



HAL
open science

Apport de l'électrophorèse capillaire pour l'étude des anomalies de glycosylation de protéines liées à des pathologies : vers l'identification de nouveaux biomarqueurs

Coralie Ruel

► **To cite this version:**

Coralie Ruel. Apport de l'électrophorèse capillaire pour l'étude des anomalies de glycosylation de protéines liées à des pathologies : vers l'identification de nouveaux biomarqueurs. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS519 . tel-03505872

HAL Id: tel-03505872

<https://theses.hal.science/tel-03505872>

Submitted on 1 Jan 2022

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.

Apport de l'électrophorèse capillaire pour l'étude des anomalies de glycosylation de protéines liées à des pathologies : Vers l'identification de nouveaux biomarqueurs

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571- Sciences chimiques : molécules,
matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 13 Décembre 2018, par

Coralie Ruel

Composition du Jury :

Nathalie SETA <i>Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Paris (EA 4064)</i> <i>Praticien hospitalier, Hôpital Bichat-Claude</i>	Présidente
Marianne FILLET <i>Professeur, Université de Liège (Laboratory for the Analysis of Medicines)</i>	Rapporteuse
François FOULQUIER <i>Directeur de recherches, Université de Lille (UMR CNRS 8576)</i>	Rapporteur
Florence GONNET <i>Professeur des Universités, Université d'Evry Val d'Essonne, UPSaclay (UMR CNRS 8587)</i>	Examinatrice
Thuy TRAN-MAIGNAN <i>Maître de conférences, Université Paris-Sud, UPSaclay (UMR CNRS 8612)</i>	Directrice de thèse
Arnaud BRUNEEL <i>Maître de conférences, Université Paris-Sud, UPSaclay (UMR INSERM -1193)</i> <i>Praticien hospitalier, Hôpital Bichat-Claude Bernard</i>	Invité
François FENAILLE <i>Ingénieur - Chercheur, CEA, UPSaclay (SPI, LEMM)</i>	Co-encadrant-Invité

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord ma directrice de thèse, le Docteur Nguyet Thuy Tran pour sa très grande disponibilité, son écoute attentive et sa rigueur scientifique incontestable. Merci pour tout ce que tu m'as apporté tant sur le plan professionnel que personnel. Mes remerciements s'adressent également à mon encadrant de thèse, le Docteur François Fenaille pour ses conseils et la vision plus globale du projet qu'il a pu m'apporter au cours de ces trois années. La complémentarité de vos expertises scientifiques m'a été d'une grande aide pour mener à bien ce projet.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers le Professeur Myriam Taverna, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire mais également pour ses remarques constructives et ses idées fourmillantes lors des réunions de labo.

Je remercie le Professeur Marianne Fillet, le Docteur François Foulquier, le Professeur Florence Gonnet, le Professeur Nathalie Seta et le Professeur Fathi Moussa qui me font l'honneur d'être membres de mon jury de thèse. Je souhaite également remercier tout particulièrement le Docteur Arnaud Bruneel d'avoir accepté d'être le membre extérieur de mon comité de thèse mais aussi pour sa grande bienveillance au cours de ce projet.

Un grand merci à Duc Thanh Mai pour son aide lors des manipulations d'immunocapture mais aussi de préconcentration électrocinétique, pour sa grande écoute, sa disponibilité mais aussi pour son optimisme sans faille. Ce fut un grand plaisir de pouvoir discuter avec toi tant sur des sujets scientifiques que de la vie en général lorsque tu étais encore post-doc ou maintenant que tu es Maître de conférences.

Ce projet de thèse m'a donné l'opportunité d'encadrer un stagiaire Erasmus venant d'Italie, Marco Morani. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi, merci pour ta rigueur mais surtout pour ton sourire permanent et communicatif ! Je te souhaite plein de réussite pour tes projets, notamment ta thèse que tu commences cette année.

Ces travaux ont permis de créer plusieurs collaborations très enrichissantes. Je remercie Emilie Picard du Centre de Recherche des Cordeliers pour la collaboration sur l'analyse de la transferrine issue de l'humeur vitrée.

I would like to thank a lot Pr. András Guttman for accepting me within the Horvath Csaba Laboratory of Bioseparation Sciences, University of Debrecen during 2 months. I also would like to thank very much Boglarka Donczó who taught me how to process the N-glycans labeling and analysis but also Apolka Domokos and Anna Farkas for welcoming me in the lab with kindness. It was a real pleasure to work with them but also to taste Hungarian food. I enjoyed visiting Debrecen, the second biggest city of Hungary.

Je tiens à remercier également Sophie Cholet au CEA pour m'avoir initiée à l'utilisation du spectromètre de masse MALDI-TOF ainsi qu'à la réalisation des dépôts sur la cible MALDI.

Cette thèse a également été l'occasion pour moi de faire de l'enseignement et je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique et les différents enseignants-chercheurs qui m'ont accueillie au cours de ces trois années de monitorat.

Mes remerciements vont également à Claire Smadja, membre permanente de l'équipe PNAS, ce fut un plaisir de te côtoyer tout au long de ces trois années tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci également à Marie-Claude pour son soutien logistique au quotidien mais aussi pour ses nombreux essais de pâtisseries.

J'exprime tous mes remerciements à tous les stagiaires, doctorants, post-doctorants ou ingénieurs que j'ai pu croiser au cours de mes rares passages au CEA et plus particulièrement à Mikail, Nolwenn, Hélène, Christelle, Loïc, Pierre et Samuel pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci aux doctorants du PNAS qui m'ont accueillie au laboratoire lors de mon arrivée : Monica, Nacéra, Cédric et Jeanne. Je remercie également tous les autres doctorants et post-doctorants que j'ai côtoyé au laboratoire au cours de cette thèse : Emmanuel, Grégory, Etienne, Kai, Marta et Minh. Une petite pensée également à tous les stagiaires rencontrés au cours de ces trois années : Ayoub, Oihana, Aurélie, Christelle et Arnold. Vous avez tous contribué à rendre cette thèse agréable.

Je tiens à remercier tout particulièrement Emilie, dit Mimie, qui prend ma succession dans la famille des doctorants encadrés par Thuy, je serai fière de te céder mon bureau ! Merci pour toutes nos conversations partagées autour d'un thé, ta joie de vivre et ton soutien quotidien en cette période de fin de rédaction... et merci pour le service de livraison de comté ! Tu es devenue une amie en dehors du laboratoire et je sais qu'on gardera contact après mon départ. Je te souhaite une pleine réussite pour la fin de ta thèse mais aussi pour tous tes autres projets futurs.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je ne mentionnais pas Arthur et Corentin. Après la prépa, CPE Lyon et le Master, le hasard a fait que nous nous sommes tous les trois retrouvés sur Paris pour notre thèse. Si à l'origine vous deviez vous partager ma garde au laboratoire, dans les faits Corentin a bénéficié d'une garde presque exclusive au PNAS ! Il est maintenant temps que nos chemins se séparent mais je sais que notre amitié durera encore longtemps. Merci pour tous ces bons moments partagés ensemble et je vous souhaite de vous épanouir aussi bien professionnellement que personnellement.

Je remercie également Maëlle, amie depuis le lycée, pour avoir toujours trouvé du temps pour me voir lors de mes passages express sur Lyon. C'est toujours un plaisir de te voir et je te souhaite plein de bonheur.

Merci à tous mes amis de CPE Lyon, éparpillés un peu partout en France et en Europe. Nous partageons tous la grande aventure du doctorat : Caroline, Justine, Adja, Thomas, Johan. Qui aurait cru en prépa qu'on finirait tous DOCTEURS ?! Je vous souhaite plein de réussite pour l'avenir et bon courage à ceux qui rentrent dans la phase de rédaction.

Je voudrais adresser un énorme merci à ma famille, mes parents et ma grande sœur ! Merci pour votre soutien sans faille et de m'avoir toujours fait confiance et de croire en moi. Elodie, la prochaine thèse à laquelle on assistera sera la tienne ! Enfin, merci à Paul pour ses encouragements au quotidien et sa présence à mes côtés.

Curriculum Vitae

Formation :

- **Ingénieur** CPE Lyon (2009-2015), dont un an à Roche Diagnostic (Penzberg, Allemagne, 2013-2014)
- **Master 2** Analyse et Contrôle à l'Université Claude Bernard Lyon 1 (2014-2015)
- **Doctorat** et enseignements (192h TP et TD) en Chimie analytique et Génie des procédés à l'IUT d'Orsay, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay (2015-2018)

Communications orales :

- *Detection of Apolipoprotein C-III glycoforms and related species for the screening of Congenital Disorders of Glycosylation by capillary zone electrophoresis* - 34th international symposium on Microscaled Separations and Bioanalysis (MSB) - Rio de Janeiro, Brésil (18-21 février 2018)
- *Apport de l'électrophorèse capillaire et de la spectrométrie de masse pour le dépistage et la caractérisation d'anomalies de glycosylation* - 12ème Congrès de l'Association Francophone des Sciences Séparatives (SEP 2017), Paris, France (28-30 mars 2017)

Posters :

- *Nouvelle stratégie de dépistage des anomalies congénitales de la glycosylation (CDGs): séparation des glycoformes de l'Apo C-III par ECZ* - Journées scientifiques du club CE ; Paris, France (17-18 Mai 2018)
- *Apport de l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse pour l'étude de la N-glycosylation* - Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique (SMMAAP) 2017, Marne-la-Vallée, France (3-5 octobre 2017)

Publications scientifiques :

- **C. Ruel**, M. Morani, A. Bruneel, C. Junot, M. Taverna, F. Fenaille, NT. Tran: A capillary zone electrophoresis method for detection of apolipoprotein C-III glycoforms and other related artifactually modified species. *J Chro A* (2018) 1532, 238-245.
DOI: 10.1016/j.chroma.2017.12.002C.
- M. Girard, A. Poujois, M. Fabre, F. Lacaille, D. Debray, M. Rio, F. Fenaille, S. Cholet, **C. Ruel**, E. Caussé, J. Selves, L. Bridoux-Henno, F. Woimant, T. Dupré, S. Vuillaumier-Barrot, N. Seta, L. Alric, P. de Lonlay, A. Bruneel: CCDC115-CDG: A new rare and misleading inherited cause of liver disease. *Mol. Genet. Metab.* (2018) 124(3), 224-235 DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.05.002
- A. Bruneel, S. Cholet, V. Drouin-Garraud, M. Jacquemont, A. Cano, A. Mégarbané, **C. Ruel**, D. Cheillan, T. Dupré, S. Vuillaumier-Barrot, N. Seta, F. Fenaille: Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric and gene sequencing techniques for the screening and characterization of congenital disorders of glycosylation. *Electrophoresis* (2018) DOI: 10.1002/elps.201800021.

Abréviations et symboles

2-AA	Acide 2-Aminobenzoïque
2-AB	2-Aminobenzamide
2-AP	2-Aminopyridine
α 1-ATT	Alpha-1-antitrypsine
α -AGP	Alpha-glycoprotéine acide
μ ep	Mobilité électrophorétique
μ eo	Mobilité électroosmotique
A%	Aire relative
A β	Peptide bêta-amyloïde
ACN	Acétonitrile
AF	Acide formique
ANTS	Acide 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonique
ApoC-III	Apolipoprotéine C-III
APP	Protéine précurseur amyloïde
APTS	Acide 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonique
ARCL2	Cutis laxa autosomique récessif de type 2
BST	Bracketing standard
CDG	Anomalies congénitales de la glycosylation
CDG-I	CDG de type I
CDG-II	CDG de type II
CDT	Carbohydre-déficient transferrin
CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CMP	Cytidine monophosphate
Con A	Concanavalline A
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
Dol-P-P	Dolichol diphosphate
DS	Dextran
EC	Electrophorèse capillaire
ECG	Electrophorèse capillaire en gel
ECZ	Electrophorèse capillaire de zone
EGF	Facteur de croissance épidermique
EIC	Extracted ion chromatogram
ESI	Source d'ionisation électrospray
EtOH	Ethanol
FEO	Flux électroosmotique
FTICR	Analyseur à transformée de Fourier
Fuc	Fucose
GAG	Glycosaminoglycane
Gal	Galactose

GalNAc	N-acétylgalactosamine
GDP	Guanosine diphosphate
Glc	Glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GU	Unité glucose
h	Heure
HCl	Acide chlorhydrique
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile
hLys	Hydroxylysine
HPAEC	Chromatographie d'échange d'anions en milieu très alcalin
HPC	Hydroxypropyl cellulose
HPLC/LC	Chromatographie liquide haute performance
IEF	Isoélectrofocalisation
IEF _C	Isoélectrofocalisation capillaire
IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline G
IMER	Microréacteur enzymatique
IMS	Spectroscopie de mobilité ionique
JAC	Jacaline
L, mL, nL	Litre, milli-litre, nano-litre
LacNAc	Chaîne N-acétyllactosaminiques
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LIF	Fluorescence induite par laser
LOD	Limite de détection
M, mM, nM	Molaire, milli-molaire, nano-molaire
MA	Maladie d'Alzheimer
mAb	Anticorps monoclonal
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
Man	Mannose
MeOH	Méthanol
NeuAc	Acide N-acétylneuraminique
OST	Oligosaccharyltransférase
PA	Acide perchlorique
PAA	Polyacrylamide
PAD	Ampérométrie pulsée
PB	Polybrène
PEO	Oxyde de polyéthylène
Peptide A β	Peptide bêta-amyloïde
PGC	Carbone graphite poreux
PMP	1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone
PNGase F	Peptide N-glycosidase F
PSA	Antigène spécifique à la prostate
PVA	Alcool polyvinylique
RE	Réticulum endoplasmique

RFMS	Rapifluor-MS
rhEPO	Erythropoïétine humaine recombinante
rhIFN- β	Interféron β -1a recombinante
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNase B	Ribonucléase B
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – gel de polyacrylamide
SM	Spectrométrie de masse
SPE	Extraction sur support solide
TCA	Acide trichloroacétique
Tf	Transferrine
TFA	Acide trifluoroacétique
t_m	Temps de migration
TiO ₂	Oxyde de titane
TOF	Analyseur à temps de vol
UDP	Uridine diphosphate
UHPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance
UV	Ultraviolet
WGA	Wheat germ agglutinin
Xyl	Xylose

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
CURRICULUM VITAE	4
ABREVIATIONS ET SYMBOLES	6
TABLE DES MATIÈRES	10
INTRODUCTION GENERALE	1
BIBLIOGRAPHIE	5
CHAPITRE I : LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES	9
I. LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES	9
<i>I.1. Les différents types de monosaccharides</i>	9
<i>I.2. Les différentes formes de glycosylation</i>	10
I.2.1. La N-glycosylation	11
I.2.2. La O-glycosylation	12
I.2.3. La C-glycosylation	13
<i>I.3. Structures des chaînes glycaniques des glycoprotéines</i>	13
I.3.1. Les N-glycanes.....	14
I.3.2. Les O-glycanes	16
I.3.3. Antigènes de groupes sanguins	17
II. LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES	17
<i>II.1. Biosynthèse des N-glycanes</i>	17
II.1.1. Les nucléotides-sucre	17
II.1.2. Initiation de la N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique	18
II.1.2.1. Formation du précurseur tétradécasaccharidique.....	18
II.1.2.2. Transfert du précurseur tétradécasaccharidique.....	19
II.1.3. Maturation des N-glycanes dans l'appareil de Golgi	21
<i>II.2. Biosynthèse des O-glycanes</i>	23
III. ROLE DES GLYCANES DES GLYCOPROTEINES	24
<i>III.1. Effets sur les propriétés physico-chimiques des glycoprotéines</i>	24
<i>III.2. Effets sur les fonctions biologiques et immunologiques des glycoprotéines</i>	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES – CHAPITRE I	27
CHAPITRE II : LES METHODES D'ANALYSE DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES	31
I. ANALYSE DES GLYCOPROTEINES INTACTES.....	32
<i>I.1. Méthodes électrophorétiques</i>	33
I.1.1. Electrophorèse sur gel	33
I.1.2. Isoélectrofocalisation capillaire	34
I.1.3. Electrophorèse capillaire de zone (ECZ)	35
I.1.4. Electrophorèse capillaire avec détection par spectrométrie de masse (EC-SM)	38

1.2. Méthodes de spectrométrie de masse	40
1.2.1. Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	40
1.2.2. Source d'ionisation électrospray (ESI)	42
1.3. Conclusion	43
II. ANALYSE DES GLYCANES.....	44
II.1. Traitement d'échantillon.....	44
II.1.1. Enrichissement des glycanes	44
II.1.2. Méthodes de libération des glycanes	46
II.1.2.1. Méthodes chimiques.....	46
II.1.2.2. Méthodes enzymatiques	49
II.1.3. Méthodes de dérivation	51
II.1.3.1. Dérivation pour une détection en UV ou fluorescence	53
II.1.3.2. Dérivation pour une détection en SM.....	55
II.1.4. Purification.....	57
II.1.5. Méthodes de préparation d'échantillons à haut débit.....	57
II.2. Méthodes d'analyse.....	58
II.2.1. Analyse par électrophorèse capillaire	58
II.2.1.1. Electrophorèse capillaire de zone.....	58
II.2.1.2. Electrophorèse capillaire en gel avec détection par fluorescence induite par laser (ECG-LIF)	60
II.2.1.3. Electrophorèse capillaire avec détection par spectrométrie de masse (EC-SM)	62
II.2.1.4. Méthodes d'identification des glycanes	64
II.2.2. Analyse par méthodes chromatographiques	66
II.2.2.1. Chromatographie d'échange d'anions en milieu très alcalin.....	66
II.2.2.2. Chromatographie liquide à polarité de phase inversée	67
II.2.2.2.1. Colonnes greffées par des chaînes alkyles	67
II.2.2.2.2. Colonnes poreuses de carbone graphite.....	68
II.2.2.3. Chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)	69
II.2.3. Analyse par méthodes spectrométriques.....	71
II.2.3.1. Résonance magnétique nucléaire.....	71
II.2.3.2. Spectrométrie de masse	72
II.2.3.2.1. Source d'ionisation électrospray (ESI).....	72
II.2.3.2.2. Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	72
II.2.3.3. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse	73
II.3. CONCLUSION.....	76
III. CONCLUSION.....	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES – CHAPITRE II.....	78
CHAPITRE III : GLYCOSYLATION ET PATHOLOGIES HUMAINES	93
I. LES ANOMALIES CONGENITALES DE LA GLYCOSYLATION (CDG)	93
1.1. Etat de l'art et classification des CDG	93
Figure 53: Processus de biosynthèse des N-glycanes et sites d'anomalies génétiques responsables des différents types de CDG annotés d'après (Freeze, 2006)	95
1.2. Observations cliniques	95
1.3. Dépistage et identification des CDG.....	96
1.4. Anomalies affectant la N-glycosylation et leur dépistage	97
1.5. Anomalies affectant la O-glycosylation et leur dépistage	101

I.6. Traitements des CDG.....	103
II. LES ANOMALIES ACQUISES DE LA GLYCOSYLATION.....	104
II.1. Alzheimer	104
II.2. Diabète de type 2	106
II.3. Cancers.....	107
II.4. Alcoolisme et pathologies hépatiques chroniques.....	109
II.5. Pathologies inflammatoires chroniques.....	112
III. CONCLUSION.....	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES – CHAPITRE III	114
CHAPITRE IV : ANALYSE DE GLYCOPROTEINES INTACTES : CAS DE L'APOLIPOPROTEINE C-III POUR LE	
DEPISTAGE DES CDGS	123
I. APPORT DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE POUR LA SEPARATION DES GLYCOFORMES DE L'APOC-III	123
I.1. Introduction.....	123
I.2. Méthode d'électrophorèse capillaire de zone pour la détection des glycoformes de	
<i>l'Apolipoprotéine C-III et d'autres espèces apparentées et artificiellement modifiées (Article 1)</i>	124
Supporting information.....	143
I.3. Application de la méthode ECZ à des échantillons biologiques.....	147
I.3.1. Matériel et méthodes	147
I.3.1.1. Réactifs et consommables	147
I.3.1.2. Méthodes.....	148
I.3.1.2.1. Précipitation des protéines.....	148
I.3.1.2.2. SPE	148
I.3.1.2.3. Immunocapture sur billes magnétiques	148
I.3.1.2.4. Méthodes de préconcentration électrocinétique.....	150
I.3.1.2.4.a. Field amplified sample stacking (FASS).....	150
I.3.1.2.4.b. Large-volume sample stacking (LVSS)	150
I.3.1.2.5. Dérivation sur billes magnétiques	150
I.3.1.2.6. Délipidation du plasma	151
I.3.2. Extraction de l'ApoC-III du plasma	151
I.3.2.1. Précipitation des protéines	151
I.3.2.2. Extraction sur support solide (SPE)	155
I.3.2.2.1. Optimisation de l'extraction de l'ApoC-III par SPE.....	155
I.3.2.2.2. Elimination supplémentaire des interférents par ultrafiltration	157
I.3.2.3. Immunocapture sur billes magnétiques.....	157
I.3.2.3.1. Billes fonctionnalisées par des groupements tosyl.....	159
I.3.2.3.1.a. Efficacité de l'immobilisation des pAbs anti-ApoC-III et de l'immunocapture de l'ApoC-	
III standard.....	159
I.3.2.3.1.b. Comparaison et choix de la méthode d'élution	160
I.3.2.3.1.c. Mise en évidence de la spécificité de l'immunocapture de l'ApoC-III dans le plasma.....	160
I.3.2.3.1.d. Amélioration du signal de l'ApoC-III issue du plasma.....	163
I.3.2.3.2. Billes fonctionnalisées par des acides carboxyliques.....	164
I.3.2.3.3. Billes fonctionnalisées par la streptavidine	165
I.3.2.4. Amélioration de la sensibilité de la méthode d'ECZ.....	166
I.3.2.4.1. Elimination des sels	167
I.3.2.4.2. Méthodes de préconcentration électrocinétique.....	167
I.3.2.4.2.a. Field amplified sample stacking (FASS).....	167

I.3.2.4.2.b. Large-volume sample stacking (LVSS)	170
I.3.2.4.3. Dérivation avec un fluorophore.....	172
II. SEPARATION DES GLYCOFORMES DE L' APOC-III PAR MALDI-TOF MS DE PATIENTS ATTEINTS DE CDGs	175
III. CONCLUSION.....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES – CHAPITRE IV.....	180
CHAPITRE V : ANALYSE GLYCOMIQUE DE FLUIDES BIOLOGIQUES DANS LE CADRE DU DEPISTAGE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	183
I. INTRODUCTION.....	183
II. ANALYSE GLYCOMIQUE DE FLUIDES BIOLOGIQUES EN ECG-LIF	184
II.1. Introduction.....	184
II.2. Principe de la méthodologie.....	184
II.3. Matériel et méthodes.....	185
II.3.1. Réactifs et consommables	185
II.3.2. Echantillons biologiques	185
II.3.3. Préparation d'échantillons.....	186
II.3.4. Analyse par ECG-LIF	186
II.4. Vérification de l'efficacité du kit sur différentes matrices.....	187
II.4.1. Analyse d'une IgG humaine standard	187
II.4.2. Analyse du plasma	188
II.4.3. Analyse du LCR.....	191
II.5. Application à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.....	192
II.5.1. Cas du plasma	192
II.5.2. Cas du LCR.....	195
II.6. Conclusion	196
III. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE SEPARATION DE GLYCANES LIBERES PAR EC-SM.....	197
III.1. Introduction.....	197
III.2. Intérêt du RapiFluor-MS (RFMS)	198
III.3. Développement de la méthode	199
III.3.1. Matériel et méthodes	199
III.3.1.1. Produits et consommables.....	199
III.3.1.2. Dérivation avec le RapiFluor-MS.....	199
III.3.1.3. Analyse par MALDI-TOF	200
III.3.1.4. Analyse par électrophorèse capillaire	200
III.3.2. Vérification de l'efficacité de la dérivation	201
III.3.3. Optimisation de la séparation en EC-UV.....	202
III.3.4. Optimisation de la séparation en EC-SM	203
III.3.4.1. Séparation dans un capillaire de silice	203
III.3.4.2. Séparation dans un capillaire avec un revêtement neutre	205
III.4. Conclusion et perspectives	209
IV. CONCLUSION	210
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES – CHAPITRE V.....	213
CHAPITRE VI : ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE POUR LE DEPISTAGE DE PATHOLOGIES OCULAIRES.....	217
I. INTRODUCTION.....	217

II. MATERIEL ET METHODES	220
II.1.1. Réactifs et consommables	220
II.1.2. Immunopurification de la transferrine de l'humeur vitrée.....	220
II.1.3. Concentration de la transferrine de l'humeur vitrée sur membrane	221
II.1.4. Analyse des glycoformes de la transferrine.....	221
II.1.5. Analyse des N-glycanes par ECG-LIF	222
III. SEPARATION DES GLYCOFORMES DE LA TRANSFERRINE DE L'HUMEUR VITREE	222
IV. SEPARATION DES GLYCANES DE LA TRANSFERRINE	226
V. CONCLUSION	227
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES – CHAPITRE VI.....	229
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	231
ANNEXE 1	237
ANNEXE 2	276
ANNEXE 3	281
ANNEXE 4	292

Introduction générale

La glycosylation est l'une des principales modifications post-traductionnelles subies par les protéines. Elle se caractérise par une grande micro-hétérogénéité ainsi qu'une très forte fréquence car plus de 50% des protéines eucaryotes sont glycosylées (Apweiler *et al.*, 1999; Khoury *et al.*, 2011). Selon le site d'attachement impliqué (Asn ou Ser/Thr), on parlera de N- ou de O-glycosylation. La glycosylation est impliquée dans le bon repliement des protéines tout en influençant leur activité biologique notamment au cours des processus de reconnaissance, d'adhésion et de signalisation cellulaires (Ohtsubo & Marth, 2006).

La recherche de biomarqueurs de pathologies est devenue un enjeu de santé mondial (ANSM, 2011; Rifai *et al.*, 2006). Un biomarqueur de pathologie est une caractéristique biologique mesurable objectivement qui permet de distinguer un état physiologique normal d'un état pathologique (Strimbu & Tavel, 2010). Ainsi, la découverte de nouveaux biomarqueurs de maladies peut permettre d'améliorer la précocité du diagnostic ou le suivi de l'évolution de la pathologie. Une grande partie des biomarqueurs protéiques approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) sont des glycoprotéines. Ainsi, depuis les années 1980, pas moins de 24 glycoprotéines ont été approuvées par la FDA (Weng & Jian, 2017). Néanmoins seul le dosage global des glycoprotéines a pour le moment été validé (i.e. pas celui d'une glycoforme particulière). Cependant, la capacité de glycosylation des cellules peut être très largement affectée dans le cadre de certaines maladies. Ainsi, les modifications résultantes de glycosylation constituent une autre source de biomarqueurs de pathologies, potentiellement plus fine que le dosage global des glycoprotéines elles-mêmes. Ainsi, l'étude de la glycosylation des protéines contenues dans les fluides biologiques (plasma, liquide céphalorachidien (LCR), ...) pour le dépistage, le suivi et le pronostic de maladies comme pour l'élucidation des mécanismes impliqués dans la pathogénèse constituent d'importants sujets de recherche. De nombreux efforts sont donc réalisés pour atteindre cet objectif et certaines modifications spécifiques de glycosylation ont déjà été rapportées dans les cas de pathologies acquises ou innées comme la polyarthrite rhumatoïde, les cancers, l'obésité ou encore les anomalies congénitales de la glycosylation (CDGs) (Abu Bakar *et al.*, 2018; S. B. Harvey *et al.*, 2009; C. Huang *et al.*, 2017; Kailemia *et al.*, 2017).

L'analyse de la glycosylation représente un challenge analytique très complexe du fait de la très grande micro-hétérogénéité structurale des glycanes. Cette micro-hétérogénéité résulte de deux facteurs principaux : i) une même glycoprotéine peut posséder plusieurs sites de glycosylation occupés ou non, ii) les structures glycaniques présentes sur un même site peuvent varier de manière qualitative et quantitative. Aucune technique unique ne permet de caractériser finement la glycosylation des protéines et la combinaison de plusieurs approches est généralement nécessaire pour en obtenir une vision globale. De plus, les glycoprotéines arborent simultanément des parties peptidique et oligosaccharidique, ce qui ajoute une difficulté supplémentaire lors de leur étude. La complexité des fluides biologiques ainsi que la faible abondance de certaines biomolécules d'intérêt nécessitent l'emploi de techniques analytiques spécifiques et sensibles. La détection et l'identification de biomarqueurs de pathologies glycosylés requiert l'emploi d'une technique sensible mais surtout ayant un pouvoir de résolution élevé permettant la séparation de structures très proches, telle que

l'électrophorèse capillaire (EC). Plusieurs stratégies d'analyse de la glycosylation, apportant généralement des informations complémentaires, ont été proposées. Ainsi, il est possible d'étudier une glycoprotéine à l'aide de ses glycoformes intactes, ses glycopeptides, ses glycanes libérés ou encore sa composition en monosaccharides.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse porte sur le développement de méthodes analytiques, en particulier électrophorétiques, permettant l'analyse de la glycosylation des protéines issues de fluides biologiques dans le cadre de la détection de biomarqueurs de pathologies. Les travaux présentés ici se concentrent donc sur les différentes stratégies développées autour de cette technique pour le dépistage de différentes pathologies innées telles que les CDGs ou acquises comme la maladie d'Alzheimer ou encore des pathologies oculaires.

La première partie de ce manuscrit est composée d'une étude bibliographique. Celle-ci débute (Chapitre I) par la description de la glycosylation en exposant la structure des glycoprotéines, leur processus de biosynthèse ainsi que le rôle de la partie oligosaccharidique sur l'activité des protéines. Par la suite (Chapitre II), un état de l'art sur les différentes méthodes analytiques développées (*i.e.* EC, chromatographie liquide et spectrométrie de masse) pour étudier la glycosylation selon deux stratégies, l'analyse de glycoprotéines intactes puis des glycanes libérés, est présenté. Des exemples de découverte de biomarqueurs mais aussi en lien avec l'étude de glycoprotéines thérapeutiques sont donnés. En effet, ces méthodes pourraient être adaptées pour la recherche de potentiels biomarqueurs glycaniques. Une partie de ce second chapitre bibliographique, a fait l'objet en partie de la rédaction d'un chapitre de livre du volume 56 de la série *Advances in Chromatography* publiée par Taylor & Francis et actuellement sous presse. Enfin, le Chapitre III de cette partie introduit les différentes anomalies de glycosylation qui ont déjà été observées pour certaines pathologies comme le cancer, les CDGs ou la maladie d'Alzheimer.

La deuxième partie de ce manuscrit comporte trois chapitres détaillant les résultats expérimentaux de ce travail de thèse. Chacun des chapitres aborde une stratégie d'étude de la glycosylation différente soit via l'analyse des glycoprotéines intactes soit via celle des glycanes libérés. Les deux types de N- et O-glycosylation seront abordées à travers les techniques analytiques employées. Les études menées ont été réalisées dans le cadre du dépistage de diverses pathologies : les CDGs, la maladie d'Alzheimer ainsi que des pathologies oculaires.

Ainsi, le premier chapitre de résultats (Chapitre IV) est dédié au développement d'une méthode d'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) pour la détection des différentes glycoformes de l'apolipoprotéine C-III (ApoC-III) intacte dans le cadre du dépistage des CDGs. Cette glycoprotéine est en effet étudiée lors de la recherche de troubles de la O-glycosylation. Tout d'abord, l'optimisation des conditions de séparation des glycoformes d'un standard commercial d'ApoC-III sont décrites. Le rôle important du préconditionnement du capillaire ainsi que des rinçages inter-analyses, pour assurer de bonnes répétabilités des temps de migrations et des aires relatives, est détaillé. Des analyses complémentaires réalisées par spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF ont permis de caractériser l'ApoC-III standard utilisé. Cette méthode d'ECZ a donc permis la séparation des glycoformes du standard d'ApoC-III et de comparer plusieurs lots de différents fournisseurs. Ce travail a fait l'objet d'un article publié en 2018 dans *Journal of Chromatography A* (vol 1532, pp.238-245) intitulé « *A capillary zone electrophoresis method for detection of Apolipoprotein C-III glycoforms and other related artifactually modified species* ». La deuxième partie de ce chapitre est consacrée au développement

d'une méthode de traitement d'échantillon biologique afin d'appliquer cette méthode d'ECZ à des échantillons de plasma. Plusieurs stratégies, de la moins à la plus spécifique à l'ApoC-III, telles que la précipitation des protéines, l'extraction sur support solide et l'immunocapture sur billes magnétiques ont été étudiées avec pour objectif de minimiser la présence d'interférents tout en assurant un rendement maximal d'extraction de l'ApoC-III. Ces essais ont montré la nécessité de combiner l'étape d'extraction avec une étape de dérivation par fluorescence de la chaîne polypeptidique pour assurer un gain de sensibilité et améliorer la détection des glycoformes d'ApoC-III dans le plasma.

Le deuxième chapitre de résultats expérimentaux (Chapitre V) présente l'application d'une méthode d'EC en gel couplée à une détection par fluorescence induite par laser (ECG-LIF) pour analyser les N-glycanes libérés de glycoprotéines. Tout d'abord, une nouvelle méthode de préparation d'échantillon très rapide pour déglycosyler et dériver les N-glycanes par l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS) (Váradi *et al.*, 2014) a été appliquée à l'analyse de différents types de fluides biologiques (plasma, LCR). Une fois la vérification de la bonne répétabilité de la méthode de traitement d'échantillon pour les différents fluides biologiques effectuée, celle-ci a été appliquée à des échantillons d'individus sains et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer afin de mettre en évidence de potentielles modifications de glycosylation liées à cette pathologie. Certains glycanes n'étant pas assez abondants pour une détection par fluorescence et l'identification des structures étant indirecte en ECG-LIF, l'emploi d'une méthode plus sensible et permettant une identification directe a été envisagée. Ainsi, les premiers développements d'une méthode d'EC couplée à la spectrométrie de masse (EC-SM) pour analyser des N-glycanes après dérivation avec un nouveau fluorophore, le RapiFluor-MS® sont présentés. Ce fluorophore permet un gain de sensibilité pour une détection en spectrométrie de masse grâce à la présence d'une amine tertiaire (Lauber *et al.*, 2015). Ce fluorophore n'ayant encore jamais été utilisé lors d'analyses en EC, il est très intéressant d'explorer son apport lors de la séparation de N-glycanes en EC-SM.

Enfin, le dernier chapitre de résultats expérimentaux (Chapitre VI) s'intéresse à l'étude de la glycosylation de la transferrine (Tf) dans l'humeur vitrée de patients atteints de maladies rétinienne afin de quantifier une forme spécifique appelée β 2-Tf présente dans ce fluide biologique et le LCR. Tout d'abord, la séparation des différentes glycoformes intactes de la Tf a été effectuée par ECZ après préconcentration par immunopurification. Une deuxième stratégie, employant la méthode d'ECG-LIF précédemment appliquée aux échantillons biologiques, a été envisagée pour améliorer la sensibilité de la méthode de détection ainsi que pour caractériser les N-glycanes de la forme β 2-Tf dans l'humeur vitrée. Finalement, une approche utilisant une préconcentration de la Tf de l'humeur vitrée qui permet la détection de la glycoforme d'intérêt en ECZ est présentée.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui présente également des hypothèses qui mériteraient d'être davantage creusées pour améliorer les résultats obtenus et répondre au mieux aux problématiques de cette thèse, à savoir si l'électrophorèse capillaire permet d'étudier les anomalies de glycosylation liées aux CDGs, à la maladie d'Alzheimer ou encore aux dégénérescences rétinienne.

Les travaux de cette thèse ont été encadrés conjointement par deux laboratoires, l'Institut Galien Paris-Sud (UMR CNRS 8612) et le Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM, SPI, CEA Saclay) ayant des compétences complémentaires pour l'étude de la glycosylation. Ce projet de thèse s'est également inscrit dans le cadre de trois collaborations avec l'Hôpital Bichat (Laboratoire de

Biochimie, Paris), l'Université de Debrecen (Horváth Csaba Laboratory of Bioseparation Sciences, Hongrie) et le Centre de Recherche des Cordeliers (INSERM, UMRS 1138, Paris).

Bibliographie

- Abu Bakar, N., Lefeber, D. J., & van Scherpenzeel, M. (2018). Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0144-9>
- ANSM. (2011). *Biomarqueurs et produits de santé - ANSM*. Retrieved from [https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/(offset)/0)
- Apweiler, R., Hermjakob, H., & Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), 4–8. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00165-8)
- Harvey, S. B., Zhang, Y., Wilson-Grady, J., Monkkonen, T., Nelsestuen, G. L., Kasthuri, R. S., Verneris, M. R., Lund, T. C., Ely, E. W., Bernard, G. R., Zeisler, H., Homoncik, M., Jilma, B., Swan, T., & Kellogg, T. A. (2009). O-glycoside biomarker of apolipoprotein C3: Responsiveness to obesity, bariatric surgery, and therapy with metformin, to chronic or severe liver disease and to mortality in severe sepsis and graft VS host disease. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 603–612. <https://doi.org/10.1021/pr800751x>
- Huang, C., Liu, Y., Wu, H., Sun, D., & Li, Y. (2017). Characterization of IgG glycosylation in rheumatoid arthritis patients by MALDI-TOF-MSn and capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(15), 3731–3739. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0302-1>
- Kailemia, M. J., Park, D., & Lebrilla, C. B. (2017). Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(2), 395–410. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9880-6>
- Khoury, G. A., Baliban, R. C., & Floudas, C. A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, 1. <https://doi.org/10.1038/srep00090>
- Lauber, M. A., Yu, Y. Q., Brousmiche, D. W., Hua, Z., Koza, S. M., Magnelli, P., Guthrie, E., Taron, C. H., & Fountain, K. J. (2015). Rapid preparation of released N-glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection. *Analytical Chemistry*, 87(10), 5401–5409. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00758>
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.08.019>
- Rifai, N., Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2006). Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology*, 24(8), 971–983. <https://doi.org/10.1038/nbt1235>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Váradi, C., Lew, C., & Guttman, A. (2014). Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies. *Analytical Chemistry*, 86(12), 5682–5687. <https://doi.org/10.1021/ac501573g>
- Weng, N., & Jian, W. (2017). *Targeted biomarker quantitation by LC-MS*. (N. Weng & W. Jian, Eds.). John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from https://books.google.fr/books?id=b1QrDwAAQBAJ&pg=PA246&lpg=PA246&dq=advantage+glycan+vs+glyco+protein&source=bl&ots=G4NH_Xgw3s&sig=RwvGQh_lvovMzSP0XDoeWc0n5qq&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKewj83cTryfvcAhXIPFAKHyaAXYQ6AEwC3oECAIQAO#v=onepage&q=advantage glycan vs gl

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La glycosylation des protéines

La glycosylation est la modification post-traductionnelle la plus fréquente car plus de 50% des protéines eucaryotes sont glycosylées d'après les banques de données protéiques (SWISS-PROT) (Apweiler *et al.*, 1999; Khoury *et al.*, 2011). Plus de 1% du génome humain code pour l'ensemble des processus de glycosylation montrant ainsi la grande complexité de ce processus (Lowe & Marth, 2003). Il est donc important de connaître la composition et le mécanisme de biosynthèse des glycanes afin de les étudier dans les fluides biologiques chez l'Homme. Dans ce premier chapitre bibliographique, la structure des glycoprotéines ainsi que leur biosynthèse seront détaillées puis le rôle de ces structures oligosaccharidiques sur les différentes propriétés physicochimiques et biologiques sera présenté.

I. La structure des glycoprotéines

La glycosylation correspond à l'attachement d'une chaîne oligosaccharidique ou d'un monosaccharide à un ou plusieurs acides aminés constitutif d'une protéine par une liaison glycosidique covalente. Selon la liaison glycosidique mise en jeu on parlera alors de N- ou de O-glycosylation (voir partie I.2).

Une glycoprotéine peut présenter un ou plusieurs sites d'attachement appelés sites de glycosylation. La composition glucidique peut être très variable allant de moins de 1% à près de 90% de la masse de la glycoprotéine (Voet *et al.*, 2016). Contrairement aux chaînes polypeptidiques qui sont codées par une matrice d'acides désoxyribonucléiques (ADN), les glycanes sont synthétisés par un ensemble d'enzymes. Celles-ci n'assurent pas la formation de produits uniformes créant ainsi une hétérogénéité. En effet, une glycoprotéine peut exister sous plusieurs glycoformes ayant pour différences (Rademacher *et al.*, 1988) :

- le nombre et la nature des sites glycosylés
- le nombre et la structure des glycanes
- la répartition des chaînes glycaniques sur les différents sites de glycosylation

Ces différentes glycoformes sont le symbole de la très grande hétérogénéité des glycoprotéines (macro-hétérogénéité et micro-hétérogénéité) qui rend leur caractérisation très complexe. En effet, on parle de macro-hétérogénéité pour définir les différences d'occupation des sites de glycosylation potentiels tandis que la micro-hétérogénéité correspond à la diversité des structures possibles sur un même site de glycosylation.

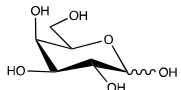

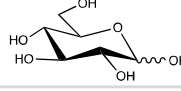

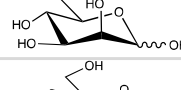

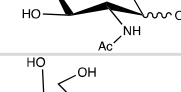

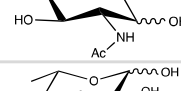

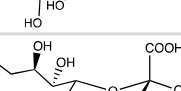

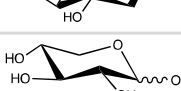

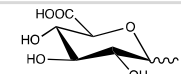



I.1. Les différents types de monosaccharides

Un monosaccharide est un carbohydrate qui ne peut pas être hydrolysé dans une forme plus simple. Même s'il existe plusieurs centaines de monosaccharides dans la nature, seulement neuf d'entre eux sont utilisés lors de l'assemblage des glycanes chez les mammifères. Ceux-ci peuvent être rassemblés en groupes selon leur composition. Ainsi on retrouve :

- ✓ Pentoses : sucres neutres composés de 5 atomes de carbone ; D-xylose (Xyl)
- ✓ Hexoses : sucres neutres composés de 6 atomes de carbone ; D-galactose (Gal), D-glucose (Glc), D-mannose (Man)
- ✓ Hexosamines : hexose en position C2, généralement N-acétylé ; N-acétylglucosamine (GlcNAc), N-acétylgalactosamine (GalNAc)
- ✓ Désoxyhexoses : hexoses avec le groupement hydroxyl en position C6, L-fucose (Fuc)
- ✓ Acides uroniques : hexoses avec prte du groupement carboxylate en 6^{ème} position négativement chargéé ; acide D-glucuronique (GlcA),
- ✓ Acides sialiques : sucres acides composés de 9 carbones ; le plus classique étant l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) toujours situé dans la partie externe de l'oligosaccharide.

Parmi ces monosaccharides, seuls sept sont généralement présents chez l'Homme et sont rassemblés dans le Tableau I. Les monosaccharides sont issus de l'alimentation, du catabolisme lysosomal des glycoprotéines et des glycolipides ainsi que du métabolisme des glucides (glycolyse, gluconéogenèse...).

Tableau I : Principaux monosaccharides composant les glycanes, seuls les sept premiers sont présents chez l'Homme. La nomenclature présentée ici sera utilisée dans la suite de ce manuscrit et correspond à la dernière nomenclature proposée par Varki et al (Varki et al., 2015)

Monosaccharide	Abréviation	Structure	Symbole
Galactose	Gal		
Glucose	Glc		
Mannose	Man		
N-acétylglucosamine	GlcNAc		
N-acétylgalactosamine	GalNAc		
Fucose	Fuc		
Acide N-acétylneuraminique	Neu5Ac		
Xylose	Xyl		
Acide glucuronique	GlcA		

I.2. Les différentes formes de glycosylation

Les chaînes oligosaccharidiques peuvent être attachées à la chaîne peptidique d'une protéine selon deux types de liaisons : les liaisons N- et O-glycosidiques. Les N-glycanes sont liés à une Asn de

la protéine via une GlcNAc tandis que les O-glycans sont attachés à une Ser ou Thr grâce à une GalNAc (Figure 1). Les N-glycans sont cinq fois plus fréquents que les O-glycans. Seules 10% des protéines possèdent les deux types de glycosylation (Voet *et al.*, 2016).

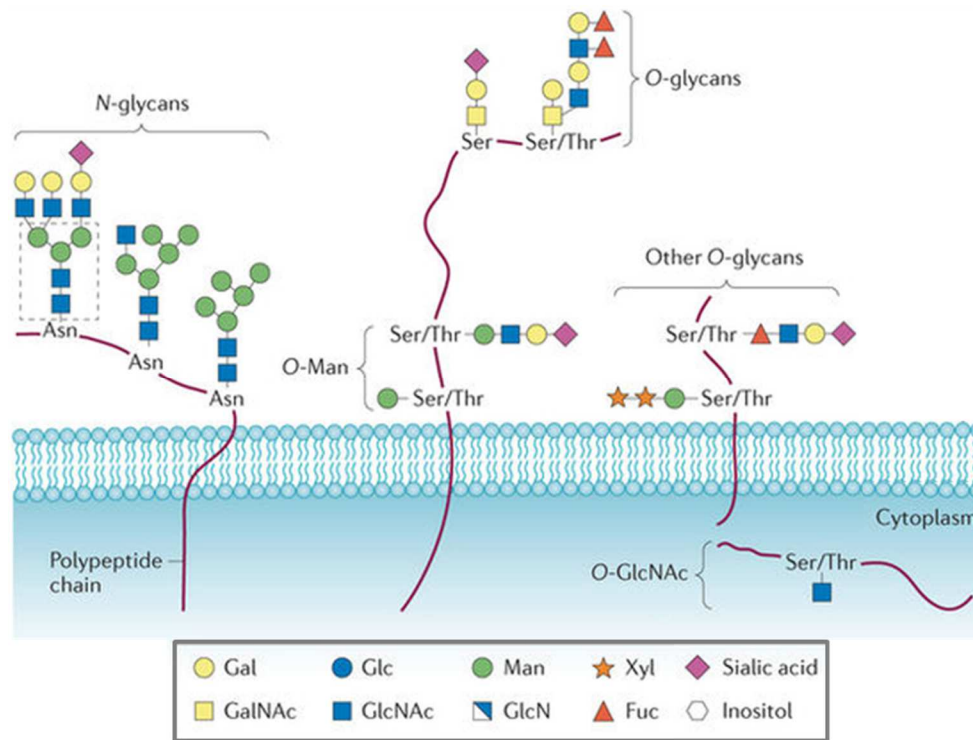
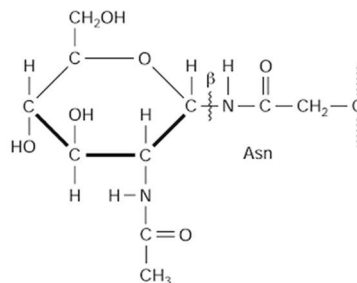


Figure 1 : Représentation des différents types de N- et O-glycosylations des protéines adapté de (Pinho & Reis, 2015)

1.2.1. La N-glycosylation

Actuellement, cinq types de liaisons N-glycosidiques ont été reportés mais la liaison de type N- β -glycosylamine (Figure 2) entre le groupement hydroxyle en position C1 d'un résidu β -GlcNAc et la fonction amide du résidu asparagine (Asn) est largement majoritaire. L'acide aminé Asn doit faire partie de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr de la protéine (X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline) pour que la glycosylation puisse avoir lieu (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Les résidus aspartate (Asp), tryptophane (Trp), glutamate (Glu) et leucine (Leu) sont rarement présents en position X puisqu'ils diminuent la fréquence de la N-glycosylation (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996).



La présence de cette séquence consensus, encore appelée séquen, est une condition nécessaire mais non suffisante pour que la N-glycosylation ait lieu. En effet, on estime qu'entre 10 et 30% sites potentiels de glycosylation restent non occupés (P. M. Rudd *et al.*, 1995) notamment pour des raisons d'encombrement stérique et de conformation de la chaîne polypeptidique puisque la glycosylation a

préférentiellement lieu au niveau des coudes β . Enfin, il semble que la séquence Asn-X-Thr soit deux fois plus glycosylée que la séquence Asn-X-Ser (Petrescu *et al.*, 2004).

D'autres séquences atypiques ont été ponctuellement identifiées comme étant N-glycosylées. C'est le cas de la séquence Asn-X-Cys présente sur la transferrine humaine (Satomi *et al.*, 2004) ou encore Asn-Gly-Gly-Thr sur une chaîne lourde d'immunoglobuline M de souris (Kehry *et al.*, 1979).

1.2.2. La O-glycosylation

Contrairement à la N-glycosylation, plusieurs types de liaisons O-glycosidiques via un groupement hydroxyle ont déjà été identifiés. Dans tous les cas, la liaison est formée par condensation de la fonction héli-acétal d'un monosaccharide avec la fonction alcool d'un acide aminé hydroxylé, le plus souvent la sérine (Ser) ou la thréonine (Thr) (Figure 3).

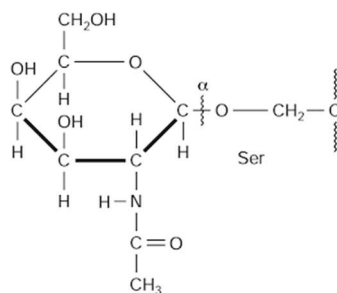


Figure 3 : Représentation d'une liaison O-glycosidique d'après (Harper *et al.*, 2017)

On trouve ainsi :

- ✓ **la liaison O-GalNAc** : appelée également type mucine, c'est le type le plus répandu qui implique une liaison O- α -glycosidique entre un résidu GalNAc et une Ser/Thr. De nombreuses glycoprotéines membranaires ou plasmatiques ainsi que les mucines (protéines présentes dans les mucus pour protéger les épithéliums d'agressions externes) possèdent ce type de liaison (Hang & Bertozzi, 2005).
- ✓ **la liaison O-GlcNAc** : il s'agit d'une liaison O- β -glycosidique entre un résidu GlcNAc et une Ser/Thr principalement présente sur des protéines dans le cytoplasme ou dans le noyau. Ce type de glycosylation se distingue des autres car elle ne lie qu'un seul monosaccharide (GlcNAc) à la protéine mais aussi parce que cette liaison est réversible. La O-GlcNAcylation est en compétition avec la phosphorylation (Hart *et al.*, 2007) et l'interaction dynamique entre ces deux modifications post-traductionnelles régulerait les voies de signalisation impliquées dans le diabète et la maladie d'Alzheimer.
- ✓ **la liaison O-Xyl** : cette forme de glycosylation, aussi appelée type protéoglycane, met en jeu une liaison O- β -glycosidique entre un résidu Xyl et une Ser. Elle permet la formation de protéoglycanes en associant des glycosaminoglycanes (GAG), de longues chaînes de polysaccharides multichargées linéaires (acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate et le kératane sulfate) à une protéine (Esko & Zhang, 1996).
- ✓ **la liaison O-Gal** : ce type de liaison, également appelé type collagène, car très abondante dans le collagène, implique une liaison O- β -glycosidique entre un résidu Gal et une hydroxylysine (hLys). Cet acide aminé est issu d'une modification post-traductionnelle de la lysine sous

l'action de lysine hydroxylase. Le glycanes est soit composé de Gal uniquement soit du disaccharide Glc-Gal. On retrouve cette glycosylation dans les collagènes et les protéines fibreuses (Spiro, 2002).

✓ **la liaison O-Man** : il s'agit d'une liaison O- α -glycosidique entre un résidu Man et une Ser/Thr présente sur les levures et certaines glycoprotéines du système nerveux et musculaire dont l' α -dystroglycane (Endo, 1999).

✓ **la liaison O-Fuc** : elle met en jeu une liaison O- α -glycosidique entre un résidu Fuc et une Ser/Thr et est retrouvée au niveau des domaines répétés du facteur de croissance épidermique (EGF) de glycoprotéines fibrinolytiques (Harris & Spellman, 1993) ou de certains facteurs de coagulation (VII, IX et XII) (Bjoern *et al.*, 1991).

✓ **la liaison O-Glc** : elle implique une liaison O- β -glycosidique entre un résidu Glc et une Ser/Thr. Certains facteurs de coagulation (Bjoern *et al.*, 1991) et domaines répétés d'EGF de glycoprotéines fibrinolytiques présentent ce type de glycosylation. Cette liaison a également été observée sur la glycogénine sous une forme O- α -glycosidique qui résulte de l'attachement d'un résidu Glc de façon covalente à une tyrosine (Tyr) (Smythe & Cohen, 1991).

Contrairement à la N-glycosylation, il ne semble pas exister de séquence consensus stricte sauf pour les glycosylations de type O-Fuc (Cys-X-X-Gly-Gly-Ser/Thr-Cys, X pouvant être n'importe quel acide aminé) et O-Glc (Cys-X-Ser-X-Pro-Cys, X pouvant être n'importe quel acide aminé) (Shao *et al.*, 2002; Shao & Haltiwanger, 2003). La présence de chaînes polypeptidiques très riches en résidus Pro directement autour du site de glycosylation Ser/Thr favoriserait également la O-glycosylation (Hema *et al.*, 2001). L'absence de séquence consensus s'explique probablement par l'activité de plusieurs glycosyltransférases ayant des spécificités distinctes mais catalysant la même réaction de O-glycosylation. Ainsi plus de 15 α -GalNAc transférases, spécifiques des tissus, contrôlent la biosynthèse des O-glycanes de type mucine (Ten Hagen *et al.*, 2003). On note toutefois que la O-glycosylation a préférentiellement lieu sur des coudes β dans des régions présentant une faible hydrophobie (résidus Trp, Leu, Ile ou Phe rarement rencontrés) (Steen *et al.*, 1998). La glycosylation des séquences possédant une Thr au lieu d'une Ser semble plus souvent rencontrée (Steen *et al.*, 1998).

1.2.3. La C-glycosylation

La C-glycosylation (ou C-mannosylation) a été découverte plus tardivement que les deux autres types au milieu des années 1990 (Hofsteenge *et al.*, 1994). Elle met en jeu une liaison covalente carbone-carbone entre un résidu de Man en position C1 et le noyau indole du tryptophane (Trp) (en position C2), il ne s'agit donc pas d'une liaison glycosidique à proprement parler. Le glycanes est composé d'un seul résidu Man. Cette C-glycosylation a été observée notamment sur la ribonucléase 2 humaine (Löffler *et al.*, 1996; de Beer *et al.*, 1995) ou plus récemment sur le récepteur de la thrombopoïétine (Sasazawa *et al.*, 2015). Ce type de glycosylation reste très rare et nécessite la présence de la séquence consensus Trp-X-X-Trp (X pouvant être n'importe quel acide aminé), le résidu Trp du N-terminal étant le site de liaison avec le résidu Man (Krieg *et al.*, 1998).

1.3. Structures des chaînes glycaniques des glycoprotéines

Comme vu précédemment, il est possible de classer les glycoprotéines en fonction des liaisons glycosidiques rencontrées en deux groupes : les N- et les O-glycoprotéines. Les structures des N- et O-glycanes présentent une très grande diversité que ce soit au niveau de l'anomérisation ou du type de liaisons

entre monosaccharides mais aussi au niveau de la composition en monosaccharides des élongations présentes. Ainsi, les possibilités sont tellement variées qu'un enchaînement de six monosaccharides conduit à 10^{12} structures tandis que six acides aminés ne peuvent donner que 10^5 structures possibles (Cummings, 2009; Laine, 1994).

Afin d'expliciter les structures des glycanes qui seront présentées dans le reste de ce manuscrit, quelques points critiques relatifs à la grande complexité de ces structures sont détaillés dans ce paragraphe.

La liaison glycosidique s'effectue entre le C1 du monosaccharide accepteur et l'un des groupements hydroxyles libres présents sur un autre monosaccharide. En fonction de l'anométrie α ou β du monosaccharide accepteur, on obtient une liaison α ou β (Figure 4).

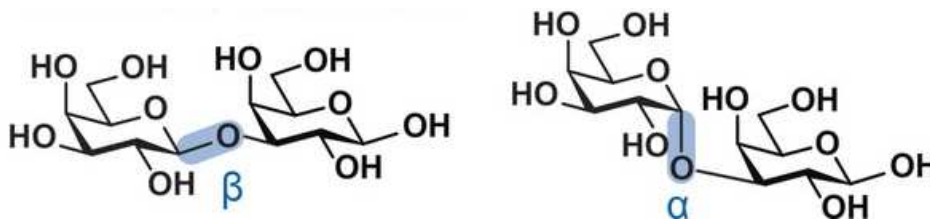


Figure 4 : Représentation des anoméries α et β du monosaccharide accepteur d'après (Johanna Hofmann & Pagel, 2017)

Compte-tenu du nombre de groupements hydroxyles présents sur les monosaccharides, la connexion entre deux monosaccharides peut se faire sur différents atomes de carbone (Figure 5). Toutes ces possibilités de connexion expliquent la formation d'espèces branchées et pas uniquement linéaires puisqu'un même monosaccharide peut être lié à 4 ou 5 autres monosaccharides en même temps sur ses différents atomes de carbone.

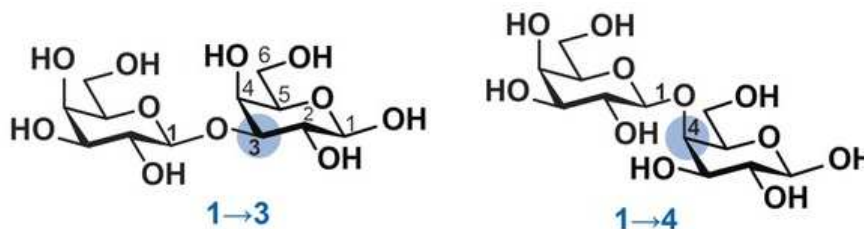


Figure 5 : Exemples de liaisons β 1-3 et β 1-4 d'après (Johanna Hofmann & Pagel, 2017)

1.3.1. Les N-glycanes

Les N-glycanes partagent tous le même noyau pentasaccharidique branché : le noyau Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc (Figure 6). Ce noyau a la particularité d'avoir un point de branchement au niveau d'un résidu de Man lié en β 1-4 au premier résidu GlcNAc. Cet embranchement donne naissance à deux antennes composées d'un résidu Man lié en α 1-3 et α 1-6 respectivement. Selon la nature des monosaccharides qui se substituent sur chacune des antennes, les N-glycanes sont classés en trois familles :

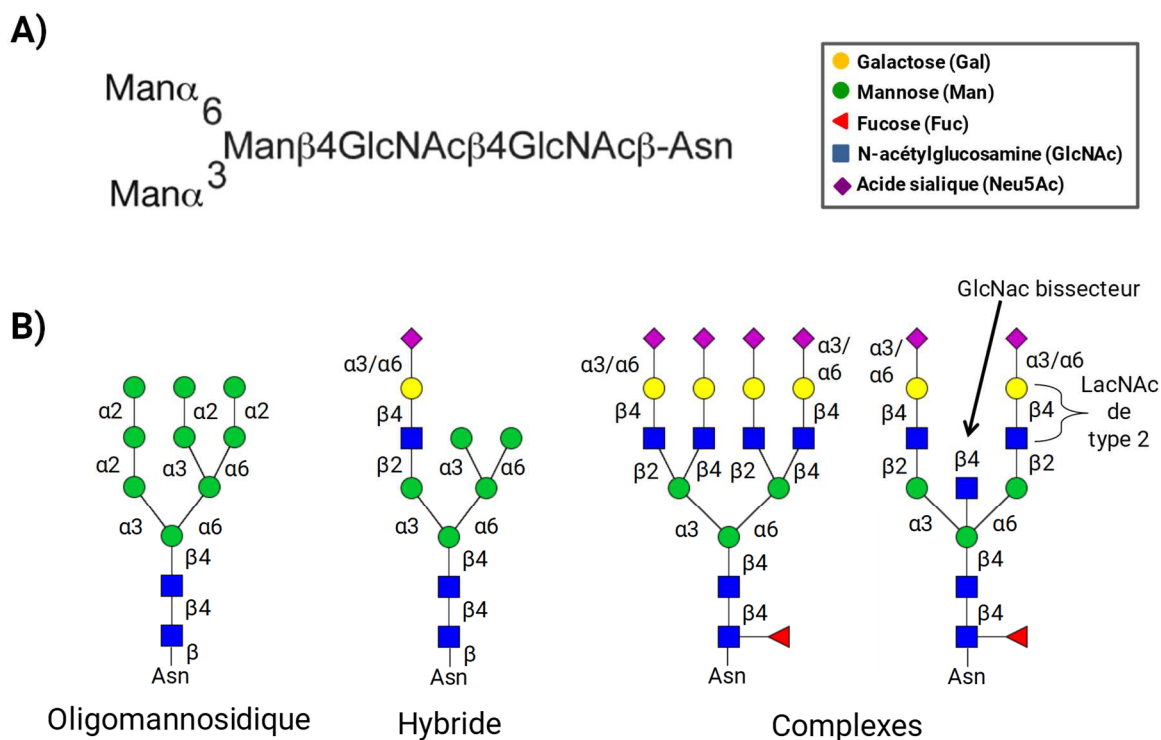


Figure 6 : Structure du pentasaccharide de base (A) et représentation des trois types de N-glycanes (oligomannosidique, complexe, hybride) (B) à partir de (Stanley *et al.*, 2009; Varki *et al.*, 2015)

✓ **type oligomannosidique** : également appelé « high mannose », il possède des antennes constituées uniquement de résidus Man, entre 5 et 9 résidus, reliés entre eux par des liaisons $\alpha 1-2$, $\alpha 1-3$ et $\alpha 1-6$ (Figure 6) .

✓ **type complexe** : il ne comporte que trois résidus Man présents dans le noyau pentasaccharidique et peut posséder entre deux et quatre résidus GlcNAc qui donnent alors respectivement des structures bi-, tri- ou tétra-antennées chez l'Homme (Figure 6). Les antennes sont composées de l'enchaînement de résidus GlcNAc, Gal, et acides sialiques. Chez l'Homme, les résidus de GlcNAc antennaires liés à des résidus Gal forment généralement des chaînes N-acétyllactosaminiques (LacNAc) de type 2 ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$). Les acides sialiques se situent toujours à l'extrémité des chaînes glycaniques. Le $\text{Man}\beta 1-4$, point de branchement du noyau pentasaccharidique, peut également être relié directement à un GlcNAc par une liaison $\beta 1-4$ en position bissectrice, mais cela ne représente pas une antenne additionnelle. Le fucose se substitue généralement au GlcNAc proximal (lié à l'Asn) par une liaison $\alpha 1-6$ (Figure 6). On classe ces glycanes selon leur nombre d'antennes et le nombre d'acides sialiques présents. On retrouve ce type de glycane sur des glycoprotéines comme l'alpha-glycoprotéine acide (α -GPA) (Vasson *et al.*, 1996). Les glycanes complexes représentent la forme la plus répandue sur les glycoprotéines plasmatiques (Clerc *et al.*, 2016).

✓ **type hybride** : il présente une antenne de structure oligomannosidique au niveau de la branche $\alpha 1-6$ et une antenne de structure complexe au niveau de la branche $\alpha 1-3$ (Figure 6). La partie oligomannosidique se compose d'un à quatre résidus de Man. La partie complexe peut posséder une ou deux antennes. Le Fuc se substitue comme précédemment sur le résidu GlcNAc proximal et un GlcNAc en position bissectrice peut également être présent. On retrouve ce type de glycane sur deux des 19 sites de glycosylation de l'apolipoprotéine B-100 par exemple (Harazono *et al.*, 2005).

Les N-glycanes existent dans toutes sortes d'espèces et même si la composition des antennes varie selon l'espèce considérée, le noyau pentasaccharidique reste lui constant (Figure 7). Les mécanismes de glycosylation diffèrent d'un organisme à un autre, ce qui a une grande importance lors de la production de protéines recombinantes puisqu'elles présentent des profils de glycosylation différents selon le type cellulaire d'origine (levures, animaux). Par conséquent, il est nécessaire que les protéines thérapeutiques recombinantes soient produites par des systèmes cellulaires eucaryotes (Walsh & Jefferis, 2006).

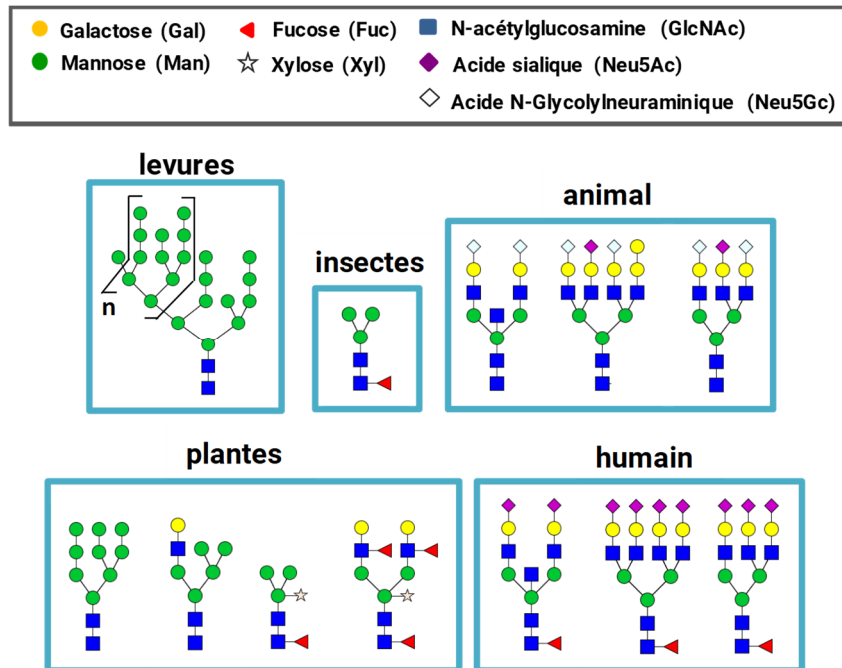


Figure 7 : Représentation de différents types de N-glycanes issus d'espèces différentes

1.3.2. Les O-glycanes

La structure des O-glycanes est plus complexe que celle des N-glycanes parce qu'il existe pas moins de 8 structures de base différentes, composées de di- ou tri-saccharides (Tableau II)(Brockhausen *et al.*, 2009). Les motifs 1 à 4 sont plus fréquents que les motifs 5 à 8. Chez les mammifères, le motif 1 correspond au déterminant antigénique de Thomsen-Friedereich (antigène T). Avec le noyau 2, ils ont une distribution ubiquitaire et sont présents sur un ensemble de mucines et glycoprotéines dans le plasma comme le fibrinogène (facteur I de coagulation) ou l'apolipoprotéine C-III.

Tableau II : Représentation des 8 motifs retrouvés dans les O-glycanes

Motif 1	Motif 2	Motif 3	Motif 4	Motif 5	Motif 6	Motif 7	Motif 8

Les O-glycanes présentent une très grande hétérogénéité car ils peuvent être substitués par divers types de monosaccharides. Les motifs peuvent en effet être substitués par des résidus Gal et GlcNAc pour former des antennes LacNAc de types 1 (Gal β 1-3GlcNAc) et 2 (Gal β 1-4GlcNAc) souvent sialylées en liaison α 2-3 et parfois galactosylées en α 1-3. Les O-glycanes présentent de structures plus petites et plus hétérogènes que celles des N-glycanes.

1.3.3. Antigènes de groupes sanguins

Les antigènes de groupes sanguins correspondent à des enchaînements de monosaccharides présents à l'extrémité des N- et O-glycanes présents. Ils sont notamment présents à la surface des globules rouges et sont responsables de la non-compatibilité entre donneur et receveur lors des transfusions sanguines (Vasconcelos-dos-Santos *et al.*, 2015). Ils sont regroupés en système selon le gène qui les codent. Découverts au début du XX^{ème} siècle par Karl Landsteiner, les antigènes du système ABO sont synthétisés par l'action des glycosyltransférases A ou B, codées par les locus A, B ou O (Figure 8) (Franchini & Bonfanti, 2015). Les antigènes du système Lewis sont des glycosphingolipides libres dans le plasma qui peuvent être adsorbés sur les globules rouges. Ils sont synthétisés par deux fucosyltransférases codées par deux gènes distincts (Figure 8).

