plantier^d, Rémi Urbain^d, Delphine Borgel^c, Myriam Taverna^{a,b,*}

^aUniversité Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

^bCNRS UMR 8612, Institut Galien Paris Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France

^cUniversité Paris Sud, Laboratoire d'Hématologie, EA 4531, 92290 Châtenay-Malabry, France

^dLFB, 91940 Les Ulis, France

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 83 54 62

E-mail address: myriam.taverna@u-psud.fr (M. Taverna)

Abstract

With the aim to determine the binding affinity of a new generation of recombinant antithrombin (AT) toward heparin, we developed a dynamic equilibrium-affinity capillary electrophoresis (DE-ACE) method. This method allows the determination of an AT-heparin binding constant (K_d) directly from the cell culture supernatant used to produce the AT variants. Eight measurements per AT variant are sufficient to determine an accurate K_d (uncertainty ≤ 22 %, regression coefficient ≥ 0.97), which is not significantly different from the value obtained from a higher number of measurements. Due to the relatively short time required to determine the K_d of one AT variant (2 h), this method has the potential for being a low throughput screening method. The method was validated by analyzing five AT variants, whose K_d have been reported in the literature using fluorescence spectroscopy. Finally, the method was applied to estimate the K_d of one new AT variant and one AT conformer, a latent form, that exhibits a significant loss of affinity.

Key words: Affinity capillary electrophoresis, recombinant antithrombin, heparin, binding constant.

Abbreviations: ACE, affinity capillary electrophoresis; AT, antithrombin; BGE, background electrolyte; CE, capillary electrophoresis; DE-ACE, dynamic equilibrium-ACE; EOF, electroosmotic flow; FA, frontal analysis; HEK, human embryonic kidney; K, binding constant; K_d , dissociation constant; μ_{ep} , electrophoretic mobility; NECEEM, non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PVA, polyvinyl alcohol; RSD, relative standard deviation; Serpin, serine protease inhibitor; SPR, surface plasmon resonance.

1. Introduction

Antithrombin (AT) is a human plasma glycoprotein which belongs to the serine protease inhibitor (serpin) family. AT is the major physiological inhibitor of coagulation proteases, primarily thrombin and factor Xa. Efficient regulation of clotting proteases by antithrombin requires the polysaccharide cofactor heparin, which acts to increase the moderate rates of inhibition of AT by several thousand-fold [1-5]. Besides its anti-coagulant effect, AT also possesses anti-inflammatory properties, this anti-inflammatory effect being observed when a high concentration of AT is present in the blood. In order to produce AT variants with an improved therapeutic potential, a French pharmaceutical company currently produces a new generation of recombinant AT by directed mutagenesis. Owing to the great number of the produced AT variants (between 200 and 300), it has been necessary to develop a screening method to assess the affinity of these newly produced variants toward heparin. The analytical method had to be fast, to allow an accurate determination of the binding constant, and, above all, to afford the analysis of the variants directly from the cell culture supernatant used to produce them.

Currently, very few analytical methods are capable of measuring the binding constant between AT and heparin. Fluorescence spectroscopy has been widely used in the past for this purpose [6-11], since it is highly specific of AT-heparin interaction, and offers the advantage to be realized in free solution. However, this method requires considerable amounts (100 μg) of sample and the analysis of non purified antithrombin is not possible. Isothermal titration calorimetry (ITC) is an alternative method to fluorescence spectroscopy [12-14], but is less

specific of AT-heparin interaction. Surface plasmon resonance (SPR) has also been used to study the interaction between AT and heparin [15-17]. Using this technique, the binding kinetics can be followed in real time (determination of k_{on} and k_{off}), with a low consumption of material. However, SPR requires the immobilization of heparin on a sensor chip surface, which hampers the conformational flexibility of the polysaccharide necessary to the formation of a stable AT-heparin complex. Affinity chromatography is also a good approach to study AT-heparin interaction [18-20], but, up to now, has not been exploited to determine binding constants between these two partners.

In contrast, capillary electrophoresis (CE) has proved to be very well suited to study protein-ligand binding interactions. In the past two decades, several modes with different operational protocols have been developed to study molecular interactions [21-23]. When binding kinetics are fast the ligand is rather introduced in the running buffer and the target injected. For slower kinetics the target and its ligand are preincubated before analysis. Frontal analysis (FA) based methods involve a large plug of sample or continuous sample introduction, and the measurement of a plateau height. FA implies therefore high consumption of sample. Alternatively, zonal elution methods, among which affinity capillary electrophoresis (ACE), can be used. ACE, which relies on the electrophoretic mobility measurement of either the complex or the target alone, is the most simple and frequently used mode. In ACE, the interactions can take place either at the surface of a capillary previously coated with the ligand or, more frequently, when both the target and the ligand are free in solution. Besides these modes, “non-equilibrium CE of equilibrium mixtures” (NECEEM) was developed by Krylov’s group for intermediate equilibrium kinetics [24,25]. Although one single NECEEM electropherogram provides sufficient data for determining both K_d and k_{off} , this mode is much more complicated and, up to now, only a few publications have exploited it.

For the purpose of this study, we chose the ACE mode in dynamic equilibrium (DE-ACE) based on mobility shift measurements since it is relatively simple to implement, and doesn’t require a high quantity of sample. Furthermore, in this mode, the binding assay is realized in free solution, with the preservation of the flexibility of the interacting molecules. DE-ACE has been exploited several times for the assessment of AT-heparin binding. Gunnarsson et al. were the first to report the binding study of AT to low-affinity heparins by DE-ACE. The analysis was performed at physiological pH, and used a polyacrylamide coated capillary to minimize the adsorption of AT to the capillary inner wall [26]. In 2006, Le Saux et al.

described a DE-ACE method that allowed to assess the binding of AT toward fractionated heparins. This method, which used a non-coated capillary and a phosphate buffer, was suitable to determine weak to medium interactions between AT and short oligomeric heparin fragments [27]. Recently, Gotti et al. reported a DE-ACE method allowing a medium/highly throughput screening of the affinity of heparin batches from different sources toward AT [28]. The method used a polyvinyl alcohol (PVA) coated capillary, and a phosphate buffer as the separation medium. Even more recently, Dinges et al. reported the use of DE-ACE for the determination of the binding affinities between AT and low molecular weight heparins [29]. The analytical conditions were very similar to those employed by Le Saux et al. However, in all these works, the analyzed antithrombins were purified AT, obtained from human plasma. In order to analyze recombinant antithrombins, present in a complex matrix containing many other compounds (salts, amino acids, proteins ...), it was necessary to adapt these previously reported works.

The choice of a coated capillary, to minimize the adsorption of recombinant AT and also the cell culture components onto the capillary inner wall, was not retained since this kind of coating highly increases the analysis time due to the very low EOF. We therefore preferred using a non-coated capillary and optimizing the analytical conditions so as to minimize, as much as possible, the adsorption phenomena. For this purpose, capillary preconditioning, background electrolyte ionic strength and inter-run rinses were carefully studied. The development of a fast method, compatible with a screening, also required to adapt other parameters, like heparin concentrations. The accuracy of the method was proved by analyzing AT variants, whose binding constants have already been reported in the literature. The suitability of the method to detect a loss of affinity was also demonstrated. Finally, the developed DE-ACE method was applied to the analysis of one AT variant, whose K_d has not been reported yet, and results were compared with those obtained by fluorescence spectroscopy.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and sample preparations

Sodium hydroxide was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium hydroxide and thiourea were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier,

France). Sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was from Carlo Erba Reagents (Cornaredo, Italy).

Unfractionated Choay[®] heparin (5000 I.U./mL) was used for all the studies. The human antithrombin Aclotine[®] and the AT variants (ATWT, ATN135Q, ATN155Q, ATN96Q, ATN192Q) were provided by LFB Biotechnologies (Les Ulis, France). These variants were produced by using the FreeStyle[™] 293 Expression System (Invitrogen), a suspension cell culture system generating large amounts of recombinant protein after a transient transfection in a protein-free cell culture medium. The variant ATN135Q-Pro394 was provided by the laboratory of hematology EA4531 (Châtenay-Malabry, France). This variant was produced in adherent HEK cells after stable transfection in DMEM-F12 (Invitrogen) supplemented with insulin, transferrin and selenium (Invitrogen), as previously described [30].

Latent and heterodimeric forms of AT were prepared as previously described by Karlsson et al. [31]. Briefly, Aclotine[®] was dialyzed against 5 mM HEPES, 0.9 M ammonium sulfate, pH 7.4 using 30000 MWCO Vivaspin 15R (Sartorius Stedim Biotech, Germany), and diluted to a concentration of 2.5 mg/mL in this buffer, followed by heating at 60°C during 9 h and 72 h to prepare heterodimeric and latent forms, respectively. The reaction mixtures were then concentrated and dialyzed against serum-free DMEM buffer (Gibco) using 30000 MWCO Vivaspin 15R.

Human and recombinant ATs, and preparations enriched in latent and heterodimeric forms were all stored at -20°C before use.

All buffers and samples used for CE analyses were prepared with Milli-Q water using a Direct-Q 3 UV purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Before use, all buffers were filtered through a 0.2 µm Millex membrane (Millipore).

2.2. PAGE analyses of latent antithrombin

The preparation of latent antithrombin was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using a 10 % polyacrylamide gel containing either 6 M urea (urea PAGE) or no urea (native PAGE), as previously described [32,33]. Urea PAGE analysis showed a clear separation of latent and native AT based on their own electrophoretic mobility, the latent

conformer having a higher electrophoretic mobility under these experimental conditions. Native PAGE was used to evaluate the amount of heterodimeric forms in the preparation of latent AT. These heterodimeric forms exhibit a lower electrophoretic mobility compared to latent AT, as previously described [34].

2.3. CE system and method

CE experiments were carried out on a P/ACE MDQ capillary electrophoresis instrument (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Fused-silica capillaries were from Composite Metal Services (Ilkley, UK). The effective and total lengths were 10.2 and 60.2 cm, respectively. The internal and external diameters were 50 and 375 μm , respectively. An intensive capillary preconditioning was carried out by successive flushes with methanol/water (50/50, v/v) (5 min), water (5 min), 1 N NaOH (15 min), 0.1 N NaOH (15 min), water (10 min), running buffer (5 min), and voltage application (20 kV for 2 h). Hydrodynamic injections were performed from the short-end of the capillary, with a pressure of 0.5 psi for 5 s. The separation voltage was set at -20 kV, and the capillary temperature was maintained at 25°C. UV detection was performed at 200 nm. The neutral molecules, present in the sample matrix, allowed to determine the EOF mobility for each analysis of recombinant AT. The pH of sodium phosphate buffer was adjusted at a value of 7.4 with 1 M ammonium hydroxide. Different buffers were prepared by adding various concentrations of unfractionated heparin (from 0.0025 to 0.5 μM). All buffers were prepared the day before the CE analyses and kept at room temperature. Just before use, the vials containing the buffers (with or without heparin) were heated at 30°C with a hot plate (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The AT variants, present in cell culture supernatant, were diluted at a concentration of 0.13 μM before their injection into the capillary.

2.4. Binding constant determination by DE-ACE

A fair number of publications have detailed the way to determine a binding constant by ACE in dynamic equilibrium [35,36]. Briefly, if we assume that the binding stoichiometry between AT and heparin is 1:1, the reversible reaction between AT and heparin is expressed by Eq. (1), and the binding constant (K) can be determined from Eq. (2).



where A is the analyte (AT), L is the ligand (heparin), and AL is the analyte-ligand (AT-heparin) complex.

$$\mu_i = (\mu_A + \mu_{AL} K[L]) / (1 + K[L]) \quad (2)$$

where μ_i is the experimentally determined electrophoretic mobility (μ_{ep}) of AT (running buffer containing heparin), μ_A the μ_{ep} of free AT (running buffer devoid of heparin), and μ_{AL} the μ_{ep} of the AT-heparin complex. [L] is the heparin concentration in the buffer.

For accurate measurement of electrophoretic mobilities, the viscosity variations of the buffers containing different concentrations of heparin were corrected by comparing the time required to push, under a constant pressure, a sample plug of thiourea through a buffer with and without heparin, noted t and t_0 , respectively. The viscosity correction factor (f) was determined from Eq. (3), and the measured μ_{ep} was corrected by multiplying the μ_{ep} by this factor.

$$f = \eta / \eta_0 = t / t_0 \quad (3)$$

where η and η_0 are the viscosity of the buffer determined by Poiseuille law and CE experiments using BGE with and without heparin, respectively.”

Binding constants were estimated by direct nonlinear regression using Origin[®] software (version 6.0) (Microcal Software).

2.5. Fluorescence spectroscopy instrument and method

For fluorescence spectroscopy experiments, ATWT and ATN135Q-Pro394 were purified from conditioned cell culture media by heparin affinity chromatography using a HiTrap Heparin HP 5 mL (GE) equilibrated with 20 mM phosphate buffer, 0.4 M NaCl, and 0.1 mM EDTA, pH 7.4 to prevent nonspecific binding. Bound AT was step-eluted in the same buffer containing 2 M NaCl, and concentrated by anion exchange chromatography using a resource Q 1 mL (GE) [30]. K_d were estimated by monitoring AT intrinsic fluorescence enhancement upon heparin binding as previously described [30].

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the DE-ACE method

ACE in dynamic equilibrium (DE-ACE) has been successfully applied in the past to evaluate AT-heparin binding constants. However, in all the previously reported studies, the analyzed antithrombins were purified AT, issued from human plasma. The analysis of recombinant antithrombins, directly from the cell culture supernatant used to produce them, represents a new challenge. Indeed, the different compounds present in the cell culture medium, as well as the low quantity of the produced AT variants, are additional issues requiring the adaptation of already optimized DE-ACE methods. Furthermore, with the aim to screen many future AT variants produced by directed mutagenesis, the method to be developed had to be fast. We chose to adapt Le Saux and Gotti's works to reach this goal. In each of these works, the detected entity was the AT protein, and heparin, added at different concentrations in the BGE, played the role of the ligand. Under these conditions, the electrophoretic mobility of the AT receptor was correlated to the heparin concentration, allowing the binding constant determination. We proceeded in the same way owing to the low available quantity of AT variants. A sodium phosphate buffer at pH around 7.4 was systematically employed to mimic physiological conditions. Le Saux et al. worked with a bare-silica capillary, while Gotti et al. employed a PVA coated one. In our case, to minimize the adsorption of not only recombinant AT but also the molecules present in the sample matrix and heparin onto the capillary inner wall, the use of a neutral coating, like polyethylene oxide (PEO), would have been a good option. However, this kind of neutral coating was not compatible with a screening method, since it dramatically increased the analysis time due to a too low or negligible μ_{EOF} . We therefore selected a non-coated capillary. First attempts to reproduce the method reported by Le Saux failed to obtain good repeatabilities and accuracies for the measured K_d . In addition, uncertainty associated with the K_d determination was rather high. To increase the DE-ACE performances, it was necessary to minimize as much as possible eventual adsorption of proteins or cell culture components to the capillary wall. We then decided to re-optimize the CE conditions by focusing on buffer ionic strength, sample dilution medium, capillary preconditioning and inter-run rinse protocols.

We first studied the influence of the ionic strength of the sodium phosphate buffer. Two ionic strengths (50 and 100 mM) were compared, and the relative standard deviations (RSDs) of AT electrophoretic mobility and peak area of five consecutive analyses, with or without heparin in the BGE, were calculated. The results were not significantly different for the two ionic strengths, with RSDs of AT μ_{ep} less than 1.48 % and 1.42 % for 50 and 100 mM, respectively, and with RSDs of AT peak areas less than 3.60 % and 4.57 % for 50 and 100 mM, respectively. We then chose a 50 mM ionic strength, in order to minimize the Joule heating effect.

We then studied the influence of the sample medium. Indeed, this medium contains many salts but also various compounds like vitamins, amino acids, and proteins. By consequence, we studied the effect of a dilution of the AT samples in water, and compared it with a dilution in the phosphate buffer. Five consecutive analyses were realized for each kind of dilution. The mean values of the AT peak heights and widths at base were 467.80 and 0.18, respectively, by dilution of the AT supernatant in phosphate buffer, whereas these values were 616.20 and 0.14, respectively, when the dilution was made with water. These results prove that the dilution in water allows a favorable stacking effect, due to an increase of the peak height, particularly interesting because of the very low concentrations of the AT variants expected in the cell culture supernatants.

At this stage, we decided to decrease the analysis time by injecting the AT samples from the short-length of the capillary as proposed by Gotti et al. We investigated the influence of different capillary preconditioning and inter-run rinse protocols on the reproducibility of the analyses. Conventional and more intensive preconditioning protocols were compared. The conventional conditioning consisted in successive flushes (5 min each) with water, 1 N NaOH, 0.1 N NaOH, and water; whereas the intensive one was carried out by successive flushes with methanol/water, water, 1 N NaOH (15 min), 0.1 N NaOH (15 min), water, running buffer, and by introducing an equilibration of the capillary under voltage application (20 kV for 2 h). These preconditionings were only realized once on each new capillary. For each preconditioning method, four inter-run rinse protocols with sodium hydroxide and/or SDS were tested. We observed that the NaOH step was not strictly necessary for the inter-run rinse when an intensive preconditioning (based on a longer NaOH rinse step) was already realized (Table 1). In addition, an intensive preconditioning combined with a 1 mM SDS inter-run rinse gave the best results, with RSDs of 0.92 % and 1.51 % for AT μ_{ep} and peak

areas, respectively. These results confirmed the usefulness of a more intensive capillary preconditioning and introducing a rinse step with 1 mM SDS. Fig. 1 shows the electropherograms of AT at different concentrations of heparin in the BGE. No baseline drift, good peak asymmetry and low RSD of peak migration times indicated that adsorption was not a major issue in these conditions.

Table 1: Comparison of different capillary preconditioning and inter-run rinse protocols. RSD % obtained from five consecutive analyses of recombinant AT with addition of 0.05 μM of heparin in the BGE.

| Inter-run rinses | Conventional | preconditioning | Intensive | preconditioning |
|--|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| | AT | AT | AT | AT |
| | μ_{ep} | RSD % (n=5) | μ_{ep} | RSD % (n=5) |
| | | peak area | | peak area |
| 0.1 N NaOH (3 min) BGE (3 min) | 1.58 | 10.78 | 1.22 | 2.16 |
| 1 mM SDS (3 min) water (3 min) BGE (3 min) | 1.49 | 11.69 | 0.92 | 1.51 |
| 1 mM SDS (3 min) water (3 min) 0.1 N NaOH (3 min) BGE (3 min) | 2.54 | 1.53 | 2.41 | 3.24 |
| 10 mM SDS (3 min) water (5 min) BGE (3 min) | 2.11 | 6.61 | 2.52 | 2.60 |

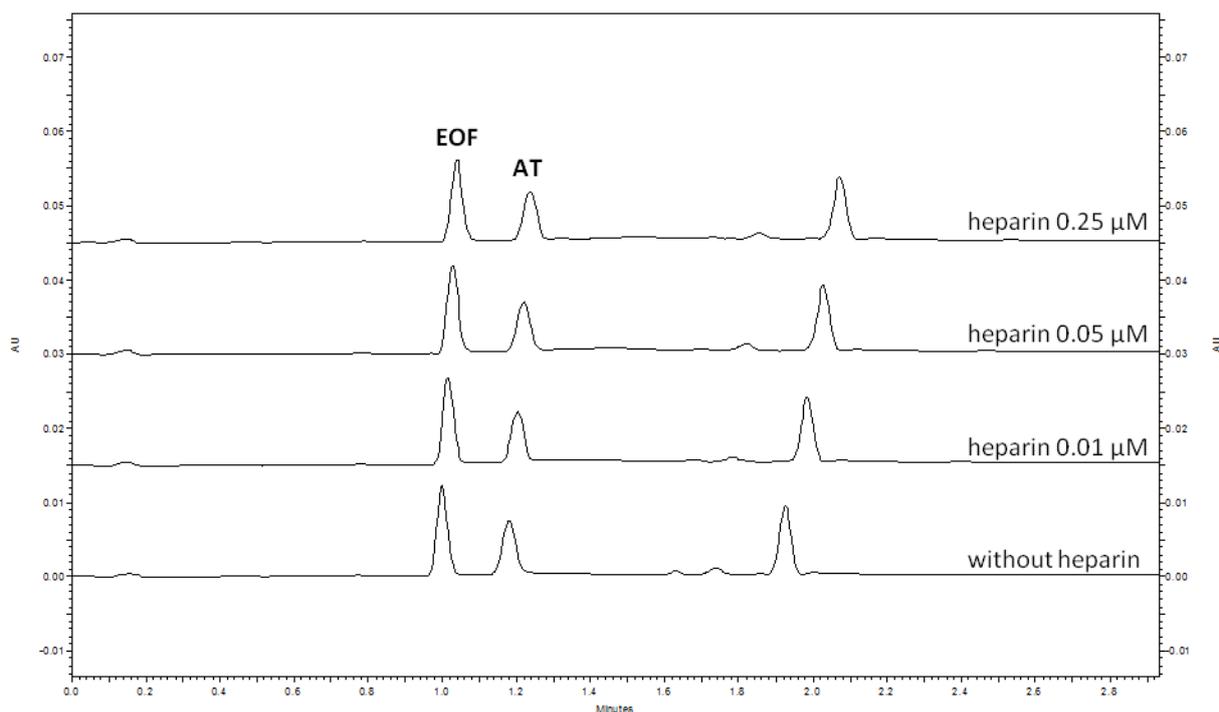


Fig.1. DE-ACE electropherograms of an AT variant at different concentrations of heparin in the BGE. Analytical conditions: bare silica capillary 60.2 cm (L_{eff} 10.2 cm) \times 50 μm I.D., 20 mM ammonium phosphate buffer pH 7.4, applied voltage: -20 kV, detection at 200 nm.

3.2. Determination of binding constants

In the second part of our study, we searched to improve the time required to determine a binding constant. We first performed an estimation of AT-heparin binding constant with a high number of data points (seven concentrations of heparin and three successive analyses for each heparin concentration) (Fig. 2.A.), which allowed to calculate an accurate K_d for a few AT variants already reported in the literature. We then attempted to reduce the number of data points and analyses, while maintaining an accurate determination of the K_d . Further experiments carried out with only two successive analyses for each heparin concentration gave similar results, allowing the determination of an accurate K_d (uncertainty $\leq 12\%$, and regression coefficient ≥ 0.97). We then tried to reduce as much as possible the number of heparin concentrations. Finally, only three concentrations of heparin (0.01, 0.05 and 0.25 μM) and two successive analyses for each heparin concentration were sufficient to calculate an accurate K_d (uncertainty $\leq 22\%$, and regression coefficient ≥ 0.97) (Fig. 2.B.).

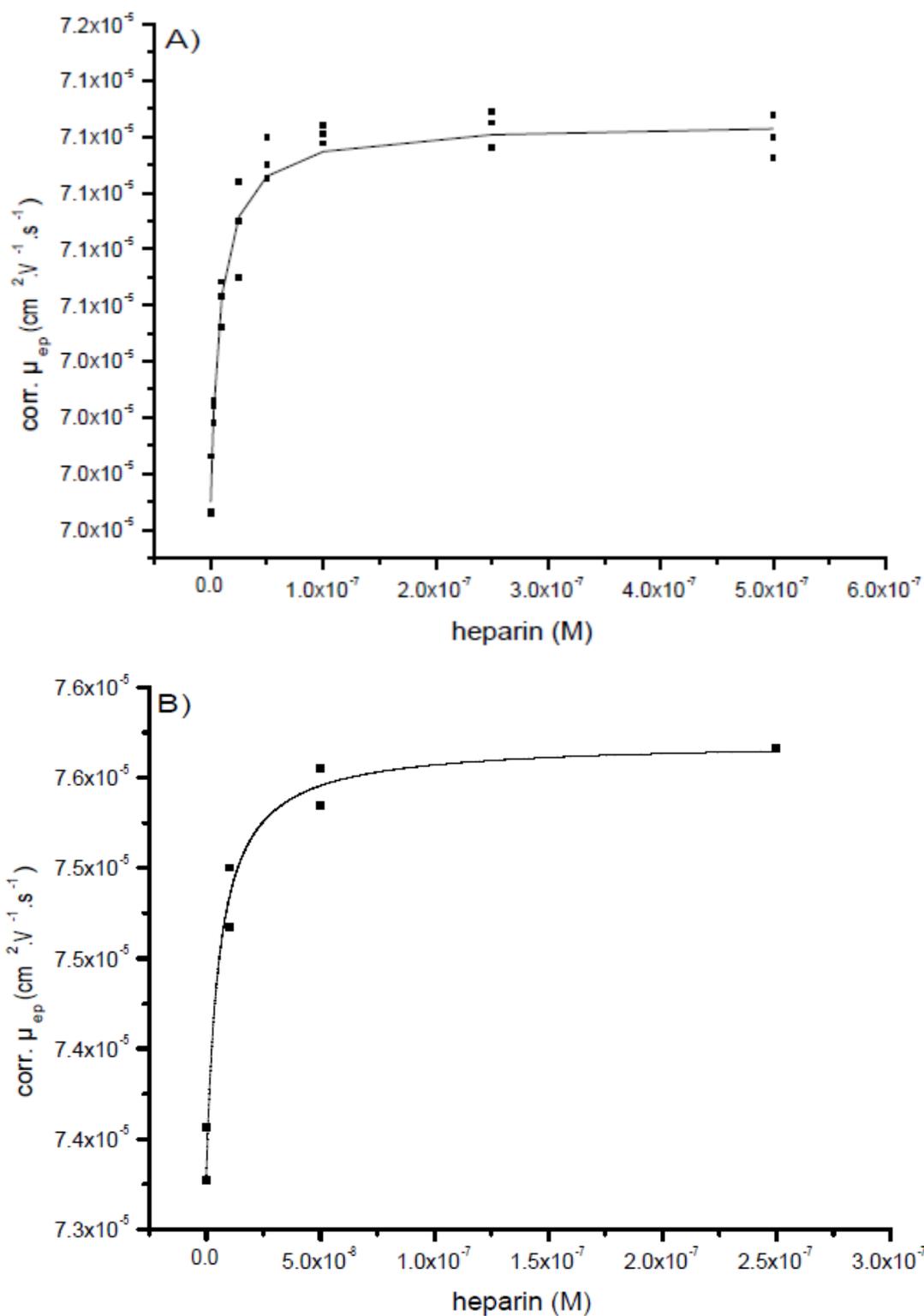


Fig.2. Determination of ATN96Q K_d with A) seven concentrations of heparin: 0.0025, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 μM , and three successive analyses for each heparin concentration; B) with three concentrations of heparin: 0.01, 0.05 and 0.25 μM , and two successive analyses for each heparin concentration. The AT variant concentration is 0.13 μM . The fitting of the curves provided a K_d of 8 nM (uncertainty 9 %, $R^2 = 0.97$) and 7 nM (uncertainty 22 %, $R^2 = 0.97$) for the graphs A) and B), respectively.

To prove the efficiency of the new developed DE-ACE method, we analyzed several AT variants, among which ATWT variant which corresponds to the wild type of recombinant AT produced from HEK cells. K_d for all these variants have been previously evaluated by fluorescence spectroscopy [8,10]. As shown in Table 2, the results obtained with the newly developed method are in very good agreement with literature data. These results are also in good agreement with fluorescence spectroscopy experiments we performed with the ATWT variant for a purpose of comparison (Table 3). However, the precision associated with the K_d determination is a little lower in the case of the DE-ACE method, certainly due to the low number of data points.

Table 2: Dissociation constants (K_d) of several AT variants determined by the developed DE-ACE method, and comparison to values obtained by fluorescence spectroscopy. Error represents $\pm 2\sigma$.

| AT Variant | ACE method K_d (nM) | Fluorescence spectroscopy^a K_d (nM) |
|-------------------|---|--|
| ATWT | 25 ± 6 | 22 ± 2 |
| ATN135Q | 3 ± 1 | 3.1 ± 0.4 |
| ATN155Q | 10^b | 9.8 ± 0.7 |
| ATN96Q | 7 ± 2 | 9.0 ± 1.3 |
| ATN192Q | 7^b | 5.8 ± 0.9 |

^a obtained from literature data [8,10].

^b precision of the measured K_d not determined.

As all the AT variants depicted in Table 2 are variants possessing a high affinity for heparin, we searched to prove the suitability of the DE-ACE method to detect a loss of affinity. Due to the fact that we didn't possess an AT variant with a low affinity for heparin, we chose to analyze an AT conformer. Indeed, like other serpins, the native form of AT is metastable and undergoes conformational changes into more stable conformers, among which a latent form [37]. This latter conformer exhibits a very low affinity for heparin. We then prepared a solution of antithrombin containing a high quantity of latent form (see Section 2). This latent form-enriched preparation was analyzed by native PAGE (Fig. 3), and was found to contain around 70 % of latent form, the remaining fraction corresponding to AT heterodimers, whose affinity for heparin has been reported higher than that of the latent form [34]. As the latent form-enriched preparation was obtained from human AT, we mixed it with cell culture

medium before its analysis by DE-ACE. The K_d obtained for the latent form-enriched preparation was estimated at 100 nM in the concentration range selected for the DE-ACE method. As expected and although investigated concentrations in this case are probably not fully adapted to this low affinity measurement, this K_d value is much lower than that reported in the literature by fluorescence spectroscopy for a pure latent form, which exhibited a K_d of 1200 nM [38]. Indeed, the latent form-enriched preparation contains both latent and heterodimeric forms, and the resulting K_d is likely to be a combination of the affinities of both conformers. In addition, the K_d obtained for the latent form-enriched preparation corresponds to a loss of affinity of 75 %, by comparison with the ATWT variant. This result is in good agreement with the quantity of latent form estimated in the preparation by native PAGE (70 %).

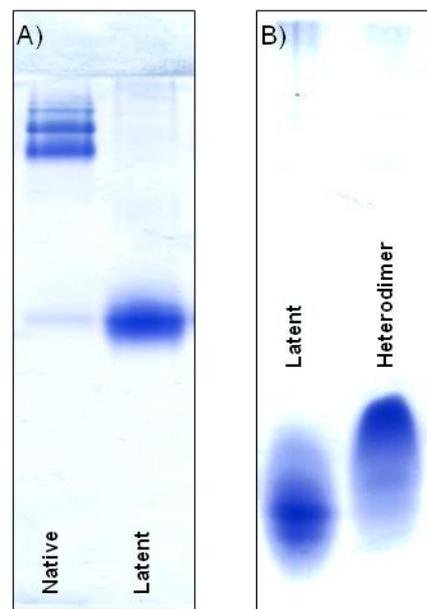


Fig.3. Analyses of different AT conformers by PAGE: A) with urea (urea PAGE), B) without urea (native PAGE).

Finally, we applied the developed DE-ACE method to the characterization of one new AT variant, whose K_d toward heparin has not been reported yet. In this variant, asparagine 135 has been mutated to glutamine to block glycosylation at this site, and to thereby increase the affinity for heparin, whereas a proline has been inserted between arginine 393 and serine 394, to hinder the cleavage of the protein, and to thereby abolish its anticoagulant effect [30]. Our objective was double: firstly, the determination of the K_d of this newly produced AT variant, secondly the application of the new DE-ACE method to another kind of cell culture medium. Indeed, the type of cell, the type of culture, the transfection mode, and the cell culture

medium used to produce this new variant were different from that employed to produce the variants used for the validation of the method. In parallel, the K_d of this variant was also determined by fluorescence spectroscopy, which was performed after intensive purification steps. As illustrated in Table 3, the K_d obtained with both methods indicates a high affinity of this variant for heparin, which is in good agreement with the mutations performed. By comparison with the ATWT variant, the affinity has been increased by a factor of 3.1 and 2.6, as determined by the DE-ACE method and fluorescence spectroscopy, respectively. However, the DE-ACE method offers several advantages. First, the analysis of recombinant AT, directly from cell culture supernatants, is not possible with fluorescence spectroscopy. Indeed, fluorescence spectroscopy must be performed on purified proteins, which is highly time consuming (several days) in the case of AT. Secondly, the determination of a K_d by DE-ACE requires a much lower quantity of AT sample (hundred-fold less) than that required in fluorescence spectroscopy.

Table 3: Experimental comparison of the DE-ACE and fluorescence spectroscopy methods to evaluate the dissociation constants (K_d) of ATWT and ATN135Q-Pro394 variants. Error represents $\pm 2\sigma$. Gain of affinity of ATN135Q-Pro394 compared to ATWT.

| | ACE method | Experimental Fluorescence spectroscopy |
|----------------------------|--------------------|--|
| AT purification | No | Yes (several days) |
| Sample consumption | $\leq \mu\text{g}$ | $\sim 100 \mu\text{g}$ |
| Analysis time ^a | 2 h | 30 min |
| K_d ATWT (nM) | 25 ± 6 | 18 ± 5 |
| K_d ATN135Q-Pro394 (nM) | 8^b | 7 ± 1 |
| Gain of affinity | 3.1 | 2.6 |

^a global time necessary for one K_d measurement.

^b precision of the measured K_d not determined.

4. Conclusion

By optimizing several relevant CE parameters, we have developed a dynamic equilibrium-affinity capillary electrophoresis (DE-ACE) method, which allows an accurate estimation of the binding constant (K_d) of an AT variant toward heparin in less than two hours. In addition, the AT variants can be analyzed directly from the cell culture supernatant used to produce them, whatever its composition. This method is therefore compatible with a low throughput screening to compare the binding affinity of newly produced AT variants. The DE-ACE method was validated by analyzing five AT variants, whose K_d have been reported in the literature using fluorescence spectroscopy. The DE-ACE method was also applied to estimate the K_d of one new AT variant and also one AT conformer, a latent form, that exhibits a significant loss of affinity. Although the DE-ACE and fluorescence spectroscopy methods gave similar results, only the DE-ACE method is capable of analyzing recombinant AT directly in cell culture media. By consequence, it is undoubtedly a method of choice to quickly quantify the affinity between non purified recombinant AT and heparin.

Acknowledgments

This work and the PhD fellowship of A.L. Marie were supported by the French National Agency of Research (ANR2011-RPIB N°01803, THERAT project). The authors are grateful to Allan De Carvalho for his excellent technician support.

The authors declared conflict of interest with LFB Biotechnologies.

References

- [1] L. Jin, J.P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R.N. Pike, R.W. Carrell, The anticoagulant activation of antithrombin by heparin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 14683-14688.
- [2] E. Ersdal-Badju, A. Lu, Y. Zuo, V. Picard, S.C. Bock, Identification of the antithrombin III heparin binding site, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19393-19400.
- [3] H. Larsson, P. Akerud, K. Nordling, E. Raub-Segall, L. Claesson-Welsh, I. Björk, A novel anti-angiogenic form of antithrombin with retained proteinase binding ability and heparin affinity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11996-12002.
- [4] S.M Raja, N. Chhablani, R. Swanson, E. Thompson, M. Laffan, D.A. Lane, S.T. Olson, Deletion of P1 arginine in a novel antithrombin variant (antithrombin London) abolishes inhibitory activity but enhances heparin affinity and is associated with early onset thrombosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13688-13695.

- [5] D.J.D. Johnson, J.A. Huntington, Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state, *Biochemistry* 42 (2003) 8712-8719.
- [6] R.D. Rosenberg, G.M. Oosta, R.E. Jordan, W.T. Gardner, The interaction of heparin with thrombin and antithrombin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 (1980) 1200-1208.
- [7] C.B. Peterson, M.N. Blackburn, Isolation and characterization of an antithrombin III variant with reduced carbohydrate content and enhanced heparin binding, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 610-615.
- [8] I. Björk, K. Ylinenjärvi, S.T. Olson, P. Hermentin, H.S. Conradt, G. Zettlmeissl, Decreased affinity of recombinant antithrombin for heparin due to increased glycosylation, *Biochem. J.* 286 (1992) 793-800.
- [9] S.T. Olson, I. Björk, R. Sheffer, P.A. Craig, J.D. Shore, J. Choay, Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12528-12538.
- [10] S.T. Olson, A.M. Frances-Chmura, R. Swanson, I. Björk, G. Zettlmeissl, Effect of individual carbohydrate chains of recombinant antithrombin on heparin affinity and on the generation of glycoforms differing in heparin affinity, *Arch. Biochem. Biophys.* 341 (1997) 212-221.
- [11] U.R. Desai, M. Petitou, I. Björk, S.T. Olson, Mechanism of heparin activation of antithrombin: Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7478-7487.
- [12] S. DeLauder, F.P. Schwarz, J.C. Williams Sr., D.H. Atha, Thermodynamic analysis of heparin binding to human antithrombin, *Biochim. Biophys. Acta* 1159 (1992) 141-149.
- [13] R. Tyler-Cross, M. Sobel, D. Marques, R.B. Harris, Heparin binding domain peptides of antithrombin III: analysis by isothermal titration calorimetry and circular dichroism spectroscopy, *Protein Sci.* 3 (1994) 620-627.
- [14] R. Tyler-Cross, M. Sobel, L.E. McAdory, R.B. Harris, Structure-function relations of antithrombin III-heparin interactions as assessed by biophysical and biological assays and molecular modeling of peptide-pentasaccharide-docked complexes, *Arch. Biochem. Biophys.* 334 (1996) 206-213.
- [15] B. Mille, J. Watton, T.W. Barrowcliffe, J.C. Mani, D.A. Lane, Role of N- and C-terminal amino acids in antithrombin binding to pentasaccharide, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 29435-29443.
- [16] R.I.W. Osmond, W.C. Kett, S.E. Skett, D.R. Coombe, Protein-heparin interactions measured by Biacore 2000 are affected by the method of heparin immobilization, *Anal. Biochem.* 310 (2002) 199-207.

- [17] N. Mirow, B. Zimmermann, A. Maleszka, H. Knobl, G. Tenderich, R. Koerfer, F.W. Herberg, Plasma protein binding properties to immobilized heparin and heparin-albumin conjugate, *Artif. Organs* 31 (2007) 466-471.
- [18] U. Lindahl, L. Thunberg, G. Bäckström, J. Riesenfeld, K. Nordling, I. Björk, Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 12368-12376.
- [19] A. Heger, T. Grunert, P. Schulz, D. Josic, A. Buchacher, Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography, *Thromb. Res.* 106 (2002) 157-164.
- [20] G. Karlsson, S. Winge, Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 339-345.
- [21] R.M. Guijt-van Duijn, J. Frank, G.W.K. van Dedem, E. Baltussen, Recent advances in affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 21 (2000) 3905-3918.
- [22] X. He, Y. Ding, D. Li, B. Lin, Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 25 (2004) 697-711.
- [23] C. Jiang, D.W. Armstrong, Use of CE for the determination of binding constants, *Electrophoresis* 31 (2010) 17-27.
- [24] J. Zavaleta, D. Chinchilla, A. Brown, A. Ramirez, V. Calderon, T. Sogomonyan, F.A. Gomez, Recent developments in affinity capillary electrophoresis: a review, *Curr. Anal. Chem.* 2 (2006) 1-8.
- [25] S.N. Krylov, Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM): a novel method for biomolecular screening, *J. Biomol. Screen.* 11 (2006) 115-122.
- [26] K. Gunnarsson, L. Valtcheva, S. Hjertén, Capillary zone electrophoresis for the study of the binding of antithrombin to low-affinity heparin, *Glycoconj. J.* 14 (1997) 859-862.
- [27] T. Le Saux, A. Varenne, F. Perreau, L. Siret, S. Duteil, L. Duhau, P. Gareil, Determination of the binding parameters for antithrombin-heparin fragment systems by affinity and frontal analysis continuous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 289-296.
- [28] R. Gotti, B. Parma, F. Spelta, L. Liverani, Affinity capillary electrophoresis in binding study of antithrombin to heparin from different sources, *Talanta* 105 (2013) 366-371.
- [29] M.M. Dinges, K. Solakyildirim, C.K. Larive, Affinity capillary electrophoresis for the determination of binding affinities for low molecular weight heparins and antithrombin III, *Electrophoresis* 35 (2014) 1469-1477.

- [30] E.P. Bianchini, J. Fazavana, V. Picard, D. Borgel, Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives, *Blood* 117 (2011) 2054-2060.
- [31] G. Karlsson, S. Winge, Preparative conversion of native human antithrombin to the latent form, *Protein Expr. Purif.* 26 (2002) 106-110.
- [32] N.J. Beauchamp, R.N. Pike, M. Daly, L. Butler, M. Makris, T.R. Dafforn, A. Zhou, H.L. Fitton, F.E. Preston, I.R. Peake, R.W. Carrell, Antithrombins wobble and wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation, *Blood* 92 (1998) 2696-2706.
- [33] J. Corral, J.A. Huntington, R. González-Conejero, A. Mushunje, M. Navarro, P. Marco, V. Vicente, R.W. Carrell, Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 931-939.
- [34] A. Zhou, J.A. Huntington, R.W. Carrell, Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis, *Blood* 94 (1999) 3388-3396.
- [35] Y. Tanaka, S. Terabe, Estimation of binding constants by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B* 768 (2002) 81-92.
- [36] N.T. Tran, M. Taverna, L. Miccoli, J.F. Angulo, Poly(ethylene oxide) facilitates the characterization of an affinity between strongly basic proteins with DNA by affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 26 (2005) 3105-3112.
- [37] A. Mushunje, G. Evans, S.O. Brennan, R.W. Carrell, A. Zhou, Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004), 2170-2177.
- [38] S. Schedin-Weiss, B. Richard, S.T. Olson, Kinetic evidence that allosteric activation of antithrombin by heparin is mediated by two sequential conformational changes, *Arch. Biochem. Biophys.* 504 (2010) 169-176.

III.C. Etudes complémentaires : détermination de constantes d'affinité de différents variants de l'AT

La méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) décrite dans l'article précédent a été utilisée pour déterminer la constante d'affinité (K_d) de quinze variants d'AT produits par génie génétique dans le cadre du projet THERAT. Pour des raisons de confidentialité, la nature des mutations réalisées ne peut être révélée, excepté pour le variant ATN135Q déjà décrit dans la littérature. Ainsi, chaque mutant est désigné par un numéro tandis que la forme non-mutée (wild type) est nommée ATWT. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 7 page suivante. Par comparaison à l'ATWT, le variant d'AT de référence, la plupart des variants d'AT analysés avec la méthode ACE montrent une plus grande affinité pour l'héparine, ce qui était l'objectif des mutations réalisées. Certains sont même très affins, avec des K_d très bas de l'ordre de 2 nM (variants 1, 7 et 11). Sur les quinze variants analysés, seulement deux ont une affinité plus faible pour l'héparine comparativement à l'ATWT, avec des K_d beaucoup plus élevés.

Dans le cadre du projet THERAT, une méthode ELISA (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ») a été développée par le laboratoire UMR-INSERM 1176, dirigé par le Professeur Delphine Borgel, pour déterminer le gain ou la perte d'affinité des variants d'AT synthétisés comparativement à l'ATWT. Dans cette méthode ELISA, qui n'est pas encore publiée, de l'héparine biotinylée en quantité saturante est incubée avec de la streptavidine immobilisée sur une plaque. Puis les milieux de culture contenant les variants à tester sont incubés, et l'AT fixée à l'héparine est détectée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-AT marqué à la peroxydase et révélé grâce à un substrat coloré.

Tableau 7 : Détermination par ACE ou ELISA de la constante d'affinité ou du gain d'affinité (% par rapport à l'ATWT) de variants d'AT synthétisés dans le cadre du projet THERAT. En rouge sont indiquées les valeurs pour lesquelles les deux méthodes ne sont pas cohérentes.

| Variant d'AT | Méthode ACE K _d (nM) | Méthode ACE gain d'affinité (%) / ATWT | Méthode ELISA gain d'affinité (%) / ATWT |
|--------------|------------------------------------|---|---|
| 1 | 2 ± 0.4 | 1150 | 460 |
| 2 | 17 ± 4 | 47 | 300 |
| 3 | 7 ± 0.5 | 257 | 205 |
| 4 | 31 ± 6 | -19 | 203 |
| 5 | 21 ± 3 | 19 | 221 |
| 6 | 53 ± 15 | -53 | 259 |
| 7 | 2 ± 0.3 | 1150 | 237 |
| 8 | 4 ± 0.9 | 525 | 212 |
| 9 | 8 ± 2 | 213 | 255 |
| 10 | 2 ± 0.3 | 1150 | 10 |
| 11 | 2 ± 0.2 | 1150 | 200 |
| 12 | 76 ± 19 | -67 | 201 |
| 13 | 4 ± 0.8 | 525 | 225 |
| 14 | 26 ± 5 | -4 | 500 |
| 15 | 10 ± 3 | 150 | 323 |
| ATWT* | 25 ± 6 | - | - |
| ATN135Q* | 3 ± 1 | 733 | 228 |

*Voir article section III.B.

La méthode ELISA développée a permis d'avoir une méthode complémentaire à celle de l'ACE, et d'analyser plus de variants sur un temps plus court. Cette méthode ELISA ne permet pas de déterminer un K_d mais donne le pourcentage de gain ou de perte d'affinité d'un variant donné par rapport à l'ATWT. Nous avons donc comparé les résultats obtenus avec les deux méthodes. Comme le montre le tableau 7, les résultats obtenus pour un très grand nombre de variants sont cohérents entre les deux méthodes. Par exemple, la méthode ACE montre que le variant n°1 est l'un des variants les plus affins, et la méthode ELISA montre que c'est l'un des variants qui a le plus gagné en affinité. Par contre, il y a des incohérences entre les deux méthodes pour quatre des variants analysés. En effet, pour les variants 6, 12 et 14, la méthode ACE montre une perte d'affinité ou une affinité identique à celle de l'ATWT,

alors que la méthode ELISA montre un gain d'affinité. Pour le variant n°10, la méthode ACE montre une augmentation importante de l'affinité alors que la méthode ELISA ne détecte aucun gain d'activité. Il ne semble pas anormal d'avoir des discordances entre les deux méthodes étant donné que leur principe est très différent et que chacune d'elles présente des avantages et des inconvénients. L'avantage de la méthode ACE est que l'héparine est libre en solution et donc que les interactions avec l'AT ne sont pas gênées. De plus, l'AT étant séparée lors de la mesure d'affinité, il est peu probable qu'elle interagisse avec les constituants du milieu de culture cellulaire qui vont migrer dans d'autres zones du capillaire et ainsi ne vont pas perturber l'affinité AT/héparine. A l'inverse, dans la méthode ELISA, l'héparine biotinylée est immobilisée sur un support et donc soumise à des contraintes stériques, qui entravent la flexibilité conformationnelle du polysaccharide nécessaire à la formation d'un complexe AT/héparine stable. Un autre avantage de la méthode ACE est que les mesures d'affinité entre l'AT et l'héparine se font directement sans avoir besoin d'un intermédiaire, tel que l'anticorps utilisé dans la méthode ELISA. Or cet anticorps ajoute un facteur d'erreur supplémentaire puisque la mesure d'affinité va également dépendre de l'interaction entre l'AT et l'anticorps. La méthode ELISA présente cependant des avantages, notamment sa capacité de criblage élevé.