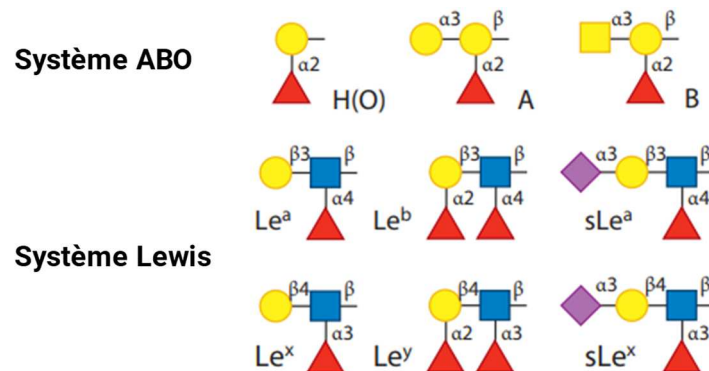


Figure 8 : Structures des antigènes de groupes sanguins du système ABO et du système Lewis (Le : Lewis et sLe : Sialyl Lewis) d'après (Krasnova & Wong, 2016)

II. La biosynthèse des glycoprotéines

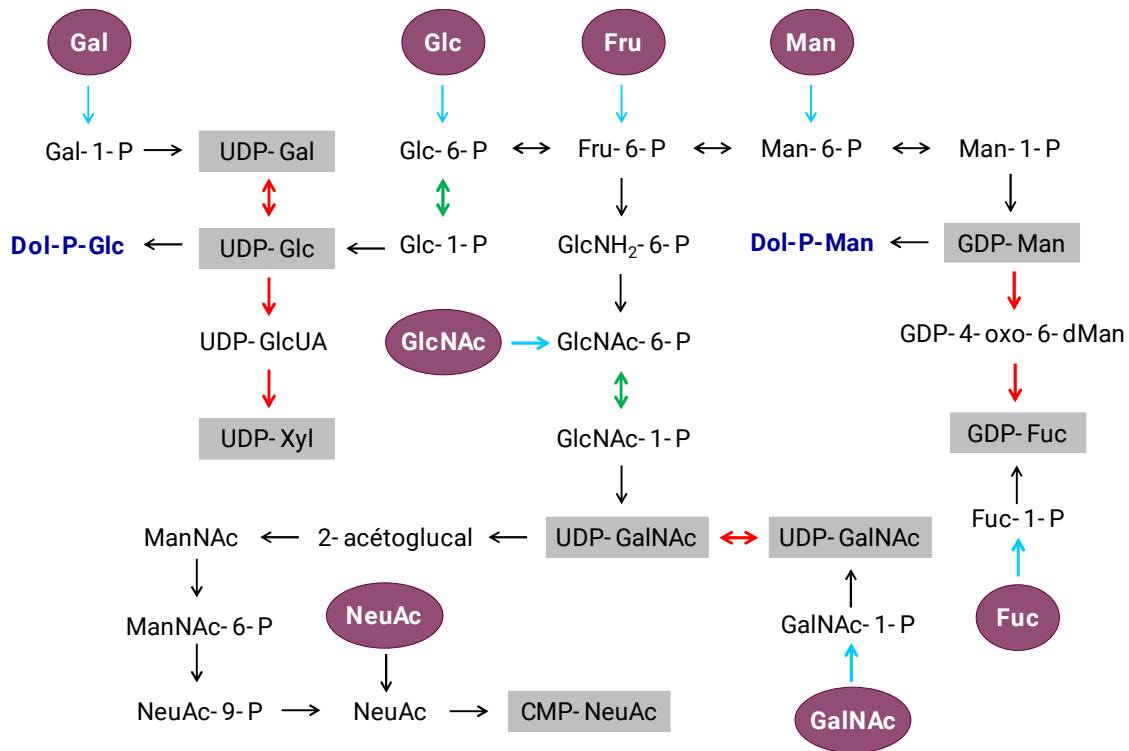
Généralement, la biosynthèse des glycanes se déroule dans deux compartiments subcellulaires, le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Seule la glycosylation de type O-GlcNAc ne suit pas cette règle car elle a lieu dans le cytosol et le noyau (Hart *et al.*, 2007). Plusieurs revues ont décrit le mécanisme de N-glycosylation (Markus Aebi, 2013; Breitling & Aebi, 2013; Varki *et al.*, 2015).

II.1. Biosynthèse des N-glycanes

II.1.1. Les nucléotides-sucres

Au cours de la biosynthèse des chaînes glycaniques, les monosaccharides employés se présentent sous la forme d'un intermédiaire activé mono ou di-phosphate appelé nucléotide-sucre. Cet intermédiaire a pour objectif de fixer l'anométrie du monosaccharide ainsi que de fournir l'énergie nécessaire à la formation d'une liaison glycosidique grâce à une rupture de liaison phosphodiester. Les monosaccharides exogènes majeurs dit précurseurs provenant de l'alimentation sont Gal, le fructose et Glc. Les autres monosaccharides sont synthétisés à partir des trois monosaccharides précurseurs et

d'autres métabolites précurseurs issus notamment de la glycolyse. La formation de ces nucléotides-sucres passe par la conversion des monosaccharides en oses-1-P et oses-6-P réalisée à l'aide de kinases (flèches bleues sur la Figure 9) (Freeze, Hart, et al., 2015). La nucléotidylation (UDP, GDP ou CMP) a lieu une fois le donneur sous forme ose-1-P, sinon des réactions d'isomérisation seront effectuées jusqu'à obtenir la forme nécessaire à l'activation des sucres (flèches vertes sur la Figure 9). Le nucléotide-sucre peut être formé par la réaction d'un nucléoside triphosphate avec le monosaccharide-1-P ou par isomérisation ou interconversion d'un autre nucléotide-sucre (flèches rouges sur la Figure 9) (Breitling & Aebi, 2013). La plupart des nucléotides-sucres sont synthétisés dans le cytoplasme.



UDP : uridine diphosphate
 GDP : guanosine diphosphate
 CMP : cytidine monophosphate

Figure 9 : Schéma simplifié des voies d'activation et d'interconversion des monosaccharides pour la biosynthèse des nucléotides-sucres à partir de (Freeze, Hart, et al., 2015)

II.1.2. Initiation de la N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique

II.1.2.1. Formation du précurseur tétradecasaccharidique

La biosynthèse des glycanes commence par l'assemblage d'un précurseur oligosaccharidique composé de deux GlcNAc, neuf Man et trois Glc (Figure 10A).

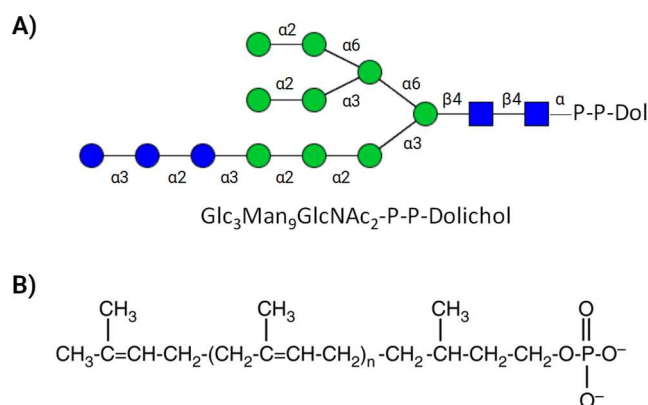


Figure 10 : Structure du précurseur tétradéca-saccharidique (A) et formule du dolichol phosphate (B) d'après (Stanley *et al.*, 2015)

Ce précurseur tétradéca-saccharidique est lié à un lipide chargé, ancré dans la membrane du RE, le pyrophosphodolichol (Dol-P-P). Le dolichol est un lipide polyisoprénique insaturé comprenant entre seize et vingt unités isoprènes et correspond à un intermédiaire de biosynthèse du cholestérol (Figure 10B). La formation de ce précurseur à partir de monosaccharides est réalisée par l'action de diverses glycosyltransférases membranaires (ALG_x) au cours de ce qu'on appelle le cycle des dolichols (Figure 11) (Burda & Aebi, 1999). La biosynthèse débute par des additions successives de GlcNAc, Man et Glc à partir de nucléotide-sucres au niveau du cytoplasme jusqu'à la formation de Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol (Breitling & Aebi, 2013). Cet intermédiaire subit ensuite une translocation vers la lumière du RE grâce à une flippase (RTF1) (Helenius *et al.*, 2002). La deuxième partie de l'assemblage se déroule alors dans la lumière réticulaire par action de différentes mannosyltransférases et glucosyltransférases jusqu'à obtenir le précurseur tétradéca-saccharidique complet.

II.1.2.2. Transfert du précurseur tétradéca-saccharidique

Une fois l'assemblage du précurseur terminé, cet intermédiaire est transféré en bloc sur l'un des sites potentiels de glycosylation Asn-X-Ser/Thr sur la protéine naissante. Ce transfert est réalisé à l'aide d'une enzyme, l'oligosaccharyltransférase (OST) (Markus Aebi, 2013). Des lectines (protéines reconnaissant spécifiquement certains monosaccharides) entrent alors en action pour vérifier la bonne conformation des glycoprotéines et éliminer celles ayant une conformation incorrecte (Pearse & Hebert, 2010). En effet, environ 30% des glycoprotéines n'arriveront pas à acquiescer un repliement correct (Schubert *et al.*, 2000). Celles-ci voient alors leur précurseur tétradéca-saccharidique coupé pour stopper les essais de mise en conformation correcte puis elles subissent une rétro-translocation vers le cytoplasme où elles seront dégradées (Hebert & Molinari, 2007). Si le contrôle qualité valide la conformation, l'action d' α -glucosidases réticulaires I et II puis de l' α -mannosidase réticulaire I entraîne la coupure des résidus Glc et d'un résidu Man (Stanley *et al.*, 2009). La glycoprotéine est alors transportée au niveau de l'appareil de Golgi grâce à des vésicules tapissées de COPII (« coat protein » qui correspond à un complexe heptamérique appelé coatomère) via un transport antérograde (Szul & Sztul, 2011).

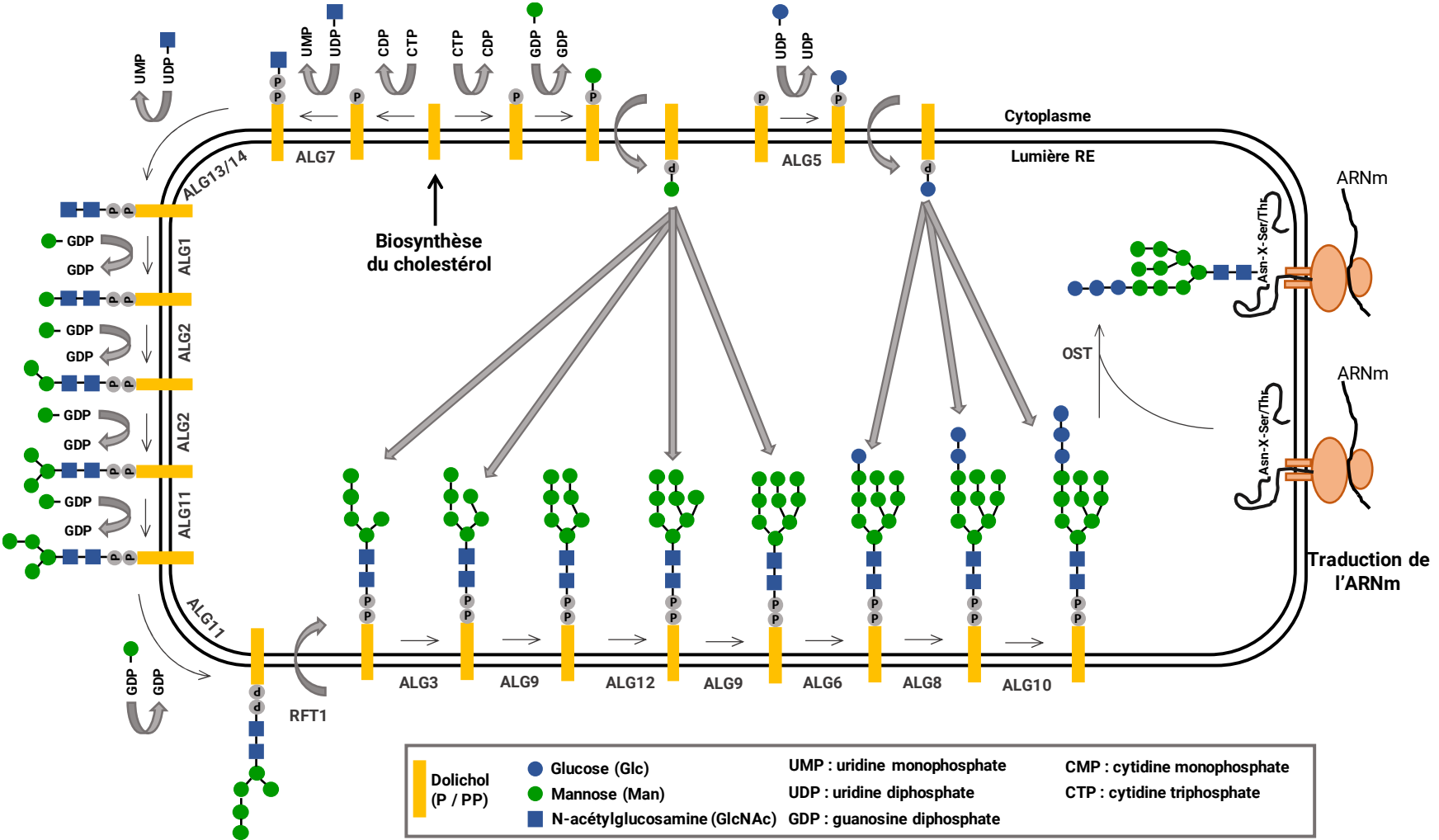


Figure 11 : Cycle des dolichols pour la biosynthèse du précurseur oligosaccharidique et son transfert sur la chaîne polypeptidique. adapté de (Burda & Aebi, 1999).

II.1.3. Maturation des N-glycanes dans l'appareil de Golgi

Les protéines transférées dans l'appareil de Golgi vont subir les actions de différentes enzymes, les glycosidases et glycosyltransférases qui permettront la maturation des chaînes glycaniques à travers des étapes d'élongation et de digestion (Figure 12). La variété des enzymes impliquées ainsi que le compartiment de maturation donneront naissance à la diversité des N-glycanes, qui peuvent être regroupés en trois catégories : les types complexe, hybride et oligomannosidique (voir partie I.3.1).

✓ **Type oligomannosidique** : si toutes les α -mannosidases I ne sont pas actives dans le compartiment *cis* de l'appareil de Golgi, des glycanes oligomannosidiques (avec 5 à 9 résidus de Man) seront observés.

✓ **Type complexe** : la formation des N-glycanes complexes commence dans le *cis*-Golgi par l'action l' α -mannosidase I jusqu'à obtenir une structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Cet intermédiaire entre alors dans le Golgi-*médian* où l'enzyme GlcNAcT-I catalyse l'élongation de la branche α 1-3 mannosidique par l'ajout d'un résidu GlcNAc (Schachter, 2000). Une fois cette étape d'ajout de GlcNAc réalisée, indispensable pour la poursuite du processus de maturation, l' α -mannosidase golgienne II permet de retirer deux résidus de Man terminaux sur la branche α 1-6 donnant naissance à la forme $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ (Varki *et al.*, 2015). La GlcNAcT-II permet l'addition d'un résidu GlcNAc sur l'antenne α 1-6 mannosidique. On obtient alors un glycanes bi-antenné de structure $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ qui correspond à la forme la plus simple d'un N-glycane complexe (Stanley, 2011). De nouvelles antennes peuvent être créées par l'ajout de résidus de GlcNAc, catalysé par des enzymes GlcNAc transférases (GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V et GlcNAcT-VI) permettant l'obtention de structures tri-, tétra-, penta-antennées. Un N-glycane complexe peut ainsi présenter jusqu'à 7 antennes chez les poissons ou les oiseaux mais chez l'Homme les protéines plasmatiques présentent généralement au maximum quatre antennes (Clerc *et al.*, 2016). L'ajout de GlcNAc, en position bissectrice, en β 1-4 sous l'action de la GlcNAcT-III, inhibe l'action des autres GlcNAc transférases et de l' α -mannosidase golgienne II, empêchant ainsi la formation d'autres antennes. La fucosyltransférase-VIII (FUT VIII) peut engendrer la fucosylation du GlcNAc proximal en α 1-6. Les antennes sont ensuite allongées par ajout de Gal, LacNAc, Fuc ou encore Neu5Ac dans le *trans*-Golgi. On retrouve le plus souvent des antennes $\text{Neu5Ac}(\alpha$ 2-6) $\text{Gal}(\beta$ 1-4) GlcNAc sur les N-glycoprotéines sécrétées.

✓ **Type hybride** : comme pour les glycanes complexes, la maturation commence par la formation de l'intermédiaire $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ dans le *cis*-Golgi. Les structures hybrides sont présentes lorsque les mannosidases II n'ont pas retiré certains ou tous les résidus Man de la branche α 1-6 mannosidique. Ce phénomène est favorisé lors de l'ajout d'un GlcNAc en position bissectrice. L'antenne de la branche α 1-3 peut être allongée par l'ajout de résidus Gal ou Neu5Ac. La fucosylation du GlcNAc proximal peut également avoir lieu.

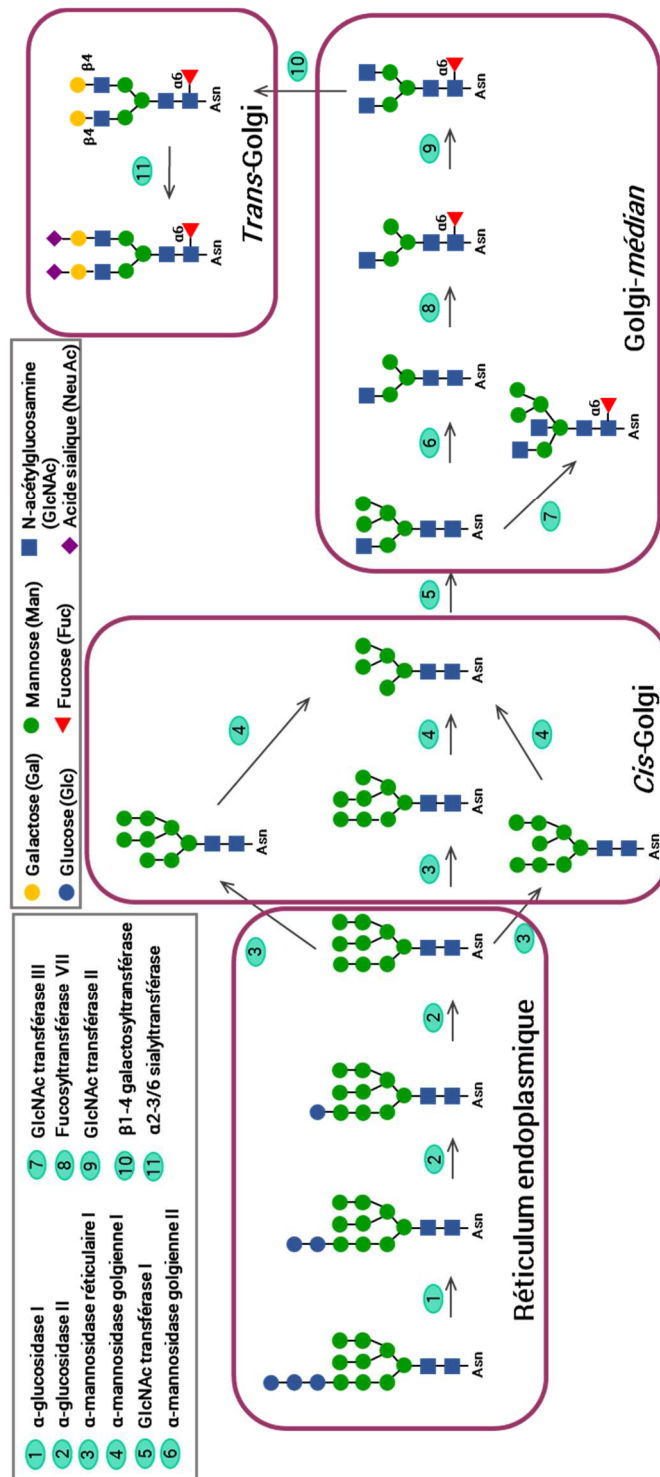


Figure 12 : Biosynthèse des N-glycanes dans le RE et leur maturation dans l'appareil de Golgi adapté de (Nairn et al., 2012)

Ce processus de biosynthèse explique la présence d'un noyau pentasaccharidique commun à tous les N-glycanes. Lorsque la maturation est achevée, les glycoprotéines sont alors secrétées.

II.2. Biosynthèse des O-glycanes

Contrairement aux N-glycanes, la biosynthèse des O-glycanes repose sur l'action séquentielle d'un ensemble de glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi au lieu d'impliquer le transfert d'un précurseur oligosaccharidique déjà formé dans le RE. Dans le cas des O-glycanes de type mucine, la biosynthèse débute par l'addition d'un résidu GalNAc sur le site de glycosylation (Ser ou Thr) grâce à un donneur UDP-GalNAc et elle est catalysée par des transférases qui sont tissu-spécifiques (Ten Hagen *et al.*, 2003). Cet ajout donne naissance à une structure appelée antigène Tn (GalNAc α -Ser/Thr). La structure va alors évoluer par l'ajout d'autres monosaccharides (Gal, GlcNAc et Fuc) sous l'action de plusieurs transférases (différentes de celles employées pour la biosynthèse des N-glycanes) dans le Golgi *médian* et le *trans*-Golgi pour former les 8 motifs vus précédemment (Wopereis *et al.*, 2006).

L'élongation des motifs 1 et 2 peut alors suivre plusieurs voies pour former d'autres motifs antigéniques terminaux des systèmes ABO ou Lewis par exemple (Figure 13) (Steen *et al.*, 1998). Par exemple la sialylation et la sulfatation empêchent une élongation supplémentaire et se traduisent par des chaînes O-glycaniques acides courtes. Les résidus de GlcNAc libres, comme sur les motifs de type 2 et 4, sont préférentiellement allongés par des résidus Gal et peuvent donner des chaînes LacNAc.

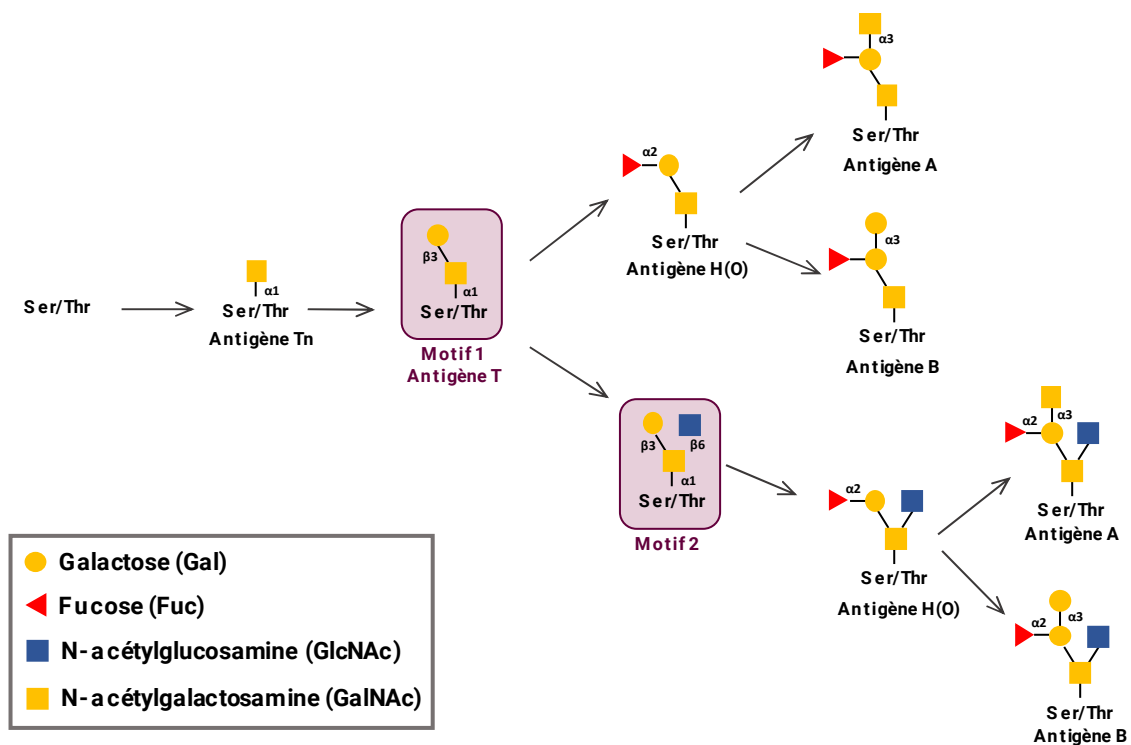


Figure 13 : Synthèse et maturation des O-glycanes et formation des motifs antigéniques du système ABO adapté de (Nairn *et al.*, 2012)

III. Rôle des glycanes des glycoprotéines

Pour la plupart des glycoprotéines, le volume moléculaire occupé par les glycanes est très grand voir aussi important que celui occupé par la protéine. De plus, les glycanes ne sont pas des structures rigides mais bénéficient d'une grande mobilité et leurs conformations changent rapidement (Figure 14). Ainsi les glycanes représentent une part très importante de la surface des glycoprotéines et peuvent influencer leurs propriétés physico-chimiques mais aussi leurs fonctions biologiques (Voet *et al.*, 2016).

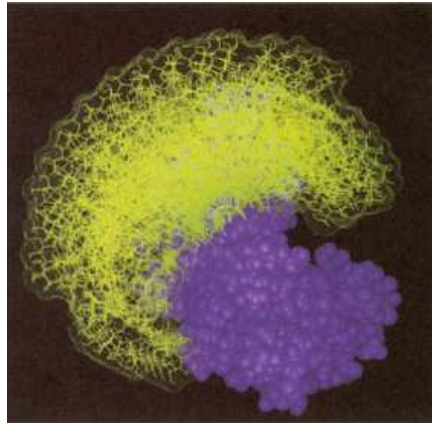


Figure 14 : Différentes conformations du glycanes (jaune) de la ribonucléase B (partie peptidique en violet) représentées à partir d'instantanés superposés d'après (Dwek, 1995)

III.1. Effets sur les propriétés physico-chimiques des glycoprotéines

De par leur caractère hydrophile, les glycanes augmentent la solubilité des protéines et permettent de limiter leur agrégation (Berger *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2006; Shental-Bechor & Levy, 2009). En effet, si certaines protéines se retrouvent sous leurs formes non-glycosylées, elles peuvent s'agréger au niveau des acides aminés hydrophobes présents à leur surface. Par exemple, dans le cas de la protéine du Prion, la formation de fibrilles est limitée par la présence d'un glycanes sur l'Asn⁸¹. Les glycanes stabilisent un pont disulfure intra-chaîne et provoquent un encombrement stérique qui empêche l'association avec d'autres protéines du Prion sous la forme de feuillets β (Rudd *et al.*, 2002).

De plus, la présence de glycanes permet également de maintenir la conformation de la protéine car ils aident au repliement de la chaîne polypeptidique en stabilisant certaines structures secondaires (Walsh & Jefferis, 2006). Cette mise en conformation facilite la sécrétion de certaines protéines.

La glycosylation des protéines entraînerait une meilleure résistance à la dénaturation thermique grâce à la contraction des liaisons hydrogènes avec certains acides aminés polaires ou certains résidus provenant de glycanes voisins. Cela se traduit par une diminution de la température de dénaturation de la protéine lorsque celle-ci est partiellement ou complètement déglycosylée (Wang *et al.*, 1996). De nombreux exemples ont été décrits tels que l'érythropoïétine (EPO), l'alpha-1 antitrypsine (α -AAT) ou encore l'interféron- β (Solá & Griebenow, 2009).

La présence de glycanes à la surface de la protéine semble également efficace pour participer à la protection des glycoprotéines contre l'action de protéases en masquant les potentiels sites de clivage (Berger *et al.*, 2011; Van Veen *et al.*, 2004).

Ainsi, la glycosylation semble permettre un bon repliement des protéines tout en assurant leur stabilité (Freeze, 2006) mais les glycanes jouent également un rôle sur l'activité biologique des protéines et cellules.

III.2. Effets sur les fonctions biologiques et immunologiques des glycoprotéines

Les glycanes peuvent avoir un rôle sur l'activité biologique des protéines en fonction de leur position par rapport aux sites impliqués dans l'activité biologique. Les glycanes peuvent ainsi promouvoir ou au contraire limiter les liaisons intramoléculaires, comme les interactions hydrogènes ou électrostatiques entre les oligosaccharides et la surface de la protéine. Cela peut entraîner la modification des structures secondaire et tertiaire impliquées dans l'activité de la glycoprotéine avec un effet positif si l'activité est favorisée ou négatif si elle est diminuée à cause d'une gêne stérique (Figure 15).

De plus, les glycanes peuvent entraîner un recouvrement des sites antigéniques à la surface de la protéine provoquant une modification de la reconnaissance antigène-anticorps par effet stérique ou par interactions avec les charges des acides sialiques. Ainsi, par exemple, les nombreux O-glycanes des mucines masquent les motifs antigéniques et les glycanes peuvent même engendrer eux-mêmes une réponse immunitaire (Walsh & Jefferis, 2006).

Les glycanes se trouvant à la surface des cellules sont responsables des interactions de ces dernières avec leur environnement que ce soit avec une cellule, des anticorps, des virus ou des bactéries (Saxon & Bertozzi, 2001). En effet, les glycanes sont responsables de la reconnaissance cellule-cellule et peuvent promouvoir ou au contraire inhiber des interactions homotypiques ou hétérotypiques. Ainsi, de très nombreuses interactions cellulaires sont régulées par cette reconnaissance des motifs glycaniques (Figure 15) (Ohtsubo & Marth, 2006). Ils peuvent notamment être reconnus spécifiquement par des « glycan-binding proteins » (GBPs) comme les lectines, les selectines ou encore les galectines lors de différents processus biologiques : adhésion cellulaire, croissance et différenciation cellulaire, apoptose, et inflammation (Varki & Lowe, 2009). Ils peuvent également intervenir dans la signalisation cellulaire ou la réponse au stress (Alley *et al.*, 2013).

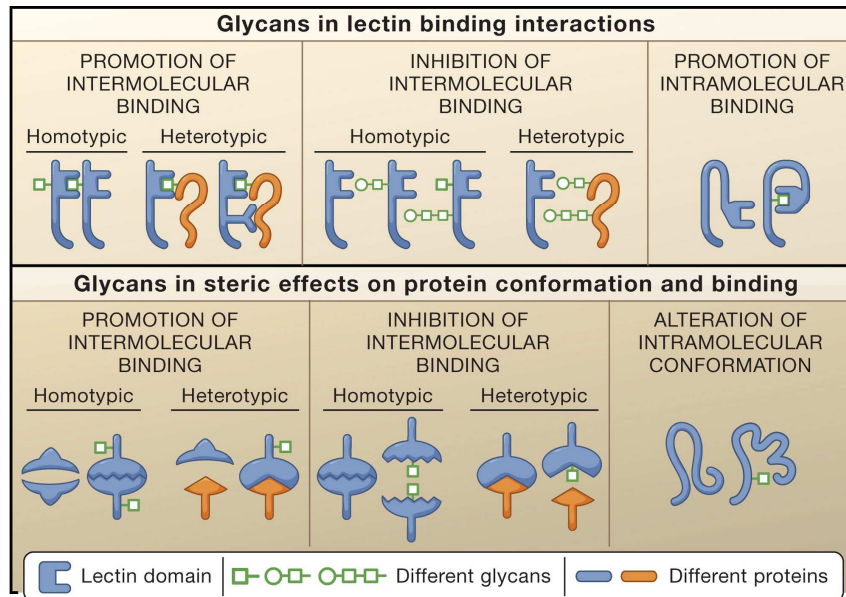


Figure 15 : Phénomènes de promotion ou d'inhibition des interactions homotypiques et hétérotypiques sur les lectines et les effets stériques d'après (Ohtsubo & Marth, 2006)

Malgré sa fréquence élevée, la glycosylation reste un phénomène très complexe. En effet, ce processus implique une succession d'étapes et nécessite de nombreux intermédiaires qui génèrent une multitude de glycoformes dues aux grandes macro et micro-hétérogénéités des glycanes engendrée par des différences de degré de sialylation, la présence de fucosylation, nombre d'antennes, nature des monosaccharides, type de liaisons impliquées et le nombre de sites potentiels de glycosylation. Les glycanes remplissent des rôles très importants que ce soit au niveau des propriétés physico-chimiques des glycoprotéines ou de leurs activités biologiques. Ils sont notamment responsables des mécanismes d'interactions cellule-cellule mais aussi de reconnaissance de certains virus ou bactéries. Le moindre blocage ou défaut lors d'une des étapes de la glycosylation pourra alors avoir de lourdes conséquences en privant la glycoprotéine de son activité. Ainsi, il semble que la glycosylation puisse être un bon indicateur de pathologies puisque celles-ci peuvent être associées à des anomalies de glycosylation. La mise en évidence de ces anomalies nécessite le développement d'outils analytiques puissants permettant à la fois leur détection et leur identification. Les méthodes d'analyse de la glycosylation déjà décrites dans la littérature seront présentées dans le deuxième chapitre bibliographique.

Références bibliographiques – Chapitre I

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430–2437. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.04.001>
- Alley, W. R., Mann, B. F., Novotny, M. V., & Novotny, M. V. (2013). High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins. *Chemical Reviews*, 113(4), 2668–2732. <https://doi.org/10.1021/cr3003714>
- Andreas Löffler, ‡, Marie-Agnès Doucey, ‡, Anita M. Jansson, §, Dieter R. Müller, I, Tonny de Beer, †, Daniel Hess, ‡, ... Jan Hofsteenge*, ‡. (1996). Spectroscopic and Protein Chemical Analyses Demonstrate the Presence of C-Mannosylated Tryptophan in Intact Human RNase 2 and Its Isoformst. <https://doi.org/10.1021/BI9610515>
- Apweiler, R., Hermjakob, H., & Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), 4–8. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00165-8)
- Berger, M., Kaup, M., & Blanchard, V. (2011). Protein Glycosylation and Its Impact on Biotechnology. In *Genomics and Systems Biology of Mammalian Cell Culture* (pp. 165–185). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2011_101
- Bjoern, S., Foster, D. C., Thim, L., Wiberg, F. C., Christensen, M., Komiyama, Y., ... Kisiel, W. (1991). Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11051–11057. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1904059>
- Breitling, J., & Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), a013359. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013359>
- Brockhausen, I., Schachter, H., & Stanley, P. (2009). *O-GalNAc Glycans. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301232>
- Burda, P., & Aebi, M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1426(2), 239–257. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00127-5)
- Clerc, F., Reiding, K. R., Jansen, B. C., Kammeijer, G. S. M., Bondt, A., & Wuhler, M. (2016). Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconjugate Journal*, 33(3), 309–343. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9626-2>
- Cummings, R. D. (2009). The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular BioSystems*, 5(10), 1087–1104. <https://doi.org/10.1039/b904729h>
- de Beer, T., Vliegenthart, J. F. G., Loeffler, A., & Hofsteenge, J. (1995). The Hexopyranosyl Residue That Is C-Glycosidically Linked to the Side Chain of Tryptophan-7 in Human RNase Us Is .alpha.-Mannopyranose. *Biochemistry*, 34(37), 11785–11789. <https://doi.org/10.1021/bi00037a016>
- Dwek, R. A. (1995). Glycobiology: more functions for oligosaccharides. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5228), 1234–1235. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7652569>
- Endo, T. (1999). O-Mannosyl glycans in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), 237–246. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00182-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00182-8)
- Esko, J. D., & Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(5), 663–670. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(96\)80034-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80034-0)
- Franchini, M., & Bonfanti, C. (2015). Evolutionary aspects of ABO blood group in humans. *Clinica Chimica Acta*, 444, 66–71. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2015.02.016>
- Freeze, H. H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 537–551. <https://doi.org/10.1038/nrg1894>
- Freeze, H. H., Hart, G. W., & Schnaar, R. L. (2015). *Glycosylation Precursors. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.005>
- Hang, H. C., & Bertozzi, C. R. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5021–5034. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2005.04.085>
- Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T., & Hayakawa, T. (2005). Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS. *Glycobiology*, 15(5), 447–462. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwi033>

- Harper, H. A. (1911-1988), Bender, D. A. ., Botham, K. M. ., Kennelly, P. J. ., Rodwell, V. W. ., Weil, P. A., & Domenjoud, L. (2017). *Biochimie de Harper*. Retrieved from <https://books.google.fr/books?id=2CM2DwAAQBAJ&pg=PA572&dq=lectines+sucre&hl=fr&sa=X&ved=0ahUK EwiE2KT37J7dAhXHJVAKHUejDxcQ6AEILjAB#v=onepage&q=lectines sucre&f=false>
- Harris, R. J., & Spellman, M. W. (1993). O-Linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology*, *3*(3), 219–224. <https://doi.org/10.1093/glycob/3.3.219>
- Hart, G. W., Housley, M. P., & Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, *446*(7139), 1017–1022. <https://doi.org/10.1038/nature05815>
- Hebert, D. N., & Molinari, M. (2007). In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases. *Physiological Reviews*, *87*(4), 1377–1408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2006>
- Helenius, J., Ng, D. T. W., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A., & Aebi, M. (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature*, *415*(6870), 447–450. <https://doi.org/10.1038/415447a>
- Hema, T., Christlet, T., & Veluraja, K. (2001). Database Analysis of O-Glycosylation Sites in Proteins. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1301293/pdf/11159462.pdf>
- Hofmann, J., & Pagel, K. (2017). Glycan Analysis by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, *56*(29), 8342–8349. <https://doi.org/10.1002/anie.201701309>
- Hofsteenge, J., Mueller, D. R., de Beer, T., Loeffler, A., Richter, W. J., & Vliegthart, J. F. G. (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry*, *33*(46), 13524–13530. <https://doi.org/10.1021/bi00250a003>
- Kehry, M., Sibley, C., Fuhrman, J., Schilling, J., & Hood, L. E. (1979). Amino acid sequence of a mouse immunoglobulin mu chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(6), 2932–2936. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/111247>
- Khoury, G. A., Baliban, R. C., & Floudas, C. A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, *1*. <https://doi.org/10.1038/srep00090>
- Kornfeld, R., & Kornfeld, S. (1985). Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, *54*(1), 631–664. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.003215>
- Krasnova, L., & Wong, C.-H. (2016). Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *85*(1), 599–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034420>
- Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., & Hofsteenge, J. (1998). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Molecular Biology of the Cell*, *9*(2), 301–309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450956>
- Laine, R. A. (1994). Invited Commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the *Isomer Barrier* to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, *4*(6), 759–767. <https://doi.org/10.1093/glycob/4.6.759>
- Lowe, J. B., & Marth, J. D. (2003). A Genetic Approach to Mammalian Glycan Function. *Annual Review of Biochemistry*, *72*(1), 643–691. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161809>
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. C., & Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(3), 156–163. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2006.01.003>
- Nairn, A. V, Aoki, K., dela Rosa, M., Porterfield, M., Lim, J.-M., Kulik, M., ... Moremen, K. W. (2012). Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(45), 37835–37856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405233>
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, *126*(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.08.019>
- Pearse, B. R., & Hebert, D. N. (2010). Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1803*(6), 684–693. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.10.008>
- Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., & Wormald, M. R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: Implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, *14*(2),

- 103–114. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh008>
- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, *15*(9), 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>
- Rademacher, T. W., Parekh, R. B., & Dwek, R. A. (1988). Glycobiology. *Annual Review of Biochemistry*, *57*(1), 785–838. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004033>
- Rudd, P. M., Merry, A. H., Wormald, M. R., & Dwek, R. A. (2002). Glycosylation and prion protein. *Current Opinion in Structural Biology*, *12*(5), 578–586. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00377-9)
- Rudd, P. M., Woods, R. J., Wormald, M. R., Opdenakker, G., Downing, A. K., Campbell, I. D., & Dwek, R. A. (1995). The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminogen activator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1248*(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00230-E](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00230-E)
- Sasazawa, Y., Sato, N., Suzuki, T., Dohmae, N., & Simizu, S. (2015). C-mannosylation of thrombopoietin receptor (c-Mpl) regulates thrombopoietin-dependent JAK-STAT signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *468*(1–2), 262–268. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.10.116>
- Satomi, Y., Shimonishi, Y., & Takao, T. (2004). N-glycosylation at Asn⁴⁹¹ in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. *FEBS Letters*, *576*(1–2), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.061>
- Saxon, E., & Bertozzi, C. R. (2001). Chemical and Biological Strategies for Engineering Cell Surface Glycosylation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *17*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.1>
- Schachter, H. (2000). The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconjugate Journal*. <https://doi.org/10.1023/A:1011010206774>
- Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, *404*(6779), 770–774. <https://doi.org/10.1038/35008096>
- Shakin-Eshleman, S. H., Spitalnik, S. L., & Kasturi, L. (1996). The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(11), 6363–6366. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.11.6363>
- Shao, L., & Haltiwanger, R. S. (2003). O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, *60*, 241–250. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s000180300019.pdf>
- Shao, L., Luo, Y., Moloney, D. J., & Haltiwanger, R. S. (2002). O-Glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase. *Glycobiology*, *12*(11), 763–770. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwf085>
- Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2009). Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Current Opinion in Structural Biology*, *19*(5), 524–533. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2009.07.002>
- Smythe, C., & Cohen, P. (1991). The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *European Journal of Biochemistry*, *200*(3), 625–631. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16225.x>
- Solá, R. J., & Griebenow, K. (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *98*(4), 1223–1245. <https://doi.org/10.1002/jps.21504>
- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, *12*(4), 43R–56R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>
- Stanley, P. (2011). Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005199>
- Stanley, P., Schachter, H., & Taniguchi, N. (2009). *N-Glycans. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301244>
- Stanley, P., Taniguchi, N., & Aebi, M. (2015). *N-Glycans. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.009>
- Steen, P. Van den, Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (1998). Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(3), 151–208. <https://doi.org/10.1080/10409239891204198>
- Szul, T., & Sztul, E. (2011). COPII and COPI Traffic at the ER-Golgi Interface. *Physiology*, *26*(5), 348–364. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2011>

- Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., & Tabak, L. A. (2003). All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*, *13*(1), 1R–16. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg007>
- Van Veen, H. A., Geerts, M. E. J., Van Berkel, P. H. C., & Nuijens, J. H. (2004). The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, *271*(4), 678–684. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03965.x>
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., ... Seeberger, P. H. (2015). *Essentials of Glycobiology. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27010055>
- Varki, A., & Lowe, J. B. (2009). *Biological Roles of Glycans. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301233>
- Vasconcelos-dos-Santos, A., Oliveira, I. A., Lucena, M. C., Mantuano, N. R., Whelan, S. A., Dias, W. B., & Todeschini, A. R. (2015). Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Frontiers in Oncology*, *5*, 138. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>
- Vasson, M. P., Cynober, L., & Raichvarg, D. (1996). L'alpha-1 glycoprotéine acide (orosomucoïde). *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *10*(3), 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(96\)80022-7](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(96)80022-7)
- Voet, D., Voet, J. G., & Domenjoud, L. (2016). *Biochimie*. De Boeck Supérieur. Retrieved from <https://books.google.hu/books?id=BvNFDgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=biochimie&hl=hu&sa=X&ved=0ahUKEwjB5ZzJ1dXaAhXR6qQKHcNgCFYQ6wEIPTAE#v=onepage&q=biochimie&f=false>
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, *24*(10), 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>
- Wang, C., Eufemi, M., Turano, C., & Giartosio, A. (1996). Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, *35*(23), 7299–7307. <https://doi.org/10.1021/bi9517704>
- Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, É., & Wevers, R. A. (2006, June 1). Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review. *Clinical Chemistry*. Clinical Chemistry. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063040>

Chapitre II : Les méthodes d'analyse de la glycosylation des glycoprotéines

Plusieurs stratégies peuvent être employées pour l'étude de la glycosylation des protéines (Figure 16), chacune apportant des informations complémentaires. La première voie envisageable est l'analyse des glycoprotéines intactes aussi appelée stratégie top-down. Celle-ci permet de distinguer les différentes glycoformes, éventuellement de les caractériser et de déterminer leur distribution. Ne nécessitant pas de préparation d'échantillon complexe, cette technique est rapide et économique. La deuxième stratégie possible, appelée bottom-up, est l'analyse des glycopeptides obtenus après traitement par une endoprotéase. Celle-ci donne accès à des informations supplémentaires sur les sites de glycosylation et son occupation. Cette voie d'analyse est très largement employée, mais elle nécessite plusieurs étapes de préparation d'échantillon telles que la réduction des ponts disulfures, l'alkylation des Cys, la digestion enzymatique et parfois l'enrichissement des glycopeptides obtenus. Ces étapes peuvent être longues et coûteuses et engendrer la perte de certains monosaccharides labiles. L'analyse des glycanes libérés constitue la troisième option pour l'étude de la glycosylation et elle a l'avantage d'être réalisable à haut débit. Elle permet une caractérisation avancée de la structure des glycanes (nature des monosaccharides et le type de liaison les reliant), ainsi que leur composition relative. Cependant, ce type d'analyse induit une perte d'information concernant la macro-hétérogénéité (site de glycosylation) et nécessite également de nombreuses étapes de préparation (libération et dérivatisation des glycanes voire parfois leur enrichissement). Enfin, la dernière voie est l'analyse des monosaccharides mais cette technique est très peu utilisée puisque seule la composition des monosaccharides est déterminée sans aucune donnée sur leur enchaînement. Ces différentes stratégies nécessitent généralement l'emploi de plusieurs techniques analytiques séparatives orthogonales pour obtenir la caractérisation la plus fine possible de la micro-hétérogénéité des glycoprotéines.

Dans ce chapitre, seules les deux voies d'analyse à partir des glycanes libérés et des glycoprotéines intactes seront abordées puisque ces deux stratégies ont été exploitées pour l'étude des glycoformes de l'ApoC-III et l'étude des N-glycanes de fluides biologiques dans la suite dans la partie expérimentale de ce manuscrit. Les exemples cités concerneront à la fois l'analyse de fluides biologiques pour la recherche de biomarqueurs de pathologies mais aussi l'analyse de protéines thérapeutiques. Plus de 40% des produits biopharmaceutiques sont des glycoprotéines (Schiestl *et al.*, 2011), de nombreux outils d'analyse ont été développés pour évaluer leur qualité et ceux-ci pourraient être appliqués à la recherche de biomarqueurs glycosylés.

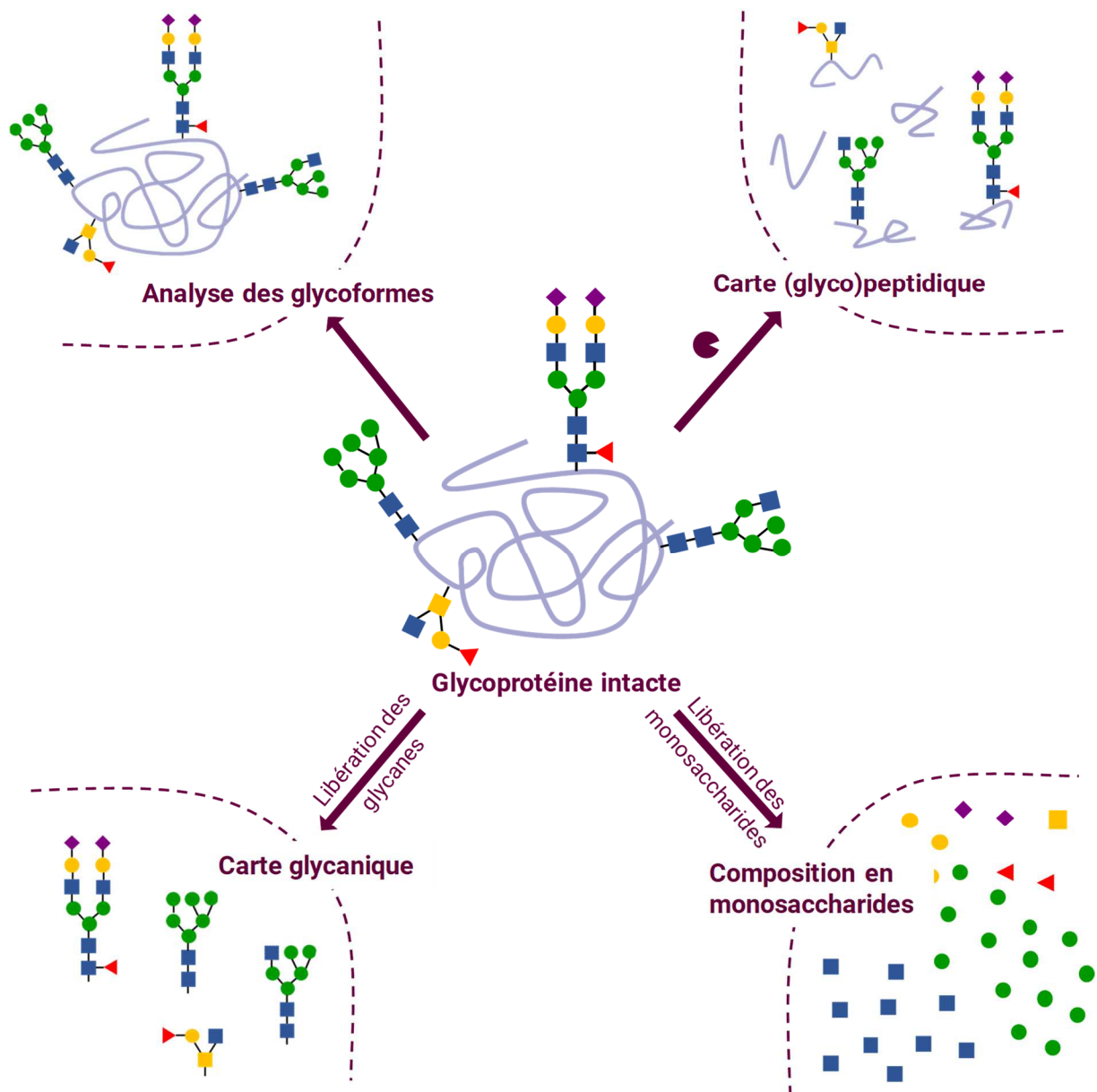


Figure 16 : Différentes voies d'étude de la glycosylation d'une glycoprotéine intacte

I. Analyse des glycoprotéines intactes

L'analyse des glycoprotéines intactes est une stratégie permettant d'obtenir une information globale sur les micro- et macro-hétérogénéités des glycoprotéines sans avoir recours à des préparations d'échantillons longues. Cependant, l'isolement de la protéine d'intérêt peut se révéler complexe. Les plus gros challenges de l'analyse des glycoprotéines intactes dans le cadre de la recherche de nouveaux biomarqueurs consistent à réussir à détecter, caractériser et quantifier des glycoprotéines de faible abondance dans des fluides biologiques complexes. Afin de séparer des structures aussi similaires que des glycoformes, l'emploi d'une méthode analytique disposant d'un grand pouvoir de résolution est indispensable. La technique la plus utilisée est l'électrophorèse capillaire (EC) qui permet d'obtenir des séparations quantitatives avec une excellente reproductibilité et sensibilité. Néanmoins, la nécessité d'avoir une caractérisation structurale avec une identification directe a fait évoluer les méthodes vers des systèmes dits en tandem où la séparation est couplée avec une détection par spectrométrie de masse (*i.e.* EC-SM).

Dans cette partie, seules les méthodes électrophorétiques et de spectrométrie de masse seront détaillées.

I.1. Méthodes électrophorétiques

I.1.1. Electrophorèse sur gel

Les séparations sur gel SDS-PAGE (1D) ou par électrophorèse en deux dimensions (IEF-SDS PAGE) permettent de réaliser une séparation des glycoprotéines selon leur taille ou point isoélectrique. Lors de l'analyse bidimensionnelle d'un échantillon plasmatique, elles sont reconnaissables par l'ensemble de spots alignés visibles, appelés « train », montrant la différence de masse moléculaire et/ou point isoélectrique des différentes glycoprotéines (Figure 17).

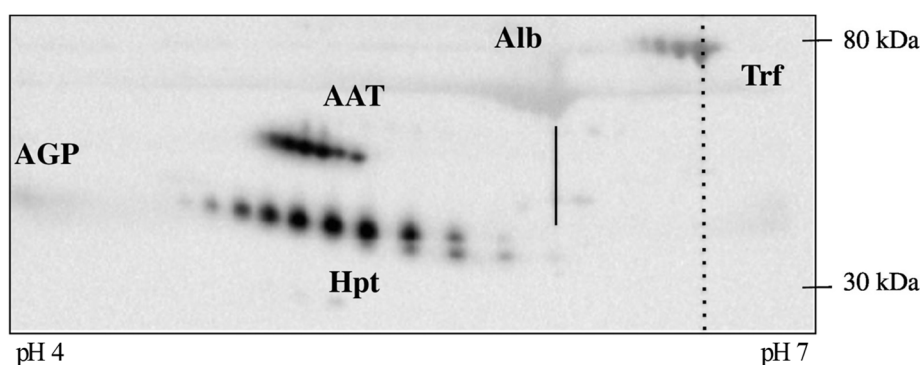


Figure 17: Profil obtenu par électrophorèse sur gel 2D du plasma. Observation de différentes protéines et glycoprotéines plasmatiques (transferrine, Trf; albumine, Alb; alpha-antitrypsine, AAT; alpha-1 glycoprotéine acide, AGP; chaîne β de l'haptoglobuline, Hpt) (Bruneel *et al.*, 2017)

La coloration des spots peut être réalisée avec l'acide périodique de Schiff, un colorant spécifique des sucres mais cette méthode nécessite environ 6h (Keyser, 1964). Afin d'accélérer cette étape de révélation, la coloration a été réalisée à l'aide d'un four à microondes et a permis la coloration de glycoprotéines avec cet acide périodique de Schiff en moins de 10min (Moravec & Mares, 2017). La détection peut également être réalisée via l'affinité des glycoprotéines pour les lectines qui sont marquées par des groupements fluorescent. Des méthodes de détection utilisant des fluorophores dérivés par de l'hydrazine pour marquer des glycoprotéines via une réaction des carbohydrates avant leur séparation sur le gel ont été développées et permettent ainsi de détecter jusqu'à 0,5 ng de protéine (Wang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2014). Cette dérivation avant-séparation permet un gain de temps par rapport à la méthode de révélation post-séparation longue à mettre en œuvre mais qui pourrait modifier la séparation du fait de la présence du fluorophore.

Afin d'améliorer la performance de séparation des glycoformes de glycoprotéines en gel à une dimension, le remplacement du SDS, surfactant anionique, par un surfactant ionique basique a été testé (Vidanapathirana *et al.*, 2017). L'utilisation de bromure de 1-butene-4-méthylpyridinium a en effet permis de séparer en deux bandes distinctes les glycoformes de la ribonucléase B (RNase B) tandis que toutes les autres méthodes PAGE ne montrent qu'une seule bande (Figure 18). Il s'agit donc d'une alternative intéressante dans le cas de l'étude de glycoprotéines intactes.

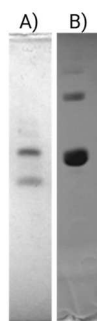


Figure 18 : Comparaison des profils de la RNase B obtenus lors des séparations électrophorétiques sur gel composé de l'agent cationique-PAGE (A) et de SDS-PAGE (B) d'après (Vidanapathirana *et al.*, 2017)

Les méthodes d'électrophorèse en gel 1D ou 2D ont été utilisées comme méthodes de recherche de biomarqueurs de pathologies. En effet, l'IEF de la transferrine sérique (Figure 19) est un test de référence utilisé pour dépister les anomalies congénitales de N-glycosylation (CDGs) (Jaeken *et al.*, 1984; O'Brien, 2005). Le gel permet de montrer les modifications d'abondance des différentes glycoformes de la Tf entre un donneur sain et des patients atteints de CDG. Les gels 2D de plusieurs glycoprotéines sériques telles que l'haptoglobuline, l'ATT et l'AGP (Figure 17) sont également couramment réalisés pour le dépistage des CDGs.

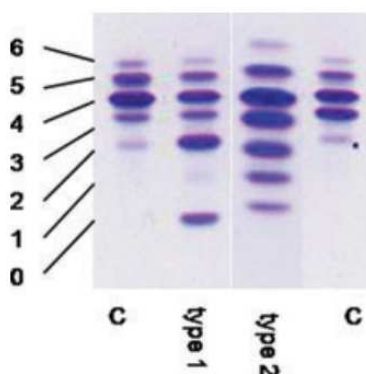


Figure 19 : Isoélectrofocalisation de la transferrine d'un individu sain (colonne C), d'un patient atteint d'un CDG de type 1 (colonne type 1) et d'un patient présentant un CDG de type 2 (colonne type 2). Les chiffres sur la gauche correspondent au nombre d'acides sialiques pour chacune des glycoformes d'après (Jaak Jaeken, 2010a)

I.1.2. Isoélectrofocalisation capillaire

L'isoélectrofocalisation capillaire (IEF_C) est une méthode de séparation qui repose sur la différence de points isoélectriques (pI) des glycoformes notamment à cause de la présence des acides sialiques. Elle permet donc de séparer des glycoformes ayant des masses proches mais des pI différents. Contrairement à l'IEF en gel, cette technique est automatisable, robuste et plus rapide (Rustandi *et al.*, 2013). L'IEF_C nécessite l'utilisation d'une solution complexe contenant un gel d'ampholytes, des marqueurs de pI ainsi que la glycoprotéine à analyser. Lors de la mise sous tension, un gradient de pH se forme au sein de la solution dans le capillaire. Les différentes glycoformes et marqueurs de pI migrent jusqu'à s'immobiliser au pH où leur charge globale devient nulle (c'est-à-dire à leur pI) durant l'étape de focalisation. Cette technique demande beaucoup d'optimisations dont la gamme d'ampholytes, leur concentration, la nature et concentration d'agents de solubilisation pour éviter la précipitation des glycoprotéines, le temps de focalisation. Néanmoins, elle permet d'obtenir une résolution et une efficacité bien plus importante que les séparations IEF en gel.

Cette technique a notamment permis d'étudier la distribution des glycoformes de l' α -glycoprotéine acide (α -AGP), un biomarqueur potentiel du cancer (Lacunza *et al.*, 2007). Une comparaison qualitative et quantitative des profils obtenus pour un donneur sain et des patients atteints de divers cancers montre que les aires relatives des glycoformes plus acides (pics 4, 5 et 6) augmentent tandis que celles des glycoformes plus basiques diminuent (1, 2 et 3) chez les patients atteints des cancers ovarien et lymphome (Figure 20). Ces résultats sont en accord avec d'autres publications où l'hypersialylation et donc une acidification des glycoformes est observée dans plusieurs types de cancers.

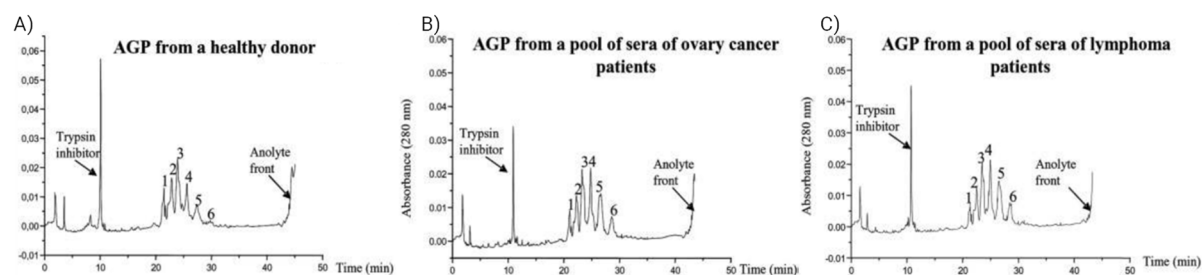


Figure 20 : Comparaison des profils d' α -AGP obtenus par IEF_C pour un donneur sain (A), un mélange de sérum de patients atteints d'un cancer des ovaires (B) et d'un lymphome (C) d'après (Lacunza *et al.*, 2007)

Ce type d'analyse permet donc de pointer des différences de proportions de certaines glycoformes en cas de pathologie. Cependant, aucune information sur la composition de ces glycoformes n'est obtenue et les résultats ne permettent pas d'expliquer les causes de ces modifications.

I.1.3. Electrophorèse capillaire de zone (ECZ)

L'ECZ a été le mode le plus développé pour étudier les glycoprotéines intactes. La séparation repose sur les différences de rapport charge sur volume hydrodynamique ce qui permet de séparer les glycoformes selon la taille de leurs glycanes et le nombre d'acides sialiques qu'ils portent. La séparation des glycoformes est souvent de meilleure qualité lorsque la séparation est réalisée en contre-électroosmose. La résolution sera maximale avec des valeurs de flux électroosmotique (μeo) proche de celles des mobilités électrophorétiques (μep) des glycoformes. Dans ces conditions, le contrôle du flux électroosmotique (FEO) est indispensable. L'emploi de tampon de séparation à base de borate semble aussi assurer des séparations de qualité à pH alcalin grâce à la complexation des groupements cis-diols des glycanes avec le borate (Hoffstetter-Kuhn *et al.*, 1991). En effet, les carbohydrates n'ont pas de charge mais ils peuvent former des complexes anioniques stables en présence de tampon borate alcalin ($8 < \text{pH} < 12$). La mobilité du complexe sera alors différente pour les différents oligosaccharides permettant ainsi de séparer les différentes glycoformes (Chen *et al.*, 2009; Galeotti *et al.*, 2014; Yodoshi *et al.*, 2013). Les groupements hydroxyles sont ionisés à un pH > 10 , l'amélioration de la séparation en tampon borate serait donc en partie attribuée à cette ionisation.

Le point le plus critique dans ce type de séparation est l'adsorption de la protéine sur la paroi du capillaire. Pour éviter cette limitation, plusieurs stratégies sont envisageables avec l'objectif est de recouvrir les silanols ionisés du capillaire. Il est possible d'utiliser des revêtements permanents (où le polymère est lié de façon covalente au capillaire), des revêtements statiques (rinçage du capillaire avec

une solution de polymère entre chaque analyse) ou dynamiques (ajout de polymère dans le tampon de séparation). Ils permettent alors de contrôler l'état de surface du capillaire et donc le flux électroosmotique généré. Dans le cas de l'analyse de glycoformes, le type de revêtement permanent le plus employé est neutre (alcool polyvinylique PVA ; polyacrylamide PAA ; polyéthylène oxyde PEO) (Gupta *et al.*, 2011; Zhang & Hage, 2016) et influence fortement sur le profil observé (Figure 21). La combinaison de revêtements statique et dynamique (PEO et PEO dans la Figure 21) s'avère parfois nécessaire pour améliorer la résolution entre les glycoformes (Zhang & Hage, 2016).

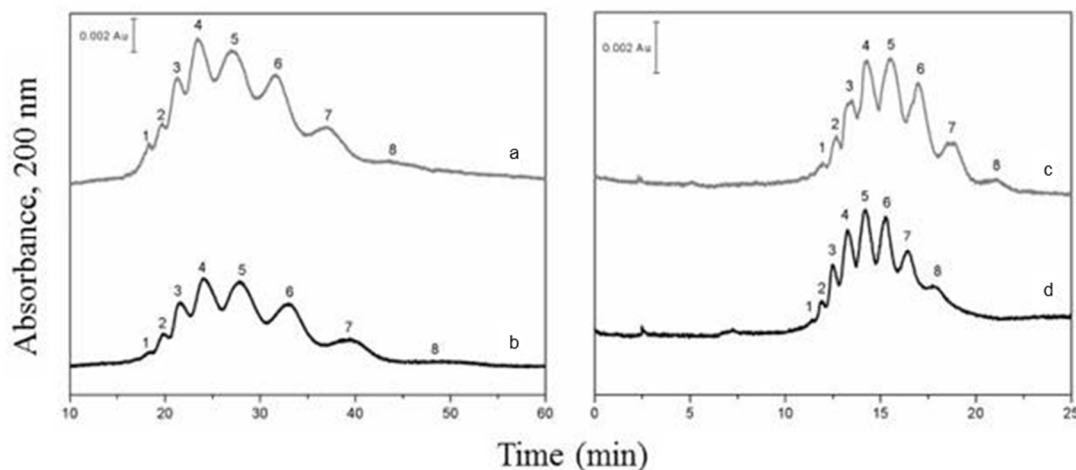


Figure 21 : profils observés en ECZ pour la séparation des glycoformes de l' α -GPA avec des capillaires modifiés par un revêtement PVA statique (R_s : 0.53-0.74) (a), des revêtements PVA statique et dynamique (R_s : 0.41-0.84) (b), un revêtement PEO statique (R_s : 0.71-0.95) (c), des revêtements PEO statique et dynamique (R_s : 0.44-1.05) (d) d'après (Chenhua Zhang & Hage, 2016)

Pour améliorer la résolution entre les glycoformes, l'ajout d'additifs dans le tampon de séparation est généralement conseillé (Lucy *et al.*, 2008). Les alkylamines comme la putrescine ou la cadaverine permettent de diminuer la μ_{eo} et de réduire l'adsorption sur les parois du capillaire par association avec la surface du capillaire en recouvrant les silanols (Figure 22B) (Alahmad *et al.*, 2010; European Pharmacopeia 9.0 European Directorate for the Quality of Medicines Council of Europe, 2008). L'emploi de chaotropes, tels que l'urée, permet le dépliement de la protéine par rupture des liaisons non-covalentes ce qui permet de rendre les charges davantage apparentes et améliore la résolution (Figure 22C) (European Pharmacopeia 9.0 European Directorate for the Quality of Medicines Council of Europe, 2008; Farina-Gomez *et al.*, 2016).

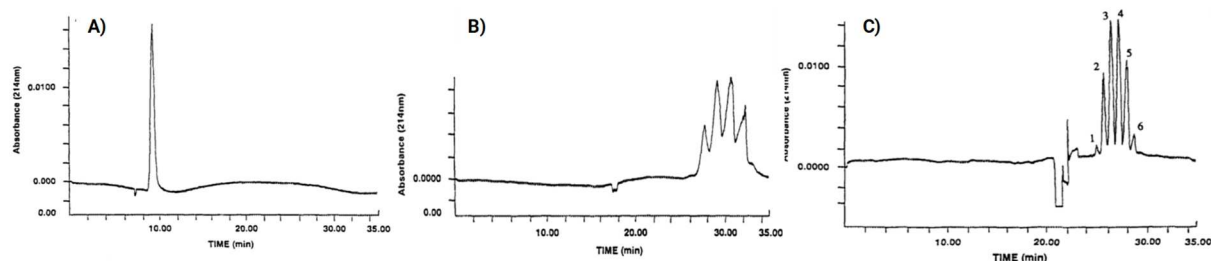


Figure 22 : Profil de l'analyse d'érythropoïétine humaine recombinante (A) et influence de l'ajout de 2,5 mM de putrescine (B) et de la combinaison de 2,5 mM de putrescine et de 7M d'urée (Watson & Yao, 1993)

Enfin, des recouvrements du capillaire à base de surfactants non-ioniques comme le Brij 35, Triton X-100 et Tween-20 diminuent modérément la μ_{eo} ce qui entraîne une amélioration de la résolution (Zhang & Hage, 2016) (Figure 23).

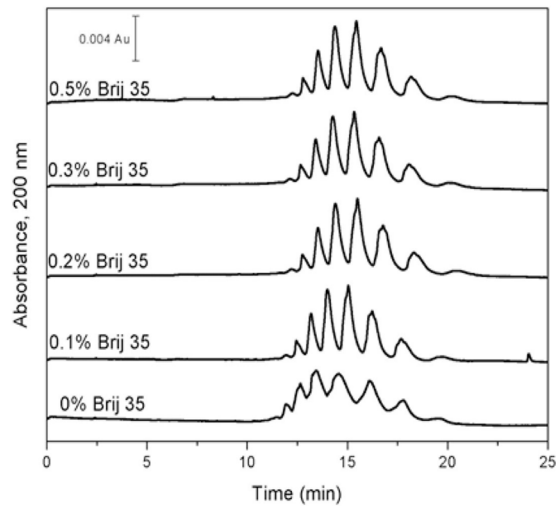


Figure 23 : Influence de la concentration de Brij 35 dans le tampon de séparation sur la résolution des glycoformes de l' α -AGP en ECZ d'après (Chenhua Zhang & Hage, 2016)

De telles séparations nécessitent également une optimisation minutieuse des rinçages entre chaque analyse mais aussi du préconditionnement préliminaire du capillaire neuf afin d'assurer la robustesse de la méthode (Alahmad *et al.*, 2009; Farina-Gomez *et al.*, 2016).

Si la glycoprotéine étudiée est très peu abondante, ce qui est le cas des biomarqueurs, une dérivation par fluorescence permettant une détection par LIF est envisageable afin d'améliorer la sensibilité. Ainsi, la dérivation en ligne au sein du capillaire avec le fluorophore Chromeo P503[®] a permis de garder une très bonne résolution entre les différentes glycoformes de l'antigène spécifique à la prostate (PSA à 0,5 mg/mL) et ne nécessite que 45s pour réaliser le marquage (Garrido-Medina *et al.*, 2013).

L'ECZ est une technique permettant de séparer les glycoformes avec une excellente résolution. Cependant, cette méthode est majoritairement employée pour le contrôle qualité de protéines thérapeutiques même si quelques applications spécifiques pour l'étude de biomarqueurs existent. Par exemple, l'ECZ est devenue une méthode de référence pour quantifier les différentes glycoformes de la transferrine sanguine (numérotées de 0 à 6) pour le dépistage de l'alcoolisme chronique (Caslavska & Thormann, 2018). En effet une altération du profil est observée lors d'une surconsommation d'alcool avec une augmentation des pics 0 et 2 et une diminution des pics 3 et 4 par rapport à un individu sain (Figure 24)

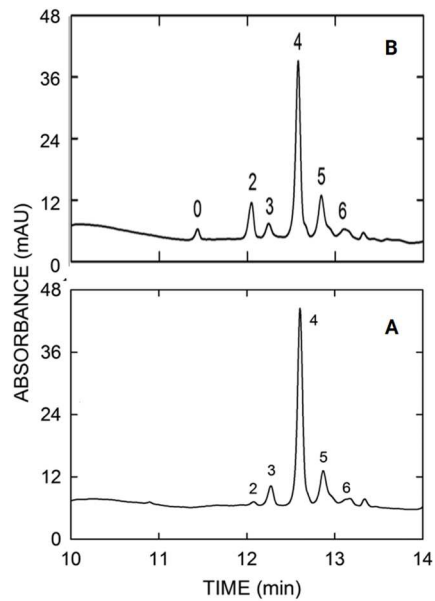


Figure 24 : Profils obtenus pour l'analyse CZE de la transferrine pour un donneur sain (A) et un patient alcoolique chronique (B) d'après (Caslavská & Thormann, 2018)

I.1.4. Electrophorèse capillaire avec détection par spectrométrie de masse (EC-SM)

Les développements récents concernant l'analyse des protéines intactes par EC-SM sont donnés dans le chapitre de livre intitulé « Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a powerful tool to investigate heterogeneities, conformers and oligomers of intact proteins » actuellement sous presse et qui sera publié dans le Volume 56 de la série *Advances in Chromatography*. Ce chapitre m'a donné l'occasion de rédiger la partie du travail focalisée sur la littérature présentant les développements de méthodes d'EC-SM pour l'analyse des modifications post-traductionnelles des protéines intactes. Ce chapitre présenté en Annexe 1 et un résumé des développements d'EC-SM concernant la glycosylation est présenté ici.

Afin d'obtenir une caractérisation fine de la composition des glycoformes, l'emploi d'un couplage avec une détection par SM permettant l'identification des espèces peut être développé. L'analyse des glycoprotéines intactes par EC-SM est un challenge car il faut réussir à éviter les phénomènes d'adsorption sur la paroi du capillaire tout en offrant une résolution maximale avec des tampons de séparation volatils et à faible concentration. Ainsi, pour atteindre ces deux objectifs, les analyses sont généralement réalisées dans des capillaires ayant des revêtements neutres permanents ou semi-permanents en combinaison avec un tampon de séparation volatil et à pH acide pour favoriser l'ionisation. Avec ces revêtements, l'adsorption est réduite et le flux électroosmotique (FEO) est contrôlé (proche de zéro) ce qui permet aux glycoformes de migrer selon leurs propres mobilités électrophorétiques assurant ainsi une résolution maximale.

Plusieurs types de revêtements ont été développés pour l'analyse de glycoprotéines thérapeutiques intactes par EC-SM mais qui peuvent être utilisés pour des glycoprotéines biomarqueurs de pathologie. C'est le cas du revêtement triple couche constitué de polybrène (PB) et de dextran sulfate (DS) PB-DS-PB développé par Haselberg *et al.*, pour l'étude de l'hétérogénéité des glycoformes de l'interféron β -1a recombinante (rhIFN- β) (Haselberg *et al.*, 2011). Ce revêtement a

permis la détection de 10 glycoformes, différant par leur nombre d'acide sialique ou d'hexose. Or, seules 6 glycoformes sont détectées dans la monographie de la Pharmacopée Européenne (European Pharmacopoeia 9.5, 2018). Ce revêtement présente donc de bonnes performances et a permis de réaliser le contrôle qualité de différents lots de rhIFN- β . Par ailleurs, l'utilisation d'un capillaire avec un revêtement en polyacrylamide avec une nouvelle interface sans liquide additionnel (sheath-less) a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode avec une détection de 18 glycoformes de rhIFN- β à une concentration en rhIFN- β 10 fois plus faible que la méthode employant du liquide additionnel (Figure 25) (Haselberg *et al.*, 2013). L'augmentation du nombre de glycoformes détectées est due à la combinaison de l'amélioration de la résolution observée grâce à l'emploi d'un capillaire neutre et d'une grande sensibilité apportée par la source nanoélectrospray (nanoESI). Cette méthode améliore également la limite de détection (ordre du picomolaire). Une dernière étude réalisée avec un revêtement en polyéthylèneimine réticulé offrant une très grande efficacité (entre 350000 et 450000 plateaux théoriques) a permis la séparation de deux isomères de position du rhIFN- β (position d'acide sialique sur un N-glycane bi-antenné ou position de la troisième antenne d'un N-glycane tri-antenné) (Bush *et al.*, 2016).

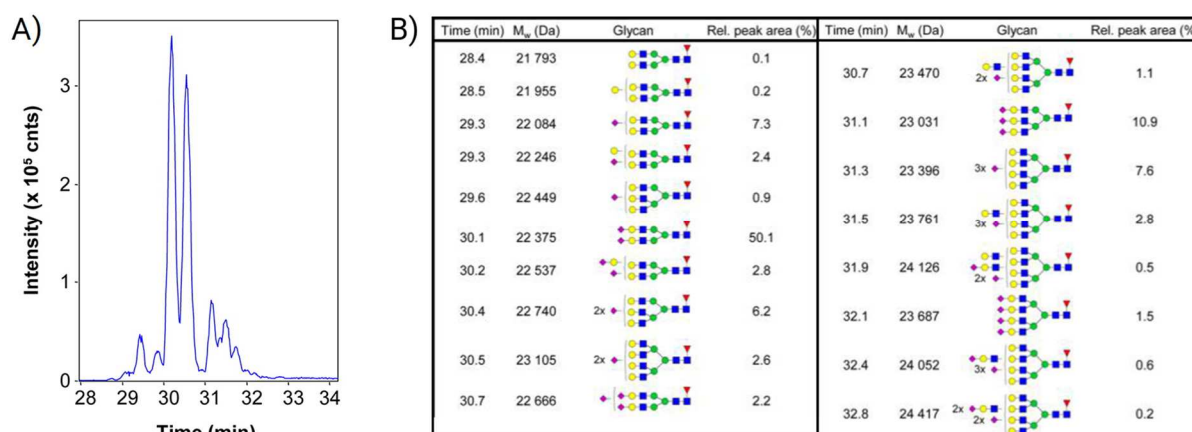


Figure 25 : BPE de l'analyse de rhIFN- β (45 μ g/mL) par EC-SM (A) et tableau décrivant l'ensemble des glycanes des glycoformes détectées par EC-SM avec leurs temps de migration, leurs masses, leurs structures et leurs aires relatives (B).

L'étude de l' α -GPA en tant que biomarqueur potentiel du cancer a été réalisée à l'aide d'un capillaire avec un revêtement chargé positivement (copolymère acrylamide-méthacrylate de pyrrolidine DMA-EPyM)(Ongay & Neusüß, 2010). Ce revêtement a permis de séparer les glycoformes selon le nombre d'acides sialiques, de fucoses et d'hexosamines qu'elles présentent. La comparaison de 16 patients a montré la grande variabilité de l'expression de l' α -GPA humaine ainsi que de la variation des proportions de ses différentes glycoformes. Il a également été utilisé pour comparer des patients atteints d'un cancer de la rate à des individus sains. Des analyses statistiques ont montré que les deux groupes pouvaient être distingués par l'augmentation de formes fucosylées tri- et tétra-antennées et une diminution des glycoformes non-fucosylées tri- et tétra-antennées chez les patients atteints de cancer.

Les méthodes électrophorétiques présentent donc un intérêt certain pour l'analyse de glycoprotéines intactes. Les techniques en gel sont de moins en moins employées car elles ne permettent pas une résolution suffisante et sont longues à mettre en œuvre, au profit des techniques en format capillaire qui offrent de meilleures efficacité et résolution. L'IEF_C est très résolutive (séparation de 0,1 unité de pH) mais n'informe pas sur la composition des glycanes. Des

développements récents de couplage de IEF_C avec la SM ont été présentés pour l'analyse de peptides ou de protéines, mais aucune application à des glycoprotéines n'a encore été rapportée (Dai *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Ce couplage reste très complexe et peu répandu. L'ECZ est une méthode de choix pour la séparation de structures très proches. Couplée à la SM, elle permet de caractériser la composition chimique des glycoformes, information très importante lors de la recherche de biomarqueurs. Cependant, les méthodes EC-SM présentent généralement des résolutions inférieures aux méthodes EC-UV du fait de l'utilisation de tampons volatils et de l'impossibilité de trouver des additifs compatibles à la SM. Ainsi, si la séparation d'isomères est un des objectifs, l'utilisation d'une détection UV sera plutôt conseillée.

I.2. Méthodes de spectrométrie de masse

L'analyse par SM des glycoprotéines intactes est très complexe du fait de leur micro-hétérogénéité importante, rendant ainsi les spectres de masse difficiles à interpréter. De plus les glycoprotéines sont plus difficilement ionisables que les protéines non-glycosylées du fait de leur plus grande hydrophilie qui engendre une désolvatation moins efficace (Frost & Li, 2014). Cependant, cet outil donne beaucoup d'informations puisqu'il est possible de déterminer la masse de la glycoprotéine entière ainsi que d'observer ses différentes isoformes. L'analyse par SM des glycoprotéines est essentiellement réalisée grâce à deux sources d'ionisation, la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'électrospray (ESI), selon la taille de la glycoprotéine en question (Figure 26).

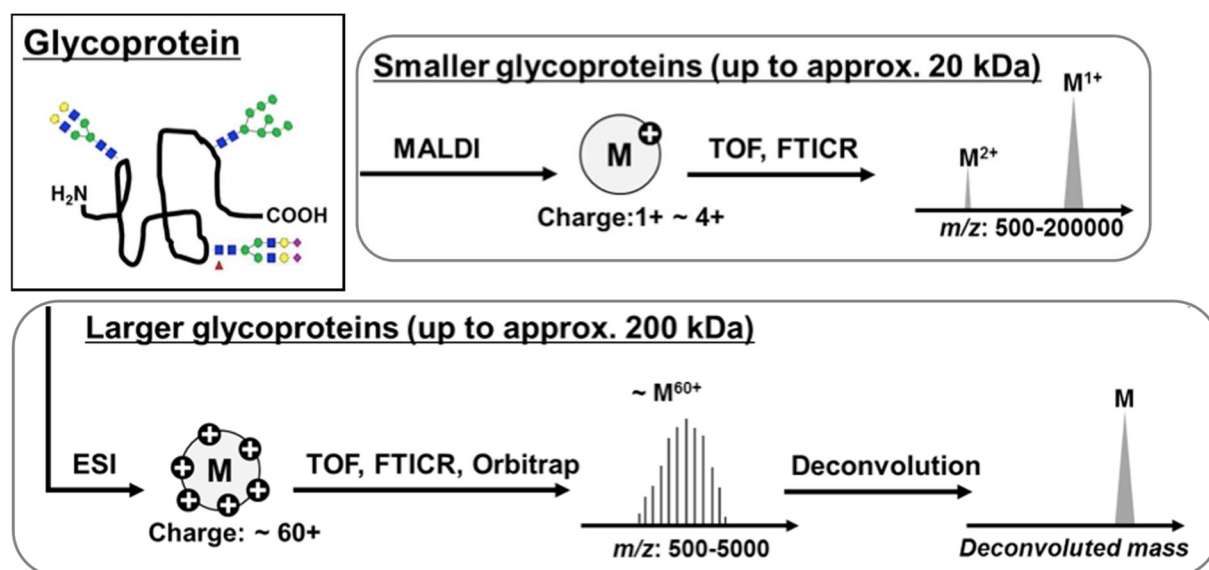


Figure 26 : Les différentes voies d'analyse des glycoprotéines intactes par spectrométrie de masse selon leur taille adapté de (Yamamoto *et al.*, 2016)

I.2.1. Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La préparation d'échantillon est simple. L'échantillon est mélangé à une solution de matrice, de nature cristallisable avec un caractère aromatique absorbant en UV, l'ensemble est ensuite déposé sur une cible. En séchant, les cristaux de matrice vont envelopper la protéine. Après séchage, la plaque est frappée par un rayon laser dans l'UV, ionisant la matrice. Celle-ci va alors transmettre un ou plusieurs protons à l'échantillon provoquant la désorption et ionisation de celui-ci (Hillenkamp & Karas, 1990; Karas *et al.*, 1987; K. Tanaka *et al.*, 1988).

Le MALDI ne produit quasiment que des ions mono-chargés ou très peu chargés (maximum 4+ pour les plus grosses molécules), ionisés par l'addition d'un proton ($[M+H]^+$) ou cation comme le sodium ($[M+Na]^+$). Le MALDI formant des ions peu chargés, l'utilisation d'analyseurs avec une très large gamme de rapport m/z est nécessaire pour obtenir une résolution satisfaisante. Ainsi l'analyse par MALDI-TOF permet d'obtenir des spectres avec une bonne résolution des glycoformes si la glycoprotéine est assez petite (≤ 40 kDa) avec un nombre limité de glycanes comme la RNase B, l'ovalbumine, l' α -GPA ou l'apoC-III (Giménez *et al.*, 2007, 2010; Yen-Nicolaÿ *et al.*, 2015a).

Ces études ont montré l'importance du choix de la matrice (acide sinapinique, acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) ...) ainsi que de la puissance du laser pour limiter notamment la perte des acides sialiques qui sont très labiles (Giménez *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 2009). Le MALDI peut être appliqué sur des échantillons avec des concentrations « élevées » en sels en comparaison avec les autres types de source d'ionisation. Cependant cette concentration reste critique pour le processus d'ionisation. Si la composition de la chaîne en acides aminés est connue, il est alors possible de déterminer la composition en monosaccharides des glycanes présents. L'avantage du MALDI est la formation d'ions précurseurs monochargés évitant ainsi le recouvrement des différents états de charge de différentes espèces (Nicolardi *et al.*, 2015).

Récemment, l'utilisation d'un analyseur à transformée de Fourier (FTICR) plutôt qu'un TOF a permis d'atteindre une résolution isotopique pour des protéines intactes, notamment la ribonucléase B (RNase B) (Nicolardi *et al.*, 2015). En effet, cette analyse a permis de séparer les 5 glycoformes de la RNase B. Cette glycoprotéine de 17 kDa a un seul site de N-glycosylation et porte des glycanes oligomannosidiques contenant de 5 à 9 résidus mannose (Figure 27). Le pouvoir de résolution moyen de 61000 a permis d'observer une différence de masse de 162,10 Da entre deux ions mono-isotopiques se suivant, écart en parfait accord avec la masse théorique d'un mannose (162,05 Da).

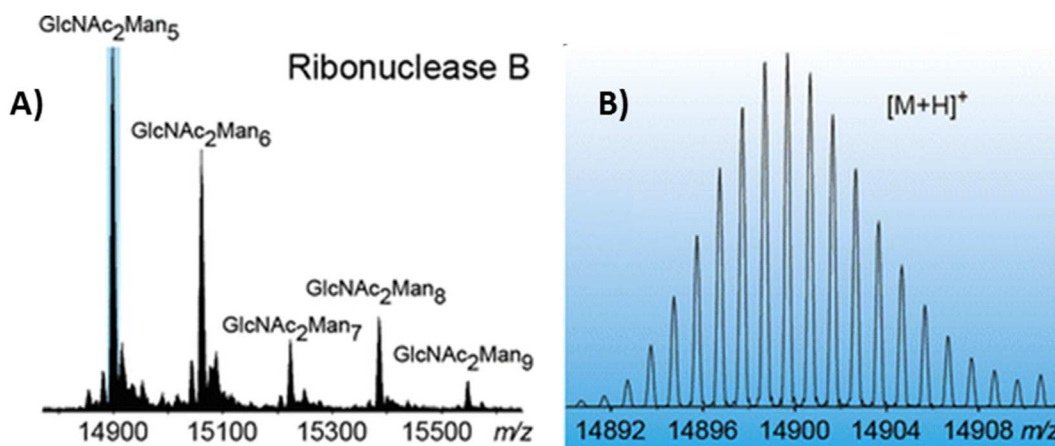


Figure 27 : Spectre de masse obtenu par MALDI-FTICR des cinq glycoformes de la RNaseB dans la gamme 14800 - 15550 m/z (A) et agrandissement du spectre de la glycoforme $GlcNAc_2Man_5$ montrant la résolution isotopique observée.

Les glycoprotéines de plus grande taille avec de nombreux sites de glycosylation donnent des massifs isotopiques mal résolus rendant leur interprétation complexe et ne donnent accès qu'à des masses moyennes (Sanz-Nebot *et al.*, 2005). Cette mauvaise performance est souvent due à la formation d'adduits avec les sels présents dans l'échantillon ainsi qu'à des standards de mauvaise qualité dans les hautes masses (Yamamoto *et al.*, 2016). Cependant, pour contourner cette faible résolution, il est possible de réaliser une digestion enzymatique sur la cible MALDI (Lattová *et al.*, 2007).

Ainsi, l'ovalbumine a été déglycosylée et les glycanes ont été dérivés directement avec de la phénylhydrazine sur la cible avant d'être analysés sans purification particulière. L'analyse des glycanes présents sur la glycoprotéine a alors permis de déterminer leur composition et le nombre de sites de glycosylation.

L'emploi du MALDI pour étudier de biomarqueurs potentiels de pathologies a également été investigué. L'analyse de l'apolipoprotéine C-III intacte (ApoC-III) par MALDI-TOF a, par exemple, montré des modifications de l'abondance relative de ses différentes glycoformes dans le cas de certaines pathologies comme le cutis laxa autosomique récessif de type 2 (ARCL2) (Figure 28) (Wada *et al.*, 2012), les anomalies congénitales de la O-glycosylation (Yen-Nicolaÿ *et al.*, 2015a) ou encore l'obésité et le sepsis (Harvey *et al.*, 2009). Il est possible alors de comparer les aires relatives à l'aide du ratio ApoC-III₁/ApoC-III₂ entre des donneurs sains et des patients malades avec une préparation d'échantillon simple (*i.e.* extraction sur support solide) pour montrer que l'ApoC-III est un biomarqueur potentiel de ces pathologies.

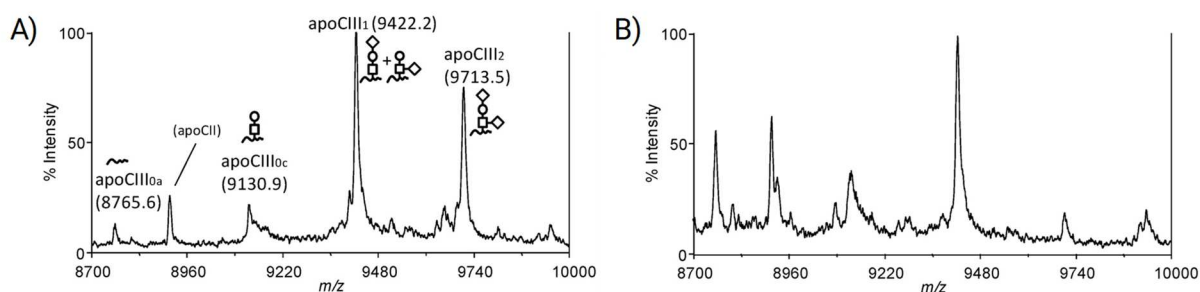


Figure 28 : Comparaison des spectres de masse de l'ApoC-III obtenus par MALDI-TOF d'un individu sain (A) et d'un patient atteint de ARCL2 (B) (Wada *et al.*, 2012)

1.2.2. Source d'ionisation électrospray (ESI)

La source électrospray a été inventée par Fenn en 1984 (Yamashita & Fenn, 1984) et repose sur l'introduction de l'échantillon en solution dans un capillaire soumis à une très forte tension. Cette tension entraîne alors la formation d'un spray de gouttelettes chargées qui entrent dans d'analyseur (Banerjee & Mazumdar, 2012; Ho *et al.*, 2003). Le spray est alors séché à de hautes températures ainsi que par un courant d'azote en présence d'un gradient de pression. À mesure que le solvant est évaporé, la taille des gouttelettes diminue tandis que leur densité de charge augmente, jusqu'à ce que la répulsion électrostatique des différentes charges devienne trop forte et entraîne la fission des gouttelettes (Kearle & Peschke, 2000). L'ESI est une source d'ionisation douce, ce qui est un avantage lors de la présence d'espèces instables comme par exemple les acides sialiques.

L'analyse des glycoprotéines intactes de grande taille par ESI donne des ions multichargés dans une gamme de masse restreinte (500-5000 m/z) permettant l'utilisation de différents analyseurs (TOF, Orbitrap, FTICR). L'interprétation des spectres obtenus des ions multi-chargés nécessite une déconvolution pour déterminer la masse précise de la glycoprotéine intacte. Afin d'obtenir plus facilement des informations sur la composition de la glycoprotéine, une stratégie top-down peut être employée et consiste à isoler puis fragmenter en phase gazeuse la glycoprotéine ionisée soit par collision avec un gaz neutre (collision induced dissociation (CID)), soit par capture ou détachement d'électrons (electron capture dissociation (ECD) ou electron transfer dissociation (ETD) respectivement). L'utilisation de dissociations par ECD ou ETD donne une meilleure couverture de la

séquence que par CID puisqu'elles permettent une meilleure conservation des oligosaccharides (Tran *et al.*, 2016).

L'analyse d'échantillons d'érythropoïétine humaine recombinante (rhEPO) en infusion directe par SM native haute résolution a par exemple été réalisée (Yang *et al.*, 2016). Cette étude a permis de caractériser près de 230 isoformes et de déterminer la composition des glycanes avec un temps de préparation d'échantillon faible (simple filtration sur membrane). Une analyse complémentaire après digestion enzymatique avec une sialidase a montré un spectre très simplifié par rapport à la glycoprotéine intacte, suggérant que les acides sialiques sont responsables de la très grande hétérogénéité de la rhEPO.

L'analyse par infusion directe en ESI est généralement peu effectuée puisque la combinaison de l'ESI avec une méthode séparative (*i.e.* EC ou chromatographie liquide (LC)) est nécessaire pour limiter les phénomènes de suppression d'ions lorsque l'échantillon est très complexe.

L'apport de la SM à l'analyse des glycoprotéines intactes est indéniable. En effet, la possibilité de caractériser finement les glycoformes permet de déterminer la composition des glycanes présents. Cette information est généralement cruciale pour la recherche de biomarqueurs potentiels de pathologies puisque le lien entre la modification de glycosylation observée et la pathologie est étudié.

Les deux méthodes d'ionisation présentent des avantages et inconvénients qu'il faut connaître afin de choisir celle qui sera la plus adaptée à la problématique recherchée. Le MALDI permet de caractériser les glycoprotéines facilement sans nécessité de couplage avec une technique de séparation et sans préparation d'échantillon excessive puisque le MALDI « tolère » la présence de sels dans l'échantillon. Néanmoins la séparation de structures isomères est impossible et la puissance du laser peut entraîner une dégradation de la composition des glycoprotéines, avec notamment la perte de certains monosaccharides labiles (*i.e.* acide sialique et fucose). L'ESI est une technique d'ionisation plus douce, présentant d'excellentes résolutions et qui peut être couplée facilement à une méthode séparative pour permettre la séparation de structures isomères. Cependant, le traitement informatique pour l'interprétation des données (*i.e.* déconvolution des spectres de masse) est complexe et nécessite l'emploi de logiciels performants. La résolution dépend du type d'analyseur employé (temps de vol, quadripole, FT-ICR ou encore Orbitrap), ainsi les analyseurs les plus résolutifs sont généralement combinés plutôt à une source ESI qu'à une source MALDI.

1.3. Conclusion

L'emploi de techniques de SM pour l'étude des glycoformes est une option intéressante. Le MALDI constitue une méthode simple et rapide pour identifier les glycoprotéines d'assez petite taille issue d'un échantillon biologique. Cependant, l'impossibilité de séparer les structures isomères par SM seule nous invite à employer des méthodes séparatives en amont. Ainsi, les méthodes électrophorétiques sont très intéressantes pour l'étude des glycoprotéines intactes. De tous les modes électrophorétiques décrits, les nombreux développements en ECZ ont montré toute la puissance de cette méthode pour la séparation des glycoformes. En effet, au-delà des très bonnes sélectivité et résolution observées et de la rapidité d'analyse, l'ECZ est une méthode qui offre plusieurs choix de détection. L'UV est utilisé pour la quantification des glycoformes tandis que le couplage à la SM permet

une identification directe des glycoformes, deux informations très utiles pour la détection de biomarqueurs glycosylés de pathologies.

II. Analyse des glycanes

L'analyse des glycanes libérés est une stratégie très intéressante pour étudier la micro-hétérogénéité structurale des glycanes issue de la composition de monosaccharides, leur enchaînement, l'anomérisation et le type de liaisons glycosidiques les reliant. L'obtention de glycanes libres nécessite un traitement d'échantillon comprenant de nombreuses étapes. L'analyse des glycanes nécessite l'emploi de méthodes séparatives très résolutive telles que la LC ou l'EC puisque des structures isomères doivent pouvoir être séparées et l'emploi de la SM est incontournable pour assurer une identification directe des structures détectées. Ce type d'analyse permet une caractérisation approfondie des glycanes mais toutes les informations concernant le site de glycosylation sont perdues.

Dans le cas de la recherche de biomarqueurs glycosylés dans les fluides biologiques, deux types d'analyses sont discernés (Rudd *et al.*, 2015). L'analyse glycomique correspond à l'étude non ciblée de tous les glycanes de toutes les protéines présentes dans l'échantillon. A l'inverse, certaines analyses sont ciblées puisqu'elles se focalisent uniquement sur les glycanes d'une glycoprotéine donnée. Un traitement spécifique pour purifier la glycoprotéine d'intérêt est alors obligatoire. Dans cette partie, ces deux types de stratégies seront illustrés.

II.1. Traitement d'échantillon

Pour analyser des glycanes à partir de fluides biologiques il est nécessaire de réaliser au préalable un traitement d'échantillon assez fastidieux pour réduire la complexité de la matrice. Ainsi, les glycoprotéines ou glycopeptides (issus d'une digestion trypsique) sont tout d'abord enrichis grâce à différentes techniques. Cet enrichissement a pour but d'éliminer les espèces non-glycosylées qui peuvent interférer et diminuer la sensibilité lors de l'analyse ultérieure. Les glycanes sont ensuite libérés soit par voie chimique soit par voie enzymatique puis dérivés avec un fluorophore. Cette étape de dérivation permet d'assurer la détection mais aussi parfois la séparation des glycanes. Une dernière étape de purification après dérivation est parfois effectuée pour retirer l'excès de fluorophore. Les glycanes sont alors prêts pour être analysés.

II.1.1. Enrichissement des glycanes

La première étape du traitement d'échantillon réside à la fois dans l'enrichissement des glycoprotéines intactes ou glycopeptides obtenus après digestion trypsique des glycoprotéines mais également dans l'élimination des molécules non-glycosylées. Pour cela, différentes techniques ont été mises au point (Figure 29) : extraction sur support solide (SPE) dont le fonctionnement est basé sur les différents modes de chromatographie liquide (phase inverse ou HILIC), chromatographie d'affinité avec des lectines ou des boronates et chélation avec des oxydes de titane. Plusieurs revues rassemblent toutes ces informations (Ahn *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; B. Huang *et al.*, 2014; Ongay *et al.*, 2012; S. Suzuki, 2013; Tousi *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2016).

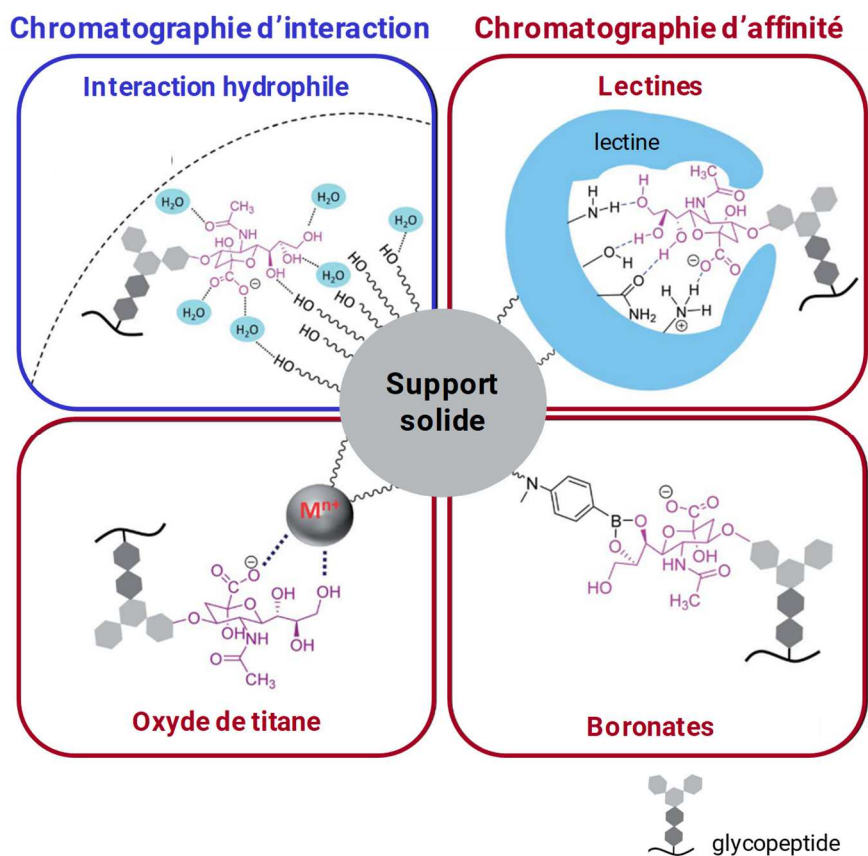


Figure 29 : Les différents modes d'enrichissement des glycopeptides ou glycoprotéines adapté de (C.-C. Chen *et al.*, 2014).

Les modes d'enrichissement reposent sur des interactions différentes et possèdent donc des spécificités variées. Quelques études ont testé de comparer certains modes d'enrichissement. Ainsi, Xue *et al.* ont effectué la comparaison de supports de SPE de HILIC et PGC avec un gel de polyacrylamide fonctionnalisé par des boronates pour l'étude des N-glycopeptides provenant du foie de souris. Les auteurs ont montré que les 3 modes permettent de détecter des glycopeptides différents. Ainsi, les boronates semblent enrichir préférentiellement les N-glycopeptides avec des glycanes oligomannosidiques, la SPE avec un matériau PGC ne permet pas de retenir les glycopeptides avec une chaîne peptidique trop longue. L'HILIC n'a pas montré de préférence dans l'enrichissement, et a permis la détection de trois fois plus de N-glycopeptides que le gel de boronates (Xue *et al.*, 2018). Une autre étude similaire a comparé cinq méthodes d'enrichissement pour détecter les N-glycopeptides issus du cerveau de souris : chromatographie d'interaction à l'aide de billes fonctionnalisées HILIC avec et sans agent de paires d'ions, chromatographie d'affinité avec les lectines (Con A, WGA et RCA-I), chélation avec le TiO₂ et enfin l'emploi d'hydrazide. Les meilleures sensibilité et spécificité ont été obtenues avec l'HILIC en présence d'agents de paires d'ions puisque le maximum de sites de N-glycosylation ont été détectés après cet enrichissement (Zhang *et al.*, 2016). L'emploi d'HILIC sans agent de paires d'ions permet un enrichissement similaire à celui obtenu par hydrazide tandis que le TiO₂ permet de détecter près de 2,5 fois moins de N-glycopeptides que la meilleure méthode.

Le choix du mode d'enrichissement va donc dépendre de l'étude réalisée ainsi que des objectifs fixés. Lors d'une étude glycomique, où l'ensemble des glycanes doivent être enrichis, l'emploi d'une

méthode non spécifique et avec une très bonne sensibilité est indispensable. La chromatographie d'interaction HILIC est une méthode qui n'induit pas de biais et semble être la meilleure option en termes d'enrichissement global d'un échantillon biologique. Cependant, lors d'une étude d'un certain type de modification de la glycosylation (*i.e.* fucosylation, sialylation ...) l'emploi d'un mode plus spécifique tel que la chromatographie d'affinité avec les lectines ou la chélation avec le TiO₂ peut permettre une sélection plus fine des glycopeptides d'intérêt et faciliter l'analyse ultérieure.

II.1.2. Méthodes de libération des glycanes

Plusieurs méthodes de déglycosylation chimiques et enzymatiques ont déjà été développées pour permettre de rompre la liaison sucre-protéine. Pour qu'une méthode de déglycosylation soit validée, elle doit remplir un certain nombre de critères :

- ✓ Libérer de manière non-spécifique les glycanes afin de garder les proportions en chacun des glycanes de l'échantillon de départ
- ✓ Conserver la structure intacte des glycanes
- ✓ Être utilisable pour tout type d'échantillon

Plusieurs revues ont décrit les différentes méthodes de déglycosylation qu'elles soient chimiques ou enzymatiques (Kamerling & Gerwig, 2007; Yamamoto *et al.*, 2016; Zauner, Kozak, *et al.*, 2012).

II.1.2.1. Méthodes chimiques

La méthode chimique la plus classique est l'hydrazinolyse qui permet de libérer les N- et/ou O-glycanes dans leur forme non réduite, ce qui permet leur dérivation directe après déglycosylation. Selon les conditions employées, l'hydrazine anhydride peut être utilisée pour libérer sélectivement les O-glycanes (60°C pendant 5-6h) ou les N-glycanes (85-100°C pendant 5-16h) (Patel *et al.*, 1993). Cependant, l'hydrazinolyse peut entraîner une dégradation de certains O-glycanes, appelée « peeling » (Figure 30), en entraînant la perte du monosaccharide terminal (GalNAc) (Royle *et al.*, 2002). Le mécanisme de la réaction d'hydrazinolyse n'est pas parfaitement compris (Zauner, Koeleman, *et al.*, 2012a), mais il commencerait par une réaction de β -élimination suivie d'une réaction des groupements -CO-NH- (de nature peptidique ou glycosamine) avec l'hydrazine pour former des dérivés hydrazide (Figure 31A) (Merry *et al.*, 2002). Une re-N-Acétylation de certains monosaccharides GlcNAc et GalNAc est effectuée par de l'anhydride acétique (Kamerling & Gerwig, 2007). L'hydrazine étant un composé chimique explosif et très toxique, cette méthode est utilisée uniquement pour des échantillons de faible volume (0,2-1 mL) (Nakakita *et al.*, 2007). Dans tous les cas, les échantillons ne doivent contenir aucune trace de sels ou d'eau qui favorisent les réactions de « peeling ». Cette méthode assez contraignante est maintenant peu utilisée au profit de stratégies plus douces.

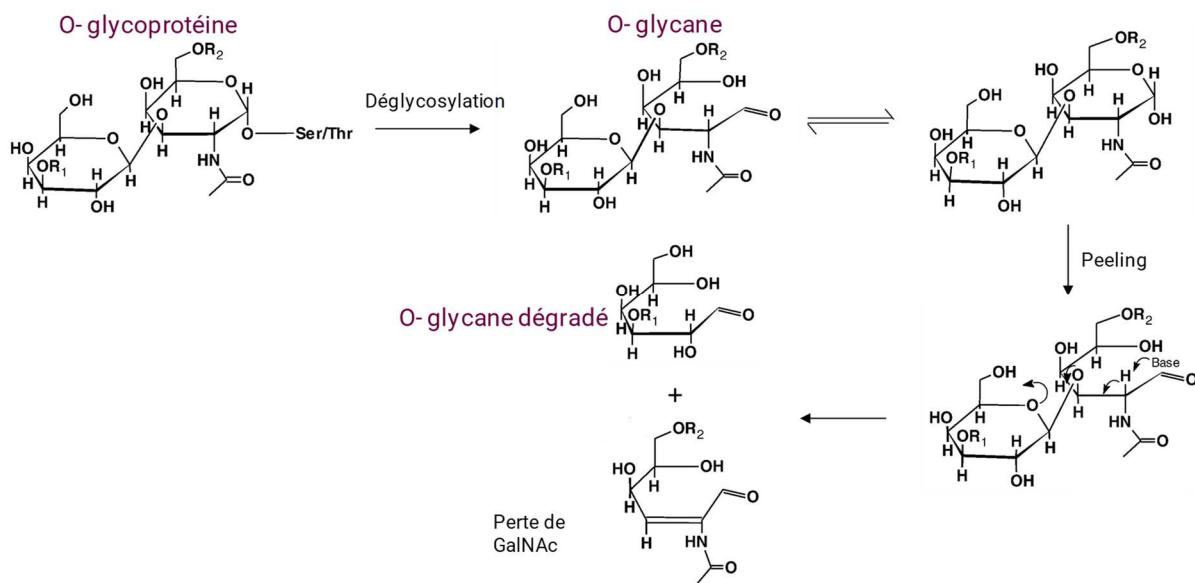


Figure 30 : Schéma de la réaction de « peeling » d'un O-glycane libéré adapté de (Zauner, Koeleman, *et al.*, 2012a)

Une autre méthode, la β -élimination réductrice permet de rompre la liaison entre la Ser/Thr et le GalNAc en conditions alcalines douces (Figure 31B). Lors de cette technique, les échantillons sont dilués pendant 14-16h à 45°C dans une solution de soude (0,05-0,1 M) contenant un excès de borohydrure de sodium (0,8-1,0 M) (Carlson, 1968). Celui-ci permet de stabiliser les oligosaccharides libérés en transformant le sucre terminal en alditol, évitant ainsi les réactions de dégradation appelées « peeling » décrites précédemment. Cependant, le principal inconvénient de cette méthode est la perte de l'extrémité réductrice des glycanes, empêchant alors leur dérivation par un fluorophore ou un chromophore dans une étape ultérieure. Des β -éliminations alternatives non-réductrices utilisant une solution d'ammoniaque permet de libérer les glycanes de glycoprotéines standard sous forme réductrice. Cette solution d'ammoniaque peut être alors saturée soit par du carbonate d'ammonium (pour éviter les réactions de peeling) ce qui permet une déglycosylation à 40°C pendant 60h (Huang *et al.*, 2001) soit par un excès de borazane (BH_3NH_3) pour une libération en 24h à 45°C (Yunping Huang *et al.*, 2002). L'excès de réactifs est alors éliminé par évaporation. Une autre méthode a montré qu'une solution de carbamate d'ammonium permettait une déglycosylation à 60°C pendant 20h (Miura *et al.*, 2010). Des travaux ont également été menés pour coupler les étapes de libération par β -élimination et de dérivation de O-glycanes. Ces méthodes utilisent alors une solution du chromophore en présence soit de diméthylamine (Zauner, Koeleman, *et al.*, 2012b), d'ammoniaque (Wang *et al.*, 2011) ou de soude (Furukawa *et al.*, 2011). L'incubation du mélange se déroule alors à 85°C pendant 2h ou 50°C pendant 15h.

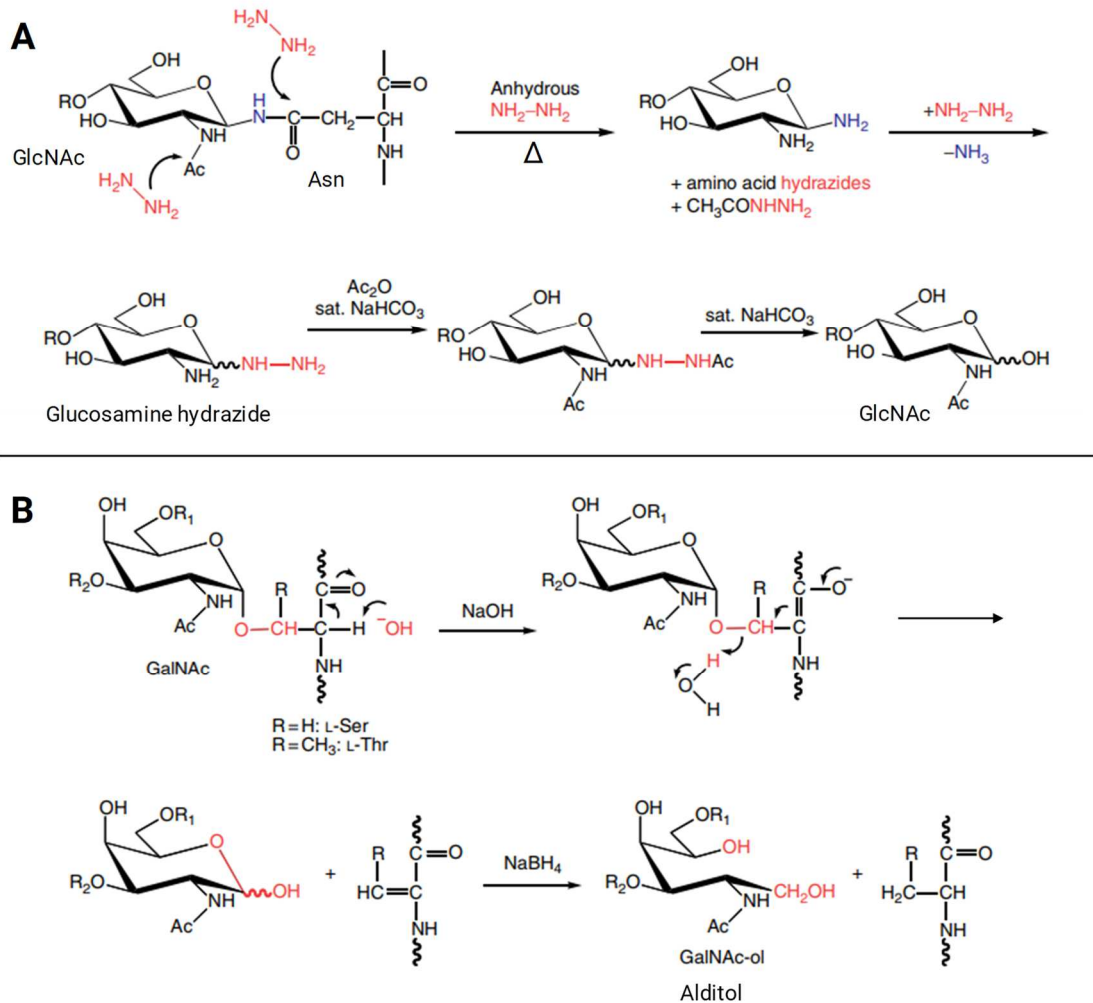


Figure 31 : Mécanismes réactionnels de déglycosylation par hydrazinolysé (A) et par β -élimination (B) d'après (Kamerling & Gerwig, 2007)

La déglycosylation chimique peut également être réalisée à l'aide d'un traitement par l'ozone (O_3) dans un mélange chloroforme/méthanol suivi par une étape de chauffage à 65°C et de mise sous agitation dans un tampon aqueux à pH neutre ($6.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$) pendant 16h. Cette technique permet une libération des glycanes des glycoprotéines et glycosphingolipides, à partir de milieux biologiques, en conservant leur extrémité non-réductrice ce qui permet des étapes de perméthylation ou dérivation ultérieures tout en évitant les réactions de dégradation « peeling » (Song et al., 2012).

Très récemment, une nouvelle approche reposant sur une réaction oxydante avec de l'hypochlorite de sodium (NaClO à 6%) permet de libérer les N-, O-glycanes et glycosphingolipides sous forme non réduite à partir de milieux complexes (*i.e.* cerveau de porc). La libération des N-glycanes s'effectue en deux minute à température ambiante (Song et al., 2016). La procédure pour libérer les O-glycanes est plus difficile puisqu'il faut six fois plus de NaClO et 24h d'incubation. La déglycosylation permet de conserver les glycanes intacts puisque les acides sialiques sont préservés.

Malheureusement, l'emploi de réactifs chimiques ainsi que l'incubation à de hautes températures pendant de longues périodes ne permettent pas toujours de maintenir intactes les structures des oligosaccharides (notamment les acides sialiques de nature très labile) et des protéines déglycosylées,

rendant ces méthodes chimiques moins attractives lorsque des méthodes enzymatiques sont disponibles et utilisables.

II.1.2.2. Méthodes enzymatiques

Les méthodes enzymatiques permettent d'avoir une plus grande spécificité et sont plus simples de mise en œuvre. Il existe deux types de glycosidases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques, les exoglycosidases et les endoglycosidases.

- ✓ Les exoglycosidases permettent de couper le monosaccharide à l'extrémité non réductrice d'un oligosaccharide et induit donc une libération séquentielle de tous les monosaccharides les uns après les autres. Ce type d'enzyme est préférentiellement utilisée lors de la caractérisation de la chaîne oligosaccharidique (type de liaison, anomérie).
- ✓ Les endoglycosidases, sont capables de couper la liaison entre l'oligosaccharide et la protéine, permettant ainsi de récupérer la chaîne oligosaccharidique intacte.

A noter qu'il est nécessaire de dénaturer la protéine par des détergents ioniques et des agents réducteurs des ponts disulfures pour déplier la protéine afin d'améliorer l'accessibilité des enzymes aux sites de glycosylation. Cela permet à la fois de diminuer la quantité d'enzyme utilisée et d'améliorer l'efficacité de la libération des glycanes.

L'enzyme, majoritairement utilisée, permettant la libération de la quasi-totalité des N-glycanes est la Peptide N-glycosidase F (PNGase F). La déglycosylation nécessite une incubation à 37°C pendant une durée de 3h à 24h selon la glycoprotéine d'intérêt (généralement elle est réalisée sur une nuit). La PNGase F ne peut cependant pas libérer les N-glycanes ayant un fucose en α -1,3 sur le GlcNAc terminal (Tretter *et al.*, 1991). Dans ce cas, une autre enzyme, la PNGase A peut être utilisée (Figure 32). Cependant, ce type de glycanes est essentiellement présent chez les plantes et les insectes, l'emploi de PNGase F est donc suffisant lors de l'étude de fluides biologiques humains. Ces deux enzymes coupent la liaison entre le GlcNAc terminal et l'Asn de la protéine est transformée en Asp. La différence de masse de 1Da générée par cette conversion de Asn en Asp permet ensuite d'identifier le site de glycosylation par SM. D'autres enzymes, les endo- β -N-acétylglucosaminidases (ex : endo F), coupent la liaison entre les deux GlcNAc du noyau, laissant le GlcNAc terminal sur la chaîne polypeptidique. (Figure 32).

Récemment, de nouvelles enzymes recombinantes commerciales ont été développées pour offrir une plus grande activité et donc une digestion plus rapide en seulement 10min permettant ainsi un traitement des échantillons à haut débit (Everest-Dass *et al.*, 2018).

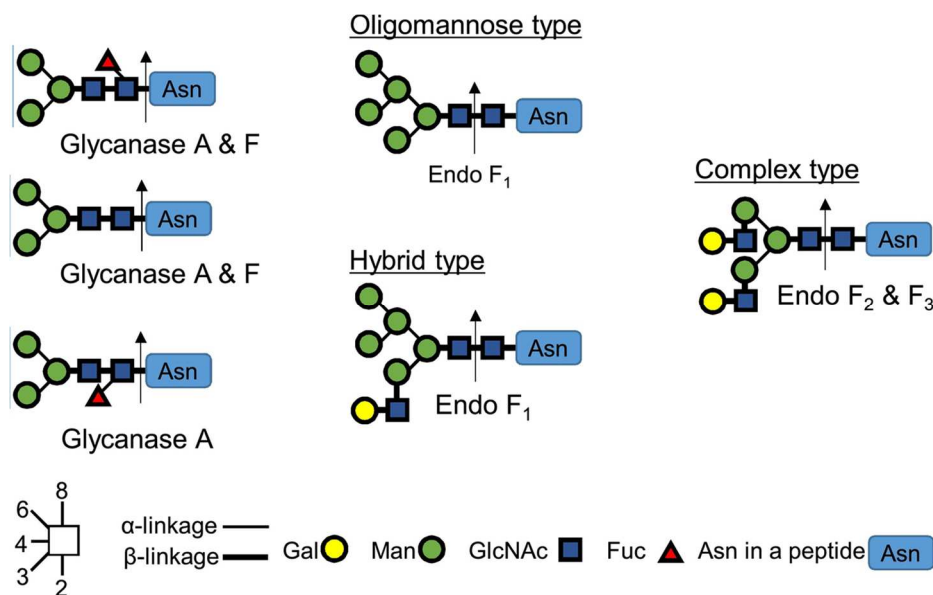


Figure 32 : Spécificité des enzymes utilisées pour la libération des chaînes N-oligosaccharidiques des glycoprotéines d'après (Yamamoto *et al.*, 2016)

La déglycosylation enzymatique des O-glycanes est plus problématique car il n'existe pas, à ce jour, d'enzyme capable de libérer tous les types de chaînes O-glycaniques (Geyer & Geyer, 2006). En effet, les O-glycanases existantes ciblent les glycanes de motifs de type 1 non substitués (Gal-GalNAc). Les structures des O-glycanes étant très variées, ces enzymes ont donc une action limitée. Si les O-glycanes possèdent d'autres monosaccharides que ceux du motif de type 1, l'emploi d'exoglycosidases est nécessaire (par exemple, un glycane sialylé devra être désialylé au préalable). Il n'existe que deux O-glycanases commerciales issues de *Diplococcus pneumoniae* (endo- α -N-acetylgalactosaminidase-D) et *alcaligenes sp.* (endo- α -N-acetylgalactosaminidase-A) (Geyer & Geyer, 2006).

La digestion enzymatique peut être réalisée en solution, mais elle peut aussi être effectuée sur supports solides afin de diminuer les temps de digestion ainsi que les coûts associés et éventuellement augmenter l'efficacité et/ou le rendement de digestion. En effet, de récents développements ont permis d'immobiliser la PNGase F sur divers supports tels que des billes magnétiques (Bodnar *et al.*, 2016), des supports monolithiques polymériques (Krenkova *et al.*, 2013; Lafleur *et al.*, 2015) ou de l'oxyde de graphite (Ren *et al.*, 2014). Une immobilisation orientée de la PNGase F sur l'oxyde de graphite a ainsi permis de réduire le temps de digestion d'une nuit à seulement 4min pour déglycosyler les protéines du plasma humain (Ren *et al.*, 2014). Plusieurs revues décrivent de manière plus approfondie le développement des microréacteurs enzymatiques (IMERs) notamment pour la déglycosylation des protéines (Karav *et al.*, 2017; Meller *et al.*, 2017; Naldi *et al.*, 2018; Safdar *et al.*, 2014).

Les digestions enzymatiques ont l'avantage de pouvoir être réalisées sur des échantillons variés et complexes (*i.e.* échantillons biologiques), que ce soit sur gel après électrophorèse 1D ou 2D (Šagi *et al.*, 2005) ou directement sur les cibles MALDI (Kim *et al.*, 2001).

II.1.3. Méthodes de dérivation

Les glycanes ne présentent aucune propriété spectrale et parfois également aucune charge, rendant leur détection et séparation difficiles en HPLC ou électrophorèse capillaire. Pour contourner cet inconvénient majeur et augmenter la sensibilité de détection en UV, fluorescence ou fluorescence induite par laser (LIF) ou encore en SM, la dérivation des sucres par un chromophore ou fluorophore est largement employée. En 1991, l'utilisation du 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldéhyde (CBQCA) a permis pour la première fois de séparer des N-glycanes en EC-LIF (J. Liu et al., 1991). En fonction des applications souhaitées, il existe de nombreux marqueurs utilisables pour dériver les glycanes. De nombreuses revues reportent les différents types de marqueurs utilisables (Harvey, 2011) ou seulement les plus fréquemment utilisés (Anumula, 2006; Lamari *et al.*, 2003; Pabst *et al.*, 2009; Ruhaak *et al.*, 2010). Le Tableau III récapitule la liste des fluorophores et chromophores les plus employés pour des détections UV, LIF ou SM et la Figure 33 représente leurs structures.

Tableau III : Liste des principaux chromophores et fluorophores utilisés comme agents de dérivation des mono- et oligosaccharides

Type de dérivation	Marqueur	Longueur d'onde (nm) UV : λ_{abs} / LIF : $\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}$	Méthodes d'analyse	Références
Amination réductrice	3-Acetamido-6-aminoacridine (AA-Ac)	λ_{ex} : 445 / λ_{em} : 525	HPLC / EC	(Charlwood <i>et al.</i> , 2000)
	2-Aminoacridone (AMAC)	λ_{abs} : 250, 276, 421 λ_{ex} : 428 / λ_{em} : 525	HPLC EC / CEC	(Galeotti <i>et al.</i> , 2012; Okafo <i>et al.</i> , 1997) (Galeotti <i>et al.</i> , 2014) / (Birrell & Camilleri, 2003)
	Acide 2-Aminobenzoïque (2-AA)	λ_{ex} : 360 / λ_{em} : 425	HPLC EC	(K. R. Anumula & Dhume, 1998; Higel <i>et al.</i> , 2013) (Abo <i>et al.</i> , 2013)
	2-Aminobenzamide (2-AB)	λ_{ex} : 330 / λ_{em} : 420	HPLC EC SM	(Bigge <i>et al.</i> , 1995; Česla <i>et al.</i> , 2016) (N. T. Tran <i>et al.</i> , 1998) (Yunping Huang <i>et al.</i> , 2001)
	4-Aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE)	λ_{abs} : 305 λ_{ex} : 320 / λ_{em} : 350	HPLC EC SM	(Wang <i>et al.</i> , 1984; Poulter <i>et al.</i> , 1991; Momenbeik <i>et al.</i> , 2006) (Sjöberg <i>et al.</i> , 2004) (S. Suzuki <i>et al.</i> , 1996)
	4-Aminobenzoic acid butyl ester (ABBE)	λ_{ex} : 310 / λ_{em} : 365	HPLC	(Poulter <i>et al.</i> , 1991; Schmid <i>et al.</i> , 2002)
	7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	λ_{ex} : 360 / λ_{em} : 430	HPLC MCE	(Yodoshi <i>et al.</i> , 2008) (Yamamoto <i>et al.</i> , 2015)
	Acide 8 -Aminonaphthalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS)	λ_{abs} : 220, 370, 360 λ_{ex} : 356 / λ_{em} : 512	EC	(Lemoine <i>et al.</i> , 2000; Reusch <i>et al.</i> , 2015)
	Acide 1-Aminopyrène-3,6,8-trisulfonique (APTS)	λ_{ex} : 488 / λ_{em} : 512	EC	(Donczo <i>et al.</i> , 2017; A. Guttman & Pritchett, 1995)
	2-Aminopyridine (2-AP)	λ_{abs} : 240 λ_{ex} : 310-320 / λ_{em} : 375	HPLC EC SM	(J.-Q. Fan <i>et al.</i> , 1995; Takegawa <i>et al.</i> , 2006) (Nashabeh & El Rassi, 1992; Rustighi <i>et al.</i> , 2009) (Deguchi <i>et al.</i> , 2005; Ito <i>et al.</i> , 2007)
	6-Aminoquinoline (6-AQ)	λ_{abs} : 245 λ_{ex} : 375 / λ_{em} : 445	EC	(Minquan Zhang <i>et al.</i> , 2001; Nashabeh & El Rassi, 1992)
	Procaine	λ_{ex} : 310 / λ_{em} : 380	HPLC SM	(Lavanant & Loutelier-Bourhis, 2012)
	Procainamide	λ_{ex} : 310 / λ_{em} : 370	HPLC SM	(Klapoetke <i>et al.</i> , 2010; Kozak <i>et al.</i> , 2015) (Lavanant & Loutelier-Bourhis, 2012; Nwosu <i>et al.</i> , 2015)
Rapifluor-MS® (RFMS)	λ_{ex} : 280 / λ_{em} : 320	HPLC SM	(Keser <i>et al.</i> , 2018; S. Zhou <i>et al.</i> , 2017) (Lauber <i>et al.</i> , 2015)	
Dérivation des acides sialiques	1,2-diamino-4,5-methylenedioxy-benzene (DMB)	λ_{ex} : 373 / λ_{em} : 448	HPLC	(Martín <i>et al.</i> , 2007; Thomson <i>et al.</i> , 2017)
Condensation du groupement carbonyle	Phenylhydrazine (PHN)	λ_{abs} : 245 λ_{ex} : 330 / λ_{em} : 470	HPLC-SM	(Lattova & Perreault, 2003; H. Suzuki <i>et al.</i> , 2009)
Addition de Michael	1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)	λ_{abs} : 245	HPLC EC SM	(Chengjian Wang <i>et al.</i> , 2013) (Honda <i>et al.</i> , 2003) (Chengjian Wang <i>et al.</i> , 2011; Zauner, Koeleman, <i>et al.</i> , 2012c)

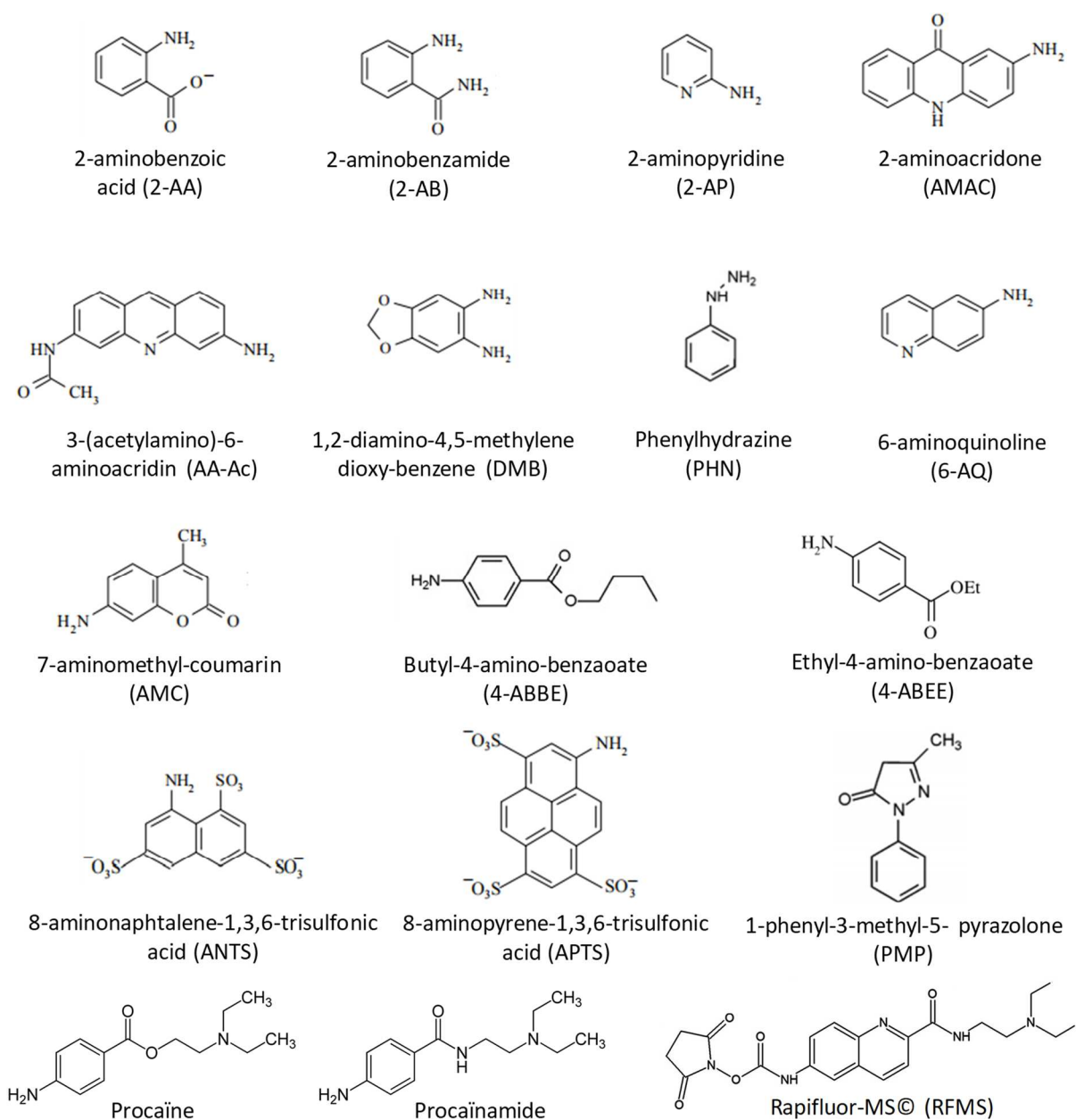


Figure 33 : Structures des différents chromophores et fluorophores présentés dans le Tableau III

II.1.3.1. Dérivation pour une détection en UV ou fluorescence

En fonction du type de marqueur employé, différents mécanismes de dérivation sont possibles et reposent sur:

- ✓ Une amination réductrice : pour ce type de dérivation, le glycane est en principe solubilisé dans du DMSO en présence d'acide acétique (Bigge *et al.*, 1995) afin de permettre l'ouverture du cycle du monosaccharide terminal situé à l'extrémité réductrice pour obtenir une fonction aldéhyde. L'ajout d'un marqueur présentant une amine terminale en présence d'un agent réducteur, sous haute température ($\approx 100^\circ\text{C}$) pendant plusieurs heures permet la dérivation de l'extrémité réductrice du glycane grâce à la formation d'une base de Schiff avec un rendement compris entre 80 et 90% (Figure

34). Cette méthode de dérivation a une stœchiométrie 1:1 facilitant, de fait, la quantification. L'optimisation des conditions de dérivation dépendent du type de fluorophore ou chromophore mis en jeu, puisque d'autres types de solvants tels que le tétrahydrofurane (Donczo *et al.*, 2017) ou le méthanol (Anumula, 1994) se sont également montrés performants lors de certaines dérivations (APTS et 2-AA respectivement). Afin d'éviter la formation de cyanure d'hydrogène, qui est un composé toxique, l'agent réducteur majoritairement utilisé, le cyanoborohydrure de sodium, est parfois remplacé par du 2-picoline borane (Ruhaak, Steenvoorden, *et al.*, 2010) du triacétoxyborohydrure de sodium (Dalpathado *et al.*, 2005) ou encore du pyridine-borane (Yodoshi *et al.*, 2008). Très récemment, une autre approche a montré qu'il est possible de remplacer l'agent réducteur par la catalyse du transfert d'hydrogène à partir d'acide formique par des complexes hydrures de ruthénium(III) ou iridium(III). Ce nouveau moyen de réduction des dérivés imine garantit un rendement de dérivation identique au protocole classique autour de 95% (Kovács *et al.*, 2017). Plusieurs types de marqueurs sont classiquement employés (Tableau III) tels que le 2-AA, le 2-AB, le 2-AP plutôt en LC ou encore l'APTS en EC (limite de détection (LOD) de 2 pM).

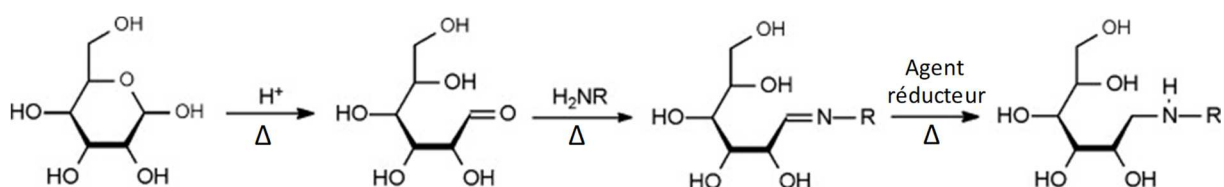


Figure 34: Mécanisme de dérivation par amination réductrice adapté de (Harvey, 2011)

✓ Une addition de Michael (Figure 35) : la réaction correspond à l'addition nucléophile d'un carbanion (marqueur PMP) sur l'aldéhyde de l'oligosaccharide (You *et al.*, 2008). Cette dérivation se déroule en conditions alcalines, limitant ainsi la perte des acides sialiques, à 70°C pendant 2h. Cette addition conduit à une stœchiométrie de 2 marqueurs PMP par glycane. Cette méthode est peu utilisée car aucun marqueur fluorescent de ce type n'existe (détection uniquement en UV avec une LOD de l'ordre de 1pM) et l'ajout de 2 marqueurs par glycane entraîne une séparation fortement dominée par les marqueurs rendant très difficile la séparation d'isomères.

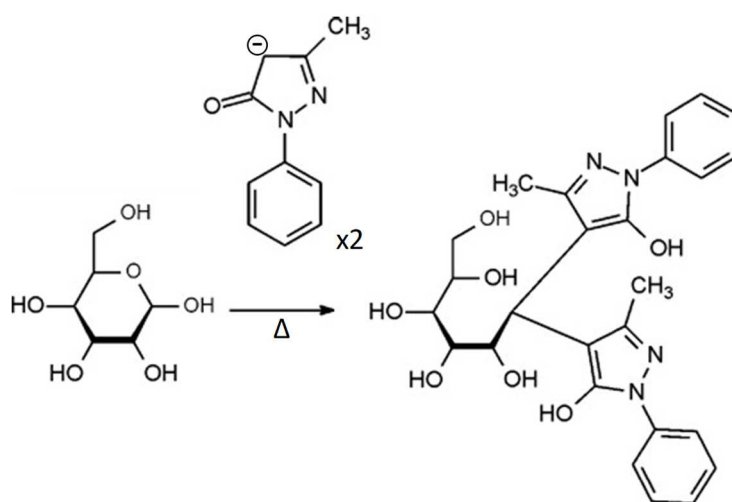


Figure 35: Mécanisme de dérivation par addition de Michael adapté de (Harvey, 2011)

✓ Une fonction hydrazone : la réaction de la fonction hydrazine du marqueur réagit avec l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide pour former une hydrazone (Figure 36). Une dérivation avec

la phénylhydrazine permet ainsi d'augmenter la sensibilité en SM et en UV. Cette réaction est rapide puisqu'il suffit d'une heure à 70°C pour être complète (Lattova & Perreault, 2003). Cette réaction ne nécessite et ne produit aucun sel, ce qui permet un couplage direct à la SM ou un dépôt sur cible MALDI avec des LOD de l'ordre de 10 pM. Ce type de dérivation est assez peu employé par rapport aux autres méthodes.

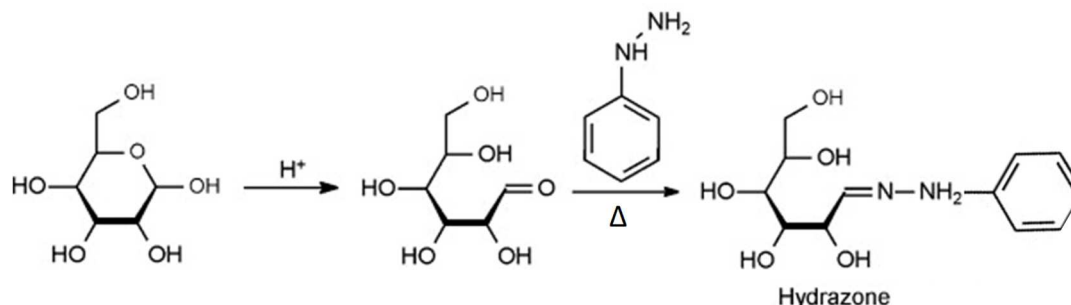


Figure 36 : Mécanisme de dérivation par formation d'une hydrazone adapté de (Harvey, 2011)

Les glycanes sont libérés après digestion avec la PNGase F sous forme de glycosylamines qui s'hydrolysent pour donner les glycanes libérés. La dérivation des intermédiaires glycosylamines est également possible notamment avec les dérivés du 9-fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc) (Kamoda *et al.*, 2005) qui améliore la sensibilité d'un facteur 5 en fluorescence par rapport au 2-AA.

II.1.3.2. Dérivation pour une détection en SM

Afin d'améliorer l'ionisation et la stabilité thermique des glycanes en SM, il est conseillé de les dériver. La méthode la plus fréquemment employée, appelée perméthylation, consiste à remplacer tous les hydrogènes des groupements hydroxyles par des groupements méthyles (Figure 37) conduisant à l'addition de 14 Da par nombre d'hydrogène remplacé dans la chaîne oligosaccharidique. La perméthylation, introduite par Hakomori en 1964, est une réaction entre le carbohydrate solubilisé dans du DMSO et de l'iodure de méthyle (CH₃I) catalysée par le carbanion méthylsulfinyl (Hakomori, 1964). Ciucanu et Kerek ont proposé, en 1984 (Ciucanu & Kerek, 1984), une méthode rapide et plus simple de perméthylation en milieu basique, reposant sur l'utilisation de poudre d'hydroxyde de sodium pour remplacer le carbanion méthylsulfinyl. Ce protocole est devenu la méthode de référence et est toujours très utilisé puisque les différentes étapes à suivre ont été détaillées dans divers protocoles (Morelle & Michalski, 2007). Depuis 2005, un nouveau protocole de perméthylation de petits volumes d'échantillons a été développé grâce à des microcolonnes à centrifuger ou des capillaires de silice fondue (diamètre interne de 500µm) remplis d'hydroxyde de sodium permettant une dérivation en moins d'une minute (Kang *et al.*, 2005). La perméthylation a de nombreux avantages, comme par exemple l'amélioration de la sensibilité par rapport aux glycanes natifs (~ 20 fois plus sensible) grâce à la diminution de leur grande hydrophilie qui entraîne généralement des effets de suppression d'ions (Shajahan *et al.*, 2017). Elle offre également la possibilité d'analyser simultanément des glycanes neutres et sialylés en mode positif grâce à la neutralisation des fonctions carboxyliques des acides sialiques en esters neutres. Elle permet aussi de déterminer les sites de liaison entre les différents monosaccharides. En effet, après avoir subi une hydrolyse acide qui libère les monosaccharides des glycanes, les atomes d'oxygène autrefois liés aux autres monosaccharides sont transformés en groupements hydroxyles tandis que les autres restent tous méthylés. Il est alors possible de remonter au type de liaison initialement présente. Elle peut être appliquée aussi bien sur les N- que les O-glycanes.

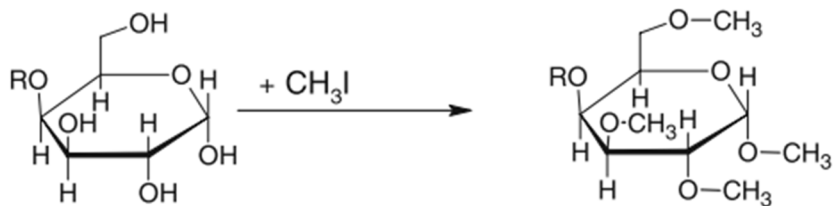


Figure 37 : Réaction de perméthylation

D'autres dérivations, par amination réductrice, sont aussi parfois réalisées pour améliorer la sensibilité en SM. Ainsi, plusieurs dérivés estérifiés d'acide 4-aminobenzoïque (ABEE, ABBE) ont été testés lors d'analyses en ESI et MALDI et le dérivé ester butylique (ABBE) semble donner les meilleures performances. Un autre dérivé, l'acide 4-aminobenzoate de 2-(diéthylamino)éthyle ou procaine, a été utilisé pour améliorer la limite de détection (à 10 fM dans le cas d'un maltoheptaose) en MALDI grâce à son amine tertiaire facilement protonable (Takao *et al.*, 1996). Une autre version plus stable de ce marqueur, le 4-amino-N-[2-(diéthylamino)éthyl]benzamide ou procainamide a également permis de fortement améliorer la sensibilité en SM (Pabst *et al.*, 2009) donnant un signal jusqu'à 30 fois plus intense que celui obtenu avec le 2-AB (Kozak *et al.*, 2015).