III.D. Exploration d'une méthode TDA pour l'étude de l'affinité

III.D.1. Principe de la TDA

L'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) est une méthode basée sur les travaux précurseurs de Taylor et Aris. Elle permet de déterminer le coefficient de diffusion moléculaire (D) et par conséquent le rayon hydrodynamique d'une molécule. Cette méthode consiste à analyser un élargissement de pic d'une zone de soluté dans un flux laminaire de Poiseuille (Alizadeh 1980, Taylor 1953). Théoriquement, elle peut être appliquée à des solutés de toutes tailles, de l'angström au micromètre. Cette technique a tout d'abord été appliquée à la détermination de coefficients de diffusion de molécules à l'état gazeux, et c'est par la suite qu'on l'a appliquée à des molécules à l'état liquide.

La dispersion de Taylor résulte de la combinaison d'un profil de vitesse parabolique dispersif avec la diffusion moléculaire, qui redistribue les molécules dans la section efficace du capillaire (Cottet 2014). Cette combinaison engendre un gradient de concentration (Fig. 60).

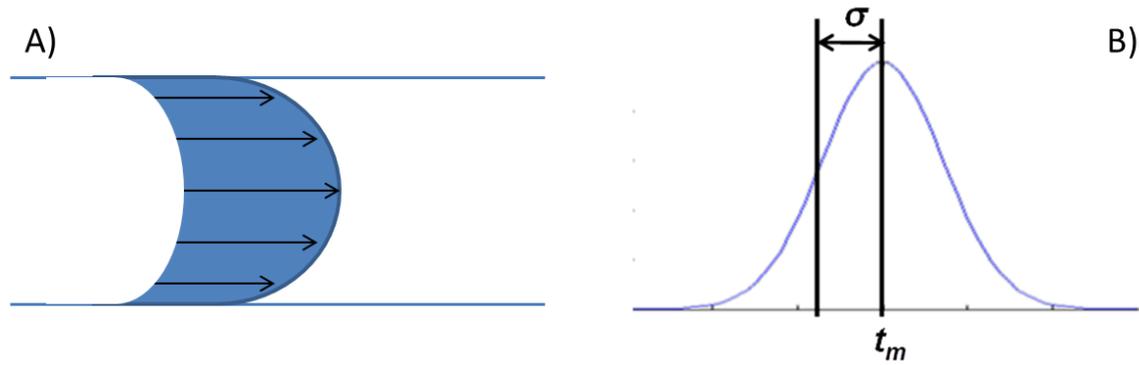


Figure 60 : Représentation schématique de la dispersion de Taylor. A) Profil de vitesse parabolique dispersif d'un analyte dans un flux laminaire de Poiseuille. B) Représentation Gaussienne du gradient de concentration d'un analyte (σ représente l'écart type temporel du pic).

L'élargissement de bande résultant de la dispersion de Taylor est facilement quantifiable à l'aide de la variance temporelle σ^2 du profil d'élution, qui est généralement calculée en lissant le pic d'élution par une fonction Gaussienne. Le coefficient de diffusion de la molécule (D) est déterminé à l'aide de l'équation 32 de Taylor-Aris, qui montre que σ^2 est inversement proportionnelle à D (Aris 1956). Le calcul du coefficient de diffusion permet alors de déterminer le rayon hydrodynamique de la molécule (R_h) selon l'équation 33 de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{R_c^2 t_d}{24\sigma^2} \quad (32)$$

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (33)$$

avec R_c le rayon du capillaire (m), t_d le temps d'élution moyen (s), σ^2 la variance temporelle du pic (s^2), k_B la constante de Boltzmann, T la température (K) et η la viscosité du liquide porteur (Pa.s).

Cependant, l'équation 32 n'est valide que lorsque le temps d'apparition du pic t_d est plus grand que le temps de diffusion caractéristique sur une distance égale au rayon du capillaire, en satisfaisant les conditions de l'équation 34 (Cottet 2014, Taylor 1954). De plus, la diffusion axiale doit être négligeable comparée à la convection, en satisfaisant les conditions de l'équation 35, où Pe est le nombre de Peclet, qui représente le rapport entre le transfert par convection et le transfert par diffusion (Chamieh 2014, Taylor 1954).

$$\tau = \frac{Dt_d}{R_c^2} > 1.4 \quad (34)$$

où τ est un temps caractéristique sans dimension.

$$P_e = \frac{uR_c}{D} > 69 \quad (35)$$

avec u la vitesse de la phase mobile linéaire (m.s^{-1}).

III.D.2. Application de la TDA à l'AT

Afin de calculer la constante d'affinité de l'AT vis-à-vis de l'héparine par TDA, nous avons entrepris quelques études préliminaires. Ces études ont été réalisées par CE. Une 1^{ère} série d'expériences a consisté à injecter une solution contenant de l'AT dans un capillaire, puis à appliquer une pression hydrodynamique avec un liquide porteur afin d'éluer l'AT et détecter le pic correspondant. Une 2^{ème} série d'expériences a consisté à injecter dans le capillaire une solution contenant de l'AT et de l'héparine mélangés en quantité équimolaire, puis à répéter la même procédure. Pour chaque série d'expériences, dix analyses successives ont été réalisées. Le liquide porteur utilisé a été un tampon phosphate de sodium 20 mM à pH 7,4. Les analyses ont été réalisées avec une préparation d'AT commerciale (Acloine[®]) que nous avons diluée dans le tampon phosphate à la concentration désirée. La préparation commerciale d'AT contenant des excipients (glycine et NaCl), il nous a fallu ajouter dans le tampon d'analyse des quantités d'excipients équivalentes à celles présentes dans la solution d'AT injectée, afin que cette solution et le tampon porteur soient de composition identique. En effet, cette condition est strictement nécessaire si l'on veut obtenir un pic gaussien. Pour l'analyse du mélange AT/héparine nous avons procédé de la même façon. Dans ce cas, de l'héparine a été également ajoutée dans le tampon porteur. N'ayant pu obtenir d'informations précises sur les excipients contenus dans l'héparine commerciale utilisée, nous n'avons pas ajouté dans le tampon les excipients contenus dans la solution d'héparine. La viscosité des tampons utilisés dans les deux séries d'expériences a été déterminée expérimentalement par CE en utilisant la loi de Poiseuille. Le protocole expérimental de ces expériences est décrit de façon détaillée en Annexe 2.

Ces études préliminaires ont permis de calculer le rayon hydrodynamique (R_h) de l'AT ainsi que son coefficient de diffusion (D) dans les conditions analytiques utilisées. Ces études ont permis également de déterminer le rayon hydrodynamique et le coefficient de diffusion de l'AT complexée à l'héparine. Le tableau 8 présente les résultats obtenus. Comme attendu, le R_h du complexe AT/héparine (4.35 ± 0.05 nm) est légèrement supérieur à celui de l'AT libre (3.42 ± 0.03 nm), alors que son coefficient de diffusion est inférieur.

Tableau 8 : Détermination par analyse TDA du rayon hydrodynamique (R_h) et du coefficient de diffusion (D) de l'AT libre ou complexée à l'héparine.

| Analyse | AT sans héparine | | AT avec héparine | |
|-------------------|---|-------------|---|-------------|
| | D ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) $\times 10^{11}$ | R_h (nm) | D ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) $\times 10^{11}$ | R_h (nm) |
| 1 | 7.18 | 3.38 | 5.42 | 4.40 |
| 2 | 6.95 | 3.49 | 5.43 | 4.39 |
| 3 | 7.11 | 3.41 | 5.37 | 4.44 |
| 4 | 7.05 | 3.44 | 5.46 | 4.37 |
| 5 | 7.06 | 3.44 | 5.54 | 4.30 |
| 6 | 7.08 | 3.43 | 5.53 | 4.31 |
| 7 | 7.14 | 3.40 | 5.52 | 4.32 |
| 8 | 7.09 | 3.43 | 5.55 | 4.29 |
| 9 | 7.16 | 3.39 | 5.51 | 4.33 |
| 10 | 7.06 | 3.44 | 5.53 | 4.31 |
| Moyenne | 7.09 | 3.42 | 5.49 | 4.35 |
| Ecart type | 0.07 | 0.03 | 0.06 | 0.05 |
| RSD % | 0.93 | 0.94 | 1.12 | 1.13 |

La figure 61 page suivante présente une superposition des pics obtenus par analyse TDA de l'AT injectée seule ou en mélange avec de l'héparine. Le pic correspondant au complexe AT/héparine présente une largeur à la base légèrement supérieure à celle du pic de l'AT seule.

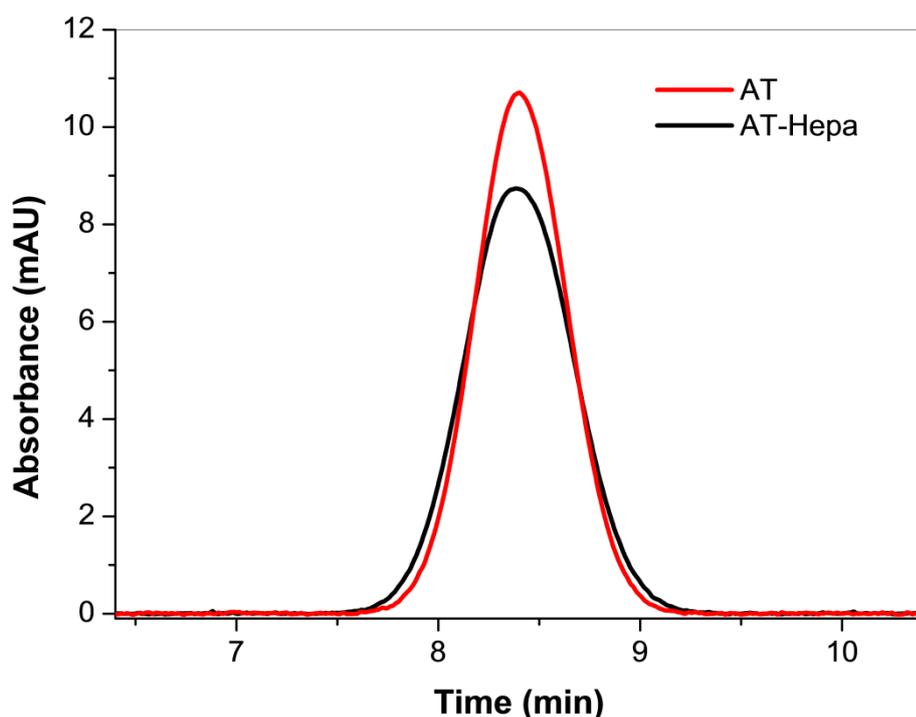


Figure 61 : Taylorgrammes obtenus par analyse d'une solution d'AT et d'un mélange équimolaire AT/héparine.

Ainsi, cette étude préliminaire a permis de montrer qu'en principe la TDA pourrait constituer une alternative intéressante à l'ACE afin de déterminer une constante d'affinité entre l'AT et l'héparine. La détermination de cette constante nécessite de réaliser des analyses avec au moins dix concentrations différentes d'héparine pour une même concentration d'AT. De plus, chaque analyse doit être répétée plusieurs fois. Nous n'avons pas pu, par manque de temps, terminer ces études. Voici néanmoins l'équation que nous aurions utilisée pour calculer la constante d'association K (Jensen 2010) :

$$\frac{t_R}{\sigma^2} = \frac{\frac{t_R}{\sigma_A^2} + \frac{t_R}{\sigma_{AL}^2} K[L]}{1 + K[L]} \quad (36)$$

avec t_R le temps d'apparition du pic de l'analyte libre ou complexé, σ_A^2 la variance temporelle du pic de l'analyte libre, σ_{AL}^2 la variance temporelle du pic du complexe analyte/ligand, et L la concentration en ligand libre.

III.E. Conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé une méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité qui permet de déterminer une constante d'association entre un variant d'AT et l'héparine en seulement deux heures d'analyse. Cette méthode a été appliquée à l'analyse d'une quinzaine de variants d'AT nouvellement synthétisés dans le cadre du projet THERAT. Cela a permis de montrer que certains variants avaient gagné considérablement en affinité comparativement au variant wild type de référence, ce qui était l'objectif des mutations réalisées.

Comparativement à la spectrofluorimétrie, qui est la technique classiquement utilisée pour étudier l'affinité entre l'AT et l'héparine, la méthode ACE développée présente différents avantages. Tout d'abord, elle permet d'analyser les variants d'AT directement à partir des surnageants de culture cellulaire utilisés pour les produire, alors que la spectrofluorimétrie ne permet pas d'analyser des protéines non-purifiées. Ainsi, l'analyse des variants d'AT par spectrofluorimétrie aurait nécessité de longues heures de purification sur de larges volumes de milieux de culture. La méthode ACE développée présente également l'avantage d'être très peu consommatrice d'échantillon protéique, contrairement à la spectrofluorimétrie qui nécessite des quantités cent fois plus élevées.

Nous aurions pu développer une méthode basée sur la résonance plasmonique de surface (SPR). En effet, la SPR a déjà été utilisée par le passé pour étudier les interactions entre l'AT et l'héparine. Celle-ci aurait permis, tout comme l'ACE, d'analyser les variants d'AT directement à partir des surnageants de culture cellulaire, avec une faible consommation d'échantillon protéique. Cependant, la SPR nécessite d'immobiliser l'héparine sur un support, ce qui entrave la flexibilité conformationnelle du polysaccharide indispensable à la formation d'un complexe AT/héparine stable. Dans le cadre du projet THERAT, l'équipe du Professeur Borgel a développé une méthode ELISA qui présente l'avantage de pouvoir cribler un grand nombre de variants d'AT en un temps très court. Cependant, cette méthode présente le même inconvénient que la SPR, c'est-à-dire la nécessité d'immobiliser l'héparine sur un support fixe. Comparativement à la SPR et l'ELISA, la méthode ACE développée possède donc l'avantage considérable de préserver la flexibilité conformationnelle de chaque partenaire. Son inconvénient majeur dans le cadre du projet THERAT a été lié au fait qu'elle ne permettait pas de faire du criblage haut débit.

Dans le cadre de cette étude d'affinité entre l'AT et l'héparine, nous avons cherché à explorer les possibilités d'une méthode plus nouvelle basée sur l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA). En effet, la TDA permet, tout comme l'ACE, d'analyser l'AT et l'héparine en solution, sans avoir besoin de fixer le ligand sur un support. La TDA est une technique relativement peu exploitée et aucune méthode TDA n'a encore été décrite dans la littérature pour analyser l'affinité entre l'AT et l'héparine. Nous avons commencé quelques travaux préliminaires avec de l'AT plasmatique, qui ont montré une augmentation du rayon hydrodynamique de l'AT par association à l'héparine. Ces résultats sont très encourageants et nous aimerions poursuivre les expériences afin de déterminer une constante d'association entre l'AT plasmatique et l'héparine. Il faut cependant préciser que la méthode TDA développée serait difficilement applicable à l'analyse de variants d'AT directement à partir des surnageants de culture cellulaire. En effet, comme nous l'avons expliqué, une analyse TDA nécessite que l'échantillon injecté et le liquide porteur soient de composition strictement identique. Or, nous ne maîtrisons ni la nature ni la concentration des nombreuses molécules présentes dans les milieux de culture.

Chapitre 4 : Développement de méthodes CE pour évaluer la qualité de préparations commerciales de protéines thérapeutiques issues du fractionnement plasmatique

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2, les protéines thérapeutiques peuvent subir, au cours de leur fabrication et leur stockage, diverses modifications chimiques ou physiques susceptibles d'affecter leurs fonctions pharmacologiques, voire induire une certaine immunogénicité ou encore provoquer une perte partielle ou totale de leur efficacité. Des techniques analytiques spécifiques doivent donc être développées afin de vérifier la qualité du produit fini. Généralement, une méthode unique ne suffit pas et il faut avoir recours à différentes méthodes complémentaires, chacune apportant une information différente.

Durant ce travail de thèse, nous avons été amenés à développer des méthodes analytiques afin d'évaluer la qualité de préparations commerciales d'albumine et d'antithrombine thérapeutiques issues du fractionnement plasmatique. La qualité de ces préparations dépend non seulement des procédés de fabrication utilisés mais également du profil des donneurs de sang, étant donné que le fractionnement plasmatique est réalisé à partir d'un pool de plasma constitué de plusieurs milliers de dons de sang. Par exemple, dans le cas de l'albumine, il a été montré que les sujets diabétiques présentaient un taux élevé de formes glyquées (Guerin-Dubourg 2012) et que les maladies du foie s'accompagnaient d'une quantité élevée de formes oxydées de l'albumine (Colombo 2012, Oetl 2010). Parmi les techniques analytiques existantes, notre choix s'est porté sur l'électrophorèse capillaire pour différentes raisons. Tout d'abord, comparativement aux méthodes chromatographiques (RP-HPLC, IEXC ou SEC), la CE offre différents avantages comme le fait de ne pas utiliser de solvants dénaturants et de pouvoir travailler dans des conditions analytiques proches des conditions physiologiques. Bien qu'ayant acquis récemment un spectromètre de masse au laboratoire, nous n'avons pas cherché à développer une méthode uniquement basée sur la MS car ce n'est pas une technique simple à mettre en place. De plus, la MS n'est pas une méthode séparative et reste une méthode semi-quantitative (l'intensité d'une forme détectée étant dépendante de sa capacité à s'ioniser). Comparativement aux méthodes électrophorétiques conventionnelles (IEF, SDS-PAGE ou PAGE natif), la CE est une méthode beaucoup plus résolutive et qui peut être reproductible si un certain nombre de précautions ont été prises lors du développement de la méthode pour limiter, par exemple, l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire de

silice vierge. Un autre avantage est qu'elle permet de quantifier de manière précise les formes détectées. Parmi les différents modes CE, il nous a semblé judicieux de choisir le mode CZE. En effet, ce mode est relativement simple et permet de séparer des formes très proches. Par ailleurs, des travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur l'albumine thérapeutique avaient montré le potentiel de la CZE à séparer de nombreuses formes apparentées de la protéine. Enfin, nous souhaitons pouvoir coupler ultérieurement notre méthode CE à la MS afin d'obtenir des informations complémentaires, et le mode CZE est particulièrement adapté dans ce cas. Les méthodes CZE développées pour l'HSA et l'AT ont conduit à deux articles.

Le premier article, consacré à l'HSA, a fait l'objet d'une publication dans le journal *Analytica Chimica Acta* en 2013. Cet article fait suite à des travaux effectués au laboratoire dans le cadre de la thèse de Youssef Alahmad (Alahmad 2010). Ces travaux avaient permis de développer une méthode CZE conduisant à la séparation de neuf formes différentes dans une préparation d'HSA commerciale (Alahmad 2011). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un capillaire neutre revêtu d'oxyde de polyéthylène (PEO) et un tampon à pH physiologique. L'ajout d'ions cuivre dans le tampon a permis de séparer des formes d'HSA supplémentaires correspondant certainement à des formes tronquées, puisque le cuivre ne peut pas se fixer sur des formes tronquées en N-terminal de la protéine. Nous avons poursuivi ces travaux en cherchant à identifier les différentes formes séparées. Pour cela, des échantillons d'HSA ont été soumis à des réactions d'oxydation, de glycation, de digestion enzymatique ou incubés avec un anticorps anti-formes AGE (produits de glycation avancée), puis les échantillons ainsi traités ont été analysés avec la méthode CZE. La méthode a ensuite été appliquée à la comparaison qualitative et quantitative de préparations d'HSA commerciales produites par cinq laboratoires pharmaceutiques. Il est important de souligner que dans le cadre de cette étude sur l'HSA un travail de collaboration a été entrepris avec le Laboratoire d'Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE, UMR CNRS 8587), dirigé par Régis Daniel, directeur de recherche au CNRS. Cette collaboration était destinée à développer une méthode CE-MS afin d'identifier plus finement les formes apparentées présentes dans les préparations d'HSA commerciales.

Dans le deuxième article, qui vient d'être soumis au journal *Electrophoresis*, nous présentons une méthode CZE pour l'analyse de préparations commerciales d'antithrombine plasmatique. Jusqu'à présent, les méthodes CE développées pour analyser de l'AT plasmatique ou recombinante, que ce soit des méthodes CZE ou CIEF, ont permis de séparer uniquement des

glycoformes de l'AT. Or l'AT se caractérise non seulement par une hétérogénéité de glycosylation mais également une hétérogénéité de conformation. En plus de la forme native et active de la protéine il existe une forme latente inactive. Celle-ci se caractérise par l'insertion complète de la boucle réactive (RCL) à l'intérieur de la molécule, rendant la fixation des facteurs Xa et IIa (la thrombine) impossible. Il était donc particulièrement intéressant de pouvoir détecter cette forme inactive de l'AT, ainsi que l'hétérodimère issu de l'association des formes native et latente, qui lui aussi est inactif. Les méthodes CZE décrites dans la littérature pour l'analyse d'AT utilisent des tampons trop acides ou trop basiques, qui contiennent de plus des agents dénaturants ou chaotropiques. Ces méthodes n'étaient donc pas adaptées à l'analyse de conformères ou dimères de l'AT. Nous avons donc développé une méthode CZE avec un tampon proche des conditions physiologiques. Suite aux bons résultats obtenus sur l'HSA avec un capillaire neutre PEO, nous avons décidé d'exploiter à nouveau ce type de revêtement. Nous avons ensuite cherché à savoir si parmi les pics séparés par la méthode CZE développée se trouvaient des formes latentes ou hétérodimériques. Pour cela, nous avons analysé des préparations enrichies en forme latente ou en hétérodimère. La méthode CZE a ensuite été appliquée à la comparaison qualitative et quantitative de préparations d'AT commerciales produites par cinq laboratoires pharmaceutiques.

IV.A. Article 4 : « Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin »

Analytica Chimica Acta 800 (2013) 103-110

Anne-Lise Marie^{a,b}, Cédric Przybylski^c, Florence Gonnet^c, Régis Daniel^c, Rémi Urbain^d, Guillaume Chevreux^d, Sylvie Jorieux^d, Myriam Taverna^{a,b,*}

^aUniversité Paris Sud - Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

^bCNRS UMR 8612, Institut Galien Paris Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France

^cCNRS UMR 8587, LAMBE, Université Evry - Val d'Essonne, 91025 Evry, France

^dLFB, 91940 Les Ulis, France

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 46 83 54 62

E-mail address: myriam.taverna@u-psud.fr (M. Taverna)

Abstract

The present study describes a reproducible and quantitative capillary zone electrophoresis (CZE) method, which leads to the separation of nine forms (native, oxidized and glycosylated) of human serum albumin (HSA). In an attempt to identify the different species separated by this CZE method, the capillary electrophoresis was coupled to mass spectrometry using a sheath liquid interface, an optimized capillary coating and a suitable CE running buffer. CE-MS analyses confirmed the heterogeneity of albumin preparation and revealed new truncated and modified forms such as Advanced Glycation End products (AGEs). Assignment of the CZE peaks was carried out using specific antibodies, carboxypeptidase A or sample reduction before or during the CE separation. Thus, five HSA forms were unambiguously identified. Using this CZE method several albumin batches produced by slightly different fractionation ways could be discriminated. Furthermore, analyses of HSA preparations marketed by five pharmaceutical industries revealed that two therapeutic albumins, including that marketed by LFB, contained the highest proportion of native form and lower levels of oxidized forms.

Key Words: Human Serum Albumin, Capillary Zone Electrophoresis, Mass Spectrometry, Advanced Glycation End products.

Abbreviations: AGE, advanced glycation end product; BGE, background electrolyte; CE, capillary electrophoresis; CEL, N_{ϵ} -(1-carboxyethyl)-lysine; CE-MS, capillary electrophoresis-mass spectrometry; CML, N_{ϵ} -carboxymethyl-lysine; CPA, carboxypeptidase A; CZE, capillary zone electrophoresis; DGH, N_{δ} -[5-(2,3,4-trihydroxybutyl)-5-hydro-4-imidazol-2-yl]-ornithine; DOLD, 3-deoxyglucosone-derived lysine dimer, 1,3-di(N_{ϵ} -lysino)-4-(2,3,4-trihydroxybutyl)-imidazolium salt; EOF, electroosmotic flow; ESI, electrospray ionization; GH, N_{δ} -(5-hydro-4-imidazol-2-yl)-ornithine; GOLD, glyoxal-derived lysine dimer, 1,3-di(N_{ϵ} -lysino)-imidazolium salt; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonic acid; HPC, hydroxypropyl cellulose; HSA, human serum albumin; HSA+Cys, cysteinylated HSA; HSA+HCys, homocysteinylated HSA; HSA+G, glutathionylated HSA; HSA-SNO, nitrosylated HSA; HSA-SOH, HSA-sulfenic acid; HSA-SO₂H, HSA-sulfinic acid; HSA-SO₃H, HSA-sulfonic acid; HSA-DA, HSA minus aspartic acid and alanine from the N-terminus; HSA-L, HSA minus leucine from the C-terminus; IT, ion trap; MGH, N_{δ} -(5-hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-ornithine; MOLD, methylglyoxal-derived lysine dimer, 1,3-di(N_{ϵ} -lysino)-4-methyl-imidazolium salt; MS, mass spectrometry; PEO, polyethylene oxide; PMMA, polymethylmethacrylate; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, tris-buffered saline; THP, N_{δ} -(4-carboxy-4,6-dimethyl-5,6-dihydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)-ornithine; TIC, total ion current.

1. Introduction

Human serum albumin (HSA), obtained by fractionation of donor plasma, is used as a therapeutic molecule to correct hypovolemia and hypoalbuminemia, which are symptoms associated with liver failure, renal diseases or sepsis [1,2]. Apart from maintaining oncotic pressure, HSA exhibits many other important physiological functions such as transport of endogen and exogen ligands (fatty acids, hormones, bilirubine and drugs) and powerful antioxidant activity owing to its single free cysteine (Cys34), acting as a free radical scavenger, and its capacity to bind metal ions (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ...) known as oxidation catalysts [3-5].

For intrinsic (natural source) and extrinsic reasons (bioprocess, storage conditions) HSA preparations are very heterogeneous [6]. Indeed native HSA can undergo physical (aggregation, dimerization) [7,8] or chemical (truncation, oxidation, nitrosylation, glycation) modifications [4,9]. The free sulfhydryl residue (SH) of the native albumin is implicated in a great number of oxidation reactions [10]. For instance it can bind other thiol-containing compounds like cysteine, homocysteine or glutathione (leading to the so-called HSA+Cys, HSA+HCys and HSA+G species, respectively) [11], interact with nitric oxide (NO) and thereby form S-nitrosothiols (HSA-SNO) [12] or be oxidized into sulfenic (HSA-SOH), sulfinic (HSA-SO₂H) or sulfonic (HSA-SO₃H) acids [13].

Furthermore, serum albumin is a plasma protein highly sensitive to glycation, because of its long half-time (21 days) and its high concentration. The glycation process, also known as the Maillard reaction, is a slow non-enzymatic reaction that initially involves attachment of a hexose (glucose, galactose, fructose) or derivatives such as glyoxal and methylglyoxal with free amine groups of albumin. This reaction forms a reversible Schiff base product, which leads to stable fructosamine residue (ketoamine) following Amadori rearrangement. The Schiff base and fructosamine, called early glycation adducts, can subsequently be oxidized, polymerized or cleaved to give irreversible conjugates, called Advanced Glycation End products (AGEs). Numerous studies have identified the main sites on HSA molecule modified by glycation in vivo [14]. Because of their high nucleophile properties, lysine, arginine and cysteine are the sole residues prone to glycation. Figure 1 describes the different structures of AGEs reported in the literature [15,16].

It has been shown that massive albumin oxidation occurs in vivo in different biological fluids and, to some extent, that this process is correlated to organ dysfunction [4]. For instance, albumin can undergo increased glycation in diabetic subjects [17] and liver diseases are accompanied by high levels of cysteinylated or sulfonic forms [18]. Depending on donor population but also on the fractionation process, commercial albumin preparations may vary in their composition regarding the different degraded or modified forms of HSA and this heterogeneity is suspected to impact their therapeutic effect. Recently, the quality of administrated HSA in critically ill patients has been discussed. It appears that preference should be given to preparations with a higher reduced HSA percentage since an increased percentage of oxidized HSA is responsible for impaired HSA functions [19]. It is therefore of paramount importance to detect, characterize and quantify the different forms of HSA.

Several methods, mainly based on liquid chromatography, have been developed but most of them still cannot discriminate native HSA from all its related forms. Due to its high separation efficiency, capillary electrophoresis (CE) has emerged as a powerful method for the analysis of protein isoforms. However, one of the major difficulties in CE is to prevent the adsorption of proteins on the inner capillary wall [20]. In 1995, Denton and his coworkers succeeded in separating eight HSA forms using a neutral polyacrylamide coating but no reproducibility was demonstrated and only four peaks were identified [21]. Recently our laboratory has developed a reproducible CZE method that allows to separate nine isoforms of HSA and two of which were identified [22]. The present paper reports the improvement of the above-mentioned strategy with the aim of a comprehensive identification of the nine HSA species by using the innovative CE-MS coupling [23]. Until now, only few studies have reported the analysis of human serum albumin by CE-MS [24,25]. The CE-MS experiments we have carried out revealed many unexpected forms of HSA despite the loss of resolution upon the CZE separation when coupled to MS. To attribute the nine peaks of our CZE separation, we used chemical and enzymatic reactions during or before the CE separation, without MS coupling. The CZE method was evaluated in terms of reproducibility and efficiency by analyzing albumin preparations obtained from slightly modified fractionation ways. Finally we have applied the CZE method to the comparison of albumin preparations produced by five competitive pharmaceutical industries.

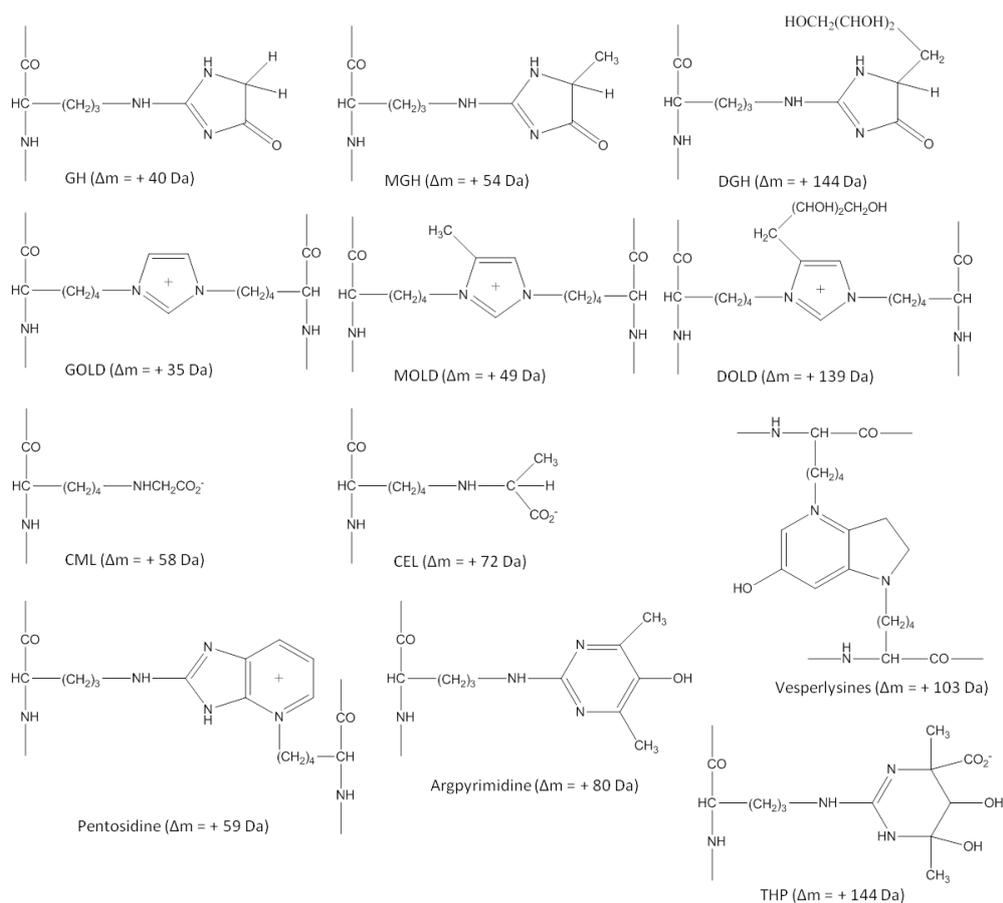


Fig.1. Examples of AGE chemical structures. AGEs derived from lysine residues: GOLD, MOLD, DOLD, CML, CEL and Vesperlysines. AGEs derived from arginine residues: GH, MGH, DGH, Argpyrimidine, Pentosidine and THP.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Sodium hydroxide, hydrochloric acid, ammonium hydrogenocarbonate, polyethylene oxide (PEO, average Mw 200,000) were obtained from ProLabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium acetate, acetonitrile, formic acid, hydroxypropyl cellulose (HPC, average Mw 100,000) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonic acid (HEPES), sodium dodecyl sulfate (SDS), copper nitrate ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), n-dodecyl- β -D-maltoside, dithiothreitol (DTT), carboxypeptidase A (from Bovine Pancreas) and glycated albumin (2 mol of hexose per mol of albumin) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) was from Merck (Darmstadt, Germany). Anti-AGE antibody was obtained from Acris Antibodies

(ref. BP8039, Herford, Germany). The HSA samples (marketed by LFB, Sanquin, Baxter, CSL Behring, Octapharma) were provided by LFB (Les Ulis, France). All buffers and samples used for CE and CE-MS were prepared with Milli-Q water using a Direct-Q 3 UV purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) and were filtered through a 0.2 μm Millex membrane (Millipore) before use.

2.2. MS infusion

For MS direct infusion albumin samples were desalted by centrifugation on a Vivaspin® 500 filter with a 10 kDa cut-off (Sartorius Stedim Biotech) by applying 6 concentration/dilution steps in ammonium acetate 50 mM. The desalted samples were then diluted to a concentration of 1 μM in water/acetonitrile 50/50 with formic acid 0.1 %. The MS apparatus used was a Synapt G2S (Waters, Milford, MA, USA) calibrated using sodium iodide (NaI, Waters, Milford, MA, USA) as recommended by the manufacturer. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using the TOF analyzer recording from m/z 400 to 4000 and the quadrupole in RF only mode. Samples were infused in nanospray at an estimated flow rate of 0.2 $\mu\text{L min}^{-1}$, using a TriVersa NanoMate system operating in Chip-Based Infusion mode. Scans were registered every 4 s and mass spectra were obtained from the combination of 30 scans.

2.3. CE system

2.3.1. CE apparatus and method

The CE experiments were carried out on a P/ACE 5500 capillary electrophoresis instrument equipped with a UV detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Bare fused-silica capillaries with an internal and external diameter of 50 and 375 μm , respectively, were purchased from Phymep (Paris, France). The capillaries were of 57 cm total length (50 cm to the UV detector). New fused-silica capillaries were dynamically coated with PEO according to the procedure described in section 2.5.1. The background electrolyte for CE consisted of HEPES 50 mM pH 7.5 with SDS 0.5 mM. The albumin samples at 1 mg mL^{-1} (15 μM) containing 30 μM of copper ions were injected by hydrodynamic mode at 0.5 psi for 5 s. The separation was performed under a negative voltage of -25 kV and a capillary temperature of 25°C. UV detection was made at 214 nm.

2.3.2. Validation of the method

For repeatability studies, one batch of the same albumin was analyzed five successive times, the same day on the same capillary. This was repeated with twelve different batches and the highest RSDs for migration times and peak areas were used to evaluate the repeatability. For inter-day study, one batch of the same albumin was analyzed over five different days, on the same capillary, and the RSDs were calculated from these five analyses. For inter-capillary reproducibility, three capillaries were compared. One batch of the same albumin was analyzed twice on each capillary and the RSDs were estimated from the six analyses.

2.4. CE-MS coupling

For CE-MS analyses an HP^{3D} capillary electrophoresis device (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was hyphenated to an Esquire 3000+ ESI source ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) *via* a coaxial sheath liquid interface. Experiments were carried out using capillaries of 98 cm total length (21.5 cm to the UV detector) with diameters identical to those used for CE only analyses. New fused-silica capillaries were permanently coated with HPC using the procedure described in section 2.5.2. The background electrolyte was composed of ammonium bicarbonate 100 mM at pH 7.8. The albumin sample was diluted in the electrolyte to a concentration of 1 mg mL⁻¹ and hydrodynamically injected at a pressure of 34.5 mBar (0.5 psi) during 50 s, followed by an injection of electrolyte at a pressure of 30 mBar during 50 s. During the CE analysis a continuous pressure of 50 mBar was applied. The CE separation was operated in normal polarity at +20 kV and the UV detection was made at 214 nm. Electrospray in positive ionization mode was achieved by applying a capillary voltage of -4 kV. The sheath liquid was a mixture of acetonitrile/water 60/40 (v/v) with 1 % formic acid delivered at a flow rate of 3 μ L min⁻¹, provided by a syringe pump (74900 series, Cole Palmer). The drying gas (nitrogen) temperature was maintained at 150°C, with a flow rate of 3 L min⁻¹. The nebulizing gas (nitrogen) pressure was optimized at 5 psi. The instrument was calibrated using ES tuning mix provided by the manufacturer. The mass spectra were obtained in a standard mode (1000-3000 *m/z*) with a target mass set at 2000 *m/z*. The maximum numbers of accumulated ions and accumulation time were fixed at 1.10⁵ and 500 ms, respectively, and the average scan number was 5. For isoform investigation, mass spectra were deconvoluted using Bruker Daltonics 5.1 Data Analysis software.

2.5. Capillary coatings

2.5.1. PEO coating

Each new fused-silica capillary was conditioned by successive flushes (5 min each at 20 psi) with water, NaOH 1 N, NaOH 0.1 N and water. A solution of PEO 0.2 % (w/v) in HCl 0.1 N was freshly prepared and used for the capillary coating according to the procedure previously reported [22]. Briefly, the capillary was rinsed first with water (5 min), NaOH 0.1 N (5 min), HCl 1 N (10 min), water (10 min), then with the PEO solution (5 min) and then with water (5 min). This semi-permanent coating was regenerated each day by rinsing the capillary with water (2 min), HCl 1 N (5 min), the PEO solution (5 min) and electrolyte buffer (2 min). The inter-run rinses consisted of water (3 min), HCl 1 N (3 min), the PEO solution (5 min) and electrolyte buffer (2 min).

2.5.2. HPC coating

For the CE-MS experiments a permanent HPC coating was selected using a procedure adapted from Shen and Smith [26]. Each new fused-silica capillary was directly treated with an aqueous HPC solution at 5 % (w/w) previously stirred thoroughly during 2 hours. The capillary was filled at $50 \mu\text{L h}^{-1}$ with the polymer solution using a syringe pump (Kd Scientific, MA, USA) for 120 min. The HPC polymer layer was immobilized by heating the capillary in a GC oven (5790A Series Gas Chromatograph, Hewlett Packard) at 60°C for 2 min, from 60 to 140°C at 5°C min^{-1} and then at 140°C for 20 min, keeping N_2 pressure at 2 Bar. Before use, the coated capillary was rinsed with water during 15 min.

2.6. Sample preparation

2.6.1. Reduction of albumin by DTT

LFB albumin (Vialebex®, 200 mg mL^{-1}) was dialyzed at 4°C overnight against a degassed phosphate buffer 0.1 M pH 6.86 with 0.3 M NaCl. The dialyzed albumin was incubated with a 100 mg mL^{-1} DTT solution for 45 min at room temperature at a ratio 1:5 (w/w). The solution was then extensively dialyzed at 4°C overnight against sodium acetate 0.1 M pH 5.5.

2.6.2. Cleavage by carboxypeptidase A

A stock solution of carboxypeptidase A (1.4 mL at 1785 IU mL⁻¹) was diluted 1:100 with NaCl 1 M. A sample of Vialebex® albumin was diluted 1:10 with TBS buffer (mixture of 25 mM Tris-HCl pH 7.5 with 0.5 M NaCl). Then 22 µL of the diluted CPA (i.e. 0.4 UI) were added to 2 mL of the diluted albumin (i.e. 0.6 µmole) and incubated for 30 minutes at 37°C. The digestion was stopped by freezing the sample at -20°C.

2.6.3. Incubation with anti-AGE antibody

For immuno-affinity experiments a solution of anti-AGE polyclonal antibody at 1 mg mL⁻¹ was mixed with Vialebex® albumin to give a final ratio HSA/antibody of 1:0.0001 (mol/mol). After two hours of incubation at room temperature the sample was analyzed by CZE.

3. Results and discussion

3.1. MS and CE-MS experiments

In 2005, Bar-Or and his coworkers highlighted the heterogeneity of commercial albumin with LC-MS [9]. We have confirmed this heterogeneity by analyzing a sample of Vialebex® albumin by mass spectrometry. This analysis revealed nine HSA isoforms: the native HSA, the cysteinylated HSA (HSA+Cys), a glycosylated form HSA+Hexose and other oxidized forms like HSA+Cys+Hexose and HSA-SO₂H (sulfinic form of HSA), and several truncated forms like HSA-DA, HSA-L, HSA+Cys-DA and HSA-SO₂H-DA (truncated form of sulfinic form of HSA) (Fig.2).

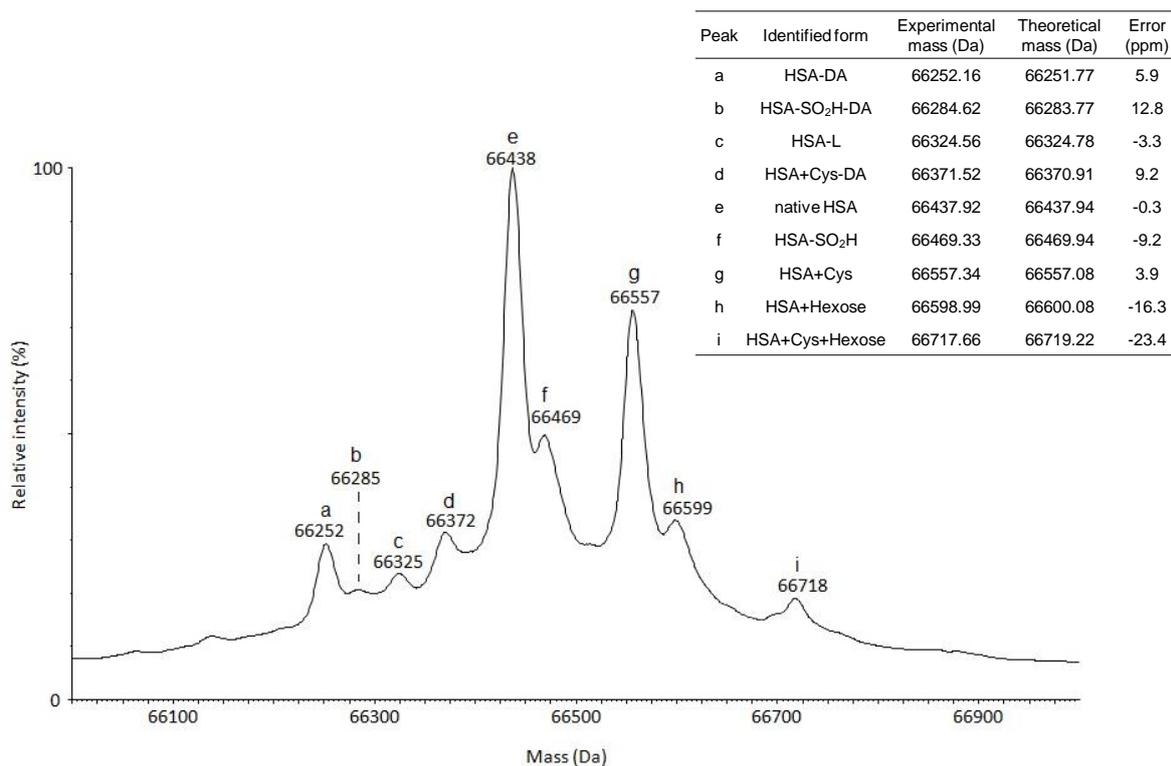


Fig.2. Positive electrospray mass spectrum of Vialebex® albumin (produced by LFB) by direct infusion. Masses are all displayed as average masses. For analytical conditions see section 2.2.

In an attempt to identify a greater number of HSA forms than those obtained by direct infusion we have performed the coupling of CE with MS. The parameters (coating, BGE, capillary length) of the CZE method (see section 2.3) were adapted to be compatible with the on-line CE-MS coupling. Thus, a permanent hydroxypropyl cellulose (HPC) coating was used instead of the semi-permanent polyethylene oxide (PEO) coating used in the CE only experiments, to avoid suppression of analyte ionization, background signals and/or contamination of the ion source by coating agents. The BGE was composed of ammonium bicarbonate 100 mM pH 7.8, with or without n-dodecyl- β -D-maltoside 0.25 mM (no ionization suppression was observed with this BGE). Under these conditions, the CZE without the MS coupling separated nine peaks of HSA but with a poor resolution (data not shown).

The CE-MS experiments were realized with a sheath liquid composed of acetonitrile-water (60:40, v/v) containing 1 % formic acid. Other sheath liquid compositions were tried like

methanol-water (90:10, v/v) or isopropanol-water (75:25, v/v) with 0.1 % acetic acid but did not bring significant improvement of the TIC intensity. To balance the lowered electroosmotic flow resulting from the permanent HPC coating, a continuous hydrodynamic pressure (50 mBar) was applied during the CE-MS analyses. As generally observed with CE-MS experiments using a sheath-liquid interface, the coupling led to a loss of resolution due to a siphoning effect [27,28]. This loss of resolution can also be explained by the hydrodynamic pressure continuously applied during the CE separation. However, a broad peak was observed in these conditions with both UV and MS detection, indicating the beginning of separation of several HSA forms and allowing their identification by MS. The deconvolution of the mass spectra revealed a great number of peaks that were assigned to different forms of HSA based on literature data. In particular AGE derivatives have been investigated. Table 1 presents the possible AGEs that could correspond to the detected masses (see also the Supporting Information). Some multiple AGEs, like HSA+DOLD+2Pentosidine or HSA+Argpyrimidine+3Pentosidine have never been reported before. Furthermore many truncated forms other than those detected by MS direct infusion have been identified (Table 1 and Supporting Information).