Enfin, récemment, un nouveau marqueur commercialisé, le RapiFluor-MS® (RFMS) permet d'augmenter la sensibilité en fluorescence et en SM (Lauber *et al.*, 2015). Le RFMS aurait ainsi un signal 14 fois et 160 fois plus intense en fluorescence et SM respectivement que le 2-AB et serait 3 fois plus sensible en SM que la procainamide probablement grâce à son caractère plus hydrophobe (Figure 38). Le RFMS permet d'atteindre des LOD de l'ordre du fM.

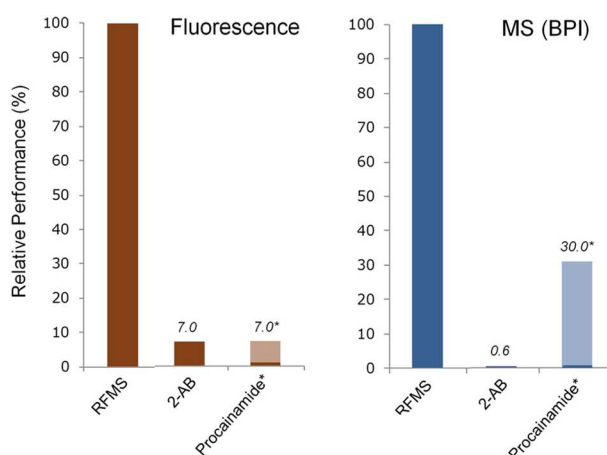


Figure 38 : Comparaison des performances (%) de différents fluorophores (2-AB et procainamide), par rapport au RFMS pour la séparation de glycanes d'une IgG en fluorescence et SM d'après (Lauber *et al.*, 2015). * Les barres plus claires de la procainamide indiquent les résultats d'une autre étude qui a comparé les performances du 2-AB et de la procainamide (Rudd *et al.*, 1997)

Un autre type de marqueur a également été développé correspondant à un « tandem mass tag (TMT) ». Celui-ci permet de réaliser une quantification relative des glycanes bien plus précise que celle obtenue après perméthylation ou avec d'autres marqueurs. Ce marqueur TMT est composé d'une fonction aminoxy ou hydrazide réagissant avec le glycanes (Hahne *et al.*, 2012). Cette étude a montré que le marqueur aminoxyTMT possède un rendement de dérivation de l'ordre de 95% supérieur à celui de la fonction hydrazide.

La dérivation n'est pas uniquement employée pour l'apport de propriétés spectrales pour la détection comme vu dans cette partie mais elle sert aussi parfois à la séparation des glycanes. En effet, certains marqueurs possèdent des charges positives (RFMS) ou négatives (APTS, ANTS, AA...) et vont permettre de rendre l'ensemble des glycanes issus d'échantillons complexes chargés. L'ajout de charges est particulièrement recherché dans le cadre de la séparation de glycanes neutres par électrophorèse capillaire car ils ne peuvent être séparés sous leur forme native. L'apport de groupements aromatiques par la dérivation améliore la séparation des glycanes en chromatographie à polarité inverse de phase inversée.

II.1.4. Purification

Après dérivation, une étape de purification visant à éliminer l'excès de marqueur et de sels est effectuée. Plusieurs méthodes sont employées, généralement identiques à celles employées lors de l'enrichissement des glycanes.

Cependant, la purification après dérivation permet l'utilisation de supports de SPE additionnels fonctionnant sur le mode de la chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC). En effet, l'emploi de colonnes en carbone graphite poreux (PGC), permet d'enrichir les glycanes dérivés par interactions hydrophobes en présence d'une phase mobile aqueuse (Zhu *et al.*, 2011). Des exemples de la littérature montrent qu'elle peut être réalisée après dérivation par le PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) (Wang *et al.*, 2011) ou après dérivation par l'APTS et dérivation des acides sialiques (Snyder *et al.*, 2017). Un format de plaque avec 96 puits composés d'une phase PGC Hypercarb peut également être utilisé pour traiter un plus grand nombre d'échantillons simultanément et gagner ainsi du temps sur la préparation d'échantillon (Ruhaak, Nguyen, *et al.*, 2013). Les colonnes C18 peuvent permettre le même type de purification (Möginger *et al.*, 2018).

Les supports de SPE employés peuvent aussi être composés de matériaux d'HILIC, comme par exemple à base de cellulose pour la purification de glycanes dérivés par le 2-AA (Ruhaak *et al.*, 2008) ou de billes de polyacrylamide après dérivation par l'APTS (Hennig *et al.*, 2015; Möginger *et al.*, 2018) avant analyse par MALDI-TOF et EC-SM.

Les purifications post-dérivation emploient le plus souvent des supports de SPE de chromatographie HILIC ou RP notamment du fait que ces supports sont commerciaux et généralement prêts à l'emploi. De plus, ces supports n'induisent pas de biais en termes de sélectivité lors de la purification de glycanes marqués.

II.1.5. Méthodes de préparation d'échantillons à haut débit

Afin de réduire le temps des étapes de déglycosylation et de dérivation des glycanes, de nouvelles stratégies ont été développées. Ainsi en utilisant un support solide de graphite non poreux, il est possible d'extraire, de dériver par le 2-AA ou le 2-AB et de purifier les glycanes dérivés sur un même support solide (Jiang *et al.*, 2017). Cette méthode permet de limiter les pertes d'échantillons par rapport au protocole en solution tout en garantissant une très bonne reproductibilité.

Une autre technique, reposant sur l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées avec des fonctions carboxyliques permet une automatisation de la préparation des glycanes dérivés par de l'APTS (Figure 39) (Váradí *et al.*, 2014). Les billes employées semblent capables de capturer à la fois les

glycanes libérés non-dérivés et les glycanes dérivés par l'APTS donc plus hydrophobes et chargés. Ainsi avec cette nouvelle méthode, la déglycosylation, l'extraction des glycanes, la dérivation par l'APTS et la purification des glycanes dérivés sont réalisées en moins de 4h.

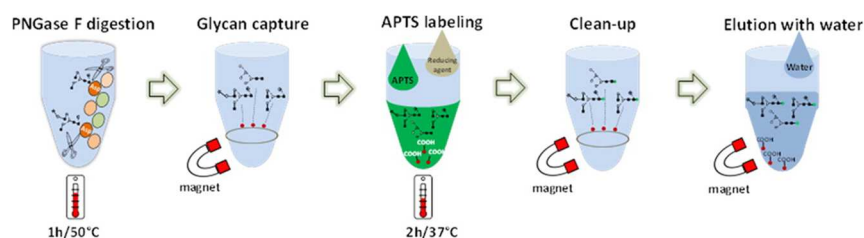


Figure 39 : Etapes de préparation des échantillons de N-glycanes-APTS à l'aide de billes magnétiques d'après (Váradi *et al.*, 2014)

La préparation d'échantillons dérivés au RFMS (déglycosylation, dérivation, purification) est réalisée en 30 minutes grâce à l'emploi d'un surfactant (RapiGest) permettant une digestion à la PNGase F plus rapide (15 min) et la présence d'une fonction carbamate NHS sur le fluorophore qui est un agent de marquage rapide (5 min) (Lauber *et al.*, 2015).

Afin de permettre l'analyse d'échantillons à haut débit, une nouvelle méthode automatisée permet de réaliser toutes les étapes de la libération des glycanes jusqu'à leur purification après perméthylation en moins de 5h sur une plaque à 96 puits à l'aide de robots pipeteurs (Shubhakar *et al.*, 2016).

II.2. Méthodes d'analyse

II.2.1. Analyse par électrophorèse capillaire

Les méthodes électrophorétiques ont fait l'objet de nombreuses études pour séparer les glycanes. Les développements se sont essentiellement concentrés sur les méthodes d'électrophorèse capillaire. En effet, l'EC avec sa très grande capacité de pic et sa consommation très faible d'échantillon est considérée comme une méthode très intéressante pour l'étude d'échantillons biologiques. Comme mentionné dans la partie II.1.3, la dérivation des glycanes est incontournable en EC puisqu'elle permet l'apport de charge aux glycanes neutres et permet d'utiliser des détections par UV ou fluorescence.

II.2.1.1. Electrophorèse capillaire de zone

L'ECZ constitue un outil performant pour l'analyse des glycanes (Mittermayr *et al.*, 2013). Afin d'améliorer la sélectivité de l'ECZ, il est possible par exemple d'utiliser la complexation des cis-diols avec les ions borates à pH alcalin comme pour la séparation des glycoformes (Hoffstetter-Kuhn *et al.*, 1991).

La séparation des oligosaccharides peut également être améliorée grâce à l'utilisation de capillaires ayant des revêtements neutres. En effet, la séparation de glycanes marqués est essentiellement dirigée par les charges apportées par fluorophore employé. Ainsi, quelle que soit la taille des oligosaccharides (tri- ou tétra-antennés ou de plus petit volume hydrodynamique) leurs mobilités électrophorétiques sont très proches et négligeables en comparaison avec la μeo . Afin de mieux visualiser les différences de mobilité, une réduction du FEO dans les capillaires en utilisant un revêtement neutre améliore la résolution dans le cas d'analyse de glycanes (Figure 40). Pour cela,

différents types de revêtements permanents ou dynamiques ont été testés. Certains polymères peuvent directement être ajoutés dans le tampon de séparation, comme par exemple l'hydroxypropyl cellulose (HPC) (Yodoshi *et al.*, 2013). Des revêtements permanents comme l'alcool polyvinylique (PVA) ou le polyacrylamide (PAA) ont également été testés pour l'analyse de glycanes. L'utilisation de deux couches de PVA a permis d'obtenir une meilleure homogénéité au niveau du recouvrement des silanols se traduisant par une séparation avec de meilleures répétabilités que les traditionnels monocouches (CV des temps de migration de 0,6% au lieu de 1,2%) (Zhang *et al.*, 2015).

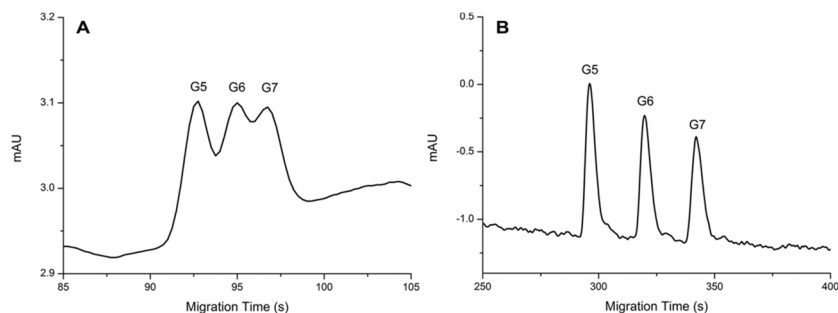


Figure 40 : Séparation des trois maltooligosaccharides standards (G5, G6, G7) sur un capillaire de silice fondue (A) et sur un capillaire avec un revêtement double couche de PVA (B) avec une détection UV d'après (Zhang *et al.*, 2015)

La détection peut être effectuée par UV qui malheureusement est peu sensible et nécessite généralement des concentrations autour du mM (à 195 nm). Pour surmonter ce manque de sensibilité, une détection par fluorescence induite par laser (LIF) ou par spectrométrie de masse (partie II.2.1.3) plus sensible que l'UV permet d'atteindre des sensibilités de l'ordre du μM et fM respectivement.

La CZE peut avoir un très grand pouvoir de résolution pour la séparation de glycanes. EN effet, il est possible de séparer des isomères de position lorsque l'échantillon contient peu de glycanes comme par exemple pour l'étude de glycanes issus d'anticorps monoclonaux (Feng *et al.*, 2017a; Mechref *et al.*, 2005). Cependant lorsqu'un échantillon plus complexe est analysé par ECZ, la résolution obtenue est moins satisfaisante (Figure 41). La séparation de glycanes sialylés, se différenciant par leur nombre de charge est plus aisée que pour les autres glycanes non chargés.

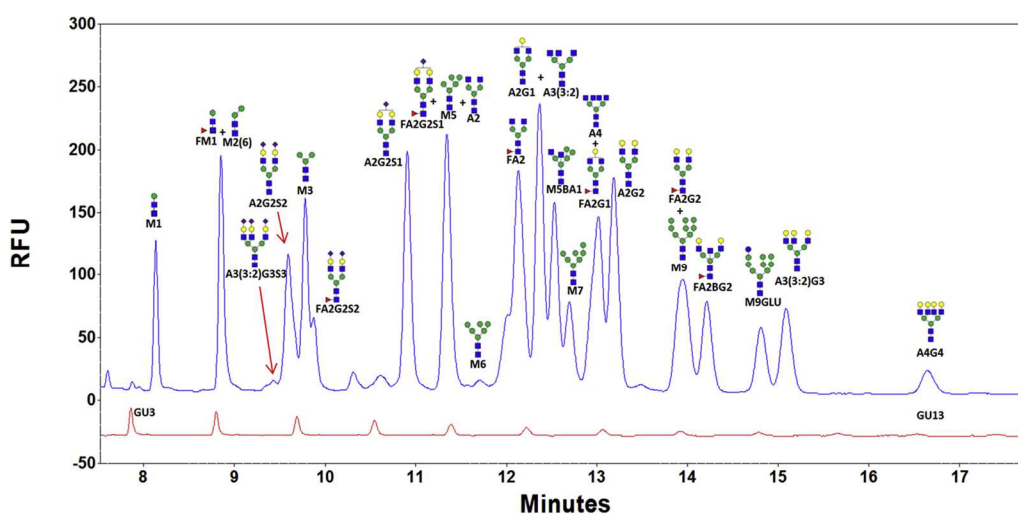


Figure 41 : Profil obtenu par ECZ d'un mélange de 26 N-glycanes dérivés par l'APTS (bleue) et d'une échelle dextrane (rouge) d'après (Feng *et al.*, 2017b)

L'ECZ est une méthode analytique permettant de séparer avec une résolution très satisfaisante des glycanes issus de glycoprotéines standards ou d'anticorps monoclonaux. Cependant, lors de l'étude de mélanges complexes, comme pour les glycanes issus de fluides biologiques, la qualité de séparation n'est pas suffisante. L'emploi d'une technique plus résolutive comme l'ECG ou plus spécifique telle que l'EC-SM est alors indispensable.

II.2.1.2. Electrophorèse capillaire en gel avec détection par fluorescence induite par laser (ECG-LIF)

Depuis son introduction dans les années 1990, l'APTS constitue le meilleur choix et demeure le fluorophore le plus utilisé en ECG (Lu *et al.*, 2018). En effet, la dérivation par l'APTS apporte 3 charges négatives supplémentaires à tous les glycanes, y compris les glycanes neutres, assurant ainsi leur migration lors de la mise sous tension (Guttman & Pritchett, 1995; Guttman *et al.*, 1996).

Le développement de méthodes ECG-LIF de glycanes dérivés par l'APTS a donné naissance à un kit nommé « N-CHO Carbohydrate Labeling and Analysis kit » commercialisé maintenant par Sciex®. Ce kit permet de séparer des N-glycanes marqués par l'APTS à l'aide d'un capillaire recouvert par un revêtement en PVA ainsi que d'un gel composé notamment d'un tampon à 25 mM d'acétate à pH 4,75 avec 0,4% d'oxyde de polyéthylène (PEO) (Guttman *et al.*, 1996). Afin de démontrer l'applicabilité de cette méthode d'électrophorèse capillaire en gel (ECG)-LIF à l'industrie pharmaceutique, 16 laboratoires indépendants (laboratoires académiques, industries pharmaceutiques et autorités réglementaires) ont testé la préparation ainsi que l'analyse de N-glycanes APTS (Szekrényes *et al.*, 2016). Leurs résultats ont montré une très grande reproductibilité confirmant l'usage de cette méthode dans le monde industriel pour le contrôle qualité de lots de glycoprotéines thérapeutiques entre autres ($0,80 \leq \%RSD \leq 2,63\%$ pour les aires des pics pour les pics ayant une aire relative supérieure à 1% et $\%RSD=2,24$ pour les temps de migration).

Cette méthode a depuis été appliquée à divers échantillons pour caractériser la glycosylation d'anticorps monoclonaux (Szekrényes *et al.*, 2015) mais aussi à des fins de diagnostic. En effet elle a été employée notamment pour réaliser le N-glycanome chez des patients atteints d'un cancer ovarien en phase aigüe (Weiz *et al.*, 2016a), ou sur l'haptoglobuline dans le cadre de maladies pulmonaires (Váradí *et al.*, 2013). Ces études ont mis en évidence des modifications de glycosylation, à savoir des changements d'abondance pour certains glycanes qui pourraient être de biomarqueurs potentiels de ces pathologies. Par exemple, l'analyse glycomique pour l'étude des patients atteints d'un myélome multiple a montré des différences statistiques pour certains glycanes entre les différents groupes (sains, malades, malades sous traitement et en rémission) (Figure 42)(Kovacs *et al.*, 2017).

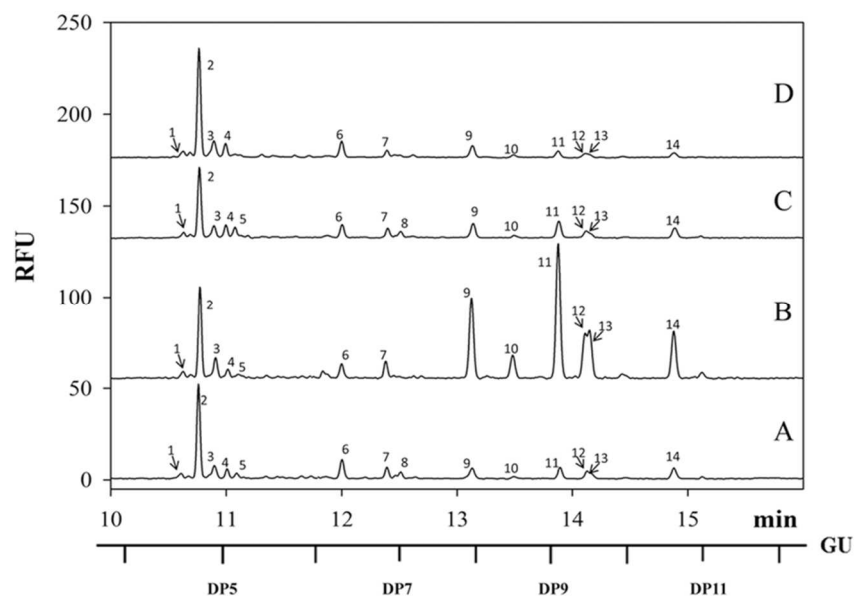


Figure 42 : Profils obtenus par ECG-LIF de l'analyse de N-glycanes dérivés par l'APTS issus de sérum d'individus sains (A), de patients atteints d'un myélome multiple non traité (B), traité (C) et de patients en phase de rémission (D) d'après (Kovacs *et al.*, 2017)

Afin de rendre possible des analyses à haut débit, un nouveau kit appelé « Fast Glycan Analysis and Labeling » a été commercialisé par Sciex depuis 2017. Ce kit permet de réaliser la préparation d'échantillon (voir partie II.1.5) et l'analyse des glycanes-APTS en ECG-LIF en moins de 4h (Váradí *et al.*, 2014). Cette méthode de préparation d'échantillon a même été entièrement automatisée grâce à l'emploi de robots pipeteur (Szigeti *et al.*, 2016). Ce kit permet également d'améliorer la résolution des profils obtenus grâce à un nouveau gel de séparation. D'autres développements ont été réalisés avec notamment le multiplexage de plusieurs capillaires permettant l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, assurant ainsi un gain de temps pour l'analyse des nombreux échantillon issus de cohortes (Ruhaak *et al.*, 2013; Ruhaak, *et al.*, 2010; Ruhaak *et al.*, 2014). Ruhaak *et al.* ont ainsi réalisé le profil des N-glycanes issus de l'AAT et des immunoglobulines A (IgA) du plasma de plus de 2400 participants d'âge et de sexe différents à l'aide de 48 capillaires en parallèle (Ruhaak *et al.*, 2013). Cette étude a montré que les modifications de glycosylation observées pour les IgA étaient principalement liées au sexe des individus tandis que les changements pour l'AAT étaient associés à l'âge ainsi qu'à des paramètres liés à des pathologies cardiovasculaires et inflammatoires (cholestérol, triglycéride, HDL, glycémie, insuline, protéine C réactive ...). La même instrumentation a été utilisée pour mener une étude glycomique à partir d'échantillons de plasma de femmes tout au long de leur grossesse. Cette étude a dévoilé des modifications de glycosylation pour 16 glycanes qui contribuent peut-être à l'immunosuppression. Les glycanes sialylés bi-, tri- et tétra-antennés ont une abondance plus élevée et les glycanes bi-antennés avec maximum un acide sialique étaient moins abondants. Cette méthode commerciale ECG-LIF est également hautement résolutive car elle a aussi permis la détection et la quantification de 34 isomères (de position ou de type de liaisons glycaniques) de glycanes issus du sérum de patientes atteintes d'un cancer des ovaires (Schwedler *et al.*, 2014).

Récemment, une étude sur la température a montré l'influence de celle-ci sur la résolution observée pour des glycanes standards biantennés ou oligomannosidiques lors de l'utilisation du kit « Fast Glycan Analysis and Labeling », suggérant ainsi la mise en place d'un gradient de température pour améliorer la qualité de séparation des glycanes (Szigeti & Guttman, 2017). En effet, la résolution entre deux paires de pics est différente selon la température du capillaire, certaines étant meilleures à

basse température et d'autres à haute température (Figure 43). L'emploi du gradient de température (entre 15°C et 45°C par pallier de 15°C/min) permet d'optimiser la résolution pour chacun des pics.

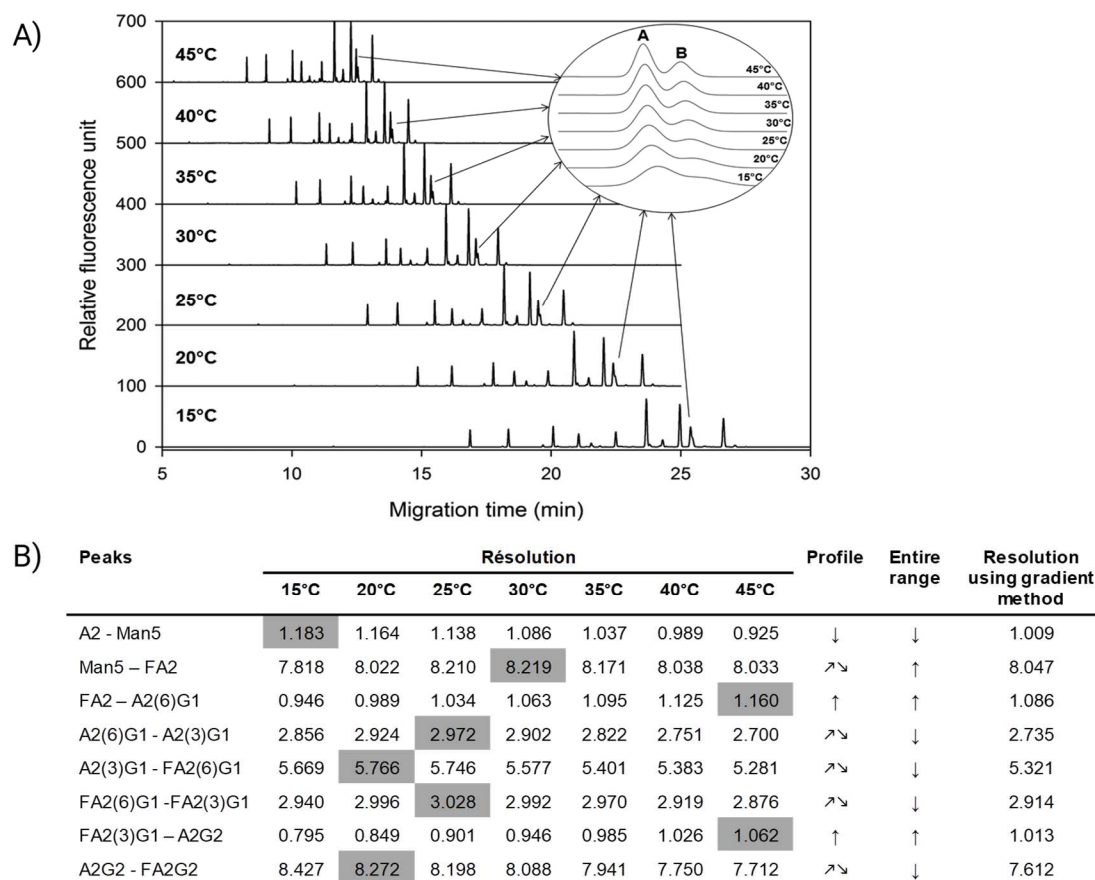


Figure 43 : Profils obtenus pour la séparation de N-glycanes dérivés par l'APTS en ECG-LIF en fonction de la température du capillaire (A) et tableau récapitulant les résolutions obtenues pour chaque paire de pics en fonction des températures du capillaire et pour la méthode utilisant le gradient de température d'après (Szigeti & Guttman, 2017)

Ainsi, la séparation ECG-LIF réalisée après dérivation par l'APTS est tout à fait compatible avec la recherche de biomarqueurs de pathologies dans les fluides biologiques puisque la méthode est suffisamment sensible pour observer de faibles variations d'intensité des pics et très résolutive pour séparer les structures isomères. La reproductibilité très élevée des temps de migration et des aires relatives. La disponibilité de ce kit commercial permet une utilisation directe et rapide sans développement de méthode de séparation complexe. Cette méthode reste la méthode la plus simple et performante pour réaliser le profil glycomique de fluides biologiques. (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2018)

II.2.1.3. Electrophorèse capillaire avec détection par spectrométrie de masse (EC-SM)

Afin de coupler la séparation d'espèces structurales proches et leur identification directe, le couplage de l'EC à la SM a été étudié et plusieurs revues rassemblent ces développements (Mechref, 2011; Mechref & Novotny, 2009; Zaia, 2013). Ce couplage nécessite de prendre en compte quelques contraintes techniques à savoir l'utilisation de tampons de séparation compatibles avec la SM mais qui engendrent des pertes de résolution ainsi qu'un débit en sortie de capillaire très faible (1–100nL) par rapport au débit aux interfaces des spectromètres de masse qui est de l'ordre de 1-200µL (Mechref,

2011). L'interface entre les deux systèmes peut avoir différentes configurations : avec ou sans liquide additionnel. L'utilisation de liquide additionnel permet de contourner le faible débit de l'EC mais provoque une dilution importante des analytes, diminuant, de fait, la sensibilité. Pour éviter cette perte de sensibilité, un autre système, reposant sur un capillaire rendu poreux à son extrémité et ne nécessitant pas de liquide additionnel a été développé (Moini, 2007).

Tout comme pour les méthodes précédentes, les glycanes sont dérivés, en principe avec de l'APTS (S. C. Bunz *et al.*, 2013; Möginger *et al.*, 2018; Reusch *et al.*, 2015) même si quelques groupes ont utilisé le 2-AA (Váradi *et al.*, 2016a). L'apport des charges négatives est alors nécessaire à la fois pour la migration en électrophorèse mais aussi pour l'ionisation en SM en mode négatif. La double détection, SM et LIF, permet d'obtenir une quantification directe grâce au LIF et la SM permet l'identification des espèces. Une quantification relative en EC-SM peut également être obtenue grâce à l'emploi de glycanes marqués TMT. Cette méthode a été testée sur des glycanes issus de glycoprotéines standards et a permis d'obtenir des quantifications plus précises qu'avec les fluorophores classiques (Zhong *et al.*, 2015).

L'électrolyte est généralement composé d'eau et de méthanol contenant soit un acide (acide acétique, formique...) soit une base (hydroxyde d'ammonium) soit un sel compatible avec la SM (ammonium acétate, formate, carbonate...) (Zhang *et al.*, 2018). Comme vu précédemment, diminuer le FEO pour augmenter la résolution des séparations est également une étape nécessaire en EC-SM. L'utilisation d'un tampon acide conduit à une ionisation limitée des silanols et permet donc de réduire le FEO. Lors de l'utilisation d'un tampon moins acide, le FEO peut être supprimé à l'aide d'un revêtement permanent (PVA, PAA). L'ajout de solvant organique peut permettre d'améliorer la forme des pics cependant la quantité ajoutée doit être optimisée car le méthanol a également tendance à provoquer une augmentation des temps de migration (à cause d'une viscosité plus importante). Afin d'obtenir la meilleure séparation possible de glycanes dérivés il est donc nécessaire d'optimiser systématiquement le tampon d'analyse en termes de nature et de pH et aucune méthode standard ne peut être appliquée à tous types d'échantillons comme c'est le cas en ECG-LIF. Les glycanes possédant des nombres d'acides sialiques différents seront plus facilement

Les applications reportées dans la littérature concernent la caractérisation des glycanes issus de glycoprotéines standard et d'anticorps monoclonaux (Bunz *et al.*, 2013) ou l'analyse d'échantillons biologiques tels que le sérum ou la peau (Jayo *et al.*, 2012; Möginger *et al.*, 2018). En effet, Snyder *et al.* ont utilisé l'EC-SM pour la détection de N-glycanes neutralisés (acides sialiques dérivés par méthylation) puis dérivés par l'APTS issus de sérums humains (Snyder *et al.*, 2017). Lors de cette étude, la séparation en EC-SM est réalisée en moins de 15min mais la qualité de séparation est faible. Cependant, grâce à la spécificité de la SM, il est possible de distinguer les temps de migration observés pour chaque type de glycanes. Ce travail a permis de déterminer 77 structures potentielles de glycanes présents dans le sérum humain soit 31 de plus que dans les études précédentes.

Le couplage EC-SM doit encore être amélioré pour proposer des séparations avec des sensibilités encore plus importantes afin de pouvoir détecter des espèces très peu abondantes qui seront des biomarqueurs potentiels lors d'analyses à visée diagnostique.

De toutes les méthodes électrophorétiques disponibles décrites dans cette partie, l'ECG-LIF constitue la meilleure option pour l'étude des glycanes issus de fluides biologiques. En effet, cette

méthode est quantitative, très résolutive (séparation des isomères de position) et très sensible. De plus, des kits commerciaux, prêts à l'emploi, sont disponibles pour réaliser la préparation des échantillons ainsi que l'analyse par ECG-LIF.

II.2.1.4. Méthodes d'identification des glycanes

Lorsque la détection de la méthode électrophorétique n'est pas réalisée par SM mais par UV ou LIF, plusieurs techniques d'identification des glycanes sont envisageables pour déterminer leur structure et les types de liaisons présentes.

Tout d'abord, l'identification des espèces présentes peut se faire par comparaison des temps de migration observés pour l'analyte est avec ceux d'un calibrant de dextran (mélange d'oligomères linéaires du glucose compris entre 2 et 15 glucoses). Cette comparaison permet de transformer les temps de migration de l'échantillon en valeurs d'unité de glucose (GU) pour chacun des glycanes. A l'aide de tables de données il est possible de remonter à la structure associée au nombre de GU calculé, ce travail peut être effectué par l'application appelée GUcal (Jarvas *et al.*, 2015).

Une autre possibilité est l'utilisation d'exoglycosidases en série. Ces enzymes digèrent spécifiquement certains monosaccharides à partir de l'extrémité non-réductrice du glycanes. Ainsi, elles peuvent également avoir une spécificité encore plus fine avec par exemple le type de liaison carbone-carbone ou l'anométrie (α ou β). Ainsi une digestion avec plusieurs exoglycosidases jusqu'à l'obtention du noyau pentasaccharidique permet de confirmer les structures pressenties (Figure 44). Dans le cas de N-glycanes, ce type de procédure débute par l'emploi d'une sialidase pour retirer les acides sialiques, suivie par une fucosidase spécifique des Fuc sur les antennes en α 1-3,4 puis d'une fucosidase spécifique au Fuc sur le GlcNAc terminal. Ensuite, une digestion par une galactosidase puis par une hexosaminidase permet d'obtenir le profil du noyau pentasaccharidique. Une acquisition est réalisée entre chaque digestion pour attribuer les décalages de temps de migration observés sur le profil au monosaccharide retiré et remonter ainsi à la structure glycanique d'origine.

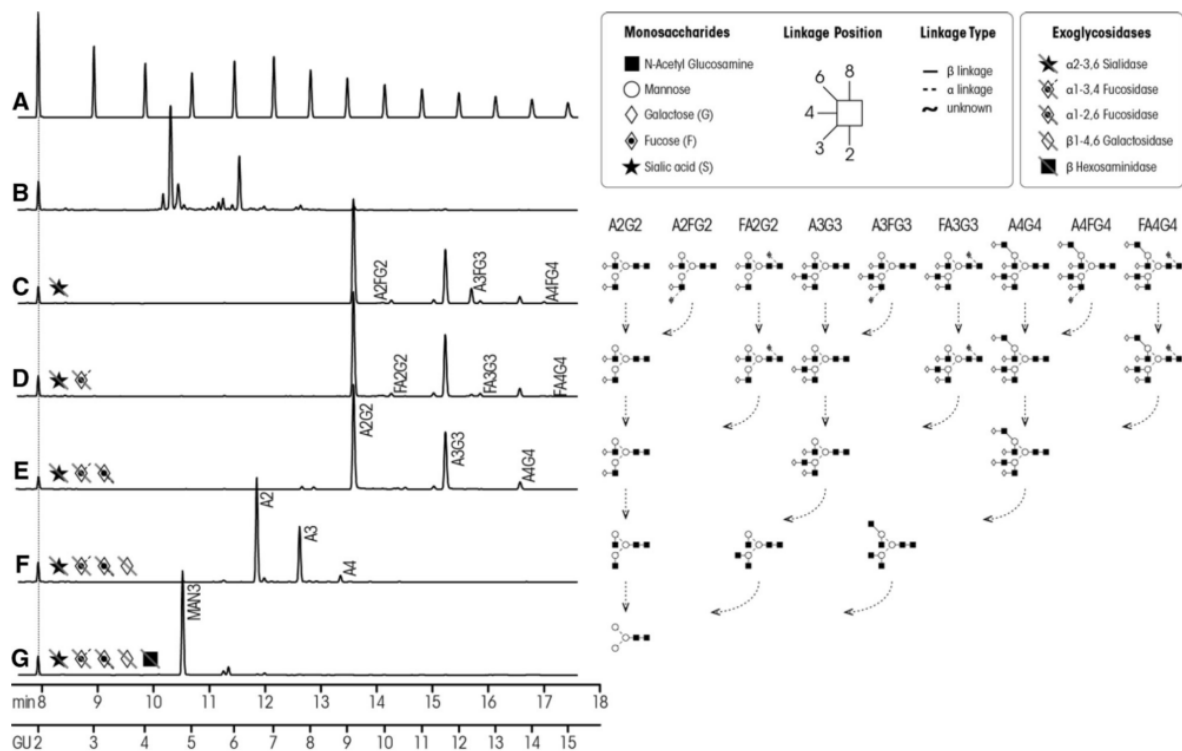


Figure 44 : Identification des N-glycanes d'un standard d'haptoglobuline à l'aide de digestions par des exoglycosidases en EC-LIF. Ladder de maltooligosaccharide (A), N-glycanes d'haptoglobine non digérés (B), digestions en série par sialidase α -2,3/ α -2,6 (C), fucosidase α -1,3/ α -1,4 (D), fucosidase α -1,6, galactosidase (F), hexosaminidase (G). d'après (Váradi et al., 2013)

La dernière technique repose sur la reconnaissance des glycanes par les lectines, même s'ils ont été dérivés par fluorescence (Kinoshita & Kakehi, 2014). Cette méthode appelée électrophorèse capillaire d'affinité s'effectue en deux étapes (Figure 45). Tout d'abord une séparation sans lectine est exécutée puis une deuxième analyse est réalisée en présence de lectines dans le tampon de séparation. Si une interaction entre la lectine et un glycanes a lieu, un changement important de la mobilité du complexe, vers des temps de migration plus élevés, par rapport au glycanes seul est observé. Cette modification de la migration est souvent accompagnée par un élargissement des pics. Les glycanes n'étant pas reconnus par ce type de lectine auront une mobilité inchangée en présence de la lectine. Il est possible également d'employer une série de lectines pour faciliter l'identification des glycanes (Yamashita & Ohkura, 2014). Cette technique présente des inconvénients puisqu'il est généralement nécessaire d'adapter la composition, le pH et la concentration du tampon de séparation à la présence de lectines et celles-ci peuvent compliquer les analyses en s'adsorbant sur les parois du capillaire.

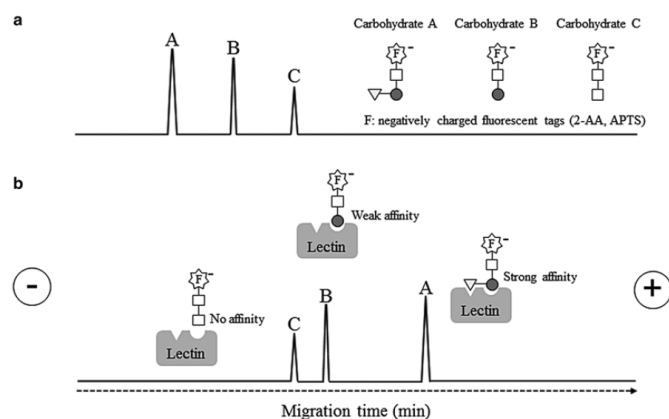


Figure 45 : Principe de l'identification avec les lectines. Séparation sans lectine (a) puis avec lectine (b) d'après (Kinoshita & Takehi, 2014).

II.2.2. Analyse par méthodes chromatographiques

Afin de séparer les oligosaccharides, les méthodes chromatographiques ont été particulièrement développées et divers modes de séparation ont été étudiés depuis 1980. La détermination de la structure nécessite l'utilisation d'une échelle dextrane dérivée ainsi que d'un logiciel bio-informatique permettant d'attribuer la structure inconnue grâce aux temps de rétention observés en comparaison avec celle du standard. Cependant, comme la détection par fluorescence ne permet pas d'identifier la structure des glycanes nouveaux ou jusqu'alors non caractérisés, la SM s'est largement imposée comme détecteur principal ces dernières années pour l'analyse de glycanes en LC. En effet, le couplage avec la SM permet de surmonter ce frein en permettant une élucidation des structures des glycanes grâce à une identification directe des analytes. De plus, ce couplage à la SM permet de s'affranchir d'une très grande sélectivité et bonne résolution facilitant l'analyse des espèces. Ainsi, même si les espèces se recouvrent, la spécificité de la SM permet de surmonter cet inconvénient et d'extraire un chromatogramme pour un ion précis. Cependant les espèces isomères ne pouvant pas être séparées par la SM il faut que la méthode chromatographique le puisse. Les avancées en matière de séparation chromatographique, notamment le développement de colonnes remplies des particules de diamètre inférieur à 3 μ m ont permis d'améliorer les performances de séparation jusqu'à obtenir une séparation d'isomères dérivés avec du 2-AB (Ahn *et al.*, 2010) mais aussi de réduire fortement les temps d'analyses.

Les différents modes de chromatographie liquide envisageables pour la séparation d'oligosaccharides vont être détaillés dans la suite de cette partie.

II.2.2.1. Chromatographie d'échange d'anions en milieu très alcalin

A un pH très basique (pH > 12), les groupements hydroxyles des carbohydrates considérés comme des acides faibles sont chargés négativement du fait de la formation d'oxanions. Ainsi, de faibles différences de pKa (compris entre 12 et 14) dues aux différences de composition et de conformation des glycanes, mais aussi à l'apport de charges négatives par les acides sialiques, permettent de réaliser des séparations sélectives des oligosaccharides en milieu basique. La détection est le plus souvent réalisée par ampérométrie pulsée (PAD), permettant d'éviter la dérivation des glycanes.

L'HPAEC-PAD a été largement utilisée dans les années 1990 et 2000 mais elle est peu fréquente actuellement même si on trouve quelques applications sur des N-glycanes natifs issus d'IgG (Rohrer *et al.*, 2016) ou d'autres glycoprotéines standards (Szabo *et al.*, 2017). L'HPAEC est très sélective puisqu'elle permet par exemple la séparation de structures isomères ne se différenciant que par le type de liaison de l'acide sialique au Gal dans les N-glycanes (liaison α -2,3 ou α -2,6) (Townsend *et al.*, 1989).

Le couplage avec la SM est également possible mais a longtemps été limité à cause de la grande quantité de sels nécessaire pour l'élution qui contraint à ajouter d'une étape de dessalage voire également d'ajout de sels de lithium pour augmenter la sensibilité des glycanes neutres en mode positif (Bruggink *et al.*, 2005). Le couplage avec la SM a permis d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 100 fM avec une sensibilité meilleure en SM qu'en PAD lors de l'analyse de N-glycanes issus de la partie Fc de plusieurs IgG (Figure 46) (Maier *et al.*, 2016). En comparant les profils observés en PAD et en SM il apparaît que même si la résolution est légèrement moins satisfaisante en SM, elle reste acceptable puisque des isomères de position sont séparés.

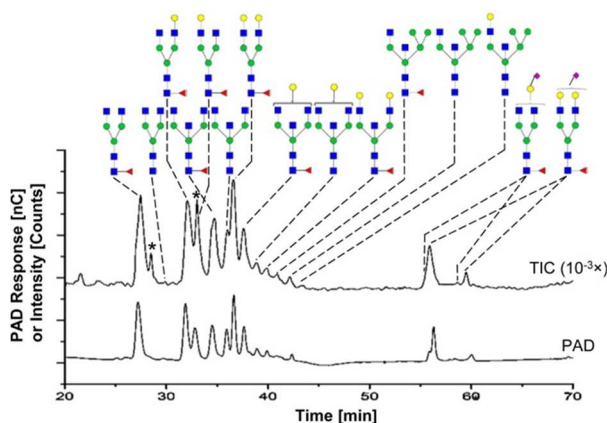


Figure 46 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en HPAEC-PAD (A) et HPAEC-MS (TIC) (B) pour un mélange de N-glycanes issus d'une IgG humaine purifiée d'après (Maier *et al.*, 2016)

L'HPAEC-PAD est une technique résolutive cependant elle reste moins sélective et sensible que les méthodes avec détection par fluorescence (sensibilité entre 10 et 100 pmol) ce qui peut être un facteur limitant lors de la recherche de biomarqueurs potentiels de pathologies. Le couplage de l'HPAEC avec la SM reste complexe et peu employé.

II.2.2.2. Chromatographie liquide à polarité de phase inversée

Une revue de 2017 résume les différents types de séparations de glycanes obtenues en RP-HPLC (Vreeker & Wuhrer, 2017)

II.2.2.2.1. Colonnes greffées par des chaînes alkyles

Les oligosaccharides étant très polaires, ce mode est donc plutôt utilisé pour des chaînes oligosacchariques dérivées par des fluorophores de nature apolaire ou perméthylées. Cependant, la résolution obtenue dépend de la taille du marqueur utilisé, s'il est trop imposant, la rétention sera gouvernée essentiellement par le marqueur et les différences structurales des glycanes seront alors masquées. Ainsi, l'emploi de marqueurs de petites tailles, comme par exemple le 2-AP, le 2-AA ou encore le 2-AB est conseillé. Selon le marqueur utilisé pour la dérivation, la séparation sera affectée. Cependant, quel que soit le marqueur, la séparation en phase inverse semble toujours permettre de

rassembler les glycanes d'un même type (non-fucosylés, oligomannosidiques, complexes sialylés ..) même si la résolution n'est pas toujours satisfaisante (Figure 47).(Pabst *et al.*, 2009).

Parfois, l'ajout d'agents de paires d'ions (diéthylamine, triéthylamine) dans la phase mobile permet d'augmenter la rétention des glycanes chargés, contenant par exemple des acides sialiques (Melmer *et al.*, 2011).

La séparation des glycanes dérivés au 2-AB issus de glycoprotéines standards avec une colonne C18 est également possible. Tout comme précédemment, les glycanes sont élués par « famille » (oligomannosidiques, sialylés, hybrides ...) (Chen & Flynn, 2007; Higel *et al.*, 2013) avec une résolution généralement satisfaisante y compris pour des glycanes au sein d'un même groupe (Figure 47).

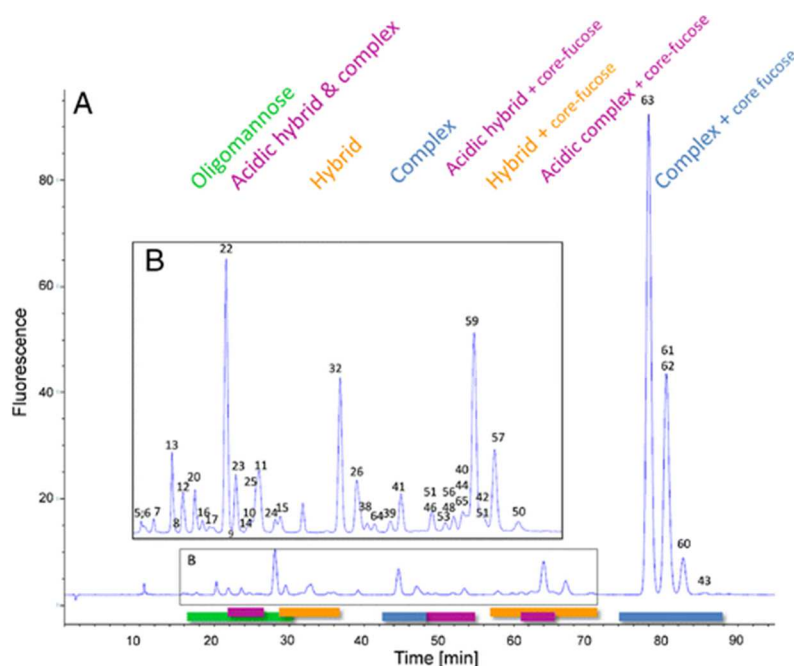


Figure 47 : Séparation de N-glycanes issus d'une IgG dérivés par le 2-AB et séparés sur une colonne C18 avec une détection par fluorescence et descriptions des groupes de glycanes rassemblés sous une même couleur (Higel *et al.*, 2013).

Les développements les plus récents sur le mode à polarité de phase inversée concerne le test de colonnes de nano-LC (Hu *et al.*, 2016; S. Zhou *et al.*, 2016), avec des débits de phase mobile autour de 300 nL/min qui permettent d'améliorer les séparations des glycanes perméthylés avec une consommation d'échantillon plus faible. Les temps d'analyse sont alors plus courts (moins de 40 min pour l'analyse des N-glycanes issus du plasma contre près de 90min pour le système UHPLC) ce qui peut être intéressant lors d'études de cohortes avec de très nombreux patients.

Les colonnes greffées par des chaînes alkyles sont nettement moins utilisées actuellement depuis le développement des colonnes en carbone graphite ou de la chromatographie HILIC qui présentent de meilleures performances séparatives notamment en termes de résolution.

II.2.2.2.2. Colonnes poreuses de carbone graphite

Les colonnes en carbone graphite (PGC) permettent de séparer les glycanes dérivés mais aussi les glycanes natifs non dérivés contrairement aux colonnes greffées C18 (Chu *et al.*, 2009). Le

mécanisme de rétention des oligosaccharides repose sur des interactions hydrophobes mais aussi sur des interactions polaires (J. Q. Fan *et al.*, 1994) et ioniques (Pabst & Altmann, 2008). Ces colonnes présentent l'avantage d'avoir une très grande surface spécifique avec une porosité de l'ordre de 80%, de très bonnes stabilités mécanique, chimique (gamme de pH de 0 à 14) et thermique (Hajba *et al.*, 2016). De plus la phase mobile contient peu de solvant organique, cependant le choix de ce solvant est important puisqu'il influence le mécanisme de rétention (Melmer *et al.*, 2010).

Les colonnes PGC sont une technologie récente qui emploie la plupart du temps une détection par SM. Il apparaît que la plupart des séparations dans ce cas sont menées à pH alcalin (ammonium bicarbonate pH ≥ 8) et en mode d'ionisation négative. En effet, le mode négatif permet une meilleure ionisation des glycanes de type complexes sialylés et diminue celle des glycanes neutres. Cependant cette ionisation sélective crée malheureusement un biais par rapport à la composition initiale de l'échantillon. Ainsi, si le mélange analysé contient à la fois des glycanes neutres et des glycanes sialylés, une analyse en mode positif donnera une image plus juste de l'échantillon réel (Pabst & Altmann, 2008) ce qui est plus avantageux lors de la recherche de biomarqueurs potentiels de pathologies. L'analyse des glycanes perméthylés est également possible par PGC-SM.

Les colonnes PGC sont capables de discriminer différents isomères de position et de liaison (comme les branchements α -2,3 et α -2,6 des acides sialiques) permettant ainsi de séparer des structures isobares lorsque les sucres sont réduits (pour éviter de voir l'anométrie) (Figure 48) (Hu *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017; Stavenhagen *et al.*, 2015). Les glycanes sont alors séparés selon leur taille, le motif de leurs antennes ainsi que le nombre et le type de liaisons avec les résidus d'acide sialique (Pabst *et al.*, 2007). Le pouvoir séparatif des colonnes PGC est, de fait, bien plus élevé que celui des colonnes de C18.

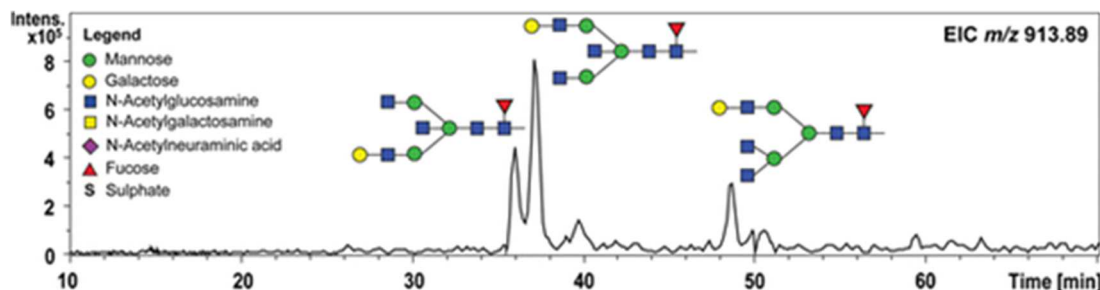


Figure 48 : EIC à 913.89 m/z montrant la séparation de trois isomères de N-glycanes issus du côlon d'un patient atteint de colite ulcéreuse en PGC-LC-ESI-IT-MS d'après (Stavenhagen *et al.*, 2015)

La chromatographie PGC permet d'obtenir d'excellentes séparations avec la résolution d'isomères de position ou de liaison et correspond à une approche efficace pour analyser les échantillons issus de fluides biologiques.

II.2.2.3. Chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

La chromatographie HILIC met en jeu une phase stationnaire très polaire (silice, amine, hydroxy, ou amide) et une phase mobile contenant une grande proportion de solvant organique (souvent acétonitrile) (Alpert, 1990). Le gradient d'élution tend vers une phase mobile de plus en plus aqueuse (jusqu'à au moins 50% d'eau avec des sels ou acide à moins de 100 mM) pour permettre l'élution des composés par ordre d'hydrophilie croissante (Wuhrer *et al.*, 2009). Les analytes sont retenus sur la phase stationnaire par des liaisons hydrogène, des interactions ioniques et dipôle-dipôle en fonction de

leur taille, charge, structure, du type de liaison inter-monosaccharidiques et composition (Mariño *et al.*, 2010). La rétention reste néanmoins basée essentiellement sur le nombre de groupements polaires présents rendant les profils obtenus prédictibles (Pabst & Altmann, 2011). Il est cependant à noter que les marqueurs fluorescents apportent généralement des groupes apolaires, rendant la rétention des glycanes dérivés plus faible que celle des natifs.

Ce type de chromatographie est très utilisé pour le dépistage de biomarqueurs de pathologies (Gudelj *et al.*, 2018; Link-lenczowski *et al.*, 2018) et le contrôle qualité de glycoprotéines thérapeutiques (Cowper *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2014). En effet, l'HILIC est très appréciée pour sa capacité à séparer les isomères, et ce, même pour des structures ne différenciant que par le type de liaison reliant l'acide sialique (liaison α -2,3 ou α -2,6) comme montré sur la Figure 49 (Tao *et al.*, 2014). Ce type de différenciation permet une quantification individuelle des glycanes, ce qui est d'une importance majeure dans le cadre d'étude de biomarqueurs de pathologies.

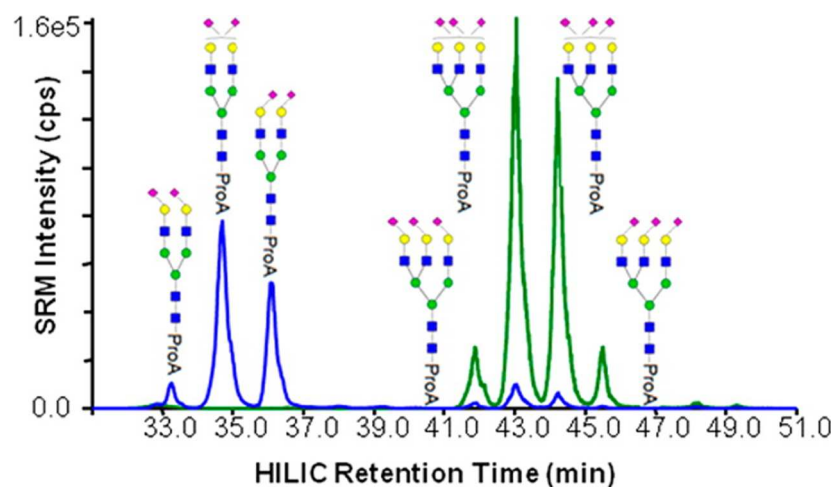


Figure 49 : EIC obtenu lors de la séparation par HILIC-SM de N-glycanes issus de la fétuine et dérivés par la procaïnamide (ProA) (Tao *et al.*, 2014)

De nombreux efforts ont été menés pour développer des méthodes automatisées pour réaliser la déglycosylation, la dérivation avec un fluorophore, l'analyse sur colonne HILIC avec une détection par fluorescence (sensibilité de l'ordre du fM) et une assignation automatique des structures grâce à une base de données glycoBase (www.nibr.ie/glycobase/show_nibr.action) ainsi qu'une digestion par des exoglycosidases pour confirmer les structures pressenties (Royle *et al.*, 2008; Stöckmann *et al.*, 2015a) à haut débit. Ce type de méthode d'analyse automatisée a été employé lors d'études glycomiques de cohortes regroupant un très grand nombre de d'individus, autour de 2000 personnes (Knežević *et al.*, 2010; Ruhaak *et al.*, 2011), qui ont montré la variabilité et l'hérédité des N-glycanes au sein de larges populations.

Les derniers développements concernent essentiellement l'utilisation de nouvelles colonnes d'UHPLC contenant des particules de diamètre inférieur à 2 μ m, afin d'obtenir une plus grande efficacité avec des temps d'analyse beaucoup plus courts tout en limitant la consommation de solvants (Doherty *et al.*, 2013; Stöckmann *et al.*, 2015b). Ces temps d'analyse raccourcis permettent de traiter un plus grand nombre d'échantillons (Zauner *et al.*, 2011). Grâce à une sensibilité accrue, ces colonnes d'UHPLC ont mis en évidence la présence de N-glycanes d'anticorps monoclonaux de faible abondance existant sous différentes structures isomères (Zhao *et al.*, 2016).

De toutes les méthodes chromatographiques détaillées ci-dessus, L'HILIC est la méthode la plus employée à ce jour pour réaliser l'étude des modifications de glycosylation pour la recherche de biomarqueurs potentiels de pathologies. En effet, ses nombreuses qualités telles que l'excellente efficacité de séparation, la très haute résolution observée (distinction d'isomères de liaisons) et l'excellente répétabilité des temps de rétention en font la méthode la plus adaptée pour l'analyse de glycanes issus de fluides biologiques. Le seul inconvénient des techniques chromatographiques est le temps d'analyse généralement long (environ 1h) et la nécessité d'avoir un volume d'échantillon assez important. Pour contourner ces problèmes, le développement de méthodes basées sur des colonnes de plus petite taille (UHPLC et nanoLC) a permis de réduire ces deux contraintes. Afin d'obtenir les meilleures séparations possibles, le couplage de deux dimensions de chromatographie liquide ayant des modes de séparation différents a déjà été testé afin de combiner les avantages de chaque mode. Ainsi, la chromatographie 2D a permis de réaliser par exemple l'étude approfondie des micro-hétérogénéités d'échantillons d'érythropoïétine ainsi que la détection d'espèces peu abondantes présentes dans le plasma (Bones *et al.*, 2011; Hanneman *et al.*, 2014).

II.2.3. Analyse par méthodes spectrométriques

Comme nous l'avons vu au cours des paragraphes précédents, les techniques chromatographiques et électrophorétiques ne sont souvent pas suffisantes pour obtenir toutes les informations sur la composition des glycanes (nombre et nature des monosaccharides, nature de la liaison anomérique, position des liaisons entre chaque unité monosaccharidique). Afin d'aider la caractérisation des glycanes, l'utilisation de techniques spectrométriques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse et la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse.

II.2.3.1. Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire a également été testée pour analyser des glycanes (Fellenberg *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2014; Sarkar *et al.*, 2015). Elle permet notamment de déterminer les monosaccharides présents et la nature de la liaison anomérique (Battistel *et al.*, 2014). Cette technique peut être assez sensible puisque 100µg suffisent pour caractériser complètement un glycanes avec un appareil à 700 MHz, si la préparation d'échantillon est optimisée et si toute trace d'eau est bien éliminée (Fellenberg *et al.*, 2010). Cependant, il est généralement nécessaire d'avoir des quantités de l'ordre du mg (Duus *et al.*, 2000). De plus, la nécessité d'avoir un échantillon très pur (> 95%) en RMN empêche son application aux échantillons biologiques. La RMN a l'avantage de ne pas être destructive ce qui signifie que l'échantillon est ensuite réutilisable pour une autre méthode d'analyse. Afin d'éviter les analyses très complexes et analyses RMN 2D, le groupe de Vliegthart a montré que les déplacements chimiques observés pour certains protons spécifiques étaient très sensibles à la structure du glycanes et que la comparaison de ces déplacements à la base de données qu'ils ont établis permet de réaliser une caractérisation des glycanes (van Kuik & Vliegthart, 1992; Vliegthart *et al.*, 1983). Cette base de données de RMN 1D 1H appelée SweetDB (<http://www.glycosciences.de/sweetdb/>) contient plus de 1400 glycanes différents (Artemenko *et al.*, 2012; Fellenberg *et al.*, 2013). De plus, le traitement des données obtenues est très complexe et nécessite une expertise.

II.2.3.2. Spectrométrie de masse

Comme vu précédemment, le couplage de méthodes séparatives à la spectrométrie de masse est devenu un outil très puissant pour l'identification des glycanes grâce à sa grande sensibilité et la faible consommation d'échantillon. L'interprétation des spectres obtenus en spectrométrie de masse en tandem peut être complexe car ceux-ci dépendent de la méthode de fragmentation employée, du type de dérivation et du profil des ions fils. Elle reste très informative quant à la structure des glycanes. Les deux principales sources d'ionisation utilisées sont l'ESI et le MALDI.

II.2.3.2.1. Source d'ionisation électrospray (ESI)

L'ESI est une technique généralement utilisée en couplage d'une méthode de séparation électrophorétique ou chromatographique (EC-SM ou LC-SM) mais ne sera pas développée ici car elle a déjà été détaillée dans les paragraphes des méthodes EC et LC.

II.2.3.2.2. Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La désorption-ionisation laser assistée par matrice est très largement utilisée lors de l'étude d'oligosaccharides libérés notamment à cause de sa rapidité d'analyse et sa faible consommation d'échantillon. Quelques revues très récentes décrivent ces analyses ainsi que les nombreuses matrices existantes pour étudier les carbohydrates (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2018; Harvey, 2017, 2018) cependant la matrice la plus utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB).

L'un des principaux inconvénients de cette technique est la perte des acides sialiques, fragmentés lors de l'ionisation ou peu de temps après surtout dans le mode reflectron (Harvey, 2011). Pour limiter cette perte, les acides sialiques peuvent être spécifiquement estérifiés (Bladergroen *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2012). En effet, l'utilisation d'un même réactif permet de former des lactones avec les acides sialiques avec une liaison α -2,3 tandis que ceux avec une liaison α -2,6 sont estérifiés. Cette différence de marquage induit une différence de 32Da entre les deux types d'acides sialiques facilitant ainsi leur identification et augmentant leur stabilité en MALDI (Figure 50).

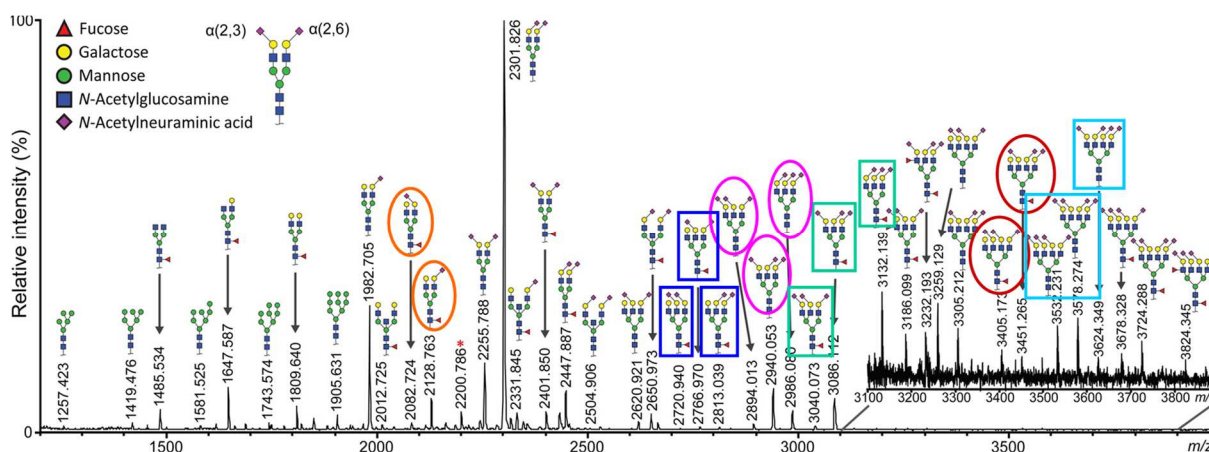


Figure 50 : Spectre SM obtenu par MALDI-TOF pour l'analyse de glycanes estérifiés sous la forme d'adduits $[M+Na]^+$ permettant de séparer les types de liaison des acides sialiques d'après (Bladergroen *et al.*, 2015). Les glycanes encadrés avec la même couleur correspondent à des isomères.

Le MALDI a été employé pour l'étude des N-glycanes et constitue une méthode très classique pour les analyses glycomiques des fluides biologiques après perméthylation pour une analyse en mode positif (Alley *et al.*, 2012; Goyallon *et al.*, 2015; Palmigiano *et al.*, 2018) ou dérivation par le 2-AA pour

une analyse en mode négatif (Balog *et al.*, 2012; Reiding *et al.*, 2017). Il est alors possible de comparer les spectres obtenus pour les différents patients et de conclure sur les modifications de glycosylation observées. Par exemple, l'étude de liquides céphalorachidiens (LCR) de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a permis récemment de montrer une augmentation des glycanes bi-antennés avec un GlcNAc en position bissectrice (Palmigiano *et al.*, 2016).

Les analyses glycomiques par MALDI-TOF sont très informatives et rapides. L'emploi de MALDI permet après estérification des acides sialiques de différencier des isomères de liaison.

II.2.3.3. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse

Ces dernières années, un outil s'est montré très prometteur pour l'analyse des glycanes : la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMS-MS). Les analytes sont tout d'abord ionisés avant d'être introduits dans un tube de dérive. Ils sont alors transportés par un gaz porteur et un gradient électrique. La vitesse de dérive dépend alors de la taille et de la charge de l'ion. En effet, plus il sera gros et plus il entrera en collision avec le gaz porteur ralentissant ainsi sa vitesse.

Cette technique permet la séparation d'isomères et il a été montré que le mode d'ionisation ainsi que la formation d'adduits peuvent avoir une influence sur la qualité de séparation observée. En effet, les adduits peuvent changer la conformation des glycanes qui auront alors une section efficace de collision (CCS) plus grande. Cependant il est impossible de prévoir quelle polarité ou quel adduit donnera la meilleure séparation, il est donc nécessaire de tester les différentes possibilités pour optimiser les séparations (Hofmann & Pagel, 2017). Une base de données GlycoMob (<http://www.glycomob.org>) accessible gratuitement a été créée pour répertorier les valeurs CCSs de glycanes et de leurs fragments (Struwe *et al.*, 2016).

L'IMS-MS a montré son grand pouvoir résolutif car il est possible de différencier des trisaccharides en fonction du type de liaison et de l'anométrie (Figure 51)(Hofmann *et al.*, 2015). Cependant, aucune différence de temps de dérive est observée lorsque le Glc est remplacé par un Gal.

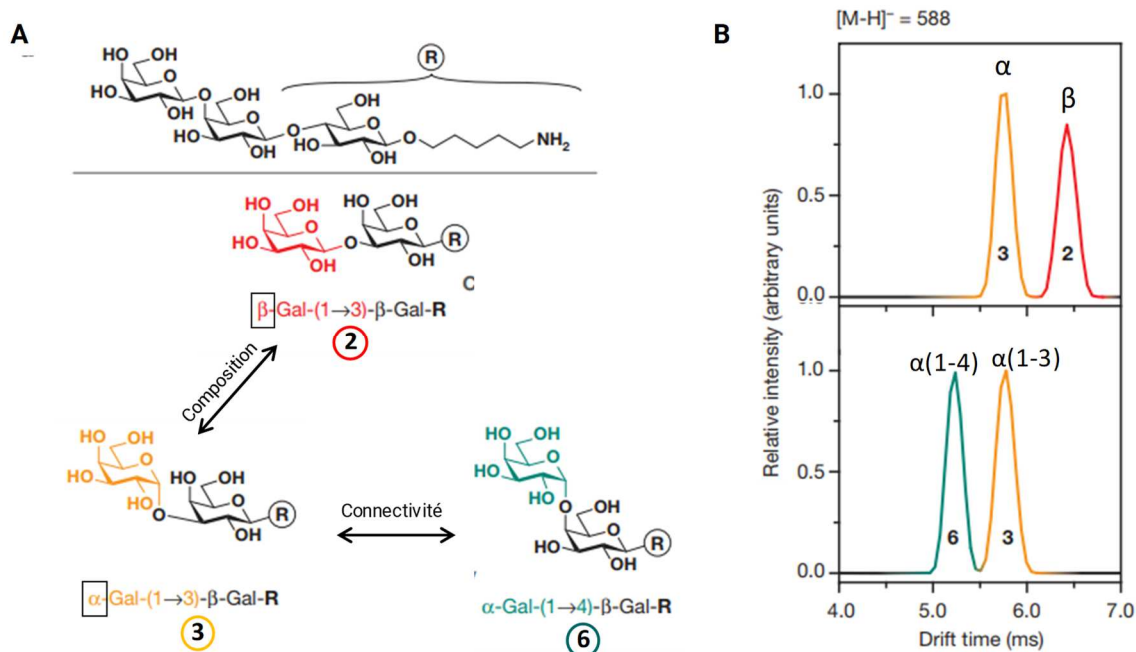


Figure 51 : Etude de l'influence de la composition, de l'anomérisie et du type de liaison de trisaccharides (A) sur les mobilogrammes extraits observés pour les ions $[M-H]^-$ (B) d'après (J. Hofmann *et al.*, 2015). Les valeurs indiquées en Å^2 correspondent aux valeurs de CCSs estimées.

L'IMS-MS a également permis d'obtenir des profils uniques de glycanes et de confirmer les identifications d'une analyse glycomique d'un échantillon d'urine humaine (Vakhrushev *et al.*, 2008). Cette méthode peut également être appliquée pour réaliser du dépistage. En effet, l'utilisation de l'IMS avec des techniques d'analyse de données (analyse en composante principale) a permis de caractériser les N-glycanes de sérum de 81 patients et de différencier les patients atteints d'une cirrhose de ceux atteints d'un cancer du foie (Isailovic *et al.*, 2012). L'IMS-MS permet également de séparer les analytes en fonction de leurs états de charge dans des échantillons complexes (Pritchard *et al.*, 2015). Les ions multi-chargés possèdent une plus grande mobilité que les ions monochargés au même m/z ce qui permet d'isoler les signaux en groupes en fonction de leurs charges (Figure 52B). Ainsi, une extraction sélective d'un groupe particulier permet de simplifier les spectres de masse obtenus en diminuant le bruit de fond ce qui permet une identification des signaux (Figure 52C).

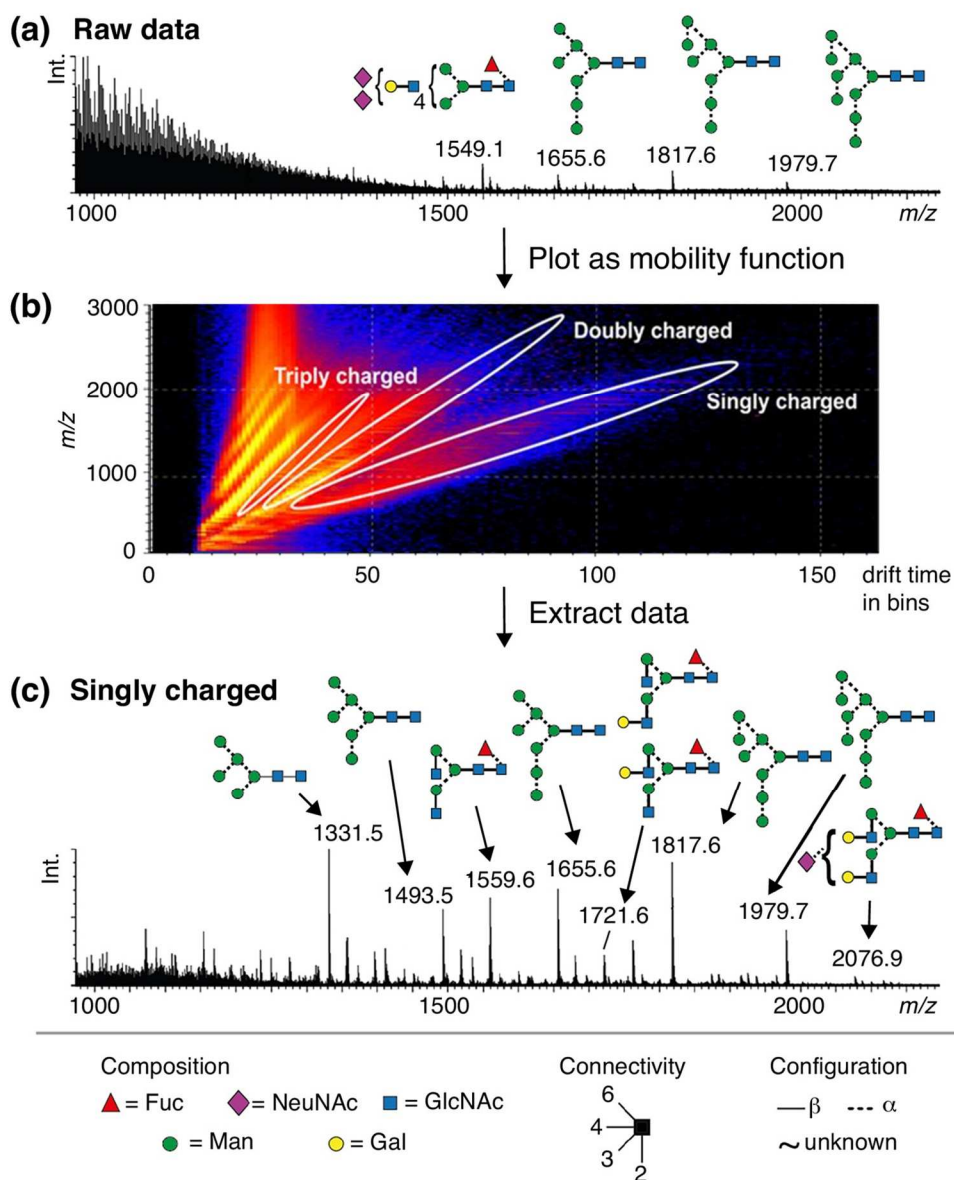


Figure 52 : Analyse IMS-MS de l'enveloppe de la glycoprotéine gp120. Spectre de masse complet des N-glycanes libérés de l'enveloppe de la gp120 en mode d'ionisation négative obtenu par infusion directe (a). DriftScope (m/z en fonction du temps de dérive) (b). Spectre de masse extrait pour les ions monochargés (c) d'après (Pritchard *et al.*, 2015)

L'IMS-MS est donc une méthode hautement résolutive qui permet de séparer des oligosaccharides en fonction de leur anomérie et de leur type de liaisons ce qui est très intéressant dans le cas de la séparation de structure isomères. L'ajout de la deuxième dimension d'IMS offre la possibilité d'isoler les glycanes en fonction de leurs charges ce qui engendre une simplification des spectres de masse observés et donc de l'identification. Quelques revues détaillent les avancées en IMS-MS pour l'analyse des glycanes (Hofmann & Pagel, 2017; Manz & Pagel, 2018).

Les méthodes spectrométriques sont très performantes pour analyser les glycanes. Cependant, la RMN nécessite des échantillons en quantité assez importante et avec une très grande pureté, elle n'est donc pas adaptée à l'analyse des fluides biologiques complexes. L'IMS-MS permet des résolutions excellentes mais peu de développements ont été réalisés sur des échantillons réels. De plus, le traitement des données est très complexe. La spectrométrie de masse constitue donc la meilleure option pour l'étude d'échantillons complexes, que ce soit en couplage avec une méthode de

séparation pour l'ESI ou seule pour le MALDI. En effet, ces méthodes permettent d'obtenir une identification directe ainsi qu'une quantification relative donnant ainsi beaucoup d'informations sur les espèces présentes.

II.3. Conclusion

L'analyse de glycanes issus d'échantillons biologique pour la recherche de biomarqueurs peut être abordée avec plusieurs techniques. L'emploi d'une méthode électrophorétique doit se focaliser sur l'ECG-LIF, technique la plus souvent utilisée et qui offre les meilleures résolution, sensibilité et quantification absolue en des temps d'analyse très courts. La chromatographie en mode HILIC constitue une deuxième voie envisageable car très résolutive également et permettant un couplage à la SM en ligne pour une identification directe. Malheureusement, les temps d'analyse sont généralement plus long qu'en ECG et les quantités d'échantillons nécessaires sont également supérieures. Une dernière alternative est l'utilisation de MALDI-TOF qui permet une analyse rapide avec des quantités d'échantillon faibles et une identification des structures directe.

Lors de l'étude de fluides biologiques avec un objectif de dépistage et de découverte de biomarqueurs, l'emploi de l'ECG-LIF semble donc être très indiqué notamment pour l'étude de cohortes.

III. Conclusion

Le développement de méthodes d'analyse de la glycosylation a ouvert un nouveau champ d'investigation pour la caractérisation des glycoprotéines mais aussi dans la découverte de biomarqueurs potentiels de pathologies. Les stratégies citées dans ce chapitre présentent toutes les deux des avantages mais aussi un certain nombre d'inconvénients. Le choix de la stratégie employée doit donc faire l'objet d'une réflexion pour être la mieux adaptée aux objectifs fixés que ce soit pour une analyse ciblée (protéine particulière) ou non-ciblée (glycomique ou glycoprotéomique).

La première stratégie, reposant sur les glycoprotéines intactes, a l'avantage de ne pas nécessiter de préparation d'échantillon aussi longue que pour les glycanes. Elle permet d'informer rapidement sur la micro-hétérogénéité des glycoprotéines cependant la séparation de structures isomères est impossible. Selon la méthode employée, les profils peuvent s'avérer très complexes pouvant rendre leur interprétation fastidieuse. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être employées, généralement au profit des techniques couplées à la spectrométrie de masse (LC-SM ou EC-SM). L'ECZ, grâce à sa très haute résolution est tout à fait adaptée à l'analyse de glycoprotéines intactes pour la séparation de leurs différentes glycoformes.

L'étude des glycanes libérés permet de caractériser précisément leur structure et composition montrant ainsi la micro-hétérogénéité des glycanes. Il est, en effet, alors possible de différencier des isomères de structure et des anomères mais aucune information sur le site de glycosylation n'est obtenue. Leur analyse nécessite néanmoins une procédure de préparation d'échantillon longue puisqu'il faut réaliser une déglycosylation enzymatique ou chimique suivie d'une dérivation pour rendre leur détection possible. Généralement effectuée par HILIC-SM pour la facilité d'identification (bases de données et SM) l'analyse glycomique peut également être accomplie par ECG-LIF qui présente également de nombreux avantages telles qu'une excellente résolution et la possibilité d'une quantification absolue, critères majeurs pour ce type d'analyse.

Ainsi, la caractérisation fine des glycoprotéines est un processus long, nécessitant parfois la combinaison de plusieurs stratégies (glycanes libres et glycopeptides/ glycoprotéines intactes) pour avoir l'image la plus précise de l'état de la glycosylation. Toutes ces méthodes analytiques peuvent être appliquées à des échantillons biologiques de patients ayant différents types de pathologies et de détecter des changements de glycosylation qui pourraient être des biomarqueurs potentiels de pathologies. L'analyse de la glycosylation a ainsi déjà permis de montrer qu'elle peut être modifiée lors de différentes pathologies et celles-ci seront décrites dans dans le dernier chapitre bibliographique de ce manuscrit.

Références bibliographiques – Chapitre II

- Abo, M., He, L., Sato, K., & Okubo, A. (2013). Determination of Monosaccharides Derivatized with 2-Aminobenzoic Acid by Capillary Electrophoresis (pp. 45–50). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-296-4_4
- Ahn, J., Bones, J., Yu, Y. Q., Rudd, P. M., & Gilar, M. (2010). Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 μ m sorbent. *Journal of Chromatography B*, *878*, 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.12.013>
- Ahn, Y. H., Kim, J. Y., & Yoo, J. S. (2015). Quantitative mass spectrometric analysis of glycoproteins combined with enrichment methods. *Mass Spectrometry Reviews*, *34*(2), 148–165. <https://doi.org/10.1002/mas.21428>
- Aizpurua-Olaizola, O., Sastre Toraño, J., Falcon-Perez, J. M., Williams, C., Reichardt, N., & Boons, G. J. (2018). Mass spectrometry for glycan biomarker discovery. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.015>
- Alahmad, Y., Taverna, M., Mobdi, H., Duboeuf, J., Grégoire, A., Rancé, I., & Tran, N. T. (2010). A validated capillary electrophoresis method to check for batch-to-batch consistency during recombinant human glycosylated interleukin-7 production campaigns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(4), 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.013>
- Alahmad, Y., Tran, N. T., Duboeuf, J., Grégoire, A., Rancé, I., & Taverna, M. (2009). CZE for glycoform profiling and quality assessment of recombinant human interleukin-7. *Electrophoresis*, *30*(13), 2347–2354. <https://doi.org/10.1002/elps.200800789>
- Alley, W. R., Vasseur, J. A., Goetz, J. A., Svoboda, M., Mann, B. F., Matei, D. E., Menning, N., Hussein, A., Mechref, Y., Novotny, M. V., & Novotny, M. V. (2012). N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *Journal of Proteome Research*, *11*(4), 2282–2300. <https://doi.org/10.1021/pr201070k>
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, *499*, 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3)
- Anumula, K. R. (1994). Quantitative Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by High-Performance Liquid Chromatography with Highly Sensitive Fluorescence Detection. *Analytical Biochemistry*, *220*(2), 275–283. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1994.1338>
- Anumula, K. R. (2006). Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, *350*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.037>
- Anumula, K. R., & Dhume, S. T. (1998). High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid. *Glycobiology*, *8*(7), 685–694. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.7.685>
- Artemenko, N. V., McDonald, A. G., Davey, G. P., & Rudd, P. M. (2012). Databases and Tools in Glycobiology (pp. 325–350). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_21
- Balog, C. I. A., Stavenhagen, K., Fung, W. L. J., Koeleman, C. A., McDonnell, L. A., Verhoeven, A., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2012). N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *11*(9), 571–585. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011601>
- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, *2012*, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Battistel, M. D., Azurmendi, H. F., Yu, B., & Freedberg, D. I. (2014). NMR of glycans: Shedding new light on old problems. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *79*, 48–68. <https://doi.org/10.1016/J.PNMRS.2014.01.001>
- Bigge, J. C., Patel, T. P., Bruce, J. A., Goulding, P. N., Charles, S. M., & Parekh, R. B. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Analytical Biochemistry*, *230*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1468>

- Birrell, H. C., & Camilleri, P. (2003). Analysis of 2-Aminoacridone-Derivatized Complex Oligosaccharides Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography and Laser-Induced Fluorescence Detection. In *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates* (pp. 147–162). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-294-5:147>
- Bladergroen, M. R., Reiding, K. R., Hipgrave Ederveen, A. L., Vreeker, G. C. M. M., Clerc, F., Holst, S., Bondt, A., Wuhrer, M., & Van Der Burgt, Y. E. M. M. (2015). Automation of high-throughput mass spectrometry-based plasma n-glycome analysis with linkage-specific sialic acid esterification. *Journal of Proteome Research*, *14*(9), 4080–4086. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00538>
- Bodnar, J., Szekrenyes, A., Szigeti, M., Jarvas, G., Krenkova, J., Foret, F., & Guttman, A. (2016). Enzymatic removal of N-glycans by PNGase F coated magnetic microparticles. *Electrophoresis*, *37*(10), 1264–1269. <https://doi.org/10.1002/elps.201500575>
- Bones, J., McLoughlin, N., Hilliard, M., Wynne, K., Karger, B. L., & Rudd, P. M. (2011). 2D-LC analysis of BRP 3 erythropoietin N-glycosylation using anion exchange fractionation and hydrophilic interaction UPLC reveals long poly-N-acetyl lactosamine extensions. *Analytical Chemistry*, *83*(11), 4154–4162. <https://doi.org/10.1021/ac200406z>
- Bruggink, C., Maurer, R., Herrmann, H., Cavalli, S., & Hoefler, F. (2005). Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1085*(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.03.108>
- Bruneel, A., Habarou, F., Stojkovic, T., Plouviez, G., Bougas, L., Guillemet, F., Brient, N., Henry, D., Dupré, T., Vuillaumier-Barrot, S., & Seta, N. (2017). Two-dimensional electrophoresis highlights haptoglobin beta chain as an additional biomarker of congenital disorders of glycosylation. *Clinica Chimica Acta*, *470*, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.04.022>
- Bunz, S.-C. C., Cutillo, F., & Neusüss, C. (2013). Analysis of native and APTS-labeled N-glycans by capillary electrophoresis/time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(25), 8277–8284. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7231-4>
- Bunz, S. C., Rapp, E., & Neusüss, C. (2013). Capillary electrophoresis/mass spectrometry of APTS-labeled glycans for the identification of unknown glycan species in capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence systems. *Analytical Chemistry*, *85*(21), 10218–10224. <https://doi.org/10.1021/ac401930j>
- Bush, D. R., Zang, L., Belov, A. M., Ivanov, A. R., & Karger, B. L. (2016). High Resolution CZE-MS Quantitative Characterization of Intact Biopharmaceutical Proteins: Proteoforms of Interferon-β1. *Analytical Chemistry*, *88*(2), 1138–1146. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03218>
- Carlson, D. M. (1968). Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *The Journal of Biological Chemistry*, *243*(3), 616–626. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5637714>
- Caslavska, J., & Thormann, W. (2018). Monitoring of transferrin isoforms in biological samples by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, *41*(1), 303–322. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700914>
- Česla, P., Vaňková, N., Křenková, J., & Fischer, J. (2016). Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labeled oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*, *1438*, 179–188. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2016.02.032>
- Charlwood, J., Birrell, H., Gribble, A., Burdes, V., Tolson, D., Camilleri, P., Joanne Charlwood, Helen Birrell, Andy Gribble, Vincent Burdes, David Tolson, and, & Camilleri*, P. (2000). A probe for the versatile analysis and characterization of N-linked oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, *72*(7), 1453–1461. <https://doi.org/10.1021/ac991268f>
- Chen, C.-C., Su, W.-C., Huang, B.-Y., Chen, Y.-J., Tai, H.-C., & Obena, R. P. (2014). Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. *The Analyst*, *139*(4), 688–704. <https://doi.org/10.1039/C3AN01813J>
- Chen, J., He, L., Abo, M., Zhang, J., Sato, K., & Okubo, A. (2009). Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of 2-AA derivatized saccharides in capillary electrophoresis. *Carbohydrate Research*, *344*(9), 1141–1145. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.03.019>
- Chen, X., & Flynn, G. C. (2007). Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, *370*(2), 147–161. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2007.08.012>
- Chu, C. S., Niñonuevo, M. R., Clowers, B. H., Perkins, P. D., An, H. J., Yin, H., Killeen, K., Miyamoto, S., Grimm, R., & Lebrilla, C. B. (2009). Profile of native N-linked glycan structures from human serum using high performance liquid chromatography on a microfluidic chip and time-of-flight mass spectrometry. *PROTEOMICS*, *9*(7),

- 1939–1951. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800249>
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, *131*(2), 209–217. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8)
- Cowper, B., Li, X., Yu, L., Zhou, Y., Fan, W. H., & Rao, C. M. (2018). Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *153*, 214–220. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.02.043>
- Dai, J., Lamp, J., Xia, Q., & Zhang, Y. (2018). Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry Method for the Separation and Online Characterization of Intact Monoclonal Antibody Charge Variants. *Analytical Chemistry*, *90*(3), 2246–2254. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04608>
- Dalpathado, D. S., Jiang, H., Kater, M. A., & Desaire, H. (2005). Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *387*(6), 1130–1137. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-3028-9>
- Deguchi, K., Takegawa, Y., Hirabayashi, A., Nakagawa, H., & Nishimura, S.-I. (2005). Characteristic pH and electrolyte concentration dependences of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides (N-glycans) in sonic-spray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *19*(16), 2325–2330. <https://doi.org/10.1002/rcm.2063>
- Doherty, M., Bones, J., Mcloughlin, N., Telford, J. E., Harmon, B., Defelippis, M. R., & Rudd, P. M. (2013). An automated robotic platform for rapid profiling oligosaccharide analysis of monoclonal antibodies directly from cell culture. *Analytical Biochemistry*, *442*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.005>
- Donczo, B., Szarka, M., Tovari, J., Ostoros, G., Csanky, E., & Guttman, A. (2017). Molecular glycopathology by capillary electrophoresis: Analysis of the N-glycome of formalin-fixed paraffin-embedded mouse tissue samples. *Electrophoresis*, *38*(12), 1602–1608. <https://doi.org/10.1002/elps.201600558>
- European Pharmacopeia 9.0 European Directorate for the Quality of Medicines Council of Europe. (2008). Erythropoietin concentrated solution, Council of Europe, Strasbourg. In *1316* (pp. 2391–2395).
- European Pharmacopoeia 9.5. (2018). Interferon beta-1a concentrated solution. *European Pharmacopoeia 9.5, Council of Europe*, 5701–5703. Retrieved from <http://online6.edqm.eu.proxy.scd.u-psud.fr/ep905/>
- Everest-Dass, A. V, Moh, E. S. X., Ashwood, C., Shathili, A. M. M., & Packer, N. H. (2018). Human disease glycomics: technology advances enabling protein glycosylation analysis – part 2. *Expert Review of Proteomics*, *15*(4), 341–352. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1448710>
- Fan, J.-Q., Huynh, L. H., & Lee, Y. C. (1995). Purification of 2-Aminopyridine Derivatives of Oligosaccharides and Related Compounds by Cation-Exchange Chromatography. *Analytical Biochemistry*, *232*(1), 65–68. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1995.9960>
- Fan, J. Q., Kondo, A., Kato, I., & Lee, Y. C. (1994). High-Performance Liquid Chromatography of Glycopeptides and Oligosaccharides on Graphitized Carbon Columns. *Analytical Biochemistry*, *219*(2), 224–229. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1994.1261>
- Farina-Gomez, N., Puerta, A., Gonzalez, M., Diez-Masa, J. C., & de Frutos, M. (2016). Impact of capillary conditioning and background electrolyte composition on capillary electrophoresis analysis of prostate specific antigen isoforms. *Journal of Chromatography A*, *1443*, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.037>
- Fellenberg, M., Behnken, H. N., Nagel, T., Wiegandt, A., Baerenfaenger, M., & Meyer, B. (2013). Glycan analysis: scope and limitations of different techniques—a case for integrated use of LC-MS(/MS) and NMR techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(23), 7291–7305. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7164-y>
- Fellenberg, M., Çoksezen, A., & Meyer, B. (2010). Characterization of Picomole Amounts of Oligosaccharides from Glycoproteins by ¹H NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, *49*(14), 2630–2633. <https://doi.org/10.1002/anie.200906680>
- Feng, H. tao, Su, M., Rifai, F. N., Li, P., & Li, S. F. Y. (2017a). Parallel analysis and orthogonal identification of N-glycans with different capillary electrophoresis mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, *953*, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.043>
- Feng, H. tao, Su, M., Rifai, F. N., Li, P., & Li, S. F. Y. (2017b). Parallel analysis and orthogonal identification of N-glycans with different capillary electrophoresis mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, *953*, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.043>
- Frost, D. C., & Li, L. (2014). Recent advances in mass spectrometry-based glycoproteomics. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *95*, 71–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800453-1.00003-8>
- Furukawa, J., Fujitani, N., Araki, K., Takegawa, Y., Kodama, K., & Shinohara, Y. (2011). A Versatile Method for Analysis of Serine/Threonine Posttranslational Modifications by β -Elimination in the Presence of Pyrazolone

- Analogues. *Analytical Chemistry*, *83*(23), 9060–9067. <https://doi.org/10.1021/ac2019848>
- Galeotti, F., Coppa, G. V., Zampini, L., Maccari, F., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Gabrielli, O., & Volpi, N. (2014). Capillary electrophoresis separation of human milk neutral and acidic oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Electrophoresis*, *35*(6), 811–818. <https://doi.org/10.1002/elps.201300490>
- Galeotti, F., Coppa, G. V., Zampini, L., MacCari, F., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Gabrielli, O., & Volpi, N. (2012). On-line high-performance liquid chromatography-fluorescence detection-electrospray ionization-mass spectrometry profiling of human milk oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Analytical Biochemistry*, *430*(1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.027>
- Garrido-Medina, R., Diez-Masa, J. C., & de Frutos, M. (2013). On-capillary fluorescent labeling and capillary electrophoresis laser-induced fluorescence analysis of glycoforms of intact prostate-specific antigen. *ELECTROPHORESIS*, *34*(16), 2295–2302. <https://doi.org/10.1002/elps.201200651>
- Geyer, H., & Geyer, R. (2006). Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1764*(12), 1853–1869. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.10.007>
- Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., & Sanz-Nebot, V. (2007). Towards a reliable molecular mass determination of intact glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *21*(16), 2555–2563. <https://doi.org/10.1002/rcm.3109>
- Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., & Sanz-Nebot, V. (2010). Ionic liquid matrices for MALDI-TOF-MS analysis of intact glycoproteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *398*(1), 357–365. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3898-y>
- Goyallon, A., Cholet, S., Chapelle, M., Junot, C., & Fenaille, F. (2015). Evaluation of a combined glycomics and glycoproteomics approach for studying the major glycoproteins present in biofluids: Application to cerebrospinal fluid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *29*(6), 461–473. <https://doi.org/10.1002/rcm.7125>
- Gudelj, I., Salo, P. P., Trbojević-Akmačić, I., Albers, M., Primorac, D., Perola, M., & Lauc, G. (2018). Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.03.018>
- Gupta, R., Baldock, S. J., Fielden, P. R., & Grieve, B. D. (2011). Capillary zone electrophoresis for the analysis of glycoforms of cellobiohydrolase. *Journal of Chromatography A*, *1218*(31), 5362–5368. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.036>
- Guttman, A., Chen, F.-T. A., & Evangelista, R. A. (1996). Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *17*(2), 412–417. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170221>
- Guttman, A., & Pritchett, T. (1995). Capillary gel electrophoresis separation of high-mannose type oligosaccharides derivatized by 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid. *Electrophoresis*, *16*(1), 1906–1911. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601314>
- Hahne, H., Neubert, P., Kuhn, K., Etienne, C., Bomgarden, R., Rogers, J. C., & Kuster, B. (2012). Carbonyl-Reactive Tandem Mass Tags for the Proteome-Wide Quantification of N-Linked Glycans. *Analytical Chemistry*, *84*(8), 3716–3724. <https://doi.org/10.1021/ac300197c>
- Hajba, L., Csanky, E., & Guttman, A. (2016). Liquid phase separation methods for N-glycosylation analysis of glycoproteins of biomedical and biopharmaceutical interest. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, *943*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.035>
- Hakomori, S. (1964). *A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide*. *The Journal of Biochemistry* (Vol. 55). Japanese Biochemical Society. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/55/2/55_2_205/_article
- Hanneman, A. J. S., Strand, J., & Huang, C.-T. (2014). Profiling and characterization of sialylated N-glycans by 2D-HPLC (HIA/PGC) with online orbitrap MS/MS and offline MSn. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *103*(2), 400–408. <https://doi.org/10.1002/jps.23792>
- Harvey, D. J. (2011). Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *879*(17–18), 1196–1225. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2010.11.010>
- Harvey, D. J. (2017). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2011–2012. *Mass Spectrometry Reviews*, *36*(3), 255–422. <https://doi.org/10.1002/mas.21471>

- Harvey, D. J. (2018). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2013-2014. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(4), 353–491. <https://doi.org/10.1002/mas.21530>
- Harvey, S. B., Zhang, Y., Wilson-Grady, J., Monkkonen, T., Nelsestuen, G. L., Kasthuri, R. S., Verneris, M. R., Lund, T. C., Ely, E. W., Bernard, G. R., Zeisler, H., Homoncik, M., Jilma, B., Swan, T., & Kellogg, T. A. (2009). O-glycoside biomarker of apolipoprotein C3: Responsiveness to obesity, bariatric surgery, and therapy with metformin, to chronic or severe liver disease and to mortality in severe sepsis and graft VS host disease. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 603–612. <https://doi.org/10.1021/pr800751x>
- 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(1), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4738-4>
- Haselberg, R., De Jong, G. J., & Somsen, G. W. (2013). Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins. *Analytical Chemistry*, 85(4), 2289–2296. <https://doi.org/10.1021/ac303158f>
- Hennig, R., Rapp, E., Kottler, R., Cajic, S., Borowiak, M., & Reichl, U. (2015). N-Glycosylation Fingerprinting of Viral Glycoproteins by xCGE-LIF (pp. 123–143). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2874-3_8
- Higel, F., Demelbauer, U., Seidl, A., Friess, W., & Sörgel, F. (2013). Reversed-phase liquid-chromatographic mass spectrometric N-glycan analysis of biopharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(8), 2481–2493. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6690-3>
- Hillenkamp, F., & Karas, M. (1990). [12] Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization (pp. 280–295). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)93420-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)93420-P)
- Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., Ng, K. F., Suen, M. W. M., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568044>
- Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., & Widmer, H. M. (1991). Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63(15), 1541–1547. <https://doi.org/10.1021/ac00015a009>
- Hofmann, J., Hahm, H. S., Seeberger, P. H., & Pagel, K. (2015). Identification of carbohydrate anomers using ion mobility–mass spectrometry. *Nature*, 526(7572), 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature15388>
- Hofmann, J., & Pagel, K. (2017). Glycan Analysis by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(29), 8342–8349. <https://doi.org/10.1002/anie.201701309>
- Honda, S., Suzuki, S., & Taga, A. (2003). Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(6), 1689–1714. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00512-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00512-5)
- Hu, Y., Shihab, T., Zhou, S., Wooding, K., & Mechref, Y. (2016). LC-MS/MS of permethylated N-glycans derived from model and human blood serum glycoproteins. *Electrophoresis*, 37(11), 1498–1505. <https://doi.org/10.1002/elps.201500560>
- Huang, B. Y., Yang, C. K., Liu, C. P., & Liu, C. Y. (2014). Stationary phases for the enrichment of glycoproteins and glycopeptides. *Electrophoresis*, 35(15), 2091–2107. <https://doi.org/10.1002/elps.201400034>
- Huang, Y., Konse, T., Mechref, Y., & Novotny, M. V. (2002). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry compatible β -elimination of O-linked oligosaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(12), 1199–1204. <https://doi.org/10.1002/rcm.701>
- Huang, Y., Mechref, Y., & Novotny, M. V. (2001). Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 73(24), 6063–6069. <https://doi.org/10.1021/ac015534c>
- Huang, Y., Mechref, Y., & Novotny, M. V. (2001). Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 73(24), 6063–6069. <https://doi.org/10.1021/ac015534c>
- Huang, Y., Zhou, S., Zhu, J., Lubman, D. M., & Mechref, Y. (2017). LC-MS/MS isomeric profiling of permethylated N-glycans derived from serum haptoglobin of hepatocellular carcinoma (HCC) and cirrhotic patients. *Electrophoresis*, 38(17), 2160–2167. <https://doi.org/10.1002/elps.201700025>
- Isailovic, D., Plasencia, M. D., Gaye, M. M., Stokes, S. T., Kurulugama, R. T., Pungpapong, V., Zhang, M., Kyselova, Z., Goldman, R., Mechref, Y., Novotny, M. V., & Clemmer, D. E. (2012). Delineating diseases by IMS-MS profiling of

- serum N-linked glycans. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 576–585. <https://doi.org/10.1021/pr200777u>
- Ito, H., Yamada, K., Deguchi, K., Nakagawa, H., & Nishimura, S.-I. (2007). Structural assignment of disialylated biantennary N-glycan isomers derivatized with 2-aminopyridine using negative-ion multistage tandem mass spectral matching. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(2), 212–218. <https://doi.org/10.1002/rcm.2824>
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. In M. L. and H. B. S. Olivier Dulac (Ed.), *Year In Human And Medical Genetics: New Trends In Mendelian Genetics* (Vol. 1214, pp. 190–198). Elsevier. Retrieved from <papers3://publication/doi/10.1111/j.1749-6632.2010.05840.x>
- Jaeken, J., van Eijk, H. G., van der Heul, C., Corbeel, L., Eeckels, R., & Eggermont, E. (1984). Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 144(2–3), 245–247. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(84\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(84)90059-7)
- Jarvas, G., Sziget, M., & Guttman, A. (2015). GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis. *Electrophoresis*, 36(24), 3094–3096. <https://doi.org/10.1002/elps.201500397>
- Jayo, R. G., Li, J., & Chen, D. D. Y. (2012). Capillary electrophoresis mass spectrometry for the characterization of O-Acetylated N-glycans from fish serum. *Analytical Chemistry*, 84(20), 8756–8762. <https://doi.org/10.1021/ac301889k>
- Jens Ø. Duus, Charlotte H. Gottfredsen, and, & Bock*, K. (2000). Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations†. <https://doi.org/10.1021/CR990302N>
- Jiang, K., Zhu, H., Xiao, C., Liu, D., Edmunds, G., Wen, L., Ma, C., Li, J., & Wang, P. G. (2017). Solid-phase reductive amination for glycomic analysis. *Analytica Chimica Acta*, 962, 32–40. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.01.049>
- Kamerling, J. P., & Gerwig, G. J. (2007). Strategies for the Structural Analysis of Carbohydrates. *Comprehensive Glycoscience*, 1–68. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00032-5>
- Kamoda, S., Nakano, M., Ishikawa, R., Suzuki, S., & Takechi, K. (2005). Rapid and sensitive screening of N-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives by high-performance liquid chromatography: A method which can recover free oligosaccharides after analysis. *Journal of Proteome Research*, 4(1), 146–152. <https://doi.org/10.1021/pr049825o>
- Kang, P., Mechref, Y., Klouckova, I., & Novotny, M. V. (2005). Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 19(23), 3421–3428. <https://doi.org/10.1002/rcm.2210>
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53–68. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(87\)87041-6](https://doi.org/10.1016/0168-1176(87)87041-6)
- Karav, S., Cohen, J. L., Barile, D., & de Moura Bell, J. M. L. N. (2017). Recent advances in immobilization strategies for glycosidases. *Biotechnology Progress*, 33(1), 104–112. <https://doi.org/10.1002/btpr.2385>
- Kebarle, P., & Peschke, M. (2000). On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta*, 406(1), 11–35. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00598-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00598-X)
- Keser, T., Pavić, T., Lauc, G., & Gornik, O. (2018). Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan Analysis. *Frontiers in Chemistry*, 6, 324. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00324>
- Keyser, J. W. (1964). Staining of serum glycoproteins after electrophoretic separation in acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 9(2), 249–252. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90111-3)
- Kim, Y. J., Freas, A., & Fenselau, C. (2001). Analysis of viral glycoproteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(7), 1544–1548. <https://doi.org/10.1021/ac001171p>
- Kinoshita, M., & Takechi, K. (2014). Capillary-based lectin affinity electrophoresis for interaction analysis between lectins and glycans. *Methods in Molecular Biology*, 1200, 131–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_12
- Klapoetke, S., Zhang, J., Becht, S., Gu, X., & Ding, X. (2010). The evaluation of a novel approach for the profiling and identification of N-linked glycan with a procainamide tag by HPLC with fluorescent and mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 315–324. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2010.03.045>
- Knežević, A., Gornik, O., Polašek, O., Pučić, M., Redžić, I., Novokmet, M., Rudd, P. M., Wright, A. F., Campbell, H., Rudan, I., & Lauc, G. (2010). Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 20(8), 959–969. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq051>

- Kovács, Z., Papp, G., Horváth, H., Joó, F., & Guttman, A. (2017). A novel carbohydrate labeling method utilizing transfer hydrogenation-mediated reductive amination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *142*, 324–327. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.05.017>
- Kovacs, Z., Simon, A., Szabo, Z., Nagy, Z., Varoczy, L., Pal, I., Csanky, E., & Guttman, A. (2017). Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma. *Electrophoresis*, *38*(17), 2115–2123. <https://doi.org/10.1002/elps.201700006>
- Kozak, R. P., Tortosa, C. B., Fernandes, D. L., & Spencer, D. I. R. (2015). Comparison of procainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification of glycans by liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization–mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, *486*, 38–40. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2015.06.006>
- Krenkova, J., Szekrenyes, A., Keresztessy, Z., Foret, F., & Guttman, A. (2013). Oriented immobilization of peptide-N-glycosidase F on a monolithic support for glycosylation analysis. *Journal of Chromatography A*, *1322*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.087>
- Lacunza, I., Kremmer, T., Díez-Masa, J., Sanz, J., & de Frutos, M. (2007). CIEF with hydrodynamic and chemical mobilization for the separation of forms of α -1-acid glycoprotein. *Electrophoresis*, *28*(23), 1204–1213. <https://doi.org/10.1002/elps.200600700>
- Lafleur, J. P., Senkbeil, S., Novotny, J., Nys, G., Bøgelund, N., Rand, K. D., Foret, F., & Kutter, J. P. (2015). Rapid and simple preparation of thiol–ene emulsion-templated monoliths and their application as enzymatic microreactors. *Lab Chip*, *15*(10), 2162–2172. <https://doi.org/10.1039/C5LC00224A>
- Lamari, F. N., Kuhn, R., & Karamanos, N. K. (2003). Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *793*(1), 15–36. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00362-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00362-3)
- Lattová, E., Chen, V. C., Varma, S., Bezabeh, T., & Perreault, H. (2007). Matrix-assisted laser desorption/ionization on-target method for the investigation of oligosaccharides and glycosylation sites in glycopeptides and glycoproteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *21*(10), 1644–1650. <https://doi.org/10.1002/rcm.3007>
- Lattova, E., & Perreault, H. (2003). Labelling saccharides with phenylhydrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption–ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *793*(1), 167–179. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00374-X](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00374-X)
- Lauber, M. A., Yu, Y. Q., Brousmiche, D. W., Hua, Z., Koza, S. M., Magnelli, P., Guthrie, E., Taron, C. H., & Fountain, K. J. (2015). Rapid preparation of released N-glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection. *Analytical Chemistry*, *87*(10), 5401–5409. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00758>
- Lavanant, H., & Loutelier-Bourhis, C. (2012). Use of procaine and procainamide as derivatizing co-matrices for the analysis of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *26*(11), 1311–1319. <https://doi.org/10.1002/rcm.6223>
- Lemoine, J., Cabanes-Macheteau, M., Bardor, M., Michalski, J.-C., Faye, L., & Lerouge, P. (2000). Analysis of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid labelled N-glycans by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *14*(2), 100–104. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000130\)14:2<100::AID-RCM845>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000130)14:2<100::AID-RCM845>3.0.CO;2-W)
- Link-lenczowski, P., Bubka, M., Balog, C. I. A., Koeleman, C. A. M., & Butters, T. D. (2018). The glycomic effect of N-acetylglucosaminyltransferase III overexpression in metastatic melanoma cells. GnT-III modifies highly branched N-glycans. *Glycoconjugate Journal*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10719-018-9814-y>
- Liu, J., Shirota, O., & Novotny, M. (1991). Separation of fluorescent oligosaccharide derivatives by microcolumn techniques based on electrophoresis and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *559*(1–2), 223–235. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)80073-P](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)80073-P)
- Lu, G., Crie-field, C. L., Gattu, S., Veltri, L. M., & Holland, L. A. (2018). Capillary Electrophoresis Separations of Glycans. *Chemical Reviews*, *acs.chemrev.7b00669*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00669>
- Lucy, C. A., MacDonald, A. M., & Gulcev, M. D. (2008). Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, *1184*(1–2), 81–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>
- Maier, M., Reusch, D., Bruggink, C., Bulau, P., Wuhrer, M., & Mølhøj, M. (2016). Applying mini-bore HPAEC-MS/MS for the characterization and quantification of Fc N-glycans from heterogeneously glycosylated IgGs. *Journal*

- of Chromatography B*, 1033–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.001>
- Manz, C., & Pagel, K. (2018). Glycan analysis by ion mobility-mass spectrometry and gas-phase spectroscopy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 42, 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2017.10.021>
- Mariño, K., Bones, J., Kattla, J. J., & Rudd, P. M. (2010). A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 713–723. <https://doi.org/10.1038/nchembio.437>
- Martín, M. J., Vázquez, E., & Rueda, R. (2007). Application of a sensitive fluorometric HPLC assay to determine the sialic acid content of infant formulas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(8), 2943–2949. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1160-z>
- Mechref, Y. (2011). Analysis of glycans derived from glycoconjugates by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 32(24), 3467–3481. <https://doi.org/10.1002/elps.201100342>
- Mechref, Y., Muzikar, J., & Novotny, M. V. (2005). Comprehensive assessment of N-glycans derived from a murine monoclonal antibody: a case for multimethodological approach. *Electrophoresis*, 26(10), 2034–2046. <https://doi.org/10.1002/elps.200410345>
- Mechref, Y., & Novotny, M. V. (2009). Glycomic analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(2), 207–222. <https://doi.org/10.1002/mas.20196>
- Meller, K., Szumski, M., & Buszewski, B. (2017). Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244, 84–106. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2016.12.021>
- Melmer, M., Stangler, T., Premstaller, A., & Lindner, W. (2010). Solvent effects on the retention of oligosaccharides in porous graphitic carbon liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217–6092. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.059>
- Melmer, M., Stangler, T., Premstaller, A., & Lindner, W. (2011). Comparison of hydrophilic-interaction, reversed-phase and porous graphitic carbon chromatography for glycan analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 118–123. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.10.122>
- Merry, A. H., Neville, D. C. A., Royle, L., Matthews, B., Harvey, D. J., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2002). Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis. *Analytical Biochemistry*, 304(1), 91–99. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5620>
- Minquan Zhang, †, Hassan A. Melouk, ‡, Kelly Chenault, ‡ and, & Ziad El Rassi*, †. (2001). Determination of Cellular Carbohydrates in Peanut Fungal Pathogens and Baker's Yeast by Capillary Electrophoresis and Electrochromatography. <https://doi.org/10.1021/JF0103626>
- Mittermayr, S., Bones, J., & Guttman, A. (2013). Unraveling the glyco-puzzle: Glycan structure identification by capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 85(9), 4228–4238. <https://doi.org/10.1021/ac4006099>
- Miura, Y., Kato, K., Takegawa, Y., Kurogochi, M., Furukawa, J., Shinohara, Y., Nagahori, N., Amano, M., Hinou, H., & Nishimura, S.-I. (2010). Glycoblotting-Assisted O-Glycomics: Ammonium Carbamate Allows for Highly Efficient O-Glycan Release from Glycoproteins. *Analytical Chemistry*, 82(24), 10021–10029. <https://doi.org/10.1021/ac101599p>
- Möginger, U., Grunewald, S., Hennig, R., Kuo, C.-W., Schirmeister, F., Voth, H., Rapp, E., Khoo, K.-H., Seeberger, P. H., Simon, J. C., & Kolarich, D. (2018). Alterations of the Human SkinN- andO-Glycome in Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 8, 70. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00070>
- Moini, M. (2007). Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4241–4246. <https://doi.org/10.1021/ac0704560>
- Momenbeik, F., & Khorasani, J. H. (2006). ANALYSIS OF SUGARS BY MICELLAR LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV DETECTION, (16). Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/e2dc/01c37b25ca1ffecd179e9768ec19313d6e93.pdf>
- Moravec, J., & Mares, J. (2017). A simple, time-saving, microwave-assisted periodic acid-Schiff's staining of glycoproteins on 1D electrophoretic gels. *ELECTROPHORESIS*, 38(24), 3100–3103. <https://doi.org/10.1002/elps.201700189>
- Morelle, W., & Michalski, J.-C. C. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(7), 1585–1602. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.227>
- Nakakita, S. ichi, Sumiyoshi, W., Miyanishi, N., & Hirabayashi, J. (2007). A practical approach to N-glycan production by hydrazinolysis using hydrazine monohydrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.032>
- Naldi, M., Tramarin, A., & Bartolini, M. (2018). Immobilized enzyme-based analytical tools in the -omics era: Recent

- advances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 160, 222–237. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.07.051>
- Nashabeh, W., & El Rassi, Z. (1992). Capillary zone electrophoresis of linear and branched oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*, 600(2), 279–287. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85559-C](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85559-C)
- Nicolardi, S., Switzar, L., Deelder, A. M., Palmblad, M., & van der Burgt, Y. E. M. (2015). Top-Down MALDI-In-Source Decay-FTICR Mass Spectrometry of Isotopically Resolved Proteins. *Analytical Chemistry*, 87(6), 3429–3437. <https://doi.org/10.1021/ac504708y>
- Nie, H., Li, Y., & Sun, X.-L. (2012). Recent advances in sialic acid-focused glycomics. *Journal of Proteomics*, 75(11), 3098–3112. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.050>
- Nwosu, C., Yau, H. K., & Becht, S. (2015). Assignment of Core versus Antenna Fucosylation Types in Protein N-Glycosylation via Procainamide Labeling and Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 87(12), 5905–5913. <https://doi.org/10.1021/ac5040743>
- O'Brien, J. F. (2005). Methods for detection of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes. *Seminars in Pediatric Neurology*, 12(3), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2005.11.002>
- Okafo, G., Langridge, J., North, S., Organ, A., West, A., Morris, M., Camilleri, P., Pharmaceuticals, S. B., Road, C., & Limited, M. (1997). High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Complex N-Linked Glycans Derivatized with 2-Aminoacridone. *Society*, 69(24), 4985–4993. <https://doi.org/10.1021/AC9707139>
- Ongay, S., Boichenko, A., Govorukhina, N., & Bischoff, R. (2012). Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *Journal of Separation Science*, 35(18), 2341–2372. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200434>
- Ongay, S., & Neusüß, C. (2010). Isoform differentiation of intact AGP from human serum by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 845–855. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3948-5>
- Pabst, M., & Altmann, F. (2008). Influence of electrosorption, solvent, temperature, and ion polarity on the performance of LC-ESI-MS using graphitic carbon for acidic oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, 80(19), 7534–7542. <https://doi.org/10.1021/ac801024r>
- Pabst, M., & Altmann, F. (2011). Glycan analysis by modern instrumental methods. *Proteomics*, 11(4), 631–643. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000517>
- Pabst, M., Bondili, J. S., Stadlmann, J., Mach, L., & Altmann, F. (2007). Mass + retention time = structure: A strategy for the analysis of N-glycans by carbon LC-ESI-MS and its application to fibrin N-glycans. *Analytical Chemistry*, 79(13), 5051–5057. <https://doi.org/10.1021/ac070363i>
- Pabst, M., Kolarich, D., Pörtl, G., Dalik, T., Lubec, G., Hofinger, A., & Altmann, F. (2009). Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method. *Analytical Biochemistry*, 384(2), 263–273. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2008.09.041>
- Palmigiano, A., Barone, R., Sturiale, L., Sanfilippo, C., Bua, R. O., Romeo, D. A., Messina, A., Capuana, M. L., Maci, T., Le Pira, F., Zappia, M., & Garozzo, D. (2016). CSF N-glycoproteomics for early diagnosis in Alzheimer's disease. *J Proteomics*, 131, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.10.006>
- Palmigiano, A., Messina, A., Bua, R. O., Barone, R., Sturiale, L., Zappia, M., & Garozzo, D. (2018). CSF N-glycomics using MALDI MS techniques in Alzheimer's disease. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1750, pp. 75–91). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7704-8_5
- Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Parekh, R., Wormald, M., & Jaques, A. (1993). Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry*, 32(2), 679–693. <https://doi.org/10.1021/bi00053a037>
- Poulter, L., Karrer, R., & Burlingame, A. L. (1991). n-Alkyl p-aminobenzoates as derivatizing agents in the isolation, separation, and characterization of submicrogram quantities of oligosaccharides by liquid secondary ion mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 195(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90286-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90286-3)
- Pritchard, L. K., Harvey, D. J., Bonomelli, C., Crispin, M., & Doores, K. J. (2015). Cell- and Protein-Directed Glycosylation of Native Cleaved HIV-1 Envelope. *Journal of Virology*, 89(17), 8932–8944. <https://doi.org/10.1128/JVI.01190-15>
- Qu, Y., Feng, J., Deng, S., Cao, L., Zhang, Q., Zhao, R., Zhang, Z., Jiang, Y., Zink, E. M., Baker, S. E., Lipton, M. S., Paša-Tolić, L., Hu, J. Z., & Wu, S. (2014). Structural analysis of N- and O-glycans using ZIC-HILIC/dialysis coupled to NMR detection. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 72, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.001>
- Reid Townsend, R., Hardy, M. R., Cumming, D. A., Carver, J. P., & Bendiak, B. (1989). Separation of branched

- sialylated oligosaccharides using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, *182*(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90708-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90708-2)
- Reiding, K. R., Ruhaak, L. R., Uh, H.-W., El Bouhaddani, S., van den Akker, E. B., Plomp, R., McDonnell, L. A., Houwing-Duistermaat, J. J., Slagboom, P. E., Beekman, M., & Wuhrer, M. (2017). Human Plasma N-glycosylation as Analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-MS Associates with Markers of Inflammation and Metabolic Health. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *16*(2), 228–242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.065250>
- Ren, X., Bai, H., Pan, Y., Tong, W., Qin, P., Yan, H., Deng, S., Zhong, R., Qin, W., & Qian, X. (2014). A graphene oxide-based immobilized PNGase F reagent for highly efficient N-glycan release and MALDI-TOF MS profiling. *Analytical Methods*, *6*(8), 2518. <https://doi.org/10.1039/c3ay41829d>
- Reusch, D., Habegger, M., Maier, B., Maier, M., Kloseck, R., Zimmermann, B., Hook, M., Szabo, Z., Tep, S., Wegstein, J., Alt, N., Bulau, P., & Wuhrer, M. (2015). Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles--part 1: separation-based methods. *MAbs*, *7*(1), 167–179. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.986000>
- Rohrer, J. S., Basumallick, L., & Hurum, D. C. (2016). Profiling N-linked oligosaccharides from IgG by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiology*, *26*(6), 582–591. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww006>
- Royle, L., Campbell, M. P., Radcliffe, C. M., White, D. M., Harvey, D. J., Abrahams, J. L., Kim, Y.-G., Henry, G. W., Shadick, N. A., Weinblatt, M. E., Lee, D. M., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2008). HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical Biochemistry*, *376*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2007.12.012>
- Royle, L., Mattu, T. S., Hart, E., Langridge, J. I., Merry, A. H., Murphy, N., Harvey, D. J., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2002). An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, *304*(1), 70–90. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5619>
- Rudd, P., Karlsson, N. G., Khoo, K.-H., & Packer, N. H. (2015). *Glycomics and Glycoproteomics. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.051>
- Rudd, P. M., Gulle, G. R., Küster, B., Harvey, D. J., Opdenakker, G., & Dwek, R. A. (1997). Oligosaccharide sequencing technology. *Nature*, *388*(6638), 205–207. <https://doi.org/10.1038/40677>
- Ruhaak, L. R., Hennig, R., Huhn, C., Borowiak, M., Dolhain, R. J. E. M., Deelder, A. M., Rapp, E., & Wuhrer, M. (2010). Optimized Workflow for Preparation of APTS-Labeled N-Glycans Allowing High-Throughput Analysis of Human Plasma Glycomes using 48-Channel Multiplexed CGE-LIF. *Journal of Proteome Research*, *9*(12), 6655–6664. <https://doi.org/10.1021/pr100802f>
- Ruhaak, L. R., Huhn, C., Waterreus, W. J., De Boer, A. R., Neus??ss, C., Hokke, C. H., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2008). Hydrophilic interaction chromatography-based high-throughput sample preparation method for N-glycan analysis from total human plasma glycoproteins. *Analytical Chemistry*, *80*(15), 6119–6126. <https://doi.org/10.1021/ac800630x>
- Ruhaak, L. R., Koeleman, C. A. M., Uh, H.-W., Stam, J. C., van Heemst, D., Maier, A. B., Houwing-Duistermaat, J. J., Hensbergen, P. J., Slagboom, P. E., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2013). Targeted biomarker discovery by high throughput glycosylation profiling of human plasma alpha1-antitrypsin and immunoglobulin A. *PLoS One*, *8*(9), e73082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073082>
- Ruhaak, L. R., Koeleman, C. A. M., Uh, H.-W., Stam, J. C., van Heemst, D., Maier, A. B., Houwing-Duistermaat, J. J., Hensbergen, P. J., Slagboom, P. E., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2013). Targeted Biomarker Discovery by High Throughput Glycosylation Profiling of Human Plasma Alpha1-Antitrypsin and Immunoglobulin A. *PLoS ONE*, *8*(9), e73082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073082>
- Ruhaak, L. R., Nguyen, U. T., Stroble, C., Taylor, S. L., Taguchi, A., Hanash, S. M., Lebrilla, C. B., Kim, K., & Miyamoto, S. (2013). Enrichment strategies in glycomics-based lung cancer biomarker development. *Proteomics. Clinical Applications*, *7*(9–10), 664–676. <https://doi.org/10.1002/prca.201200131>
- Ruhaak, L. R., Steenvoorden, E., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2010). 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *PROTEOMICS*, *10*(12), 2330–2336. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900804>
- Ruhaak, L. R., Uh, H.-W., Beekman, M., Hokke, C. H., Westendorp, R. G. J., Houwing-Duistermaat, J., Wuhrer, M., Deelder, A. M., & Slagboom, P. E. (2011). Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *Journal of Proteome Research*, *10*(4), 1667–1674. <https://doi.org/10.1021/pr1009959>
- Ruhaak, L. R., Uh, H.-W., Deelder, A. A., Dolhain, R. E. J. M., & Wuhrer, M. (2014). Total Plasma N-Glycome Changes

- during Pregnancy. *J. Proteome Res*, *13*, 27. <https://doi.org/10.1021/pr401128j>
- Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2010). Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *397*(8), 3457–3481. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3532-z>
- Rustandi, R. R., Anderson, C., & Hamm, M. (2013). Application of Capillary Electrophoresis in Glycoprotein Analysis (pp. 181–197). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5_11
- Rustighi, I., Campa, C., Rossi, M., Semeraro, S., Vetere, A., & Gamini, A. (2009). Analysis of N-acetylaminosugars by CE: A comparative derivatization study. *Electrophoresis*, *30*(15), 2632–2639. <https://doi.org/10.1002/elps.200800791>
- Safdar, M., Sproß, J., & Jänis, J. (2014). Microscale immobilized enzyme reactors in proteomics: Latest developments. *Journal of Chromatography A*, *1324*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2013.11.045>
- Šagi, D., Kienz, P., Denecke, J., Marquardt, T., & Peter-Katalinić, J. (2005). Glycoproteomics of N-glycosylation by in-gel deglycosylation and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry mapping: Application to congenital disorders of glycosylation. *Proteomics*, *5*(10), 2689–2701. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401312>
- Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Giménez, E., & Barbosa, J. (2005). Capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry for analysis of the novel erythropoiesis-stimulating protein (NESP). *ELECTROPHORESIS*, *26*(7–8), 1451–1456. <https://doi.org/10.1002/elps.200410092>
- Sarkar, A., Drouillard, S., Rivet, A., & Perez, S. (2015). Databases of Conformations and NMR Structures of Glycan Determinants. *Glycobiology*, *25*(12), 1480–1490. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv054>
- Schiestl, M., Stangler, T., Torella, C., Čepeljnik, T., Toll, H., & Grau, R. (2011). Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, *29*(4), 310–312. <https://doi.org/10.1038/nbt.1839>
- Schmid, D., Behnke, B., Metzger, J., & Kuhn, R. (2002). Nano-HPLC-mass spectrometry and MEKC for the analysis of oligosaccharides from human milk. *Biomedical Chromatography*, *16*(2), 151–156. <https://doi.org/10.1002/bmc.152>
- Schwedler, C., Kaup, M., Weiz, S., Hoppe, M., Braicu, E. I., Sehouli, J., Hoppe, B., Tauber, R., Berger, M., & Blanchard, V. (2014). Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(28), 7185–7193. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8168-y>
- Sergey Y. Vakhrushev, †, James Langridge, ‡, Iain Campuzano, ‡, Chris Hughes, ‡ and, & Jasna Peter-Katalinić*, †. (2008). Ion Mobility Mass Spectrometry Analysis of Human Glycourinome. <https://doi.org/10.1021/AC7023443>
- Shajahan, A., Heiss, C., Ishihara, M., & Azadi, P. (2017). Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(19), 4483–4505. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0406-7>
- Shang, T. Q., Saati, A., Toler, K. N., Mo, J., Li, H., Matlosz, T., Lin, X., Schenk, J., Ng, C.-K., Duffy, T., Porter, T. J., & Rouse, J. C. (2014). Development and application of a robust N-glycan profiling method for heightened characterization of monoclonal antibodies and related glycoproteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *103*(7), 1967–1978. <https://doi.org/10.1002/jps.24004>
- Shubhakar, A., Kozak, R. P., Reiding, K. R., Royle, L., Spencer, D. I. R., Fernandes, D. L., & Wuhrer, M. (2016). Automated High-Throughput Permethylaton for Glycosylation Analysis of Biologics Using MALDI-TOF-MS. *Analytical Chemistry*, *88*(17), 8562–8569. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01639>
- Sjöberg, J., Adorjan, I., Rosenau, T., & Kosma, P. (2004). An optimized CZE method for analysis of mono- and oligomeric aldose mixtures. *Carbohydrate Research*, *339*(11), 2037–2043. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.06.003>
- Snyder, C. M., Zhou, X., Karty, J. A., Fonslow, B. R., Novotny, M. V., & Jacobson, S. C. (2017). Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct structural identification of serum N-glycans. *Journal of Chromatography A*, *1523*, 127–139. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.09.009>
- Song, X., Ju, H., Lasanajak, Y., Kudelka, M. R., Smith, D. F., & Cummings, R. D. (2016). Oxidative release of natural glycans for functional glycomics. *Nature Methods*, *13*(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3861>
- Song, X., Smith, D. F., & Cummings, R. D. (2012). Nonenzymatic release of free reducing glycans from glycosphingolipids. *Analytical Biochemistry*, *429*(1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2012.06.029>
- Stavenhagen, K., Kolarich, D., & Wuhrer, M. (2015). Clinical Glycomics Employing Graphitized Carbon Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Chromatographia*, *78*(5–6), 307–320.

<https://doi.org/10.1007/s10337-014-2813-7>

- Stöckmann, H., O'Flaherty, R., Adamczyk, B., Saldova, R., & Rudd, P. M. (2015a). Automated, high-throughput serum glycoprofiling platform. *Integrative Biology*, *7*(9), 1026–1032. <https://doi.org/10.1039/C5IB00130G>
- Stöckmann, H., O'Flaherty, R., Adamczyk, B., Saldova, R., & Rudd, P. M. (2015b). Automated, high-throughput serum glycoprofiling platform. *Integrative Biology*, *7*(9), 1026–1032. <https://doi.org/10.1039/C5IB00130G>
- Struwe, W. B., Pagel, K., Benesch, J. L. P., Harvey, D. J., & Campbell, M. P. (2016). GlycoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics. *Glycoconjugate Journal*, *33*(3), 399–404. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9613-7>
- Suzuki, H., Kato, E., Matsuzaki, A., Ishikawa, M., Harada, Y., Tanikawa, K., & Nakagawa, H. (2009). Analysis of Saccharides Possessing Post-translational Protein Modifications by Phenylhydrazine Labeling Using High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Sciences*, *25*(8), 1039–1042. <https://doi.org/10.2116/analsci.25.1039>
- Suzuki, S. (2013). Recent developments in liquid chromatography and capillary electrophoresis for the analysis of glycoprotein glycans. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, *29*(12), 1117–1128. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.1117>
- Suzuki, S., Takehi, K., & Honda, S. (1996). Comparison of the sensitivities of various derivatives of oligosaccharides in LC/MS with fast atom bombardment and electrospray ionization interfaces. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac951144c>
- Szabo, Z., Thayer, J. R., Agroskin, Y., Lin, S., Liu, Y., Srinivasan, K., Saba, J., Viner, R., Huhmer, A., Rohrer, J., Reusch, D., Harfouche, R., Khan, S. H., & Pohl, C. (2017). In-depth analyses of native N-linked glycans facilitated by high-performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection coupled to mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(12), 3089–3101. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0248-3>
- Székényes, Á., Park, S. S., Santos, M., Lew, C., Jones, A., Haxo, T., Kimzey, M., Pourkaveh, S., Szabó, Z., Susic, Z., Feng, P., Váradi, C., de l'Escaille, F., Falmagne, J.-B., Sejwal, P., Niedringhaus, T., Michels, D., Freckleton, G., Hamm, M., Manuilov, A., Schwartz, M., Luo, J.-K., van Dyck, J., Leung, P.-K., Olajos, M., Gu, Y., Gao, K., Wang, W., Wegstein, J., Tep, S., & Guttman, A. (2016). Multi-Site N-glycan mapping study 1: Capillary electrophoresis – laser induced fluorescence. *MAbs*, *8*(1), 56–64. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1107687>
- Székényes, Á., Partyka, J., Váradi, C., Krenkova, J., Foret, F., & Guttman, A. (2015). Sample Preparation for N-Glycosylation Analysis of Therapeutic Monoclonal Antibodies by Electrophoresis (pp. 183–195). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2353-3_16
- Szigeti, M., & Guttman, A. (2017). High-Resolution Glycan Analysis by Temperature Gradient Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, *89*(4), 2201–2204. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00016>
- Szigeti, M., Lew, C., Roby, K., & Guttman, A. (2016). Fully Automated Sample Preparation for Ultrafast N-Glycosylation Analysis of Antibody Therapeutics. *Journal of Laboratory Automation*, *21*(2), 281–286. <https://doi.org/10.1177/2211068215608767>
- Takao, T., Tambara, Y., Nakamura, A., Yoshino, K., Fukuda, H., Fukuda, M., & Shimonishi, Y. (1996). Sensitive Analysis of Oligosaccharides Derivatized with 4-Aminobenzoic Acid 2-(Diethylamino)ethyl Ester by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *10*(6), 637–640. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199604\)10:6<637::AID-RCM544>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199604)10:6<637::AID-RCM544>3.0.CO;2-9)
- Takegawa, Y., Deguchi, K., Keira, T., Ito, H., Nakagawa, H., & Nishimura, S.-I. (2006). Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1113*(1–2), 177–181. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.02.010>
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *2*(8), 151–153. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>
- Tao, S., Huang, Y., Boyes, B. E., & Orlando, R. (2014). Liquid chromatography-selected reaction monitoring (LC-SRM) approach for the separation and quantitation of sialylated N-glycans linkage isomers. *Analytical Chemistry*, *86*(21), 10584–10590. <https://doi.org/10.1021/ac5020996>
- Thomson, R. I., Gardner, R. A., Strohfeldt, K., Fernandes, D. L., Stafford, G. P., Spencer, D. I. R., & Osborn, H. M. I. (2017). Analysis of Three Epoetin Alpha Products by LC and LC-MS Indicates Differences in Glycosylation Critical Quality Attributes, Including Sialic Acid Content. *Analytical Chemistry*, *89*(12), 6455–6462. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00353>
- Tousi, F., Hancock, W. S., & Hincapie, M. (2011). Technologies and strategies for glycoproteomics and glycomics

- and their application to clinical biomarker research. *Anal. Methods*, *3*(1), 20–32. <https://doi.org/10.1039/C0AY00413H>
- Tran, B. Q., Barton, C., Feng, J., Sandjong, A., Yoon, S. H., Awasthi, S., Liang, T., Khan, M. M., Kilgour, D. P. A., Goodlett, D. R., & Goo, Y. A. (2016). Comprehensive glycosylation profiling of IgG and IgG-fusion proteins by top-down MS with multiple fragmentation techniques. *Journal of Proteomics*, *134*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2015.10.021>
- Tran, N. T., Taverna, M., Deschamps, F. S., Morin, P., & Ferrier, D. (1998). Investigation of micelles and anionic cyclodextrins as pseudostationary phases for the capillary electrophoresis separation of oligosaccharides derivatized with 2-aminobenzamide. *Electrophoresis*, *19*(15), 2630–2638. <https://doi.org/10.1002/elps.1150191511>
- Tretter, V., Altmann, F., & März, L. (1991). Peptide-N4-(N-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached α1 → 3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European Journal of Biochemistry*, *199*(3), 647–652. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16166.x>
- van Kuik, J. A., & Vliegthart, J. F. G. (1992). Databases of complex carbohydrates. *Trends in Biotechnology*, *10*, 182–185. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(92\)90211-D](https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90211-D)
- Váradi, C., Lew, C., & Guttman, A. (2014). Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies. *Analytical Chemistry*, *86*(12), 5682–5687. <https://doi.org/10.1021/ac501573g>
- Váradi, C., Mittermayr, S., Millán-Martín, S., & Bones, J. (2016). Quantitative twoplex glycan analysis using 12C6 and 13C6 stable isotope 2-aminobenzoic acid labelling and capillary electrophoresis mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(30), 8691–8700. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9935-8>
- Váradi, C., Mittermayr, S., Szekrényes, Á., Kádas, J., Takacs, L., Kurucz, I., & Guttman, A. (2013). Analysis of haptoglobin N-glycome alterations in inflammatory and malignant lung diseases by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *34*(16), 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/elps.201300041>
- Vidanapathirana, P., Hasan, F., Mussio, K., Pande, A., Brands, M., Siraj, N., Grove, A., & Warner, I. M. (2017). Cationic ionic liquid surfactant-polyacrylamide gel electrophoresis for enhanced separation of acidic and basic proteins with single-step ribonuclease b glycoforms separation. *Journal of Chromatography A*, *1515*, 245–251. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.07.083>
- Vliegthart, J. F. G., Dorland, L., & Halbeek, H. van. (1983). High-Resolution, 1H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Tool in the Structural Analysis of Carbohydrates Related to Glycoproteins. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *41*, 209–374. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60059-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60059-1)
- Vreeker, G. C. M., & Wührer, M. (2017). Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(2), 359–378. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0073-0>
- Wada, Y., Kadoya, M., & Okamoto, N. (2012). Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology*, *22*(8), 1140–1144. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws086>
- Wang, C., Fan, W., Zhang, P., Wang, Z., & Huang, L. (2011). One-pot nonreductive O-glycan release and labeling with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone followed by ESI-MS analysis. *PROTEOMICS*, *11*(21), 4229–4242. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000677>
- Wang, C., Yuan, J., Wang, Z., & Huang, L. (2013). Separation of one-pot procedure released O-glycans as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography followed by identification using electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1274*, 107–117. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.12.005>
- Wang, L., Bo, T., Zhang, Z., Wang, G., Tong, W., & Da Yong Chen, D. (2018). High Resolution Capillary Isoelectric Focusing Mass Spectrometry Analysis of Peptides, Proteins, And Monoclonal Antibodies with a Flow-through Microvial Interface. *Analytical Chemistry*, *90*(15), 9495–9503. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02175>
- Wang, W. T., LeDonne, N. C., Ackerman, B., & Sweeley, C. C. (1984). Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast-atom bombardment-mass spectrometry, and exoglycosidase digestion. *Analytical Biochemistry*, *141*(2), 366–381. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90057-5)
- Wang, Y., Zhou, X., Yu, Q., Duan, Y., Huang, B., Hong, G., Zhou, A., & Jin, L. (2014). Prestaining of glycoproteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by dansylhydrazine. *PROTEOMICS*, *14*(11), 1322–1327. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300532>
- Watson, E., & Yao, F. (1993). Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO)

- glycoforms. *Analytical Biochemistry*, 210(2), 389–393. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1212>
- Weiz, S., Wieczorek, M., Schwedler, C., Kaup, M., Braicu, E. I., Sehoul, J., Tauber, R., & Blanchard, V. (2016). Acute-phase glycoprotein N-glycome of ovarian cancer patients analyzed by CE-LIF. *Electrophoresis*, 37(11), 1461–1467. <https://doi.org/10.1002/elps.201500518>
- Wuhrer, M., de Boer, A. R., & Deelder, A. M. (2009). Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(2), 192–206. <https://doi.org/10.1002/mas.20195>
- Xue, Y., Xie, J., Fang, P., Yao, J., Yan, G., Shen, H., & Yang, P. (2018). Study on behaviors and performances of universal N-glycopeptide enrichment methods. *The Analyst*. <https://doi.org/10.1039/C7AN02062G>
- Yamamoto, S., Kinoshita, M., & Suzuki, S. (2016). Current landscape of protein glycosylation analysis and recent progress toward a novel paradigm of glycoscience research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 273–300. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.015>
- Yamamoto, S., Nagai, E., Asada, Y., Kinoshita, M., & Suzuki, S. (2015). A rapid and highly sensitive microchip electrophoresis of mono- and mucin-type oligosaccharides labeled with 7-amino-4-methylcoumarin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(5), 1499–1503. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8363-x>
- Yamashita, K., & Ohkura, T. (2014). Determination of glycan motifs using serial lectin affinity chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 1200, 79–92. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_7
- Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451–4459. <https://doi.org/10.1021/j150664a002>
- Yang, Y., Liu, F., Franc, V., Halim, L. A., Schellekens, H., & Heck, A. J. R. (2016). Hybrid mass spectrometry approaches in glycoprotein analysis and their usage in scoring biosimilarity. *Nature Communications*, 7, 13397. <https://doi.org/10.1038/ncomms13397>
- Yen-Nicolaj, S., Boursier, C., Rio, M., Lefeber, D. J., Pilon, A., Seta, N., & Bruneel, A. (2015). MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation: Comparison with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics - Clinical Applications*, 9(7–8), 787–793. <https://doi.org/10.1002/prca.201400187>
- Yodoshi, M., Ikeda, N., Yamaguchi, N., Nagata, M., Nishida, N., Kakehi, K., Hayakawa, T., & Suzuki, S. (2013). A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents. *ELECTROPHORESIS*, 34(22–23), 3198–3205. <https://doi.org/10.1002/elps.201200612>
- Yodoshi, M., Tani, A., Ohta, Y., & Suzuki, S. (2008). Optimized conditions for high-performance liquid chromatography analysis of oligosaccharides using 7-amino-4-methylcoumarin as a reductive amination reagent. *Journal of Chromatography A*, 1203(2), 137–145. Retrieved from https://ac-els-cdn-com.proxy.scd.u-psud.fr/S0021967308011837/1-s2.0-S0021967308011837-main.pdf?_tid=ca9d6f20-dd44-44cd-8ef9-64ab7d1f1449&acdnat=1520437079_d7c983fb6e2571a013389832a6e9f4a3
- You, J., Sheng, X., Ding, C., Sun, Z., Suo, Y., Wang, H., & Li, Y. (2008). Detection of carbohydrates using new labeling reagent 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone by capillary zone electrophoresis with absorbance (UV). *Analytica Chimica Acta*, 609(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2007.12.022>
- Zaia, J. (2013). Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry of Carbohydrates. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 984, 13–25. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-296-4_2
- Zauner, G., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2011, December 1). Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*. WILEY-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elps.201100247>
- Zauner, G., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2012a). Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by beta-elimination and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(9), 1420–1428. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.004>
- Zauner, G., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2012b). Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by beta-elimination and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(9), 1420–1428. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.004>
- Zauner, G., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2012c). Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by beta-elimination and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(9), 1420–1428. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2011.07.004>
- Zauner, G., Kozak, R. P., Gardner, R. A., Fernandes, D. L., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2012). Protein O-glycosylation analysis. *Biological Chemistry*, 393(8), 687–708. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0144>

- Zhang, C., & Hage, D. S. (2016). Glycoform analysis of alpha1-acid glycoprotein by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, *1475*, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.014>
- Zhang, C., Ye, Z., Xue, P., Shu, Q., Zhou, Y., Ji, Y., Fu, Y., Wang, J., & Yang, F. (2016). Evaluation of Different N-Glycopeptide Enrichment Methods for N-Glycosylation Sites Mapping in Mouse Brain. *Journal of Proteome Research*, *15*(9), 2960–2968. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00098>
- Zhang, Q., Li, Z., Wang, Y., Zheng, Q., & Li, J. (2018). Mass spectrometry for protein sialoglycosylation. *Mass Spectrometry Reviews*, *37*(5), 652–680. <https://doi.org/10.1002/mas.21555>
- Zhang, Y.-W., Zhao, M.-Z., Liu, J.-X., Zhou, Y.-L., & Zhang, X.-X. (2015). Double-layer poly(vinyl alcohol)-coated capillary for highly sensitive and stable capillary electrophoresis and capillary electrophoresis with mass spectrometry glycan analysis. *Journal of Separation Science*, *38*(3), 475–482. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401025>
- Zhang, Y. W., Zhao, M. Z., Liu, J. X., Zhou, Y. L., & Zhang, X. X. (2015). Double-layer poly(vinyl alcohol)-coated capillary for highly sensitive and stable capillary electrophoresis and capillary electrophoresis with mass spectrometry glycan analysis. *Journal of Separation Science*, *38*(3), 475–482. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401025>
- Zhao, J., Li, S., Li, C., Wu, S.-L., Xu, W., Chen, Y., Shameem, M., Richardson, D., & Li, H. (2016). Identification of Low Abundant Isomeric N-Glycan Structures in Biological Therapeutics by LC/MS. *Analytical Chemistry*, *88*(14), 7049–7059. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00636>
- Zhong, X., Chen, Z., Snovida, S., Liu, Y., Rogers, J. C., & Li, L. (2015). Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Quantitative Analysis of Glycans Labeled with Multiplex Carbonyl-Reactive Tandem Mass Tags. *Analytical Chemistry*, *87*(13), 6527–6534. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01835>
- Zhou, A., Zhou, T., Yu, D., Shen, Y., Shen, J., Zhu, Z., Jin, L., Zhang, H., & Wang, Y. (2015). Pre-staining of glycoprotein in SDS-PAGE by the synthesis of a new hydrazide derivative. *PROTEOMICS*, *15*(21), 3623–3628. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400567>
- Zhou, S., Hu, Y., & Mechref, Y. (2016). High-temperature LC-MS/MS of permethylated glycans derived from glycoproteins. *Electrophoresis*, *37*(11), 1506–1513. <https://doi.org/10.1002/elps.201500568>
- Zhou, S., Veillon, L., Dong, X., Huang, Y., & Mechref, Y. (2017). Direct comparison of derivatization strategies for LC-MS/MS analysis of N-glycans. *The Analyst*, *142*(23), 4446–4455. <https://doi.org/10.1039/C7AN01262D>
- Zhu, A., Romero, R., Huang, J.-B., Clark, A., & Petty, H. R. (2011). Maltooligosaccharides from JEG-3 trophoblast-like cells exhibit immunoregulatory properties. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *65*(1), 54–64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00851.x>
- Zhu, Z., Zhou, X., Wang, Y., Yu, Q., Zhu, X., Niu, C., Cong, W., & Jin, L. (2014). Prestaining of glycoproteins in SDS-PAGE via 4H-[1]-Benzopyrano[4,3-b]thiophene-2-carboxylic acid hydrazide with weak influence on protein mobility. *ELECTROPHORESIS*, *35*(24), 3512–3517. <https://doi.org/10.1002/elps.201400351>

Chapitre III : Glycosylation et pathologies humaines

Comme vu précédemment, la glycosylation est la modification post-traductionnelle la plus courante impliquant une multitude d'enzymes dans le RE et l'appareil de Golgi. Des modifications de la glycosylation peuvent avoir lieu au cours des différentes étapes de la biosynthèse des glycanes à cause de diverses pathologies. Celles-ci engendrent alors des anomalies innées ou acquises de la glycosylation. Les méthodes analytiques développées pour analyser la glycosylation et présentées dans le chapitre précédent, ont permis de mettre en évidence ces anomalies de glycosylation et ainsi d'avoir accès à de nouvelles données utiles pour discriminer les pathologies et aider au diagnostic. Les principales pathologies associées à des modifications de glycosylation seront décrites dans ce chapitre et un accent particulier sera porté sur les pathologies étudiées dans la partie expérimentale (anomalies congénitales de la glycosylation et maladie d'Alzheimer).