The CE-MS coupling proved then to be a very efficient tool for structural characterization of HSA forms. However, due to the loss of resolution, it was not suitable for a qualitative and quantitative comparison of different albumin batches. The assignment of the CZE peaks as well as the inter-batch comparison studies were then performed by CZE-UV, since this method allows the most exhaustive separation of the various HSA species.

Table 1. Experimental mass values obtained by on-line ESI-CE-MS analysis of Vialebex® albumin and corresponding attribution to various truncated and AGE forms of albumin. $\Delta M_{\text{exp.}}$ refers to mass difference between the experimental masses of native HSA and modified HSA. $\Delta M_{\text{th.}}$ refers to theoretical mass difference induced by the modification. Truncated forms from the N-terminus are indicated as HSA-(D1A2-...) and from the C-terminus as HSA-(...-G584L585).

| Experimental Mass (Da) | $\Delta M_{\text{exp.}}$ (Da) | $\Delta M_{\text{th.}}$ (Da) | HSA forms |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|---|
| 60720 | -5755 | -5752 | HSA-(D1A2---F51A52) |
| 61509 | -4966 | -4962 | HSA-(D1A2---L42V43) |
| 61612 | -4864 | -4863 | HSA-(D1A2---K41L42) |
| 62202 | -4273 | -4271 | HSA-(D1A2---F36E37) |
| 63416 | -3060 | -3064 | HSA-(D1A2---A26F27) |
| 64694 | -1781 | -1783 | HSA-(F551A552---G584L585) |
| 64952 | -1523 | -1520 | HSA-(D1A2---K12D13) |
| 65041 | -1435 | -1436 | HSA-(E571G572---G584L585) |
| 66475 | 0 | 0 | native HSA |
| 66524 | 49 | 49 | HSA+MOLD |
| 66575 | 100 | 103 | HSA+Vesperlysines |
| 66614 | 139 | 139 | HSA+DOLD |
| 66621 | 146 | 144 | HSA+DGH <i>or</i> HSA+THP |
| 66733 | 257 | 257 | HSA+DOLD+2Pentosidine <i>or</i> HSA+Argpyrimidine+3Pentosidine |

3.2. Assignments of the CZE peaks

Although the CE-MS hyphenation revealed a great number of HSA forms and even new forms not yet reported, it failed to attribute the nine peaks separated by the CZE method. We then tried to identify the main CZE peaks using chemical and enzymatic reactions, before or during the CE analysis without the coupling.

3.2.1. Identification of the cysteinylated form

HSA was treated with dithiothreitol, in mild conditions, to only reduce the disulfide bridge between HSA and a thiol-containing compound like cysteine, homocysteine or glutathione and not other disulfide bounds. After this reduction by DTT, a significant diminution of peak 4 associated with an increase of peak 3 (corresponding to the native HSA) was observed (Fig.3A). We concluded that peak 4 was mainly composed of cysteinylated HSA (HSA+Cys) considering that homocysteinylated and glutathionylated HSA are negligible forms in plasma [29].

3.2.2. Identification of truncated forms

HSA was treated with carboxypeptidase A (CPA), which was expected to remove its carboxy terminal leucine [30]. After 30 minutes of digestion with CPA, peak areas of the two major peaks, corresponding to native HSA and cysteinylated HSA, dramatically decreased. This diminution was correlated with the formation of two new peaks at higher migration times (peaks 5 and 5', Fig.3B). We deduced from these results that peaks 5 and 5' were respectively the C-term truncated forms of HSA : HSA-L and HSA+Cys-L.

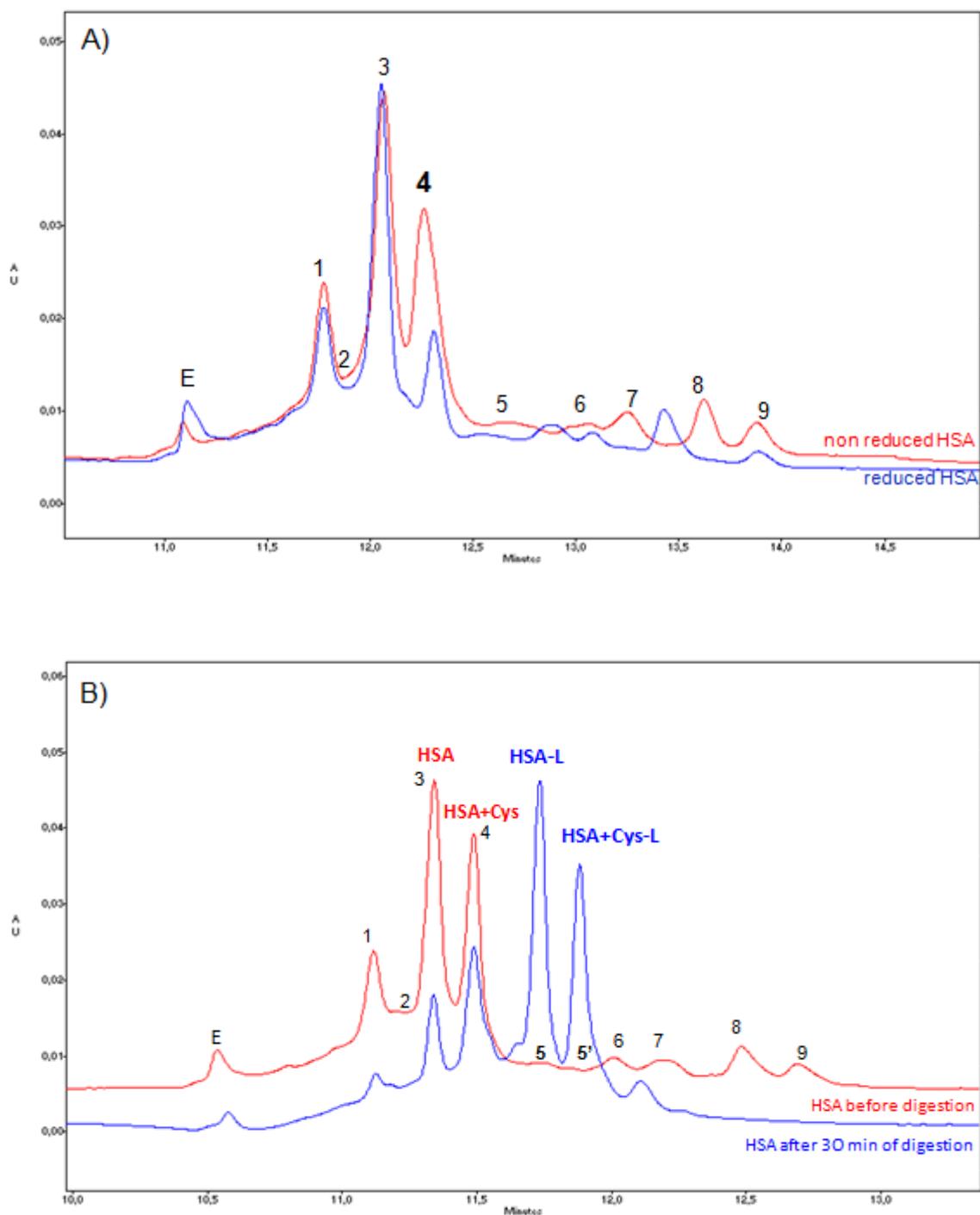


Fig.3. Electropherograms of HSA treated with different in vitro degradations. A) Comparison of non reduced and reduced HSA. B) Comparison of normal HSA and HSA cleaved by CPA. Analytical conditions: PEO coated capillary with an i.d. of 50 μm and a length of 57 cm. BGE: HEPES 50 mM, SDS 0.5 mM, pH 7.5. The peak noted E corresponds to excipient contained in the therapeutic albumin.

3.2.3. Identification of glycated forms

We then analyzed under the same conditions a glycated human albumin marketed by Sigma. This glycated HSA is minimally glycated with an average of two moles of hexose per mole of albumin. The proportion of the three major peaks (1, 3 and 4) was completely different between Vialebex® and the glycated albumin (Fig.4A). The latter sample exhibited a much higher proportion of peak 1 demonstrating that peak 1 was mainly composed of glycated forms of HSA.

3.2.4. Immuno-affinity CE

To assign AGE derivatives on the profile, we employed immuno-affinity CE [31] by using an AGE antibody. This antibody specifically recognizes AGE derivatives of HSA. To avoid interference of the copper ions with the AGE antibody and the complex recognition, the immuno-affinity analyses were realized without adding copper ions in the albumin samples, leading to a profile with only five peaks [22]. The figure 4B presents a comparison of the CE profiles obtained for LFB albumin incubated with or without the AGE antibody. After incubation with the antibody, peaks 3 and 4 decreased whereas one shoulder in peak 4 (noted 4a) appeared as well as a new well resolved peak just after (noted 4b). These two peaks are the result of the immuno-complexation of HSA with probably one or two antigens attached to the antibody. These experiences indicate that peak 3 (native HSA) and peak 4 (cysteinylated HSA) also contain a small proportion of AGE derivatives.

Finally, the different experiments we carried out (reduction, cleavage, glycation, incubation with AGE antibody) allowed us to identify more than 5 peaks of the CZE profile, which are glycated forms, HSA+Cys, HSA-L, HSA+Cys-L and AGE derivatives.

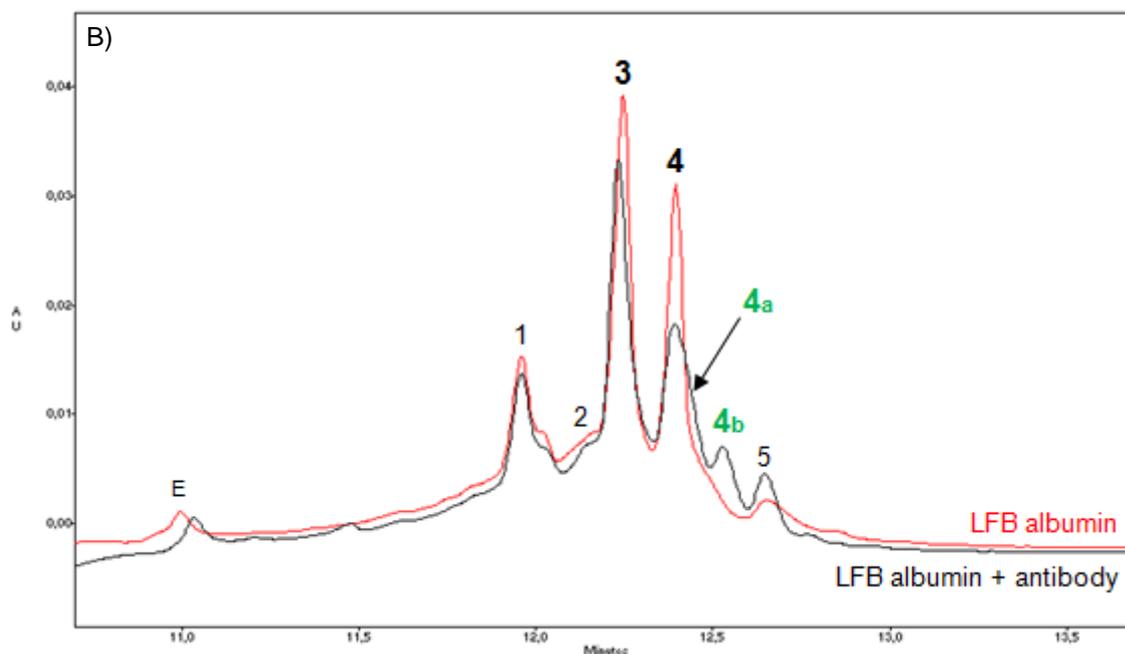
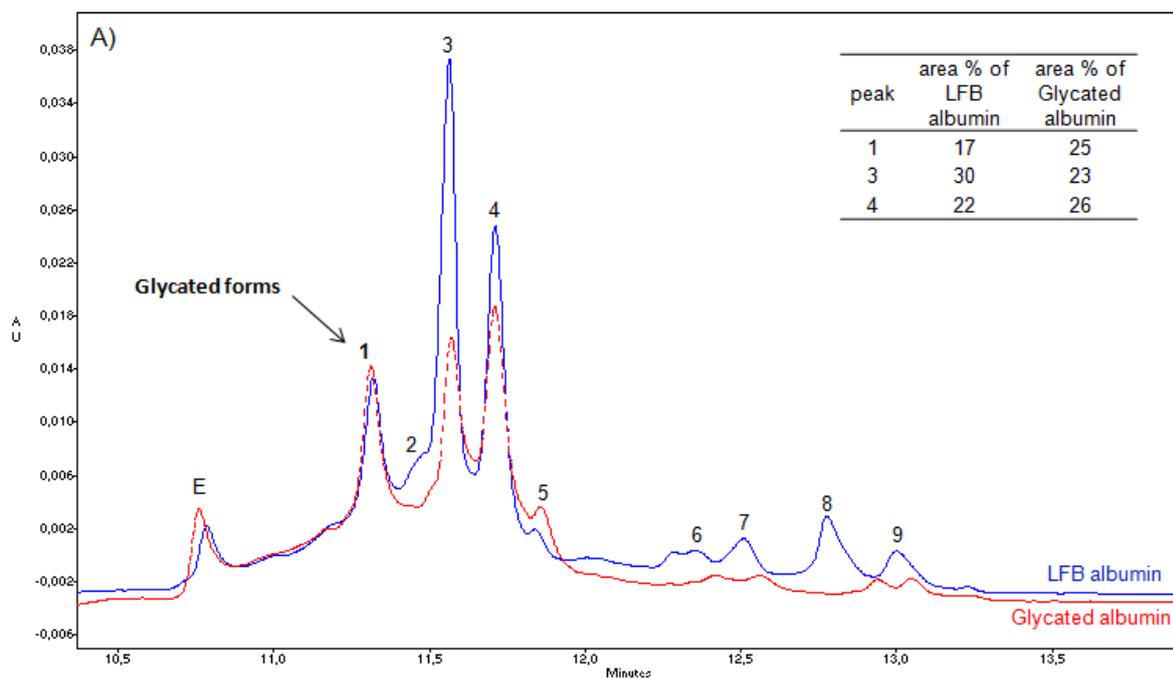


Fig.4. Electropherograms of HSA after in vitro chemical modifications. A) Comparison of non glycated and glycated albumins. Analytical conditions identical to Fig.3. B) Comparison of normal HSA and HSA pre-incubated with AGE antibody. Analytical conditions identical to Fig.3 without addition of copper ions in the samples. The peak noted E corresponds to excipient contained in the therapeutic albumin.

3.3. Validation and efficiency of the CZE method

The repeatability of the CZE method was evaluated by performing five consecutive analyses of the same albumin batch, the same day on the same capillary. The relative standard deviations (RSDs) of migration times and peak areas were excellent, with values less than 0.5 % and 4 % respectively. We also studied the inter-day reproducibility of the method by analyzing, on the same capillary, the same albumin batch over five different days. The RSDs obtained for migration times and peak areas were less than 0.7 % and 6 %, respectively. Finally, the inter-capillary reproducibility of the method, evaluated by analyzing the same albumin batch with three different capillaries, led to satisfactory RSDs for migration times and peak areas (less than 1.2 % and 8 %, respectively).

To test the effectiveness of our method to detect little variations in the composition of human albumin preparations, we have analyzed LFB batches intentionally purified with slightly modified protocols. Four batches were compared showing that the proportions of peak 1 and peak 3 were slightly different from batch to batch, whereas no significant difference was observed for the other peaks (Fig.5). These results proved the analytical method efficiency to detect slight composition differences in human albumin preparations.

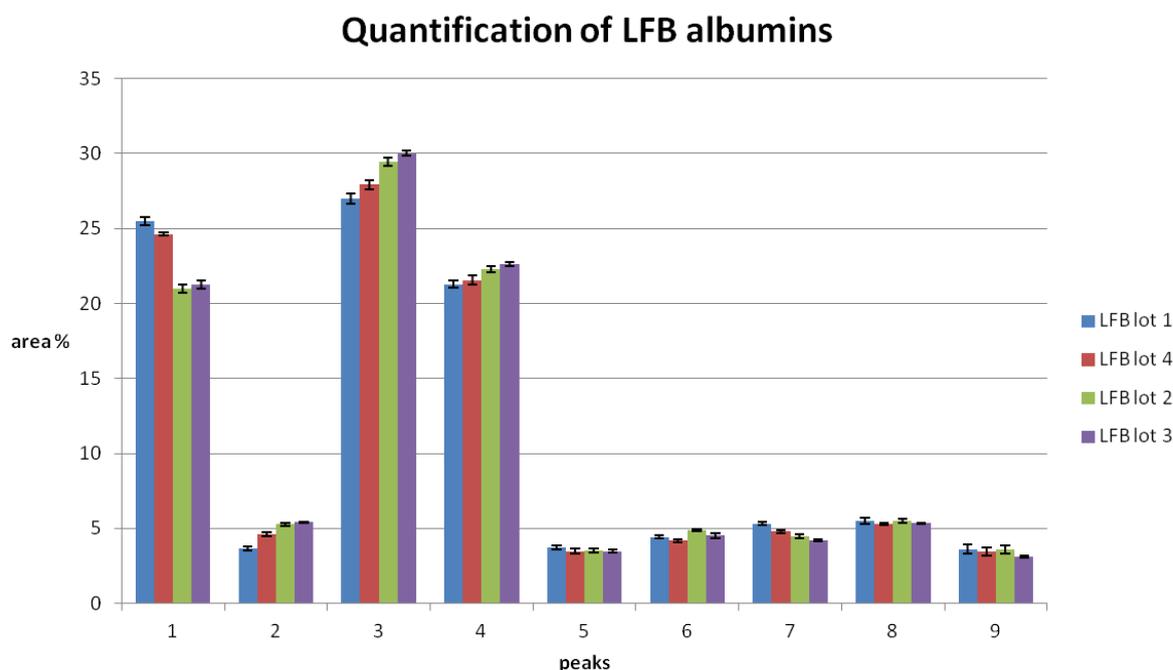


Fig.5. Comparison of different LFB albumin preparations obtained by slightly different ways. Each bar represents the mean \pm standard deviation of five experiments. For analytical conditions, see section 2.3.

3.4. Comparison of several competitive albumin preparations

Five therapeutic albumin preparations produced by different pharmaceutical companies were analyzed using the CZE method. The electropherograms of LFB and Sanquin samples were found very similar with peak 3 (mainly composed of native HSA) as the major one. In contrast, the albumin preparations from Baxter, CSL and Octapharma were all characterized by a small peak 3 and a large peak 1 that we attributed to glycosylated forms (Fig.6). Furthermore, albumin produced by Baxter showed a very low proportion of peak 4 (containing mainly cysteinylated HSA) compared to the other competitors. Several species such as those corresponding to peaks 2, 6 and 8 were not present in all the albumin preparations and the CE profile of Octapharma sample exhibited the lowest number of peaks.

To protect HSA against thermal and oxidative stress, excipients such as sodium caprylate and N-acetyl-L-tryptophanate are added to the formulation buffers of therapeutic preparations [32]. These stabilizers may interact with some of the HSA forms, modifying thereby their migration behavior. Among the five therapeutic solutions analyzed, two are prepared in a formulation buffer containing only sodium caprylate (LFB and Sanquin) whereas the formulation buffer of the three others contains sodium caprylate and N-acetyl-L-tryptophanate. In order to compare the different HSA preparations, the desalting of the samples could be an option. However several studies have revealed that filtration procedure of plasma proteins (using membrane materials like PMMA) may increase, for instance, the carbonyl derivatives like CML (an advanced glycation end product) [33]. Furthermore, the aim of this study was to compare the HSA preparations as they are in the bottle. We then preferred to analyze the samples without any desalting step to avoid any bias. Although the presence of various stabilizers may partly explain the observed differences in the CE profiles, we cannot exclude the existence of differences in the nature and level of HSA forms in the therapeutic preparations.

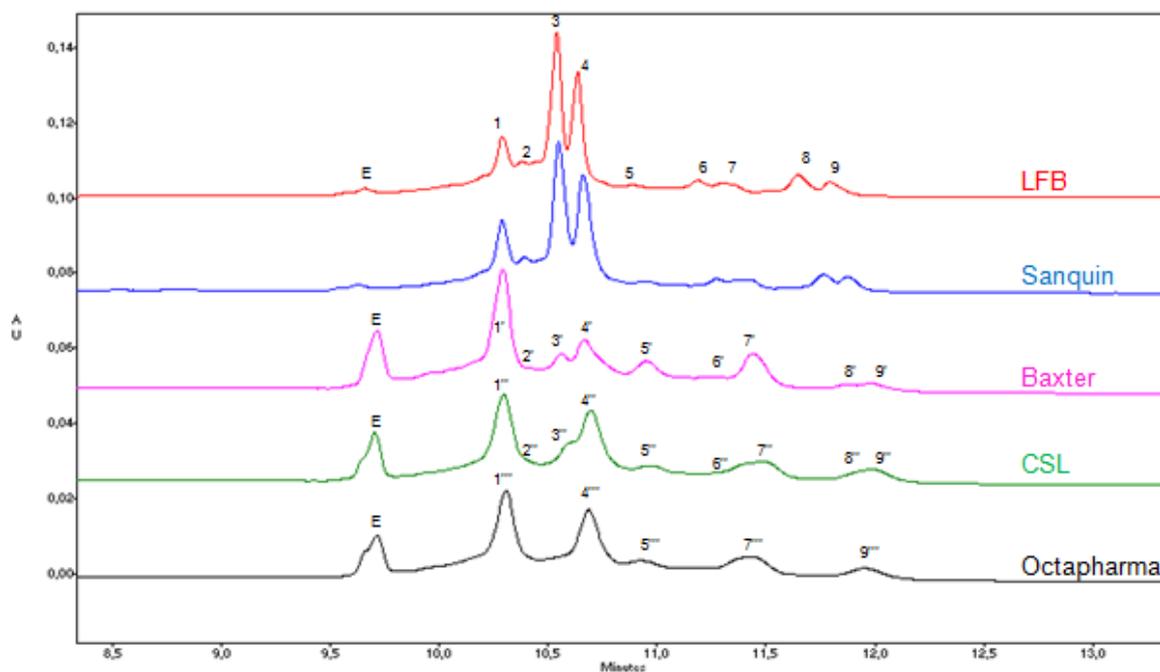


Fig.6. Electropherograms of five competitive HSA preparations. Analytical conditions: PEO coated capillary with an i.d. of 50 μm and a length of 57 cm. BGE: HEPES 50 mM, SDS 0.5 mM, pH 7.5. The peak noted E corresponds to excipient contained in the therapeutic albumin.

4. Conclusions

In this work we investigated a CE-MS on-line coupling to study the heterogeneity of human serum albumin. These experiments were based on a reproducible CZE method we reported recently, which allowed the separation of nine HSA isoforms. The analytical conditions used for CE-MS led to a unique wide peak but deconvolution of the mass spectra brought additional information, in particular the identification of many truncated forms and unexpected forms such as AGE derivatives in the HSA preparation. The detection of such forms has never been reported by using CE or MS alone. Other experiments, based only on CZE and chemical reactions before or during the CZE separation, allowed to identify more than five HSA isoforms : HSA+Cys, HSA-L, HSA+Cys-L, glycated forms and AGE derivatives. The developed CZE method allowed a qualitative and quantitative analysis of HSA composition and appeared to be very well suited to point out slight variations between different HSA batches produced by the same laboratory. This validated method highlighted important differences between albumin preparations produced by different pharmaceutical companies. Indeed, two therapeutic albumins, including Vialebex® marketed by LFB, were shown to contain the highest proportion of native form compared to preparations of three other competitors, which were composed of more oxidized forms.

Acknowledgments

The authors thank Véronique Devos and Véronique Duretz for their excellent technical support. Jean-Luc Plantier is gratefully acknowledged for technical support and fruitful discussions.

References

- [1] J. Boldt, *Br. J. Anaesth.* 104 (2010) 276-284.
- [2] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans, *Hepatology* 41 (2005) 1211-1219.
- [3] M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1783-1787.
- [4] G. Colombo, M. Clerici, D. Giustarini, R. Rossi, A. Milzani, I. Dalle-Donne, *Antioxid. Redox Signal* 17 (2012) 1515-1527.
- [5] W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 33-39.
- [6] M. Girard, H.P. Bietlot, T.D. Cyr, *J. Chromatogr. A* 772 (1997) 235-242.
- [7] Y. Ogasawara, T. Namai, T. Togawa, K. Ishii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2006) 353-358.
- [8] R. Medina-Navarro, G. Durán-Reyes, M. Díaz-Flores, C. Vilar-Rojas, *PloS ONE* 5 (2010) 1-11 <http://www.plosone.org>
- [9] D. Bar-Or, R. Bar-Or, L.T. Rael, D.K. Gardner, D.S. Slone, M.L. Craun, *Crit. Care Med.* 33 (2005) 1638-1641.
- [10] A. Kawakami, K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka, E. Suzuki, K. Hirayama, *FEBS J.* 273 (2006) 3346-3357.
- [11] K. Oettl, R.E. Stauber, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 580-590.
- [12] Y. Ishima, S. Hiroyama, U. Kragh-Hansen, T. Maruyama, T. Sawa, T. Akaike, T. Kai, M. Otagiri, *Nitric Oxide* 23 (2010) 121-127.
- [13] L. Turell, S. Carballal, H. Botti, R. Radi, B. Alvarez, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (2009) 305-311.
- [14] P. Rondeau, E. Bourdon, *Biochimie* 93 (2011) 645-658.
- [15] C. Wa, R.L. Cerny, W.A. Clarke, D.S. Hage, *Clin. Chim. Acta* 385 (2007) 48-60.

- [16] N. Ahmed, O.K. Argirov, H.S. Minhas, C.A.A. Cordeiro, P.J. Thornalley, *Biochem. J.* 364 (2002) 1-14.
- [17] A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon, P. Rondeau, *Diabetes Metab.* 38 (2012) 171-178.
- [18] K. Oettl, G. Marsche, *Methods Enzymol.* 474 (2010) 181-195.
- [19] M. Taverna, A-L. Marie, J-P. Mira, B. Guidet, *Ann. Intensive Care* 3 (2013) 1-7.
- [20] V. Dolnik, *Electrophoresis* 29 (2008) 143-156.
- [21] K.A. Denton, R. Harris, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 335-341.
- [22] Y. Alahmad, N.T. Tran, I. Le Potier, E. Forest, S. Jorieux, M. Taverna, *Electrophoresis* 32 (2011) 292–299.
- [23] R. Ramautar, A.A.M. Heemskerk, P.J. Hensbergen, A.M. Deelder, J-M. Busnel, O.A. Mayboroda, *J. Proteomics* 75 (2012) 3814-3828.
- [24] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 81-109.
- [25] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *Electrophoresis* 32 (2011) 66-82.
- [26] Y. Shen, R.D. Smith, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 135-141.
- [27] M. Mokaddem, P. Gareil, J-E. Belgaied, A. Varenne, *Electrophoresis* 29 (2008) 1957-1964.
- [28] M. Mokaddem, P. Gareil, J-E. Belgaied, A. Varenne, *Electrophoresis* 30 (2009) 1692-1697.
- [29] S. Carballal, R. Radi, M.C. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman, B. Alvarez, *Biochemistry* 42 (2003) 9906-9914.
- [30] D. Bar-Or, L.T. Rael, R. Bar-Or, D.S. Slone, M.L. Craun, *Clin. Chim. Acta* 365 (2006) 346-349.
- [31] L.K. Amundsen, H. Sirén, *Electrophoresis* 28 (2007) 99-113.
- [32] M. Anraku, Y. Tsurusaki, H. Watanabe, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Biochim. Biophys. Acta* 1702 (2004) 9-17.
- [33] B. Pavone, V. Sirolli, S. Bucci, F. Libardi, P. Felaco, L. Amoroso, P. Sacchetta, A. Urbani, M. Bonomini, *Blood Transfus.* 8 (2010) 113-119.

Supporting information: Table S-1. Charge states and m/z distributions, and molecular weights of the different HSA forms identified by CE-MS.

| HSA forms | Charge state (z) | m/z | | Experimental Molecular Weight (Da) |
|-----------------------|---------------------|-------------|--------------|--|
| | | Theoretical | Experimental | |
| (D1A2---F51A52) | 45+ | 1350.28 | 1350.27 | 60720.42 ± 0.48 |
| | 44+ | 1381.06 | 1381.06 | |
| | 43+ | 1413.25 | 1413.24 | |
| | 42+ | 1446.73 | 1446.72 | |
| | 41+ | 1482.02 | 1482.01 | |
| | 40+ | 1519.02 | 1519.01 | |
| | 39+ | 1557.81 | 1557.80 | |
| (D1A2---L42V43) | 38+ | 1598.99 | 1598.99 | 61508.84 ± 0.76 |
| | 37+ | 1663.44 | 1663.43 | |
| | 36+ | 1709.56 | 1709.52 | |
| | 35+ | 1758.40 | 1758.38 | |
| | 34+ | 1810.15 | 1810.15 | |
| (D1A2---K41L42) | 33+ | 1865.00 | 1865.01 | 61611.64 ± 0.89 |
| | 38+ | 1622.31 | 1622.29 | |
| | 37+ | 1666.35 | 1666.36 | |
| | 36+ | 1712.36 | 1712.32 | |
| | 35+ | 1761.28 | 1761.25 | |
| (D1A2---F36E37) | 34+ | 1813.17 | 1813.18 | 62201.84 ± 0.50 |
| | 42+ | 1482.00 | 1482.01 | |
| | 41+ | 1518.13 | 1518.11 | |
| | 40+ | 1556.13 | 1556.13 | |
| | 39+ | 1595.95 | 1595.96 | |
| (D1A2---A26F27) | 38+ | 1637.79 | 1637.78 | 63415.67 ± 0.68 |
| | 41+ | 1547.68 | 1547.65 | |
| | 40+ | 1586.42 | 1586.42 | |
| | 39+ | 1627.10 | 1627.09 | |
| | 38+ | 1669.84 | 1669.82 | |
| | 37+ | 1714.86 | 1714.84 | |
| | 36+ | 1762.64 | 1762.63 | |
| (F551A552---G584L585) | 35+ | 1813.17 | 1813.18 | 64694.13 ± 0.85 |
| | 40+ | 1618.29 | 1618.26 | |
| | 39+ | 1659.81 | 1659.77 | |
| | 38+ | 1703.51 | 1703.52 | |
| | 37+ | 1749.53 | 1749.52 | |
| | 36+ | 1798.26 | 1798.25 | |
| | 35+ | 1849.35 | 1849.32 | |
| (D1A2---K12D13) | 34+ | 1903.75 | 1903.73 | 64951.83 ± 0.66 |
| | 40+ | 1624.88 | 1624.87 | |
| | 39+ | 1666.39 | 1666.36 | |
| | 38+ | 1710.27 | 1710.25 | |
| | 37+ | 1756.44 | 1756.42 | |
| | 36+ | 1805.34 | 1805.33 | |
| (E571G572---G584L585) | 35+ | 1856.80 | 1856.81 | 65040.56 ± 0.78 |
| | 46+ | 1414.87 | 1414.84 | |
| | 45+ | 1446.44 | 1446.44 | |
| | 44+ | 1479.20 | 1479.20 | |
| | 43+ | 1513.49 | 1513.46 | |
| | 42+ | 1549.69 | 1549.69 | |

Supporting information: Table S-1 continued.

| HSA forms | Charge state (z) | m/z | | Experimental Molecular Weight (Da) |
|--|---------------------|-------------|--------------|--|
| | | Theoretical | Experimental | |
| Native | 50+ | 1330.53 | 1330.53 | 66475.28 ± 0.65 |
| | 49+ | 1357.69 | 1357.68 | |
| | 48+ | 1386.04 | 1386.04 | |
| | 47+ | 1415.38 | 1415.38 | |
| | 46+ | 1445.95 | 1445.94 | |
| | 45+ | 1478.30 | 1478.30 | |
| | 44+ | 1511.76 | 1511.73 | |
| + MOLD | 46+ | 1447.21 | 1447.22 | 66524.40 ± 0.77 |
| | 45+ | 1479.22 | 1479.20 | |
| | 44+ | 1512.88 | 1512.85 | |
| | 43+ | 1548.20 | 1548.20 | |
| | 42+ | 1585.04 | 1585.04 | |
| | 41+ | 1623.68 | 1623.67 | |
| | 40+ | 1663.99 | 1663.97 | |
| + Vesperlysines | 42+ | 1586.08 | 1586.04 | 66574.85 ± 0.85 |
| | 41+ | 1624.86 | 1624.87 | |
| | 40+ | 1665.38 | 1665.37 | |
| | 39+ | 1708.06 | 1708.02 | |
| | 38+ | 1753.03 | 1753.03 | |
| + DOLD | 44+ | 1514.88 | 1514.86 | 66614.42 ± 0.60 |
| | 43+ | 1550.30 | 1550.29 | |
| | 42+ | 1587.09 | 1587.08 | |
| | 41+ | 1625.75 | 1625.74 | |
| | 40+ | 1666.37 | 1666.36 | |
| + DGH or + THP | 37+ | 1801.52 | 1801.51 | 66621.13 ± 0.54 |
| | 36+ | 1851.65 | 1851.65 | |
| | 35+ | 1904.47 | 1904.45 | |
| | 34+ | 1960.54 | 1960.54 | |
| | 33+ | 2019.80 | 2019.77 | |
| +DOLD+2Pentosidine or +Argpyrimidine+3Pentosidine | 45+ | 1484.02 | 1484.01 | 66732.55 ± 0.49 |
| | 44+ | 1517.57 | 1517.55 | |
| | 43+ | 1553.02 | 1553.03 | |
| | 42+ | 1589.81 | 1589.79 | |
| | 41+ | 1628.66 | 1628.66 | |

IV.B. Article 5 : « A capillary zone electrophoresis method to detect conformers and dimers of antithrombin in therapeutic preparations »

Submitted to Electrophoresis

Anne-Lise Marie^{a,b}, Nguyet Thuy Tran^{a,b}, François Saller^{c,d}, Youmna Mohamed Abdou^{a,b}, Pascal Zeau^e, Jean-Luc Plantier^e, Rémi Urbain^e, Delphine Borgel^{c,d,f}, Myriam Taverna^{a,b,*}

^aUniversité Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

^bCNRS UMR 8612, Institut Galien Paris Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France

^cUniversité Paris Sud, UMR-S1176, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

^dINSERM, U1176, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

^eLFB, 91940 Les Ulis, France

^fAP-HP, Hôpital Necker, Service d'Hématologie Biologique, 75015 Paris, France

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 83 54 62

E-mail address: myriam.taverna@u-psud.fr (M. Taverna)

Abstract

Antithrombin (AT) is a human plasma glycoprotein which possesses anticoagulant and anti-inflammatory properties. However, the native (active) form of AT is unstable and undergoes conformational changes, leading to latent, cleaved and heterodimeric forms. The presence of these alternative forms mostly inactive can highly impact the quality and therapeutic activity of pharmaceutical AT preparations. We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method, based on a neutral polyethylene oxide (PEO) coated capillary and a buffer close to physiological conditions, enabling the separation of more than eight forms of AT. Several peaks were identified as native, latent and heterodimeric forms. The CZE method was reproducible with intra-day relative standard deviations (RSDs) less than 0.5 and 2 % for migration times and peak areas, respectively. The method was applied to the comparison of AT preparations produced by five competitive pharmaceutical companies, and statistical tests were performed. Important differences in the proportion of each form were highlighted. In particular, one AT preparation was shown to contain a high quantity of heterodimer, and two preparations contained high quantities of latent form. In addition, one AT preparation exhibited additional forms, not yet identified.

Key words: Capillary zone electrophoresis, therapeutic antithrombin, conformers, latent form, heterodimer.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; AT, antithrombin; BGE, background electrolyte; CE, capillary electrophoresis; CZE, capillary zone electrophoresis; EOF, electroosmotic flow; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; RSDs, relative standard deviations; SDS, sodium dodecyl sulfate; Serpin, serine protease inhibitor; t_m , migration time; μ_{ep} , electrophoretic mobility.

1. Introduction

Antithrombin (AT) is a plasma glycoprotein which belongs to the serine protease inhibitor (serpin) superfamily [1]. AT is the major physiological inhibitor of coagulation proteases, primarily thrombin and factor Xa. This inhibition is slow but is accelerated up to several thousand-fold when AT binds heparin or heparin derivatives [2,3]. For clinical use, AT is indicated to treat patients with hereditary antithrombin deficiency or in severe acquired AT deficiencies [4].

AT has a heterogeneity of glycosylation, with two major groups of glycoforms α (~90 %) and β (~10 %). α -AT and β -AT carry four and three glycan chains, respectively. AT also exhibits various conformers and dimeric forms. Like other serpins, the native form of AT is metastable and undergoes, spontaneously, conformational changes into hyperstable forms, among which a latent form (Fig. 1). The structure of the AT latent form was described for the first time in the nineties by Carrell's team [5,6]. In this conformer, the reactive center loop (RCL) is inserted inside the molecule to form an additional β -sheet strand. Dimeric forms may be homo- or heterodimers [7,8]. The homodimers are dimers of native forms, with the RCL of one native monomer inserted into another native monomer [9]. The heterodimers correspond to the association of a native and a latent form (Fig. 1). In this case, the stable dimerization contact involves the incorporation of several RCL residues of the native monomer into the latent monomer [10]. An additional contact results from a salt bridge between Arg393 of the native monomer and Glu237 of the latent counterpart.

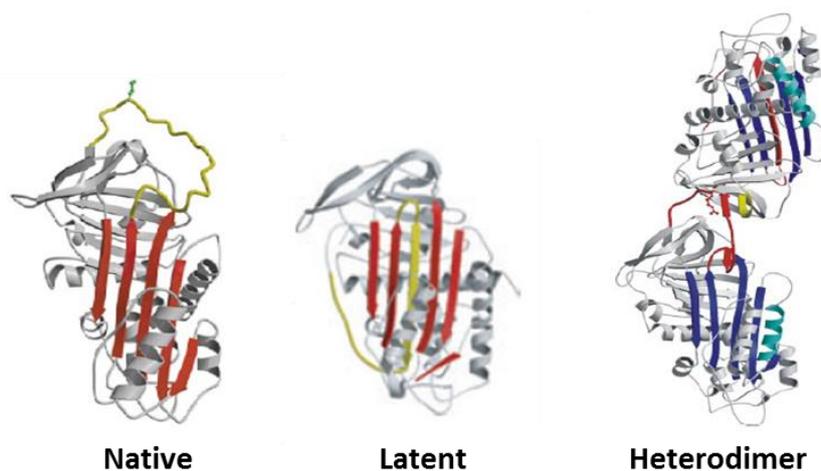


Fig.1. Conformers and dimer of antithrombin. Native AT undergoes a conformational rearrangement into a latent form with complete insertion of the reactive center loop (RCL). The heterodimer corresponds to the association of native and latent forms through the partial incorporation of the RCL of the native monomer into the latent counterpart. Adapted from [1,6,10] with permissions.

Bioprocess steps can also modify the structure of AT. The pasteurization process, commonly used for viral inactivation, can induce the formation of latent form, and could be responsible for up to 40 % of the latent form present in some AT preparations [11,12]. Pasteurization and other processes like ultra/diafiltration and lyophilisation may also cause denaturation of AT, with the formation of aggregates or polymeric forms [13-15].

The presence of latent and dimeric forms in therapeutic AT preparations is undesirable because they correspond to inactive forms of the native molecule, and thereby decrease the quality and efficacy of the drug. In particular, the heterodimers are detrimental because they result in a loss of activity that may reach 11 % for the α glycoform and 21 % for the β one [8]. All these reasons explain the need to develop fast and reliable analytical methods to detect and quantify the different forms of AT in pharmaceutical preparations.

Liquid chromatography has been largely used during the past two decades. By using affinity chromatography, α -AT and β -AT could be separated based on differences in the binding strength to heparin [12,16,17]. Heparin affinity chromatography was also used to separate native from latent form since the latter has a much lower affinity for heparin [12,18-20]. Hydrophobic interaction chromatography allowed successful separation of native and latent forms [19,21,22]. However, all these chromatographic methods did not allow to separate dimeric forms of AT.

Electrophoretic methods like isoelectric focusing (IEF) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) have been frequently used to analyze AT. IEF techniques allowed separating more than six AT glycoforms with their pI determination [23-25]. SDS-PAGE, urea-PAGE [6,11,12,18] and native PAGE [8,11,19,26] were capable of differentiating native, latent, and dimeric forms. However, these electrophoretic methods are time-consuming, have a poor reproducibility, and a precise quantification is not possible.

Up to now, very few capillary electrophoresis (CE) methods have been reported for the analysis of AT. Twenty years ago, capillary isoelectric focusing (CIEF) was proposed to partially separate up to six AT isoforms, but which were probably glycoforms and not conformers [23,24]. In 2001, Dönges et al developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with a background electrolyte (BGE) composed of SDS micelles [27,28]. Only two peaks, corresponding to α -AT and β -AT, were separated. Furthermore, the BGE employed was very alkaline and SDS is a denaturant molecule. In 2003, Kremser et al. developed a CZE method allowing the separation of six AT glycoforms but, in this case, the BGE was very acidic and contained a high quantity of urea, a chaotropic agent [26]. Finally, none of these CE methods was capable of differentiating AT conformers and dimeric forms under mild conditions necessary to maintain the initial proportion of each form in one AT preparation.

With the aim to preserve the conformation of AT conformers but also the non-covalently bound dimeric complexes, we developed a new CZE method employing near-physiological conditions. This CZE method allowed separating, with a good resolution, more than eight species in therapeutic AT preparations. Several of these peaks were identified as AT conformers and heterodimers. In order to provide a reproducible method that could be used in quality control, inter-run rinse protocols were carefully optimized. Intra-day, inter-day and inter-capillary repeatabilities were studied. Finally, the optimized CZE method was applied to the comparison of five AT preparations obtained from competitors.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and AT samples

Sodium hydroxide, hydrochloric acid, polyethylene oxide (PEO, average Mw 200,000) were obtained from ProLabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium hydroxide 28 % (v/v), acetic acid and thiourea were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Sodium dihydrogen phosphate monohydrate was from Carlo Erba Reagents (Cornaredo, Italy).

The different AT preparations Aclotine[®] (LFB), Anbinex[®] (Grifols), Kybernin P[®] (CSL Behring), Atenativ[®] (Octapharma), ATIII[®] (Baxter) were reconstituted following recommendations from the provider, and were all stored at -20°C before use. Each marketed AT preparation was desalted by centrifugation on a Vivaspin[®] 500 filter with a 5 kDa cut-off (Sartorius Stedim Biotech, Germany) by applying 6 rinse steps with Milli-Q water.

All buffers and samples used for CE analyses were prepared with Milli-Q water using a Direct-Q 3 UV purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Before use, all buffers were filtered through a 0.2 µm Millex membrane (Millipore).

2.2. Preparation of AT latent and heterodimeric forms

AT preparations enriched with either latent or heterodimeric forms were prepared as previously described by Karlsson et al. [19]. Briefly, Aclotine[®] was dialyzed against 5 mM HEPES, 0.9 M ammonium sulfate, pH 7.4 using 30000 MWCO Vivaspin 15R (Sartorius Stedim Biotech, Germany), and diluted to a concentration of 2.5 g/L in this buffer, followed by heating at 60°C for 9 h and 72 h to prepare heterodimeric and latent forms, respectively. The reaction mixtures were then concentrated and dialyzed against serum-free DMEM buffer (Gibco) using 30000 MWCO Vivaspin 15R. The final concentrations of latent and heterodimer-enriched preparations were 13.65 and 14.25 g/L, respectively.

The preparations of heterodimer and latent forms were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using a 10 % polyacrylamide gel containing either 6 M urea (urea PAGE) or no urea (native PAGE), as previously described [29,30]. Urea PAGE analysis

showed a clear separation of latent and native AT based on their own electrophoretic mobility, the latent conformer having a higher electrophoretic mobility under these experimental conditions. Native PAGE was used to differentiate native, latent and heterodimeric forms. The heterodimeric forms exhibited a lower electrophoretic mobility compared to native and latent forms, as previously described [8].

2.3. CE system

2.3.1. CE apparatus and method

CE experiments were carried out on a P/ACE MDQ capillary electrophoresis instrument (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Bare fused-silica capillaries with an internal and external diameter of 50 and 375 μm , respectively, were purchased from Composite Metal Services (Ilkley, UK). The effective and total lengths were 50 and 60.2 cm, respectively. New fused-silica capillaries were coated with PEO according to the procedure previously described [31]. Briefly, the capillary was rinsed with water (5 min), 0.1 N NaOH (5 min), 1 N HCl (10 min), water (10 min), 0.2 % (w/v) PEO solution in 0.1 N HCl (5 min) and water (5 min). At the end of each analysis, the capillary was rinsed with water (3 min), 1 mM SDS (3 min), water (5 min), 0.1 N NaOH (3 min), and water (3 min). The BGE consisted of 50 mM ammonium acetate, pH 7.4. The different AT samples (commercial solutions, latent or heterodimer-enriched preparations) at a concentration of 1.5 g/L (26 μM) were hydrodynamically injected with a pressure of 0.5 psi for 10 s. The separation was performed under a negative voltage of -25 kV and the capillary temperature was maintained at 25°C. UV detection was performed at 214 nm.

2.3.2. Validation of the method

For intra-day repeatability studies, one batch of the same AT was analyzed five successive times, the same day on the same capillary. Relative standard deviations (RSDs) for migration times and peak areas were calculated for all the separated peaks from these five analyses, and the highest RSDs values were used to evaluate the repeatability. For inter-day repeatability, one batch of the same AT was analyzed once a day, over five different days on the same capillary, and the RSDs were calculated from these five analyses. For inter-capillary

repeatability, three capillaries were used. One batch of the same AT was analyzed twice on each capillary and the RSDs were estimated from the six analyses.

For statistical tests, the homogeneity of variance was checked with Cochran's test. Analysis of variance (ANOVA) parametric tests and multiple range tests were performed.

3. Results and discussion

Only a few CE methods have been reported in the literature to analyze AT, and all the previously reported works allowed only to separate glycoforms, and not AT conformers. This can be explained by the analytical conditions employed, which were either too acidic or too alkaline [26,27]. With the aim to preserve the conformation of AT, and to obtain a good separation of the AT forms, we selected a background electrolyte at physiological pH (i.e., 7.4) and a neutral polyethylene oxide (PEO) coated capillary. This capillary coating allowed to significantly decrease the electroosmotic (EOF) flow, and to minimize protein adsorption. Different ammonium-based BGE were tested: ammonium citrate, acetate, formate and bicarbonate. All these BGE at pH 7.4 allowed separating several peaks from one preparation of Aclotine[®]. However, the best profiles were obtained with ammonium acetate, with more than eight peaks separated. We therefore selected this BGE and optimized the ionic strength. Finally, a BGE composed of 50 mM ammonium acetate gave the best resolution. Higher concentrations of ammonium acetate, like 75 mM, did not improve the resolution.

3.1. Peak identification

Figure 2 presents the UV-CZE profile of Aclotine[®] obtained using a BGE composed of 50 mM ammonium acetate at pH 7.4 and a neutral PEO coated capillary. More than eight peaks are separated. Peak 3 exhibits a shoulder named 3'. The highest peak (i.e., peak 5) was supposed to be the native (active) form of AT.

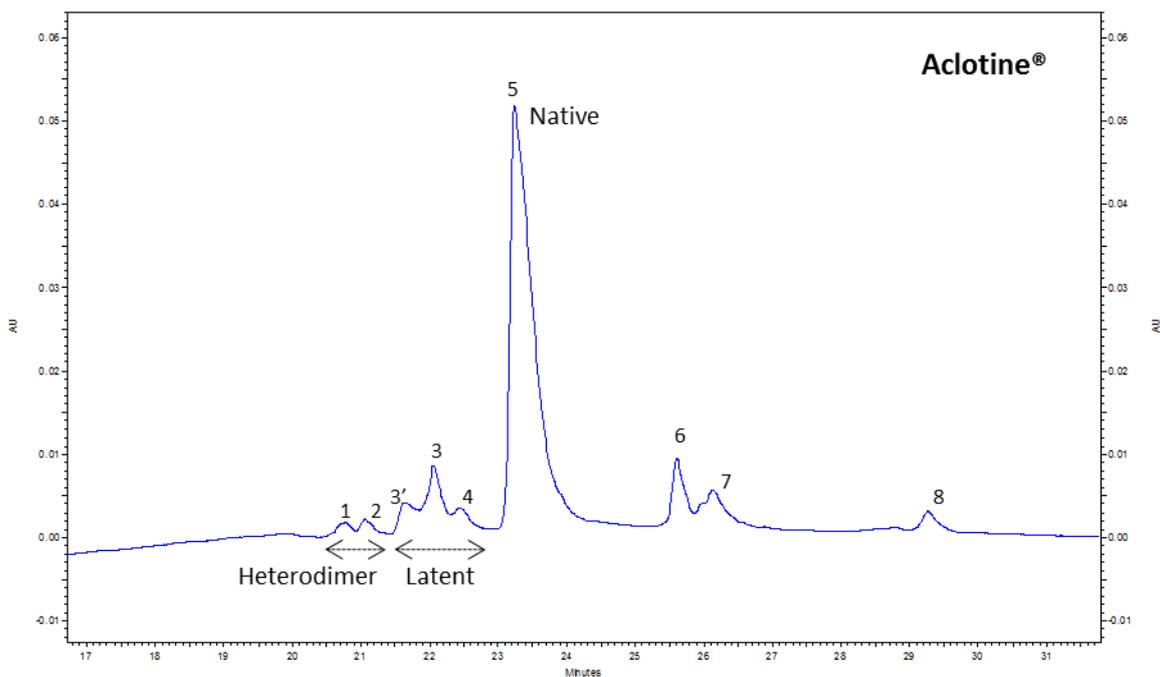


Fig.2. Analysis of Aclotine[®] (LFB) with the developed CZE method. Analytical conditions: PEO coated capillary with an internal diameter of 50 μ m and a total length of 60.2 cm; BGE, 50 mM ammonium acetate pH 7.4; UV detection at 214 nm.

In order to identify the peaks, we prepared AT samples enriched in latent or heterodimeric forms by heating a sample of Aclotine[®]. Aclotine[®], which mainly contains the native form (more than 70 % as determined by SDS-PAGE), was used as a reference. A buffer exchange was performed to have Aclotine[®] in the same medium as latent or heterodimer-enriched preparations. We then analyzed heterodimer-enriched and latent-enriched preparations individually with the CZE method. Equimolar mixtures of native and heterodimeric forms as well as native and latent forms were also analyzed.

As shown in Figure 3A, the CZE profiles of the heterodimer-enriched and latent-enriched preparations both presented several peaks migrating more rapidly than the native form. In both profiles the peak supposed to correspond to the native form of AT was strongly decreased. The analysis of an equimolar mixture of latent and native forms led to a profile with a very little quantity of native form, and a significant increase of the peak areas corresponding to the faster migrating species that we attributed to the heterodimer. This is in good agreement with what is described in the literature [8]. Indeed, when native and latent forms of AT are mixed together in equimolar quantity, they associate to form heterodimers. Finally, the different CZE profiles obtained led us to conclude that the heterodimer had the

highest electrophoretic mobility, while the latent form migrated between the heterodimer and native forms. Figure 3B shows the very good agreement between the peaks separated in the latent-enriched preparation and the peaks separated in front of the native form in Aclotine[®]. We concluded from all these experiments that peaks 1 and 2 could be related to the heterodimer, peaks 3', 3 and 4 to the latent form, and peak five to the native form. Peaks 6, 7 and 8 were supposed to be AT glycoforms based on literature data and experiments we carried out by CE-MS (data not shown).

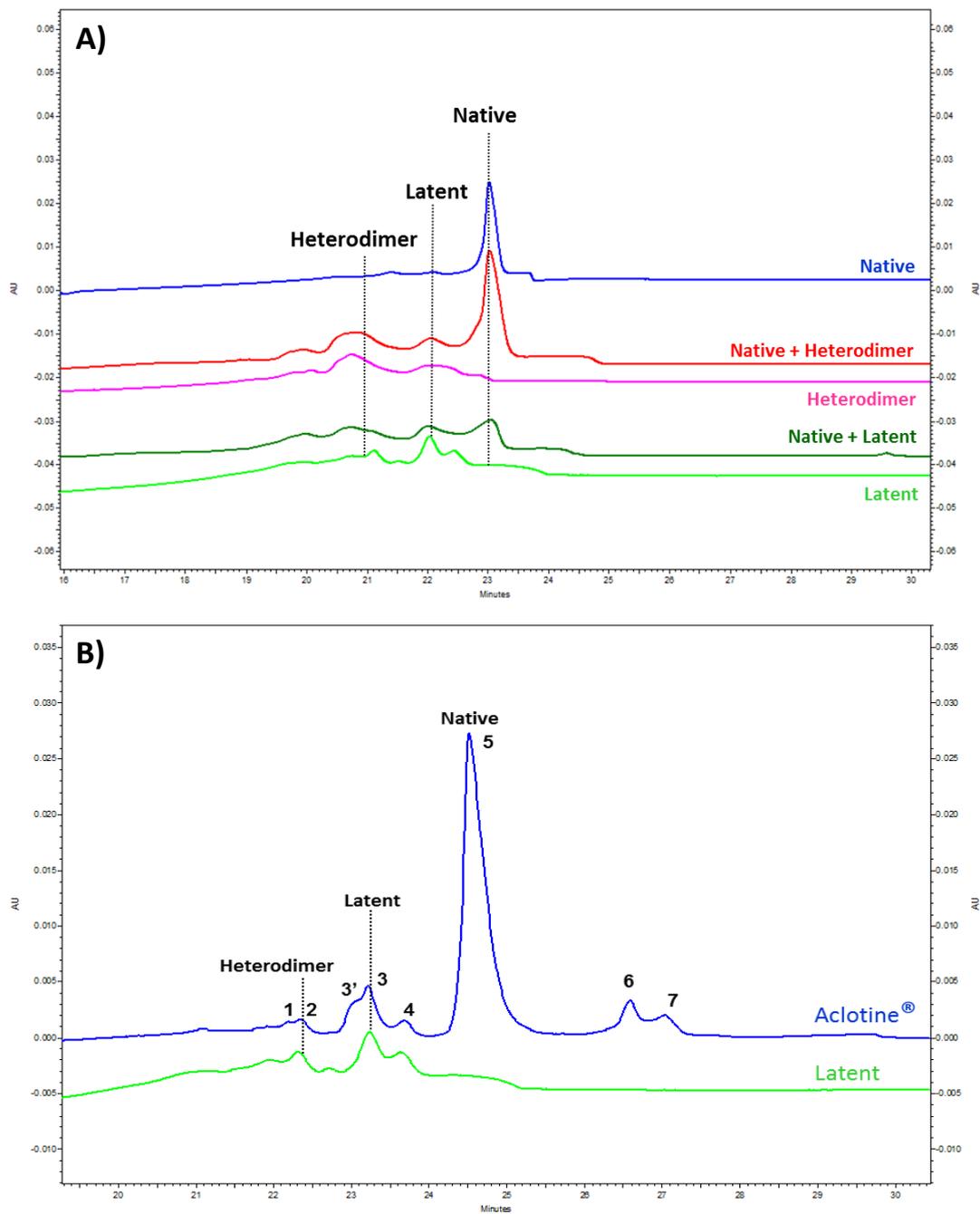


Fig.3. Identification of the peaks separated by the CZE method. A) Analyses of latent or heterodimer-enriched preparations, and mixtures of native and latent or heterodimer-enriched preparations. B) Analyses of Aclotine[®] and latent-enriched preparation. The analytical conditions are the same as Figure 2.

3.2. Optimization of the method

The first experiments performed with only a short rinse of water at the end of each analysis gave a good intra-day repeatability (RSDs less than 0.4 and 3.6 % for migration times (t_m) and peak areas, respectively), but a poor inter-day repeatability for peak areas (RSDs ≥ 10 %). In order to improve the repeatability of the CZE method, different inter-run rinse protocols were tested with SDS solutions at different concentrations combined with 0.1 N NaOH. The introduction of an equilibration step with BGE, and the replenishment of the BGE between each analysis, to avoid a depletion effect, were also investigated. As indicated in Table 1, the best results were obtained with the protocol which included a rinse step with 1 mM SDS followed by one with 0.1 N NaOH. Higher concentrations of SDS were tested but led to a deformation of the separated peaks and a loss of resolution, probably due to the damage of the PEO coating [32]. We therefore selected this inter-run rinse protocol and studied inter-day and inter-capillary repeatabilities. For inter-day repeatability, the RSDs obtained were less than 0.9 and 4 % for t_m and peak areas, respectively. For inter-capillary repeatability, three capillaries were compared over three different days. The RSDs obtained were less than 0.7 and 5 % for t_m and peak areas, respectively. The values obtained for inter-day and inter-capillary repeatabilities were thereby considered quite satisfactory.

Table 1. Comparison of different inter-run rinse protocols. The different inter-run rinses were performed after each analysis.

| Inter-run rinse protocols* | Intra-day repeatability RSD % (n=5) | |
|---|--|-----------|
| | t_m | peak area |
| Water (3 min) | 0.39 | 3.58 |
| 0.1 N NaOH (3 min) 1 mM SDS (3 min) Water (3 min) | 1.16 | 3.40 |
| 1 mM SDS (3 min) 0.1 N NaOH (3 min) Water (3 min) | 0.50 | 2.16 |
| BGE (3 min) and V = + 25kV (5 min) Water (3 min) | 0.81 | 5.43 |
| Fresh vials of BGE and inter-run rinse with water (3 min) | 0.60 | 3.90 |

* all inter-run rinse protocols begin with a rinse with water (3 min). A rinse with water (3 or 5 min) was systematically inserted between SDS and NaOH rinses.

3.3. Comparison of competitive AT preparations

We applied the optimized CZE method to the comparison of AT preparations produced by five pharmaceutical companies. To study the impact of the excipients contained in the different marketed preparations on the separation, a filtration was performed. For each commercial AT, no significant differences were observed between the profiles of the filtered and non-filtered samples, indicating that the excipients did not interfere neither with the separated AT forms, nor with the relative intensity of the peaks of interest. To compare the five AT drugs from one to another, we therefore chose to directly analyze them, without the filtration step. Each AT batch was analyzed five successive times the same day on the same capillary. The CZE profiles of Aclotine and Anbinex were very similar. The CZE profiles of Kybernin, Atenativ and Baxter's ATIII showed slight differences compared to those of Aclotine and Anbinex (Fig. 4). In particular, the peak of the native form in Baxter's preparation exhibited two not well-resolved additional peaks.

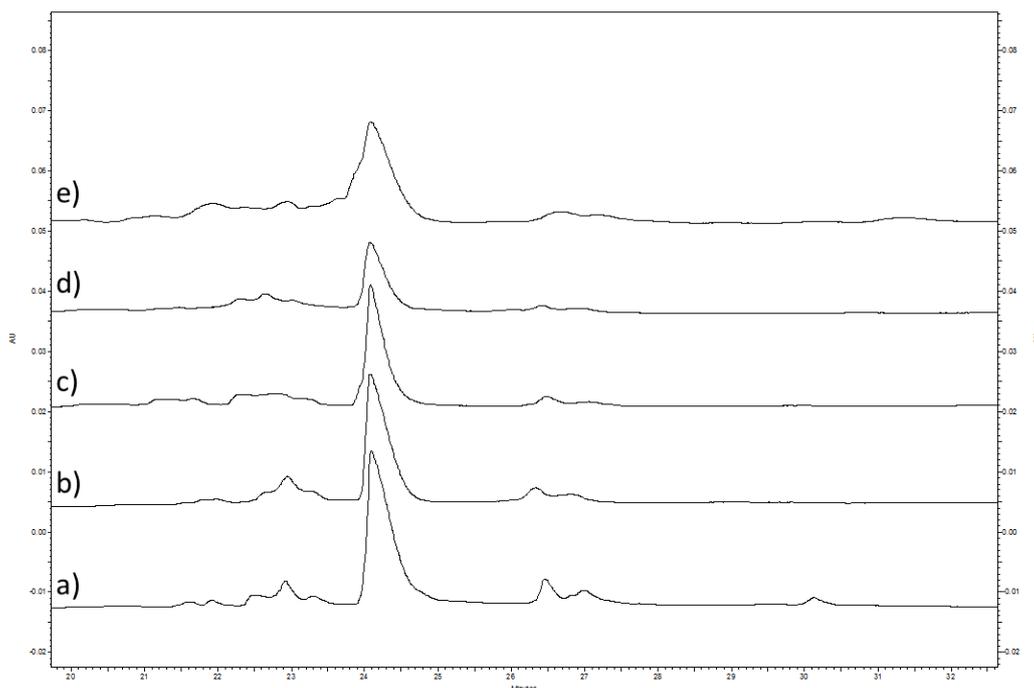


Fig.4. Analyses of five competitive AT preparations with the developed CZE method : a) Aclotine[®] (LFB), b) Anbinex[®] (Grifols), c) Kybernin[®] (CSL Behring), d) Atenativ[®] (Octapharma), e) ATIII[®] (Baxter). For analytical conditions, see Figure 2.

For each marketed AT preparation, t_m and corrected peak areas of the separated peaks were measured and compared. Figure 5 shows Box-and-Whisker plot representations for heterodimeric (peaks 1 and 2), latent (peaks 3', 3 and 4) and native (peak 5) forms. The quantities of heterodimer in four preparations (Aclotine, Anbinex, Atenativ and Baxter's AT) were rather similar with values between 2.1 and 2.4 %. The quantity of heterodimer in Kybernin was four times higher than that contained in the other preparations (i.e., 8.0 %). The proportion of latent form was much more different from one preparation to another, varying from 13.5 to 21 %. Aclotine and Baxter preparations contained the lowest quantities of latent form (13.63 and 13.51, respectively), whereas Kybernin and Atenativ contained the highest (20.30 and 21.07, respectively). A Cochran's test proved the homogeneity of variance between the different AT preparations, with a P-value greater than 0.05 at the 95 % confidence level. ANOVA parametric test was performed and showed that the quantity of latent form was significantly different from one AT preparation to another at the 95 % confidence level, since the P-value of Fischer's test was less than 0.05. Multiple range tests were also performed to compare AT preparations by pair. These tests showed that the quantity of latent form in Aclotine and Baxter preparations was not significantly different at the 95 % confidence level.

The proportion of the native form in the different AT preparations varied from 63 to 73 %. Three AT preparations (Aclotine, Anbinex and Baxter's AT) contained more than 71 % of native form (73.05, 71.47 and 72.33, respectively). A Cochran's test proved the homogeneity of variance between the different AT preparations, with a P-value greater than 0.05 at the 95 % confidence level. ANOVA parametric test was performed and showed that the quantity of native form was significantly different from one AT preparation to another at the 95 % confidence level, since the P-value of Fischer's test was less than 0.05. Multiple range tests proved that the quantity of native form in Aclotine, Anbinex and Baxter preparations was significantly different at the 95 % confidence level.

Finally, Aclotine from LFB was shown to contain one of the highest quantities of native form, and very low quantities of heterodimeric forms compared to the other preparations. Latent forms were at the lowest levels in Aclotine and Baxter formulations. Conversely, Kybernin was shown to contain the highest quantity of heterodimeric form, and one of the highest quantities of latent form.

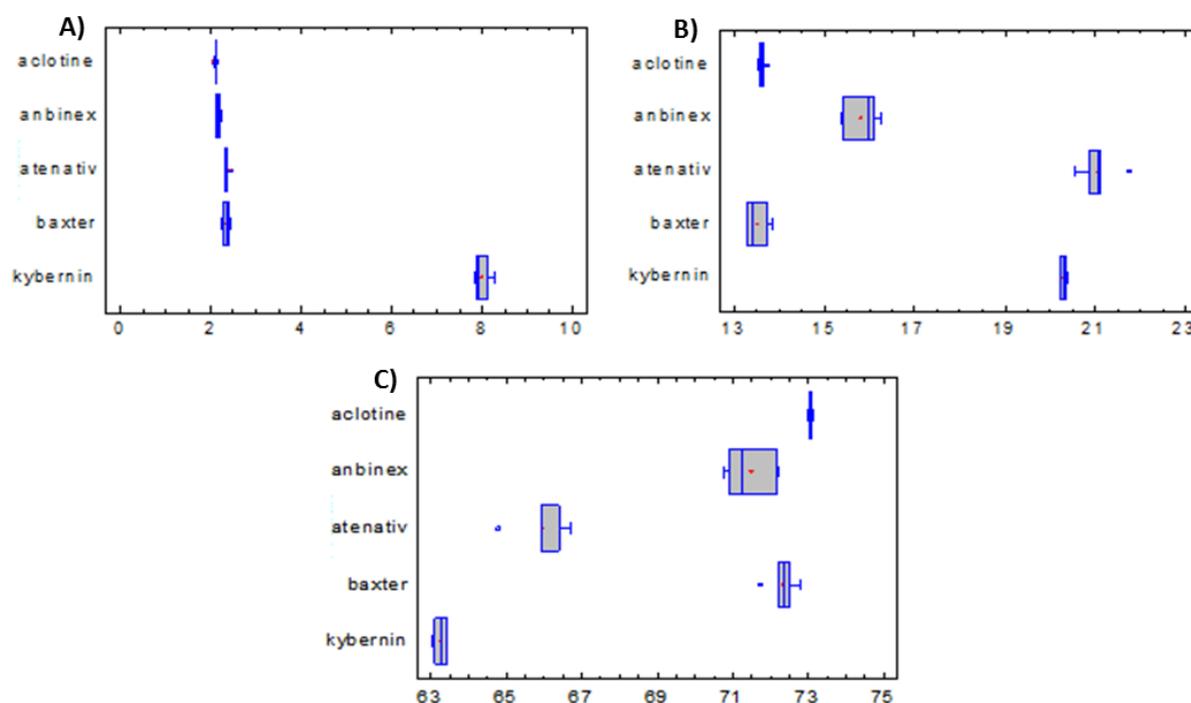


Fig.5. Comparison of the quantities of the different AT forms in the AT preparations obtained from five competitors. Box-and-Whisker plot representations of A) heterodimers, B) latent forms, and C) native forms.

4. Conclusion

The developed CZE method allowed separating more than eight peaks in pharmaceutical preparations of antithrombin. The analytical conditions, close to physiological ones, allowed to preserve as much as possible the conformation of the protein. Five peaks were identified as being AT conformers (native and latent) and heterodimeric forms. The method was validated in term of intra-day, inter-day and inter-capillary repeatability. The CZE method could highlight important differences in the proportion of each AT form and conformers of different AT preparations obtained from five competitors. Three preparations showed to contain a high quantity of native form (> 71 %). One AT preparation showed to contain a very high proportion of heterodimer (four times higher than that contained in the other AT preparations). Two preparations were found to contain high quantities of latent form (> 20 %). In addition, one AT preparation exhibited additional peaks, and further experiments are required to identify them.

Acknowledgments

This work and the PhD fellowship of A.L. Marie were supported by the French National Agency of Research (ANR2011-RPIB N°01803, THERAT project). The authors would like to thank Béatrice Catieau for her technical support.

The authors declared conflict of interest with LFB Biotechnologies since they worked together on a French National Agency of Research funded project dealing with antithrombin.

References

- [1] J.A. Huntington, R.J. Read, R.W. Carrell, Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation, *Nature* 407 (2000) 923-926.
- [2] L. Jin, J.P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R.N. Pike, R.W. Carrell, The anticoagulant activation of antithrombin by heparin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 14683-14688.
- [3] E. Ersdal-Badju, A. Lu, Y. Zuo, V. Picard, S.C. Bock, Identification of the antithrombin III heparin binding site, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19393-19400.
- [4] K. Cai, W.P. Osheroff, G. Buczynski, J. Hotta, J. Lang, E. Elliott, D.C. Lee, N.J. Roth, Characterization of Thrombate III[®], a pasteurized and nanofiltered therapeutic human antithrombin concentrate, *Biologicals* 42 (2014) 133-138.

- [5] M.R. Wardell, W.S.W. Chang, D. Bruce, R. Skinner, A.M. Lesk, R.W. Carrell, Preparative induction and characterization of L-antithrombin: a structural homologue of latent plasminogen activator inhibitor-1, *Biochemistry* 36 (1997) 13133-13142.
- [6] A. Mushunje, G. Evans, S.O. Brennan, R.W. Carrell, A. Zhou, Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 2170-2177.
- [7] R.W. Carrell, P.E. Stein, G. Fermi, M.R. Wardell, Biological implications of a 3Å structure of dimeric antithrombin, *Structure* 2 (1994) 257-270.
- [8] A. Zhou, J.A. Huntington, R.W. Carrell, Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis, *Blood* 94 (1999) 3388-3396.
- [9] J.C. Whisstock, G.A. Silverman, P.I. Bird, S.P. Bottomley, D. Kaiserman, C.J. Luke, S.C. Pak, J.M. Reichhart, J.A. Huntington, Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 24307-24312.
- [10] D.J.D. Johnson, J. Langdown, W. Li, S.A. Luis, T.P. Baglin, J.A. Huntington, Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35478-35486.
- [11] J. Corral, J. Rivera, J.A. Guerrero, A. Miñano, I. Alberca, D. Hernández-Espinosa, A. Ordóñez, C. Martínez, L. Navarro-Núñez, R. González-Conejero, M.L. Lozano, V. Vicente, Latent and polymeric antithrombin: clearance and potential thrombotic risk, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 232 (2007) 219-226.
- [12] A. Heger, T. Grunert, P. Schulz, D. Josic, A. Buchacher, Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography, *Thromb. Res.* 106 (2002) 157-164.
- [13] T.F. Busby, D.H. Atha, K.C. Ingham, Thermal denaturation of antithrombin III: stabilization by heparin and lyotropic anions, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 12140-12147.
- [14] J.A. Huntington, T.J. Sendall, M. Yamasaki, New insight into serpin polymerization and aggregation, *Prion* 3 (2009) 12-14.
- [15] M. Yamasaki, W. Li, D.J.D. Johnson, J.A. Huntington, Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization, *Nature* 455 (2008) 1255-1259.
- [16] C.B. Peterson, M.N. Blackburn, Isolation and characterization of an antithrombin III variant with reduced carbohydrate content and enhanced heparin binding, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 610-615.
- [17] B. Turk, I. Brieditis, S.C. Bock, S.T. Olson, I. Björk, The oligosaccharide side chain on Asn-135 of α -antithrombin, absent in β -antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change, *Biochemistry* 36 (1997) 6682-6691.

- [18] H. Larsson, P. Åkerud, K. Nordling, E. Raub-Segall, L. Claesson-Welsh, I. Björk, A novel anti-angiogenic form of antithrombin with retained proteinase binding ability and heparin affinity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11996-12002.
- [19] G. Karlsson, S. Winge, Preparative conversion of native human antithrombin to the latent form, *Protein Expr. Purif.* 26 (2002) 106-110.
- [20] G. Karlsson, S. Winge, Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 339-345.
- [21] G. Karlsson, S. Winge, Separation of native and latent forms of human antithrombin by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, *Protein Expr. Purif.* 21 (2001) 149-155.
- [22] S. Mochizuki, K. Miyano, M. Kondo, M. Hirose, A. Masaki, H. Ohi, Purification and characterization of recombinant human antithrombin containing the prelatent form in Chinese hamster ovary cells, *Protein Expr. Purif.* 41 (2005) 323-331.
- [23] O.W. Reif, R. Freitag, Control of the cultivation process of antithrombin III and its characterization by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 383-394.
- [24] A. Buchacher, P. Schulz, J. Choromanski, H. Schwinn, D. Josic, High-performance capillary electrophoresis for in-process control in the production of antithrombin III and human clotting factor IX, *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 355-366.
- [25] A. Plematl, U.M. Demelbauer, D. Josic, A. Rizzi, Determination of the site-specific and isoform-specific glycosylation in human plasma-derived antithrombin by IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS, *Proteomics* 5 (2005) 4025-4033.
- [26] L. Kremser, A. Brückner, A. Heger, T. Grunert, A. Buchacher, D. Josic, G. Allmaier, A. Rizzi, Characterization of antithrombin III from human plasma by two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoretic methods, *Electrophoresis* 24 (2003) 4282-4290.
- [27] R. Dönges, J. Römisch, H. Stauss, D. Brazel, Separation of antithrombin III variants by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 307-313.
- [28] J. Römisch, R. Dönges, H. Stauss, D. Inthorn, D. Mühlbayer, M. Jochum, J.N. Hoffmann, Quantification of antithrombin isoform proportions in plasma samples of healthy subjects, sepsis patients, and in antithrombin concentrates, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 32 (2002) 143-150.
- [29] N.J. Beauchamp, R.N. Pike, M. Daly, L. Butler, M. Makris, T.R. Dafforn, A. Zhou, H.L. Fitton, F.E. Preston, I.R. Peake, R.W. Carrell, Antithrombins Wibble and Wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation, *Blood* 92 (1998) 2696-2706.

[30] J. Corral, J.A. Huntington, R. González-Conejero, A. Mushunje, M. Navarro, P. Marco, V. Vicente, R.W. Carrell, Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 931-939.

[31] A.L. Marie, C. Przybylski, F. Gonnet, R. Daniel, R. Urbain, G. Chevreux, S. Jorieux, M. Taverna, Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin, *Anal. Chim. Acta* 800 (2013) 103-110.

[32] Y. Alahmad, N.T. Tran, I. Le Potier, E. Forest, S. Jorieux, M. Taverna, A new CZE method for profiling human serum albumin and its related forms to assess the quality of biopharmaceuticals, *Electrophoresis* 32 (2011) 292-299.

IV.C. Discussion

Les méthodes CZE développées ont permis de séparer un grand nombre de formes dans des préparations commerciales d'albumine et d'antithrombine thérapeutiques issues du fractionnement plasmatique. Dans le cas de l'albumine, ces formes correspondent majoritairement à des formes apparentées de la protéine, alors que pour l'AT, plusieurs des formes séparées correspondent à des conformères et dimères de l'AT. Ces méthodes présentent différents avantages. Tout d'abord, elles utilisent des conditions douces proches des conditions physiologiques, sans solvants organiques. Elles permettent donc de ne pas dénaturer les protéines ou provoquer des changements conformationnels durant l'analyse, comme cela est fréquemment observé avec des méthodes RP-HPLC. D'autre part, les deux méthodes CZE développées se distinguent par le nombre élevé de formes que l'on peut séparer et détecter en une seule analyse. Ces méthodes sont reproductibles, présentent une résolution élevée, et permettent de quantifier les formes détectées. En effet, les deux méthodes CZE développées reposent sur l'utilisation d'un revêtement polymérique neutre de la silice dont les protocoles de génération et régénération ont été largement optimisés, et qui limite grandement l'adsorption des protéines tout en maintenant un certain flux électroosmotique bénéfique à l'efficacité des pics. De plus, ce sont des méthodes relativement rapides, peu consommatrices d'échantillon et faciles à mettre en place. Elles peuvent donc être appliquées à du contrôle de routine pour évaluer la qualité du produit fini.

La méthode CZE développée pour analyser l'HSA thérapeutique a permis de montrer une grande différence de composition entre différentes HSA commerciales, certaines contenant une faible quantité de forme native et de grandes quantités de formes oxydées et/ou glyquées. Nous pouvons supposer que la composition d'une préparation d'HSA commerciale (formes native et apparentées) peut avoir un impact sur l'activité thérapeutique du médicament. Cela expliquerait pourquoi les résultats de certaines études cliniques telles que l'étude CRYCO (Schortgen 2008) et l'étude SAFE (Finfer 2011), réalisées en vue d'étudier les bénéfices thérapeutiques de l'HSA dans le cadre du sepsis sévère ou de maladies du rein, se sont montrés discordants, sachant qu'elles ont été réalisées avec des lots d'HSA plasmatique de provenance différente, et que ces lots n'ont pas été caractérisés d'un point de vue analytique avant leur utilisation. Il est extrêmement difficile de corréler l'activité thérapeutique d'une préparation d'HSA commerciale avec sa composition. Pour cela, il faudrait pouvoir isoler chaque forme d'albumine et faire des essais cliniques avec des préparations contenant telle ou

telle forme. Nous pouvons cependant émettre quelques hypothèses. Il semblerait que les effets bénéfiques de l'HSA sur des patients atteints de sepsis sévère ou de maladies du foie soient dus en grande partie à ses propriétés antioxydantes (Quinlan 2004, Roche 2008). Or, lorsque la préparation d'HSA commerciale contient un taux élevé de formes oxydées au niveau de la cystéine 34, on peut supposer que le pouvoir antioxydant de cette préparation sera réduit. De même, la présence de formes tronquées en N-terminal va diminuer les capacités antioxydantes de la protéine car ces formes tronquées ne peuvent plus lier des métaux catalyseurs de réactions d'oxydation, tels que le cuivre.

Concernant l'antithrombine thérapeutique, la méthode CZE développée a permis également de mettre en évidence de grandes différences entre des préparations d'AT commerciales provenant de fournisseurs différents. En particulier, il a été montré que certaines préparations contenaient des quantités élevées de formes latentes et/ou hétérodimériques. Or, il est connu que les formes latentes et hétérodimériques de l'AT sont des formes non-inhibitrices des protéases de la coagulation, donc ne possédant pas de pouvoir anticoagulant (Zhou 1999, Wardell 1997). Cependant, il n'est pas à exclure que ces formes puissent jouer un rôle dans les effets anti-inflammatoires de l'AT parfois observés lors d'études cliniques (Borgel 2013, Levi 2008). A l'heure actuelle, les propriétés anti-inflammatoires de l'AT sont encore difficiles à démontrer et les mécanismes biologiques mis en jeu ne sont pas complètement éclaircis. Un des objectifs du projet THERAT est justement d'évaluer le rôle de la forme latente dans les fonctions cytoprotectrices de la protéine en produisant un variant dont la transition vers la forme latente serait diminuée, par création de ponts disulfures entre certains feuillets de la protéine par mutagénèse ciblée.

Chapitre 5 : Développement de méthodes CE-MS pour caractériser l'AT plasmatique

Nous avons entrepris, pour différentes raisons, d'analyser l'AT plasmatique à l'aide d'un couplage CE-MS avec un spectromètre de masse hybride quadripôle-temps de vol (Q-TOF) et une interface à ionisation électrospray (ESI). Tout d'abord, bien que la glycosylation de l'AT plasmatique soit déjà bien décrite dans la littérature (voir section V.A.2.), aucune étude n'a été réalisée avec un spectromètre de masse Q-TOF et les seules analyses effectuées avec un TOF ont utilisé non pas une ionisation ESI mais une ionisation MALDI (Amon 2006, Ullmer 2006, Demelbauer 2005, Kleinova 2004). De plus, seulement deux articles relatent l'utilisation d'un couplage CE-MS pour l'analyse d'AT plasmatique (Demelbauer 2004 a, Amon 2006). Enfin, la plupart des analyses de l'AT par spectrométrie de masse ont été réalisées non pas sur de la protéine intacte mais sur des glycopeptides, après digestion enzymatique de l'AT. Il semblait donc intéressant de voir ce que pourraient apporter des analyses CE-MS avec de l'ESI-Q-TOF sur de l'AT non digérée, non seulement par rapport aux types de glycoformes détectées, mais également par rapport aux formes apparentées détectées. D'autre part, dans le cadre du projet THERAT, nous nous intéressions aux conformères et dimères de l'AT. Nous avons donc voulu savoir s'il serait possible de les détecter par CE-MS sachant qu'aucune méthode MS, LC-MS ou CE-MS n'a encore été décrite dans la littérature afin d'analyser des conformères ou dimères de l'AT. Enfin, un des objectifs de l'exploration du couplage CE-MS était lié à la méthode CZE développée, permettant de séparer plus de huit formes dans une préparation d'AT plasmatique commerciale (voir section IV.B.). Nous étions en effet désireux d'identifier les formes séparées par CZE à l'aide de la spectrométrie de masse.

Une première série d'expériences CE-ESI-Q-TOF-MS a été réalisée au sein de notre laboratoire parisien, puis une deuxième dans un laboratoire néerlandais. En effet, nous avons entrepris un travail en collaboration avec l'équipe du Professeur Govert Somsen (VU University, Amsterdam, Pays-Bas), qui m'a accueillie dans son laboratoire durant deux mois et demi. Le but de cette collaboration était de savoir s'il était possible de séparer les conformères et dimères de l'AT en ajustant certains paramètres de couplage CE-MS.

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2, en mode ESI positif (mode le plus couramment utilisé pour les protéines), il est beaucoup plus facile de travailler en conditions acides, en raison d'une meilleure efficacité d'ionisation. Des études CE-MS en conditions acides ont donc été réalisées. Nous espérons ainsi pouvoir détecter facilement l'AT et accéder à un grand nombre d'informations sur le type de glycoformes et formes apparentées présentes dans une préparation d'AT commerciale. Des études CE-MS en conditions basiques ont ensuite été effectuées afin tout d'abord de confronter les résultats obtenus en conditions acides et basiques, mais également pour tenter d'identifier les formes séparées par la méthode CZE développée, utilisant un tampon à pH physiologique. De plus, nous souhaitons explorer des conditions non-dénaturantes afin de préserver la conformation des monomères et dimères de l'AT.

La première partie de ce chapitre décrit les méthodes CE-MS que nous avons développées afin d'analyser les glycoformes et formes apparentées de l'AT, mais également ses formes dimériques. Ces analyses ont été réalisées en conditions acides ou basiques. En deuxième partie, un article que nous venons de rédiger décrit le développement d'une méthode CE-MS en conditions non-dénaturantes afin de séparer les conformères et dimères de l'AT.

V.A. Analyse des glycoformes et dimères de l'AT

V.A.1. Matériels et méthodes

Les analyses CE-MS ont été réalisées avec des spectromètres de masse quadripôle-temps de vol (Q-TOF) avec une interface à liquide additionnel permettant une ionisation ESI. Deux types de spectromètres de masse Q-TOF ont été utilisés lors de nos travaux : l'instrument Q-TOF 6540 de la société Agilent avec la nouvelle technologie Jetstream et le microTOF-Q de la société Bruker Daltonics. La conception de ces deux instruments n'est pas identique, à commencer par leurs sources ESI (voir Annexe 3).

Un capillaire greffé de manière semi-permanente par du PEO, tel que celui utilisé dans la méthode CZE développée (voir section IV.B.), n'a pas pu être utilisé pour le couplage CE-MS. En effet, un revêtement PEO greffé de manière semi-permanente n'est pas recommandé pour un couplage CE-MS puisque le PEO risque de polluer la source du spectromètre de masse. De plus, ce type de revêtement nécessite des régénérations au PEO entre les

différentes analyses et il aurait donc fallu découpler la CE de la MS entre chaque analyse. Nous avons tenté sans succès de préparer des capillaires greffés avec du PEO de manière permanente, en se basant sur un protocole décrit dans la littérature (Razunguzwa 2006). Cet échec est certainement dû au fait que le protocole n'était pas assez détaillé. D'autre part, nous avons eu l'occasion de préparer des revêtements HPC greffés de manière permanente pour certaines études CE-MS (voir article section IV.A.), mais ce type de revêtement est assez fastidieux à réaliser. Nous avons donc décidé d'utiliser un capillaire PVA commercial greffé de manière permanente.

V.A.1.a. CE-MS en conditions acides

Avec le spectromètre de masse Q-TOF 6540 de la société Agilent couplé à une CE 7100 d'Agilent, les conditions analytiques ont été les suivantes :

Paramètres CE :

- Capillaire PVA : L_{tot} , entre 85 et 125 cm ; Φ_1 50 μm
- Injection hydrodynamique d'AT à 130 μM : 4 sec à 0,7 psi
- Electrolyte support (BGE) : acide formique 100 mM, pH 3
- Tension : + 30 kV

Paramètres MS :

- Gaz séchant : 8 L/min
- T° du gaz séchant : 250°C
- Gaz de nébulisation : 10 psi
- Gaz additionnel : 3,5 L/min (le gaz additionnel est lié à la technologie Jetstream développée par Agilent, voir Annexe 3)
- V_{cap} : - 4000 V
- Débit du liquide additionnel : 8 $\mu\text{L}/\text{min}$

Le liquide additionnel (« Sheath Liquid », SL) utilisé a été un mélange isopropanol/eau 50:50 (v/v) avec 1 % d'acide formique.

Avec le spectromètre de masse microTOF-Q de la société Bruker couplé à une CE PA800+ de la société Beckman Coulter (nouvellement AB Sciex), les conditions analytiques ont été les suivantes :

Paramètres CE :

- Capillaire PVA : L_{tot} , 85 cm ; Φ_I 50 μm
- Injection hydrodynamique d'AT à 260 μM : 15 sec à 0,5 psi
- BGE : acide formique 100 mM, pH 3
- Tension : + 30 kV

Paramètres MS :

- Gaz séchant : 4 L/min
- T° du gaz séchant : 190°C
- Gaz de nébulisation : 4,4 psi
- Vcap : - 4500 V
- Débit du liquide additionnel : 3,33 $\mu\text{L}/\text{min}$

Le SL utilisé a été un mélange isopropanol/eau 50:50 (v/v) avec 0,1 % d'acide formique.

Quel que soit l'instrument utilisé, les analyses en conditions acides ont été réalisées sans pression additionnelle durant la CE.

V.A.1.b. CE-MS en conditions basiques

Les analyses en conditions basiques ont été réalisées avec le spectromètre de masse Q-TOF 6540 de la société Agilent couplé à une CE 7100 d'Agilent. Les conditions analytiques ont été les suivantes :

Paramètres CE :

- Capillaire PVA : L_{tot} , 85 cm ; Φ_I 50 μm
- Injection hydrodynamique d'AT à 130 μM : 5 ou 15 sec à 0,7 psi
- BGE : acétate d'ammonium 50 mM, pH 7,5
- Tension : + 20 ou - 20 kV
- Pas de pression additionnelle

Paramètres MS :

- Gaz séchant : 8 L/min
- T° du gaz séchant : 250°C
- Gaz de nébulisation : 10 psi

- Gaz additionnel : 3,5 L/min
- Vcap : - 4000 V
- Débit du liquide additionnel : 8 µL/min

Deux types de SL ont été utilisés :

- un mélange isopropanol/eau 50:50 (v/v) avec 5 mM d'acétate d'ammonium,
- une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM, pH 7,5.

Les différentes expériences en conditions acides et basiques ont été réalisées par analyse d'un échantillon d'AT plasmatique commercial (Aclotine[®]), stocké au congélateur à - 20°C avant son utilisation.

V.A.2. Identification de glycoformes et formes apparentées de l'AT

L'AT possède quatre sites de glycosylation (N96, N135, N155, N192). Depuis les travaux de Franzén montrant que les chaînes glycanes de la glycoforme principale de l'AT étaient composées de cinq hexoses (Hex), quatre N-acétylhexosamines (HexNAc) et deux acides sialiques (SiA) organisés en une structure bi-antennée (Franzén 1980, Edmunds 1998), de nombreuses autres glycoformes de l'AT ont été caractérisées. En effet, le groupe de Rizzi a étudié en détails la glycosylation de l'AT. Pour cela, diverses analyses ont été réalisées par MS (Ullmer 2006, Demelbauer 2005, Kleinova 2004, Demelbauer 2004 b) et MS couplée à la CE (Amon 2006, Demelbauer 2004 a) ou à la LC (Ullmer 2006, Plematl 2005), avec des modes d'ionisation ESI ou MALDI. Les analyses ont été effectuées soit sur de la protéine entière, soit sur des glycopeptides après digestion enzymatique de l'AT. Elles ont montré que, contrairement à ce qui avait été décrit auparavant, l'AT pouvait être fucosylée. De plus, elles ont révélé la présence de glycoformes minoritaires portant une chaîne glycanes tri-antennée. Il a été également observé que la plus grande variabilité de glycosylation se trouvait au niveau de l'asparagine 155 et que la fucosylation était au niveau de la N-acétylglucosamine (GlcNAc) reliée à cet acide aminé.

Nous allons maintenant présenter les analyses CE-MS que nous avons réalisées, non seulement pour étudier la glycosylation de l'AT avec un spectromètre de masse plus résolutif que celui utilisé classiquement par le groupe de Rizzi (qui était une trappe ionique couplée à un quadripôle), mais également détecter des formes apparentées de l'AT.

V.A.2.a. CE-MS en conditions acides

Quel que soit l'instrument utilisé (Agilent ou Bruker), les analyses CE-MS opérées en conditions acides ont permis de détecter l'AT avec une très bonne intensité de signal. De plus, ces analyses ont permis de séparer le groupe de glycoformes β -AT du groupe de glycoformes α -AT, comme le montre la figure 62 ci-dessous.

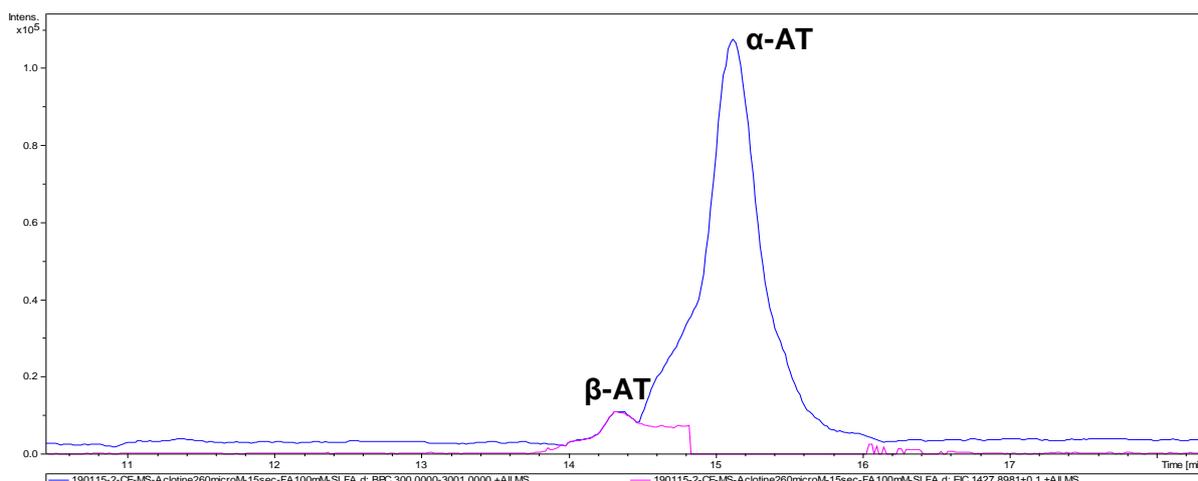


Figure 62 : Analyse CE-ESI-MS d'AT en conditions acides avec le microTOF-Q de Bruker (BPE entre 300 et 3000 m/z). Conditions analytiques : capillaire PVA (I.D. 50 μm , L_{tot} 85 cm) ; BGE : acide formique 100 mM, pH 3 ; SL : isopropanol/eau 50:50 (v/v) + 0,1 % d'acide formique, débit 3,33 $\mu\text{L}/\text{min}$; tension CE : +30 kV ; injection d'Acloctine[®] à 260 μM : 15 sec à 0,5 psi. Le tracé rose correspond à l'EIE à 1427,9 Da (état de charge 39+) associé à la glycoforme β -AT principale (MW_{exp} moyenne : 55650 Da).

A titre comparatif, nous avons réalisé quelques expériences par infusion directe. Comme attendu, ces analyses n'ont pas permis de séparer les deux groupes de glycoformes. Le couplage CE-MS est donc bénéfique. Nous aurions pu tenter d'optimiser les conditions de couplage CE-MS afin de séparer un nombre plus important de glycoformes de l'AT. Cependant, ces études ont déjà été effectuées par le groupe de Rizzi, qui est parvenu à séparer, par CE-MS, sept glycoformes de l'AT en conditions acides (Demelbauer 2004 a).