I. Les anomalies congénitales de la glycosylation (CDG)

Les anomalies congénitales de la glycosylation peuvent être séparées en deux groupes : les anomalies primaires congénitales de la glycosylation (CDG) ou les maladies génétiques causant une hypoglycosylation secondaire (galactosémie, intolérance au fructose...). Dans cette partie, seuls les CDG seront décrits.

I.1. Etat de l'art et classification des CDG

Le syndrome appelé « carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome » en anglais fut découvert en 1980 par Jaak Jaeken (Jaeken *et al.*, 1980). C'est seulement après les années 2000 que le nom définitif de ce syndrome est fixé à « congenital disorders of glycosylation » (CDG) ou troubles congénitaux de la glycosylation en français. Les CDG regroupent l'ensemble des pathologies héréditaires rares, principalement autosomiques récessives touchant la synthèse des glycanes des glycoprotéines (Freeze, 2006; Jaeken, 2010b; Marquardt & Denecke, 2003). Plus de 1300 patients atteints de CDG sont répertoriés en Europe (prévalence moyenne 1/50000-100000 en Europe) (Péanne *et al.*, 2017). Les CDG proviennent de dysfonctionnements métaboliques et sont associés à des déficits enzymatiques et à des mutations génétiques diverses affectant ainsi : les glycosyltransférases (53 types de CDG), les sous-unités de multi-protéines (16 types de CDG), les transporteurs de nucléotides-sucres (6 types de CDG), les désacylases (3 types de CDG), les mutases (3 types de CDG), les synthases (3 types de CDG), les glycosidases (4 types de CDG), les acylases (2 types de CDG), les phosphorylases (2 types de CDG), et les récepteurs (2 types de CDG), un chaperon (1 type de CDG), une désacétylase (1 type de CDG), une épimérase (1 type de CDG), une flippase (1 type de CDG), une kinase (1 type de CDG), une réductase (1 type de CDG) ou encore une transamidase (1 type de CDG) (Jaeken & Péanne, 2017a). Il existe 105 types de CDG connus à l'heure actuelle, mais de plus en plus de mutations sont découvertes au fil des ans et pas moins de 5 nouveaux types de CDG ont été répertoriés sur les six

premiers mois de 2017 (Péanne *et al.*, 2017). Ceci est notamment dû à un réseau européen, créé en 2011 et regroupant 8 hôpitaux, qui a conduit à une amélioration des méthodologies de diagnostic permettant d'identifier un plus grand nombre de CDG et de raccourcir le temps nécessaire pour le diagnostic mais aussi de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

Les erreurs innées du métabolisme de la glycosylation concernent essentiellement la biosynthèse du précurseur tétradécasaccharidique et son transfert sur la chaîne peptidique au niveau du RE ou la maturation des glycanes dans l'appareil de Golgi (voir Figure 53).

Les CDG ont été initialement définis comme des erreurs innées métaboliques portant sur la N-glycosylation. Cependant, le nombre grandissant de nouveaux cas détectés a montré qu'ils pouvaient également être associés à la O-glycosylation ainsi qu'à la combinaison des N et O-glycosylations. Aucun cas de CDG affectant la C-glycosylation n'a été reporté jusqu'à maintenant. Une première classification des CDG basée sur l'étape métabolique limitante dans la biosynthèse des glycanes a été établie. Un système de nomenclature a été proposé par la suite afin de les rassembler selon deux groupes, les CDG-I et CDG-II (Aebi *et al.*, 1999). Les CDG-I représentent le type le plus fréquemment rencontré (plus de 1000 cas décrits dans le monde) et comptabilisent 94% des patients diagnostiqués sur l'ensemble des laboratoires européens prenant en charge le dépistage des CDG (Péanne *et al.*, 2017). Ils correspondent à des déficits enzymatiques au niveau des voies d'assemblage des Dol-P-P (voir Chapitre I) au niveau du RE conduisant à une absence de chaînes glycaniques sur certains, voire tous les sites de glycosylation des N-glycoprotéines. Les CDG-II (6% des patients diagnostiqués en Europe), quant à eux, sont caractérisés par des défauts des mécanismes de maturation des chaînes glycaniques liées aux protéines, au cours de leur passage au niveau du RE et de l'appareil de Golgi menant à une troncation des chaînes N-glycaniques qui sont alors incomplètes. Cette nomenclature propose de sous-classifier les CDG en faisant suivre le type I ou II par une lettre (a, b, c ...) attribuée par ordre chronologique de la découverte de nouvelles mutations (voir Figure 53). Les cas de CDG dont l'origine était encore inconnue étaient rassemblés sous les types CDG-Ix ou CDG-IIx.

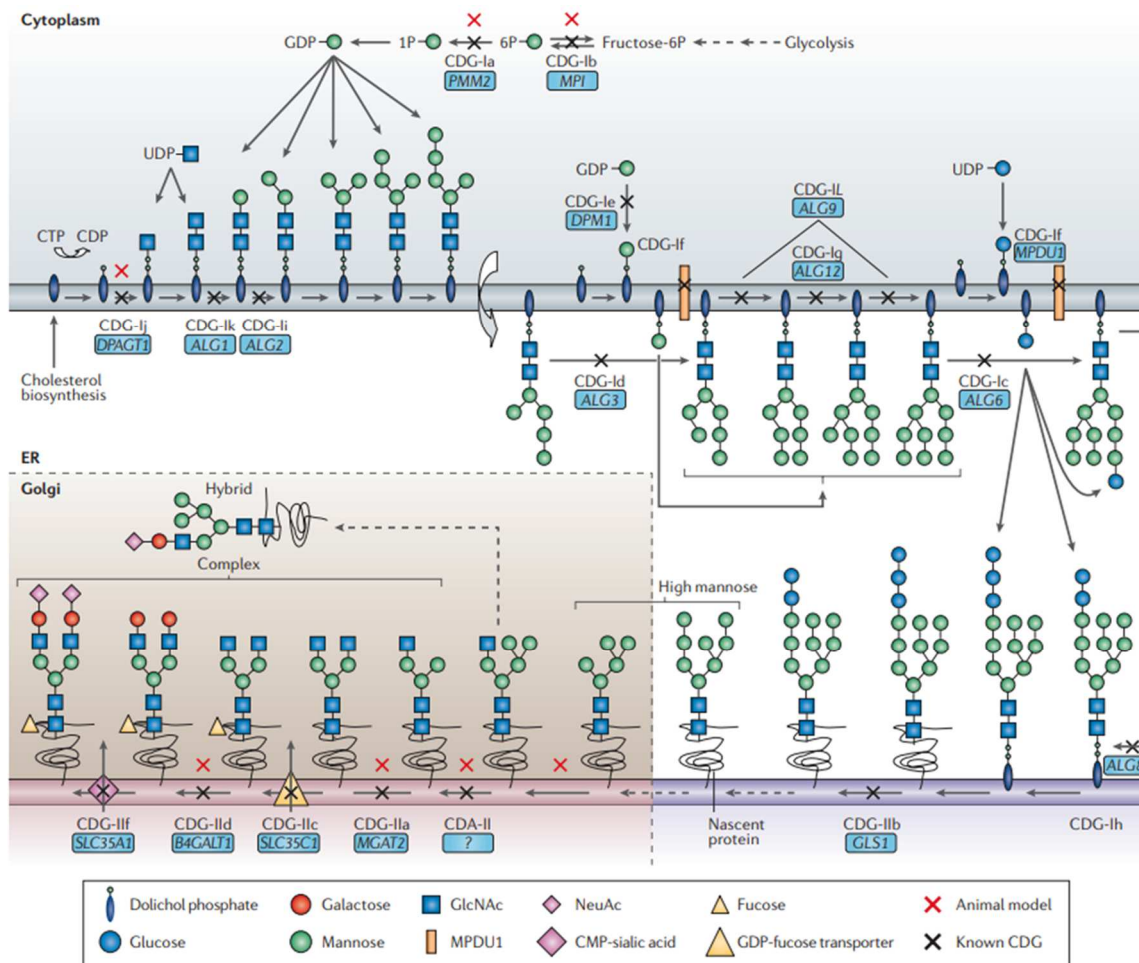


Figure 53: Processus de biosynthèse des N-glycanes et sites d'anomalies génétiques responsables des différents types de CDG annotés d'après (Freeze, 2006)

Cependant, le nombre de CDG ayant fortement augmenté et la nomenclature étant très complexe pour les cliniciens, une nouvelle classification a été adoptée en 2008 (Jaeken *et al.*, 2008). Dans cette nouvelle classification, les deux types de CDG n'existent plus puisqu'ils sont désormais nommés selon le gène défaillant suivi du suffixe -CDG. Le nom de la protéine mutée doit également être indiqué. Ainsi, le CDG le plus courant, anciennement appelé CDG-Ia, est alors renommé PMM2-CDG. L'appellation CDG-x est conservée pour tous les cas où la mutation n'a pas encore été trouvée. La liste complète des CDG se trouve en Annexe 2 (Jaeken & Péanne, 2017a).

I.2. Observations cliniques

Les symptômes des patients atteints de CDG sont très variés et hétérogènes, et ce, même pour des personnes atteintes du même sous-type ou pour des membres d'une même famille, rendant le diagnostic très complexe (Al Teneji *et al.*, 2017). Dans les cas les plus graves, les patients peuvent présenter des troubles neurologiques associés à des atteintes multiviscérales (Sparks & Krasnewich, 2014). Dès la naissance, certains symptômes tels qu'un strabisme interne (Wolfe & Krasnewich, 2013), des mamelons ombiliqués (Rymen & Jaeken, 2014), des anomalies lipocutanées (Rymen & Jaeken, 2014) peuvent être détectés. Des manifestations neurologiques (Freeze, Eklund, et al., 2015) telles que des crises d'épilepsie (Barba *et al.*, 2016), une hypotonie généralisée, une hypoplasie et une atrophie cérébelleuse peuvent également apparaître. Les enfants atteints de CDG présentent également de forts

retards mentaux et psychomoteurs (Wolfe & Krasnewich, 2013). Des atteintes cardiaques (Footitt *et al.*, 2009) sont également fréquentes ainsi qu'une hépatomégalie modérée en lien avec une fibrose hépatique (Grünewald *et al.*, 2002). D'autres manifestations, telles que des anomalies rénales et endocrines diverses (Miller & Freeze, 2003) ainsi que des troubles de la coagulation (Van Geet *et al.*, 2001) sont aussi parfois rencontrés. La mortalité infantile est très élevée lors des trois premières années de vie ($\approx 20-30\%$ des cas) principalement à cause de défaillances hépatiques ou cardiaques ou à cause d'infections (de Lonlay *et al.*, 2008). Après l'adolescence, d'autres signes, tels que l'absence de puberté, une scoliose ou des anomalies articulaires peuvent apparaître. La grande variabilité du tableau clinique explique l'important sous-diagnostic de ces pathologies (Péanne *et al.*, 2017). L'espérance de vie reste généralement très courte mais elle dépend du type de CDG considéré et peut varier de quelques jours après la naissance à plus de 50 ans (Jaeken & Morava, 2016).

I.3. Dépistage et identification des CDG

Lorsque les symptômes cliniques semblent indiquer un CDG, une confirmation biochimique est nécessaire. Celle-ci peut passer par l'analyse de plusieurs glycoprotéines sériques telles que l'alpha1-glycoprotéine acide ($\alpha 1$ -GPA) et l'alpha-1-antitrypsine ($\alpha 1$ -ATT) (Harrison *et al.*, 1992) ou par l'analyse de la protéine « β -trace» (ou prostaglandine H2 D-isomérase), présente dans le liquide céphalorachidien (Grünewald *et al.*, 1999; Pohl *et al.*, 1997).

Bien que les anomalies de glycosylation semblent toucher toutes les glycoprotéines sériques, le dépistage rapide des anomalies de la N-glycosylation est effectué grâce à l'analyse de la transferrine sérique (Tf) par isoélectrofocalisation (IEF), par électrophorèse capillaire de zone (ECZ) ou par chromatographie liquide (HPLC) (voir partie I.4). Lorsqu'un profil anormal de la Tf est obtenu et qu'il correspond au profil caractéristique du CDG de type I, une mesure d'activité des enzymes leucocytaires ou fibroblastiques impliquées dans les deux CDG de type I les plus fréquents (PMM2-CDG et MPI-CDG) est réalisé (Lefeber *et al.*, 2011; Van Scherpenzeel *et al.*, 2016). Si l'activité de ces enzymes s'avère normale, l'étape suivante correspond à l'identification du précurseur d'oligosaccharides liés au dolichol ou à des lipides dans les fibroblastes (Gao & Lehrman, 2002). Une augmentation d'un ou plusieurs glycanes intermédiaire(s) permet d'émettre des hypothèses sur l'étape défaillante et de pouvoir remonter à la mutation génétique. Cependant, cette analyse est généralement remplacée par un séquençage d'exome direct. Si le profil observé correspond à un CDG de type II, la procédure classique consiste à évaluer la O-glycosylation, par l'intermédiaire de l'analyse de l'apolipoprotéine C-III (ApoC-III) par IEF, ECZ, spectrométrie de masse MALDI ou par HPLC. Cette analyse permet de vérifier les abondances des différentes glycoformes d'une O-glycoprotéine ce qui permet de déterminer s'il s'agit d'un type de CDG affectant la N-glycosylation de manière isolée ou combinée avec la O-glycosylation.

Si le profil de l'analyse de la Tf est difficilement interprétable, l'étude peut être complétée par celle de trois autres glycoprotéines plasmatiques (l' $\alpha 1$ -AGP, l' $\alpha 1$ -ATT et l'haptoglobine (Hpt)) par Western-blot pour confirmer la présence ou l'absence des anomalies de glycosylation dues aux CDG (Figure 17)(Artuch *et al.*, 2003; Seta *et al.*, 1996). En effet, ces glycoprotéines sont également sensibles aux CDG et présentent une modification de l'abondance de leurs différentes glycoformes. En particulier, il est apparu récemment que la chaîne β de l'haptoglobine constituait un biomarqueur additionnel fiable utile pour le dépistage de tous les types de CDG (Bruneel *et al.*, 2017). En effet, elle présente des anomalies très nettes de sa glycosylation (plus de glycoformes visibles) lors de l'étude de patients atteints de CDG

de types I et II et reste inchangée dans le cas des anomalies de glycosylation secondaires (alcoolisme, fuctosémie) (Figure 17).

Une fois le dépistage d'anomalies de glycosylation réalisé via l'analyse de la Tf et de l'ApoC-III, il convient de déterminer la mutation à l'origine du CDG. Si les tests biochimiques et le tableau clinique semblent indiquer un sous-type de CDG particulier, le séquençage du gène suspecté est réalisé. Cependant, si aucun CDG n'est suggéré, un séquençage de l'ensemble des 44 gènes, impliqués dans les différents cas de CDG déjà connus, est effectué, permettant ainsi le diagnostic de la mutation chez près de 35% des patients (Jaeken & Péanne, 2017a). Des tests génomiques plus complets, tels que le séquençage de l'exome et du génome, peuvent être considérés si le phénotype seul est insuffisant pour réaliser les tests sur un ou des gène(s) ciblé(s) ou si l'utilisation du séquençage des 44 gènes déjà impliqués dans des cas de CDG ne permet pas de confirmer le diagnostic de CDG (Sparks & Krasnewich, 2014).

Quelques revues permettent d'avoir une vue globale de ces étapes de dépistage (Abu Bakar *et al.*, 2018; Jaeken & Péanne, 2017b; Van Scherpenzeel *et al.*, 2016).

I.4. Anomalies affectant la N-glycosylation et leur dépistage

Les anomalies de la N-glycosylation ont été les premières à être rapportées et sont largement majoritaires. Comme vu précédemment, le dépistage des anomalies de la N-glycosylation est réalisé par l'étude de la Tf, qui constitue un biomarqueur sérique très abondant et sensible. La Tf est une glycoprotéine qui possède deux sites de N-glycosylation (Asn⁴¹³ et Asn⁶¹¹) (MacGillivray *et al.*, 1983) occupés essentiellement par des N-glycanes complexes. Comme montré sur la Figure 54, la Tf possède une grande micro-hétérogénéité glycanique naturelle puisqu'elle existe sous la forme d'une variété de glycoformes possibles.

La nomenclature que nous utiliserons dans cette partie est propre à l'analyse de la Tf et ne correspond pas à la nomenclature généralement utilisée en glycomique. En effet, les acides sialiques de tous les glycanes des différents sites de glycosylation sont additionnés pour donner les noms des différentes glycoformes.

Ainsi, la forme appelée tétrasialo-Tf porte des glycanes bi-antennés bi-sialylés sur les deux sites de glycosylation. Les formes pentasialo-Tf et hexasialo-Tf correspondent au remplacement des glycanes bi-antennés bi-sialylés par un ou deux glycanes tri-antennés tri-sialylés respectivement. La trisialo-Tf, quant à elle, peut exister sous deux formes, soit possédant un seul glycanes tri-antenné tri-sialylé sur un de ses sites de glycosylation (non représenté sur la Figure 54) soit par deux glycanes, l'un bi-antenné bi-sialylé et l'autre bi-antenné mono-sialylé. Les dernières glycoformes, bisialo-Tf et mono-sialo-Tf présentent soit un glycanes bi-antenné bi-sialylé soit un glycanes bi-antenné mono-sialylé respectivement. Enfin la forme asialo-Tf ne possède aucun glycanes.

La forme tétra-Tf est la plus abondante puisqu'elle représente entre 60 et 85% de la Tf chez les patients sains (Quintana, Navarro-Sastre, *et al.*, 2009). Les formes hexasialo-Tf, et pentasialo-Tf représentent ensemble une distribution comprise entre 10 et 25% tandis que la forme trisialo-Tf correspondant à 1.5-8% de la Tf chez les patients sains.

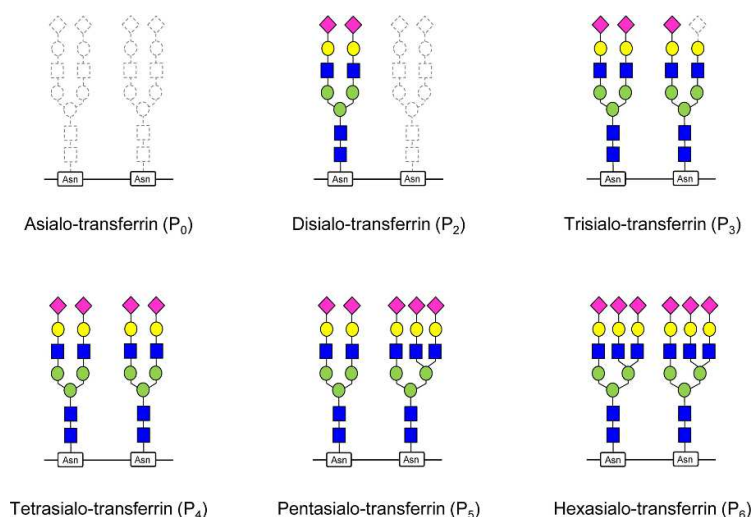


Figure 54 : Représentation des différentes glycoformes de la Tf humaine d'après (Kohler *et al.*, 2014)

Depuis son introduction en 1984 (Jaeken *et al.*, 1984) la méthode de référence utilisée pour le dépistage des CDG est l'IEF de la Tf (O'Brien, 2005). Cette technique repose sur la séparation des différentes isoformes selon leur état de charge défini par le nombre de résidus d'acides sialiques terminaux présents (Figure 55). Comme mentionné précédemment, l'isoforme normale majoritaire de la Tf est tétrasialylée (colonnes 1 et 3 de la Figure 55). Les patients atteints de CDG présentent alors une diminution de l'isoforme tétrasialo-Tf et une augmentation des formes moins sialylées. L'IEF de la Tf permet de classer les profils anormaux en deux groupes, CDG de type I ou de type II selon les bandes visibles. Ainsi, une augmentation isolée des isoformes asialo-Tf et bisialo-Tf correspond à un CDG de type I (ligne 2 de la Figure 55) tandis qu'une augmentation des isoformes monosialo-Tf, bisialo-Tf et trisialo-Tf est liée à un CDG de type II (lignes 4 et 5 de la Figure 55).

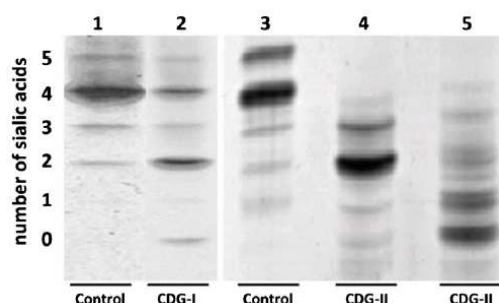


Figure 55 : Gels d'isoélectrofocalisation (IEF) de Tf. Le nombre d'acides sialiques est indiqué sur la gauche (0 à 5). Lignes 1 et 3 : profil normal, ligne 2 : profil d'un CDG de type I (présence des bandes asialo- et disialylées) et lignes 4 et 5 : profils de CDG de type II d'après (Van Scherpenzeel *et al.*, 2016)

Malgré son efficacité, l'IEF est une méthode qui n'est pas automatisable et dont l'interprétation est parfois subjective (Quintana, Navarro-Sastre, *et al.*, 2009). Afin de simplifier l'analyse des isoformes de la Tf en tant que témoin des anomalies de la N-glycosylation, de nouvelles techniques par ECZ (Carchon, 2004; Parente *et al.*, 2010) ou par HPLC (Quintana, Navarro-Sastre, *et al.*, 2009) ont été développées. Celles-ci reposent également sur la séparation des isoformes selon le nombre d'acides sialiques présents mais ont l'avantage d'être quantitatives. Des kits commerciaux (CEofix-CDT kit d'Analys ou Capillarys™ CDT kit de Sebia) ont été développés pour réaliser l'analyse de la Tf par ECZ pour le dépistage de l'alcoolisme chronique. Ces kits sont détournés pour faciliter le dépistage de patients atteints de CDG (Figure 56) puisqu'ils permettent une automatisation des analyses à l'hôpital. Comme avec l'IEF, il est possible de différencier les deux types de CDG (types I et II sur Figure 56B et C

respectivement) en fonction des proportions relatives de chacune des glycoformes avec une grande rapidité d'analyse. En effet le CDG-I est caractérisé par une augmentation des pics associés aux formes bisialo-Tf et asialo-Tf (Figure 56B) et le CDG-II à une augmentation des formes trisialo-Tf, bisialo-Tf, monosialo-Tf et asialo-Tf (Figure 56C) comme observé avec l'IEF. Un profil similaire, avec la même résolution, est obtenu lors de l'utilisation d'une méthode d'HPLC (de même les formes sont de plus en plus sialylées lorsque le temps de rétention augmente). L'évolution des méthodes ECZ-UV et HPLC-UV vers des méthodes couplées à la spectrométrie de masse (Lacey *et al.*, 2001; Sanz-Nebot *et al.*, 2007) permettent d'obtenir des informations structurales et d'identifier l'anomalie biochimique avec précision.

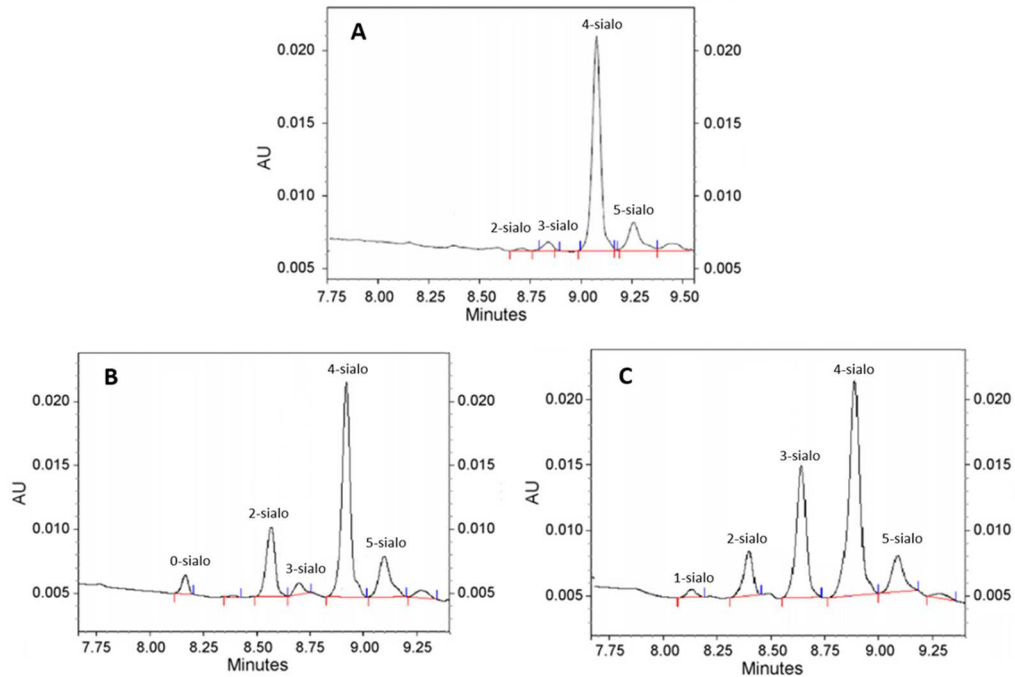
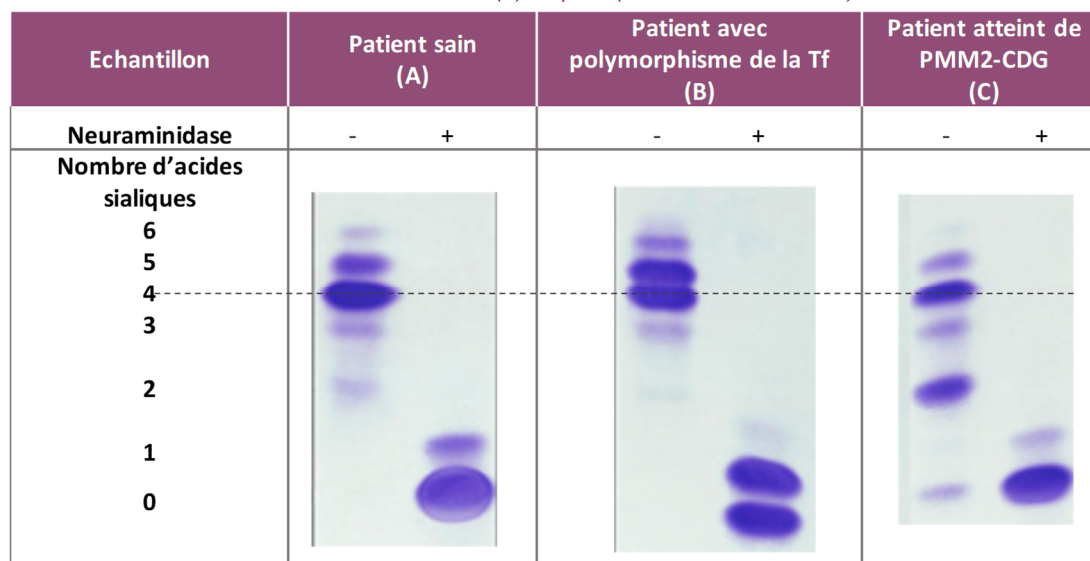


Figure 56 : Profils obtenus en électrophorèse capillaire de zone (ECZ) avec le kit commercial CEofix-CDT d'un sérum de patient sain (A), d'un patient atteint de CDG-I (B) et d'un patient atteint de CDG-II (C) d'après (Quintana, Montero, *et al.*, 2009)

Quelle que soit la technique utilisée (IEF, ECZ ou HPLC) un patient ayant un polymorphisme des isoformes de la Tf présentera également un profil anormal de la Tf avec généralement une forme trisialo-Tf plus intense que chez des patients de contrôle (Tableau IV) (Albahri *et al.*, 2005; Zühlendorf *et al.*, 2015). Afin d'exclure les hypothèses de polymorphisme, un traitement des sérums par de la neuraminidase (sialidase) est réalisé (Kühnl & Spielmann, 1978). La présence d'un polymorphisme de la Tf est confirmée si deux espèces sont encore visibles après désialylation (patient B dans le Tableau IV) mais si le profil ne présente plus qu'une seule isoforme non sialylée, le polymorphisme est exclu (patient C dans le Tableau IV).

Tableau IV : Gels d'IEF avant (-) et après (+) traitement à la neuraminidase d'un patient sain (A), d'un patient présentant une augmentation de la bande pentasialylée car ayant un polymorphisme de la Tf (B) et d'un patient atteint de PMM2-CDG (C) d'après (Zühlsdorf *et al.*, 2015).



De faux positifs peuvent également être détectés pour des patients souffrant d'alcoolisme chronique (profil de type CDG-I) (Arndt, 2001b; Golka & Wiese, 2004) ou pour des patients ayant une intolérance au fructose (profil de type CDG-I) (Jaeken *et al.*, 1996), une galactosémie congénitale non contrôlée (profil de type CDG-I) (Stibler *et al.*, 1997) ou encore une maladie hépatique sévère (profil de type CDG-II) (Larsson & Flodin, 1998). De plus, l'étude des isoformes de la Tf chez le nouveau-né conduit également souvent à de faux positifs (Thiel *et al.*, 2013). En effet, lors des premiers mois de vie (jusqu'à 3 mois), la maturation des N-glycanes de certaines protéines n'est pas encore achevée. Les glycanes de la Tf sont alors souvent tronqués donnant des profils de la Tf ressemblant à des CDG de type II. Dans ce cas, l'étude d'une autre glycoprotéine, l' α -ATT qui existe sous une forme entièrement glycosylée peu de temps après la naissance permet alors de confirmer ou d'exclure la présence d'un CDG.

Un autre écueil, celui des faux négatifs existe également, pour lesquels le profil obtenu des isoformes de la Tf était normal dans le cas de certains types de CDG précis (GCS1-CDG, SLC35C1-CDG et SLC35A1-CDG) (Krasnewich, 2014).

Afin de s'affranchir des problèmes de faux positifs et faux négatifs, compléter l'analyse de la Tf par celle de trois autres glycoprotéines plasmatiques (l' α -1-antitrypsine, l' α -1-glycoprotéine et l'haptoglobine) par Western-blot permet de confirmer la présence ou l'absence des anomalies de glycosylation dues aux CDG (Artuch *et al.*, 2003; Seta *et al.*, 1996). En particulier, il est apparu récemment que la chaîne β de l'haptoglobine constituait un biomarqueur additionnel fiable utile pour le dépistage de tous les types de CDG (Bruneel *et al.*, 2017).

Si le profil de la Tf correspond à un CDG de type II, la procédure classique consiste en l'évaluation de la O-glycosylation afin de déterminer s'il s'agit d'un type de CDG affectant la N-glycosylation de manière isolée ou combinée avec la O-glycosylation.

I.5. Anomalies affectant la O-glycosylation et leur dépistage

Le dépistage des anomalies de la O-glycosylation est réalisé par l'analyse de l'ApoC-III, une glycoprotéine synthétisée dans le foie et les intestins. Elle est principalement retrouvée à la surface des particules circulantes riches en triglycérides telles que les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité et de haute densité. L'ApoC-III est assez abondante puisque sa concentration plasmatique est comprise entre 0.1 et 0.5 g/L (Petibois *et al.*, 2001; Sakurabayashi *et al.*, 2001). Elle présente un unique site de O-glycosylation en Thr⁷⁴ portant la forme de O-glycane la plus courante, de type mucine à noyau 1 correspondant à un galactose (β 1-3) lié à une N-acétylgalactosamine, et aucun site de N-glycosylation. Trois glycoformes principales ont été décrites (Albers & Scanu, 1971; Hospattankar *et al.*, 1986; Shulman *et al.*, 1974) selon le nombre d'acides sialiques présents compris entre 0 et 2 (formes ApoC-III₀, ApoC-III₁ et ApoC-III₂ respectivement), la forme monosialylée étant la plus abondante (Figure 57). La forme monosialylée existe peut-être sous la forme de deux isomères où la position de l'acide sialique diffère. D'autres types de glycanes, minoritaires, peuvent également exister chez certains patients (fréquence <30%). Ceux-ci présentent une structure très différentes des 3 glycanes majoritaires puisqu'ils portent entre 2 et 4 résidus de fucose et aucun résidu d'acide sialique (Balog *et al.*, 2010; Nicolardi *et al.*, 2013). Ces glycanes de type Lewis ont des masses beaucoup plus élevées que les glycanes majoritaires (9933 < m/z < 10852).

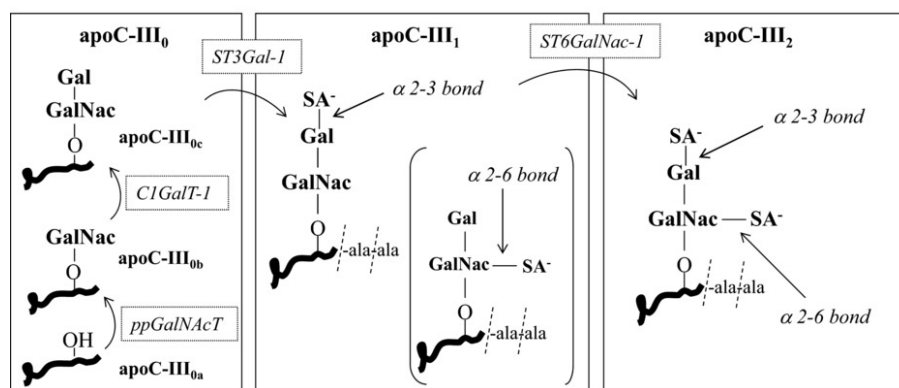


Figure 57 : Structures des différents glycoformes de l'ApoC-III d'après (Yen-Nicolaj et al., 2015b)

Une anomalie de O-glycosylation consiste en une augmentation de l'abondance relative des formes moins sialylées (asialylée et monosialylée) corrélée à une diminution de l'abondance relative de l'isoforme bisialylée (Figure 58).

Tout comme pour la Tf, plusieurs techniques d'analyses ont été développées pour séparer et quantifier les différents glycoformes de l'ApoC-III. Des méthodes électrophorétiques telles que l'IEF (Figure 58) (Haase *et al.*, 1988; Wopereis *et al.*, 2003; Ondrušková *et al.*, 2015) et l'électrophorèse en gel bidimensionnelle (2D) dénaturante (SDS-Page) (Bruneel *et al.*, 2007, 2008; Sprecher *et al.*, 1984; Yen-Nicolaj *et al.*, 2015) ont été utilisées dans un premier temps. L'avantage de l'électrophorèse 2D est de pouvoir séparer les isoformes de différentes glycoprotéines simultanément sur un même gel. Ces méthodes permettent une quantification absolue des trois glycoformes ApoC-III₀, ApoC-III₁ et ApoC-III₂ mais ne séparent pas les différents glycoformes asialylés (Figure 57). Cependant, ces techniques ont de nombreux inconvénients puisqu'elles sont seulement semi-quantitatives et longues à mettre en œuvre.

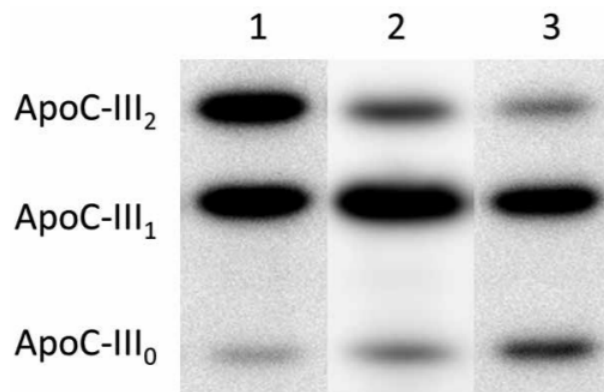


Figure 58 : Comparaison de profils d'ApoC-III physiologique normale (1) et de profils pathologiques caractérisés par une diminution de l'intensité de la bande d'ApoC-III₂ et une augmentation des bandes d'ApoC-III₁ et d'ApoC-III₀ (2 et 3) obtenus par IEF d'après (Ondrušková *et al.*, 2015)

De nouvelles méthodes spectrométriques par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un temps de vol (TOF) (Bruneel *et al.*, 2008; S. B. Harvey *et al.*, 2009; Wada, 2016; Wada *et al.*, 2012; Yen-Nicolaïj *et al.*, 2015b) (Figure 59) ou à un analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) (Nicolardi *et al.*, 2013) ont été introduites.

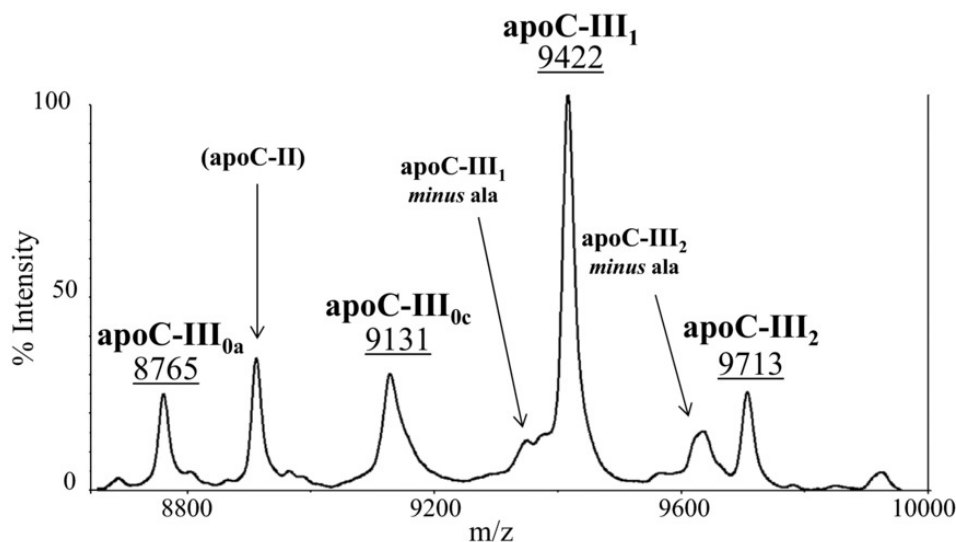


Figure 59 : Spectre MALDI-TOF des glycoformes d'ApoC-III d'un patient sain. Les valeurs *m/z* soulignées correspondent aux glycoformes majeures non tronquées de l'ApoC-III d'après (Yen-Nicolaïj *et al.*, 2015b)

Celles-ci permettent une quantification relative grâce aux ratios des différentes glycoformes (ApoC-III₁ / ApoC-III₀ et ApoC-III₂ / ApoC-III₀) utilisés pour le dépistage des CDG de la O-glycosylation mais également une discrimination des différentes glycoformes asialylées ApoC-III₀. En effet, cette technique permet de visualiser l'ApoC-III_{0a} complètement non-glycosylée et l'ApoC-III_{0c} qui porte un glycan (Gal-GalNAc) asialylé (Figure 57) (Wada *et al.*, 2012; Yen-Nicolaïj *et al.*, 2015b). Cette dernière est considérée comme un artéfact dû à la puissance du laser (S. B. Harvey *et al.*, 2009) car les acides sialiques sont très labiles et qu'elle n'est jamais détectée en électrophorèse 2D (Yen-Nicolaïj *et al.*, 2015b) et ne serait donc pas naturellement présente dans le plasma. La préparation d'échantillon étant assez rapide et simple (purification et dessalage par extraction sur phase solide) cette méthode est très intéressante. Une dernière approche, utilisant de l'HPLC couplée à de la SM permet d'évaluer les abondances de chacune des glycoformes lors de l'utilisation d'un standard interne deutéré (ApoC-III deutérée sur 3 alanines) (Jian *et al.*, 2013). Cependant ces techniques SM ont un coût élevé et ne sont

généralement pas envisagées en routine ou en première intention de dépistage biochimique et constituent plutôt un outil de confirmation des tests réalisés en IEF.

I.6. Traitements des CDG

Malgré le nombre toujours croissant de CDG détectés, le nombre de thérapies n'évolue pas aussi rapidement. De nombreux efforts ont été apportés pour proposer un traitement pour les centaines de patients atteints du PMM2-CDG dont, par exemple, la thérapie génique. L'altération de l'activité ou de la stabilité de l'enzyme mutée, le remplacement de l'enzyme mutée, le contournement de la voie métabolique ou la supplémentation en mannose ont également été tentés (Freeze, 2009). Toutes ces approches seraient également applicables à d'autres types de CDG. Malheureusement, l'avancée du développement de ces thérapies est limitée par le faible nombre de patients, leur coût élevé ainsi que par le nombre limité de médicaments disponibles permettant, notamment, de passer la barrière hémato-encéphalique (Van Scherpenzeel *et al.*, 2016).

A l'heure actuelle, peu de CDG ont des traitements efficaces et une revue rassemble tous les cas rapportés dans la littérature (Brasil *et al.*, 2018). Le MPI-CDG, caractérisé par une diminution en mannose-6-phosphate (voir Figure 53), est le mieux traité, grâce à l'apport oral de mannose libre afin de supplémenter la cellule en mannose et donc en mannose 6-phosphate (de Lonlay & Seta, 2009). La transplantation du foie permet de guérir les patients souffrant encore d'une insuffisance hépatique progressive après la supplémentation (Janssen *et al.*, 2014). Le CAD-CDG, présentant une déficience en synthèse uridine monophosphate (UMPS), a également un traitement efficace grâce à l'apport oral d'uridine (Koch *et al.*, 2017). Les autres types de CDG ne bénéficient que de traitements partiels permettant de limiter certains symptômes. Ainsi pour le PGM1-CDG, où les glycanes sont tronqués à cause d'un manque de galactose, une supplémentation en galactose permet une normalisation presque totale de la glycosylation de la Tf (Tegtmeyer *et al.*, 2014; S. Y.-W. Wong *et al.*, 2017) et permet d'améliorer le fonctionnement du foie et de réduire les troubles endocriniens (Morava, 2014). L'apport de galactose améliore également la glycosylation chez les patients atteints de SLC35A2-CDG (Dörre *et al.*, 2015), de SLC39A8-CDG (Park *et al.*, 2015) et de TMEM165-CDG (Morelle *et al.*, 2017) qui présentent aussi une hypogalactosylation des N-glycanes. Concernant le SLC35C1-CDG, associé à une hypofucosylation des N-glycoprotéines, certains patients réagissent favorablement à l'apport de L-fucose (Thorsten Marquardt *et al.*, 1999). Le PIGM-CDG est associé à un problème de transfert du premier mannose à l'ancre GPI, causant la formation d'histones hypoacétylées et de glycoprotéines à ancrées GPI défectueuses sur les globules rouges. Un patient, ayant ce type de CDG, fut traité par du phénylbutyrate de sodium, un inhibiteur d'histone désacétylase ce qui a permis d'améliorer les glycoprotéines à ancre GPI (Almeida *et al.*, 2007). La supplémentation en acide sialique permet de stabiliser la force musculaire dans le cas de GNE-CDG associé à un blocage dans la biosynthèse des acides sialiques (Argov *et al.*, 2016) et semble également améliorer les anomalies squelettiques chez le NANS-CDG qui est associé à un défaut en synthétase CMP-acide N-acétylneuraminique (van Karnebeek *et al.*, 2016). Pour les patients atteints du PGM3-CDG, associé à un dysfonctionnement dans la biosynthèse du nucléotide-sucres UDP-GlcNAc, la greffe de cellules souches hématopoïétiques issues du sang de cordon permet de corriger la neutropénie ou la lymphopénie (Stray-Pedersen *et al.*, 2014).

Le suivi des patients sous traitement se fait principalement sur l'évolution des signes cliniques et par l'analyse de la Tf.

II. Les anomalies acquises de la glycosylation

Les anomalies de glycosylation ne sont pas toujours congénitales mais peuvent apparaître au cours de la vie, lors du développement de certaines pathologies. En étudiant la glycosylation des protéines, il est apparu que certaines anomalies semblent spécifiques d'une pathologie en particulier. Ainsi elles pourraient permettre de dépister la maladie et de suivre son évolution. Malheureusement, l'analyse de la glycosylation est souvent au stade de l'étude et elle est rarement proposée comme outil diagnostique à l'hôpital sauf dans le cas de l'alcoolisme chronique.

II.1. Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus commune et concerne plus de 35,6 millions de malades dans le monde actuellement (Henriques *et al.*, 2018). Elle est caractérisée par la présence de plaques séniles extracellulaires et d'enchevêtrements neurofibrillaires intra-neuronaux en partie dus à l'accumulation du peptide bêta-amyloïde (peptide A β), fragment d'une glycoprotéine membranaire, la protéine précurseur amyloïde (APP) (voir Figure 60). Le diagnostic de la MA repose actuellement essentiellement sur des bilans neurologiques et psychologiques. Quelques biomarqueurs, les peptides A β , la protéine Tau et la protéine Tau hyperphosphorylée (pTau), ont été détectés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et sont maintenant dosés en routine dans certains hôpitaux (Sutphen *et al.*, 2015). Cependant, ce diagnostic nécessite un prélèvement de LCR, ce qui est un acte invasif pour le patient. Ainsi, la détection de biomarqueurs sériques permettrait une plus grande facilité d'accès afin de proposer le diagnostic à un plus grand nombre de patients. Il n'existe à ce jour aucun traitement pour soigner les patients atteints de la MA. La détection de nouveaux biomarqueurs pourrait permettre un diagnostic de routine précoce mais aussi un suivi de l'évolution de la maladie afin de faciliter la découverte de nouveaux traitements permettant de ralentir son développement.

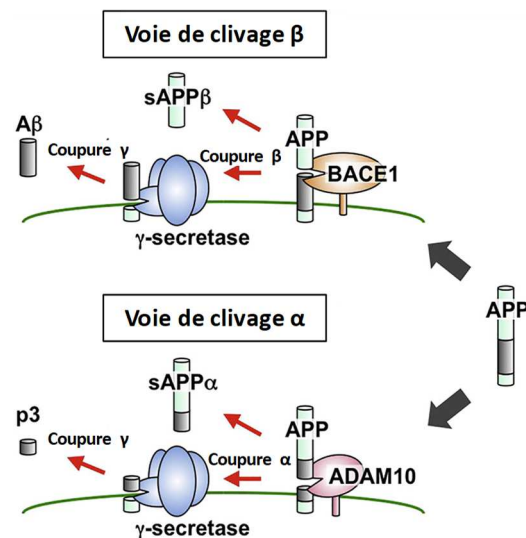


Figure 60 : Les 2 voies de clivage de la protéine précurseur (APP), la voie α est majoritaire, la voie β produit les peptides β -amyloïdes d'après (Kizuka *et al.*, 2017).

Dans le but de rechercher des biomarqueurs potentiels de la MA, la glycosylation de plusieurs protéines impliquées dans le développement de la MA a été étudiée (Kizuka *et al.*, 2017; Schedin-Weiss *et al.*, 2014). La première glycoprotéine fortement examinée est l'APP, puisqu'elle est à l'origine de la présence des peptides A β . Des modifications de glycosylation telles qu'une augmentation du branchement des N-glycanes en β -1,6 par des résidus GlcNAc bissecteurs et de la fucosylation α -1,6

de l'APP ont été observée lors de certaines mutations génétiques connues de la MA conduisant à une augmentation de la quantité d'A β (Akasaka-manya *et al.*, 2008). De plus, l'étude des peptides A β a montré que certains peptides de petites tailles (A β 1-X, 15 \leq X \leq 20) glycosylés en Tyr¹⁰ étaient 2,5 fois plus abondants dans le LCR de patients atteints de la MA que chez les patients sains. Cette glycosylation atypique aurait donc probablement une influence sur la transformation de l'APP.

L'étude de la protéine Tau, protéine assurant la cohésion des microtubules du cytosquelette des neurones, a mis en évidence qu'elle possède 3 sites de N-glycosylation potentiels mais qu'elle n'est N-glycosylée que chez les patients atteints de la MA. En effet, la présence de N-glycanes oligomannosidiques, complexes et tronqués dans les cerveaux de patients a été confirmée par une combinaison d'analyses avec des lectines, de traitements à la PNGase F et d'analyses de la composition en monosaccharides (F. Liu *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2001; J.-Z. Wang *et al.*, 1996). L'abondance de N-glycanes tronqués chez la « paired helical filaments » Tau (PHF Tau) est plus importante que dans la protéine pTau chez les patients atteints de la MA. Ces glycanes tronqués favoriseraient l'assemblage et la stabilisation des enchevêtrements neurofibrillaires puisque la déglycosylation de PHF Tau entraînerait une destruction de ces structures (Sato *et al.*, 2001; J.-Z. Wang *et al.*, 1996). Cette N-glycosylation aberrante rendrait Tau plus susceptible à la phosphorylation et précéderait donc son hyperphosphorylation pathologique (F. Liu *et al.*, 2002). Cependant la présence de Tau glycosylée dans la MA n'est pas encore expliquée même si plusieurs hypothèses ont été émises. L'une serait due à une mauvaise localisation subcellulaire de Tau lui donnant accès aux enzymes de N-glycosylation ou alors due à une hyperactivité d'OST dans les cerveaux atteints de la MA. Enfin la dernière hypothèse serait l'inactivité d'une enzyme, non identifiée jusqu'alors, qui permettrait de retirer les N-glycanes de Tau. Concernant la O-glycosylation, Tau est également très largement O-GlcNAc glycosylée (Arnold *et al.*, 1996) chez les patients sains. La fréquence de cette O-GlcNAc glycosylation est inversement proportionnelle à la phosphorylation pathologique (F. Liu *et al.*, 2004) et elle est diminuée chez les patients atteints de la MA. Une augmentation de cette forme de glycosylation ralentirait l'agrégation de Tau ce qui empêcherait la neurodégénérescence (Yuzwa *et al.*, 2012). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-acides sialiques ont démontré l'hypersialylation de deux structures constituées de pTau et associées à la MA, les enchevêtrements neurofibrillaires et les dégénérescences granulo-vacuolaires (Nagamine *et al.*, 2016). Cette hypersialylation de pTau favoriserait les phénomènes d'agrégation et serait également associée à la pathogénèse d'autres taupathies (Maladie de Pick et paralysie supranucléaire progressive).

Comme expliqué précédemment, la Tf existe sous plusieurs glycoformes mais aussi sous la forme de différents variants. Il existe en effet trois principaux groupes de variants : TfB, TfC et TfD. Le variant TfC1 est le plus commun chez les patients caucasiens sains avec une prévalence supérieure à 95% (Caslavskaja & Thormann, 2018). Les patients atteints de la MA présentent plus fréquemment le variant TfC2, présentant des qualités pro-oxydantes. Il est apparu que les patients homozygotes atteints de la MA et ayant le variant TfC1 avaient une augmentation des formes penta- et hexa-sialylées de la Tf plasmatique par rapport aux patients hétérozygotes TfC1C2 (Van Rensburg *et al.*, 2004). Dans le LCR, une diminution de la reconnaissance des lectines WGA indique une diminution de la sialylation de la Tf (Taniguchi *et al.*, 2008).

BACE-1, l'enzyme à l'origine de la formation de peptides A β , est particulièrement glycosylée par un glycane présentant un GlcNAc bissecteur dans le cerveau chez les patients atteints de la MA. La diminution de l'activité de la transférase GnT-III, produisant l'addition de ce GlcNAc bissecteur, permet

de diminuer l'activité de la BACE-1 puisqu'elle est alors dirigée vers les endosomes et lysosomes. BACE-1 est alors moins en contact avec l'APP ce qui se traduit par une diminution du clivage β . Cette baisse d'activité induit une diminution du dépôt de peptides A β et permet d'améliorer les fonctions cognitives chez la souris (Kizuka *et al.*, 2015).

D'autres glycoprotéines furent étudiées notamment l'acétylcholinestérase. L'AChE, protéase à sérine qui dégrade le neurotransmetteur acétylcholine, présente trois sites potentiels de N-glycosylation et coexiste sous différentes isoformes, la forme tétramérique étant majoritaire et considérée comme étant la seule forme active. Dans la MA, la forme monomérique est plus abondante que chez les patients sains, et la glycosylation de l'AChE serait également affectée puisqu'une isoforme ne serait pas reconnue par la lectine Con A. Ces modifications ont été observées à la fois dans les cerveaux et les LCR de patients atteints de la MA (Sáez-Valero *et al.*, 2000). Cette glycosylation anormale serait directement liée à la formation de plaques amyloïdes (Talesa, 2001). La réeline, protéine impliquée dans la régulation de la fonctionnalité et la plasticité des synapses, présente elle aussi une modification de sa glycosylation puisqu'une réduction de la reconnaissance par la lectine Con A est observée dans le LCR ainsi que dans le cortex frontal dans le cas de la MA (Botella-López *et al.*, 2006). Les peptides A β moduleraient l'expression de la réeline conduisant à une expression accrue de la protéine et/ou une modification de sa glycosylation (Botella-López *et al.*, 2010).

Il a également été observé, pour les patients atteints de la MA, que l'activité de la sialyltransférase soluble dans le sérum était fortement diminuée (diminution de l'activité des sialyltransférases α -2,3 et α -2,6) entraînant une diminution générale de la sialylation des protéines. Cette hyposialylation fut observée grâce à une diminution de la reconnaissance par des lectines WGA des glycoprotéines du LCR de patients atteints de la MA dont notamment la Tf (Fodero *et al.*, 2008). La présence d'acides sialiques α -2,6 sur l'APP entraîne une augmentation de la production de peptides A β (K. Nakagawa *et al.*, 2006). Récemment, une analyse glycomique a montré l'augmentation du nombre de glycanes avec un GlcNAc bissecteur dans le LCR de patients atteints résultant de l'activité de la glycosyltransférase GnT-III (Palmigiano *et al.*, 2018).

II.2. Diabète de type 2

Les deux principaux signes du diabète sont une hyperglycémie ainsi qu'une résistance à l'insuline. Afin de s'adapter, le corps va alors augmenter la sécrétion d'insuline pour maintenir une concentration normale du glucose sanguin (Haataja *et al.*, 2008). L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β du pancréas et joue un rôle dans l'assimilation du glucose présent dans le sang. Lorsque le diabète n'est pas soigné, le niveau de glucose dans le sang est élevé, entraînant une glycation des protéines plasmatiques. L'hémoglobine fait partie de ces protéines glyquées (Bunn *et al.*, 1978), et sa concentration plasmatique est mesurée lors du dépistage du diabète. Cette forte concentration en glucose peut également entraîner une modification de la glycosylation des protéines.

En effet, une analyse glycomique a mis en évidence une augmentation significative de la fucosylation en α -1,6 du GlcNAc proximal dans le sérum de patients atteints de diabète de type 2 (Itoh *et al.*, 2007). Ce changement est probablement lié à une augmentation de la α -1,6 fucosyltransférase dans le foie. De plus, une diminution des glycanes monogalactosylés (analyse glycomique), en particulier en α -1,6 a été corrélée au diabète, cette diminution étant d'autant plus forte lorsque le patient présente un syndrome métabolique (Testa *et al.*, 2015). De plus, l'hyperglycémie entraîne une

augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines ce qui contribue au mécanisme de résistance à l'insuline. La O-GlcNAcylation est réversible et sensible à la quantité de glucose présente dans les cellules β du pancréas (Dias & Hart, 2007).

II.3. Cancers

Le cancer est une problématique de santé mondiale puisque le nombre de cancers ne cesse d'augmenter d'années en années. En effet, 14.1 millions de nouveaux cas de cancers et 8.2 millions de décès des suites de cancers ont été reportés au niveau mondial en 2012 (Torre *et al.*, 2015) tandis que les prévisions annoncent une augmentation de 22 millions et 13 millions respectivement chaque année d'ici 2030 (Fidler *et al.*, 2018). La hausse du nombre de cancers est liée au vieillissement de la population mondiale mais aussi due à l'augmentation de la prévalence de facteurs de risques tels que le tabac, le surpoids et l'inactivité physique. Les deux cancers les plus meurtriers sont le cancer des poumons et celui du sein (Torre *et al.*, 2015). Le nombre de décès ne cessant pas de s'intensifier, la découverte de nouveaux biomarqueurs de cancers est urgente.

Des modifications de glycosylation associées à un processus oncogène ont été décrits dès la fin des années 1960 (S. I. Hakomori & Murakami, 1968). En général, un changement par rapport à la voie de glycosylation normale se produit dans les cellules cancéreuses, conduisant à une biosynthèse altérée des glycanes due à un ou plusieurs facteur(s). Tout d'abord, cette modification des glycanes peut être attribuée à la sous ou surexpression des glycosyltransférases (en raison d'un dérèglement au niveau de la transcription (Buckhaults *et al.*, 1997; Hatano *et al.*, 2011), dérèglement de la fonction chaperon (Schietinger *et al.*, 2006) et / ou de l'altération de l'activité des glycosidases (Kakugawa *et al.*, 2002)). Deuxièmement, les différences peuvent provenir de la variabilité de divers substrats accepteurs ainsi que de la disponibilité et de l'abondance des nucléotides-sucres donneurs et des cofacteurs. Enfin, les changements dans la biosynthèse du glycane peuvent être dus à l'expression et la localisation des glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi.

Les principaux types de changements dans la glycosylation des protéines associés à la transformation cellulaire maligne comprennent des changements des N- et O-glycanes qui peuvent avoir lieu tôt ou tard dans la progression du cancer et des métastases. Une surexpression des sialyltransférases pendant la transformation maligne induit une augmentation globale aberrante de la sialylation des cellules cancéreuses (particulièrement les acides sialiques α -2,6 et α -2,3) (Bull *et al.*, 2013; Z. Zhang *et al.*, 2018). La forte présence d'acides sialiques protégerait les cellules cancéreuses de l'apoptose, favoriserait le développement de métastases (Yogeeswaran & Salk, 1981) et augmenterait la résistance des cellules aux traitements. Les principales formes sialylées associées au cancer sont les antigènes de groupe sanguins de type Lewis sialylés, SLe^a et SLe^x à la surface cellulaire (voir (1) dans Figure 61), dont les niveaux d'expression sont corrélés à de faibles chances de survie pour le patient (Baldus *et al.*, 1998). SLe^a est un biomarqueur des cancers pancréatique, colorectal et gastrique détecté par le test sérologique de l'antigène carbohydre 19-9 (CA19-9) présent sur les glycoprotéines telles que les mucines (Goonetilleke & Siriwardena, 2007). Le CA19-9 est le seul biomarqueur validé par la Food and Drug Administration (FDA) pour la surveillance du cancer pancréatique (Füzéry *et al.*, 2013). Il permet également de suivre la réponse du patient en cas de traitement (Boeck *et al.*, 2006). L'augmentation de la sialylation des glycanes se traduit également par la présence d'acides polysialiques notamment sur la NCAM (à la surface des neurones) (voir (2) dans la Figure 61) associés

au développement de nombreuses tumeurs de haut-grade et métastases notamment dans les cancers du poumon et du cerveau (gliome) (M. Suzuki et al., 2005; F. Tanaka et al., 2001).

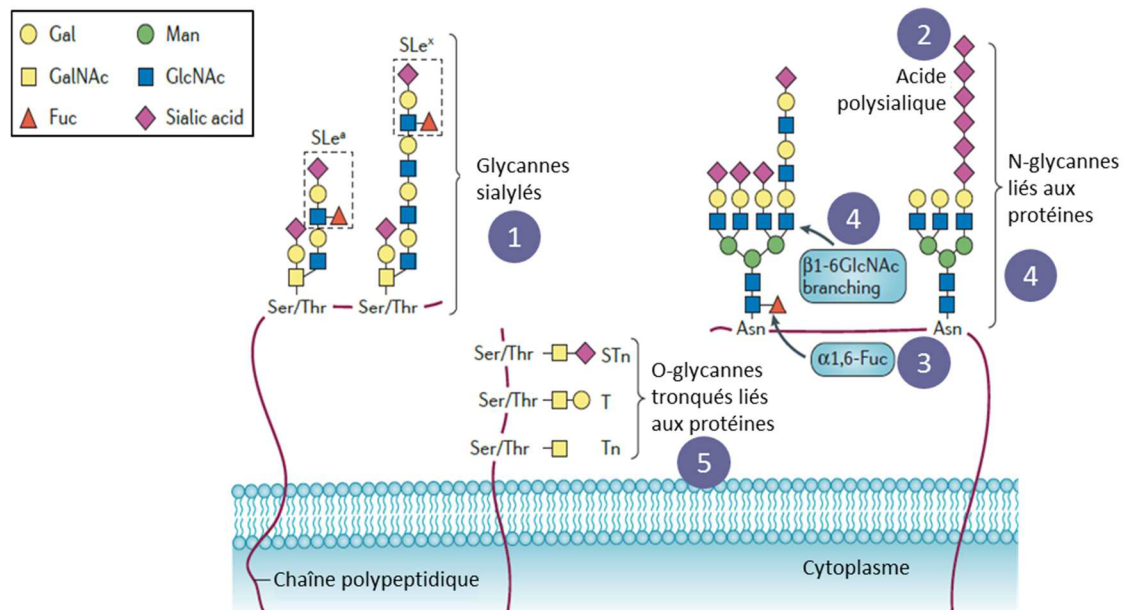


Figure 61 : Principaux glycanes associés aux tumeurs cancéreuses d'après (Pinho & Reis, 2015)

La fucosylation a aussi été associée au cancer à cause de la présence de deux antigènes à activité de groupes sanguins de type Lewis sialylés, SLe^a et SLe^x cités précédemment, ainsi que par une forte augmentation de la fucosylation en α 1-6 des résidus GlcNAc proximaux des N-glycanes à cause d'une surexpression de Fuc-transférase VIII (voir (3) dans la Figure 61) (Block *et al.*, 2005) notamment dans les cancers du poumon et du sein. Ainsi, la forme fucosylée de l' α -fétoprotéine sur le GlcNAc proximal est un biomarqueur (AFP-L3) approuvé par la FDA du cancer hépatocellulaire (Stowell *et al.*, 2015). Un autre phénomène, le branchement des N-glycanes en β 1-6 par des résidus GlcNAc (voir (4) dans la Figure 61) dû à une hyperactivité de GlcNAc-transférase V, provoque par exemple un dysfonctionnement de la cadhérine E, responsable de l'adhésion cellulaire dans plus de 70% des carcinomes invasifs dont le cancer de l'estomac (Pinho *et al.*, 2013). En effet, l'addition de glycanes branchés par des β 1-6 GlcNAc entraîne une modification de sa localisation cellulaire, passant de la membrane cellulaire au cytoplasme. Ainsi, chez des patients atteints d'un cancer épithélial de l'ovaire (Figure 62), on observe des glycanes tétra-antennés présentant jusqu'à 3 épitopes de type Le^x ainsi que des glycanes tri-antennés avec une branche β (1-6) présentant un épitope Le^x sur plusieurs protéines plasmatiques (Weiz et al., 2016a).

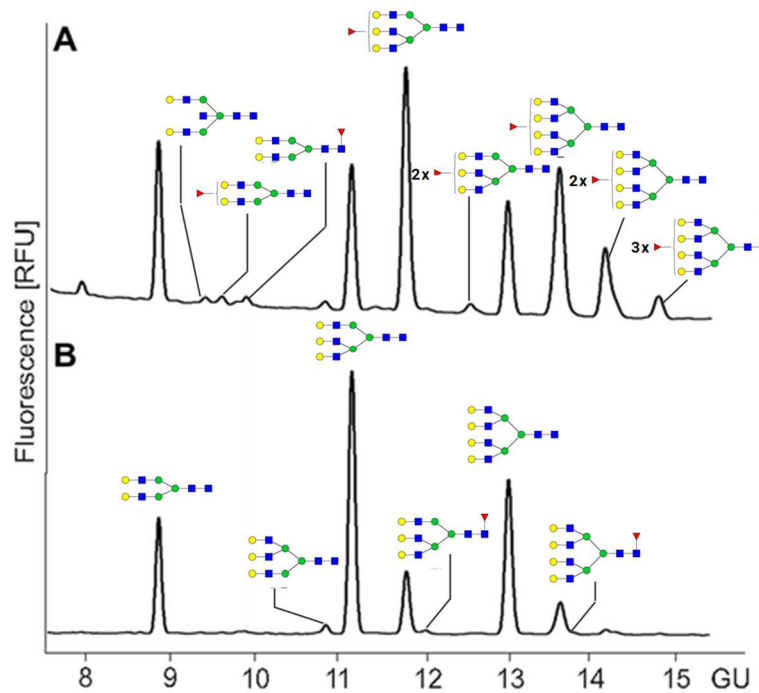


Figure 62 : Profils d'EC-LIF obtenus pour les glycanes désialylés issus de l' α -AGP pour des patients atteints d'un cancer épithélial de l'ovaire (A) ou des individus sains (B) d'après (Weiz et al., 2016a)

Enfin, l'expression de O-glycanes de type mucine tronqués (T, Tn et sialyl-Tn, voir (5) dans la Figure 61) (Burchell *et al.*, 2001) sont également favorisés en cas de cancer. Le test CA72-4 permet de détecter les antigènes STn (sur les mucines) dans le sérum. Des patients ayant un taux élevé peuvent présenter différents types de cancers (peau, colorectal, poumon, pancréas, estomac et sein) et ce marqueur est généralement associé aux métastases et à un taux de survie faible (Tuccillo *et al.*, 2014).

II.4. Alcoolisme et pathologies hépatiques chroniques

La fibrose hépatique qui correspond au développement de manière abondante de tissu cicatriciel dans le foie en raison d'une forte inflammation de celui-ci engendre une perte de la fonctionnalité du foie. Cette inflammation peut avoir pour cause l'abus d'alcool, une maladie virale (hépatites) ou auto-immune (hépatite chronique du foie). La méthode de référence actuelle pour confirmer le diagnostic d'une fibrose hépatique consiste en une biopsie du foie, intervention invasive souvent accompagnée de complications. Comme la plupart des glycoprotéines sériques sont synthétisées au niveau du foie, leur glycosylation peut être affectée lors de pathologies hépatiques et pourraient constituer une méthode non-invasive de dépistage.

Afin de diagnostiquer l'alcoolisme, le dosage des Carbohydre-déficient transferrin (CDT) marqueur de la prise chronique excessive d'alcool est réalisé. Comme mentionné précédemment (partie I.4), la Tf possède différentes isoformes selon le nombre d'acides sialiques portés par ses glycanes. Tout comme pour les anomalies de la N-glycosylation, un excès de consommation d'alcool se révèle par un profil de la Tf présentant une augmentation de l'abondance des isoformes peu sialylées comparable au profil des CDG de type I. Ce biomarqueur est utilisé pour vérifier l'abstinence du patient, puisque le profil de la Tf revient à la normale 3 à 5 semaines après l'arrêt de la consommation d'alcool (Ingall, 2012).