La figure 64 page 240 présente un exemple de spectromètre de masse, avant et après déconvolution, obtenu lors de nos travaux. Le pic principal détecté après déconvolution correspond à la glycoforme α -AT principale. La masse expérimentale de cette glycoforme (57858 Da) est en accord avec sa masse théorique. En effet, la masse théorique de la glycoforme α -AT principale, calculée à partir de la séquence d'acides aminés de l'AT et de

quatre chaînes glycanes d'une masse moyenne de 2206 Da, correspond à 57863 Da, ce qui donne une masse théorique de 57857 Da après soustraction des six hydrogènes perdus lors de la formation des trois ponts disulfures. En plus de cette glycoforme, de nombreuses glycoformes ont été détectées (Tableau 9). Certaines correspondent à des pertes d'acide sialique (-291 Da) et/ou de groupement HexHexNAc (-365 Da). D'autres sont des glycoformes fucosylées (+146 Da). Enfin, certaines correspondent à des glycoformes tri-antennées. Toutes ces glycoformes ont déjà été décrites dans la littérature (Plematl 2005, Demelbauer 2005, Demelbauer 2004 a). Cependant, les analyses CE-ESI-Q-TOF-MS ont permis de détecter quelques glycoformes d'AT peu ordinaires et pas encore décrites dans la littérature, qui portent deux acides sialiques successifs en bout de chaîne glycanes (Fig. 63). Ce type de glycoforme a déjà été décrit dans la littérature mais pour des protéines recombinantes et non plasmatiques (Haselberg 2013 b). Il semblerait également qu'une glycoforme d'AT porte trois acides sialiques successifs en bout de chaîne glycanes. Des oligomères d'acides sialiques en bout d'antenne de chaîne glycanes ont déjà été décrits dans la littérature (Yabe 2003) mais pas pour des glycoprotéines plasmatiques.

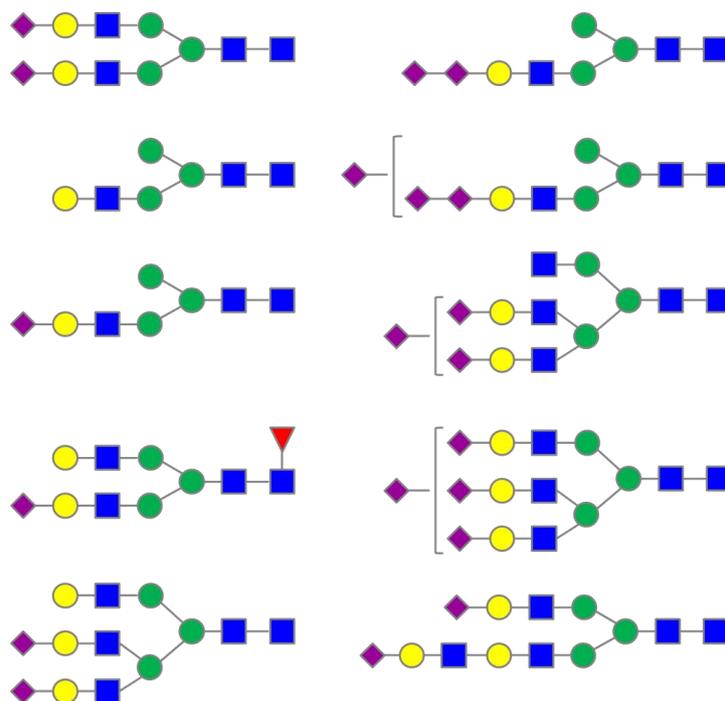


Figure 63 : Proposition de structures de glycoformes de l'AT détectées par CE-ESI-Q-TOF-MS en conditions acides. Triangle rouge : fucose, carré bleu : N-acétylglucosamine, rond vert : mannose, rond jaune : galactose, losange violet : acide sialique. A droite sont représentées des glycoformes d'AT peu ordinaires, pas encore décrites dans la littérature.

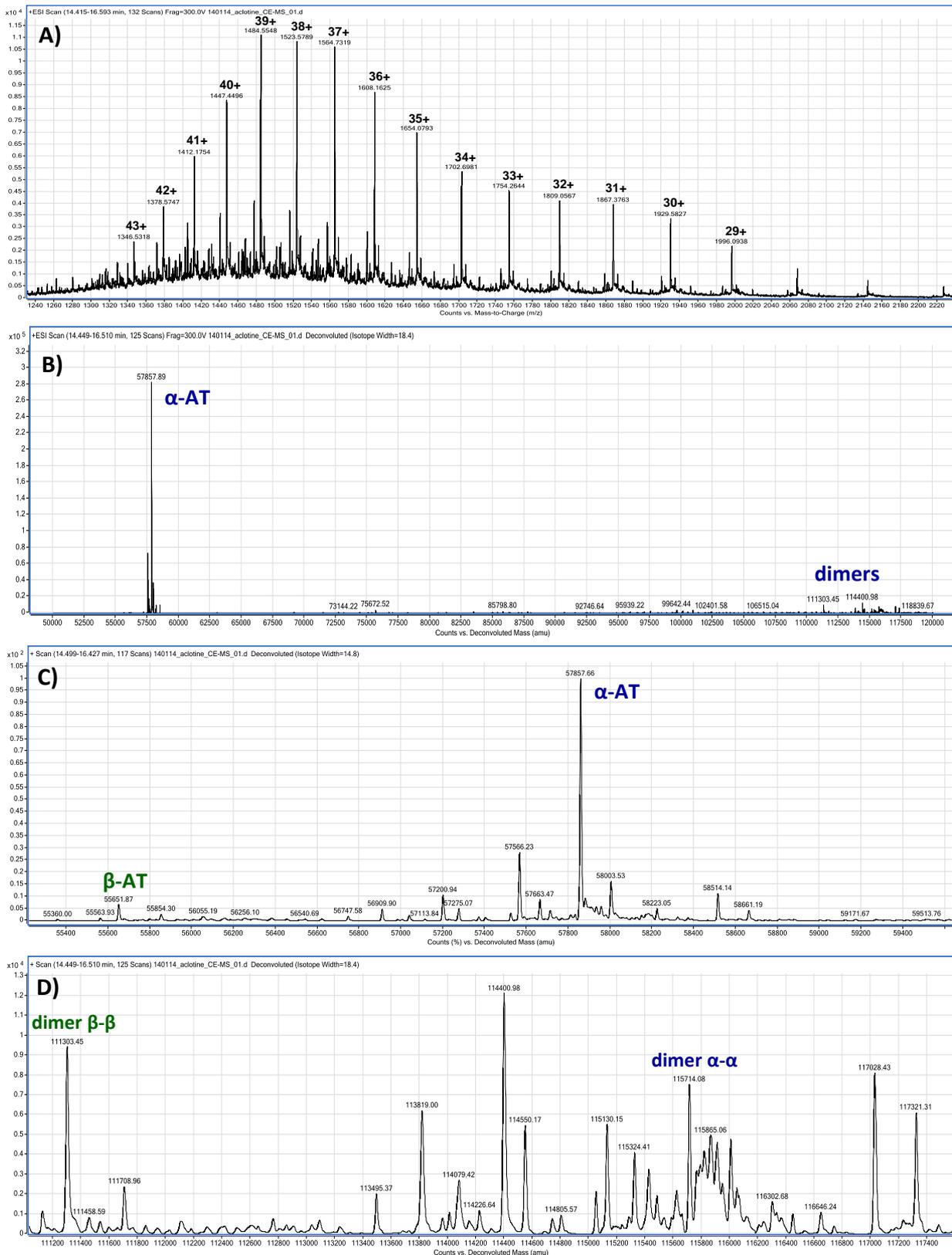


Figure 64 : Analyse CE-ESI-MS d'AT en conditions acides avec le Q-TOF 6540 d'Agilent : A) spectre de masse avant déconvolution, B) C) et D) spectres de masse déconvolués. Conditions analytiques : capillaire PVA (I.D. 50 μm , L_{tot} 96 cm) ; BGE : acide formique 100 mM, pH 3 ; SL : isopropanol/eau 50:50 (v/v) + 1 % d'acide formique, débit 8 $\mu\text{L}/\text{min}$; tension CE : +30 kV ; injection d'Aclotine[®] à 130 μM : 4 sec à 0,7 psi.

| Identified forms | MW _{exp} (Da) |
|--|------------------------|
| β-AT(-SiA) | 55361 |
| β-AT | 55652 |
| β-AT + 2SO ₃ H | 55750 |
| β-AT(+Fuc) | 55799 |
| β-AT + 4SO ₃ H | 55848 |
| α-AT(-2SiA-Hex-HexNAc) | 56911 |
| α-AT(-2SiA-Hex-HexNAc) + 2SO ₃ H + 32 | 57039 |
| α-AT(-SiA-Hex-HexNAc) | 57201 |
| α-AT(-SiA-Hex-HexNAc) + 32 | 57235 |
| α-AT(-2SiA) | 57275 |
| α-AT(-2SiA) + 2SO ₃ H | 57370 |
| α-AT(-Hex-HexNAc) + 32 | 57525 |
| α-AT(-SiA) | 57566 |
| α-AT(-SiA) + 2SO ₃ H | 57663 |
| α-AT(-SiA+Fuc) | 57714 |
| α-AT(-SiA+Fuc) + 2SO ₃ H | 57811 |
| α-AT(+SiA-Hex-HexNAc) + 32 | 57816 |
| α-AT | 57858 |
| α-AT + 2SO ₃ H | 57954 |
| α-AT(+Fuc) | 58005 |
| α-AT + 4SO ₃ H | 58053 |
| α-AT(+Fuc) + 2SO ₃ H | 58102 |
| α-AT(+Hex+HexNAc) | 58224 |
| α-AT(+Hex+HexNAc) + 2S ₃ OH | 58322 |
| α-AT(+SiA+HexNAc) | 58353 |
| α-AT(+SiA+Hex+HexNAc) | 58515 |
| α-AT(+2SiA+Hex+HexNAc) | 58807 |

Tableau 9 : Glycoformes de l'AT détectées par analyse CE-ESI-Q-TOF-MS en conditions acides (MW_{exp} : masse moléculaire expérimentale). En vert sont indiquées les formes oxydées.

Comme on peut le voir dans le tableau 9, de nombreuses formes oxydées de l'AT ont été détectées. Nous avons supposé qu'un ajout de masse de 96 Da provenait de la formation de deux groupes sulfoniques (Fig. 65A), suite à la rupture d'un pont disulfure. Un ajout de masse de 32 Da provient certainement de l'oxydation de deux méthionines (Fig. 65B), sachant que l'AT possède deux méthionines adjacentes proches de sa boucle réactive fortement susceptibles de s'oxyder (Van Patten 1999). Une double oxydation de méthionine est peu probable car cela nécessite des conditions drastiques (Manning 1989). Le tableau 9 n'est pas

exhaustif car d'autres formes détectées n'ont pas encore été identifiées, par manque de temps ou difficulté d'interprétation. De plus, nous avons principalement recherché des glycoformes, mais il se peut que des formes tronquées de l'AT soit également présentes parmi les formes détectées. Une rapide recherche a donc été effectuée. Il s'est avéré qu'une masse de 57663 Da, que nous avons attribuée à une forme désialylée et oxydée, soit α -AT(-SiA) + 2SO₃H, pourrait tout aussi bien correspondre à une molécule d'AT ayant perdu ses deux premiers acides aminés (histidine et glycine) en N-terminal. Cette forme tronquée avait déjà été décrite lors de la cartographie peptidique de l'AT réalisée en 1998 par Edmunds et ses collaborateurs (Edmunds 1998). Les auteurs avaient même estimé qu'elle représentait 8 %.

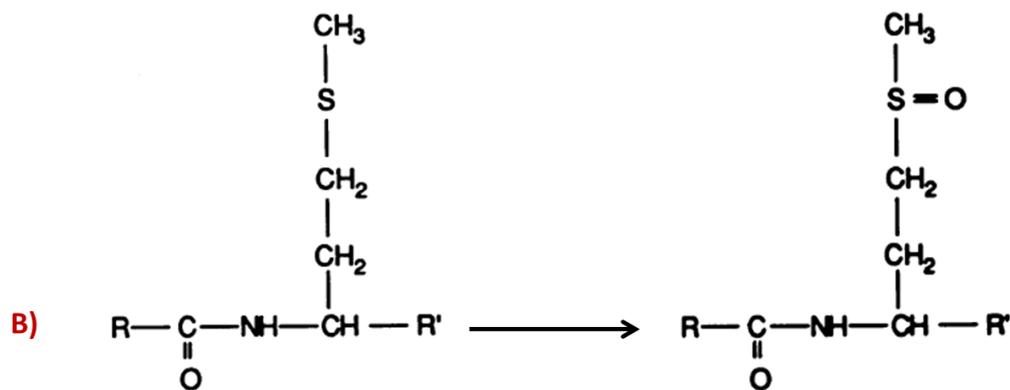


Figure 65 : A) Schéma représentant l'oxydation d'une cystéine conduisant, par étapes, à la formation d'un groupement sulfonique. B) Oxydation d'un résidu méthionine conduisant à un groupement sulfoxide. Adapté de Manning 1989.

En conclusion, nous pouvons dire que grâce à ces analyses CE-MS il a été possible de détecter un grand nombre de glycoformes de l'AT. Certaines ont déjà été décrites dans la littérature. Cependant, nous aimerions préciser qu'il faut être prudent quant à l'interprétation de ces données. En effet, il est connu que des analyses par spectrométrie de masse peuvent engendrer de la désialylation. Par exemple, le groupe de Rizzi avait montré que certaines analyses réalisées en MALDI engendraient des formes désialylées de l'AT (Demelbauer 2004 b). Bien que les conditions utilisées pour les expériences CE-MS que nous avons réalisées (ionisation ESI, tampon à pH physiologique, analyse de la protéine entière) présentent peu de risques de fragmenter les chaînes glycanes de l'AT, il ne faut pas exclure l'hypothèse que les formes correspondant à des pertes d'une partie de la chaîne glycanes ne proviennent pas de l'échantillon commercial. Par contre, les glycoformes qui correspondent à

des ajouts de molécules ne peuvent provenir de l'analyse. Ainsi, quatre glycoformes peu ordinaires portant plusieurs acides sialiques successifs en bout d'antenne de chaîne glycanes ont été détectées. Enfin, le couplage CE-MS a permis de mettre en évidence de nombreuses formes oxydées de l'AT.

V.A.2.b. CE-MS en conditions basiques

Pour les analyses CE-MS réalisées en conditions basiques, nous avons utilisé un tampon d'analyse composé d'acétate d'ammonium 50 mM à pH 7,5. Comparativement aux analyses CE-MS opérées en conditions acides, nous avons quelque peu modifié le liquide additionnel (SL) en remplaçant l'acide formique par de l'acétate d'ammonium à 5 mM, pour éviter des effets de déplétion ionique. De manière surprenante, l'application d'une tension CE positive a permis de détecter l'AT sans l'ajout d'une pression additionnelle durant la CE, alors qu'à ce pH basique la protéine est globalement chargée négativement et se dirige vers l'anode. Nous en avons conclu que la source Agilent avec la nouvelle technologie Jetstream engendrait un effet siphon très important. Des études ultérieures effectuées dans les mêmes conditions avec une tension CE négative (toujours sans pression additionnelle), donc en corrélation avec le sens de migration de l'AT à pH basique, ont également permis de détecter l'AT. Nous avons alors calculé la force hydrodynamique (FH) engendrée par le couplage en utilisant l'équation 37 suivante :

$$\mu_{app} = \mu_{FH} + \mu_{EOF} + \mu_{eff} \quad (37)$$

avec μ_{app} la mobilité apparente de l'AT, μ_{FH} la mobilité de la force hydrodynamique, μ_{EOF} la mobilité de l'EOF et μ_{eff} la mobilité effective de l'AT.

Les valeurs de FH trouvées ont été de $16,86 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le cas de l'application d'une tension CE positive, et de $15,71 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le cas d'une tension CE négative. A titre comparatif, la μ_{eff} de l'AT est de $9,99 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La figure 66 présente de façon schématique les résultats obtenus. Ainsi, grâce à cette force hydrodynamique élevée, nous avons deux possibilités pour détecter l'AT par CE-MS avec l'appareil Q-TOF 6540 d'Agilent : travailler en tension CE positive ou négative. Cependant, le signal est plus intense (environ dix fois plus) lorsque l'on travaille avec une tension CE positive.

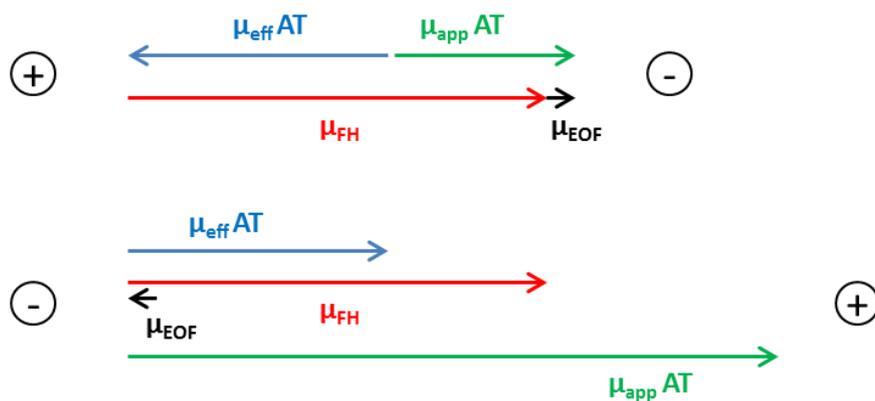


Figure 66 : Représentation schématique de la force hydrodynamique engendrée par le couplage CE-ESI-Q-TOF-MS avec l'appareil 6540 d'Agilent.

Les analyses réalisées en conditions basiques ont permis de détecter, tout comme en conditions acides, une grande variété de glycoformes de l'AT. Ces glycoformes sont les mêmes que celles détectées en conditions acides. Cependant, deux nouvelles glycoformes fucosylées ont été identifiées. L'une porte un hexose supplémentaire (+162 Da) et l'autre est une glycoforme tri-antennée (Fig. 67). Ces deux glycoformes d'AT n'ont jamais été décrites dans la littérature.

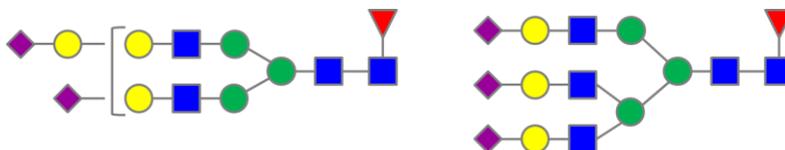


Figure 67 : Glycoformes fucosylées de l'AT détectées par CE-ESI-Q-TOF-MS en conditions basiques. Triangle rouge : fucose, carré bleu : N-acétylglucosamine, rond vert : mannose, rond jaune : galactose, losange violet : acide sialique.

V.A.3. Détection de dimères de l'AT

V.A.3.a. CE-MS en conditions acides

Les analyses CE-MS d'un échantillon d'AT commercial réalisées en conditions acides ont permis de détecter une grande variété de dimères de l'AT, bien que leur intensité ne soit pas très élevée, comme le montre la figure 64B (voir section V.A.2.). Ces dimères correspondent à l'association de différentes glycoformes de l'AT, et peuvent être des hétérodimères (association d'une forme native avec une forme latente) ou des homodimères (association de

deux formes natives). Le tableau 10 présente les différents dimères détectés. On remarquera que ces dimères correspondent à l'association d'une même glycoforme. Il existe peut-être des dimères correspondant à l'association de deux glycoformes différentes mais il faudrait faire une recherche approfondie des spectres pour le savoir. Comme le montre la figure 64D, l'intensité du dimère β - β de la glycoforme β -AT principale est très élevée comparativement à celle du dimère α - α de la glycoforme α -AT principale, alors que le monomère β ne représente que 10 % du monomère α . Cependant, ce résultat est en adéquation avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet, il a été montré que l'hétérodimère de la glycoforme β -AT était beaucoup plus stable que l'hétérodimère de la forme α -AT (Zhou 1999). Comme on peut le voir dans le tableau 10, de nombreux dimères correspondant à des formes oxydées ont également été détectés. A notre connaissance, la détection de dimères de l'AT n'a jamais été décrite dans la littérature par analyses MS, LC-MS ou CE-MS.

| Dimers | MW _{exp} (Da) |
|--|------------------------|
| β -AT(-SiA) | 110722 |
| β -AT | 111303 |
| β -AT(+Fuc) | 111599 |
| α -AT(-2SiA-Hex-HexNAc) | 113819 |
| α -AT(-2SiA-Hex-HexNAc) + 2SO ₃ H + 32 | 114079 |
| α -AT(-SiA-Hex-HexNAc) | 114401 |
| α -AT(-2SiA) | 114551 |
| α -AT(-2SiA) + 2SO ₃ H | 114744 |
| α -AT(-Hex-HexNAc) + 32 | 115050 |
| α -AT(-SiA) | 115130 |
| α -AT(-SiA) + 2SO ₃ H | 115324 |
| α -AT(-SiA+Fuc) | 115425 |
| α -AT(-SiA+Fuc) + 2SO ₃ H | 115623 |
| α -AT | 115714 |
| α -AT + 2SO ₃ H | 115909 |
| α -AT(+Fuc) | 116008 |
| α -AT(+Hex+HexNAc) | 116446 |
| α -AT(+Hex+HexNAc) + 2S ₃ OH | 116645 |
| α -AT(+SiA+Hex+HexNAc) | 117028 |

Tableau 10 : Dimères de l'AT détectés par analyse CE-ESI-Q-TOF-MS en conditions acides (MW_{exp}, masse moléculaire expérimentale). Chaque dimère correspond à l'association des glycoformes indiquées dans la colonne de gauche. En vert sont indiquées les formes oxydées.

Nous avons entrepris une étude de dégradation thermique pour voir l'impact que cela pourrait avoir sur la nature et la quantité des formes détectées. Pour cela, nous avons chauffé un échantillon d'Aclotine® à 40°C pendant 10 heures, puis l'avons analysé par CE-MS en conditions acides. Ces analyses ont été réalisées avec une détection UV, ce qui nous a permis de visualiser la séparation CE. Comme le montre la figure 68, l'échantillon d'AT après incubation présente une trace UV avec un gros épaulement (alors que la trace UV d'un échantillon fraîchement décongelé présente un pic sans épaulement). La déconvolution du spectre de masse associé à l'analyse de l'échantillon incubé à 40°C montre la présence d'une très grande quantité de dimères. Ces résultats sont assez inattendus en raison des conditions très dénaturantes utilisées. Selon nous, les dimères détectés pourraient provenir de la rupture de formes polymériques. En effet, il est connu que la chaleur entraîne la formation de polymères d'AT (Corral 2007, Wardell 1997). Cette hypothèse expliquerait la quantité élevée de dimères détectés malgré les conditions acides.

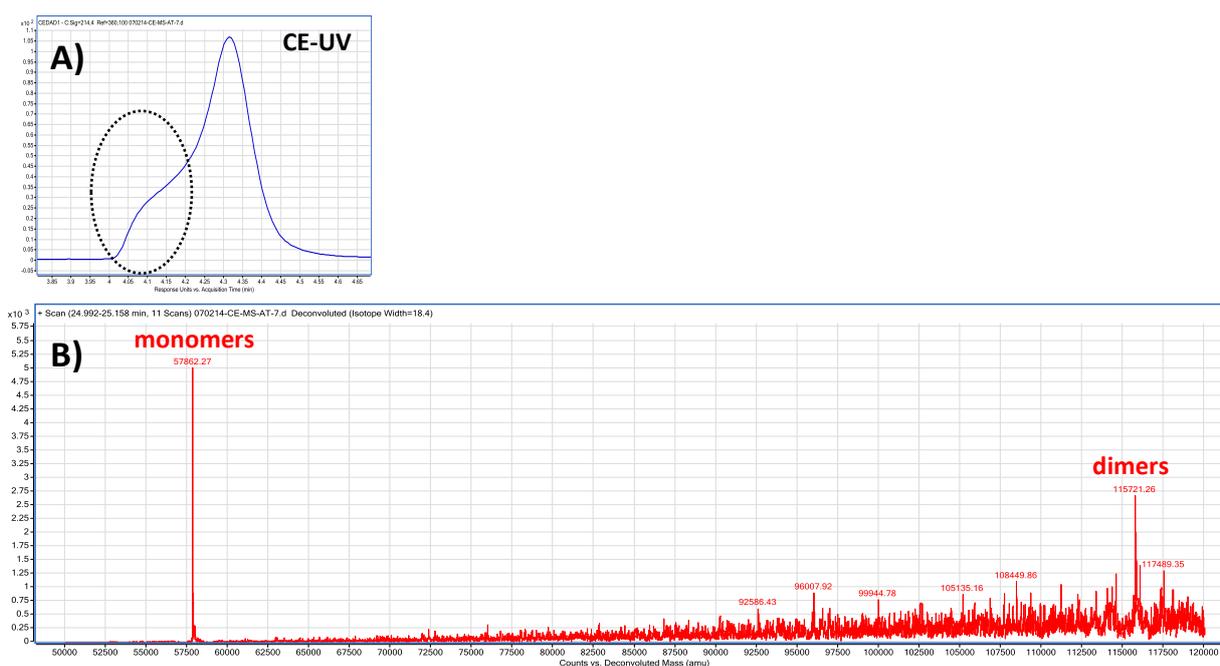


Figure 68 : Analyse CE-ESI-Q-TOF-MS d'un échantillon d'AT incubé à 40°C pendant 10 heures. A) Détection CE-UV. B) Spectre de masse déconvolué. Conditions analytiques : capillaire PVA (I.D. 50 μ m, L_{tot} 125 cm) ; BGE : acide formique 100 mM, pH 3 ; SL : isopropanol/eau 50:50 (v/v) + 1 % d'acide formique, débit 8 μ L/min ; tension CE : +30 kV ; injection d'Aclotine® à 130 μ M : 5 sec à 0,7 psi.

V.A.3.b. CE-MS en conditions non-dénaturantes

Comme nous venons de le montrer, les analyses CE-MS opérées en conditions acides permettent de détecter des dimères de l'AT. Cependant, dans des conditions normales, c'est-à-dire par analyse d'un échantillon qui n'a pas été soumis à une dégradation thermique, leur intensité est très faible. Ceci s'explique par le fait que nous ne sommes pas dans des conditions favorables à la préservation des dimères.

La détection des dimères de l'AT par ESI-MS n'est pas facile en raison du caractère non-covalent du dimère, que ce soit un homo- ou hétérodimère. Par exemple, il a été décrit que dans le cas de hétérodimère la forme native et la forme latente s'associaient ensemble par l'intermédiaire d'un pont salin entre l'arginine 393 de la boucle réactive de la forme native et l'acide glutamique 237 de la forme latente (Johnson 2006). Lors du couplage CE-MS, l'emploi d'un liquide additionnel à base d'un solvant organique tel que l'isopropanol ou le méthanol n'est pas favorable à la détection d'un dimère. En 1999, Gysler et al. ont tenté d'identifier par CE-MS les dimères de l'interleukine-6 avec un tampon acétate d'ammonium à 20 mM et un SL composé de méthanol/eau 80:20 (v/v) avec 1 % d'acide acétique (Gysler 1999). Bien que trois pics correspondant à un monomère et deux dimères aient été détectés au niveau de la fenêtre CE-UV, seul le monomère a été détecté au niveau de la MS, ceci s'expliquant par une dissociation des dimères non-covalents au contact du méthanol présent dans le SL. Très récemment, Przybylski et al. sont parvenus à détecter par couplage CIEF-MS le dimère non-covalent de l'interféron- γ , en utilisant des conditions non-dénaturantes avec un SL composé uniquement d'acétate d'ammonium à 10 mM (Przybylski 2015). Cette même équipe avait d'ailleurs quelques années auparavant réussi à détecter le complexe non-covalent AT/pentasaccharide de l'héparine, en utilisant un tampon hydrogénocarbonate d'ammonium à 30 mM et un SL composé d'acétate d'ammonium à 10 mM (Fermas 2007). Pour détecter un dimère non-covalent par CE-MS, il semble donc nécessaire de travailler en conditions non-dénaturantes, ce que l'on appelle encore des conditions natives.

Nous avons cherché à travailler dans des conditions CE-MS aussi peu dénaturantes que possible afin de préserver la conformation des différentes formes (monomères et dimères) de l'AT. Pour cela, nous avons travaillé avec un tampon acétate d'ammonium à pH physiologique et avons augmenté la quantité d'acétate d'ammonium dans le SL. Deux types de SL ont donc été utilisés : un SL composé d'un mélange isopropanol/eau 50:50 (v/v) avec

5 mM d'acétate d'ammonium et un SL uniquement composé d'acétate d'ammonium à 10 mM, que nous avons tamponné à pH 7,5. Les expériences ont été réalisées avec le spectromètre de masse Q-TOF d'Agilent et une première série d'expériences a été effectuée avec une tension CE positive.

Comme le montre la figure 69, lorsque le SL ne contient plus d'isopropanol et est uniquement composé d'acétate d'ammonium, l'enveloppe MS des différents états de charge de l'AT se décale vers des états de charges moins élevés, indiquant une moins grande dénaturation de la protéine. La déconvolution des spectres de masse montre que la proportion de dimères détectés est beaucoup plus importante lorsque le SL contient uniquement de l'acétate d'ammonium. Si l'on veut poser un chiffre, on peut dire que l'intensité des dimères détectés correspond à 2,5 % de celle des monomères dans le cas du SL contenant de l'isopropanol, alors qu'elle correspond à 15 % de l'intensité des monomères dans le cas d'un SL sans isopropanol (en se basant sur les pics principaux dans chaque cas).

D'autres analyses réalisées exactement dans les mêmes conditions mais avec une tension CE négative (- 20 kV) ont conduit au même type de résultat, c'est-à-dire une détection améliorée des dimères de l'AT par utilisation d'un SL sans isopropanol. De plus, les proportions observées ont été similaires avec une intensité des dimères détectés correspondant, respectivement, à 2,5 et 20 % de celle des monomères pour les SL avec et sans isopropanol. Nous avons entrepris une expérience supplémentaire dans le cas d'une tension CE négative de - 20 kV et avons injecté l'AT non pas en mode hydrodynamique mais en mode électrocinétique, par application d'une tension de - 5 kV. Dans ce cas, l'intensité des dimères détectés avec un SL sans isopropanol a représenté 40 % de celle des monomères. Il semblerait donc qu'un mode d'injection électrocinétique favorise l'injection des dimères ou le maintien de la dimérisation, ou alors permet l'association des monomères entre eux sous l'action du champ électrique. Lors d'une injection électrocinétique, la quantité injectée d'une molécule donnée est proportionnelle à sa mobilité électrophorétique (μ_{ep}). Or, comme nous l'avons montré dans l'article de la section IV.B., les hétérodimères de l'AT ont une μ_{ep} plus élevée que celle de l'AT native, dans des conditions analytiques utilisant un capillaire neutre et un tampon acétate d'ammonium 50 mM à pH physiologique. L'hypothèse de l'injection d'une plus grande quantité de dimères lors d'une injection électrocinétique semblerait donc probable. Quant à savoir pourquoi les hétérodimères ont une μ_{ep} plus élevée, là encore nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Etant donné que la μ_{ep} d'une protéine est

proportionnelle au rapport charge sur volume, cela signifie donc que soit le volume hydrodynamique d'un hétérodimère est inférieur à celui correspondant à l'association de deux monomères, soit que certaines charges de l'hétérodimère sont masquées, en raison notamment de l'insertion des boucles réactives.

On pourra s'étonner de ne voir qu'une seule enveloppe de l'AT dans le cas des analyses décrites ci-dessus, alors que les expériences effectuées avec l'appareil microTOF-Q de Bruker décrites dans l'article de la section V.B. montrent la présence simultanée de plusieurs enveloppes. La raison principale est que les expériences décrites ci-dessus ont été réalisées sans augmenter la gamme de masse au-delà de 3000 m/z .

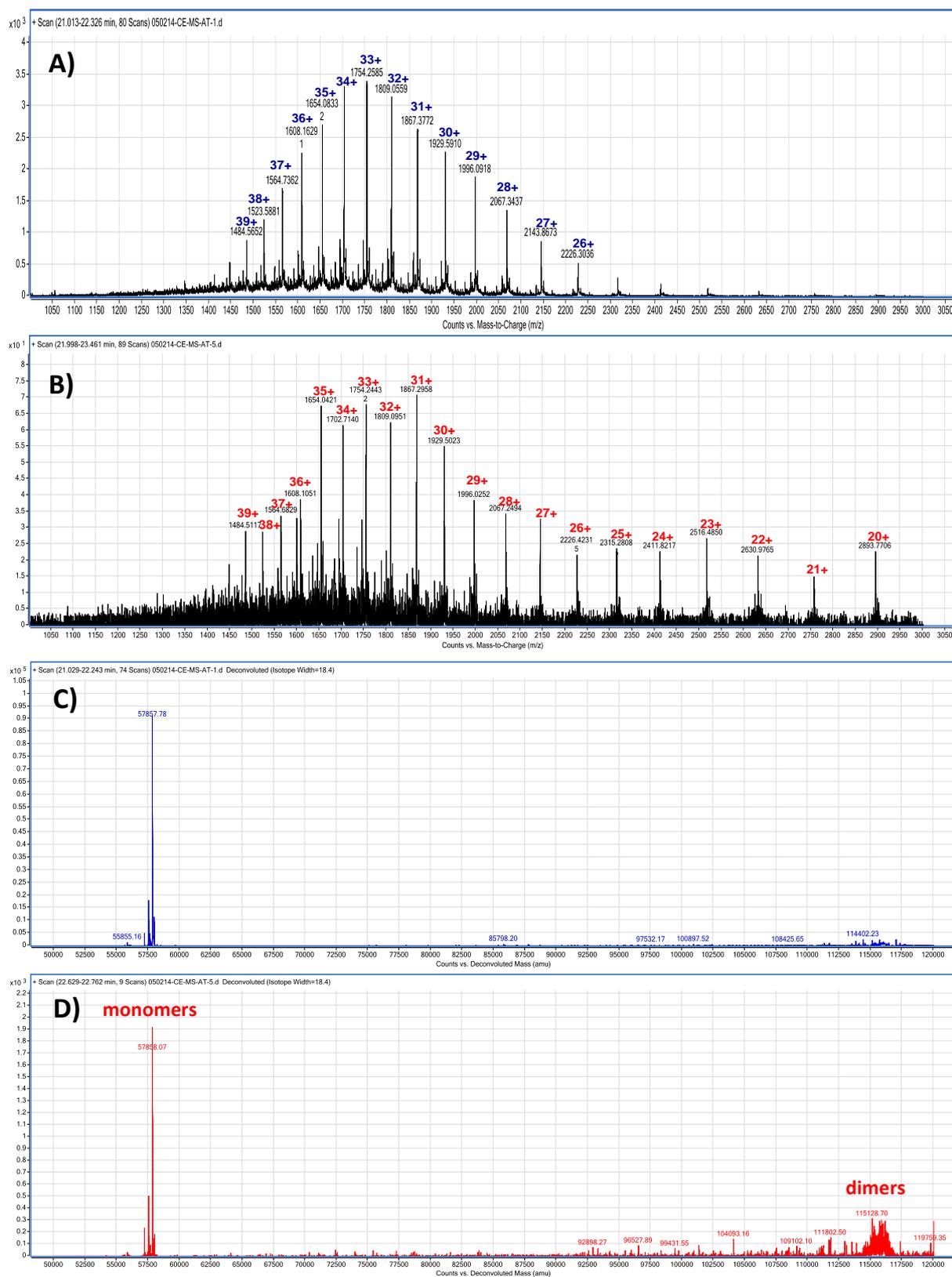


Figure 69 : Analyses CE-MS d'AT en conditions basiques avec A) un SL isopropanol/eau 50:50 (v/v) + 5 mM d'acétate d'ammonium, B) un SL acétate d'ammonium 10 mM, pH 7,5. Conditions analytiques : capillaire PVA (I.D. 50 μ m, L_{tot} 85 cm) ; BGE : acétate d'ammonium 50 mM, pH 7,5 ; tension CE : +20 kV ; injection d'Acloline[®] (130 μ M) à 0,7 psi pendant A) 5 sec, B) 15 sec. C et D correspondent respectivement à la déconvolution des spectres A et B.

Les analyses qui viennent d'être décrites dans ce chapitre ont permis de détecter une grande variété de glycoformes et dimères de l'AT, aussi bien en conditions acides que basiques. Les analyses en conditions acides ont permis de séparer les deux groupes de glycoformes α -AT et β -AT. De plus, des glycoformes peu communes et pas encore décrites dans la littérature ont été mises en évidence. Les analyses réalisées en conditions basiques ont permis, en adaptant le liquide additionnel, une meilleure détection des dimères. Cependant, ces analyses n'ont pas permis de séparer différentes formes d'AT, notamment les monomères et les dimères. Ceci s'explique certainement par l'effet siphon important engendré par le spectromètre de masse Q-TOF d'Agilent. Nous avons donc poursuivi nos études en essayant d'optimiser les paramètres du couplage CE-MS afin de séparer plusieurs formes d'AT. Nous étions particulièrement intéressés par la séparation des monomères et dimères de l'AT mais également par celle de deux conformères, la forme native et la forme latente. Ceci ajoutait une difficulté supplémentaire car aucune différence de masse n'était attendue entre ces deux conformères. Cependant, nous avons supposé qu'il serait possible de les séparer par CE-MS soit en raison d'une différence d'ionisation ESI, soit en raison d'une mobilité électrophorétique différente. Ces expériences d'optimisation ont été réalisées avec des spectromètres de masse Q-TOF de Bruker dans le laboratoire du Professeur Govert Somsen. Elles ont conduit à la rédaction d'un article que nous présentons ci-après.

V.B. Article 6 : « Characterization of conformers and dimers of antithrombin by capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry »

Anne-Lise Marie^{a,b}, Elena Dominguez-Vega^c, François Saller^{d,e}, Jean-Luc Plantier^f, Rémi Urbain^f, Delphine Borgel^{d,e,g}, N. Thuy Tran^{a,b}, Govert W. Somsen^c, Myriam Taverna^{a,b,*}

^aUniversité Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France

^bCNRS UMR 8612, Institut Galien Paris Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France

^cDivision of BioAnalytical Chemistry, AIMMS research group BioMolecular Analysis, VU University Amsterdam, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

^dUniversité Paris Sud, UMR-S1176, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

^eINSERM, U1176, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

^fLFB, 91940 Les Ulis, France

^gAP-HP, Hôpital Necker, Service d'Hématologie Biologique, 75015 Paris, France

*corresponding author: myriam.taverna@u-psud.fr

Abstract

Antithrombin (AT) is a plasma glycoprotein which possesses anticoagulant and anti-inflammatory properties. AT is a flexible protein and exhibits various forms, among which native, latent and heterodimeric forms. We studied the potential of capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) to characterize AT under native conditions. This method uses a sheath liquid interface, electrospray ionization (ESI), and a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. A neutrally coated capillary was employed. The preservation of the protein conformation was obtained by selecting non-denaturing analytical conditions. Optimization of different parameters, such as composition and flow rate of the sheath liquid, improved the ionization efficiency, leading to more intensive mass spectra. The developed CE-MS method showed that each AT form exhibited a specific mass spectrum, allowing to unambiguously distinguish them. Different co-injection experiments carried out with the latent and native forms proved that the latent form had a higher electrophoretic mobility than the native one. In addition, they showed that latent and native forms could associate to form a heterodimer during the CE analysis. The developed CE-MS method enabled the detection of latent and heterodimeric forms in a commercial AT preparation stored at room temperature for three weeks.

Key words: Capillary electrophoresis-mass spectrometry, antithrombin, conformers, latent form, heterodimer.

Abbreviations: AT, antithrombin; BGE, background electrolyte; BPE, base peak electropherogram; CE, capillary electrophoresis; CE-MS, capillary electrophoresis-mass spectrometry; EOF, electroosmotic flow; IM, ion mobility; IM-MS, ion mobility-mass spectrometry; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; Serpin, serine protease inhibitor; SDS, sodium dodecyl sulfate; μ_{ep} , electrophoretic mobility.

1. Introduction

Antithrombin (AT) is a plasma glycoprotein which belongs to the serine protease inhibitor (serpin) superfamily [1]. AT possesses anticoagulant properties. It inhibits almost all the coagulation proteases, but thrombin and factor Xa are its principal targets [2,3]. For clinical use, AT is indicated to treat patients with hereditary antithrombin deficiency or in severe acquired AT deficiencies [4].

AT is characterized by two major groups of glycoforms α and β . α -AT and β -AT carry four and three glycan chains, respectively. Besides its heterogeneity of glycosylation AT exhibits various forms, among which are conformers and dimeric forms. Native AT is metastable and converts slowly to the hyperstable latent form through the incorporation of the entire reactive center loop (RCL) inside the molecule with the formation of an additional β -sheet strand (Fig.1) [5,6]. Dimeric forms may be homo- or heterodimers [7,8]. The homodimers are dimers of native forms, with the RCL of one native monomer inserted into another native monomer [9]. The heterodimers correspond to the association of a native and a latent form (Fig.1). In this case, the stable dimerization contact involves the incorporation of several RCL residues of the native monomer into the latent monomer [10]. An additional contact results from a salt bridge between Arg393 of the native monomer and Glu237 of the latent counterpart.

Bioprocessing steps can modify the structure of AT. The pasteurization process, commonly used for viral inactivation, can induce the formation of latent form, and is probably responsible for up to 40 % of the latent form present in some AT preparations [11,12].

Pasteurization and other processes like ultra/diafiltration and lyophilisation may also cause the denaturation of AT, and lead to the formation of aggregates or polymeric forms [13-15].

The presence of latent and dimeric forms in therapeutic AT preparations is undesirable because they correspond to inactive forms of the native molecule, and thereby decrease the quality of the drug. Fast and reliable analytical methods enabling to detect these AT forms are therefore required.

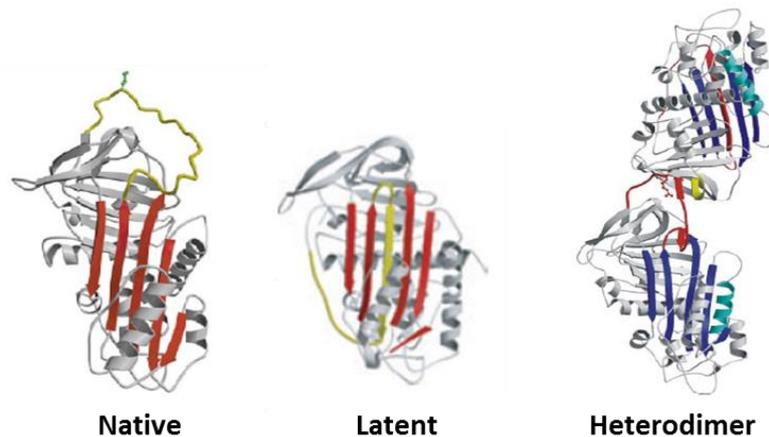


Fig.1. Conformers and dimer of antithrombin. Native AT undergoes a conformational rearrangement into a latent form which complete insertion of the reactive center loop (RCL). The heterodimer corresponds to the association of native and latent forms through the partial incorporation of the RCL of the native monomer into the latent counterpart. Adapted from [1,6,10] with permissions.

To study the conformation of a given protein, a panel of techniques exists. X-ray crystallography, circular dichroism, Fourier transform infrared, nuclear magnetic resonance, and fluorescence spectroscopy provide detailed structural information but are not separation techniques. In contrast, techniques like liquid chromatography (LC), capillary electrophoresis (CE) and ion mobility spectrometry (IM) are capable of separating protein conformers. IM coupled to mass spectrometry (IM-MS) is well suited to the analysis of protein conformers [16-19]. For instance, by using this technique, Pritchard et al. managed to separate the monomer of recombinant human growth hormone (rhGH) from an extended monomer, which may correspond to a folding intermediate [20]. CE is very attractive to study protein conformers. Conversely to LC, in CE, the proteins do not interact with a stationary phase. In addition, near-physiological conditions can be used. Another advantage is the possibility to couple CE with MS. CE-based methods have been developed to study folding/unfolding or misfolding of proteins [21,22], but only a few were applied to therapeutic proteins.

For example, Hapuarachchi et al. developed a capillary gel electrophoresis (CGE) method to detect misfolded forms of a fusion protein [23]. However, CE as well as CE-MS have never been applied to the analysis of conformers issued from the insertion of a RCL, such as serpin latent forms.

Dimeric forms of therapeutic proteins have been rarely studied by CE or CE-MS. Gysler's team developed, in 1999, CE and CE-MS methods for monitoring interleukin-6 dimer formation, but failed to detect the dimer by MS [24]. Recently, Przybylski's team exploited capillary isoelectric focusing (CIEF) coupled to MS to characterize the dimeric variants of interferon- γ [25].

Heparin affinity chromatography was used to separate native and latent forms of AT [12,26-28]. Hydrophobic interaction chromatography also allowed successful separation of native and latent forms [27,29,30]. However, all these chromatographic methods did not allow to separate dimeric forms of AT. SDS-PAGE, urea-PAGE [6,11,12,26] and native PAGE [8,11,27,31] were capable of differentiating native, latent, and dimeric forms. However, these electrophoretic methods are time-consuming and have a poor reproducibility. Several CE methods were reported to separate the different glycoforms of AT [31,32], and, in 2004, Demelbauer et al. investigated a CE-MS coupling to unambiguously characterize the AT glycoforms [33]. In 2007, Fermas et al. managed to detect the non-covalent complex between AT and heparin pentasaccharide [34]. However, up to now, neither CE nor CE-MS have been applied to the analysis of AT native and latent conformers as well as dimeric forms.

CE-MS is very well suited to the analysis of protein glycosylation as well as to the detection of related proteins, like oxidized, deamidated or truncated forms [35-38]. In this work, we searched to know if this technique could separate AT conformers but also a heterodimeric form, by adjusting and optimizing several parameters. With the aim to preserve the conformation of the protein, non-denaturing conditions were selected. To improve the ionization efficiency the composition and flow rate of the sheath liquid were carefully optimized. AT preparations enriched in native, latent and heterodimeric forms were individually analyzed with the developed CE-MS method. We then carried out co-injection experiments with native and latent forms in order to see if they could be separated based on their respective electrophoretic mobility. Finally, the method was applied to the analysis of an AT sample stored at room temperature for several weeks.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and AT samples

99.9 % (v/v) acetic acid, 98 % (v/v) formic acid, and 28 % (v/v) ammonium hydroxide were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The ammonium acetate BGE was made by diluting 5.7 % (v/v) acetic acid to 50 mM and adjusting the pH to 7.4 with 2.5 % (v/v) ammonium hydroxide in deionized water. Formic acid BGE was prepared by diluting 3.8 % (v/v) formic acid to 100 mM in deionized water.

Aclotine[®] was provided by LFB Biotechnologies (LFB, Les Ulis, France). Latent or heterodimer-enriched preparations were prepared as previously described [39]. Briefly, Aclotine[®] was dialyzed against 5 mM HEPES, 0.9 M ammonium sulfate, pH 7.4 using 30000 MWCO Vivaspin 15R (Sartorius Stedim Biotech, Germany), and diluted to a concentration of 2.5 mg/mL in this buffer, followed by heating at 60°C for 9 h and 72 h to prepare heterodimeric and latent forms, respectively. The reaction mixtures were then concentrated and dialyzed against serum-free DMEM buffer (Gibco) using 30000 MWCO Vivaspin 15R. The final concentrations of latent and heterodimer-enriched preparations were 12.2 and 23.4 g/L, respectively.

All AT samples were stored at -20°C before use. All buffers and samples used for CE-MS analyses were prepared with Milli-Q water using a Direct-Q 3 UV purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Before use, all buffers were filtered through a 0.2 µm Millex membrane (Millipore).

2.2. CE system

CE experiments were carried out using a PA800 plus capillary electrophoresis instrument from Beckman Coulter (Brea, CA, USA). Permanently coated PVA capillaries were from Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), having a total length of 90 cm and an internal diameter of 50 µm. For CE-MS analyses, hydrodynamic injections of the AT preparations were performed at 0.5 psi for 30 sec (*i.e.* 1.1 % of the total capillary volume). Unless stated otherwise, Aclotine[®], latent or heterodimer-enriched preparations were injected at 15, 12.2 and 23.4 g/L, respectively. The separation voltage was -20 kV, and the capillary temperature was 25°C.

2.3. Mass spectrometry

MS was performed using a micrOTOFQ orthogonal accelerated TOF mass spectrometer and a MAXIS Q-TOF mass spectrometer from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). The instruments were calibrated using an ESI tuning mix provided by Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). Source and transfer parameters were optimized by direct infusion of AT samples via the CE capillary. CE-MS coupling was performed with a co-axial sheath liquid electrospray interface from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). For the analysis of AT samples in acidic conditions, the sheath liquid was a mixture of isopropanol-water 50:50 (v/v) with 0.1 % formic acid, and was delivered at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{h}$. For the analysis of AT samples in alkaline conditions, the sheath liquid was a mixture of isopropanol-water 50:50 (v/v) containing 14 mM ammonium acetate, and was delivered at a flow rate of 120 $\mu\text{L}/\text{h}$. Sheath liquid was delivered by a 2.5 mL gas-tight syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) using a syringe pump of Cole-Parmer (Vernon Hill, IL, USA). The following optimized ESI conditions were used: dry gas temperature, 190°C; nitrogen flow, 4 L/min; and nebulizer pressure, 4.4 psi. Electrospray in positive ionization mode was achieved using an ESI voltage of -4500 V. The quadrupole ion energy and collision cell energy were set at 5 eV and 10 eV, respectively. The monitored mass range was from 500 to 7000 m/z . CE-MS data were analyzed using Bruker Daltonics Data Analysis software. Molecular weight determinations of proteins were performed using the “Maximum Entropy” utility of the Data Analysis software.

3. Results and discussion

3.1. Method development

Until now, very few articles have reported the analysis of therapeutic AT by CE-MS. In 2004, Demelbauer et al. developed a CE-MS method to separate and identify glycoforms of AT [33]. The conditions employed were very acidic and used urea, which is a chaotropic agent. In 2007, Fermas et al. developed a CE-MS method in non-denaturing conditions to detect AT/heparin pentasaccharide complex [34]. In contrast, we aimed at separating conformers and dimers of AT. To preserve the conformation of the protein and to be in conditions compatible with CE-MS, we selected a background electrolyte (BGE) composed of 50 mM ammonium

acetate at physiological pH (7.4). To obtain a good separation of the different AT forms, a neutrally PVA coated capillary was employed in order to minimize the electroosmotic flow (EOF), and to avoid protein adsorption onto the capillary inner wall. Preliminary experiments were carried out by analyzing a marketed AT preparation (Aclotine[®]). The first CE-MS experiments were performed with a sheath liquid composed of isopropanol-water 50:50 (v/v) with 2.5 mM ammonium acetate delivered at a flow rate of 200 $\mu\text{L/h}$. During the CE analysis, a continuous hydrodynamic pressure of 1.5 psi was applied to induce a small flow to the outlet of the neutrally PVA coated capillary. These conditions enabled to detect AT in one broad peak, as revealed by the deconvoluted mass spectrum leading to a molecular mass of 57857 Da, in good agreement with the theoretical value. However, the signal intensity was very low.

With the aim to enhance the protein signal intensity, we tried to decrease, as much as possible, the sheath liquid flow rate not only to minimize the dilution of the sample with the sheath liquid, but also to decrease the quantity of ammonium ions entering the ESI source. Several sheath liquid flow rates were tested: 200, 150, 120 and 100 $\mu\text{L/h}$. The highest signal intensity was observed for 120 $\mu\text{L/h}$.

In order to decrease the additional pressure during the CE analysis, we searched to increase the concentration of ammonium acetate in the sheath liquid to avoid as much as possible the ion depletion, hampering the closure of the CE electrical circuit. Several concentrations of ammonium acetate in the sheath liquid were tested: 2.5, 5, 14, 25 and 50 mM. The best compromise between the signal intensity and the additional pressure required during the CE analysis was obtained with 14 mM. With this latter value an additional pressure of 0.7 psi during the CE analysis was sufficient to have a stable CE current and detect AT by MS. In these optimized conditions, with a sheath liquid containing 14 mM ammonium acetate and an additional pressure of 0.7 psi, the base peak electropherogram (BPE) profile showed one peak migrating around 18 min (Fig.2). The mass spectrum of this peak showed two independent charge envelopes corresponding to the same deconvoluted mass. The first envelope has a charge distribution centered on the 32+ ion (mass range 1400-2500 m/z), whereas the second one has a charge distribution centered at twice-lower charge state, i.e. 16+ (mass range 3000-4300 m/z) (Fig.3A), indicating that less protein sites were exposed to protonation. The first envelope corresponds to denatured protein, and the second one to non-denatured protein.

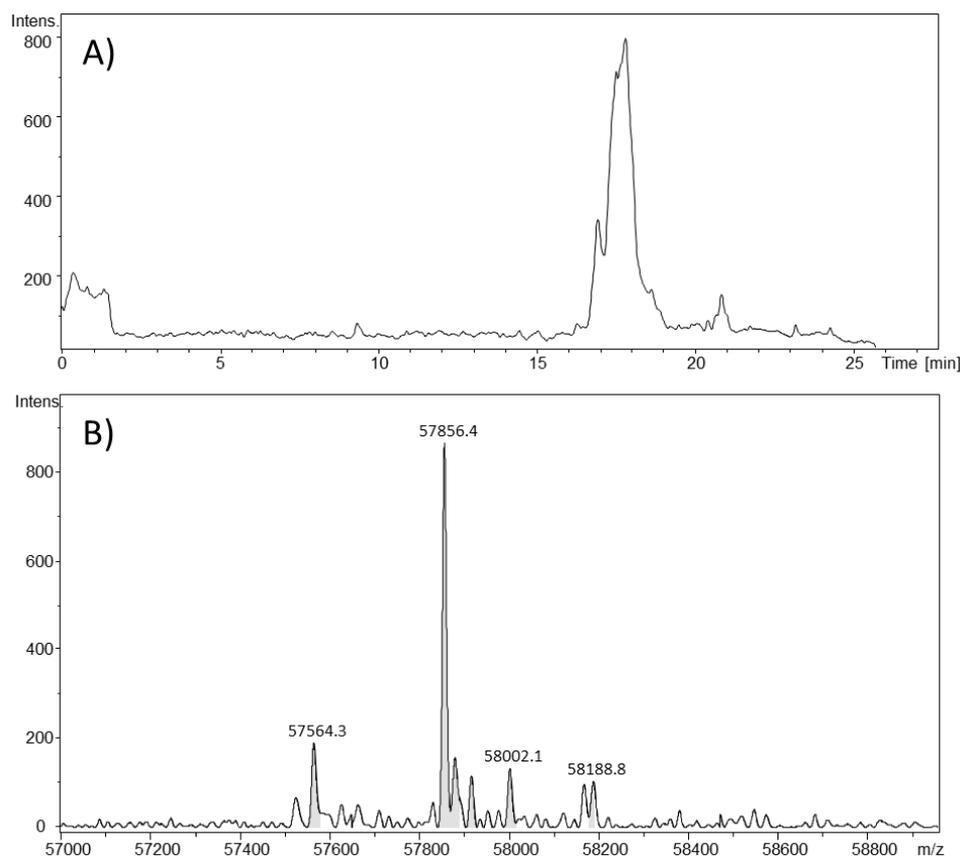


Fig.2. CE-MS analysis of Aclotine[®] with a sheath liquid composed of isopropanol-water 50:50 (v/v) with 14 mM ammonium acetate. A) BPE between 1500 and 5000 m/z . B) Deconvoluted mass spectrum. Conditions: BGE, 50 mM ammonium acetate, pH 7.4; sheath liquid flow rate, 120 $\mu\text{L/h}$; CE voltage, -20 kV; additional pressure during CE, 0.7 psi; hydrodynamic injection of Aclotine[®] (15 g/L), 30 sec at 0.5 psi.

We studied the influence of the organic solvent contained in the sheath liquid on the ionization efficiency. Different ratios of isopropanol/water were tested: 20:80, 50:50, 60:40, and 80:20 (v/v). Surprisingly, the sheath liquid with the highest quantity of isopropanol, i.e. 80:20, was deleterious for the MS detection with a lot of background signal in the mass range 1000-2000 m/z . A ratio 60:40 did not bring significant improvement compared to the ratio 50:50. Interestingly, the use of a ratio 20:80 allowed detecting only the second charge envelope of AT (Fig.3B). This result indicates that the protein denaturation happens during the ESI process due to the presence of isopropanol in the sheath liquid, confirming that the CE process does not induce denaturation of the protein, and that the conformation of the protein is preserved during the separation. A few experiments with methanol, instead of isopropanol, were also undertaken but they did not improve the signal intensity. Finally, a sheath liquid consisted of isopropanol-water 50:50 (v/v) was selected, since this sheath liquid allowed to obtain a better ionization efficiency than the sheath liquid with a ratio 20:80.

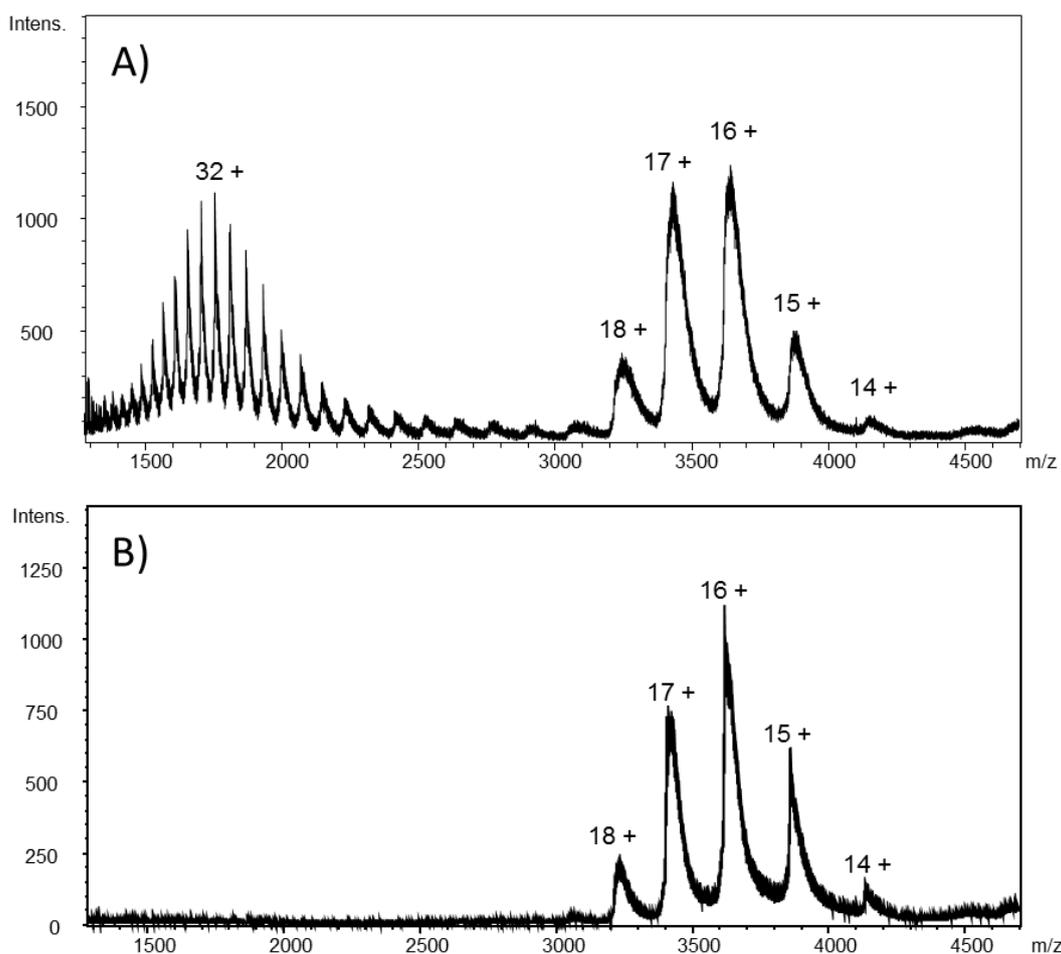


Fig.3. CE-MS analyses of Aclotine[®] with a sheath liquid composed of A) isopropanol-water 50:50 (v/v) with 14 mM ammonium acetate, B) isopropanol-water 20:80 (v/v) with 14 mM ammonium acetate. Sheath liquid flow rate: 120 μ L/h. For further conditions: see Fig.2.

3.2. CE-MS analyses of AT preparations

Three different AT preparations were analyzed with the developed CE-MS method: a marketed AT preparation (Aclotine[®]), a heterodimer-enriched preparation and a latent-enriched preparation. Aclotine[®] was used as a reference for the AT native form since it contains more than 70 % of this form. The latent-enriched preparation, containing more than 70 % of latent form, was used as a reference for the latent form. The heterodimer-enriched preparation, containing mainly heterodimeric forms but also a significant quantity of latent form (around 40 %), was considered as a mixture of heterodimeric and latent forms.

A sheath liquid composed of isopropanol-water 50:50 (v/v) containing 14 mM ammonium acetate, and delivered at a flow rate of 120 μ L/h, was employed for the CE-MS analyses. The mass range was increased to 7000 m/z during the acquisition of the mass spectra. As shown in

Figure 4, a third envelope with a charge distribution centered at 24+ was observed for the native and heterodimer-enriched preparations, indicating the detection of a dimeric state. The deconvolution of this third envelope led to an average molecular weight of 115 kDa, in agreement with the theoretical molecular weight of an AT dimer. As there is no mass difference between the native and the latent forms, the detected dimer may be a heterodimer as well as a homodimer. In the mass spectra, the monomeric forms of AT (first and second charge envelopes) were also detected. In the heterodimer-enriched preparation, a quantity of 40 % of latent form is expected, but this does not explain the high amount of monomeric forms observed. Therefore, dissociation of the non-covalently bound heterodimeric complex during the ionization and transfer to the detector most probably occur. However, the experimental conditions enable to detect the presence of a heterodimer due to its specific mass spectrum profile.

Regarding the second charge envelope associated with the different AT preparations, the observed charge distribution is slightly different (Fig.4). The mass spectra of the native form and heterodimer-enriched preparation exhibit a second charge envelope centered at 16+ charge state. However, the peaks at 15+ and 17+ charge states do not have the same relative abundance. The peak at 17+ charge state is higher than the peak at 15+ charge state in the case of the native form, whereas it is lower than the peak at 15+ charge state in the case of the heterodimer-enriched preparation. In contrast, the second charge envelope of the latent form is centered on the 15+ ion.

For the latent form, no first envelope was observed in the mass spectrum, indicating that this AT conformer is more resistant to denaturation than the native form. To confirm this hypothesis, CE-MS experiments in acidic conditions were carried out with the different AT preparations (Fig.5). Under acidic conditions, denaturation of the protein is likely to occur during the separation process. Furthermore, ionization suppression is negligible under these conditions, and therefore higher signal intensities should be observed in MS. In the particular case of the native form, no second charge envelope appeared in the mass spectrum, whereas for the latent form a second charge envelope with a high intensity was observed. This confirmed the very high stability of the latent form that still remains partially non-denatured under acidic conditions. These results are in very good agreement with what is described in the literature. Indeed, analyses by PAGE with transfer urea gradient showed that the latent form did not demonstrate the characteristic unfolding transition of native AT [5].

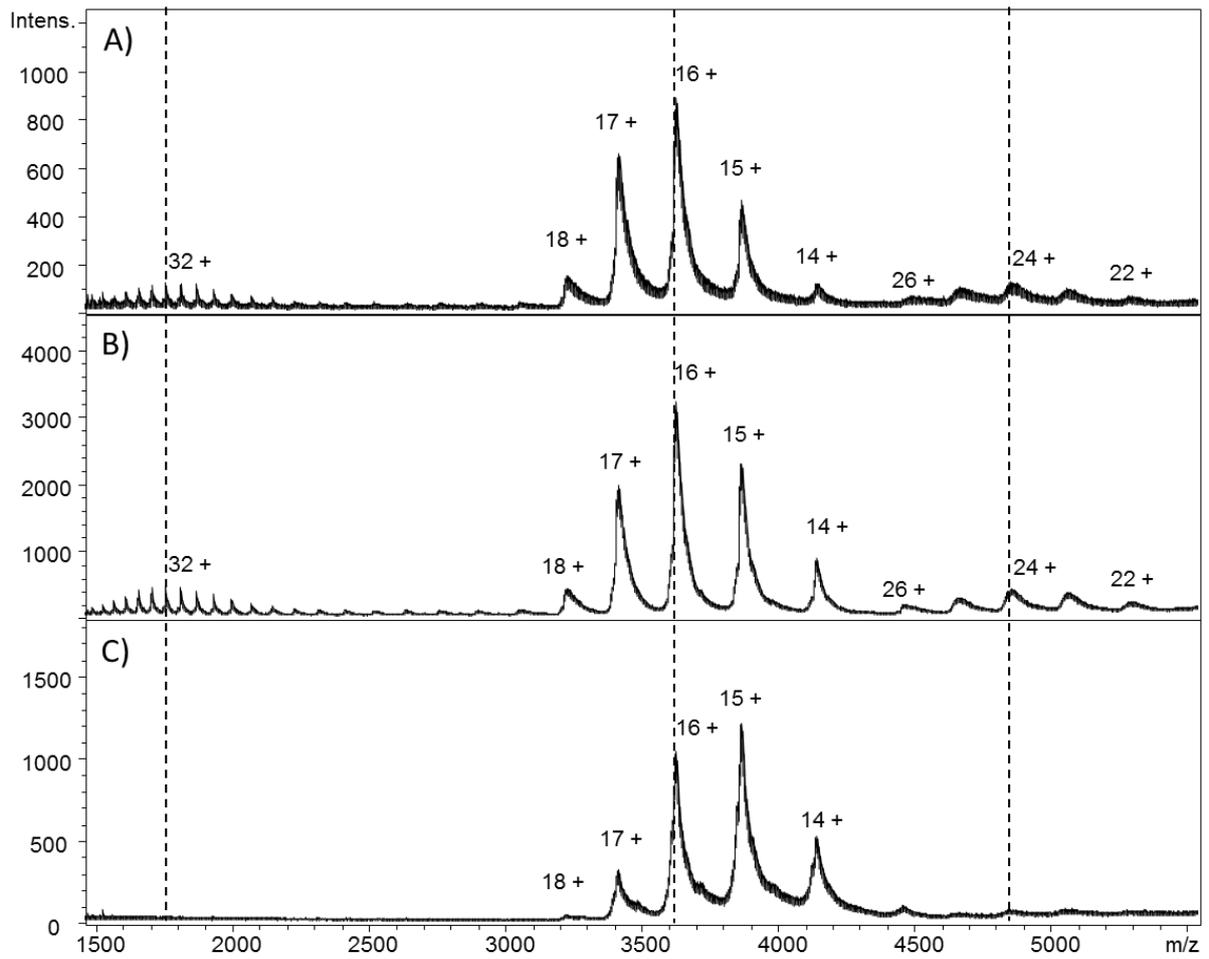


Fig.4. CE-MS analyses of A) AT native form, B) heterodimer-enriched preparation (containing also the latent form), and C) AT latent form. Conditions: sheath liquid, isopropanol-water 50:50 (v/v) with 14 mM ammonium acetate; hydrodynamic injections of the AT samples, 30 sec at 0.5 psi. Further conditions: see Fig.2.

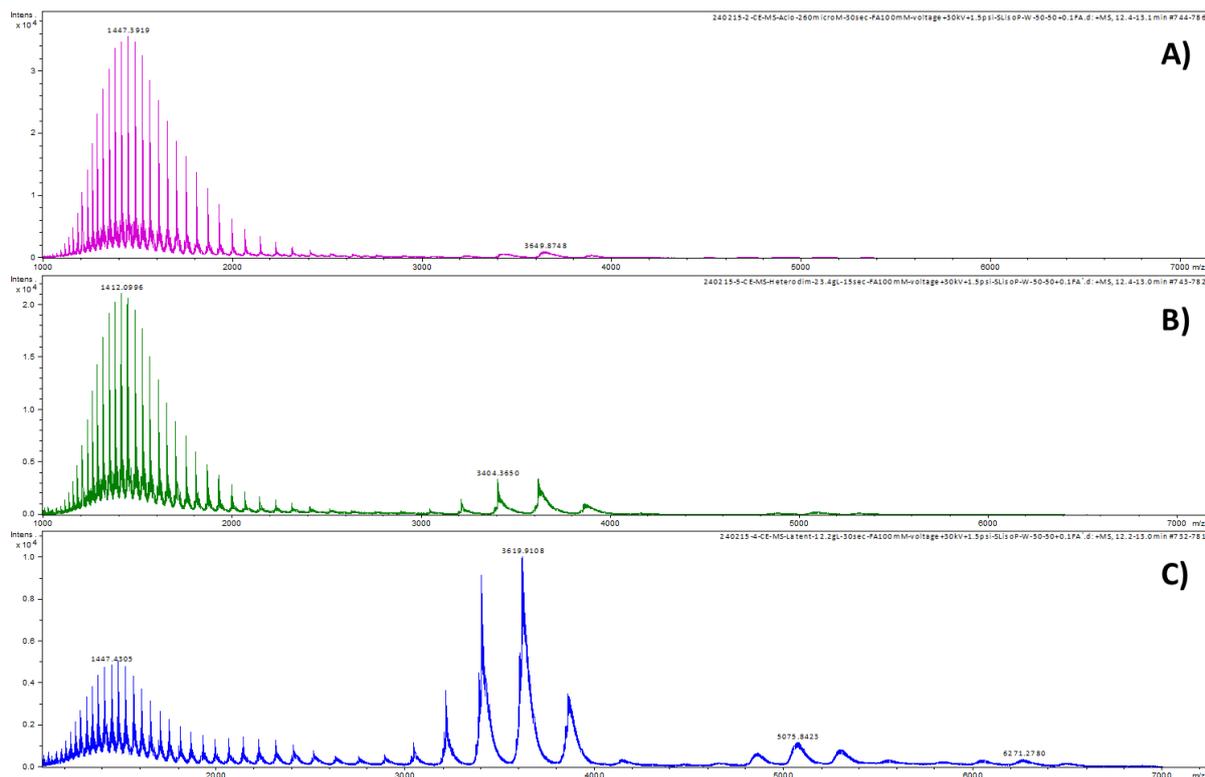


Fig.5. CE-MS analyses in acidic conditions of A) AT native form, B) heterodimer-enriched preparation (containing also the latent form), and C) AT latent form. Conditions: BGE, 100 mM formic acid, pH 3.0; sheath liquid, isopropanol-water 50:50 (v/v) with 0.1 % formic acid delivered at a flow rate of 200 μ L/h; CE voltage, +30 kV; hydrodynamic injections of the AT samples at 0.5 psi for 30 sec (A, C) and 15 sec (B).

3.3. Separation of native and latent conformers

In order to see if the native and latent forms could be separated by using the developed CE-MS method, different experiments were carried out by injecting the two conformers. For these experiments, an additional pressure of 0.7 psi was applied during the CE analysis, which gave a good compromise between the analysis time and the CE resolution. No mass difference was expected between the two conformers, but the above mentioned results showed that they could be distinguished based on their specific charge state distributions.

First, mixtures of latent and native forms in ratios 1/3 and 2/3 were analyzed. The BPE profile showed two partially separated peaks. The extracted mass spectra of these peaks showed that the first peak corresponded to the heterodimer-enriched preparation, whereas the second one corresponded to the native form only. However, the mass spectrum corresponding to the latent form was not observed. Association of both latent and native forms during the mixing and/or

the separation could explain these results. In order to further investigate this, and to see if we could separate the native from the latent form, different co-injections experiments were performed.

Native and latent forms were co-injected in successive plugs with a BGE plug between them. Experiments carried out with successive injections of latent form (plug of 30 sec), BGE (plug of 60 sec), and finally native form (plug of 30 sec) led to the separation of two well resolved peaks (Fig.6). The mass spectra of the two peaks showed different charge distributions. The mass spectrum of the first peak corresponded to a latent form, whereas the mass spectrum of the second peak corresponded to the native form. Experiments carried out with a BGE plug of only 15 sec led to two peaks, but not baseline separated. In this case, the mass spectrum of the second peak corresponded to the native form, but the mass spectrum of the first peak corresponded to the profile of the heterodimer-enriched preparation. No mass spectrum corresponding to the latent form was observed. As the heterodimer has a stoichiometry 1:1, and that the injected concentrations of native and latent forms were similar, we can suppose that if we detect free native form, we should detect free latent form. By consequence, the first peak probably contains both latent and heterodimeric forms. This result suggests that latent and native forms associate during the CE analysis to form a heterodimer. One possible explanation is that the two conformers were mixed together during the co-injection, despite a separation BGE plug, due to the parabolic profile of the hydrodynamic injection. Indeed, it has already been reported that a mixture of AT native and latent forms in equimolar proportions led to the formation of a heterodimer [8].

We have performed experiments by inverting the order of injections to see if we could separate native from latent form in this case, or if we could observe a change in the CE-MS profile due to a difference in the electrophoretic mobility (μ_{ep}) of each conformer. Experiments were then carried out with successive injections of native form (plug of 30 sec), BGE (plug of 60 sec), and finally latent form (plug of 30 sec). In this case, only one peak with a big shoulder was observed. The mass spectra extracted at different times of the BPE showed that the main peak corresponded to the native form, but that the following shoulder corresponded to the latent form. In addition, heterodimer was detected between the main peak and the shoulder, indicating again that latent and native forms could associate during the CE analysis.

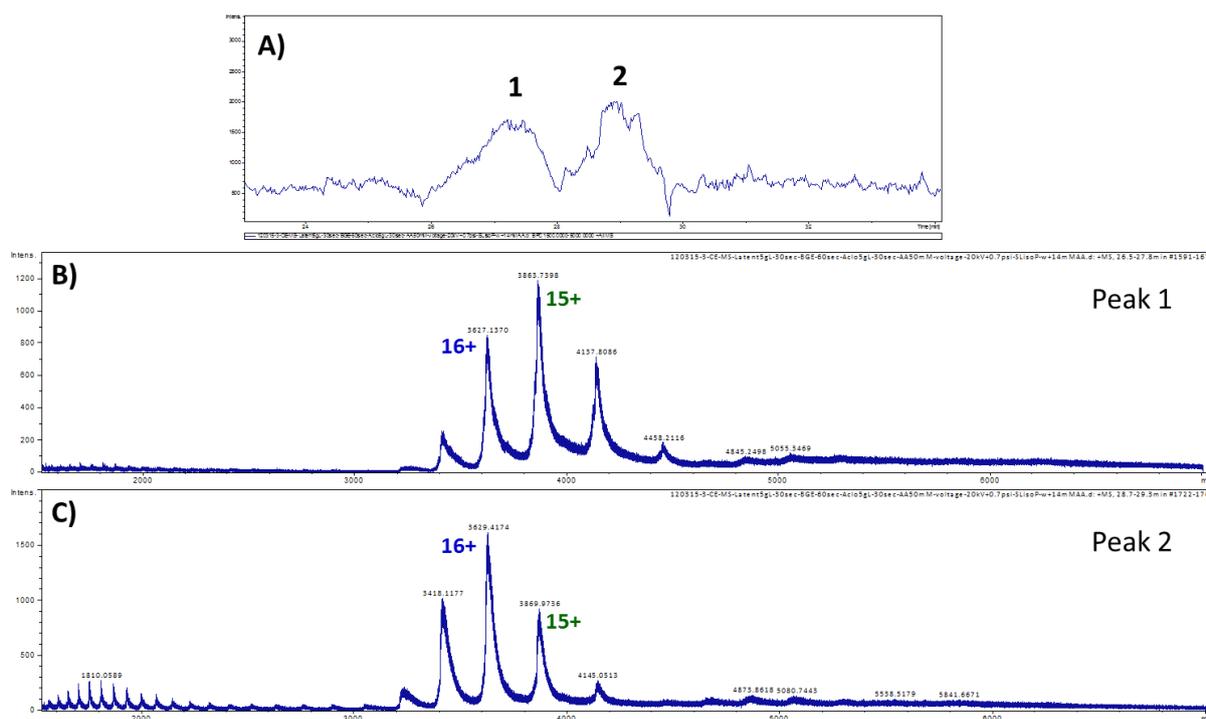


Fig.6. Co-injection experiment with AT native and latent forms. Successive hydrodynamic injections at 0.5 psi were carried out with the following sequence: latent form (5 g/L) for 30 sec, BGE plug for 60 sec, native form (5 g/L) for 30 sec. A) BPE between 1500-5000 m/z , B) and C) extracted mass spectra of peak 1 and peak 2, respectively. Conditions: BGE, 50 mM ammonium acetate; sheath liquid, isopropanol-water 50:50 (v/v) with 14 mM ammonium acetate; additional pressure during CE, 0.7 psi. Further conditions: see Fig.2.

These different co-injection experiments prove that the latent form has a higher μ_{ep} than the native form in these CE-MS conditions. This can be explained by the smaller size of the latent conformer due to the complete insertion of the RCL. Furthermore, the RCL of native AT is composed of two arginine residues, which are positively charged at pH 7.4. We can thereby suppose that the native form is less negatively charged than the latent form at this pH.

3.4. Stability study

We applied the developed CE-MS method to the analysis of a sample of Aclotine[®] stored at room temperature for three weeks. An additional pressure of 0.7 psi during CE was used, to be in the same condition as the previous co-injection experiments. As shown in Figure 7A, two peaks were separated, the first one being three times higher than the second one (for sake of comparison, only one peak was observed when a fresh sample of Aclotine[®] was analyzed in the same conditions, see Fig.2). The deconvoluted mass spectra of both peaks led to the same molecular mass of 57858 Da. However, the extracted mass spectra, before

deconvolution, showed that the first peak corresponded to a mixture of latent and heterodimeric forms (the profile being similar to that of the heterodimer-enriched preparation) (Fig.7B), whereas the second peak corresponded to the native form only (Fig.7C).

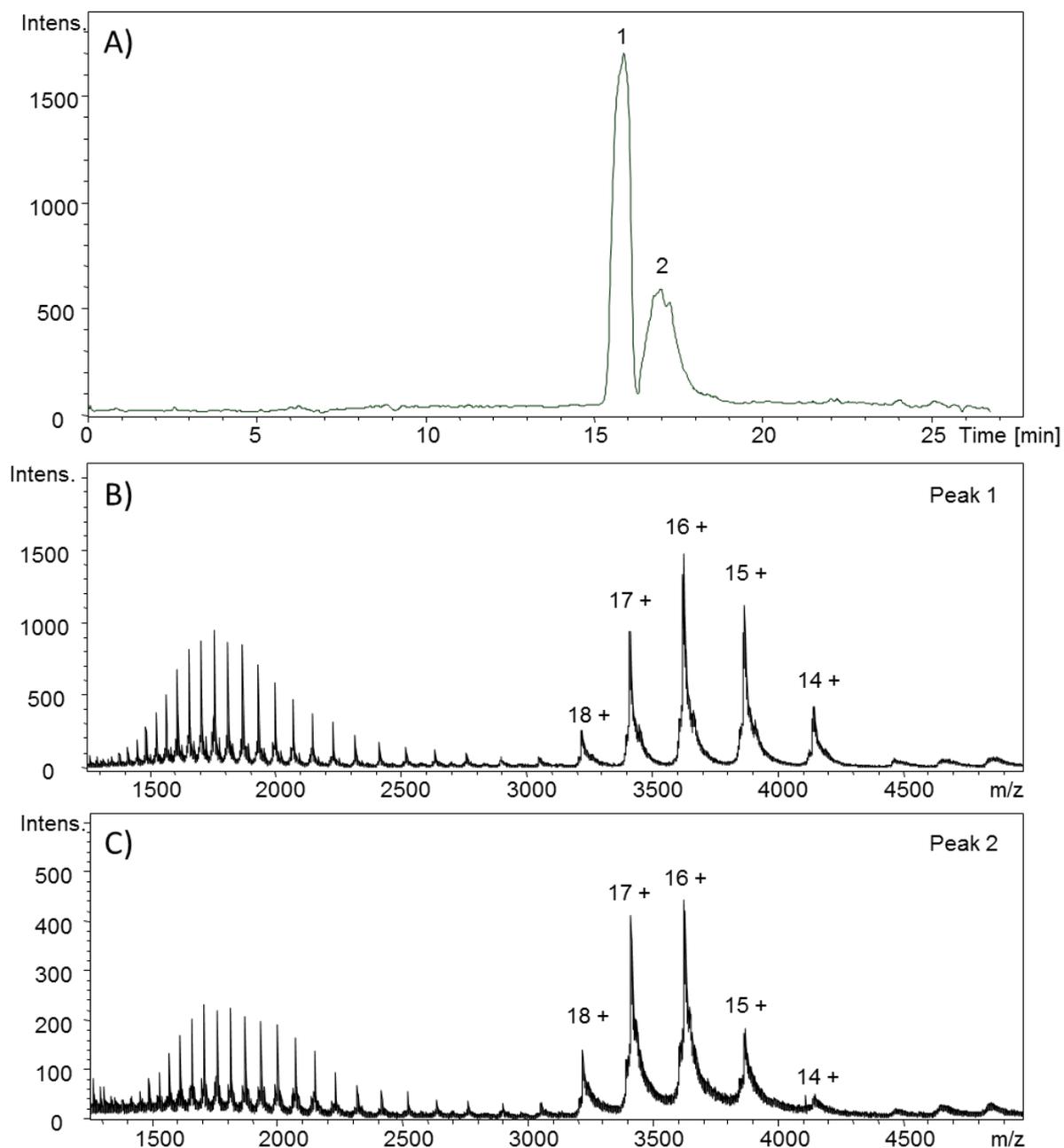


Fig.7. CE-MS analysis of a sample of Aclotine[®] stored at room temperature for three weeks. A) BPE between 1500-5000 m/z , B) and C) extracted mass spectra of peak 1 and peak 2, respectively. Conditions: hydrodynamic injection of the AT sample, 30 sec at 0.5 psi. Further conditions: see Fig.2.

This result indicates that a high quantity of latent and heterodimeric forms was formed during the storage at room temperature. This result is in good agreement with what we expected

because the conversion of the native AT to the latent conformer is a slow spontaneous process which may happen at mild temperature.

4. Conclusion

In the past, CE-MS has been successfully exploited to characterize glycoforms of intact proteins and to detect related proteins, like oxidized, deamidated or truncated forms. However, to our knowledge, it has never been applied to the analysis of protein conformers. One possible explanation may be the difficulty to distinguish them because they are isobaric forms. The detection of dimeric forms is not easier owing to their tendency to dissociate into the ESI source, and only very few papers described the analysis of dimers by using CE-MS.

In this work, we explored the possibilities of CE-MS to separate conformers of AT. To preserve the protein conformation and the non-covalently bound heterodimeric complex, non-denaturing conditions were selected. The optimization of parameters like composition and flow rate of the sheath liquid provided increased ionization efficiency, leading to a better signal-to-noise ratio. The analyses of different AT preparations showed that the mass spectra associated with each AT form (native, latent and heterodimer) exhibited specific charge state distributions, allowing to unambiguously differentiate them. The mass spectra also showed a non-dissociated dimeric form. CE-MS experiments performed with different AT preparations showed that the native and latent forms had different electrophoretic mobilities. These experiments also revealed that they could associate to form a heterodimer during the CE analysis. Finally, the analysis of a commercial AT preparation stored at room temperature for several weeks proved that the developed CE-MS method was able to detect the presence of a high quantity of latent and heterodimeric forms. As these forms are inactive forms, the developed method could be used in quality control of pharmaceutical AT preparations.

Acknowledgments

This work and the PhD fellowship of A.L. Marie were supported by the French National Agency of Research (ANR2011-RPIB N°01803, THERAT project). The authors would like to thank Dr Rob Haselberg and Dr Rabah Gahoual for fruitful discussions.

The authors declared conflict of interest with LFB Biotechnologies.

References

- [1] J.A. Huntington, R.J. Read, R.W. Carrell, Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation, *Nature* 407 (2000) 923-926.
- [2] L. Jin, J.P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R.N. Pike, R.W. Carrell, The anticoagulant activation of antithrombin by heparin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 14683-14688.
- [3] E. Ersdal-Badju, A. Lu, Y. Zuo, V. Picard, S.C. Bock, Identification of the antithrombin III heparin binding site, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19393-19400.
- [4] K. Cai, W.P. Osheroff, G. Buczynski, J. Hotta, J. Lang, E. Elliott, D.C. Lee, N.J. Roth, Characterization of Thrombate III[®], a pasteurized and nanofiltered therapeutic human antithrombin concentrate, *Biologicals* 42 (2014) 133-138.
- [5] M.R. Wardell, W.S.W. Chang, D. Bruce, R. Skinner, A.M. Lesk, R.W. Carrell, Preparative induction and characterization of L-antithrombin: a structural homologue of latent plasminogen activator inhibitor-1, *Biochemistry* 36 (1997) 13133-13142.
- [6] A. Mushunje, G. Evans, S.O. Brennan, R.W. Carrell, A. Zhou, Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 2170-2177.
- [7] R.W. Carrell, P.E. Stein, G. Fermi, M.R. Wardell, Biological implications of a 3Å structure of dimeric antithrombin, *Structure* 2 (1994) 257-270.
- [8] A. Zhou, J.A. Huntington, R.W. Carrell, Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis, *Blood* 94 (1999) 3388-3396.
- [9] J.C. Whisstock, G.A. Silverman, P.I. Bird, S.P. Bottomley, D. Kaiserman, C.J. Luke, S.C. Pak, J.M. Reichhart, J.A. Huntington, Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 24307-24312.
- [10] D.J.D. Johnson, J. Langdown, W. Li, S.A. Luis, T.P. Baglin, J.A. Huntington, Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35478-35486.
- [11] J. Corral, J. Rivera, J.A. Guerrero, A. Miñano, I. Alberca, D. Hernández-Espinosa, A. Ordóñez, C. Martínez, L. Navarro-Núñez, R. González-Conejero, M.L. Lozano, V. Vicente, Latent and polymeric antithrombin: clearance and potential thrombotic risk, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 232 (2007) 219-226.
- [12] A. Heger, T. Grunert, P. Schulz, D. Josic, A. Buchacher, Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography, *Thromb. Res.* 106 (2002) 157-164.
- [13] T.F. Busby, D.H. Atha, K.C. Ingham, Thermal denaturation of antithrombin III: stabilization by heparin and lyotropic anions, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 12140-12147.

- [14] J.A. Huntington, T.J. Sendall, M. Yamasaki, New insight into serpin polymerization and aggregation, *Prion* 3 (2009) 12-14.
- [15] M. Yamasaki, W. Li, D.J.D. Johnson, J.A. Huntington, Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization, *Nature* 455 (2008) 1255-1259.
- [16] J.C. May, J.A. McLean, Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1422-1436.
- [17] A.B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H.H. Hill Jr., Ion mobility-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1-22.
- [18] A. Beck, S. Sanglier-Cianféroni, A. van Dorsselaer, Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4637-4646.
- [19] U.I. Ekeowa, J. Freeke, E. Miranda, B. Gooptu, M.F. Bush, J. Pérez, J. Teckman, C.V. Robinson, D.A. Lomas, Defining the mechanism of polymerization in the serpinopathies, *PNAS* 107 (2010) 17146-17151.
- [20] C. Pritchard, G. O'Connor, A.E. Ashcroft, The role of ion mobility spectrometry-mass spectrometry in the analysis of protein reference standards, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7205-7212.
- [21] P.G. Righetti, B. Verzola, Folding/unfolding/refolding of proteins: present methodologies in comparison with capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 22 (2001) 2359-2374.
- [22] H. Stutz, M. Wallner, H. Malissa Jr., G. Bordin, A.R. Rodriguez, Detection of coexisting protein conformations in capillary zone electrophoresis subsequent to transient contact with sodium dodecyl sulfate solutions, *Electrophoresis* 26 (2005) 1089-1105.
- [23] S. Hapuarachchi, S. Fodor, I. Apostol, G. Huang, Use of capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate to monitor disulfide scrambled forms of an Fc fusion protein during purification process, *Anal. Biochem.* 414 (2011) 187-195.
- [24] J. Gysler, M. Mazereeuw, B. Helk, M. Heitzmann, U. Jaehde, W. Schunack, U.R. Tjaden, J. van der Greef, Utility of isotachopheresis-capillary zone electrophoresis, mass spectrometry and high-performance size-exclusion chromatography for monitoring of interleukin-6 dimer formation, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 63-73.
- [25] C. Przybylski, M. Mokaddem, M. Prull-Janssen, E. Saesen, H. Lortat-Jacob, F. Gonnet, A. Varenne, R. Daniel, On-line capillary isoelectric focusing hyphenated to native electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of interferon- γ and variants, *Analyst* 140 (2015) 543-550.
- [26] H. Larsson, P. Åkerud, K. Nordling, E. Raub-Segall, L. Claesson-Welsh, I. Björk, A novel anti-angiogenic form of antithrombin with retained proteinase binding ability and heparin affinity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11996-12002.

- [27] G. Karlsson, S. Winge, Preparative conversion of native human antithrombin to the latent form, *Protein Expr. Purif.* 26 (2002) 106-110.
- [28] G. Karlsson, S. Winge, Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 339-345.
- [29] G. Karlsson, S. Winge, Separation of native and latent forms of human antithrombin by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, *Protein Expr. Purif.* 21 (2001) 149-155.
- [30] S. Mochizuki, K. Miyano, M. Kondo, M. Hirose, A. Masaki, H. Ohi, Purification and characterization of recombinant human antithrombin containing the prelatent form in Chinese hamster ovary cells, *Protein Expr. Purif.* 41 (2005) 323-331.
- [31] L. Kremser, A. Brückner, A. Heger, T. Grunert, A. Buchacher, D. Josic, G. Allmaier, A. Rizzi, Characterization of antithrombin III from human plasma by two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoretic methods, *Electrophoresis* 24 (2003) 4282-4290.
- [32] R. Dönges, J. Römisch, H. Stauss, D. Brazel, Separation of antithrombin III variants by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 307-313.
- [33] U.M. Demelbauer, A. Plematl, L. Kremser, G. Allmaier, D. Josic, A. Rizzi, Characterization of glyco isoforms in plasma-derived human antithrombin by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-quadrupole ion trap-mass spectrometry of the intact glycoproteins, *Electrophoresis* 25 (2004) 2026-2032.
- [34] S. Fermas, F. Gonnet, A. Varenne, P. Gareil, R. Daniel, Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4987-4993.
- [35] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012, *Electrophoresis* 34 (2013) 99-112.
- [36] M. Pioch, S.C. Bunz, C. Neusüß, Capillary electrophoresis/mass spectrometry relevant to pharmaceutical and biotechnological applications, *Electrophoresis* 33 (2012) 1517-1530.
- [37] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2289-2296.
- [38] A.L. Marie, C. Przybylski, F. Gonnet, R. Daniel, R. Urbain, G. Chevreux, S. Jorieux, M. Taverna, Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin, *Anal. Chim. Acta* 800 (2013) 103-110.
- [39] A.L. Marie, N.T. Tran, E.P. Bianchini, F. Saller, S. Pautus, T. Abache, J.L. Plantier, R. Urbain, D. Borgel, M. Taverna, A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 111 (2015) 64-70.

Conclusion générale

Durant ce travail de thèse, nous avons été amenés à développer des méthodes analytiques pour atteindre deux objectifs très différents. Le premier consistait à évaluer la capacité de nouvelles protéines recombinantes à être des candidats médicaments, alors que le second concernait le contrôle qualité de protéines thérapeutiques déjà commercialisées en tant que produits finis. Dans les deux cas, notre choix s'est porté sur l'électrophorèse capillaire, que nous avons couplée pour certaines expériences à la spectrométrie de masse. En effet, bien que la CE soit encore relativement peu utilisée dans les entreprises pharmaceutiques comparativement à la chromatographie liquide, cette technique possède des avantages indéniables pour l'analyse des protéines. Son atout majeur est qu'elle permet d'analyser les protéines dans des conditions proches des conditions physiologiques, ce qui évite de les dénaturer ou de modifier leur conformation durant l'analyse, comme c'est souvent le cas avec les méthodes chromatographiques. Bien qu'un des problèmes majeurs de la CE soit l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire, il est possible en ayant recours à des techniques de greffage performantes ou des optimisations de rinçage du capillaire de limiter considérablement cette adsorption.