La désialylation est la principale altération de glycosylation observée lors de pathologies du foie alcoolique puisque ce phénomène touche également d'autres glycoprotéines parmi lesquelles l' α 1-AGP et l' α 1-ATT qui peuvent être désialylées jusqu'à 33% et 17% respectivement (Serbource-Goguel *et al.*, 1983; Tsutsumi *et al.*, 1994). Cette désialylation est contrôlée par le décalage de pI observé pour les différentes isoformes désialylées. Cette désialylation est étroitement corrélée à la sévérité de la pathologie en cause. En effet, l'absorption chronique d'alcool entraîne une forte diminution de l'activité des glycosyltransférases, notamment la α 2-6 sialyltransférase (Lakshman *et al.*, 1999) à cause de l'acétaldéhyde formé lors de la dégradation de l'éthanol dans le foie. On peut également noter l'augmentation d'une sialidase associée à la membrane des hépatocytes et provoquant une diminution de la sialylation des glycoprotéines plasmatiques (Gong *et al.*, 2007). L'éthanol provoque également une diminution de 17% de l'expression du DPM1, une sous-unité de la synthase du dolichol-phosphate-mannose réduisant ainsi la synthèse de dolichol phosphate (Welti & Hülsmeier, 2014). Par conséquent, la biosynthèse du précurseur est diminuée ce qui induit l'absence de N-glycanes sur certains sites de glycosylation. L'acétaldéhyde peut également empêcher le transfert des N-glycanes en se liant aux enzymes impliquées dans ce processus ce qui aura la même conséquence.

Hormis la désialylation, d'autres types de modifications de glycosylation peuvent affecter les glycoprotéines lors de pathologies hépatiques comme par exemple l'haptoglobine. En effet, l'haptoglobine est une protéine tétramérique composée de deux chaînes α et de deux chaînes β . Certaines études ont montré que la chaîne β de l'haptoglobine (Hp β), qui possède 4 sites de N-glycosylation potentiels, présente une altération de ses N-glycanes en cas de maladie hépatique alcoolique. Les patients présentent une hyperfucosylation notamment en position α -1,3 sur un GlcNAc subterminal plutôt que sur le GlcNAc proximal (Chambers *et al.*, 1993). De plus, même si cette hyperfucosylation de la Hp est commune à plusieurs troubles hépatiques, il est possible de distinguer les patients atteints d'une cirrhose du foie de ceux ayant un carcinome hépatocellulaire. Les patients cirrhotiques ont moins de glycanes triantennés et plus de biantennés que les patients avec un carcinome hépatocellulaire correspondant donc à une diminution de l'antennarisation (S. Zhang *et al.*, 2011). L'analyse glycomique de sérum de patients atteints de cirrhose a également mis en évidence une hypogalactosylation (pics 1 et 2 sur la Figure 63) ainsi qu'une augmentation du nombre d'espèces portant un GlcNAc en position bissectrice (pics 2 et 7 sur la Figure 63) (Callewaert *et al.*, 2004).

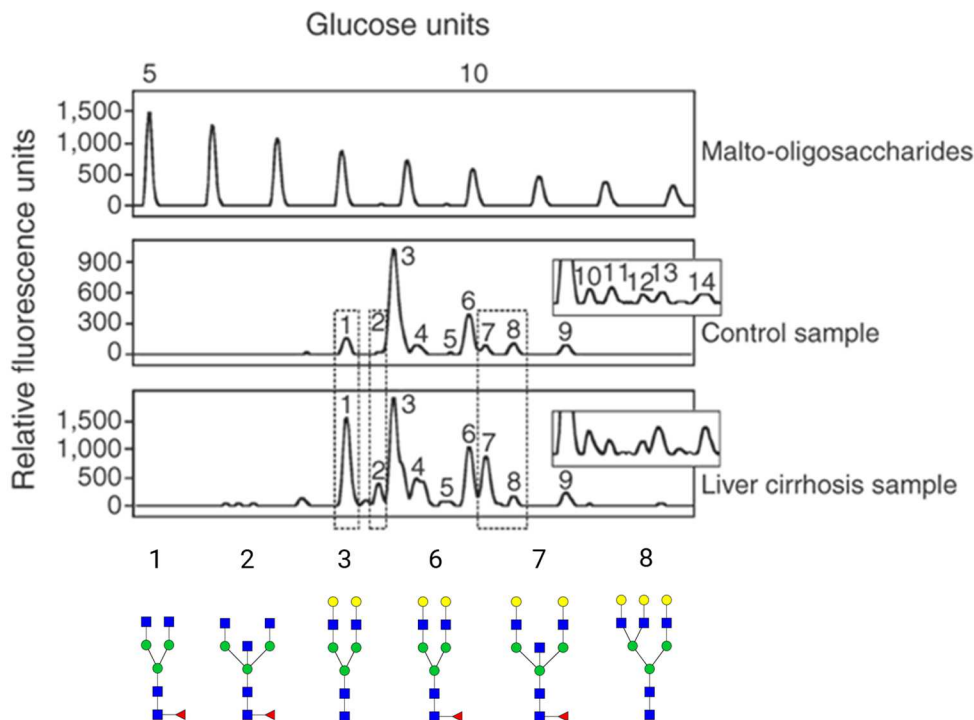


Figure 63 : Electrophorégrammes obtenus pour les glycanes désialylés issus des sérums d'individus sains et de patients atteints d'une cirrhose et structures des glycanes associés aux pics numérotés présentant des variations d'abondance entre les deux profils d'après (Callewaert *et al.*, 2004)

Lors de pathologies des voies biliaires, une hyperfucosylation des glycoprotéines (Hp, α 1-ATT et α 1-GPA) dans la bile et le sérum a été établie. Cette hyperfucosylation était davantage exacerbée dans la bile que dans le sérum pour les patients souffrant de calculs biliaires permettant ainsi de différencier même différentes pathologies biliaires en analysant deux types de fluides biologiques (T. Nakagawa *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les maladies hépatiques virales (hépatites B et C), une hyperfucosylation de l' α 1-AGP (essentiellement en α 1-3) a été notée. Les hépatites semblent également provoquer la diminution de l'activité de GnT-III au profit de celle de GnT-V qui induit une augmentation du nombre d'antennes sur les glycanes et conduit à un phénotype malin. Un autre résultat plus surprenant est la présence du monosaccharide GalNAc chez la majorité des patients atteints de l'hépatite C révélée par l'analyse des monosaccharides. Il faut savoir que l' α 1-AGP présente cinq sites de N-glycosylation (glycanes complexes bi-, tri- et tétra-antennés représentant 14%, 39% et 47% respectivement) et aucun site de O-glycosylation, elle ne devrait donc pas présenter ce monosaccharide puisqu'il est normalement absent des chaînes de N-glycanes (Anderson *et al.*, 2002). Les auteurs réfutent toute contamination par une autre glycoprotéine ou par un GalNAc libre dans le sérum. Ce résultat n'a pas été confirmé ultérieurement par une autre étude.

Ainsi, il apparaît que, quelle que soit la pathologie hépatique en cause, les mêmes types d'altérations de la glycosylation sont observées à savoir une hyperfucosylation, une augmentation de l'antennarisation et augmentation du nombre d'espèces avec un GlcNAc en position bissectrice (Blomme *et al.*, 2009). Celles-ci ne sont donc pas suffisamment spécifiques pour permettre de distinguer les différentes maladies du foie mais montrent tout de même le dysfonctionnement de cet organe.

II.5. Pathologies inflammatoires chroniques

La glycosylation des protéines sériques a été fortement étudiée pour les maladies inflammatoires chroniques et la revue de Albrecht *et al* a dressé la liste des modifications de glycosylation induites par l'inflammation (Albrecht *et al.*, 2014). Des changements de glycosylation ont notamment été observés sur les immunoglobulines G (IgG), protéines très abondantes dans le plasma. Les IgG possèdent en général des N-glycanes complexes bi-antennés, essentiellement asialylés, au niveau des domaines CH₂ des fragments Fc. Une diminution significative de la galactosylation a été mise en évidence dans des cas de polyarthrite rhumatoïde (Figure 64), maladie Crohn, lupus érythémateux disséminé, vascularites associées à des anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles et de myosites (Perdivara *et al.*, 2011; Holland *et al.*, 2002; Tomana *et al.*, 1988; C. Huang *et al.*, 2017).

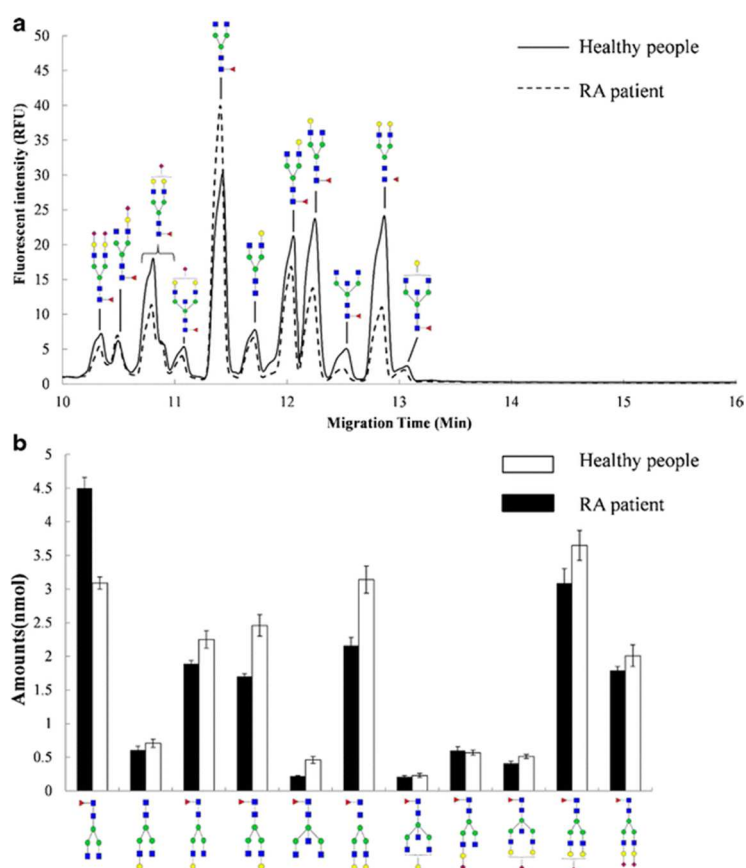


Figure 64 : Electrophorogrammes des glycanes libérés d'IgG pour des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (trait en pointillés) et des donneurs sains (trait plein) (a) et résultats de la quantification des différents glycanes obtenus pour les deux types de personnes (b) d'après (C. Huang *et al.*, 2017)

Les protéines de phase aiguë (PPA), dont la synthèse est inhibée ou exacerbée par le foie en réponse à une inflammation, ont également fait l'objet d'examens. Ainsi, l' α 1-AGP (voir II.4) possède plus de glycanes bi-antennés et moins de glycanes tri- ou tetra-antennés et présente une hyperfucosylation en α -1,3 lors d'une inflammation aiguë. Cependant, lors d'une inflammation chronique, seule une hyperfucosylation en α -1,3 des glycanes tri- ou tetra-antennés est observée (Higai *et al.*, 2005). De plus, l'augmentation de l'expression des antigènes de Lewis SLe^x a été montrée non seulement pour l' α 1-AGP mais aussi pour Hp et l' α 1-antichymotrypsine lors d'inflammations aiguë ou chronique (Linden *et al.*, 1998).

Les maladies arthritiques inflammatoires sont des maladies auto-immunes lors desquelles une dégénérescence progressive de la réponse immunitaire normale a lieu, ce qui entraîne l'inflammation. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, une diminution de la mannosylation de la chaîne β de l'Hp a été notée par Western-blot (Sarooha *et al.*, 2011). Dès 1985 (Parekh *et al.*, 1985), une hypogalactosylation des glycanes des fragment Fc des IgG, liée à un défaut de galactosyltransférase, a été démontrée en combinaison avec une hyposialylation (Nimmerjahn *et al.*, 2007; Varki & Freeze, 2009). Les IgG agalactosylées (notées IgG-G0) provoquent la production d'autoanticorps et sont préférentiellement reconnues par l'auto-anticorps nommé facteur rhumatoïde. Leur quantification sert d'outil de pronostic concernant l'évolution de la pathologie puisque cette hypogalactosylation survient dès le début de la polyarthrite rhumatoïde. Elle est aussi un marqueur de la destruction articulaire (Chou, 2002).

Une augmentation de l'antennarisation de la Tf a également été observée chez des patients ayant une colite ulcéreuse (Grzymisławski *et al.*, 2006). Ceux-ci présentent plus de formes hexasialo-Tf et pentasialo-Tf ce qui correspond à des glycanes tri-antennés et cela semble corrélé avec l'activité de la maladie (Feelders *et al.*, 1992). Une diminution de la sialylation de la Tf a été notée chez les patients en choc septique (augmentation de la bisialo-Tf), avec une très forte diminution lors des premières 24h (Piagnerelli *et al.*, 2005).

III. Conclusion

Actuellement, le diagnostic de pathologies à l'aide de biomarqueurs glycosylés est généralement basé sur la seule mesure de la concentration des glycoprotéines d'intérêt. Or, comme il a été souligné au cours de ce chapitre, la glycosylation peut être affectée au cours de diverses pathologies et des variations peuvent être observées sur les proportions des différents glycanes présents à la surface d'une glycoprotéine. De telles observations ont déjà été notées pour nombre de maladies et constituent de bons biomarqueurs. En effet, certaines modifications se révèlent être spécifiques d'une pathologie en particulier et peuvent être considérées comme des biomarqueurs fiables. Ainsi, par exemple l'hypogalactosylation des IgG semble être spécifique des maladies inflammatoires chroniques tandis que les cancers présentent plus d'épitopes de type Lewis SLe^a et SLe^x.

Ainsi, ces modifications de glycosylation pourraient améliorer la spécificité et la sensibilité des biomarqueurs glycosylés et aider les médecins dans leur diagnostic. En effet, l'implémentation de méthodes analytiques de pointe ont permis d'analyser très finement, qualitativement et quantitativement, les changements de glycosylation dans des matrices biologiques complexes.

Références bibliographiques – Chapitre III

- Aebi, M., Helenius, A., Schenk, B., Barone, R., Fiumara, A., Berger, E.G., Hennet, T., Imbach, T., Stutz, A., Bjursell, C., et al. (1999). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: An updated nomenclature for CDG. *Glycoconj. J.* *16*, 669–671.
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Spitalnik, S.L., and Endo, T. (2008). Increased bisecting and core-fucosylated N-glycans on mutant human amyloid precursor proteins. *Glycoconj. J.* *25*, 775–786.
- Al Tenejji, A., Bruun, T.U.J., Sidky, S., Cordeiro, D., Cohn, R.D., Mendoza-Londono, R., Moharir, M., Raiman, J., Siriwardena, K., Kyriakopoulou, L., et al. (2017). Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. *Mol. Genet. Metab.* *120*, 235–242.
- Albahri, Z., Marklová, E., Vaníček, H., Minxová, L., Dédek, P., and Skálová, S. (2005). Genetic variants of transferrin in the diagnosis of protein hypoglycosylation. *J. Inher. Metab. Dis.* *28*, 1184–1188.
- Albers, J.J., and Scanu, A.M. (1971). Isoelectric fractionation and characterization of polypeptides from human serum very low density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* *236*, 29–37.
- Almeida, A.M., Murakami, Y., Baker, A., Maeda, Y., Roberts, I.A.G., Kinoshita, T., Layton, D.M., and Karadimitris, A. (2007). Targeted Therapy for Inherited GPI Deficiency. *N. Engl. J. Med.* *356*, 1641–1647.
- Anderson, N., Pollacchi, A., Hayes, P., Therapondos, G., Newsome, P., Boyter, A., and Smith, K. (2002). A preliminary evaluation of the differences in the glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein between individual liver diseases. *Biomed. Chromatogr.* *16*, 365–372.
- Argov, Z., Caraco, Y., Lau, H., Pestronk, A., Shieh, P.B., Skrinar, A., Koutsoukos, T., Ahmed, R., Martinisi, J., and Kakkis, E. (2016). Aceneuramic Acid Extended Release Administration Maintains Upper Limb Muscle Strength in a 48-week Study of Subjects with GNE Myopathy: Results from a Phase 2, Randomized, Controlled Study. *J. Neuromuscul. Dis.* *3*, 49–66.
- Arndt, T. (2001). Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation. *Clin. Chem.* *47*, 13–27.
- Artuch, R., Ferrer, I., Pineda, J., Moreno, J., Busquets, C., Briones, P., and Vilaseca, M.A. (2003). Western blotting with diaminobenzidine detection for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J. Neurosci. Methods* *125*, 167–171.
- Axford, J.S. (1999). Glycosylation and rheumatic disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1455*, 219–229.
- Baldus, S.E., Zirbes, T.K., Mönig, S.P., Engel, S., Monaca, E., Rafiqpoor, K., Hanisch, F.-G., Hanski, C., Thiele, J., Pichlmaier, H., et al. (1998). Histopathological Subtypes and Prognosis of Gastric Cancer Are Correlated with the Expression of Mucin-Associated Sialylated Antigens: Sialosyl-Lewis^x, Sialosyl-Lewis^x and Sialosyl-Tn. *Tumor Biol.* *19*, 445–453.
- Balog, C.I.A., Mayboroda, O.A., Wuhler, M., Hokke, C.H., Deelder, A.M., and Hensbergen, P.J. (2010). Mass Spectrometric Identification of Aberrantly Glycosylated Human Apolipoprotein C-III Peptides in Urine from *Schistosoma mansoni*-infected Individuals. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *9*, 667–681.
- Barba, C., Darra, F., Cusmai, R., Procopio, E., Dionisi Vici, C., Keldermans, L., Vuillaumier-Barrot, S., Lefeber, D.J., Guerrini, R., and CDG Group (2016). Congenital disorders of glycosylation presenting as epileptic encephalopathy with migrating partial seizures in infancy. *Dev. Med. Child Neurol.* *58*, 1085–1091.
- Block, T.M., Comunale, M.A., Lowman, M., Steel, L.F., Romano, P.R., Fimmel, C., Tennant, B.C., London, W.T., Evans, A.A., Blumberg, B.S., et al. (2005). Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 779–784.
- Boeck, S., Stieber, P., Holdenrieder, S., Wilkowski, R., and Heinemann, V. (2006). Prognostic and Therapeutic Significance of Carbohydrate Antigen 19-9 as Tumor Marker in Patients with Pancreatic Cancer. *Oncology* *70*, 255–264.
- Botella-López, A., Burgaya, F., Gavín, R., García-Ayllón, M.S., Gómez-Tortosa, E., Peña-Casanova, J., Ureña, J.M., Río, J.A.D., Blesa, R., Soriano, E., et al. (2006). Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 5573–5578.
- Bruneel, A., Robert, T., Lefeber, D.J., Benard, G., Loncle, E., Djedour, A., Durand, G., and Seta, N. (2007). Two-dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and other serum glycoproteins for the combined

- screening of human congenital disorders of O- and N-glycosylation. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 7, 321–324.
- Bruneel, A., Morelle, W., Carre, Y., Habarou, F., Dupont, D., Hesbert, A., Durand, G., Michalski, J.C., Drouin-Garraud, V., and Seta, N. (2008). Two dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and MALDI-TOF MS are complementary techniques for the study of combined defects in N- and mucin type O-glycan biosynthesis. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 2, 1670–1674.
- Bruneel, A., Habarou, F., Stojkovic, T., Plouviez, G., Bougas, L., Guillemet, F., Brient, N., Henry, D., Dupré, T., Vuillaumier-Barrot, S., et al. (2017). Two-dimensional electrophoresis highlights haptoglobin beta chain as an additional biomarker of congenital disorders of glycosylation. *Clin. Chim. Acta* 470, 70–74.
- Buckhaults, P., Chen, L., Fregien, N., and Pierce, M. (1997). Transcriptional Regulation of N-Acetylglucosaminyltransferase V by the srcOncogene. *J. Biol. Chem.* 272, 19575–19581.
- Büll, C., Boltje, T.J., Wassink, M., Graaf, A.M.A. de, Delft, F.L. van, Brok, M.H. den, and Adema, G.J. (2013). Targeting Aberrant Sialylation in Cancer Cells Using a Fluorinated Sialic Acid Analog Impairs Adhesion, Migration, and In Vivo Tumor Growth. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1935–1946.
- Bunn, H.F., Gabbay, K.H., and Gallop, P.M. (1978). The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 200, 21–27.
- Burchell, J.M., Mungul, A., and Taylor-Papadimitriou, J. (2001). O-Linked Glycosylation in the Mammary Gland: Changes that Occur During Malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 355–364.
- Carchon, H.A., Chevigné, R., Falmagne, J.-B., and Jaeken, J. (2004). Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation by Capillary Zone Electrophoresis of Serum Transferrin. *Clin. Chem.* 50, 101–111.
- Chambers, W., Thompson, S., Skillen, A.W., Record, C.O., and Turner, G.A. (1993). Abnormally fucosylated haptoglobin as a marker for alcoholic liver disease but not excessive alcohol consumption or non-alcoholic liver disease. *Clin. Chim. Acta* 219, 177–182.
- Chou, C.-T. (2002). Binding of Rheumatoid and Lupus Synovial Fluids and Sera-Derived Human IgG Rheumatoid Factor to Degalactosylated IgG. *Arch. Med. Res.* 33, 541–544.
- Choukaife, A., Visvikis, S., Steinmetz, J., Galteau, M.M., Kabbaj, O., Féraud, G., Métails, P., and Siest, G. (1989). Two-dimensional electrophoresis of plasma proteins and high density lipoproteins during inflammation. *Electrophoresis* 10, 781–784.
- Dörre, K., Olczak, M., Wada, Y., Sosicka, P., Grüneberg, M., Reunert, J., Kurlemann, G., Fiedler, B., Biskup, S., Hörtnagel, K., et al. (2015). A new case of UDP-galactose transporter deficiency (SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 931–940.
- Feelders, R.A., Vreugdenhil, G., Jong, G. de, Swaak, A.J.G., and Eijk, H.G.V. (1992). Transferrin microheterogeneity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 12, 195–199.
- Fernandes, B., Sagman, U., Auger, M., Demetrio, M., and Dennis, J.W. (1991). β 1–6 Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression in Human Breast and Colon Neoplasia. *Cancer Res.* 51, 718–723.
- Footitt, E.J., Karimova, A., Burch, M., Yayeh, T., Dupré, T., Vuillaumier-Barrot, S., Chantret, I., Moore, S.E.H., Seta, N., and Grunewald, S. (2009). Cardiomyopathy in the congenital disorders of glycosylation (CDG): a case of late presentation and literature review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 313–319.
- Freeze, H.H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat. Rev. Genet.* 7, 537–551.
- Freeze, H.H. (2009). Towards a therapy for phosphomannomutase 2 deficiency, the defect in CDG-Ia patients. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 835–840.
- Freeze, H.H., Eklund, E.A., Ng, B.G., and Patterson, M.C. (2015). NEUROLOGICAL ASPECTS OF HUMAN GLYCOSYLATION DISORDERS. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 105–125.
- Fu, D., and van Halbeek, H. (1992). N-glycosylation site mapping of human serotransferrin by serial lectin affinity chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry, and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* 206, 53–63.
- Gao, N., and Lehrman, M.A. (2002). Analyses of dolichol pyrophosphate-linked oligosaccharides in cell cultures and tissues by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Glycobiology* 12, 353–360.
- Geet, C.V., Jaeken, J., Freson, K., Lenaerts, T., Arnout, J., Vermynen, J., and Hoylaerts, M.F. (2001). Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24, 477–492.
- Golka, K., and Wiese, A. (2004). Carbohydrate-Deficient Transferrin (cdt)—a Biomarker for Long-Term Alcohol Consumption. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 7, 319–337.

- Grünewald, S., Huyben, K., de Jong, J.G.N., Smeitink, J.A.M., Rubio, E., Boers, G.H.J., Conradt, H.S., Wendel, U., and Wevers, R.A. (1999). β -Trace protein in human cerebrospinal fluid: a diagnostic marker for N-glycosylation defects in brain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1455*, 54–60.
- Grünewald, S., Matthijs, G., and Jaeken, J. (2002). Congenital Disorders of Glycosylation: A Review. *Pediatr. Res.* *52*, 618–624.
- Grzymisławski, M., Derc, K., Sobieska, M., and Wiktorowicz, K. (2006). Microheterogeneity of acute phase proteins in patients with ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol. WJG* *12*, 5191–5195.
- Haase, R., Menke-Möllers, I., and Oette, K. (1988). Analysis of human apolipoproteins C by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* *9*, 569–575.
- Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C.J., and Butler, P.C. (2008). Islet Amyloid in Type 2 Diabetes, and the Toxic Oligomer Hypothesis. *Endocr. Rev.* *29*, 303–316.
- Hakomori, S.I., and Murakami, W.T. (1968). Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *59*, 254–261.
- Harrison, H.H., Miller, K.L., Harbison, M.D., and Slonim, A.E. (1992). Multiple serum protein abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: pathognomonic finding of two-dimensional electrophoresis? *Clin. Chem.* *38*, 1390–1392.
- Harvey, S.B., Zhang, Y., Wilson-Grady, J., Monkkonen, T., Nelsestuen, G.L., Kasthuri, R.S., Verneris, M.R., Lund, T.C., Ely, E.W., Bernard, G.R., et al. (2009). O-Glycoside Biomarker of Apolipoprotein C3: Responsiveness to Obesity, Bariatric Surgery, and Therapy with Metformin, to Chronic or Severe Liver Disease and to Mortality in Severe Sepsis and Graft vs Host Disease. *J. Proteome Res.* *8*, 603–612.
- Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N., and Kaneda, Y. (2011). Expression of gangliosides, GD1a, and sialyl paragloboside is regulated by NF- κ B-dependent transcriptional control of α 2,3-sialyltransferase I, II, and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* *129*, 1838–1847.
- Helander, A., Eriksson, G., Stibler, H., and Jeppsson, J.-O. (2001). Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. *Clin. Chem.* *47*, 1225–1233.
- Higai, K., Aoki, Y., Azuma, Y., and Matsumoto, K. (2005). Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1725*, 128–135.
- Holland, M., TAKADA, K., OKUMOTO, T., TAKAHASHI, N., KATO, K., ADU, D., BEN-SMITH, A., HARPER, L., SAVAGE, C.O.S., and JEFFERIS, R. (2002). Hypogalactosylation of serum IgG in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* *129*, 183–190.
- Hospattankar, A.V., Bryan Brewer, H., Ronan, R., and Fairwell, T. (1986). Amino acid sequence of human plasma apolipoprotein C-III from normal lipidemic subjects. *FEBS Lett.* *197*, 67–73.
- Ingall, G.B. (2012). Alcohol biomarkers. *Clin. Lab. Med.* *32*, 391–406.
- Itoh, N., Sakaue, S., Nakagawa, H., Kuroguchi, M., Ohira, H., Deguchi, K., Nishimura, S.-I., and Nishimura, M. (2007). Analysis of N-glycan in serum glycoproteins from db/db mice and humans with type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *293*, E1069–E1077.
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1214*, 190–198.
- Jaeken, J., and Péanne, R. (2017). What is new in CDG? *J. Inherit. Metab. Dis.* *40*, 569–586.
- Jaeken, J., Vanderschuerenlodeweyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E., and Eeckels, R. (1980). Familial Psychomotor Retardation with Markedly Fluctuating Serum Prolactin, Fsh and Gh Levels, Partial Tbg-Deficiency, Increased Serum Arylsulfatase-a and Increased Csf Protein - New Syndrome. *Pediatr. Res.* *14*, 179–179.
- Jaeken, J., van Eijk, H.G., van der Heul, C., Corbeel, L., Eeckels, R., and Eggermont, E. (1984). Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin. Chim. Acta* *144*, 245–247.
- Jaeken, J., Pirard, M., Adamowicz, M., Pronicka, E., and Van Schaffingen, E. (1996). Inhibition of Phosphomannose Isomerase by Fructose 1-Phosphate: An Explanation for Defective N-Glycosylation in Hereditary Fructose Intolerance. *Pediatr. Res.* *40*, 764–766.
- Jaeken, J., Hennet, T., Freeze, H.H., and Matthijs, G. (2008). On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). *J. Inherit. Metab. Dis.* *31*, 669.

- Janssen, M.C.H., Kleine, R.H. de, Berg, A.P. van den, Heijdra, Y., Scherpenzeel, M. van, Lefeber, D.J., and Morava, E. (2014). Successful Liver Transplantation and Long-Term Follow-up in a Patient With MPI-CDG. *Pediatrics* *134*, e279–e283.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* *61*, 69–90.
- Jian, W., Edom, R.W., Wang, D., Weng, N., and Zhang, S. (Weihua) (2013). Relative Quantitation of Glycoisoforms of Intact Apolipoprotein C3 in Human Plasma by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* *85*, 2867–2874.
- Kakugawa, Y., Wada, T., Yamaguchi, K., Yamanami, H., Ouchi, K., Sato, I., and Miyagi, T. (2002). Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 10718–10723.
- Kizuka, Y., Kitazume, S., Fujinawa, R., Saito, T., Iwata, N., Saido, T.C., Nakano, M., Yamaguchi, Y., Hashimoto, Y., Staufenbiel, M., et al. (2015). An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* *7*, 175–189.
- Kizuka, Y., Kitazume, S., and Taniguchi, N. (2017). N-glycan and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1867*, 2447–2454.
- Koch, J., Mayr, J.A., Alhaddad, B., Rauscher, C., Bierau, J., Kovacs-Nagy, R., Coene, K.L.M., Bader, I., Holzhacker, M., Prokisch, H., et al. (2017). CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy. *Brain* *140*, 279–286.
- Krasnewich, D. (2014). Human glycosylation disorders. *Cancer Biomark.* *14*, 3–16.
- Kühnl, P., and Spielmann, W. (1978). Transferrin: Evidence for two common subtypes of the TfC allele. *Hum. Genet.* *43*, 91–95.
- Lacey, J.M., Bergen, H.R., Magera, M.J., Naylor, S., and O'Brien, J.F. (2001). Rapid Determination of Transferrin Isoforms by Immunoaffinity Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* *47*, 513–518.
- Lakshman, M.R., Rao, M.N., and Marmillot, P. (1999). Alcohol and Molecular Regulation of Protein Glycosylation and Function. *Alcohol* *19*, 239–247.
- Larsson, A., Flodin, M., and Kollberg, H. (1998). Increased serum concentrations of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in patients with cystic fibrosis. *Ups. J. Med. Sci.* *103*, 231–236.
- Lefeber, D.J., Morava, E., and Jaeken, J. (2011). How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J. Inher. Metab. Dis.* *34*, 849–852.
- Liang, H.-C., Russell, C., Mitra, V., Chung, R., Hye, A., Bazenet, C., Lovestone, S., Pike, I., and Ward, M. (2015). Glycosylation of Human Plasma Clusterin Yields a Novel Candidate Biomarker of Alzheimer's Disease. *J. Proteome Res.* *14*, 5063–5076.
- Linden, E.C.M.B. der, Haan, P.F. de, Havenaar, E.C., and Dijk, W. van (1998). Inflammation-induced expression of sialyl Lewis x is not restricted to α 1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on α 1-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconj. J.* *15*, 177–182.
- de Lonlay, P., and Seta, N. (2009). The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1792*, 841–843.
- de Lonlay, P., Valayannopoulos, V., Dupré, T., Vuillaumier-Barrot, S., and Seta, N. (2008). Anomalies congénitales de glycosylation. *Arch. Pédiatrie* *15*, 602–605.
- MacGillivray, R.T., Mendez, E., Shewale, J.G., Sinha, S.K., Lineback-Zins, J., and Brew, K. (1983). The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J. Biol. Chem.* *258*, 3543–3553.
- Maguire, T.M., Gillian, A.M., O'Mahony, D., Coughlan, C.M., Dennihan, A., and Breen, K.C. (1994). A decrease in serum sialyltransferase levels in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *15*, 99–102.
- Marquardt, T., and Denecke, J. (2003). Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur. J. Pediatr.* *162*, 359–379.
- Marquardt, T., Lühn, K., Srikrishna, G., Freeze, H.H., Harms, E., and Vestweber, D. (1999). Correction of Leukocyte Adhesion Deficiency Type II With Oral Fucose. *Blood* *94*, 3976–3985.
- Miller, B.S., and Freeze, H.H. (2003). New Disorders in Carbohydrate Metabolism: Congenital Disorders of Glycosylation and Their Impact on the Endocrine System. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *4*, 103–113.

- Morava, E. (2014). Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Mol. Genet. Metab.* *172*, 275–279.
- Nagamine, S., Yamazaki, T., Makioka, K., Fujita, Y., Ikeda, M., Takatama, M., Okamoto, K., Yokoo, H., and Ikeda, Y. (2016). Hypersialylation is a common feature of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degenerations in Alzheimer's disease and tauopathy brains. *Neuropathology* *36*, 333–345.
- Nakagawa, T., Uozumi, N., Nakano, M., Mizuno-Horikawa, Y., Okuyama, N., Taguchi, T., Gu, J., Kondo, A., Taniguchi, N., and Miyoshi, E. (2006). Fucosylation of N-Glycans Regulates the Secretion of Hepatic Glycoproteins into Bile Ducts. *J. Biol. Chem.* *281*, 29797–29806.
- Nicolardi, S., van der Burgt, Y.E.M., Wuhler, M., and Deelder, A.M. (2013). Mapping O-glycosylation of apolipoprotein C-III in MALDI-FT-ICR protein profiles. *PROTEOMICS* *13*, 992–1001.
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M., and Ravetch, J.V. (2007). Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 8433–8437.
- O'Brien, J.F. (2005). Methods for Detection of Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndromes. *Semin. Pediatr. Neurol.* *12*, 159–162.
- Ondrušková, N., Honzík, T., Kytarová, J., Matoulek, M., Zeman, J., and Hansíková, H. (2015). Isoelectric Focusing of Serum Apolipoprotein C-III as a Sensitive Screening Method for the Detection of O-glycosylation Disturbances. *Prague Med. Rep.* *116*, 73–86.
- Parente, F., Mew, N.A., Jaeken, J., and Gilfix, B.M. (2010). A new Capillary Zone Electrophoresis method for the screening of Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). *Clin. Chim. Acta* *411*, 64–66.
- Park, J.H., Högbe, M., Grüneberg, M., DuChesne, I., von der Heiden, A.L., Reunert, J., Schlingmann, K.P., Boycott, K.M., Beaulieu, C.L., Mhanni, A.A., et al. (2015). SLC39A8 Deficiency: A Disorder of Manganese Transport and Glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* *97*, 894–903.
- Péanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D.J., Morava, E., Pérez, B., Seta, N., Thiel, C., Van Schaftingen, E., et al. (2017). Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur. J. Med. Genet.*
- Perdivara, I., Peddada, S.D., Miller, F.W., Tomer, K.B., and Deterding, L.J. (2011). Mass Spectrometric Determination of IgG Subclass-Specific Glycosylation Profiles in Siblings Discordant for Myositis Syndromes. *J. Proteome Res.* *10*, 2969–2978.
- Petibois, C., Cazorla, G., Cassaigne, A., and Déléris, G. (2001). Plasma Protein Contents Determined by Fourier-Transform Infrared Spectrometry. *Clin. Chem.* *47*, 730–738.
- Piagnerelli, M., Boudjeltia, K.Z., Nuyens, V., Backer, D.D., Su, F., Wang, Z., Vincent, J., and Vanhaeverbeek, M. (2005). Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock Augusta Ga* *24*, 48–52.
- Pinho, S.S., and Reis, C.A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 540–555.
- Pohl, S., Hoffmann, A., Rüdiger, A., Nimtz, M., Jaeken, J., and Conradt, H.S. (1997). Hypoglycosylation of a brain glycoprotein (β -trace protein) in CDG syndromes due to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency. *Glycobiology* *7*, 1077–1084.
- Quintana, E., Navarro-Sastre, A., Hernández-Pérez, J.M., García-Villoria, J., Montero, R., Artuch, R., Ribes, A., and Briones, P. (2009a). Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF). *Clin. Biochem.* *42*, 408–415.
- Quintana, E., Montero, R., Casado, M., Navarro-Sastre, A., Vilaseca, M.A., Briones, P., and Artuch, R. (2009b). Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J. Chromatogr. B* *877*, 2513–2518.
- Rensburg, S.J. van, Berman, P., Potocnik, F., MacGregor, P., Hon, D., and Villiers, N. de (2004). 5- and 6-Glycosylation of Transferrin in Patients with Alzheimer's Disease. *Metab. Brain Dis.* *19*, 89–96.
- Rymen, D., and Jaeken, J. (2014). Skin manifestations in CDG. *J. Inher. Metab. Dis.* *37*, 699–708.
- Sáez-Valero, J., Barquero, M.S., Marcos, A., McLean, C.A., and Small, D.H. (2000). Altered glycosylation of acetylcholinesterase in lumbar cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *69*, 664–667.
- Sakurabayashi, I., Saito, Y., Kita, T., Matsuzawa, Y., and Goto, Y. (2001). Reference intervals for serum apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E in healthy Japanese determined with a commercial immunoturbidimetric assay and effects of sex, age, smoking, drinking, and Lp(a) level. *Clin. Chim. Acta* *312*, 87–95.

- Sanz-Nebot, V., Balaguer, E., Benavente, F., Neusüß, C., and Barbosa, J. (2007). Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS. *ELECTROPHORESIS* 28, 1949–1957.
- Saroja, A., Biswas, S., Chatterjee, B.P., and Das, H.R. (2011). Altered glycosylation and expression of plasma alpha-1-acid glycoprotein and haptoglobin in rheumatoid arthritis. *J. Chromatogr. B* 879, 1839–1843.
- Sato, Y., Naito, Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Endo, T. (2001). Analysis of N-glycans of pathological tau: possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 496, 152–160.
- Scherpenzeel, M.V., Willems, E., and Lefeber, D.J. (2016). Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. *Glycoconj. J.* 33, 345–358.
- Schietinger, A., Philip, M., Yoshida, B.A., Azadi, P., Liu, H., Meredith, S.C., and Schreiber, H. (2006). A Mutant Chaperone Converts a Wild-Type Protein into a Tumor-Specific Antigen. *Science* 314, 304–308.
- Serbourne-Goguel, N., Corbic, M., Erlinger, S., Durand, G., Agneray, J., and Feger, J. (1983). Measurement of Serum α 1-Acid Glycoprotein and α 1-Antitrypsin Desialylation in Liver Disease. *Hepatology* 3, 356–359.
- Seta, N., Barnier, A., Hochedez, F., Besnard, M.-A., and Durand, G. (1996). Diagnostic value of Western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Clin. Chim. Acta* 254, 131–140.
- Shulman, R.S., Herbert, P.N., Fredrickson, D.S., Wehrly, K., and Brewer, H.B. (1974). Isolation and alignment of the tryptic peptides of alanine apolipoprotein, an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 249, 4969–4974.
- Sparks, S.E., and Krasnewich, D.M. (2014). Congenital Disorders of N-Linked Glycosylation and Multiple Pathway Overview. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Sprecher, D.L., Taam, L., and Brewer, H.B. (1984). Two-dimensional electrophoresis of human plasma apolipoproteins. *Clin. Chem.* 30, 2084–2092.
- Stibler, H., von Döbeln, U., Kristiansson, B., and Guthenberg, C. (1997). Carbohydrate-deficient transferrin in galactosaemia. *Acta Pædiatrica* 86, 1377–1378.
- Stray-Pedersen, A., Backe, P.H., Sorte, H.S., Mørkrid, L., Chokshi, N.Y., Erichsen, H.C., Gambin, T., Elgstøen, K.B.P., Bjørås, M., Wlodarski, M.W., et al. (2014). PGM3 Mutations Cause a Congenital Disorder of Glycosylation with Severe Immunodeficiency and Skeletal Dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 96–107.
- Tanaka, F., Otake, Y., Nakagawa, T., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yanagihara, K., Inui, K., Oyanagi, H., Yamada, T., et al. (2001). Prognostic Significance of Polysialic Acid Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 61, 1666–1670.
- Taniguchi, M., Okayama, Y., Hashimoto, Y., Kitaura, M., Jimbo, D., Wakutani, Y., Wada-Isoe, K., Nakashima, K., Akatsu, H., Furukawa, K., et al. (2008). Sugar Chains of Cerebrospinal Fluid Transferrin as a New Biological Marker of Alzheimer's Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 26, 117–122.
- Tegtmeyer, L.C., Rust, S., van Scherpenzeel, M., Ng, B.G., Losfeld, M.-E., Timal, S., Raymond, K., He, P., Ichikawa, M., Veltman, J., et al. (2014). Multiple Phenotypes in Phosphoglucomutase 1 Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 370, 533–542.
- Testa, R., Vanhooren, V., Bonfigli, A.R., Boemi, M., Olivieri, F., Ceriello, A., Genovese, S., Spazzafumo, L., Borelli, V., Bacalini, M.G., et al. (2015). N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters. *PLOS ONE* 10, e0119983.
- Thiel, C., Meßner-Schmitt, D., Hoffmann, G.F., and Körner, C. (2013). Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 887–892.
- Tomana, M., Schrohenloher, R.E., Koopman, W.J., Alarcán, G.S., and Paul, W.A. (1988). Abnormal glycosylation of serum igg from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheum.* 31, 333–338.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Wada, Y. (2016). Mass spectrometry of transferrin and apolipoprotein C-III for diagnosis and screening of congenital disorder of glycosylation. *Glycoconj. J.* 33, 297–307.
- Wada, Y., Kadoya, M., and Okamoto, N. (2012). Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology* 22, 1140–1144.
- Welti, M., and Hülsmeier, A.J. (2014). Ethanol-Induced Impairment in the Biosynthesis of N-Linked Glycosylation. *J. Cell. Biochem.* 115, 754–762.

- Wolfe, L.A., and Krasnewich, D. (2013). Congenital disorders of glycosylation and intellectual disability. *Dev. Disabil. Res. Rev.* *17*, 211–225.
- Wopereis, S., Grünwald, S., Morava, É., Penzien, J.M., Briones, P., García-Silva, M.T., Demacker, P.N.M., Huijben, K.M.L.C., and Wevers, R.A. (2003). Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis. *Clin. Chem.* *49*, 1839–1845.
- Yen-Nicolaï, S., Boursier, C., Rio, M., Lefeber, D.J., Pilon, A., Seta, N., and Bruneel, A. (2015). MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation. Comparison with two-dimensional electrophoresis. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* *9*, 787–793.
- Yogeeswaran, G., and Salk, P.L. (1981). Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* *212*, 1514–1516.
- Yuzwa, S.A., Shan, X., Macauley, M.S., Clark, T., Skorobogatko, Y., Vosseller, K., and Vocadlo, D.J. (2012). Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 393.
- Zhang, S., Shu, H., Luo, K., Kang, X., Zhang, Y., Lu, H., and Liu, Y. (2011). N-linked glycan changes of serum haptoglobin β chain in liver disease patients. *Mol. Biosyst.* *7*, 1621–1628.
- Zühlsdorf, A., Park, J.H., Wada, Y., Rust, S., Reunert, J., DuChesne, I., Grüneberg, M., and Marquardt, T. (2015). Transferrin variants: Pitfalls in the diagnostics of Congenital disorders of glycosylation. *Clin. Biochem.* *48*, 11–13.

RÉSULTATS

Chapitre IV : Analyse de glycoprotéines intactes : cas de l'apolipoprotéine C-III pour le dépistage des CDGs

I. Apport de l'électrophorèse capillaire pour la séparation des glycoformes de l'ApoC-III

I.1. Introduction

La première stratégie envisagée pour étudier des glycoprotéines a été focalisée sur la séparation des glycoformes intactes de l'ApoC-III afin de proposer une nouvelle méthode de dépistage des anomalies de la O-glycosylation en complément des dosages des glycoformes de la Tf. En effet, comme l'a montré la partie bibliographique de ce manuscrit, ce dépistage est actuellement réalisé soit par IEF, électrophorèse 2D ou par SM MALDI-TOF (Bruneel et al., 2008; Ondrušková et al., 2015; Yen-Nicolaï et al., 2015a). Malheureusement, ces techniques présentent quelques inconvénients notamment à cause de la longueur des analyses électrophorétiques en gel et d'un manque de disponibilité des spectromètres MALDI-TOF à l'hôpital. Pour pallier ces inconvénients, le développement d'une méthode d'ECZ couplée à une détection UV a été envisagé. Les instruments d'EC-UV sont déjà utilisés en routine dans la plupart des hôpitaux faisant le dépistage des CDGs pour analyser les isoformes de la Tf (Jaak Jaeken & Péanne, 2017a; Sanz-Nebot et al., 2007). Une méthode basée sur l'EC-UV semble donc être un complément intéressant aux techniques existantes. L'objectif de ce travail a été de proposer une méthode de séparation des différentes glycoformes de l'ApoC-III en ECZ-UV tout en permettant une quantification absolue des différentes espèces, le plus rapidement possible.

La première partie de ce chapitre traite du développement de la méthode d'ECZ-UV pour séparer les différentes glycoformes d'un standard commercial d'ApoC-III. Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « A capillary zone electrophoresis method for the detection of Apolipoprotein C-III glycoforms and other related artifactually modified species » (vol 1532, pp.238-245) en 2018 dans *Journal of Chromatography A*. Les optimisations en termes de nature, pH, force ionique et additifs du tampon d'analyse y sont présentées. Cette glycoprotéine a tendance à s'adsorber sur les parois du capillaire, son analyse a donc nécessité une étude approfondie au niveau des rinçages inter-analyses et du préconditionnement du capillaire pour assurer une reproductibilité élevée. L'emploi d'un capillaire avec un revêtement neutre a été testé mais n'a pas permis d'obtenir une résolution suffisante entre les différentes glycoformes. La méthode d'ECZ développée repose sur l'utilisation d'un capillaire en silice fondue en combinaison avec un tampon borate en présence d'urée et de 1,4-diaminobutane. Ces conditions ont permis la séparation de six glycoformes d'ApoC-III d'un standard commercial. Les répétabilités intra et inter-jours ont été évaluées et sont excellentes. Enfin, des digestions en présence de neuraminidase et trypsine complétées par des analyses en MALDI-TOF ont été effectuées pour

identifier les espèces présentes sur le profil obtenu en ECZ et caractériser plus finement le standard commercial utilisé. Cette étude a démontré la présence d'une modification post-traductionnelle supplémentaire, la carbamylation de l'ApoC-III. Les sites de carbamylation ont été caractérisés et trois lots d'ApoC-III standard commerciale provenant de différents fournisseurs ont été comparés. Cette étude a ainsi permis de séparer en ECZ les différentes glycoformes de l'ApoC-III pour la première fois.

La deuxième partie de ce chapitre aborde l'application de cette méthode ECZ à des échantillons biologiques. Pour cela, un traitement préalable du plasma s'est avéré nécessaire afin d'éliminer les sels et les autres protéines interférentes pour être en mesure de quantifier l'ApoC-III. Plusieurs stratégies, avec des degrés de spécificité différents, ont été envisagées comme les précipitations des protéines par des solvants organiques ou par des acides, les extractions sur support solide (SPE) et enfin l'immunocapture sur billes magnétiques afin d'extraire l'ApoC-III du plasma. Afin de maximiser la sensibilité de la méthode de détection dans le cas des échantillons biologiques, des ajustements pour l'élimination d'interférents ou l'amélioration du stacking ont également été testés en tirant profit des méthodes de préconcentration électrocinétiques. Enfin la dérivation de la chaîne polypeptidique par un fluorophore a été investiguée.

I.2. Méthode d'électrophorèse capillaire de zone pour la détection des glycoformes de l'Apolipoprotéine C-III et d'autres espèces apparentées et artificiellement modifiées (Article 1)

C. Ruel, M. Morani, A. Bruneel, C. Junot, M. Taverna, F. Fenaille, N.T. Tran, A capillary zone electrophoresis method for the detection of Apolipoprotein C-III glycoforms and other related artifactually modified species, *Journal of Chromatography A*, 2018, 1532:238-245

A capillary zone electrophoresis method for detection of ApolipoproteinC-III glycoforms and other related artifactually modified species

Coralie Ruel^{a,b}, Marco Morani^a, Arnaud Bruneel^{c,d}, Christophe Junot^b, Myriam Taverna^a, François Fenaille^b, Nguyet Thuy Tran^a

^a Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Proteins and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

^b CEA, UMR 0496, CEA, Institut Joliot, SPI, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, MetaboHUB-Paris, Université Paris Saclay, Gif-sur-Yvette cedex, France

^c AP-HP, Bichat University Hospital, Biochemistry, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

^d INSERM UMR-1193 "Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'adaptation au stress et cancérogenèse", Université Paris-Sud, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

corresponding author: Thuy Tran , thuy.tran-maignan@u-psud.fr, tel : 33146835903

Abstract

ApolipoproteinC-III (ApoC-III) is a human plasma glycoprotein whose O-glycosylation can be altered as a result of congenital disorders of glycosylation (CDG). ApoC-III exhibits three major glycoforms whose relative quantification is of utmost importance for the diagnosis of CDG patients. Considering the very close structures of these glycoforms and their tendency to adsorb on the capillary, a thorough optimization of capillary electrophoresis (CE) parameters including preconditioning and in-between rinsing procedures was required to efficiently separate all the ApoC-III glycoforms. Permanent coatings did not contribute to high resolution separations. A fast and reliable method based on a bare-silica capillary combining the effect of urea and diamine additives allowed to separate up to six different ApoC-III forms. We demonstrated by a combination of MALDI-TOF mass spectrometry (MS) analyses and CE of intact and neuraminidase-treated samples that this method well resolved glycoforms differing not only by their sialylation degree but also by carbamylation state, an undesired chemical modification of primary amines. This method allowed to demonstrate the carbamylation of ApoC-III glycoforms for the first time. Our CZE method proved robust and accurate with excellent intermediate precision regarding migration times (RSDs < 0.7%) while RSDs for peak areas were less than 5%. Finally, the quality of three distinct batches of commercial ApoC-III obtained from different suppliers was

assessed and compared. Quite similar but highly structurally heterogeneous ApoC-III profiles were observed for these samples.

Keywords

ApolipoproteinC-III, Capillary zone electrophoresis, Glycoprotein, Carbamylation

Highlights

- For the first time, a CZE method was developed to analyze ApoC-III glycoforms
- Carbamylated ApoC-III forms were highlighted and carbamylation sites were identified
- Carbamylation was evidenced in ApoC-III batches from 3 distinct commercial sources
- Carbamylated and sialylated forms of ApoC-III can be efficiently separated by CZE

1. Introduction

Glycosylation is one of the most important post-translational modifications of mammalian proteins. It corresponds to the attachment of an oligosaccharidic chain to the protein backbone by a complex enzymatic process [1]. There are two types of glycosylation, N- and O-glycosylation depending on the nature of the amino acid residue linked to the oligosaccharidic chain. Both N- and O-glycosylations can be affected in congenital disorders of glycosylation (CDGs). CDGs are inherited metabolic diseases caused by mutations of any gene coding for enzymes implied in the glycan biosynthesis [2]. CDGs affecting N-glycosylation can be defined as type I or type II according to the defective biosynthesis step [3]. The type I corresponds to a variable glycosylation site occupancy while type II is defined by the alteration of the carried N-glycan motifs. In addition to disorders associated with defects in the N-glycosylation machinery, O-glycosylation pathways can also be affected. The detection of ApolipoproteinC-III (ApoC-III), an O-glycosylated plasma protein was first proposed by Wopereis *et al* (2003) [4], as a potential biological test complementary to that of transferrin to monitor abnormal N-glycosylation [5], to screen rather abnormal O-glycan structures [4] occurring as a consequence of mutations in genes encoding for conserved oligomeric Golgi complex [6–8].

ApoC-III is a 79 amino acid protein synthesized by the liver and the intestine. It is a component of circulating particles in blood rich in triglycerides and is mainly present in very-low density lipoproteins [9] while its plasmatic concentration is comprised between $0.1.\text{mg.mL}^{-1}$ and $0.5.\text{mg.mL}^{-1}$ in plasma [10,11]. ApoC-III carries the most common form of O-linked glycans, a mucin type core 1 at threonine 74 which corresponds to a galactose β 1-3 linked to an N-acetylgalactosamine residue. Three main glycoforms have been described [12–14], depending on the number of sialic acid residues, *i.e.* from 0 to 2 (ApoC-III₀, ApoC-III₁ and ApoC-III₂ forms, respectively). Recently, minor ApoC-III glycoforms containing high levels of fucosylation instead of sialylation have also been reported [15,16](fucosylated glycans have Lewis-type structures which are different from the mucin type core 1 type of sialylated glycans).

Several analytical techniques have been developed to analyze ApoC-III in plasma for diagnostic purposes. Electrophoresis-based methods, such as IEF [4,12,17,18] and two-dimensional electrophoresis [19–23] can be successfully used for glycoform analysis and allowed to separate the two sialylated glycoforms from the asialylated one. However, such techniques are only semi-quantitative and quite time consuming. Besides, new developments in intact ApoC-III analysis by matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) coupled to either time of flight (TOF) [19,21,23–27] or Fourier transform ion cyclotron resonance [16] have been reported. MALDI techniques enabled the relative quantitation of glycoform ratios (ApoC-III₁ / ApoC-III₀ and ApoC-III₂ / ApoC-III₀) but also a differentiation, in human plasma, of the ApoC-III₀ into two main isoforms, one without any glycan and the second bearing one asialoglycan [21,27]. The determination of those ratios allows the diagnosis of O-glycosylation related CDGs. Moreover, the sample preparation was simple as only plasma purification/delipidation and desalting steps using solid-phase extraction method were necessary. The coupling of high-performance liquid chromatography to MS using an internal standard from NeoBioSci (ApoC-III deuterated on 3 alanine residues) allowed the evaluation of absolute abundances of all glycoforms [28] by performing targeted multiple-reaction monitoring detection.

Based on its automation, speed and ease of use, capillary electrophoresis (CE) is an alternative and quantitative technique that deserves to be considered for the analysis of glycoproteins. To the best of our knowledge, no CE method has yet been developed for the analysis of glycosylated ApoC-III in biological fluids. The main objective of the study was to implement a CZE method for the quantitative monitoring of ApoC-III glycoforms in plasma of CDG patients. In that aim, a well characterized and quantified standard solution of ApoC-III had to be defined. We therefore purchased ApoC-III (purified from human plasma) from different providers, but the first CZE analyses revealed a higher structural heterogeneity than expected (*i.e.* not limited to O-glycosylation). This has prompted us to refocus our objective on the thorough characterization and separation of the various protein forms from three distinct batches of commercial ApoC-III obtained from different suppliers. The present paper reports the numerous efforts made in that direction.

2. Materials and methods

2.1 Reagents and consumables

ApolipoproteinC-III (95%) provided as solution (1 mg.mL⁻¹ in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4) was obtained from Sigma Aldrich (reference A3106, St. Louis, MO, USA), from Merck (reference ALP60, Darmstadt, Germany) and from Antibodies online GmbH (reference ABIN491549, Aachen, Germany). All first experiments were conducted with ApoC-III from Sigma Aldrich.

Acetonitrile, boric acid (99.5 %), 1,4 diaminobutane (DAB, 99%), dimethyl sulfoxide (DMSO, 99%), neuraminidase type VIII from *Clostridium perfringens* (85%), sinapinic acid (99%), sodium dodecyl sulfate (SDS, 98.5%), trifluoroacetic acid (TFA), trypsin from bovine pancreas (TPCK treated) and urea

(99%) were all obtained from Sigma Aldrich. Sodium phosphatemonobasic (NaH_2PO_4 , 99.1%) and disodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4 , 99.8%) were purchased from Thermo Fisher scientific (Waltham, MA, USA). Sodium hydroxide (1 M), hydrochloric (1 M) and acetic (99.9%) acids were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

All buffers were prepared using deionized water and were filtered through a 0.22 μm nylon membrane (VWR) before use. Deionized water was prepared with a Direct-QR 3 Water Purification System from Millipore (Billerica, MA, USA).

Bare fused silica capillaries were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), polyvinylalcohol (PVA) and polyacrylamide (PAA) coated capillaries from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) and Sciex (Framingham, MA, USA), respectively.

2.2 Neuraminidase digestion

Neuraminidase digestion of ApoC-III was performed to remove α 2-3, α 2-6 and α 2-8 linked sialic acids as follows. Firstly, 10 units of lyophilized neuraminidase was dissolved in 300 μL of 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.0. Then 20 μL of the standard ApoC-III at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the sample buffer (10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4) were mixed, by pipetting, with 2 μL of the neuraminidase solution (0.066 units for 20 μg of protein). The digestion was statically performed overnight at 37 °C in an oven.

2.3 Trypsin digestion

ApoC-III was first 2-fold diluted in 100 mM ammonium bicarbonate pH 7.9 (50 μL of ApoC-III at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mixed with 50 μL of 100 mM ammonium bicarbonate). Trypsin digestion was performed upon the addition of 2 μL of trypsin solution at 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (enzyme:protein ratio (w/w) of 1:50). The digestion was statically performed overnight at 37 °C in an oven and was then stopped by the addition of 2 μL of formic acid.

2.4 MALDI-TOF MS analysis

MALDI-TOF MS analysis of intact ApoC-III was performed essentially as described before [21,27], but with minor modifications. Briefly, analyses were performed on a Bruker Ultraflex extreme MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a smartbeam-II laser. Each ApoC-III sample (0.5 μL at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was spotted on the MALDI target and thoroughly mixed on-target with 0.5 μL of matrix composed of a saturated solution of sinapinic acid in 50:50:0.1, Water/ACN/TFA. MS spectra of intact ApoC-III were acquired at 2 kHz laser repetition rate in the positive linear ion mode, with a 20 kV acceleration voltage and an extraction delay of 250 ns. All spectra were obtained by accumulating \sim 1000 laser shots over the 5000–20000 m/z range.

MALDI-TOF MS of tryptic peptides were acquired, using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 50% ACN containing 0.1% TFA), at 2 kHz laser repetition rate in the positive reflectron ion mode, with a 20 kV acceleration voltage and an extraction delay of 130 ns. All spectra were obtained by

accumulating ~1000 laser shots over the 500–5000 m/z range. Confirmation of peptide structures can be obtained from MS/MS spectra acquired in LIFT mode, at 1 kHz laser repetition rate applying 7.5 kV for initial acceleration of ions and 29.5 kV for reacceleration of fragments in the LIFT cell.

2.5 Capillary electrophoresis analysis

CE experiments were carried out with a P/ACE™ MDQ instrument (Sciex) equipped with a diode array detector. UV detection was performed at 214 nm. Bare fused silica capillaries with an internal diameter of 50 µm and an effective length to the detector of 50 cm (total length of 60.2 cm) were used. Software 32 Karat™ version 7.0 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK), was used to control the instrument and to collect data. The final background electrolyte (BGE) was 150 mM sodium borate pH 9.5, containing 4M urea and 1 mM DAB. It was prepared as follows: a stock solution of 0.5 M boric acid was prepared by dissolving 1.546 g of boric acid in 50 mL of water. To prepare the BGE, 21.2 mL of the stock solution of boric acid were mixed with 7.5 mL of 1 M NaOH. Then, 12.012 g of urea were added to the buffer which was heated at 30 °C to facilitate urea dissolution. It was then followed by the addition of 5.1 µL of DAB (99%). The buffer pH was checked and adjusted with 1 M NaOH. Deionized water was added to a total volume of 50 mL. This BGE was stored at 4°C for not more than two weeks. Fused silica capillaries were preconditioned by flushing them at 20 psi with MeOH for 10min, H₂O for 10 min, 1 M HCl for 10 min, H₂O for 10 min, 1 M NaOH for 10 min, H₂O for 10 min and BGE for 10 min. Next, the capillary was filled with 0.1 M NaOH and stored during 3 h. After this storage, the capillary was rinsed and equilibrated with the BGE for 10 min and then 20 kV was applied during 3 h. The capillary was emptied and rinsed with fresh BGE for 10 min before starting an analysis. Each BGE vial was renewed after each analysis and each sample was analyzed in triplicate. A plug of sample was hydrodynamically injected from the inlet end by applying a pressure of 0.5 psi for 6 s. The separation was carried out under 20 kV at 25°C. After each run, the capillary was rinsed for 5 min with 25 mM SDS solution and 5 min with H₂O, and equilibrated with the BGE for 10 min. At the end of the day, the capillary was rinsed for 5 min with 25 mM SDS and 10 min with H₂O and dried with air before storage at room temperature. All conditions were carefully optimized as described in this article.

2.6 Fractionation of ApoC-III by CZE and control of fractions by MALDI-TOF MS

A large plug of sample (5% of the capillary volume) was injected from the inlet end by applying a pressure of 1.5 psi for 17 seconds. A first separation step was carried out under 20 kV at 25 °C for 15 min. Then the outlet BGE vial was removed and replaced by a vial containing 5 µL of the sample buffer. A second separation step was then performed under the same conditions as the first one but during 0.5 min for the collection of the peak of interest.

3. Results and discussion

The objective of this work was to develop a CZE method for separating and quantifying the different ApoC-III glycoforms. Method implementation and optimization were first conducted with commercially available plasma-derived ApoC-III. Thus, we paid particular attention to limit protein adsorption to the capillary and also to electrophoretically resolve glycoforms differing from each other by only one sialic acid residue. Classical parameters such as the pH, the ionic strength of the BGE, the nature of the capillary coating or the addition of additives to the BGE were thoroughly examined. Also, rinsing and preconditioning procedures were carefully optimized to improve the method robustness.

3.1 Optimization of the CZE method for the ApoC-III glycoform separation

3.1.1 Optimization of the running buffer

As proteins are prone to adsorption on fused silica capillary and in order to develop a method compatible with mass-spectrometry detection, we have chosen first to work with permanent capillary coatings. We tested two commercial neutral coatings, PVA and PAA. As the isoelectric point (pI) of ApoC-III is comprised between 4.5 and 5.0, and no peak was detected at pH 5.0 with both coatings. At pH 7.0 peaks were observed for both PAA and PVA (Fig S1) but they were very broad (around 2 min) precluding convenient resolution improvements.

We then decided to work without coatings but using repelling conditions ($pH > pI$) in bare fused silica capillary and therefore under counter EOF mode. Under this configuration, high resolution is expected if the electrophoretic mobility (μ_{ep}) of the analytes is closed to that of the electroosmotic flow (μ_{eo}). We optimized the pH (from 7.0 to 10), the ionic strength (from 50 to 150 mM) and the composition (sodium phosphate, sodium borate and sodium tetraborate) of BGE. Using sodium borate buffer, as soon as the ionic strength was increased, a splitting of each peak into two peaks was observed. The beneficial effect of borate can be explained by a selective complexation between borate and cis hydroxyl groups of the glycan moieties [29]. The best separation conditions were obtained with 150 mM sodium borate buffer pH 9.5. Surprisingly, we observed six distinct peaks gathered into three pairs of peaks for the commercial ApoC-III sample (Fig 1A), while only three corresponding to the different glycoforms were expected. Many efforts were made first to separate those species as much as possible and then to better understand the origin and nature of these peaks (*vide infra*).

To increase the electrophoretic resolution, different types of additives were added to the running buffer. Firstly, the addition of diaminobutane was tested at different concentrations (from 1 mM to 10 mM). It appeared that 1 mM DAB allowed increasing the resolution between each group of peaks (Fig 1B) while the resolution between the first two peaks was still insufficient ($R_s = 0.5$). DAB has been reported to prevent protein adsorption, by interacting with the negatively charged silanols groups that leads also to a decrease of the μ_{eo} [30]. This resolution improvement was obtained thanks to the reduced μ_{eo}

intensity becoming closer to the μep of ApoC-III glycoforms. However, this induced an increase of migration times and peak width. Concentrations over 3 mM DAB were detrimental to the resolution due to a too low μeo .

Secondly, urea was added to the separation buffer (150 mM sodium borate pH 9.5 without DAB) at different concentrations (from 2 M to 6 M). Sharper peaks and a much higher resolution within each group of peaks and also between the first two peaks ($R_s = 0.8$) were observed (Fig 1C) with 4 M of urea. Urea is a chaotropic agent that disrupts hydrogen bonds [30], resulting in protein unfolding which yields higher differences between charge-to-hydrodynamic volume ratios of the coexisting glycoforms in the case of ApoC-III. No noticeable effect on the resolution was observed using concentration above 4 M.

The profile obtained with a borate buffer pH 9.5 containing 1 mM DAB and 4 M urea showed the synergic effect of both additives with three well resolved pairs of peaks (Fig 1D). Moreover, the resolution between the first two peaks was greatly improved ($R_s = 1.3$). This condition was selected for all further experiments with the ApoC-III glycoforms.

Finally, modifications of other parameters such as capillary length or voltage were also investigated but did not lead to significant improvements (data not shown).

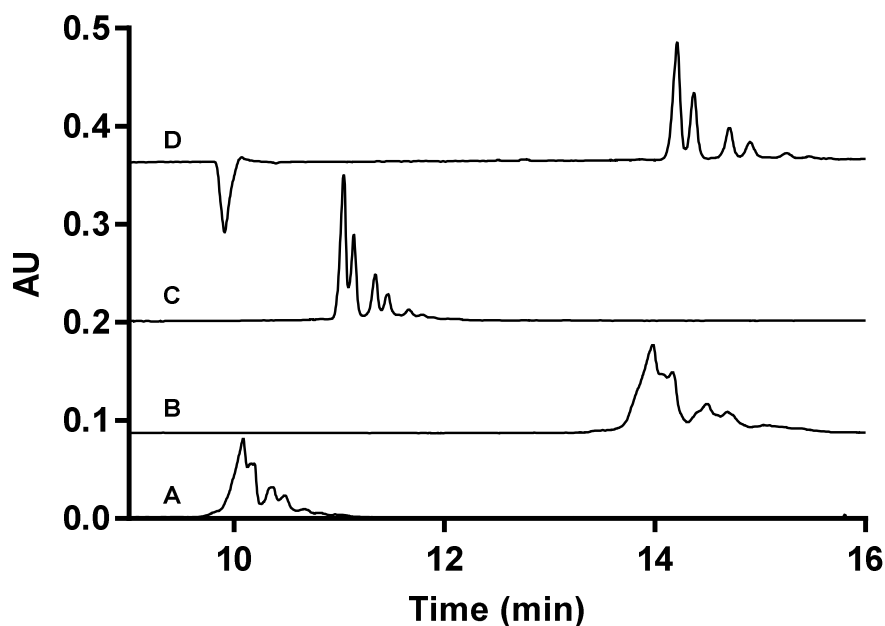


Fig. 1. Comparison of CZE profiles obtained for ApoC-III without additive in the BGE (A), and using different additives in the BGE as 1 mM DAB (B), 4 M urea (C) or a combination of 1 mM Dab and 4 M urea (D).

Sample: $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ApoC-III in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, BGE: 150 mM sodium borate pH 9.5, separation conditions: capillary: bare fused silica, $50 \mu\text{m}$, 50 cm (effective length), voltage: normal polarity, 20 kV, temperature: 25°C , injection: 0.5 psi for 6 s.

3.1.2 Optimization of the rinsing and preconditioning procedures

First experiments were performed with a classical inter-run 0.1M NaOH rinsing step and demonstrated an excellent intra-day repeatability of migration times (t_m) (RSD < 0.5%) but a less acceptable one for the peak areas (A) (RSD around 30%). In this study, BGE was prepared freshly using urea powder and not a urea stock solution, so urea decomposition was most likely not an issue and some residual adsorption of ApoC-III onto the capillary wall, leading to a certain lack of repeatability, was rather suspected. With the aim to improve the repeatability, different rinsing procedures involving more stringent conditions were compared. It appeared that among all tested procedures, the rinsing with 25mM SDS allowed to achieve the most satisfactory RSDs but always insufficient for A (< 1.3% for t_m and 12% for A) (Table 1).

We also carefully optimized the preconditioning procedure. Each new capillary was initially conditioned with a rather classical procedure involving different successive washing steps as described in the section 2.6. We suspected that the DAB layer was not enough stable and homogenous to ensure sufficiently repeatable A. Thereby, we investigated the addition of one equilibration step with the running buffer under a 20 kV voltage application during 3 h after the classical preconditioning. This step was expected to create a more homogenous DAB coating of the capillary via competitive interaction between DAB [31] and impurities from the buffer with the free silanols [32]. Such equilibration step was previously used in particular for the CZE separation of the recombinant human erythropoietin (rhEPO) in the monography of the European Pharmacopeia [33]. In our case, it slightly improved the repeatability of the A (RSD < 10.7%), but at the expense of the t_m one (Table 1). We then tried to include, between the common preconditioning and the equilibration step under a 20 kV voltage, another additional equilibration step under capillary storage in 0.1 M NaOH during 3 h. This step is supposed to ensure the complete ionization of surface silanol groups in order to promote a full coating of silanol groups by DAB. The combination of these two additional steps led to an excellent repeatability for both t_m (RSD < 0.4%) and A (RSD < 3.3%), rendering the method robust and reproducible. Finally, the inter-day ($n=3$) repeatability of the method was evaluated. An excellent intermediate precision was obtained for t_m (RSD < 0.7%) and a satisfactory one for A (RSD < 5%). A stability study of capillary preconditioning was also performed. After 16 consecutive analyses of commercial standard ApoC-III sample (Fig S2) repeatability of t_m was excellent (RSD < 0.9%) and the resolution of the less resolved peaks (peaks 1 and 2) was stable (RSD = 6.2%). Over one month of use and 40 injections of different ApoC-III samples, we evaluated the repeatability of the capillary preconditioning using two analyses performed at the beginning and two at the end of this study. The capillary was still highly stable with a satisfactory repeatability of t_m (RSD < 2.0%) corresponding to an excellent repeatability of the μ_{ep} (RSD \leq 1.0%) and the resolution between peaks 1 and 2 was always stable (RSD = 4.8%). Concerning the repeatability of different batches of capillaries ($n=3$), the repeatability of migration time was acceptable (RSD < 1.5%) and it corresponds to an excellent repeatability of the μ_{ep} (RSD < 0.5%). The repeatability of relative areas ($rA = A/\sum A_i$) of the four main peaks was acceptable too (RSD < 5%) and the resolution between peaks 1 and 2 was still very stable (RSD = 4.8%). All those results show the high stability of the method.

Table 1: Impact of the inter run rinsing and preconditioning procedures on the repeatability of the method (n=3).