Dans le cadre du projet THERAT il a été nécessaire, comme nous l'avons expliqué dans l'introduction du chapitre 3, de développer une méthode analytique permettant d'évaluer l'affinité pour l'héparine de variants d'AT nouvellement synthétisés par les techniques de l'ADN recombinant. Parmi les méthodes existantes pour étudier l'affinité entre une protéine et un ligand, il y a des méthodes de choix telles que la spectrofluorimétrie. Cependant, cette dernière n'était pas adaptée à notre contexte puisque nous souhaitons analyser les variants d'AT directement à partir des surnageants de culture cellulaire dans lesquels ils sont produits, or la spectrofluorimétrie nécessite d'analyser des protéines purifiées. De plus, cette méthode est fortement consommatrice d'échantillon protéique, alors que chaque nouveau variant à analyser était produit en très petites quantités par culture cellulaire. D'autres méthodes semblaient alors plus indiquées, telles que la SPR ou l'ELISA. Ces méthodes présentent l'avantage de pouvoir analyser des protéines non purifiées. D'autre part, elles permettent de cribler un grand nombre de protéines en un temps très court. Cependant, ces méthodes nécessitent d'immobiliser l'héparine sur un support, ce qui entrave la flexibilité conformationnelle du polysaccharide indispensable à la formation d'un complexe

AT/héparine stable. Dans le cas de l'ELISA, un autre inconvénient est l'utilisation d'un anticorps intermédiaire qui ajoute un facteur d'erreur, puisque la mesure d'affinité va également dépendre de l'interaction entre l'AT et l'anticorps. A l'inverse, l'électrophorèse capillaire d'affinité semblait répondre complètement à notre objectif. En effet, celle-ci permet non seulement d'analyser des protéines non purifiées, mais également de préserver la flexibilité conformationnelle des deux partenaires en interaction. Parmi les différentes méthodes d'électrophorèse capillaire d'affinité, nous avons choisi le mode le plus simple et le plus utilisé, c'est-à-dire le mode ACE. En effet, contrairement aux méthodes d'analyses frontales telles que la FA ou la FACCE, le mode ACE permet de ne pas consommer une quantité trop élevée d'échantillon. Ce mode se distingue aussi par la facilité de retraitement des électrophérogrammes afin de déterminer une constante d'association, contrairement à des méthodes beaucoup plus complexes telles que celles des pics de vacance ou la NECEEM. Nous sommes parvenus à développer une méthode ACE qui permet de déterminer, de manière précise et reproductible, une constante de dissociation (K_d) entre un variant d'AT et l'héparine en seulement deux heures d'analyse. Pour cela, nous avons utilisé un capillaire de silice vierge afin de bénéficier d'un flux électroosmotique élevé, permettant de réduire le temps d'analyse, et avons optimisé le conditionnement initial du capillaire ainsi que les méthodes de rinçage entre les différentes analyses, afin de minimiser l'adsorption sur les parois du capillaire non seulement de l'AT et de l'héparine, mais également des autres constituants présents dans les surnageants de culture cellulaire. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité est utilisée pour analyser des protéines thérapeutiques directement à partir de surnageants de culture cellulaire. Certes, cette méthode ne permet pas de faire du criblage haut débit mais elle a permis, dans le cadre du projet THERAT, de confirmer l'affinité élevée de certains variants d'AT pour l'héparine, en accord avec les mutations réalisées. Par conséquent, les analyses effectuées avec la méthode ACE optimisée ont participé à la sélection de plusieurs variants d'AT nouvellement produits.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à développer une méthode plus nouvelle basée sur l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA). En effet, la TDA permet, tout comme l'ACE, d'analyser l'AT et l'héparine en solution sans avoir besoin de fixer le ligand sur un support. La TDA est une technique relativement peu exploitée et aucune méthode TDA n'a encore été décrite dans la littérature pour analyser l'affinité entre l'AT et l'héparine. Nous avons commencé quelques travaux préliminaires avec de l'AT plasmatique, qui ont montré une augmentation du rayon hydrodynamique de l'AT par association à l'héparine. Ces résultats

étant très encourageants, nous aurions aimé poursuivre ces expériences afin de déterminer un K_d entre l'AT plasmatique et l'héparine. Malheureusement, le temps nous a manqué. Il faut cependant préciser que la méthode TDA développée au cours de cette thèse serait difficilement applicable à l'analyse de variants d'AT directement à partir des surnageants de culture cellulaire. En effet, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 3, une analyse TDA nécessite que l'échantillon injecté et le liquide porteur soient de composition strictement identique. Or, nous ne maîtrisons ni la nature ni la concentration des nombreuses molécules présentes dans les milieux de culture, ni même la qualité d'AT mutée produite dans chaque système. Par contre, cette méthode TDA pourrait permettre de calculer le rayon hydrodynamique de la forme latente de l'AT, qui diffère structurellement de la forme native par l'insertion de la boucle réactive.

Par la suite, nous avons été amenés à développer des méthodes analytiques afin de contrôler la qualité de préparations commerciales d'HSA et d'AT issues du fractionnement plasmatique. Notre choix s'est porté sur la CZE pour les raisons invoquées dans l'introduction du chapitre 4 (analyse en conditions non-dénaturantes, possibilité de séparer des formes apparentées très proches, couplage CE-MS envisageable...). Dans le cas de l'HSA, la méthode CZE développée a permis de séparer neuf formes de la protéine, alors que seulement trois à quatre formes sont séparées par les méthodes de chromatographie liquide développées jusqu'à présent. Comme nous l'avons expliqué, cette méthode CZE avait été mise au point par Youssef Alahmad, mais les formes séparées n'avaient pas été identifiées. Nous sommes parvenus au cours de cette thèse à montrer que, parmi les formes séparées, se trouvaient des formes oxydées, glyquées et tronquées de l'HSA. La méthode CZE développée a ainsi permis de montrer que certaines préparations d'HSA commerciales présentaient des taux élevés de formes oxydées et/ou glyquées. Bien que la méthode CZE développée permette de quantifier de manière précise les formes séparées, nous n'avons pas présenté de résultats quantitatifs lors de la comparaison de préparations produites par cinq fournisseurs différents. En effet, certains excipients présents dans les formulations d'HSA thérapeutique sont connus pour se lier à l'albumine. C'est le cas notamment du tryptophanate et du caprylate de sodium. Ces excipients pourraient donc modifier le comportement électrophorétique de certaines formes de l'HSA. De plus, quelques expériences de filtration effectuées au laboratoire sur certaines préparations d'HSA, pour éliminer les sels et excipients de petite taille, nous ont laissé supposer qu'il pourrait y avoir des formes d'HSA qui co-migrent avec les excipients. Il aurait donc été intéressant d'effectuer systématiquement la filtration des préparations concurrentes

avant de les analyser par CZE. Cependant, nous avons fait le choix de ne pas le faire pour deux raisons. Tout d'abord, il nous semblait pertinent d'analyser les préparations avec leurs excipients car ce sont ces formulations qui sont injectées aux patients. D'autre part, il a été montré que les étapes de filtration pouvaient entraîner des dégradations des protéines et notamment la formation d'espèces carbonylées.

Dans le cadre de cette étude sur l'HSA nous avons développé, dans un deuxième temps, une méthode CE-MS avec un tampon à pH physiologique et un capillaire neutre, afin de pouvoir analyser l'HSA dans des conditions similaires à celles de la méthode CZE développée. Cette méthode CE-MS a permis de détecter un grand nombre de formes tronquées et produits de glycation avancée de l'HSA, qui n'avaient encore pas été décrits dans la littérature. Malheureusement, elle n'a pas permis de séparer les différentes formes détectées. Ainsi, nous n'avons pas pu corrélérer les résultats obtenus par CE-MS avec ceux obtenus par CZE. Il reste donc à ce jour des interrogations sur l'identité de certains pics séparés par la méthode CZE.

Une seconde partie a constitué à étudier la qualité de préparations d'AT. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux conformères et dimères de la protéine, notamment sa forme latente et son hétérodimère. Il est en effet crucial de les détecter dans des préparations commerciales d'AT car ces deux molécules sont inactives et diminuent par conséquent l'efficacité thérapeutique de la protéine. Or, si de nombreuses méthodes chromatographiques ou électrophorétiques ont été développées afin d'analyser la glycosylation de l'AT, aucune méthode n'a permis jusqu'à présent de séparer et quantifier de manière précise la forme latente et l'hétérodimère de l'AT au cours d'une même analyse. En effet, il existe des méthodes chromatographiques d'affinité ou d'interactions hydrophobes qui parviennent à séparer la forme native et la forme latente de l'AT, mais aucune méthode chromatographique n'a été décrite afin d'analyser les hétérodimères de l'AT. Les seules méthodes actuelles qui permettent de détecter la forme latente et l'hétérodimère de l'AT sont des méthodes d'électrophorèse conventionnelle (SDS-PAGE, urée-PAGE et PAGE natif), mais celles-ci sont peu reproductibles et ne permettent pas une quantification précise. A l'inverse, la méthode CZE développée au cours de cette thèse permet en une seule analyse de séparer et quantifier la forme native, la forme latente et l'hétérodimère de l'AT. Cette méthode a ainsi permis de mettre en évidence la présence de quantités élevées de forme latente et/ou d'hétérodimère dans certaines préparations commerciales d'AT. Contrairement aux études réalisées sur l'HSA, nous avons pu cette fois donner des valeurs précises sur la quantité de

chaque forme présente dans les préparations, et même réaliser des études statistiques. En effet, nous avons procédé systématiquement à des étapes de filtration et avons comparé les profils CZE obtenus avant et après filtration sans observer de différences significatives.

La méthode CZE développée pour l'analyse d'AT plasmatique présente également l'avantage de séparer d'autres formes que celles précitées. Ces formes sont certainement des glycoformes de l'AT, mais elles pourraient tout aussi bien correspondre à des formes oxydées. Ces suppositions sont basées sur les analyses CE-MS que nous avons réalisées au laboratoire. En effet, durant cette thèse, nous avons été amenés à développer des méthodes CE-MS afin d'analyser des préparations commerciales d'AT plasmatique pour les raisons invoquées dans l'introduction du chapitre 5 (recherche de glycoformes et formes apparentées de l'AT avec un spectromètre de masse Q-TOF très résolutif, analyse de conformères et dimères de l'AT...). Les méthodes CE-MS développées ont permis de détecter non seulement une grande variété de glycoformes de l'AT, mais également de nombreuses formes oxydées. Parmi les glycoformes détectées, certaines sont peu ordinaires puisqu'elles portent deux acides sialiques successifs au bout de l'antenne d'une chaîne glycane. De telles glycoformes ont déjà été décrites dans la littérature mais visiblement uniquement dans le cas de protéines humaines recombinantes. D'autre part, il est important de souligner que certaines glycoformes d'AT détectées par CE-MS n'ont pas encore été identifiées par manque de temps ou difficulté d'interprétation. Il serait donc très intéressant de poursuivre cette identification afin de voir si d'autres formes non encore décrites ne pourraient pas être identifiées.

Les méthodes CE-MS développées ont également permis de mettre en évidence, aussi bien en conditions acides que basiques, une grande variété de formes dimériques de l'AT qui correspondent à l'auto-association d'une même glycoforme. De nouveau, de nombreux dimères n'ont pas encore été identifiés. Il serait intéressant de voir si certains d'entre eux pourraient correspondre, par exemple, à l'association d'une glycoforme α -AT et d'une glycoforme β -AT. Les analyses réalisées en conditions basiques ont permis une meilleure détection des dimères en optimisant le liquide additionnel. Il serait donc très intéressant d'analyser avec la méthode CE-MS optimisée en conditions basiques des préparations d'AT commerciales provenant de fournisseurs différents. Ainsi, cela permettrait de confirmer les résultats obtenus par CZE et certainement d'obtenir des informations supplémentaires quant à la nature des dimères contenus dans chaque préparation concurrente.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont conduit également au développement d'une méthode CE-MS en conditions non-dénaturantes, qui a permis de montrer que la forme native et la forme latente de l'AT présentaient des spectres de masse spécifiques permettant de les différencier sans ambiguïté, bien qu'aucune différence de masse n'existe entre ces deux conformères. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une méthode CE-MS permet l'analyse de conformères de protéines thérapeutiques. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus, malgré de nombreux ajustements des paramètres CE-MS, à être suffisamment résolutifs pour séparer les deux conformères lors de l'analyse d'une préparation commerciale d'AT plasmatisée, comme cela avait été le cas par CZE. Nous supposons que si la quantité de forme latente avait été plus élevée dans la préparation d'AT analysée, il aurait été possible de séparer les deux conformères. D'ailleurs, les expériences de stabilité que nous avons effectuées semblent le confirmer. En effet, l'analyse CE-MS d'un échantillon d'AT commercial exposé à température ambiante pendant plusieurs semaines a conduit à la séparation de deux pics bien distincts, qui sembleraient correspondre respectivement à la forme latente et la forme native de l'AT. Il serait donc intéressant de doper une préparation d'AT commerciale avec des quantités croissantes de forme latente pour vérifier si au-delà d'une certaine quantité de forme latente la méthode CE-MS est capable de la détecter. Dans le même ordre d'idées, nous pourrions analyser avec la méthode CE-MS développée les différentes préparations commerciales concurrentes analysées avec la méthode CZE, afin de voir si les quantités élevées de forme latente contenues dans certaines seraient détectables par CE-MS. Pour conclure sur ces expériences, nous pouvons dire que la méthode CE-MS développée a permis non seulement de montrer que la forme native et la forme latente de l'AT ne s'ionisaient pas de la même façon, mais également de confirmer qu'elles n'avaient pas la même mobilité électrophorétique. Ceci est bien évidemment lié à l'insertion de la boucle réactive dans la forme latente, ce qui d'une part entraîne une diminution du rayon hydrodynamique de la protéine et d'autre part masque des charges portées par cette boucle réactive.

Au final, ce qui nous a le plus gênés lors de l'analyse des conformères d'AT par CE-MS est la perte de résolution. Celle-ci étant liée en grande partie à l'effet siphon engendré par le couplage avec une interface à liquide additionnel, une piste envisageable serait l'utilisation d'une interface sheathless étant donné que ce type d'interface est censé réduire considérablement cet effet. Il serait également fort intéressant d'explorer une technique couplant la spectrométrie de masse à la spectrométrie à mobilité ionique (IM-MS). En effet,

l'IM-MS semble tout à fait adaptée à la séparation de conformères de protéines. De plus, elle permettrait peut-être de détecter des états conformationnels intermédiaires de l'AT.

Comme nous l'avons vu, les protéines thérapeutiques sont des mélanges hétérogènes, composés de formes apparentées et/ou de conformères qui peuvent diminuer l'efficacité thérapeutique du médicament. Ces formes ne sont pas toujours faciles à détecter en raison soit d'une trop faible différence structurale comparativement à la forme native, soit de la difficulté à préserver l'intégrité de la forme recherchée au cours de l'analyse. Il n'existe aucune méthode idéale ou universelle pour détecter et quantifier les nombreuses formes présentes dans une préparation commerciale de protéine thérapeutique. Néanmoins, nous avons vu le grand potentiel qu'offraient des méthodes basées sur l'électrophorèse capillaire. D'ailleurs, cette technique peut être utilisée à tous les stades du développement de la protéine thérapeutique, depuis le criblage de candidats médicaments jusqu'au produit fini. En effet, la CE permet d'analyser des protéines non purifiées, de réaliser des études de stabilité à différents pH ou différentes températures, et est très bien adaptée à du contrôle qualité. Cependant, elle reste encore très rarement utilisée dans les industries pharmaceutiques comparativement aux techniques chromatographiques. Ceci est certainement dû à une méconnaissance de la CE et au nombre restreint de personnes formées à cette technique. Ainsi, il subsiste un manque d'enthousiasme à résoudre des problèmes inhérents à celle-ci tels que l'adsorption des protéines sur les parois du capillaire. Quant au couplage CE-MS, nous avons montré qu'il offrait de belles perspectives mais il faudra certainement attendre encore quelques années avant de le voir s'implanter dans les industries pharmaceutiques.

Références

Acunha T., Ibáñez C., Reguera M.I., Sarò M., Navarro R., Redondo J.A., Reinecke H., Gallardo A., Simó C., Cifuentes A., *Potential of pro-dendronized polyamines with modulated segmental charge density as novel coating for fast and efficient analysis of peptides and basic proteins by CE and CE-MS*, *Electrophoresis* **2015**, 36: 1564-1571.

Adamson N.J., Reynolds E.C., *Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins*, *J. Chromatogr. B* **1997**, 699: 133-147.

Ahrer K., Jungbauer A., *Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants*, *J. Chromatogr. B* **2006**, 841: 110-122.

Alahmad Y., Tran N.T., Le Potier I., Forest E., Jorieux S., Taverna M., *A new CZE method for profiling human serum albumin and its related forms to assess the quality of biopharmaceuticals*, *Electrophoresis* **2011**, 32: 292-299.

Alahmad Y., *Développement et validation de méthodes reposant sur l'électrophorèse capillaire pour le contrôle qualité de protéines thérapeutiques: de l'albumine humaine issue du fractionnement plasmatique à l'interleukine-7 humaine recombinante*, Thèse de doctorat, Univ. Paris-Sud, **2010**.

Alizadeh A., Nieto de Castro C.A., Wakeham W.A., *The theory of the Taylor dispersion technique for liquid diffusivity measurements*, *Int. J. Thermophys.* **1980**, 1: 243-284.

Amon S., Plematl A., Rizzi A., *Capillary zone electrophoresis of glycopeptides under controlled electroosmotic flow conditions coupled to electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*, *Electrophoresis* **2006**, 27: 1209-1219.

Anderson C.L., Wang Y., Rustandi R.R., *Applications of imaged capillary isoelectric focusing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products*, *Electrophoresis* **2012**, 33: 1538-1544.

Aris R., *On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube*, *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* **1956**, 235: 67-77.

Bagal D., Valliere-Douglass J.F., Balland A., Schnier P.D., *Resolving disulfide structural isoforms of IgG2 monoclonal antibodies by ion mobility mass spectrometry*, *Anal. Chem.* **2010**, 82: 6751-6755.

Balaguer E., Demelbauer U., Pelzing M., Sanz-Nebot V., Barbosa J., Neusüß C., *Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis – electrospray – time-of-flight mass spectrometry*, *Electrophoresis* **2006**, 27: 2638-2650.

Bar-Or D., Bar-Or R., Rael L.T., Gardner D.K., Slone D.S., Craun M.L., *Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use*, *Crit. Care Med.* **2005**, 33: 1638-1641.

Beauchamp N.J., Pike R.N., Daly M., Butler L., Makris M., Dafforn T.R., Zhou A., Fitton H.L., Preston F.E., Peake I.R., Carrell R.W., *Antithrombins Wobble and Wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation*, *Blood* **1998**, 92: 2696-2706.

Beck A., Reichert J.M., *Approval of the first biosimilar antibodies in Europe: a major landmark for the biopharmaceutical industry*, *mAbs* **2013 a**, 5: 621-623.

Beck A., Wagner-Rousset E., Ayoub D., Van Dorsselaer A., Sanglier-Cianféran S., *Characterization of therapeutic antibodies and related products*, *Anal. Chem.* **2013 b**, 85: 715-736.

Beck A., Sanglier-Cianféran S., Van Dorsselaer A., *Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry*, *Anal. Chem.* **2012**, 84: 4637-4646.

Beck A., *Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies*, *mAbs* **2011**, 3: 107-110.

Bekri S., Leclercq L., Cottet H., *Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking*, *J. Chromatogr. A* **2015**, 1399: 80-87.

Bendahl L., Hansen S.H., Gammelgaard B., *Capillaries modified by noncovalent anionic polymer adsorption for capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and capillary electrophoresis mass spectrometry*, *Electrophoresis* **2001**, 22: 2565-2573.

Bennett L.E., Charman W.N., Williams D.B., Charman S.A., *Analysis of bovine immunoglobulin G by capillary gel electrophoresis*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, 12: 1103-1108.

Berger G., Girault G., *Macromolecule-ligand binding studied by the Hummel and Dreyer method: current state of the methodology*, *J. Chromatogr. B* **2003**, 797: 51-61.

Bertucci C., Pistolozzi M., De Simone A., *Structural characterization of recombinant therapeutic proteins by circular dichroism*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, 12: 1508-1516.

Biacchi M., Bhajun R., Saïd N., Beck A., François Y.N., Leize-Wagner E., *Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface*, *Electrophoresis* **2014**, 35: 2986-2995.

Bianchini E.P., Fazavana J., Picard V., Borgel D., *Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives*, *Blood* **2011**, 117: 2054-2060.

Boldt J., *Use of albumin: an update*, *Br. J. Anaesth.* **2010**, 104: 276-284.

Borgel D., Lerolle N., *Quel avenir pour les médicaments de l'hémostase dans le traitement du sepsis sévère après le Xigris[®] ?*, *Réanimation* **2013**, 22: 181-190.

Bowser M.T., Chen D.D.Y., *Higher order equilibria and their effect on analyte migration behavior in capillary electrophoresis*, Anal. Chem. **1998**, 70: 3261-3270.

Boyer-Neumann C., Wolf M., Larrieu M.J., *Les maladies thromboemboliques constitutionnelles*, m/s. **1987**, 3: 216-222.

Brochure du LFB, *Médicaments dérivés du plasma*, Dossier pharmacien hospitalier, ed. **2011**, 205 p.

Brock A., *Fragmentation hydrogen exchange mass spectrometry: a review of methodology and applications*, Protein Expr. Purif. **2012**, 84: 19-37.

Brunelle J.L., Green R., *One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)*, Methods Enzymol. **2014**, 541: 151-159.

Burnouf T., *Fractionnement plasmatique international: état des lieux*, Transfus. Clin. Biol. **2007**, 14: 41-50.

Busch M.H.A., Carels L.B., Boelens H.F.M., Kraak J.C., Poppe H., *Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **1997**, 777: 311-328.

Byler D.M., Susi H., *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra*, Biopolymers **1986**, 25: 469-487.

Cai K., Osheroff W.P., Buczynski G., Hotta J., Lang J., Elliott E., Lee D.C., Roth N.J., *Characterization of Thrombate III[®], a pasteurized and nanofiltered therapeutic human antithrombin concentrate*, Biologicals **2014**, 42: 133-138.

Cao J., Sun W., Gong F., Liu W., *Charge profiling and stability testing of biosimilar by capillary isoelectric focusing*, Electrophoresis **2014**, 35: 1461-1468.

Carballal S., Radi R., Kirk M.C., Barnes S., Freeman B.A., Alvarez B., *Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite*, Biochemistry **2003**, 42: 9906-9914.

Carrell R.W., Stein P.E., Fermi G., Wardell M.R., *Biological implications of a 3Å structure of dimeric antithrombin*, Structure **1994**, 2: 257-270.

Catai J.R., Sastre Toraño J., Jongen P.M.J.M., De Jong G.J., Somsen G.W., *Analysis of recombinant human growth hormone by capillary electrophoresis with bilayer-coated capillaries using UV and MS detection*, J. Chromatogr. B **2007**, 852: 160-166.

Catai J.R., Tervahauta H.A., De Jong G.J., Somsen G.W., *Noncovalently bilayer-coated capillaries for efficient and reproducible analysis of proteins by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **2005**, 1083: 185-192.

Chamieh J., Cottet H., *Size-based characterization of nanomaterials by Taylor dispersion analysis*, Chapter 9 in *Colloid and interface science in pharmaceutical research and development*, H. Ohshima, K. Makino eds., Elsevier, Amsterdam, **2014**, pp.173-192.

Chiari M., Cretich M., Stastna M., Radko S.P., Chrambach A., *Rapid capillary coating by epoxy-poly-(dimethylacrylamide): performance in capillary zone electrophoresis of protein and polystyrene carboxylate*, *Electrophoresis* **2001**, 22: 656-659.

Chou M.L., Bailey A., Avory T., Tanimoto J., Burnouf T., *Removal of transmissible spongiform encephalopathy prion from large volumes of cell culture media supplemented with fetal bovine serum by using hollow fiber anion-exchange membrane chromatography*, *Plos One* **2015**, 1-15.

Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L.Jr., Mulford D.J., Ashworth J.N., Melin M., Taylor H.L., *Preparation and properties of serum and plasma proteins: IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids*, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68: 459-475.

Colombo G., Clerici M., Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I., *Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases*, *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, 17: 1515-1527.

Corral J., Rivera J., Guerrero J.A., Miñano A., Alberca I., Hernández-Espinosa D., Ordóñez A., Martínez C., Navarro-Núñez L., González-Conejero R., Lozano M.L., Vicente V., *Latent and polymeric antithrombin: clearance and potential thrombotic risk*, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **2007**, 232: 219-226.

Corral J., Huntington J.A., González-Conejero R., Mushunje A., Navarro M., Marco P., Vicente V., Carrell R.W., *Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis*, *J. Thromb. Haemost.* **2004**, 2: 931-939.

Cottet H., Biron J.P., Martin M., *On the optimization of operating conditions for Taylor dispersion analysis of mixtures*, *Analyst* **2014**, 139: 3552-3562.

Creamer J.S., Oborny N.J., Lunte S.M., *Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis*, *Anal. Methods* **2014**, 6: 5427-5449.

Crommelin D.J.A., *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications*, 3rd ed., D.J.A. Crommelin, R.D. Sindelar, B. Meibohm eds., Informa Healthcare, New York, **2008**.

Dalmora S.L., D'Avila F.B., Da Silva L.M., Bergamo A.C., Zimmermann E.S., *Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay*, *J. Chromatogr. B* **2009**, 877: 2471-2476.

Dave N., Hazra P., Khedkar A., Manjunath H.S., Iyer H., Suryanarayanan S., *Process and purification for manufacture of a modified insulin intended for oral delivery*, *J. Chromatogr. A* **2008**, 1177: 282-286.

Debaene F., Wagner-Rousset E., Colas O., Ayoub D., Corvaia N., Van Dorsselaer A., Beck A., Cianfèrani S., *Time resolved native ion-mobility mass spectrometry to monitor dynamics of IgG4 Fab arm exchange and “bispecific” monoclonal antibody formation*, *Anal. Chem.* **2013**, 85: 9785-9792.

Demelbauer U.M., Plematl A., Josic D., Allmaier G., Rizzi A., *On the variation of glycosylation in human plasma derived antithrombin*, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1080: 15-21.

Demelbauer U.M., Plematl A., Kremser L., Allmaier G., Josic D., Rizzi A., *Characterization of glyco isoforms in plasma-derived human antithrombin by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-quadrupole ion trap-mass spectrometry of the intact glycoproteins*, *Electrophoresis* **2004 a**, 25: 2026-2032.

Demelbauer U.M., Zehl M., Plematl A., Allmaier G., Rizzi A., *Determination of glycopeptide structures by multistage mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation: comparison of electrospray ionization quadrupole ion trap and matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap reflectron time-of-flight approaches*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004 b**, 18: 1575-1582.

Denizli A., *Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification*, *J. Biol. Chem.* **2011**, 39: 315-341.

Derby P.L., Strickland T.W., Rohde M.F., Stoney K., Rush R.S., *Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin*, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, 47: 201-208.

Desai U.R., Petitou M., Björk I., Olson S.T., *Mechanism of heparin activation of antithrombin: role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin*, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273: 7478-7487.

Dickinson E.R., Jurneczko E., Pacholarz K.J., Clarke D.J., Reeves M., Ball K.L., Hupp T., Campopiano D., Nikolova P.V., Barran P.E., *Insights into the conformations of three structurally diverse proteins: cytochrome c, p53, and MDM2, provided by variable-temperature ion mobility mass spectrometry*, *Anal. Chem.* **2015**, 87: 3231-3238.

Diress A., Lorbetskie B., Larocque L., Li X., Alteen M., Isbrucker R., Girard M., *Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays*, *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217: 3297-3306.

Dolník V., *Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007*, *Electrophoresis* **2008**, 29: 143-156.

Dönges R., Römisch J., Stauss H., Brazel D., *Separation of antithrombin III variants by micellar electrokinetic chromatography*, *J. Chromatogr. A* **2001**, 924: 307-313.

Dossier du CNIMH, *Médicaments dérivés du sang*, *Revue d'évaluation sur le médicament*, **1997**, XVIII, 2-3: 167 p.

Du Y., Walsh A., Ehrick R., Xu W., May K., Liu H., *Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, mAbs* **2012**, 4: 578-585.

Dvořák M., Svobodová J., Beneš M., Gaš B., *Applicability and limitations of affinity capillary electrophoresis and vacancy affinity capillary electrophoresis methods for determination of complexation constants, Electrophoresis* **2013**, 34: 761-767.

Edmunds T., Van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., Cole E.S., *Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin, Blood* **1998**, 91: 4561-4571.

Ekeowa U.I., Freeke J., Miranda E., Gooptu B., Bush M.F., Pérez J., Teckman J., Robinson C.V., Lomas D.A., *Defining the mechanism of polymerization in the serpinopathies, PNAS* **2010**, 107: 17146-17151.

Endo S., Yamamoto Y., Sugawara T., Nishimura O., Fujino M., *The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human interleukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini, Biochemistry* **2001**, 40: 914-919.

Erim F.B., Cifuentes A., Poppe H., Kraak J.C., *Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A* **1995**, 708: 356-361.

Espinosa de la Garza C.E., Perdomo-Abúndez F.C., Padilla-Calderón J., Uribe-Wiechers J.M., Pérez N.O., Flores-Ortiz L.F., Medina-Rivero E., *Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis, Electrophoresis* **2013**, 34: 1133-1140.

Evenhuis C.J., Guijt R.M., Macka M., Marriott P.J., Haddad P.R., *Temperature profiles and heat dissipation in capillary electrophoresis, Anal. Chem.* **2006**, 78: 2684-2693.

Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P., *The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, Life* **2005**, 57: 787-796.

Fazavana J.G., *Développement d'une antithrombine modifiée inactive comme antidote des anticoagulants hépariniques, Thèse de doctorat, Univ. Paris-Sud*, **2012**.

Fekete S., Beck A., Veuthey J.L., Guillarme D., *Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *in press*.

Fekete S., Guillarme D., *Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins, Trends Anal. Chem.* **2014 a**, 63: 76-84.

Fekete S., Beck A., Veuthey J.L., Guillarme D., *Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014 b**, 101: 161-173.

Fekete S., Veuthey J.L., Guillaume D., *New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: theory and applications*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2012 a**, 69: 9-27.

Fekete S., Berky R., Fekete J., Veuthey J.L., Guillaume D., *Evaluation of recent very efficient wide-pore stationary phases for the reversed-phase separation of proteins*, J. Chromatogr. A **2012 b**, 1252: 90-103.

Feldmann A., Claußnitzer U., Otto M., *Optimization of capillary coating by hydroxyethyl methacrylate for capillary zone electrophoresis of proteins*, J. Chromatogr. B **2004**, 803: 149-157.

Fermas S., Gonnet F., Varenne A., Gareil P., Daniel R., *Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex*, Anal. Chem. **2007**, 79: 4987-4993.

Filipe V., Jiskoot W., Basmeh A.H., Halim A., Schellekens H., Brinks V., *Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice*, mAbs **2012**, 4: 740-752.

Fincke A., Winter J., Bunte T., Olbrich C., *Thermally induced degradation pathways of three different antibody-based drug development candidates*, Eur. J. Pharm. Sci. **2014**, 62: 148-160.

Finfer S., McEvoy S., Bellomo R., McArthur C., Myburgh J., Norton R., *Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis*, Intensive Care Med. **2011**, 37: 86-96.

Franzén L.E., Svensson S., *Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III*, J. Biol. Chem. **1980**, 255: 5090-5093.

Frenz J., Wu S.L., Hancock W.S., *Characterization of human growth hormone by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. **1989**, 480: 379-391.

Gahoual R., Biacchi M., Chicher J., Kuhn L., Hammann P., Beck A., Leize-Wagner E., François Y.N., *Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry*, mAbs **2014 a**, 6: 1464-1473.

Gahoual R., Busnel J.M., Wolff P., François Y.N., Leize-Wagner E., *Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes*, Anal. Bioanal. Chem. **2014 b**, 406: 1029-1038.

Garone L., Edmunds T., Hanson E., Bernasconi R., Huntington J.A., Meagher J.L., Fan B., Gettins P.G.W., *Antithrombin-heparin affinity reduced by fucosylation of carbohydrate at asparagine 155*, Biochemistry **1996**, 35: 8881-8889.

Gassner A.L., Rudaz S., Schappler J., *Static coatings for the analysis of intact monoclonal antibody drugs by capillary zone electrophoresis*, Electrophoresis **2013**, 34: 2718-2724.

Gervais D., King D., *Capillary isoelectric focusing of a difficult-to-denature tetrameric enzyme using alkylurea-urea mixtures*, Anal. Biochem. **2014**, 465: 90-95.

Gianazza E., *Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins*, J. Chromatogr. A **1995**, 705: 67-87.

Glassford S.E., Byrne B., Kazarian S.G., *Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins*, Biochim. Biophys. Acta **2013**, 1834: 2849-2858.

Goldberg M.E., Chaffotte A.F., *Undistorted structural analysis of soluble proteins by attenuated total reflectance infrared spectroscopy*, Protein Sci. **2005**, 14: 2781-2792.

Goormaghtigh E., Ruyschaert J.M., Raussens V., *Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination*, Biophys. J. **2006**, 90: 2946-2957.

Graul T.W., Schlenoff J.B., *Capillaries modified by polyelectrolyte multilayers for electrophoretic separations*, Anal. Chem. **1999**, 71: 4007-4013.

Gray J.J., *The interaction of proteins with solid surfaces*, Curr. Opin. Struct. Biol. **2004**, 14: 110-115.

Greenfield N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*, Nat. Protoc. **2006**, 1: 2876-2890.

Gregori L., Maring J.A., MacAuley C., Dunston B., Rentsch M., Kempf C., Rohwer R.G., *Partitioning of TSE infectivity during ethanol fractionation of human plasma*, Biologicals **2004**, 32: 1-10.

Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P., *Structural modifications of human albumin in diabetes*, Diabetes Metab. **2012**, 38: 171-178.

Gunturi S.R., Ghobrial I., Sharma B., *Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2007**, 43: 213-221.

Guo A., Han M., Martinez T., Ketchem R.R., Novick S., Jochheim C., Balland A., *Electrophoretic evidence for the presence of structural isoforms specific for the IgG2 isotype*, Electrophoresis **2008**, 29: 2550-2556.

Gysler J., Mazereeuw M., Helk B., Heitzmann M., Jaehde U., Schunack W., Tjaden U.R., Van der Greef J., *Utility of isotachopheresis-capillary zone electrophoresis, mass spectrometry and high-performance size-exclusion chromatography for monitoring of interleukin-6 dimer formation*, J. Chromatogr. A **1999**, 841: 63-73.

Hapuarachchi S., Fodor S., Apostol I., Huang G., *Use of capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate to monitor disulfide scrambled forms of an Fc fusion protein during purification process*, Anal. Biochem. **2011**, 414: 187-195.

Harris R.J., Kabakoff B., Macchi F.D., Shen F.J., Kwong M., Andya J.D., Shire S.J., Bjork N., Totpal K., Chen A.B., *Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody*, J. Chromatogr. B **2001**, 752: 233-245.

Harris R.J., *Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture*, J. Chromatogr. A **1995**, 705: 129-134.

Haselberg R., De Jong G.J., Somsen G.W., *CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012*, Electrophoresis **2013 a**, 34: 99-112.

Haselberg R., De Jong G.J., Somsen G.W., *Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins*, Anal. Chem. **2013 b**, 85: 2289-2296.

Haselberg R., Brinks V., Hawe A., De Jong G.J., Somsen G.W., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry using noncovalently coated capillaries for the analysis of biopharmaceuticals*, Anal. Bioanal. Chem. **2011 a**, 400: 295-303.

Haselberg R., De Jong G.J., Somsen G.W., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins 2007-2010*, Electrophoresis **2011 b**, 32: 66-82.

Haselberg R., De Jong G.J., Somsen G.W., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene-dextran sulfate-Polybrene-coated capillaries: system optimization and performance*, Anal. Chim. Acta **2010 a**, 678: 128-134.

Haselberg R., Ratnayake C.K., De Jong G.J., Somsen G.W., *Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins*, J. Chromatogr. A **2010 b**, 1217: 7605-7611.

Haselberg R., De Jong G.J., Somsen G.W., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins*, J. Chromatogr. A **2007**, 1159: 81-109.

He Y., Ning T., Xie T., Qiu Q., Zhang L., Sun Y., Jiang D., Fu K., Yin F., Zhang W., Shen L., Wang H., Li J., Lin Q., Sun Y., Li H., Zhu Y., Yang D., *Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds*, PNAS **2011 a**, 108: 19078-19083.

He Y., Isele C., Hou W., Ruesch M., *Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary*, J. Sep. Sci. **2011 b**, 34: 548-555.

He X., Ding Y., Li D., Lin B., *Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis*, Electrophoresis **2004**, 25: 697-711.

Heger A., Grunert T., Schulz P., Josic D., Buchacher A., *Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography*, Thromb. Res. **2002**, 106: 157-164.

Hepner M., Karlaftis V., *Antithrombin*, Methods Mol. Biol. **2013**, 992: 355-364.

Hilser V.J., Freire E., *Quantitative analysis of conformational equilibrium using capillary electrophoresis: applications to protein folding*, Anal. Biochem. **1995**, 224: 465-485.

Hong P., Koza S., Bouvier E.S.P., *Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates*, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. **2012**, 35: 2923-2950.

Houde D., Arndt J., Domeier W., Berkowitz S., Engen J.R., *Rapid characterization of IgG1 conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*, Anal. Chem. **2009**, 81: 2644-2651.

Houdebine L.M., *Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals*, Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. **2009**, 32: 107-121.

Huhn C., Ramautar R., Wuhrer M., Somsen G.W., *Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. **2010**, 396: 297-314.

Huikko K., Kotiaho T., Kostianen R., *Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom. **2002**, 16: 1562-1568.

Hunt G., Nashabeh W., *Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving analysis of a therapeutic recombinant monoclonal antibody: a biotechnology perspective*, Anal. Chem. **1999**, 71: 2390-2397.

Hunt G., Moorhouse K.G., Chen A.B., *Capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of recombinant humanized monoclonal antibody HER2*, J. Chromatogr. A **1996**, 744: 295-301.

Huntington J.A., Sendall T.J., Yamasaki M., *New insight into serpin polymerization and aggregation*, Prion **2009**, 3: 12-14.

Huntington J.A., *Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis*, J. Thromb. Haemost. **2003**, 1: 1535-1549.

Iki N., Yeung E.S., *Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **1996**, 731: 273-282.

Jensen H., Østergaard J., *Flow induced dispersion analysis quantifies noncovalent interactions in nanoliter samples*, J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132: 4070-4071.

Jia Z., Ramstad T., Zhong M., *Determination of protein-drug binding constants by pressure-assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal analysis (FA)*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2002**, 30: 405-413.

Jiang C., Armstrong D.W., *Use of CE for the determination of binding constants*, Electrophoresis **2010**, 31: 17-27.

Johnson D.J.D., Langdown J., Li W., Luis S.A., Baglin T.P., Huntington J.A., *Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation*, J. Biol. Chem. **2006**, 281: 35478-35486.

Joshi V.S., Kumar V., Rathore A.S., *Role of organic modifier and gradient shape in RP-HPLC separation: analysis of GCSF variants*, J. Chromatogr. Sci. **2015**, 53: 417-423.

Jungbauer A., Hahn R., *Ion-exchange chromatography*, Methods Enzymol. **2009**, 463: 349-371.

Kaneider N.C., Förster E., Mosheimer B., Sturn D.H., Wiedermann C.J., *Syndecan-4-dependent signaling in the inhibition of endotoxin-induced endothelial adherence of neutrophils by antithrombin*, Thromb. Haemost. **2003**, 90: 1150-1157.

Kanoatov M., Galievsky V.A., Krylova S.M., Cherney L.T., Jankowski H.K., Krylov S.N., *Using nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM) for simultaneous determination of concentration and equilibrium constant*, Anal. Chem. **2015**, 87: 3099-3106.

Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill H.H.Jr., *Ion mobility-mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. **2008**, 43: 1-22.

Karakasyan C., *Fonctionnalisation de surfaces par l'intermédiaire du couple adamantane / β -cyclodextrine ; application du procédé pour l'élaboration d'un immunocapteur*, Thèse de doctorat, Univ. Paris XII, **2005**.

Karlsson G., Winge S., *Preparative conversion of native human antithrombin to the latent form*, Protein Expr. Purif. **2002**, 26: 106-110.

Karlsson G., Winge S., *Separation of native and latent forms of human antithrombin by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography*, Protein Expr. Purif. **2001**, 21: 149-155.

Karlsson G., Gellerfors P., Persson A., Norén B., Edlund P.O., Sandberg C., Birnbaum S., *Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A **1999**, 855: 147-155.

Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N., *Stable capillary coating with successive multiple ionic polymer layers*, Anal. Chem. **1998 a**, 70: 2254-2260.

Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N., *Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis*, Anal. Chem. **1998 b**, 70: 5272-5277.

Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C., *How to study proteins by circular dichroism*, Biochim. Biophys. Acta **2005**, 1751: 119-139.

Kelly S.M., Price N.C., *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*, Curr. Protein Pept. Sci. **2000**, 1: 349-384.

Kelly J.F., Locke S.J., Ramaley L., Thibault P., *Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry*, J. Chromatogr. A **1996**, 720: 409-427.

Kinoshita M., Nakatsuji Y., Suzuki S., Hayakawa T., Kakehi K., *Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method*, J. Chromatogr. A **2013**, 1309: 76-83.

Kirby B.J., Hasselbrink E.F.Jr., *Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations*, Electrophoresis **2004**, 25: 187-202.

Kitagawa F., Kamiya M., Okamoto Y., Taji H., Onoue S., Tsuda Y., Otsuka K., *Electrophoretic analysis of proteins and enantiomers using capillaries modified by a successive multiple ionic-polymer layer (SMIL) coating technique*, Anal. Bioanal. Chem. **2006**, 386: 594-601.

Kleinova M., Buchacher A., Heger A., Pock K., Rizzi A., Allmaier G., *Exact molecular mass determination of various forms of native and de-N-glycosylated human plasma-derived antithrombin by means of electrospray ionization ion trap mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. **2004**, 39: 1429-1436.

Klyushnichenko V.E., Yakimov S.A., Arutyunyan A.M., Ivanov A.E., Maltsev K.V., Wulfson A.N., *Recombinant human insulin V: Optimization of the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation*, J. Chromatogr. B **1994**, 662: 363-369.

Konrat R., *NMR contributions to structural dynamics studies of intrinsically disordered proteins*, J. Magn. Reson. **2014**, 241: 74-85.

Kremser L., Brückner A., Heger A., Grunert T., Buchacher A., Josic D., Allmaier G., Rizzi A., *Characterization of antithrombin III from human plasma by two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoretic methods*, Electrophoresis **2003**, 24: 4282-4290.

Krull I.S., Liu X., Dai J., Gendreau C., Li G., *HPCE methods for the identification and quantitation of antibodies, their conjugates and complexes*, J. Pharm. Biomed. Anal. **1997**, 16: 377-393.

Krylov S.N., *Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM): a novel method for biomolecular screening*, J. Biomol. Screen. **2006**, 11: 115-122.

Kükroer B., Filipe V., Van Duijn E., Kasper P.T., Vreeken R.J., Heck A.J.R., Jiskoot W., *Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography*, Pharm. Res. **2010**, 27: 2197-2204.

Lacher N.A., Wang Q., Roberts R.K., Holovics H.J., Aykent S., Schlittler M.R., Thompson M.R., Demarest C.W., *Development of a capillary gel electrophoresis method for monitoring disulfide isomer heterogeneity in IgG2 antibodies*, Electrophoresis **2010**, 31: 448-458.

Lanucara F., Holman S.W., Gray C.J., Eyers C.E., *The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics*, Nature Chem. **2014**, 6: 281-294.

Larsson H., Åkerud P., Nordling K., Raub-Segall E., Claesson-Welsh L., Björk I., *A novel anti-angiogenic form of antithrombin with retained proteinase binding ability and heparin affinity*, J. Biol. Chem. **2001**, 276: 11996-12002.

Lasdun A.M., Kurumbail R.R., Leimgruber N.K., Rathore A.S., *Validatibility of a capillary isoelectric focusing method for impurity quantitation*, J. Chromatogr. A **2001**, 917: 147-158.

Le Saux T., Varenne A., Perreau F., Siret L., Duteil S., Duhau L., Gareil P., *Determination of the binding parameters for antithrombin-heparin fragment systems by affinity and frontal analysis continuous capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **2006**, 1132: 289-296.

Le Saux T., Varenne A., Gareil P., *Peak shape modeling by Haarhoff-Van der Linde function for the determination of correct migration times: a new insight into affinity capillary electrophoresis*, Electrophoresis **2005**, 26: 3094-3104.

Le Saux T., *Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances. Rationalisation des protocoles*, Thèse de doctorat, Univ. Paris VI, **2004**.

Lee H.G., *High-performance sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of antibodies and antibody fragments*, J. Immunol. Methods **2000**, 234: 71-81.

Lemesle-Lamache V., Taverna M., Wouessidjewe D., Duchêne D., Ferrier D., *Determination of the binding constant of salbutamol to unmodified and ethylated cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **1996**, 735: 321-331.

Levi M., Schouten M., Van der Poll T., *Sepsis, coagulation, and antithrombin: old lessons and new insights*, Semin. Thromb. Hemost. **2008**, 34: 742-746.

Li Y., Rao C., Tao L., Wang J., Lorbetskie B., Girard M., *Improved detection of variants in recombinant human interferon alpha-2a products by reverse-phase high-performance liquid chromatography on a core-shell stationary phase*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2014**, 88: 123-129.

Li N., Kessler K., Bass L., Zeng D., *Evaluation of the iCE280 Analyzer as a potential high-throughput tool for formulation development*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2007**, 43: 963-972.

Lin J., Tan Q., Wang S., *A high-resolution capillary isoelectric focusing method for the determination of therapeutic recombinant monoclonal antibody*, J. Sep. Sci. **2011**, 34: 1696-1702.

Lin J.J., Meyer J.D., Carpenter J.F., Manning M.C., *Stability of human serum albumin during bioprocessing: denaturation and aggregation during processing of albumin paste*, Pharm. Res. **2000**, 17: 391-396.

Lu R., Li W.W., Katzir A., Raichlin Y., Yu H.Q., Mizaikoff B., *Probing the secondary structure of bovine serum albumin during heat-induced denaturation using mid-infrared fiberoptic sensors*, Analyst **2015**, 140: 765-770.

Lu C., Liu D., Liu H., Motchnik P., *Characterization of monoclonal antibody size variants containing extra light chains*, mAbs **2013**, 5: 102-113.

Lucy C.A., MacDonald A.M., Gulcev M.D., *Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **2008**, 1184: 81-105.

Malmsten M., *Formation of adsorbed protein layers*, J. Colloid Interface Sci. **1998**, 207: 186-199.

Manning M.C., Patel K., Borchardt R.T., *Stability of protein pharmaceuticals*, Pharm. Res. **1989**, 6: 903-918.

Marie A.L., Przybylski C., Gonnet F., Daniel R., Urbain R., Chevreux G., Jorieux S., Taverna M., *Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin*, Anal. Chim. Acta **2013**, 800: 103-110.

Mark J.K., Dionne S., Cyr T.D., Boucher S., Girard M., Hefford M.A., *Utility of standard pharmacopeial and nonpharmacopeial methods in distinguishing folded, unfolded, and process variant forms of interferon α -2*, J. Pharm. Sci. **2012**, 101: 3672-3686.

Martinez T., Guo A., Allen M.J., Han M., Pace D., Jones J., Gillespie R., Ketchem R.R., Zhang Y., Balland A., *Disulfide connectivity of human immunoglobulin G2 structural isoforms*, Biochemistry **2008**, 47: 7496-7508.

May J.C., McLean J.A., *Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation*, Anal. Chem. **2015**, 87: 1422-1436.

McCoy A.J., Pei X.Y., Skinner R., Abrahams J.P., Carrell R.W., *Structure of β -antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity*, J. Mol. Biol. **2003**, 326: 823-833.

Mccue J., Osborne D., Dumont J., Peters R., Mei B., Pierce G.F., Kobayashi K., Ewart D., *Validation of the manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor IX Fc fusion protein*, Haemophilia **2014**, 20: 327-335.

Miller L.M., Bourassa M.W., Smith R.J., *FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells*, Biochim. Biophys. Acta **2013**, 1828: 2339-2346.

Mispelter J., *Principes de la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines en solution par résonance magnétique nucléaire (RMN)*, Introduction à la détermination des structures de protéine en solution par RMN, **2007**, pp.1-30.

Mochizuki S., Miyano K., Kondo M., Hirose M., Masaki A., Ohi H., *Purification and characterization of recombinant human antithrombin containing the prelatent form in Chinese hamster ovary cells*, Protein Expr. Purif. **2005**, 41: 323-331.

Mochizuki S., Hamato N., Hirose M., Miyano K., Ohtani W., Kameyama S., Kuwae S., Tokuyama T., Ohi H., *Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in Pichia pastoris*, Protein Expr. Purif. **2001**, 23: 55-65.

Moini M., *Simplifying CE-MS operation: 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip*, Anal. Chem. **2007**, 79: 4241-4246.

Moritz B., Schnaible V., Kiessig S., Heyne A., Wild M., Finkler C., Christians S., Mueller K., Zhang L., Furuya K., Hassel M., Hamm M., Rustandi R., He Y., Salas-Solano O., Whitmore C., Park S.A., Hansen D., Santos M., Lies M., *Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies*, J. Chromatogr. B **2015**, 983-984: 101-110.

Mushunje A., Evans G., Brennan S.O., Carrell R.W., Zhou A., *Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation*, J. Thromb. Haemost. **2004**, 2: 2170-2177.

Naldi M., Baldassarre M., Nati M., Laggetta M., Giannone F.A., Domenicali M., Bernardi M., Caraceni P., Bertucci C., *Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: a new potential biomarker in chronic liver diseases*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2015**, 112: 169-175.

Nebija D., Noe C.R., Urban E., Lachmann B., *Quality control and stability studies with the monoclonal antibody, trastuzumab: application of 1D-vs. 2D-gel electrophoresis*, Int. J. Mol. Sci. **2014**, 15: 6399-6411.

Nehmé R., Perrin C., Cottet H., Blanchin M.D., Fabre H., *Stability of capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and multilayers under various analytical conditions-Application to protein analysis*, J. Chromatogr. A **2011**, 1218: 3537-3544.

Neusüß C., Demelbauer U., Pelzing M., *Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry*, Electrophoresis **2005**, 26: 1442-1450.

O'Reilly M.S., *Antiangiogenic antithrombin*, Semin. Thromb. Hemost. **2007**, 33: 660-666.

Oetli K., Marsche G., *Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease*, Methods Enzymol. **2010**, 474: 181-195.

Oetli K., Stauber R.E., *Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties*, Br. J. Pharmacol. **2007**, 151: 580-590.

Okajima K., Uchiba M., *The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications*, Semin. Thromb. Hemost. **1998**, 24: 27-32.

Oliva A., Santoveña A., Llabres M., Fariña J.B., *Stability study of human serum albumin pharmaceutical preparations*, J. Pharm. Pharmacol. **1999**, 51: 385-392.

Olson S.T., Björk I., Sheffer R., Craig P.A., Shore J.D., Choay J., *Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions: resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement*, J. Biol. Chem. **1992**, 267: 12528-12538.

Pallandre A., De Lambert B., Attia R., Jonas A.M., Viovy J.L., *Surface treatment and characterization: perspectives to electrophoresis and lab-on-chips*, Electrophoresis **2006**, 27: 584-610.

Perkins M., Theiler R., Lunte S., Jeschke M., *Determination of the origin of charge heterogeneity in a murine monoclonal antibody*, *Pharm. Res.* **2000**, 17: 1110-1117.

Pioch M., Bunz S.C., Neusüß C., *Capillary electrophoresis/mass spectrometry relevant to pharmaceutical and biotechnological applications*, *Electrophoresis* **2012**, 33: 1517-1530.

Plematl A., Demelbauer U.M., Josic D., Rizzi A., *Determination of the site-specific and isoform-specific glycosylation in human plasma-derived antithrombin by IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS*, *Proteomics* **2005**, 5: 4025-4033.

Pol-Fachin L., Becker C.F., Guimarães J.A., Verli H., *Effects of glycosylation on heparin binding and antithrombin activation by heparin*, *Proteins* **2011**, 79: 2735-2745.

Pool J.G., Gershgold E.J., Pappenhagen A.R., *High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate*, *Nature* **1964**, 203: 312.

Pourhaghighi M.R., Busnel J.M., Girault H.H., *High-sensitive protein analysis by FESI-CE-MALDI-MS*, *Electrophoresis* **2011**, 32: 1795-1803.

Pritchard C., O'Connor G., Ashcroft A.E., *The role of ion mobility spectrometry-mass spectrometry in the analysis of protein reference standards*, *Anal. Chem.* **2013**, 85: 7205-7212.

Przybylski C., Mokaddem M., Prull-Janssen M., Saesen E., Lortat-Jacob H., Gonnet F., Varenne A., Daniel R., *On-line capillary isoelectric focusing hyphenated to native electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of interferon- γ and variants*, *Analyst* **2015**, 140: 543-550.

Quinlan C.J., Mumby S., Martin G.S., Bernard G.R., Gutteridge J.M., Evans T.W., *Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury*, *Crit. Care Med.* **2004**, 32: 755-759.

Radko S.P., Stastna M., Buzas Z., Kingsley D., Chrambach A., *Charge heterogeneity of commercial, red-shifted recombinant green fluorescent protein, revealed by capillary zone electrophoresis under nondenaturing conditions*, *Anal. Biochem.* **1999**, 274: 146-148.

Ramani K., Purohit V., Middaugh C.R., Balasubramanian S.V., *Aggregation kinetics of recombinant human FVIII (rFVIII)*, *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94: 2023-2029.

Ramautar R., Heemskerk A.A.M., Hensbergen P.J., Deelder A.M., Busnel J.M., Mayboroda O.A., *CE-MS for proteomics: advances in interface development and application*, *J. Proteomics* **2012**, 75: 3814-3828.

Rao G., Iyer V., Kosloski M.P., Pisal D.S., Shin E., Middaugh C.R., Balu-Iyer S.V., *Use of a folding model and in situ spectroscopic techniques for rational formulation development and stability testing of monoclonal antibody therapeutics*, *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99: 1697-1706.

Razunguzwa T.T., Warriar M., Timperman A.T., *ESI-MS compatible permanent coating of glass surfaces using poly(ethylene glycol)-terminated alkoxy silanes for capillary zone electrophoretic protein separations*, *Anal. Chem.* **2006**, 78: 4326-4333.

Reif O.W., Freitag R., *Control of the cultivation process of antithrombin III and its characterization by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A **1994**, 680: 383-394.

Ren D., Pipes G., Xiao G., Kleemann G.R., Bondarenko P.V., Treuheit M.J., Gadgil H.S., *Reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments*, J. Chromatogr. A **2008**, 1179: 198-204.

Reubsaet J.L.E., Beijnen J.H., Bult A., Hop E., Scholten S.D., Teeuwssen J., Underberg W.J.M., *Oxidation of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor*, J. Pharm. Biomed. Anal. **1998**, 17: 283-289.

Rickard E.C., Strohl M.M., Nielsen R.G., *Correlation of electrophoretic mobilities from capillary electrophoresis with physicochemical properties of proteins and peptides*, Anal. Biochem. **1991**, 197: 197-207.

Righetti P.G., Gelfi C., Verzola B., Castelletti L., *The state of the art of dynamic coatings*, Electrophoresis **2001 a**, 22: 603-611.

Righetti P.G., Verzola B., *Folding/unfolding/refolding of proteins: present methodologies in comparison with capillary zone electrophoresis*, Electrophoresis **2001 b**, 22: 2359-2374.

Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E., *The antioxidant properties of serum albumin*, FEBS Lett. **2008**, 582: 1783-1787.

Römisch J., Dönges R., Stauss H., Inthorn D., Mühlbayer D., Jochum M., Hoffmann J.N., *Quantification of antithrombin isoform proportions in plasma samples of healthy subjects, sepsis patients, and in antithrombin concentrates*, Pathophysiol. Haemost. Thromb. **2002**, 32: 143-150.

Rustandi R.R., Wang Y., *Use of CE-SDS gel for characterization of monoclonal antibody hinge region clipping due to copper and high pH stress*, Electrophoresis **2011**, 32: 3078-3084.

Salas-Solano O., Kennel B., Park S.S., Roby K., Susic Z., Boumajny B., Free S., Reed-Bogan A., Michels D., McElroy W., Bonasia P., Hong M., He X., Ruesch M., Moffatt F., Kiessig S., Nunnally B., *Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: an interlaboratory study*, J. Sep. Sci. **2012**, 35: 3124-3129.

Sandra K., Vandenheede I., Sandra P., *Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization*, J. Chromatogr. A **2014**, 1335: 81-103.

Sanzgiri R.D., McKinnon T.A., Cooper B.T., *Intrinsic charge ladders of a monoclonal antibody in hydroxypropylcellulose-coated capillaries*, Analyst **2006**, 131: 1034-1043.

Schortgen F., Girou E., Deye N., Brochard L., *The risk associated with hyperoncotic colloids in patients with shock*, Intensive Care Med. **2008**, 34: 2157-2168.

Sergeev N.V., Gloukhova N.S., Nazimov I.V., Gulyaev V.A., Shvets S.V., Donetsky I.A., Miroshnikov A.I., *Monitoring of recombinant human insulin production by narrow-bore reversed-phase high-performance liquid chromatography, high-performance capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry*, J. Chromatogr. A **2001**, 907: 131-144.

Shaltout E.L., Al-Ghobashy M.A., Fathalla F.A., Salem M.Y., *Chromatographic and electrophoretic assessment of filgrastim biosimilars in pharmaceutical formulations*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2014**, 97: 72-80.

Shi Y., *A glimpse of structural biology through X-ray crystallography*, Cell **2014**, 159: 995-1014.

Shi Y., Li Z., Qiao Y., Lin J., *Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb*, J. Chromatogr. B **2012**, 906: 63-68.

Skrlin A., Kosor Krnic E., Gosak D., Prester B., Mrsa V., Vuletic M., Runac D., *Correlation of liquid chromatographic and biological assay for potency assessment of filgrastim and related impurities*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2010**, 53: 262-268.

Smith R.D., Olivares J.A., Nguyen N.T., Udseth H.R., *Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface*, Anal. Chem. **1988**, 60: 436-441.

Sosic Z., Houde D., Blum A., Carlage T., Lyubarskaya Y., *Application of imaging capillary IEF for characterization and quantitative analysis of recombinant protein charge heterogeneity*, Electrophoresis **2008**, 29: 4368-4376.

Souto R.B., Stamm F.P., Ribela M.T. de C.P., Bartolini P., Calegari G.Z., Dalmora S.L., *Validation of a stability-indicating RP-LC method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with bioassay*, Anal. Sci. **2012**, 28: 215-220.

Spanilá M., Pazourek J., Havel J., *Electroosmotic flow changes due to interactions of background electrolyte counter-ions with polyethyleneimine coating in capillary zone electrophoresis of proteins*, J. Sep. Sci. **2006**, 29: 2234-2240.

Spector S., Flynn J.M., Tidor B., Baker T.A., Sauer R.T., *Expression of N-formylated proteins in Escherichia coli*, Protein Expr. Purif. **2003**, 32: 317-322.

Srebalus Barnes C.A., Lim A., *Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals*, Mass Spectrom. Rev. **2007**, 26: 370-388.

Staub A., Guillaume D., Schappler J., Veuthey J.L., Rudaz S., *Intact protein analysis in the biopharmaceutical field*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2011**, 55: 810-822.

Štěpánová S., Kašička V., *Capillary electrophoretic methods applied to the investigation of peptide complexes*, J. Sep. Sci. **2015**, 38: 2708-2721.

Stratikos E., Gettins P.G.W., *Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into β -sheet A*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1999**, 96: 4808-4813.

Stutz H., *Protein attachment onto silica surfaces – a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE*, Electrophoresis **2009**, 30: 2032-2061.

Stutz H., Wallner M., Malissa H.Jr., Bordin G., Rodriguez A.R., *Detection of coexisting protein conformations in capillary zone electrophoresis subsequent to transient contact with sodium dodecyl sulfate solutions*, Electrophoresis **2005**, 26: 1089-1105.

Suba D., Urbányi Z., Salgó A., *Capillary isoelectric focusing method development and validation for investigation of recombinant therapeutic monoclonal antibody*, J. Pharm. Biomed. Anal. **2015**, 114: 53-61.

Taichrib A., Pioch M., Neusüß C., *Multivariate statistics for the differentiation of erythropoietin preparations based on intact glycoforms determined by CE-MS*, Anal. Bioanal. Chem. **2012**, 403: 797-805.

Talebi M., Nordborg A., Gaspar A., Lacher N.A., Wang Q., He X.Z., Haddad P.R., Hilder E.F., *Charge heterogeneity profiling of monoclonal antibodies using low ionic strength ion-exchange chromatography and well-controlled pH gradients on monolithic columns*, J. Chromatogr. A **2013**, 1317: 148-154.

Tamizi E., Jouyban A., *The potential of the capillary electrophoresis techniques for quality control of biopharmaceuticals: a review*, Electrophoresis **2015**, 36: 831-858.

Tang L., Sundaram S., Zhang J., Carlson P., Matathia A., Parekh B., Zhou Q., Hsieh M.C., *Conformational characterization of the charge variants of a human IgG1 monoclonal antibody using H/D exchange mass spectrometry*, mAbs **2013**, 5: 114-125.

Taverna M., Tran N.T., Merry T., Horvath E., Ferrier D., *Electrophoretic methods for process monitoring and the quality assessment of recombinant glycoproteins*, Electrophoresis **1998**, 19: 2572-2594.

Taylor G., *Conditions under which dispersion of a solute in a stream of solvent can be used to measure molecular diffusion*, Proc. Roy. Soc. London Ser. A **1954**, 225: 473-477.

Taylor G., *Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube*, Proc. Roy. Soc. London Ser. A **1953**, 219: 186-203.

Thorne J.M., Goetzinger W.K., Chen A.B., Moorhouse K.G., Karger B.L., *Examination of capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis for the analysis recombinant tissue plasminogen activator*, J. Chromatogr. A **1996**, 744: 155-165.

Torosantucci R., Weinbuch D., Klem R., Jiskoot W., *Triethylenetetramine prevents insulin aggregation and fragmentation during copper catalyzed oxidation*, Eur. J. Pharm. Biopharm. **2013**, 84: 464-471.

Tsutsui Y., Sarkar A., Wintrode P.L., *Probing serpin conformational change using mass spectrometry and related methods*, *Methods Enzymol.* **2011**, 501: 325-350.

Tsutsui Y., Liu L., Gershenson A., Wintrode P.L., *The conformational dynamics of a metastable serpin studied by hydrogen exchange and mass spectrometry*, *Biochemistry* **2006**, 45: 6561-6569.

Turell L., Botti H., Bonilla L., Torres M.J., Schopfer F., Freeman B.A., Armas L., Ricciardi A., Alvarez B., Radi R., *HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points*, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, 944: 144-151.

Turk B., Brieditis I., Bock S.C., Olson S.T., Björk I., *The oligosaccharide side chain on Asn-135 of α -antithrombin, absent in β -antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change*, *Biochemistry* **1997**, 36: 6682-6691.

Ullmer R., Plematl A., Rizzi A., *Derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate for enhancing the ionization yield of small peptides and glycopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20: 1469-1479.

Van der Veen M., Norde W., Cohen Stuart M., *Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2004**, 35: 33-40.

Van Patten S.M., Hanson E., Bernasconi R., Zhang K., Manavalan P., Cole E.S., McPherson J.M., Edmunds T., *Oxidation of methionine residues in antithrombin: effects on biological activity and heparin binding*, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274: 10268-10276.

Vandermarliere E., Stes E., Gevaert K., Martens L., *Resolution of protein structure by mass spectrometry*, *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, 1-13.

Verzola B., Gelfi C., Righetti P.G., *Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis: quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimising the phenomenon*, *J. Chromatogr. A* **2000 a**, 868: 85-99.

Verzola B., Gelfi C., Righetti P.G., *Quantitative studies on the adsorption of proteins to the bare silica wall in capillary electrophoresis: II. Effects of adsorbed, neutral polymers on quenching the interaction*, *J. Chromatogr. A* **2000 b**, 874: 293-303.

Walsh G., *Monoclonal antibodies continue their march on the markets, optimized so-called biobetter versions of existing biologics are also gaining ground, but the rate of biosimilar approvals has seen a dramatic slowdown in recent years*, *Nature Biotechnol.* **2014**, 32: 992-1000.

Walsh G., *Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, **2007**.

Wardell M.R., Chang W.S.W., Bruce D., Skinner R., Lesk A.M., Carrell R.W., *Preparative induction and characterization of L-antithrombin: a structural homologue of latent plasminogen activator inhibitor-1*, *Biochemistry* **1997**, 36: 13133-13142.

Warren B.L., Eid A., Singer P., Pillay S.S., Carl P., Novak I., Chalupa P., Atherstone A., Péntes I., Kübler A., Knaub S., Keinecke H.O., Heinrichs H., Schindel F., Juers M., Bone R.C., Opal S.M., *High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial*, *JAMA*. **2001**, 286: 1869-1878.

Wehr T., Zhu M., Rodriguez-Diaz R., *Capillary isoelectric focusing*, *Methods Enzymol.* **1996**, 270: 358-374.

Whisstock J.C., Silverman G.A., Bird P.I., Bottomley S.P., Kaiserman D., Luke C.J., Pak S.C., Reichhart J.M., Huntington J.A., *Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions*, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285: 24307-24312.

Wiedermann Ch.J., Römisch J., *The anti-inflammatory actions of antithrombin: a review*, *Acta Med. Austriaca* **2002**, 29: 89-92.

Xuan X., Li D., *Band-broadening in capillary zone electrophoresis with axial temperature gradients*, *Electrophoresis* **2005**, 26: 166-175.

Yabe U., Sato C., Matsuda T., Kitajima K., *Polysialic acid in human milk: CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278: 13875-13880.

Yamasaki M., Li W., Johnson D.J.D., Huntington J.A., *Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization*, *Nature* **2008**, 455: 1255-1259.

Zhang Q., Yu H., Zhang F.Z., Shen Z.C., *Expression and purification of recombinant human serum albumin from selectively terminable transgenic rice*, *Biomed. Biotechnol.* **2013 a**, 14: 867-874.

Zhang L., Patapoff T., Farnan D., Zhang B., *Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength*, *J. Chromatogr. A* **2013 b**, 1272: 56-64.

Zhang W., Swanson R., Xiong Y., Richard B., Olson S.T., *Antiangiogenic antithrombin blocks the heparan sulfate-dependent binding of proangiogenic growth factors to their endothelial cell receptors: evidence for differential binding of antiangiogenic and anticoagulant forms of antithrombin to proangiogenic heparan sulfate domains*, *J. Biol. Chem.* **2006 a**, 281: 37302-37310.

Zhang J., Tran N.T., Weber J., Slim C., Viovy J.L., Taverna M., *Poly(N,N-dimethylacrylamide)-grafted polyacrylamide: a self-coating copolymer for sieving separation of native proteins by CE*, *Electrophoresis* **2006 b**, 27: 3086-3092.

Zhang W., Czupryn M.J., *Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 30: 1479-1490.

Zheng X., Wintrode P.L., Chance M.R., *Complementary structural mass spectrometry techniques reveal local dynamics in functionally important regions of a metastable serpin*, *Structure* **2008**, 16: 38-51.

Zhou A., Huntington J.A., Carrell R.W., *Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis*, *Blood* **1999**, 94: 3388-3396.

Zhou Z., Smith D.L., *Location of disulfide bonds in antithrombin III*, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1990**, 19: 782-786.

Zhu Z., Lu J.J., Liu S., *Protein separation by capillary gel electrophoresis: a review*, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 709: 21-31.

Annexes

Annexe 1 : relative au chapitre 2

A.1.a. Exemple d'un spectromètre de masse à mobilité ionique

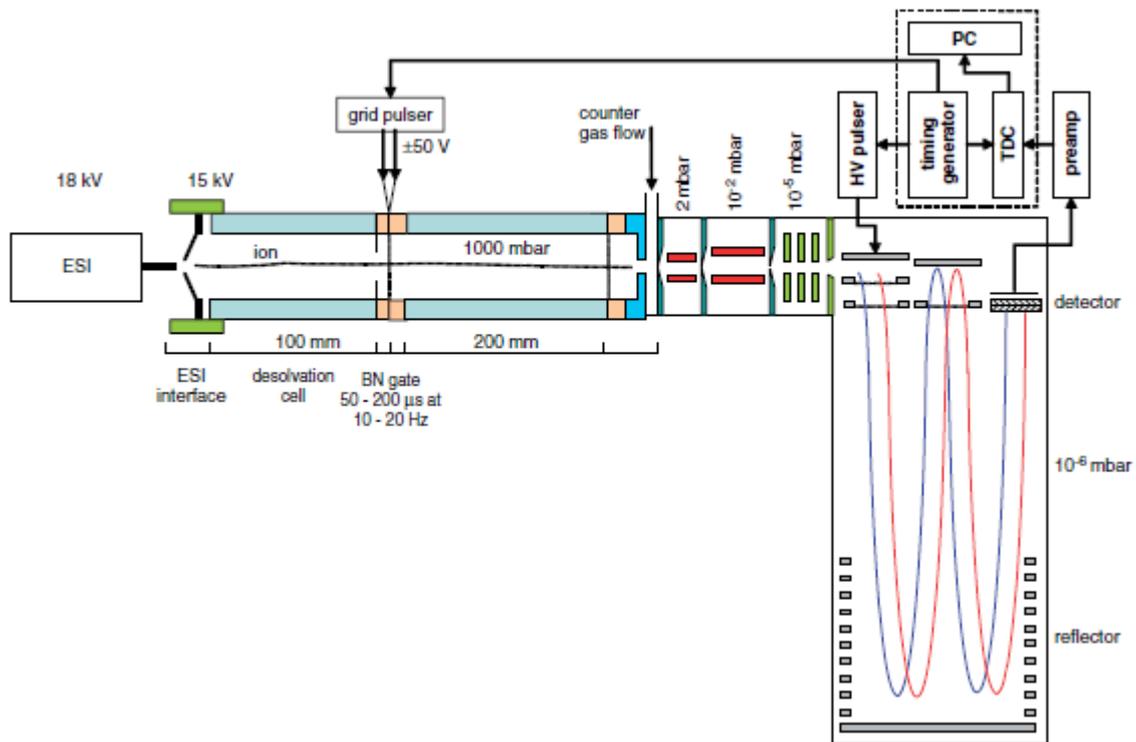


Figure 70 : Exemple de spectromètre de masse à mobilité ionique. Issu de Kanu 2008.

A.1.b. Les différentes interfaces CE-ESI-MS

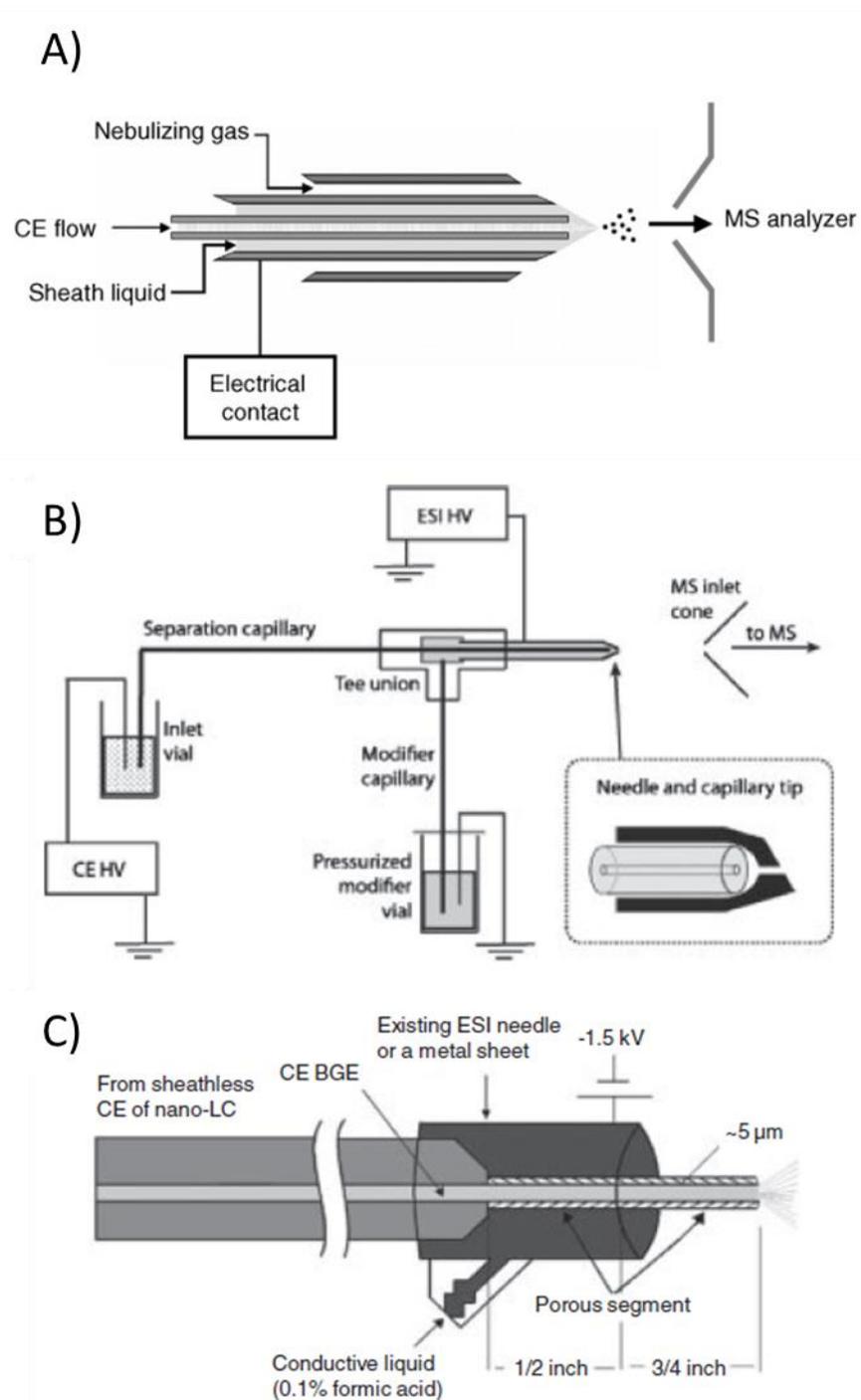


Figure 71 : Exemples d'interfaces CE-ESI-MS. A) Interface à liquide additionnel. B) Interface à jonction liquide. C) Interface sheathless. Issu de Haselberg 2007 et Haselberg 2011 b.

Annexe 2 : relative au chapitre 3

A.2. Protocoles des analyses TDA

A.2.a. Description de la méthode

Les analyses ont été réalisées avec un capillaire de silice vierge d'une longueur totale de 60,2 cm (longueur effective 50 cm) et d'un diamètre de 50 μm . Deux types de solution d'AT ont été analysées : une solution d'AT à 1,05 g/L (18 μM) et un mélange équimolaire AT/héparine (18 μM de chaque). Les injections des différentes solutions d'AT ont été réalisées en mode hydrodynamique par application d'une pression de 0,5 psi pendant 5 secondes (soit 0,5 % du volume du capillaire). L'AT ou le complexe AT/héparine ont été détectés par poussée du tampon d'analyse dans le capillaire par application d'une pression hydrodynamique de 1 psi pendant une dizaine de minutes vers un vial contenant du tampon. La longueur d'onde de détection a été fixée à 200 nm.

A.2.b. Préparations des différentes solutions

L'Aclotine[®] du LFB, lorsque reconstituée à 10 mL avec de l'eau ultra-pure, contient 10 mM de NaCl et 266 mM de glycine. Nous avons donc préparé des solutions de NaCl et de glycine, afin d'ajouter ces deux composants dans les tampons d'analyse.

Tampon phosphate à 20 mM pH 7.4 :

- Dissolution de 276 mg de phosphate monohydraté (MW, 138 g/mol) dans 100 mL d'eau milli-Q. Ajustement du pH à 7,4 avec NaOH 1N.

Solution de NaCl à 50 mM :

- Dissolution de 146,1 mg de NaCl (MW, 58,44 g/mol) dans 50 mL d'eau milli-Q.

Solution de glycine à 300 mM :

- Dissolution de 1,126 g glycine (MW, 75,07 g/mol) dans 50 mL d'eau milli-Q.

A.2.c. Analyse TDA d'AT libre

Solution d'AT à injecter :

- Mélange de 7 μL d'Aclotine à 15 g/L (soit 259,2 μM) avec 93 μL de tampon phosphate à 20 mM pH 7,4. La solution d'AT ainsi préparée contient donc :

- 1,05 g/L, soit 18,1 μM d'AT
- 0,7 mM de NaCl
- 18,6 mM de glycine
- 18,6 mM d'ions phosphate

Tampon d'analyse A à base de phosphate, NaCl et glycine :

- Mélange de 140 μL de la solution de NaCl à 50 mM et de 620 μL de la solution de glycine à 300 mM avec 9240 μL de tampon phosphate à 20 mM pH 7,4. Le tampon d'analyse ainsi préparé contient donc :

- 0,7 mM de NaCl
- 18,6 mM de glycine
- 18,5 mM d'ions phosphate

A.2.d. Analyse TDA d'un mélange équimolaire AT/héparine

La solution d'héparine utilisée pour ces expériences est de l'héparine de Choay[®] (5000 UI/mL), que nous avons considérée à 2200 μM en se basant sur 150 UI/mg d'héparine et sur une masse moléculaire moyenne de l'héparine de 15 kDa. Une solution d'héparine à 220 μM a été préparée en diluant cette solution mère par 10 avec de l'eau Milli-Q.

Mélange équimolaire AT/héparine à injecter :

- Mélange de 7 μL d'Acrotine à 259,2 μM et de 8,2 μL d'héparine à 220 μM avec 84,8 μL de tampon phosphate. La solution d'AT/héparine ainsi préparée contient donc :

- 18,1 μM d'AT
- 18,0 μM d'héparine
- 0,7 mM de NaCl
- 18,6 mM de glycine
- 17,0 mM d'ions phosphate

Remarque) Le mélange équimolaire AT/héparine est laissé à température ambiante pendant plusieurs heures avant son analyse.

Tampon d'analyse B à base de phosphate, NaCl, glycine et héparine :

- Mélange de 140 μL de la solution de NaCl à 50 mM, 620 μL de la solution de glycine à 300 mM et 82 μL d'héparine à 2200 μM avec 9158 μL de tampon phosphate à 20 mM pH 7,4. Le tampon d'analyse ainsi préparé contient donc :

- 18,0 μM d'héparine
- 0,7 mM de NaCl
- 18,6 mM de glycine
- 18,3 mM d'ions phosphate

A.2.e. Mesure de viscosité des tampons

Pour mesurer la viscosité des tampons utilisés lors des différentes analyses TDA, nous avons déterminé expérimentalement par CE le temps d'apparition d'un pic de thiourée par application d'une pression hydrodynamique avec les tampons dont nous voulions calculer la viscosité. Nous avons procédé de la façon suivante :

- injection de thiourée à 0,1 g/L diluée dans l'eau ou les tampons A ou B (2 sec à 0,1 psi), puis poussée respectivement avec de l'eau ou les tampons A ou B par application d'une pression hydrodynamique de 1 psi.

Les viscosités des tampons ont été déterminées à l'aide de l'équation de Poiseuille :

$$V_i = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8 \eta L_{tot}} \quad (38)$$

avec V_i le volume injecté (m^3), ΔP la pression appliquée (Pa), r le rayon du capillaire (m), t le temps d'application de la pression (s), η la viscosité du tampon (Pa.s), et L_{tot} la longueur totale du capillaire (m).

Comme le volume injecté équivaut au volume d'un cylindre, $V_i = \pi r^2 L_{inj}$ (avec L_{inj} la longueur injectée dans le capillaire), et l'équation 38 devient :

$$\eta = \frac{\Delta P r^2 t}{8 L_{tot} L_{inj}} \quad (39)$$

Pour une longueur injectée équivalente à la longueur effective du capillaire, le temps t devient équivalent au temps de détection de l'analyte et l'équation 39 devient :

$$\eta = \frac{\Delta P r^2 t_d}{8 L_{tot} L_{eff}} \quad (40)$$

avec t_d le temps de détection de l'analyte (s) et L_{eff} la longueur effective du capillaire (m).

Ainsi, pour deux tampons d'analyse différents, le rapport des viscosités est égal à celui des temps de détection des analytes. Nous pouvons donc calculer les viscosités des tampons utilisés en TDA selon l'équation suivante :

$$\frac{\eta_1}{\eta_0} = \frac{t_1}{t_0} \quad (41)$$

avec η_1 la viscosité du tampon A ou B, η_0 la viscosité de l'eau (0,000885 Pa.s), t_1 le temps d'apparition de la thiourée avec les tampons A ou B, t_0 le temps d'apparition de la thiourée avec l'eau.

Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants :

- Viscosité du tampon A : 0,000899 Pa.s
- Viscosité du tampon B : 0,000915 Pa.s

Annexe 3 : relative au chapitre 5

A.3. Schémas des instruments CE-MS utilisés

A.3.a. Spectromètres de masse Q-TOF utilisés

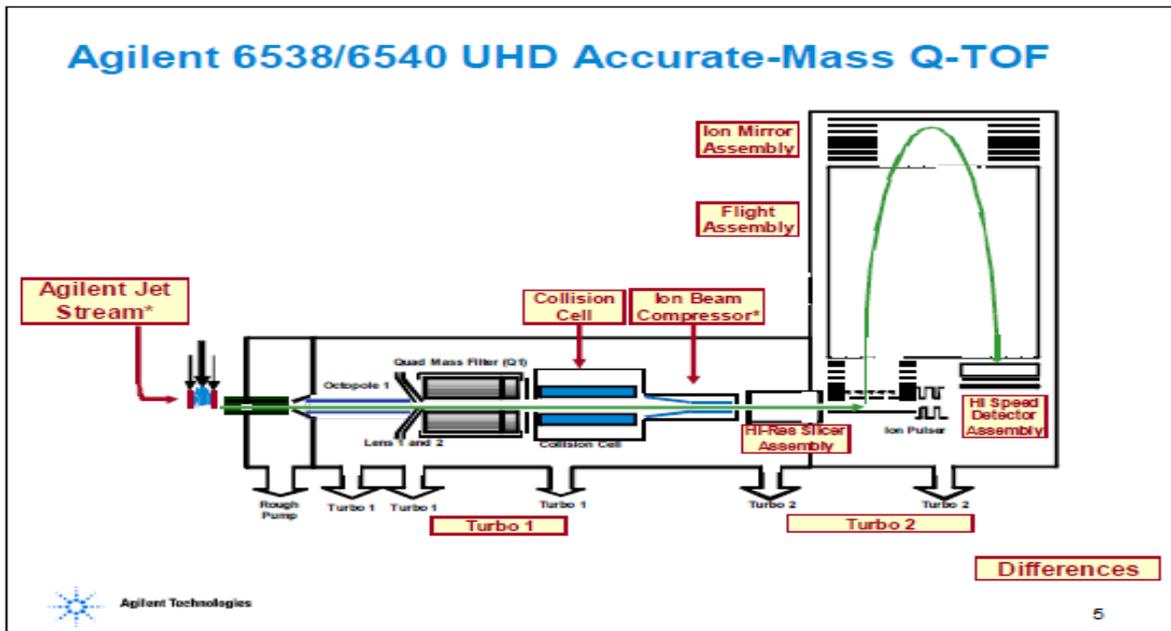


Figure 72 : Spectromètre de masse Q-TOF 6540 d'Agilent.

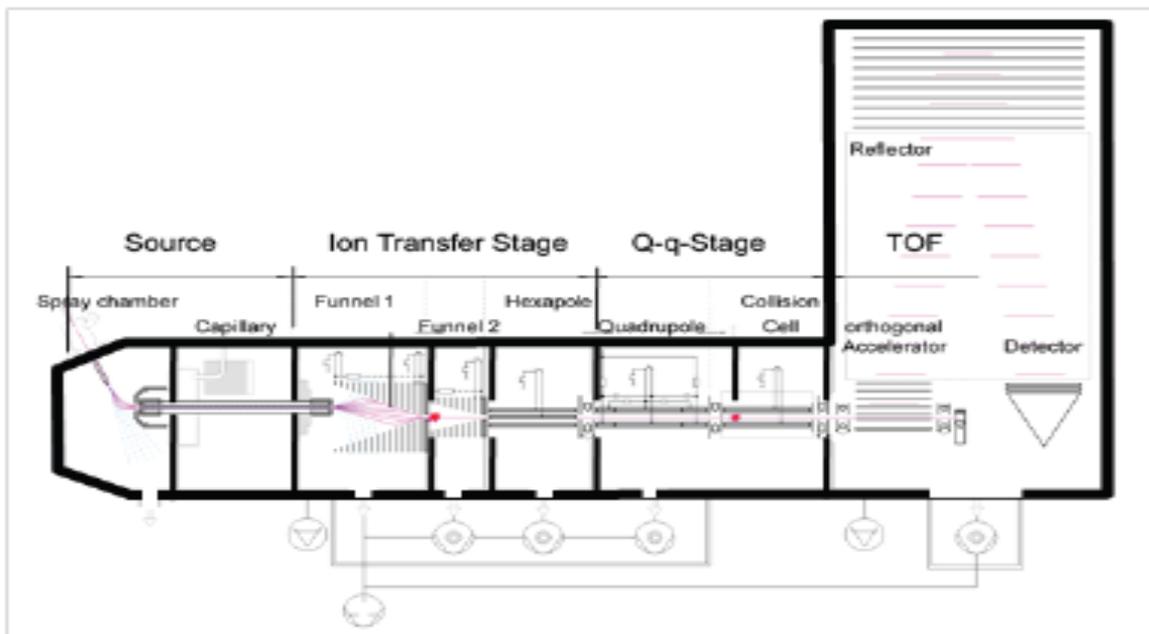


Figure 73 : Spectromètre de masse microTOF-Q de Bruker Daltonics.

A.3.b. Sources ESI des instruments CE-MS utilisés

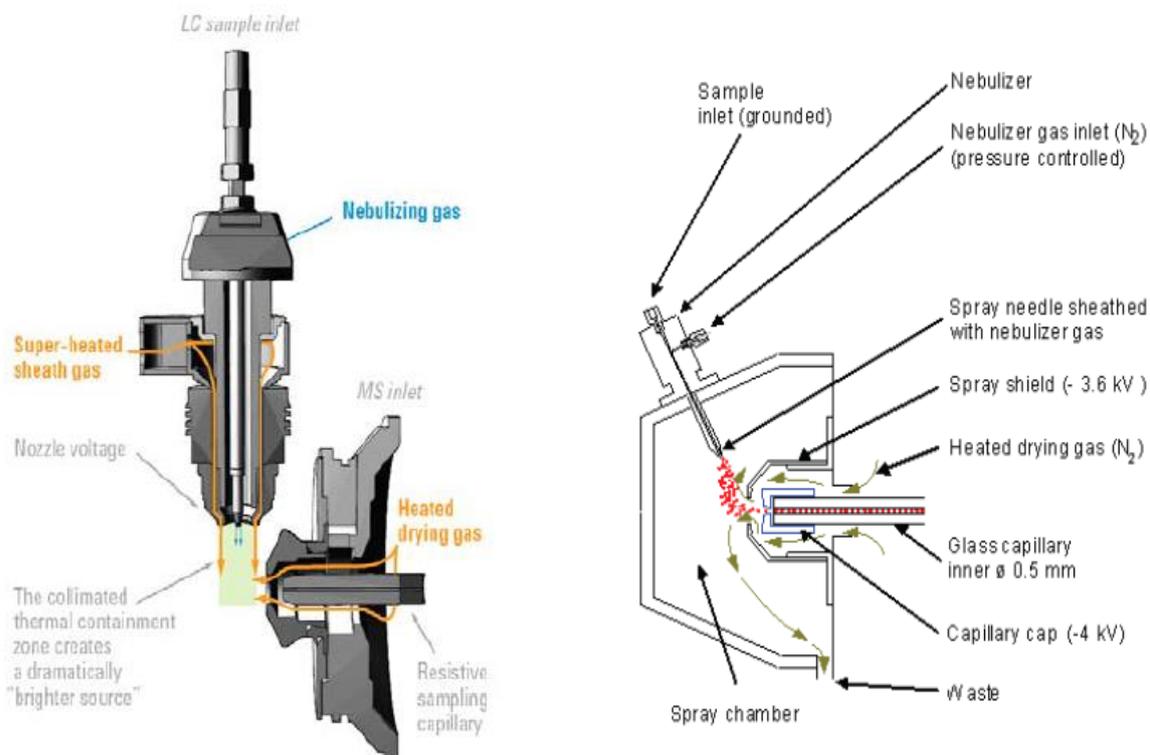


Figure 74 : Sources ESI des spectromètres de masse Q-TOF 6540 d'Agilent (à gauche) et microTOF-Q de Bruker Daltonics (à droite).

Résumé

Au cours de cette thèse, nous avons été amenés à développer des méthodes analytiques afin de contrôler la qualité de protéines thérapeutiques en tant que produits finis ou d'évaluer le potentiel de certaines protéines à être des candidats médicaments. Deux protéines ont été étudiées : l'albumine de sérum humain (HSA) et l'antithrombine (AT). Ces protéines diffèrent par leur structure, leur glycosylation et leurs activités biologiques. Une méthode d'électrophorèse capillaire de zone (CZE) a permis de séparer neuf formes dans des préparations commerciales d'HSA plasmatique, dont des formes native, cystéinylée, glyquées et tronquées. Une autre méthode CZE a permis de séparer plus de huit formes dans des préparations commerciales d'AT plasmatique, dont des formes native, latente et hétérodimérique. Les deux méthodes CZE développées ont permis de mettre en évidence des différences significatives quant à la composition de préparations commerciales d'HSA ou d'AT produites par cinq fournisseurs différents. Des méthodes d'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS), avec un analyseur quadripôle-temps de vol (Q-TOF) et une ionisation électrospray (ESI), ont également été développées. Ces méthodes CE-MS ont permis d'identifier non seulement de nombreuses glycoformes et formes apparentées de l'AT, mais également des formes dimériques. Une méthode CE-MS en conditions non-dénaturantes a permis de montrer que la forme native et la forme latente de l'AT (deux conformères) présentaient un spectre de masse spécifique, permettant de les différencier sans ambiguïté. Afin d'évaluer l'affinité de variants d'AT pour l'héparine, une méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) a été développée. Cette méthode ACE a permis d'analyser les variants d'AT directement à partir des surnageants de culture cellulaire dans lesquels ils sont produits. Ainsi, il a été montré que certains variants présentaient une affinité très élevée pour l'héparine, en accord avec les mutations réalisées. Enfin, dans le cadre des études d'affinité entre l'AT et l'héparine, nous avons exploré une méthode nouvelle basée sur l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA).

Abstract

During this Ph.D., we developed analytical methods in order to check the quality of therapeutic proteins as finished products or to assess the potential of some proteins to be drug candidates. Two proteins were studied : human serum albumin (HSA) and antithrombin (AT). These proteins are very different regarding their structure, glycosylation, and biological functions. A capillary zone electrophoresis (CZE) method enabled to separate nine forms in commercial preparations of HSA issued from human plasma, among which native, cysteinylated, glycosylated, and truncated forms. Another CZE method allowed separating more than eight forms in commercial preparations of AT issued from human plasma, among which native, latent, and heterodimeric forms. Both CZE methods enabled to highlight significant differences in the composition of marketed preparations produced by five competitive pharmaceutical companies. Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) methods, using a quadrupole-time of flight (Q-TOF) analyzer and electrospray ionization (ESI), were also developed. These CE-MS methods enabled to identify not only a high number of glycoforms and related forms of AT, but also dimeric forms. A CE-MS method developed in non-denaturing conditions showed that native and latent forms of AT (two conformers) exhibited a specific mass spectrum, allowing to unambiguously distinguish them. With the aim to assess the binding affinity of AT variants toward heparin, we developed an affinity capillary electrophoresis (ACE) method. This ACE method enabled to analyze AT variants directly from the cell culture supernatants used to produce them. It has been shown that some AT variants had a very high affinity for heparin, in good agreement with the performed mutations. Finally, a new method based on Taylor Dispersion Analysis (TDA) was investigated to study the affinity between AT issued from plasma and heparin.