Capillary Preconditioning procedure	Inter run Rinsing procedures	RSD (%) of migration times	RSD (%) of relative peak areas
Classical*	0.1 M NaOH	0.3-0.5	27-38
Classical	25 mM SDS	1.2-1.3	3.2-11.7
Classical	25mM SDS-0.1M NaOH	4.5-7.0	19 -27
Classical + voltage**	25 mM SDS	1.4-3.0	9.3-10.7
Classical + storage 0.1M NaOH*** + voltage	25 mM SDS	0.26-0.32	0.3-3.2

Sample: 1 mg mL⁻¹ ApoC-III in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, BGE: 150 mM sodium borate, 1 mM DAB, 4 M urea pH 9.5.

*Classical preconditioning: MeOH (10 min), H₂O (10 min), 1 M HCl (10 min), H₂O (10 min), 1 M NaOH (10 min), H₂O (10 min) and BGE (10 min).

**Voltage step: capillary filled with BGE and under 20 kV during 3h.

***Storage step: capillary stored with 0.1 M NaOH during 3h.

3.2 Analysis and characterization of ApoC-III by CZE-UV and MALDI-TOF mass spectrometry

3.2.1 Analysis of intact and desialylated ApoC-III

With the final optimized conditions, the CZE glycoform pattern of commercial ApoC-III isolated from plasma, unexpectedly showed three pairs of peaks (Fig 2A) instead of three expected single peaks.

In order to clarify the identity of these different species, the ApoC-III sample was treated with neuraminidase to remove terminal sialic acids from the O-glycan chain (Fig 2B). Sialylated glycoforms exhibit more negative charges than their asialylated counterpart, leading to a decrease of their apparent mobility. Migration times of desialylated ApoC-III were consequently decreased. Upon neuraminidase treatment, we expected a single peak corresponding to the asialylated ApoC-III but instead we observed three distinct peaks, potentially highlighting the presence of additional post-translationally or chemically modified protein species. To investigate further the nature of this modification, MALDI-TOF MS analysis of the intact and desialylated ApoC-III samples was performed. Under these conditions, three main clusters of peaks differing by 43 Da mass increments were observed for the intact ApoC-III sample and corresponded to various ApoC-III isoforms (Fig 3A). ApoC-III₀ (m/z 9131), ApoC-III₁ (m/z 9422) and ApoC-III₂ (m/z 9713) glycoforms bear 0, 1 and 2 sialic acid residues, respectively. The most intense peak (m/z 9508) in Fig. 3A presumably corresponds to the monosialylated ApoC-III with two 43Da mass increments. Such mass differences are consistent with the presence of several carbamyl groups on ApoC-III. Carbamylation is an in vitro nonenzymatic chemical modification of peptidic chains where an isocyanate group is covalently linked to the ε-amino groups of lysine residues and to the N-terminal residues of proteins/peptides [34]. This modification can be artificially introduced during sample

preparation with urea (through urea degradation) [35] mimicking *in vivo* carbamylation. In aqueous solutions, urea can readily dissociate upon heating or after prolonged incubation or storage to form isocyanate and ammonium ions. We suspected that such an artifactual carbamylation could occur during the purification and extraction process of ApoC-III from human plasma. *In-vitro* carbamylation of ApoC-III during an ion exchange chromatographic step using high concentration of urea has been already reported by Herbert *et al* [36]. Since a similar purification method was used by the ApoC-III provider (Sigma) [37], one cannot exclude the occurrence of carbamylation under these conditions. Undesired protein carbamylation can hamper the process of protein analysis, especially the tryptic digestion step since carbamylated lysine will not be cleaved anymore by trypsin. Of note and as previously described by others [21,25], the ApoC-III₀ glycoform (m/z 9131) and related species observed in the MALDI mass spectrum might be viewed as artifactually formed by sialic acid loss, phenomenon particularly favored at high laser power [25]. This asialylated-glycoform is almost never detected in 2D electrophoresis [21], and is therefore probably present at only very low levels *in-vivo* [25]. The artefactual loss of sialic acid residues observed under our MALDI conditions might also explain why the relative abundances of species bearing one or two 43 Da mass increments slightly fluctuate between mono- and di-sialylated protein species (Fig. 3A). Another potential explanation would be that the di-sialylated ApoC-III can be carbamylated to a lesser extent due to the additional steric hindrance resulting from the presence of a second sialic acid residue. Also, it might be linked to an artefactual loss of carbamyl moiety under our MALDI conditions, since such modification also seem quite labile and is rapidly lost under MS/MS conditions (*vide infra*). Nicolardi *et al* [38], reported the detection of up to six minor multifucosylated ApoC-III glycoforms in some serum samples. With the exception of a particular trifucosylated species, these fucosylated glycoforms were only detected in less than 20% of the 96 serum samples tested, which may explain why none of such structures was detected in our MALDI-TOF experiments performed on specific commercial ApoC-III samples.

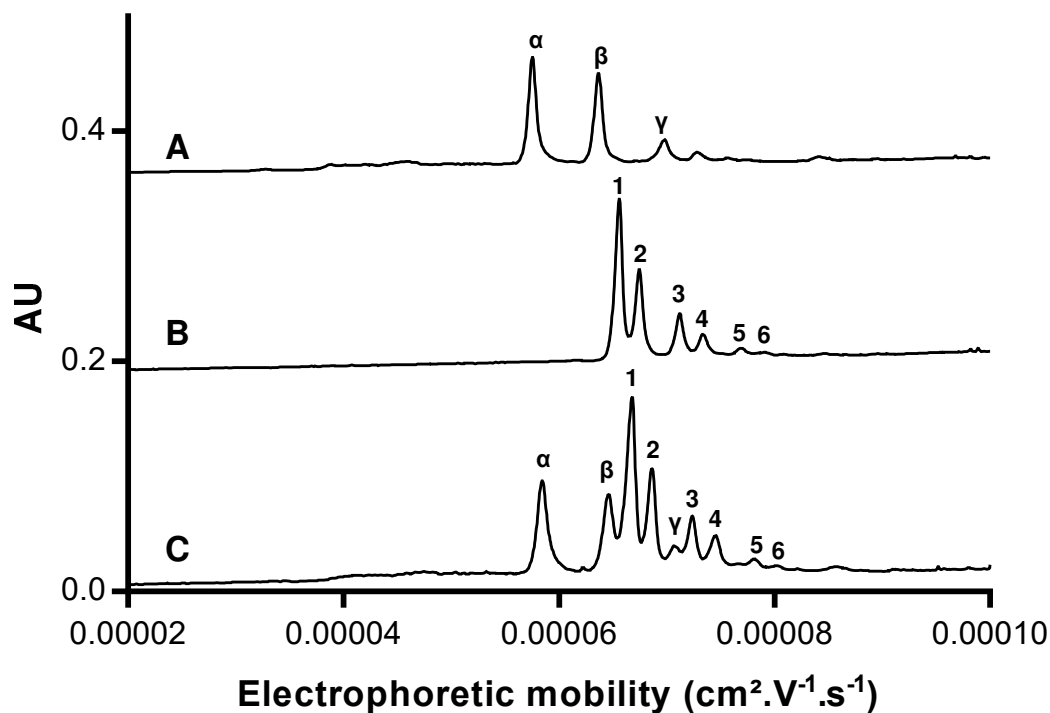


Fig. 2. CZE profiles of ApoC-III before (A) and after (B) enzymatic desialylation with neuraminidase and (C) a mix of both samples.

Sample: 1 mg.mL⁻¹ ApoC-III in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, BGE: 150 mM sodium borate, 1 mM DAB, 4 M urea pH 9.5, separation conditions as in Fig. 1. Peaks α, β and γ correspond to carbamylated species and peaks 1 to 6 correspond to both sialylated and carbamylated species.

After neuraminidase treatment, the MALDI-TOF MS spectrum (Fig 3B) showed a cluster of four peaks corresponding presumably to the asialo-form ApoC-III₀ (m/z 9131) still differing by successive mass increments of 43 Da. Only three among these four species were detected by CZE-UV, the three major peaks, α, β and γ, observed in Fig 2B corresponding potentially to ApoC-III species bearing 1 to 3 carbamyl groups. One explanation could be the poor detectability of the minor native ApoC-III₀ by UV (Fig. 2B). The disappearance of peaks above 9400Da upon neuraminidase treatment further confirms the sialylated nature of ApoC-III glycoforms initially detected by MALDI-TOF MS (Fig. 3).

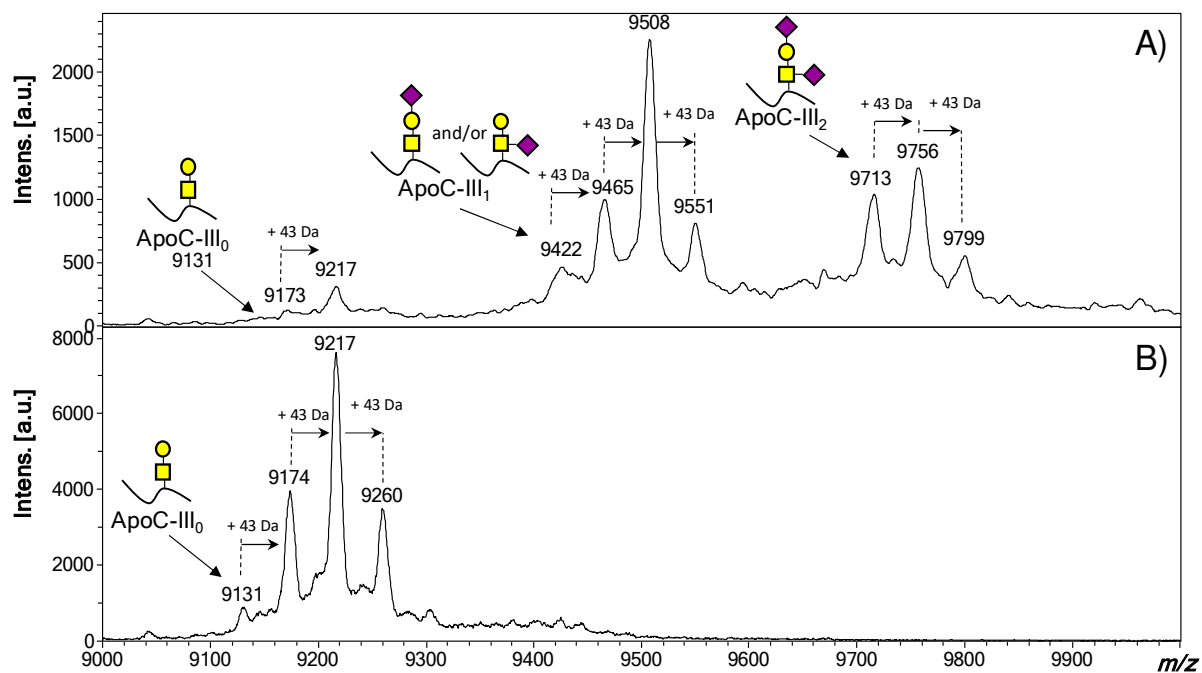


Fig. 3. MALDI-TOF MS profile of the intact ApoC-III (A) and desialylated ApoC-III sample (B). Sample: 1 mg.mL⁻¹ ApoC-III in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, matrix: saturated solution of sinapinic acid in 50:50:0.1 water/ACN/TFA, positive linear mode, accumulation of 1000 laser shots, range: 5000-20000 Da.

3.2.2. Identification of carbamylated amino acid residues

In order to confirm the occurrence of carbamylation and identify the modified amino acid residues, a tryptic digestion of the intact ApoC-III sample was performed and the resulting peptides analyzed by MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF. From these experiments, we first confirmed the presence of 43 Da mass differences between certain pairs of peaks observed in the MALDI-TOF mass spectrum of the tryptic digest of ApoC-III, thus signing potential carbamylated peptides. In addition, the MALDI-TOF/TOF mass spectra of the corresponding species are characterized by the presence of neutral losses of CHNO (-43Da), a specific feature of carbamylated peptides (Fig. S3) [39,40]. Of note, carbamylation precludes efficient trypsin digestion at modified lysine residues, giving peptides with a miscleavage site. From the MALDI-TOF/TOF tandem mass spectra and by comparing carbamylated/native peptide ratios, we deduced that the modification preferentially occurred on the N-terminus of ApoC-III and on Lys51, and to a lesser extent on Lys17 or Lys24. Fig. S3 shows the MALDI-TOF/TOF spectra of the two mostly (as judged from MALDI-TOF mass spectra) carbamylated peptides (N-terminus and Lys51). Due to its lower pKa value (~8.0), the N-terminus of the protein is presumably more prone to carbamylation than the ε-amino-groups of lysines [36]. The preferential carbamylation of some lysine residues might be related to the three-dimensional structure of ApoC-III, resulting in a favored solvent accessibility of these particular sites.

3.2.3. Tentative identification of the peaks observed by CZE-UV

Based on these results, the three peaks obtained in the CZE profile of the desialylated sample (Fig 2B) were preliminarily attributed to three different carbamylated states (1C to 3C) of ApoC-III₀ glycoform. As expected, the asialylated-glycoform ApoC-III_{0a} existing in the low concentration range *in-vivo* [38] was not detected. It appeared that the differences of electrophoretic mobilities between peaks α/β and β/γ were identical ($6.12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with a difference between both values lower than 0.1%). As desialylation was performed and proved efficient (*vide supra*), the species detected and represented on Fig 2B only represent the heterogeneity arising from carbamylation. Therefore, these differences of electrophoretic mobilities likely account for the successive additions of one carbamyl moiety.

As mentioned above, carbamylation corresponds to the addition of an isocyanate moiety to a primary amino group of a peptidic chain, and can thereby result in an increase of both hydrodynamic volume and the overall negative charge of the protein of interest (e.g. by neutralizing the positive charge carried by lysine residues). Both factors influence the apparent electrophoretic mobility in opposite sense and this modification might result in a decrease of glycoform apparent electrophoretic mobilities. Thus, glycoforms with low levels of carbamylation should migrate first while highly carbamylated species should present lower apparent electrophoretic mobilities and appear later under our conditions. Therefore, the peak α observed in Fig 2B might correspond to the isoform with one carbamyl moiety added while peaks β and γ would result from the addition of two and three carbamyl moieties respectively.

Moreover, this N-terminal amino-group has a pKa around 8.0 and thus does not carry a positive charge at pH 9.5 (separation pH) so carbamylation should not affect its charge [36]. Thus, this N-terminal carbamylated form should have the same electrophoretic mobility than the non-carbamylated form leading to a co-migration of both forms. Thereby, this co-migration of the mono and non-carbamylated forms could be another explanation for the detection of only three peaks in the CZE profile of the desialylated ApoC-III. This could also potentially explain the difference of the relative abundances of each carbamylation state between CZE and MALDI-TOF profiles. Complementary experiments proved that the high concentrations of urea present in the BGE did not induce any carbamylation of ApoC-III, which is also consistent with previous reports on 2D gel electrophoresis of carbamylated proteins [41]. In a separate set of experiments, we collected some fractions from CZE runs of the intact sample and analyzed them by both CZE and MALDI-TOF MS (Fig S4). Although tending to confirm preliminary peak attributions (*vide supra*), this experiment did not bring much information since collected peaks were not pure enough (Fig. S4) Moreover, MALDI-TOF analysis revealed that the collection introduced an additional level of structural heterogeneity with the formation of oxidized species (+ 16Da). ApoC-III contains two methionine residues that can become readily oxidized [42,43]. Altogether, these drawbacks limit the usefulness of such fractionation experiments.

In Fig 2A, we observed three groups of doublet peaks. It seems that the sialylation has led to the duplication of the peaks observed in Fig 2B and thus peaks 1 and 2 differ only from a sialic acid residue. In order to compare more accurately desialylated and sialylated samples, we analyzed a mixture of both samples (Fig 2C). Under these conditions, we expected but did not observe similar μep differences between peaks differing by one sialic acid residue, e.g. between peaks $\alpha/1$ and $1/2$. Thereby, it appeared that it becomes difficult to anticipate the migration of sialylated and carbamylated species. Indeed, one additional level of complexity might come from negatively charged sialic acids present in those glycoforms that could have strong intramolecular electrostatic interactions with primary amines of the amino acids chain or with DAB present in the BGE. Such phenomenon could drastically impact the μep of sialylated species and could explain why the μep differences observed in the carbamylated sample are different from those obtained in carbamylated and sialylated samples .

Altogether these data underline that it is really difficult to correctly assign peaks one by one as long as ApoC-III is both sialylated and carbamylated. This would require further complex and time consuming complementary experiments, which are not in the scope of this article. However, the identification of differentially sialylated species can be easier to address by working on a non-carbamylated (*i.e.* native) ApoC-III sample.

3.3 Comparison of ApoC-III batches from different suppliers

The optimized CZE method was then used to analyze different batches of human plasma-derived ApoC-III obtained from three different providers to see if the presence of carbamylated is a widespread phenomenon. All batches were analyzed both by MALDI-TOF MS (Fig S5) and CZE (Fig 5A) to assess their proteoform profile, their purity being the same according to the suppliers (95%). It appeared that all commercial ApoC-III samples contained both carbamylated and sialylated forms of ApoC-III to a very similar extent. Indeed, based on both MALDI-TOF MS and CZE profiles, all three samples were qualitatively and quantitatively homogenous, which suggests that a similar ApoC-III purification protocol was used by the different suppliers. Complementary analyses of samples obtained after desialylation further confirm this observation (Fig. 5B). It should be noted that Trenchevska *et al* [26] used a commercial ApoC-III sample coming from RayBiotech and did not encounter such modified glycoforms. The CZE method developed here allowed therefore to separate isoforms depending on their carbamylation degree. To the best of our knowledge, this work is the first one reporting an artefactual carbamylation of commercial samples of ApoC-III. Some *in-vitro* carbamylated proteins, such as green fluorescent protein [44] or human serum-albumin (HSA) [45], have already been monitored by capillary IEF or CZE respectively. HSA carbamylation has been demonstrated responsible for the shift in the albumin peak symmetry which could be used to assess their carbamylation degree. However, quantification of carbamylated products could not be performed due to a too low resolution [45].

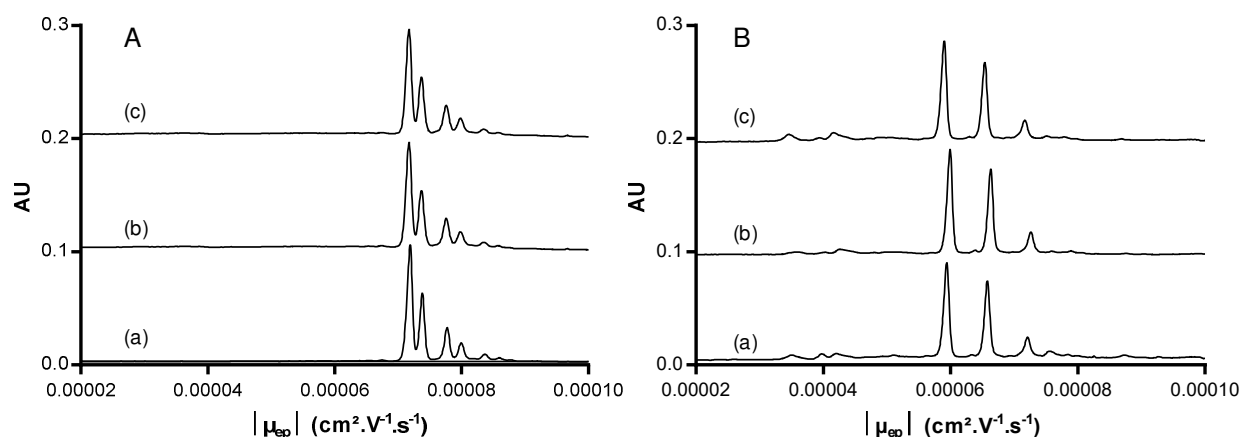


Fig. 4: Comparison of the three samples of intact ApoC-III by CZE before (A) and after (B) neuraminidase treatment; (a) sample from Merck, (b) sample from Antibodies online, (c) sample from Sigma Aldrich.

Sample: 1 mg.mL⁻¹ ApoC-III in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, BGE: 150 mM sodium borate, 1 mM DAB, 4 M urea pH 9.5, separation conditions as in Fig. 1.

Conclusion

In this work, we developed for the first time a fast and accurate CZE method for the separation of intact ApoC-III isoforms. The resolution of the separation was very satisfactory thanks to the use of an alkaline sodium borate buffer combined with the synergic effect of urea and DAB. CZE separation of sialylated ApoC-III glycoforms and their related carbamylated species proved successful even if the presence of modified commercially available ApoC-III standard drastically hamper the development of a quantitative CZE method. An optimization of the preconditioning and rinsing steps contributed to make the method robust. MALDI-TOF MS experiments combined with CZE of intact and neuraminidase-treated samples enabled to demonstrate for the first time the carbamylation of ApoC-III. The present method can also be used as a quality control tool for evaluating batch-to-batch consistency of plasma-derived as well as recombinantly expressed ApoC-III.

Acknowledgment

We thank the Ecole doctorale "Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes" which provided the financial support of Coralie Ruel as a fellowship. This work was also supported by the MetaboHUB infrastructure (ANR-11-INBS-0010 grant) and by the LabEx NanoSaclay and the University Paris Sud.

References

- [1] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, Historical Background and Overview, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20744/> (accessed July 11, 2017).
- [2] H.H. Freeze, J.X. Chong, M.J. Bamshad, B.G. Ng, Solving Glycosylation Disorders: Fundamental Approaches Reveal Complicated Pathways, *Am. J. Hum. Genet.* 94 (2014) 161–175. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.024.
- [3] J. Jaeken, Chapter 179 - Congenital disorders of glycosylation, in: M.L. and H.B.S. Olivier Dulac (Ed.), *Handb. Clin. Neurol.*, Elsevier, 2013: pp. 1737–1743. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00044-7.
- [4] S. Wopereis, S. Grünwald, É. Morava, J.M. Penzien, P. Briones, M.T. García-Silva, P.N.M. Demacker, K.M.L.C. Huijben, R.A. Wevers, Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1839–1845. doi:10.1373/clinchem.2003.022541.
- [5] S. Wopereis, S. Grünwald, K.M.L.C. Huijben, É. Morava, R. Mollicone, B.G.M. van Engelen, D.J. Lefeber, R.A. Wevers, Transferrin and Apolipoprotein C-III Isofocusing Are Complementary in the Diagnosis of N- and O-Glycan Biosynthesis Defects, *Clin. Chem.* 53 (2007) 180–187. doi:10.1373/clinchem.2006.073940.
- [6] X. Wu, R.A. Steet, O. Bohorov, J. Bakker, J. Newell, M. Krieger, L. Spaapen, S. Kornfeld, H.H. Freeze, Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder, *Nat. Med.* 10 (2004) 518–523. doi:10.1038/nm1041.
- [7] F. Foulquier, COG defects, birth and rise!, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792 (2009) 896–902. doi:10.1016/j.bbadis.2008.10.020.
- [8] L.J.M. Spaapen, J.A. Bakker, S.B. van der Meer, H.J. Sijstermans, R.A. Steet, R.A. Wevers, J. Jaeken, Clinical and biochemical presentation of siblings with COG-7 deficiency, a lethal multiple O- and N-glycosylation disorder, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 707. doi:10.1007/s10545-005-0015-z.
- [9] M.C. Jong, M.H. Hofker, L.M. Havekes, Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 472–484. doi:10.1161/01.ATV.19.3.472.
- [10] C. Petibois, G. Cazorla, A. Cassaigne, G. Déléris, Plasma Protein Contents Determined by Fourier-Transform Infrared Spectrometry, *Clin. Chem.* 47 (2001) 730–738.
- [11] I. Sakurabayashi, Y. Saito, T. Kita, Y. Matsuzawa, Y. Goto, Reference intervals for serum apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E in healthy Japanese determined with a commercial immunoturbidimetric assay and effects of sex, age, smoking, drinking, and Lp(a) level, *Clin. Chim. Acta.* 312 (2001) 87–95. doi:10.1016/S0009-8981(01)00591-5.
- [12] J.J. Albers, A.M. Scanu, Isoelectric fractionation and characterization of polypeptides from human serum very low density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* 236 (1971) 29–37. doi:10.1016/0005-2795(71)90145-0.
- [13] R.S. Shulman, P.N. Herbert, D.S. Fredrickson, K. Wehrly, H.B. Brewer, Isolation and alignment of the tryptic peptides of alanine apolipoprotein, an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 4969–4974.
- [14] A.V. Hospattankar, H. Bryan Brewer, R. Ronan, T. Fairwell, Amino acid sequence of human plasma apolipoprotein C-III from normal lipidemic subjects, *FEBS Lett.* 197 (1986) 67–73. doi:10.1016/0014-5793(86)80300-3.
- [15] C.I.A. Balog, O.A. Mayboroda, M. Wuhler, C.H. Hokke, A.M. Deelder, P.J. Hensbergen, Mass Spectrometric Identification of Aberrantly Glycosylated Human Apolipoprotein C-III Peptides in Urine from *Schistosoma mansoni*-infected Individuals, *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 9 (2010) 667–681. doi:10.1074/mcp.M900537-MCP200.

- [16] S. Nicolardi, Y.E.M. van der Burgt, M. Wuhler, A.M. Deelder, Mapping O-glycosylation of apolipoprotein C-III in MALDI-FT-ICR protein profiles, *PROTEOMICS*. 13 (2013) 992–1001. doi:10.1002/pmic.201200293.
- [17] N. Ondrušková, T. Honzík, J. Kytarová, M. Matoulek, J. Zeman, H. Hansíková, Isoelectric Focusing of Serum Apolipoprotein C-III as a Sensitive Screening Method for the Detection of O-glycosylation Disturbances, *Prague Med. Rep.* 116 (2015) 73–86. doi:10.14712/23362936.2015.48.
- [18] R. Haase, I. Menke-Möllers, K. Oette, Analysis of human apolipoproteins C by isoelectric focusing in immobilized pH gradients, *Electrophoresis*. 9 (1988) 569–575. doi:10.1002/elps.1150090917.
- [19] A. Bruneel, W. Morelle, Y. Carre, F. Habarou, D. Dupont, A. Hesbert, G. Durand, J.C. Michalski, V. Drouin-Garraud, N. Seta, Two dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and MALDI-TOF MS are complementary techniques for the study of combined defects in N- and mucin type O-glycan biosynthesis, *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 2 (2008) 1670–1674. doi:10.1002/prca.200800089.
- [20] D.L. Sprecher, L. Taam, H.B. Brewer, Two-dimensional electrophoresis of human plasma apolipoproteins., *Clin. Chem.* 30 (1984) 2084–2092.
- [21] S. Yen-Nicolaï, C. Boursier, M. Rio, D.J. Lefeber, A. Pilon, N. Seta, A. Bruneel, MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation. Comparison with two-dimensional electrophoresis, *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 9 (2015) 787–793. doi:10.1002/prca.201400187.
- [22] A. Choukaife, S. Visvikis, J. Steinmetz, M.M. Galteau, O. Kabbaj, G. Féraud, P. Métais, G. Siest, Two-dimensional electrophoresis of plasma proteins and high density lipoproteins during inflammation, *Electrophoresis*. 10 (1989) 781–784. doi:10.1002/elps.1150101110.
- [23] A. Bruneel, T. Robert, D.J. Lefeber, G. Benard, E. Loncle, A. Djedour, G. Durand, N. Seta, Two-dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and other serum glycoproteins for the combined screening of human congenital disorders of O- and N-glycosylation, *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 1 (2007) 321–324. doi:10.1002/prca.200600777.
- [24] Y. Wada, Mass spectrometry of transferrin and apolipoprotein C-III for diagnosis and screening of congenital disorder of glycosylation, *Glycoconj. J.* 33 (2016) 297–307. doi:10.1007/s10719-015-9636-0.
- [25] S.B. Harvey, Y. Zhang, J. Wilson-Grady, T. Monkkonen, G.L. Nelsestuen, R.S. Kasthuri, M.R. Verneris, T.C. Lund, E.W. Ely, G.R. Bernard, H. Zeisler, M. Homoncik, B. Jilma, T. Swan, T.A. Kellogg, O-Glycoside Biomarker of Apolipoprotein C3: Responsiveness to Obesity, Bariatric Surgery, and Therapy with Metformin, to Chronic or Severe Liver Disease and to Mortality in Severe Sepsis and Graft vs Host Disease, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 603–612. doi:10.1021/pr800751x.
- [26] O. Trenchevska, M.R. Schaab, R.W. Nelson, D. Nedelkov, Development of multiplex mass spectrometric immunoassay for detection and quantification of apolipoproteins C-I, C-II, C-III and their proteoforms, *Methods San Diego Calif.* 81 (2015) 86–92. doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.020.
- [27] Y. Wada, M. Kadoya, N. Okamoto, Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient, *Glycobiology*. 22 (2012) 1140–1144. doi:10.1093/glycob/cws086.
- [28] W. Jian, R.W. Edom, D. Wang, N. Weng, S. (Weihua) Zhang, Relative Quantitation of Glycoisoforms of Intact Apolipoprotein C3 in Human Plasma by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2867–2874. doi:10.1021/ac3034757.
- [29] S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H.M. Widmer, Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1541–1547. doi:10.1021/ac00015a009.
- [30] E. Watson, F. Yao, Capillary Electrophoretic Separation of Human Recombinant Erythropoietin (r-HuEPO) Glycoforms, *Anal. Biochem.* 210 (1993) 389–393. doi:10.1006/abio.1993.1212.
- [31] Y. Alahmad, M. Taverna, H. Mobdi, J. Duboeuf, A. Grégoire, I. Rancé, N.T. Tran, A validated capillary electrophoresis method to check for batch-to-batch consistency during recombinant human

glycosylated interleukin-7 production campaigns, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 882–888. doi:10.1016/j.jpba.2009.09.013.

[32] N. Cohen, E. Grushka, Controlling electroosmotic flow in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 678 (1994) 167–175. doi:10.1016/0021-9673(94)87086-1.

[33] European Pharmacopeia 9.0 European Directorate for the Quality of Medicines, vol. 1316, Council of Europe, Erythropoietin concentrated solution, Council of Europe, Strasbourg, in: 2008: pp. 2391–2395.

[34] G.R. Stark, W.H. Stein, S. Moore, Reactions of the Cyanate Present in Aqueous Urea with Amino Acids and Proteins, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3177–3181.

[35] L. Kollipara, R.P. Zahedi, Protein carbamylation: In vivo modification or in vitro artefact?, *PROTEOMICS.* 13 (2013) 941–944. doi:10.1002/pmic.201200452.

[36] P.N. Herbert, R.S. Shulman, R.I. Levy, D.S. Fredrickson, Fractionation of the C-Apoproteins from Human Plasma Very Low Density Lipoproteins ARTIFACTUAL POLYMORPHISM FROM CARBAMYLATION IN UREA-CONTAINING SOLUTIONS, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 4941–4946.

[37] M. Lundqvist, T. Berggård, E. Hellstrand, I. Lynch, K.A. Dawson, S. Linse, T. Cedervall, Rapid and Facile Purification of Apolipoprotein A-I from Human Plasma Using Thermoresponsive Nanoparticles, *J. Biomater. Nanobiotechnology.* 02 (2011) 258. doi:10.4236/jbnb.2011.23033.

[38] S. Nicolardi, Y.E.M. van der Burgt, I. Dragan, P.J. Hensbergen, A.M. Deelder, Identification of New Apolipoprotein-CIII Glycoforms with Ultrahigh Resolution MALDI-FTICR Mass Spectrometry of Human Sera, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 2260–2268. doi:10.1021/pr400136p.

[39] A. Martinez-Val, F. Garcia, P. Ximénez-Embún, A. Martínez Teresa-Calleja, N. Ibarz, I. Ruppen, J. Munoz, Urea Artifacts Interfere with Immuno-Purification of Lysine Acetylation, *J. Proteome Res.* 16 (2017) 1061–1068. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00463.

[40] Z.-Y. Park, R. Sadygov, J.M. Clark, J.I. Clark, J.R. Yates, Assigning in vivo carbamylation and acetylation in human lens proteins using tandem mass spectrometry and database searching, *Int. J. Mass Spectrom.* 259 (2007) 161–173. doi:10.1016/j.ijms.2006.08.013.

[41] J. McCarthy, F. Hopwood, D. Oxley, M. Laver, A. Castagna, P.G. Righetti, K. Williams, B. Herbert, Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis--myth or reality?, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 239–242.

[42] A. Palmigiano, R.O. Bua, R. Barone, D. Ryman, L. Régal, N. Deconinck, C. Dionisi-Vici, C.-W. Fung, D. Garozzo, J. Jaeken, L. Sturiale, MALDI-MS profiling of serum O-glycosylation and N-glycosylation in COG5-CDG, *J. Mass Spectrom.* 52 (2017) 372–377. doi:10.1002/jms.3936.

[43] P.V. Bondarenko, S.L. Cockrill, L.K. Watkins, I.D. Cruzado, R.D. Macfarlane, Mass spectral study of polymorphism of the apolipoproteins of very low density lipoprotein, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 543–555.

[44] Z. Liu, J. Pawliszyn, Capillary Isoelectric Focusing with Laser-Induced Fluorescence Whole Column Imaging Detection as a Tool To Monitor Reactions of Proteins, *J. Proteome Res.* 3 (2004) 567–571. doi:10.1021/pr034114w.

[45] S. Delanghe, A. Moerman, A. Pletinck, E. Schepers, G. Glorieux, W. Van Biesen, J.R. Delanghe, M.M. Speeckaert, Quantification of carbamylated albumin in serum based on capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS.* (n.d.) n/a-n/a. doi:10.1002/elps.201700068.

Supporting information

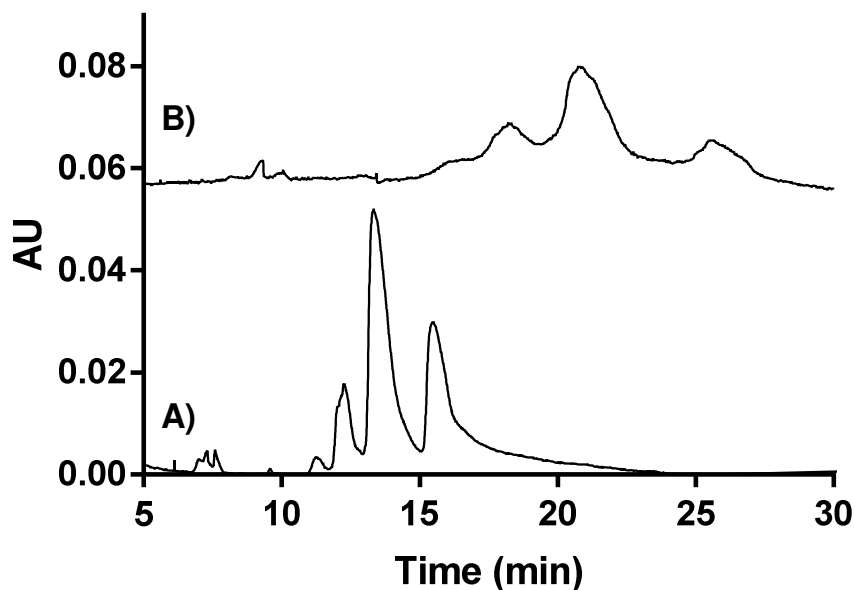


Fig. S1: Comparison of CZE profiles obtained for ApoC-III using a PVA capillary (A) and a PAA capillary (B)

Sample : 1 mg mL⁻¹ ApoC-III in 10 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, BGE: 200mM EACA pH 7,0, separation conditions: capillary: bare fused silica, 50 μm, 50 cm (effective length), voltage: normal polarity, 20 kV, temperature : 25°C, injection: 0.5 psi for 6 s.

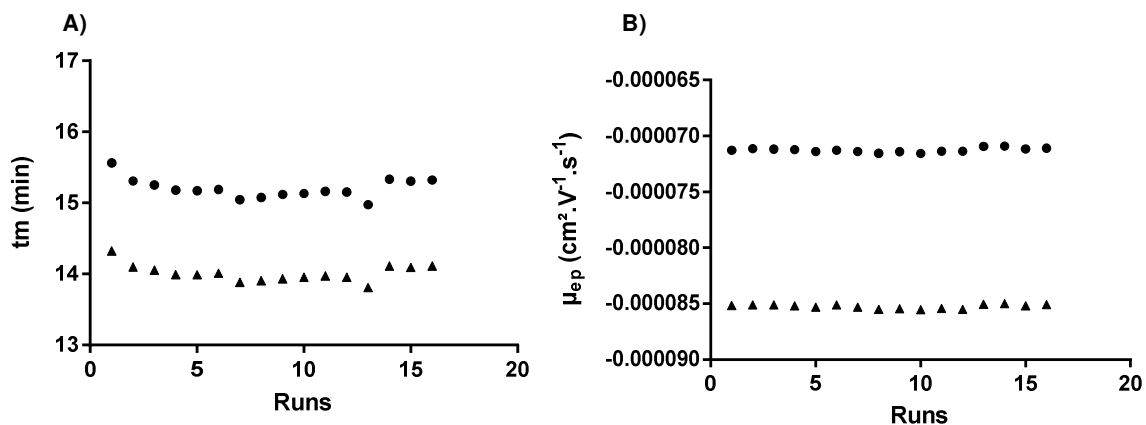


Fig. S2: Evolution of t_m (A) and of electrophoretic mobility (B) from successive runs of ApoC-III to evaluate long term stability of the preconditioning of the capillary with (●) and (▲) corresponding to peak 1 and peak 6 of Fig 2 respectively

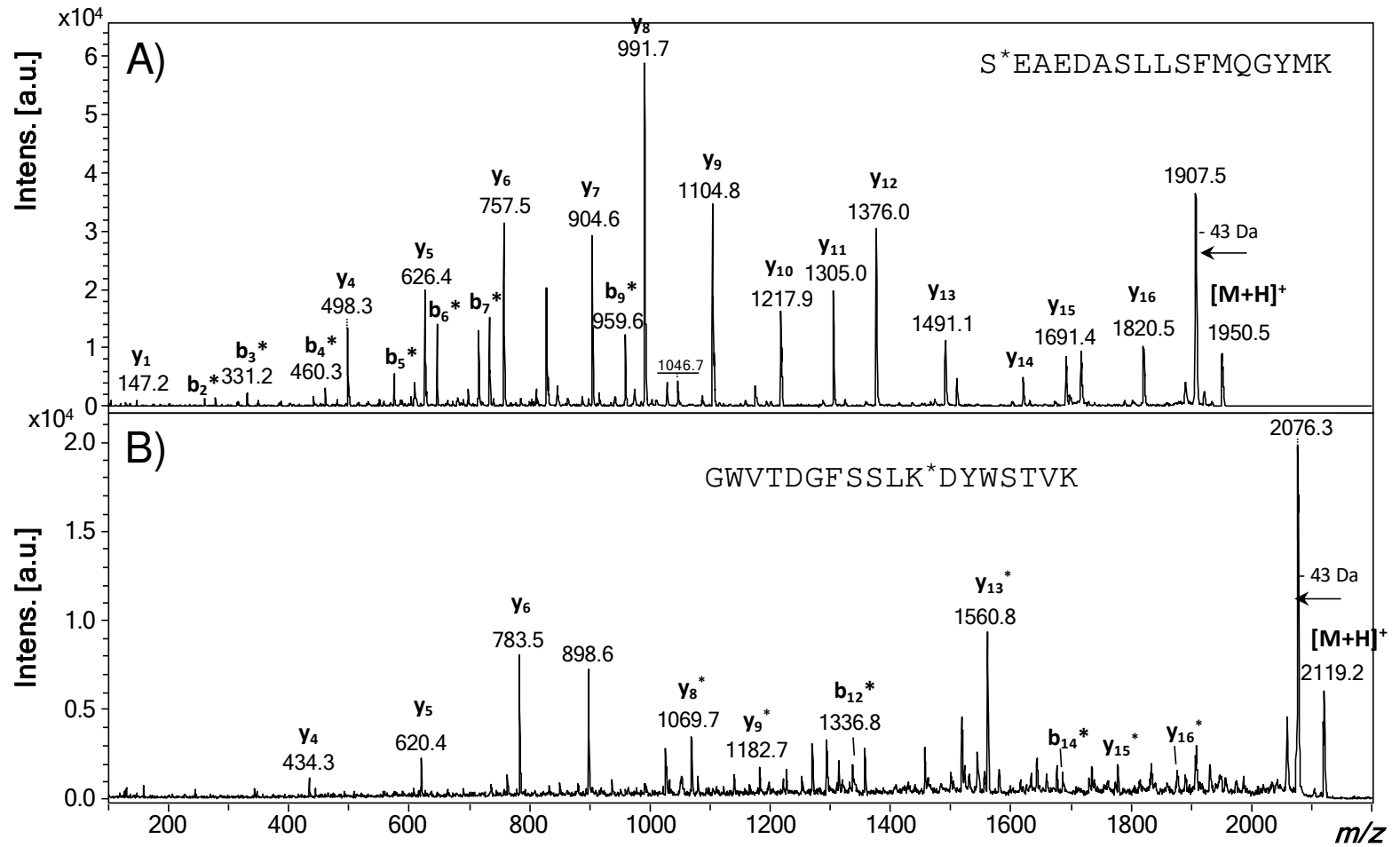


Fig. S3: MALDI-TOF/TOF tandem mass spectra of the ions at A) m/z 1950.5 and B) m/z 2119.2 corresponding to ApoC-III peptides bearing carbamylated N-terminus and Lys51 residues, respectively.

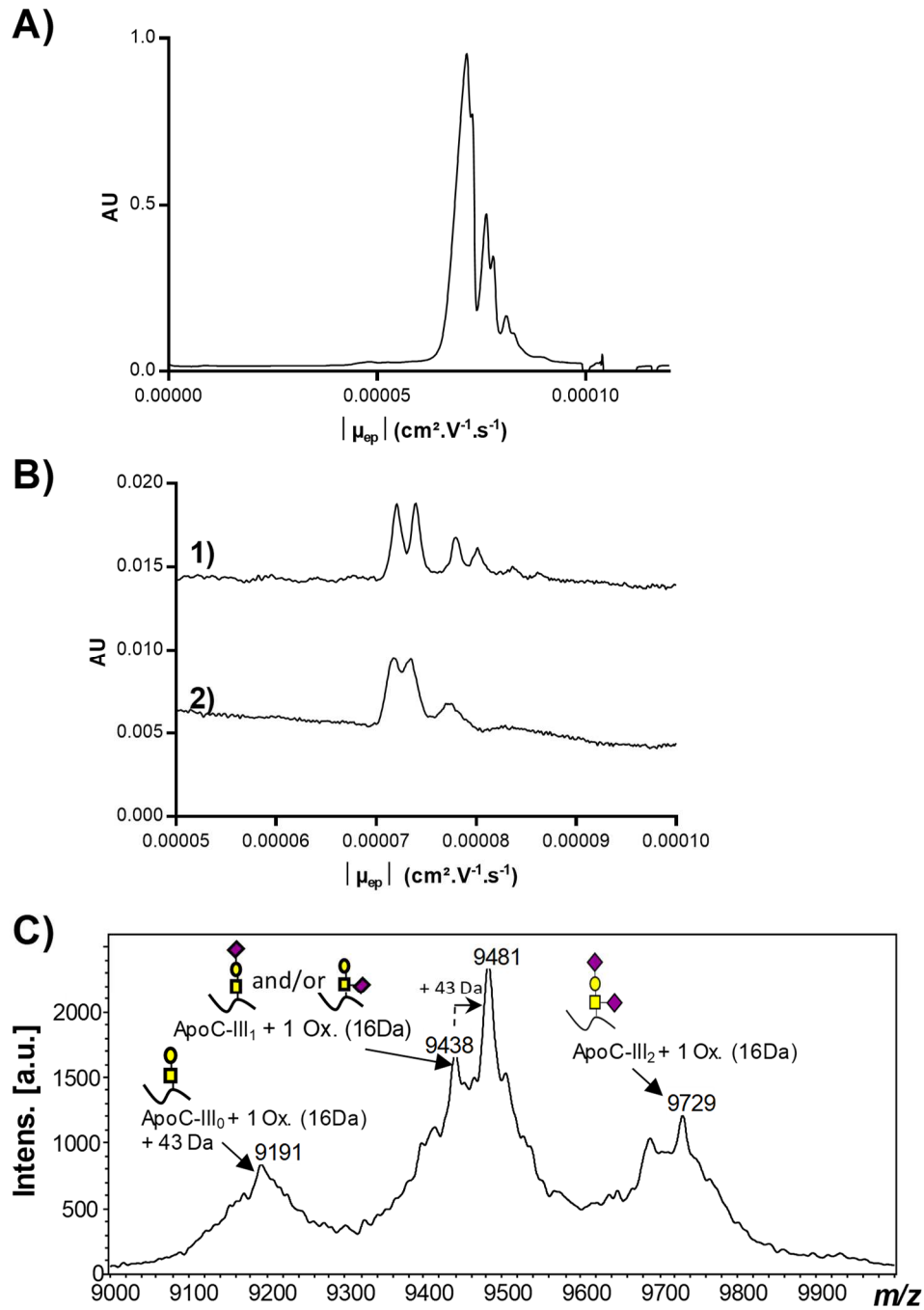


Fig. S4: Collection data : CZE analysis of ApoC-III standard used for fractionation (A) and CZE analysis of the ApoC-III standard diluted by 15 (B-1) and of the collected fraction (B-2) and in MALDI-TOF MS (C)

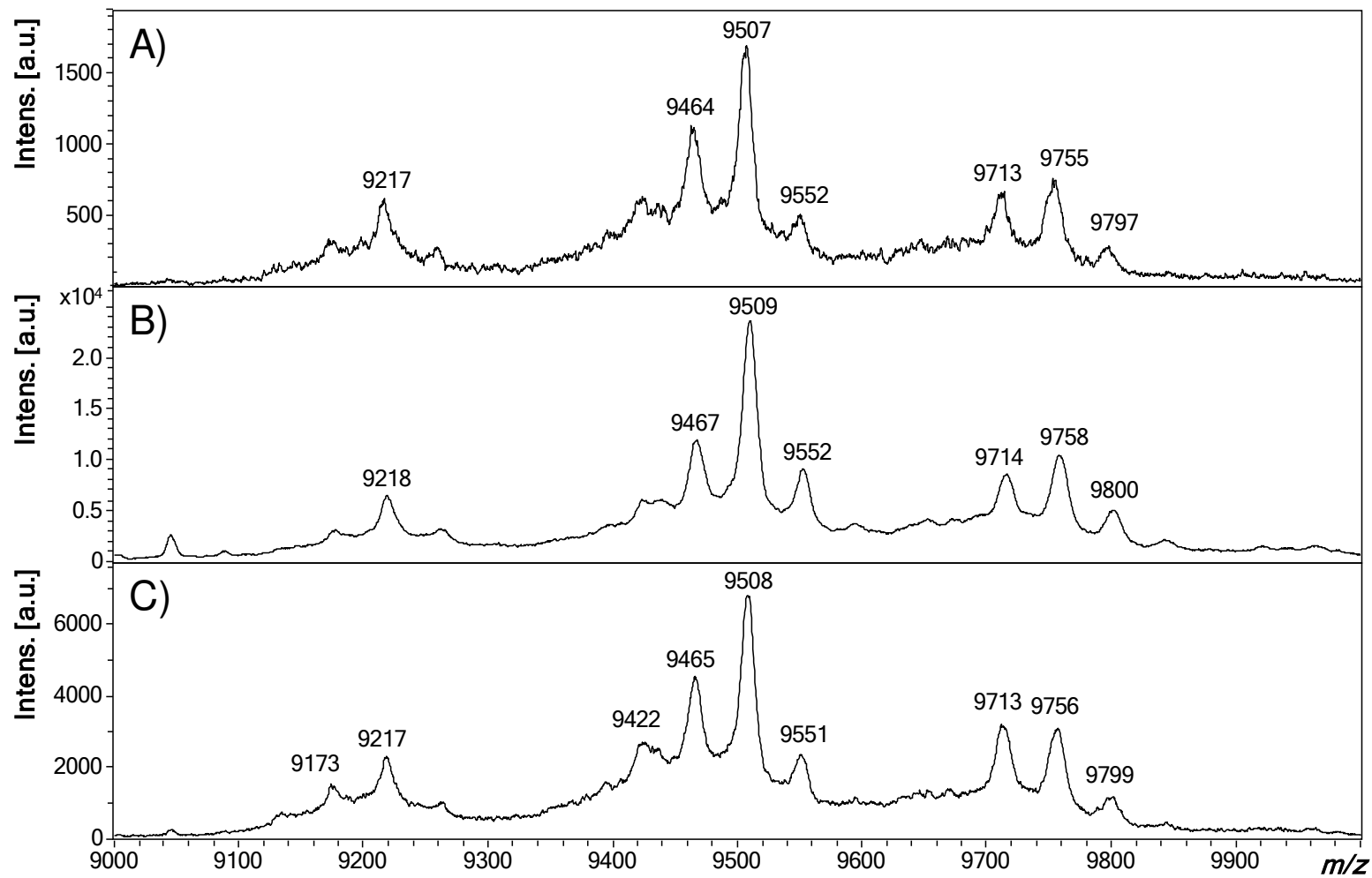


Fig. S5: MALDI-TOF mass spectra of native ApoC-III samples obtained from A) Merck, B) Antibodies online, and C) Sigma Aldrich.

I.3. Application de la méthode ECZ à des échantillons biologiques

Afin d'appliquer la méthode d'ECZ-UV décrite dans l'article précédent à des échantillons biologiques, le développement d'une étape de préparation d'échantillon s'est avéré nécessaire. En effet, l'analyse de matrices biologiques présente une complexité élevée due au grand nombre de molécules présentes variant en taille, en structure et en concentration et pouvant engendrer des interférences. La méthode de prétraitement doit permettre l'élimination d'un maximum d'interférents tout en conservant la protéine d'intérêt mais également une détection suffisamment sensible.

Dans cette deuxième partie, plusieurs approches de prétraitement ont donc été testées et chaque échantillon a été analysé par la méthode d'ECZ-UV développée. Les méthodes de préparation présentées ici sont fondées sur des mécanismes d'extraction différents et présentent des spécificités différentes.

Une fois la meilleure méthode d'extraction de l'ApoC-III du plasma choisie, plusieurs procédures ont été testées pour augmenter la sensibilité de détection. Tout d'abord, des essais pour éliminer les interférents issus du plasma par des dilutions ont été effectués puis l'ajout d'une étape de préconcentration électrocinétique pour améliorer ainsi le stacking de la méthode ECZ ou la dérivation de la chaîne polypeptidique par un fluorophore ont également été testées.

Si les temps de migration ont tendance à légèrement fluctuer sur les électrophorogrammes présentés dans cette partie lors de l'analyse des échantillons de plasma, une comparaison systématique avec une analyse de l'ApoC-III standard a été effectuée pour identifier de manière certaine les pics correspondant à l'ApoC-III.

I.3.1. Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes déjà mentionnés dans l'Article 1 ne seront pas présentés dans cette partie.

I.3.1.1. Réactifs et consommables

Les anticorps anti-ApoC-III polyclonaux proviennent de Interchim (ref K97113R, Montluçon, France) sous forme de solution (1 mg/mL dans 75mM PBS, 75mM NaCl, 0,5mM EDTA pH 7,2) et de Gentaur (ref 33B-G1b, Paris, France) sous forme lyophilisée. L'anticorps anti-ApoC-III biotinylé a été acheté chez Gentaur (ref 33B-G2b, Paris, France) sous forme de solution (1 mg/mL dans 75 mM phosphate de sodium, 75 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0.02% NaN₃, pH 7,2.). L'acétonitrile (ACN), le méthanol, l'éthanol et l'acide perchlorique (PA, 70%) ont été achetés chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Les sels NaCl proviennent d'Euromedex (Strasbourg, France). L'acide formique (AF, 100%), le diméthylsulfoxyde (DMSO, 99.9%), la solution saline tamponnée au phosphate (PBS 10x), le polyéthylène glycol sorbitan monolaurate (Tween[®]-20), l'acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES, 99,5%), le N-hydroxysuccinimide (NHS, ≥ 98%) et le N-Ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) et l'albumine de sérum bovin (BSA, 96%) viennent de chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le Fluoprobe 488 NHS (FP-488) a été acheté chez Interchim (Montluçon, France). L'acide trichloroacétique (TCA, 99%) a été acheté chez Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Les cartouches de SPE Supra-Clean SPE WC4 (N9306591, 100 mg/1 mL avec pores de 300 Å) ont été achetées chez PerkinElmer (Wellesley, MA, USA). Les billes magnétiques fonctionnalisées COOH (MyOne, diamètre de 1µm, 10 mg/mL), tosylées (MyOne, diamètre de 1µm, 100 mg/mL) et les billes avec IgG de mouton anti-souris (M-280 Dynabeads®, 10 mg/mL) proviennent de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Les billes magnétiques poreuses MagResyn fonctionnalisées par des acides carboxyliques (diamètre de 5-10µm, 20 mg/mL) et par de la streptavidine (diamètre de 5-10µm, 10 mg/mL) ont été achetées chez ReSyn Biosciences (Evendale, Afrique du Sud). Les dispositifs de filtration Nanosep (membrane Oméga de 10 et 30 kDa) ont été achetés chez Pall Corporation (Fontenay-sous-bois, France) et les membranes Amicon (membrane en cellulose, 10 et 30 kDa) proviennent de chez Merck Millipore (Guyancourt, France). La solution de délipidation LipoClear a été achetée chez Iris (Westwood, MA, USA).

I.3.1.2. Méthodes

I.3.1.2.1. Précipitation des protéines

Le plasma est mélangé avec la solution de précipitation au ratio solvant : plasma indiqué (0,05 :1, 2 :1, 2,25 :1 ou 3 :1). Le mélange est ensuite vortexé puis incubé 1h à 4°C. L'échantillon est ensuite centrifugé à 14000 g pendant 15min. Le surnageant est récupéré, lyophilisé puis resolubilisé dans 10µL de tampon 10mM bicarbonate d'ammonium pH 7,4 avant analyse.

I.3.1.2.2. SPE

Le protocole de l'extraction sur colonnes de SPE a été adapté du protocole décrit par Yen-Nicolaÿ *et al*, initialement pour des cônes de pipettes ZipTip (Yen-Nicolaÿ *et al.*, 2015a). Avant dépôt sur la colonne, 100µL de plasma est dilué par 15 par une solution eau/acétonitrile (ACN)/ acide trifluoroacétique (TFA) :95 :5 :0,1 (v/v/v) et incubé 30 min à température ambiante. L'échantillon est ensuite déposé sur la colonne de SPE préalablement conditionnée (deux fois 1mL ACN puis cinq fois 1mL eau/0,1% TFA) et placée sur un module d'extraction sous vide (manifold). La colonne est alors lavée cinq fois avec la solution eau/0,1% TFA. Enfin l'échantillon est élué deux fois par 250µL d'une solution à 50 :50 :0,1 (v/v/v) (ACN/eau/TFA) avant d'être lyophilisé. L'échantillon est ensuite repris dans 10µL de tampon 10mM ammonium bicarbonate à pH 7,4 avant analyse par ECZ.

La filtration sur membrane effectuée après SPE est réalisée à l'aide de membranes avec deux seuils de coupure (10 et 30kDa). Les membranes sont tout d'abord équilibrées par 500µL d'eau à 6000g et 4°C pendant 3min. Les échantillons à filtrer sont ensuite déposés sur les membranes puis la centrifugation est réalisée à 6000g pendant 15min. Le filtrat et le rétentat sont alors analysés par MALDI-TOF.

I.3.1.2.3. Immunocapture sur billes magnétiques

Les protocoles divergent selon le type de billes employées et ont été adaptés des préconisations des fournisseurs :

✓ Billes MyOne COOH : 50µL de billes sont prélevés puis rincés deux fois par du PBS (2x 200µL). Puis 100µL d'EDC (10 mg/mL dans PBS), 100µL de S-NHS (10 mg/mL dans PBS) et 20 µL d'anticorps Anti-ApoC-III sont ajoutés aux billes. Celles-ci sont incubées sous agitation à l'aide d'un ThermoMixer C (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pendant 3h à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées par du PBS (2x 200µL) et une solution de Tris-HCl (50mM pH7,4, 2x 300µL) puis agitées pendant 15 min à température ambiante. Enfin elles sont rincées par du PBS/BSA 0,1%/Tween-20 0,1% (3x 300µL)

et agitées pendant 10min à température ambiante avant d'être re-suspendues dans 50µL (10 mg/mL) de ce même tampon. Les billes sont alors prêtes pour l'immunocapture : 25µL de billes sont prélevées et mises en contact avec 5µL de standard d'ApoC-III et 20µL de tampon PBS/BSA 0,1%/ Tween-20 0,1%. Le mélange est incubé à 1100 rpm et 20°C pendant 24h à l'aide d'un ThermoMixer. Après capture, les billes sont rincées par du tampon PBS/BSA 0,1%/Tween-20 0,1% avant de réaliser l'élution de l'ApoC-III.

✓ Billes MyOne tosylées : 165 µL de billes sont prélevés puis rincés deux fois par du PBS (2x 200µL). Puis 300µL d'anticorps sont ajoutés ainsi que 100µL de tampon ammonium sulfate 3M à pH 9.5. Les billes sont incubées à 1100 rpm pendant une nuit à 37°C. Les billes sont alors rincées par 1mL de tampon PBS/BSA 0,5% puis incubées dans ce même tampon 1h à 1100 rpm et 37°C. Enfin les billes sont rincées par 1mL de tampon PBS/BSA 0,1% et re-suspendues dans 0,5mL de ce même tampon (33.3 mg/mL). Les billes sont alors prêtes pour l'immunocapture : 50µL de billes sont prélevés et mis en contact avec 100µL de plasma et 900µL de tampon PBS/BSA 0,1% pendant 4h à 1100 rpm et 37°C. Après capture, les billes sont rincées par 200µL de tampon PBS/BSA 0,1% puis par 200µL de tampon PBS et enfin par 200µL d'eau avant de réaliser l'élution de l'ApoC-III.

✓ Billes poreuses COOH : 100 µL de billes sont prélevés puis rincés trois fois par une solution de 0,1M MES, 0,5M NaCl pH 6,0. Puis elles sont suspendues dans 1mL d'une solution de 20mM d'EDC, 50mM NHS, 0,1M MES, 0,5M NaCl pH 6,0 et incubées sur roue tournante à température ambiante pendant 15min. Elles sont ensuite rincées trois fois par 1mL de PBS. Elles sont après mélangées avec 37.5µL d'anticorps et 62.5µL de tampon PBS/BSA 0,2% et incubées pendant une nuit à 20°C et 750 rpm. Les billes sont ensuite lavées deux fois avec 200µL de tampon PBS/BSA 0,2% puis incubées avec une solution de 200mM d'éthanolamine dans du PBS pendant 3h sur roue tournante. Elles sont alors re-suspendues dans 100µL de ce même tampon PBS/BSA 0,2% (20 mg/mL). Les billes sont alors prêtes pour l'immunocapture : 50µL de billes sont prélevées et mises en contact avec 100µL de plasma et 900µL de tampon PBS/BSA 0,2% pendant 4h à 750 rpm et 25°C. Après capture, les billes sont rincées deux fois par 200µL de tampon PBS et enfin par 200µL d'eau avant de réaliser l'élution de l'ApoC-III.

✓ Billes poreuses streptavidine : 50 µL de billes sont prélevés puis rincés trois fois par un tampon 80 mM phosphate de sodium, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20 à pH 7.4. Elles sont ensuite suspendues avec 150µg d'anticorps biotinylé et 350µL du tampon précédemment utilisé. Elles sont incubées 30min à 1000 rpm et 25°C. Les billes sont rincées trois fois avec 1mL de tampon 80 mM phosphate de sodium, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20 à pH 7.4. Elles sont alors re-suspendues dans 50µL de tampon PBS (10 mg/mL). Les billes sont alors prêtes pour l'immunocapture : 25µL de billes sont prélevés et mis en contact avec 100µL de plasma et 900µL de tampon PBS pendant 4h à 750 rpm et 25°C. Après capture, les billes sont rincées deux fois par 200µL de tampon PBS et enfin par 200µL d'eau avant de réaliser l'élution de l'ApoC-III.

✓ Billes fonctionnalisées avec des IgG de mouton dirigées contre les IgG de souris (billes M-280 Sheep Anti-Mouse IgG): 50 µL de billes sont prélevés puis rincés trois fois par une solution de PBS/BSA 0,1%. Les billes sont resuspendues avec 100µL de plasma et 900µL de tampon PBS/BSA 0,1% pendant 4h à 1100 rpm et 37°C. Après capture, les billes sont rincées par 200µL de tampon PBS/BSA 0,1% puis par 200µL de tampon PBS et enfin par 200µL d'eau avant de réaliser l'élution de l'ApoC-III.

Différentes méthodes d'élution ont également été testées :

- Elution par chauffage : Les billes sont suspendues dans 10µL de tampon d'échantillon (10mM ammonium bicarbonate pH 7,4) puis incubées à 95°C pendant 5min dans une étuve. Une fois le chauffage terminé, les billes sont re-suspendues vigoureusement par pipetage.

- Elution à pH acide : Les billes sont suspendues dans 10µL de solution d'acide formique à 1M, 0.4% TFA ou 0,1M Glycine-HCl pH 2.5, mélangées vigoureusement par pipetage et laissées incuber 5min à température ambiante.
- Elution à pH alcalin : Les billes sont suspendues dans 10µL de solution d'hydroxyde d'ammonium à 1M ou 0,1M Glycine-NaOH pH 10, mélangées vigoureusement par pipetage et laissées incuber 5min à température ambiante.
- Elution par dénaturation : Les billes sont suspendues dans 10µL de solution de 4M d'urée, mélangées vigoureusement par pipetage et laissées incuber 5min à température ambiante.
- Elution par un changement de force ionique : Les billes sont suspendues dans 10µL de solution de 5M de LiCl, mélangées vigoureusement par pipetage et laissées incuber 5min à température ambiante.

Une fois l'éluion terminée, le surnageant est retiré et analysé.

1.3.1.2.4. Méthodes de préconcentration électrocinétique

1.3.1.2.4.a. Field amplified sample stacking (FASS)

L'échantillon de standard d'ApoC-III est mélangé avec du méthanol à différentes proportions entre 10% et 60%. La méthode d'ECZ reste identique à celle décrite dans l'Article 1. L'échantillon d'immunocapture du standard d'ApoC-III est mélangé soit avec 10% de MeOH soit 10% d'isopropanol (IPA) après éluion dans 10µL de 10mM de bicarbonate d'ammonium 10mM à pH 7,4. La méthode d'ECZ utilisée change juste au niveau de l'injection de l'échantillon qui dure alors 18s au lieu de 6s à 0,5 psi pour permettre un volume d'échantillon de l'ordre de 3% du volume du capillaire.

Deux autres tampons d'éluion, une solution de 0,15mM de bicarbonate d'ammonium pH 7,4 et de l'eau ont également été essayés. Dans ce cas, la procédure est inchangée, les billes sont éluées dans 10µL des deux autres tampons avant analyse. Pour une injection d'un volume de 3% du capillaire le temps d'injection est de 18s à 0,5psi et il est de 30s à 0,5psi pour une injection de 5% du volume du capillaire.

1.3.1.2.4.b. Large-volume sample stacking (LVSS)

Lors de l'utilisation de la LVSS, la méthode se déroule en deux étapes. Tout d'abord l'échantillon est introduit, de manière hydrodynamique, 60s à 2,5 psi pour une injection de 30% du capillaire, de 60s à 0,5 psi et 30s à 0,5 psi pour une injection de 5% du volume du capillaire. Une tension de -20kV en polarité inverse est ensuite appliquée au capillaire. Lorsque la valeur du courant atteint 70% de la valeur attendue du courant, soit la valeur -35µA, cette tension est arrêtée. Une nouvelle tension de 20kV en polarité normale est cette fois appliquée comme lors de la méthode d'ECZ décrite dans l'Article 1. Les rinçages sont réalisés comme dans l'Article 1.

1.3.1.2.5. Dérivation sur billes magnétiques

Les billes après capture et avant éluion sont rincées trois fois avec 100µL de tampon bicarbonate d'ammonium 40mM à pH 7,9. Elles sont ensuite re-suspendues dans 48,5µL de ce même tampon et 1,5µL de fluorophore FP-488 (solubilisé à 10 mg/mL dans le DMSO). Les billes sont incubées à 750 rpm et 20°C pendant une nuit. Les billes sont alors rincées par du PBS et de l'eau avant éluion.

1.3.1.2.6. Délipidation du plasma

Dans un tube de 1,5mL, 250µL de plasma sont mélangés avec 40µL de la solution commerciale LipoClear. La délipidation repose sur une précipitation des lipides en présence d'un polymère non-ionique qui se lie aux chylomicrons et VLDL (Grenier, 2011). Le mélange est vortexé et incubé 5min à température ambiante. Enfin une centrifugation à 2000g pendant 20min est effectuée et le surnageant est utilisé pour la suite des analyses.

1.3.2. Extraction de l'ApoC-III du plasma

Avant de mettre en place une technique d'extraction de l'ApoC-III du plasma, il convient de connaître davantage certaines de ses propriétés. L'ApoC-III est une apolipoprotéine qui forme des complexes avec les lipides pour donner des lipoprotéines (VLDL et HDL essentiellement voir Figure 65) (Jong *et al.*, 1999) et est sans doute essentiellement présente sous cette forme complexée dans le plasma. Ces lipoprotéines sont stabilisées par des liaisons faibles de type hydrogènes, hydrophobes et de type Van der Waals. A l'inverse, l'échantillon d'ApoC-III standard employé dans l'Article 1 ainsi que dans la suite des travaux présentés est uniquement sous une forme libre suite à la purification effectuée par le fournisseur.

L'ApoC-III a une concentration plasmatique comprise entre 0,1 et 0,4 g/L (Petibois *et al.*, 2001; Sakurabayashi *et al.*, 2001).

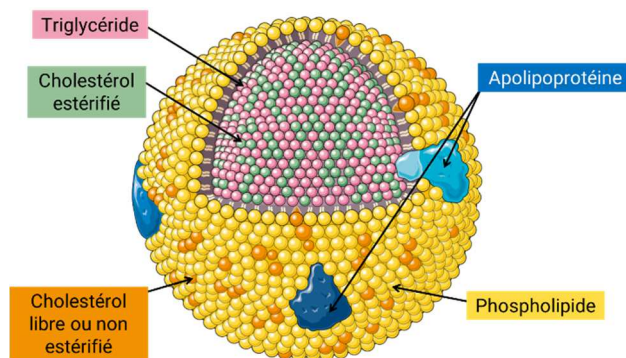


Figure 65 : Structure d'une lipoprotéine constituée de phospholipides, de cholestérol libre, de cholestérol estérifié, de triglycérides et d'apolipoprotéines adapté de (Servier Medical Art, n.d.)

1.3.2.1. Précipitation des protéines

La première stratégie envisagée pour simplifier la matrice du plasma et extraire l'ApoC-III a été l'utilisation de techniques de précipitation de protéines. Il s'agit de modifier les propriétés du milieu aqueux pour changer la solubilité des protéines. La précipitation des protéines interférentes d'un fluide biologique peut être réalisée de différentes façons en :

- ✓ Ajoutant un solvant organique
- ✓ Modifiant le pH par ajout d'acide
- ✓ Ajoutant un polymère (polyélectrolyte) inerte
- ✓ Augmentant la concentration saline à l'aide de sels en forte concentration (salting out)
- ✓ Ajoutant des sels métalliques

Ces méthodes de précipitation reposent sur des mécanismes d'action différents (Matulis, 2016; Polson *et al.*, 2003). Ainsi, l'ajout d'un solvant organique entraîne une diminution de la constante

diélectrique de l'eau dans le milieu ce qui diminue son pouvoir de solvatation favorisant ainsi les interactions électrostatiques entre les molécules de protéines et augmente l'attraction des molécules chargées entre elles qui engendre la précipitation. L'ajout d'acide génère une diminution du pH du milieu, or les protéines ne sont pas solubles sur l'ensemble de la gamme de pH. De plus, l'acide provoque la dénaturation des protéines qui engendre une désorganisation de la protéine en ramenant des groupements hydrophobes à la surface de la protéine. Celle-ci aura tendance à s'agréger et sera moins soluble ce qui entraînera sa précipitation. L'ajout d'une forte concentration de sels permet de diminuer la couche d'hydratation autour des protéines, les rendant moins solubles et plus sensibles aux interactions hydrophobes protéine-protéine et prônes à la précipitation. L'addition de sels métalliques, quant à elle, entraîne une modification du pI des protéines. Les cations métalliques sont alors en compétition avec les protons de la solution pour se lier avec les acides aminés de la protéine via les sites de coordination. Les protons sont alors déplacés des sites de coordination vers la solution provoquant une diminution du pH. La combinaison de ces deux phénomènes est à l'origine de la précipitation des protéines par des ions métalliques. Les polymères inertes agissent comme des déshydratants, qui limitent la couche d'hydratation des protéines, celles-ci ont alors tendance à s'agréger. Les agrégats présentent généralement une solvatation plus faible que les protéines individuelles ce qui entraîne leur précipitation.

Plusieurs systèmes ont donc été testés et sont rassemblés dans le Tableau V. Seuls les systèmes les plus courants et simples ont été étudiés, c'est-à-dire l'addition de solvant organique ou d'acide.

Tableau V : Techniques et conditions de précipitation des protéines du plasma réalisées

Technique de précipitation		Ratio (v:v) (solution : plasma)
Solvant organique	Acétonitrile (ACN)	(2,25 : 1)
	Ethanol (EtOH)	(3 : 1)
	Méthanol (MeOH)	(3 : 1)
Acide	Acide trichloroacétique (TCA) 10%	(2 : 1)
	Acide perchlorique (PA)	(0,05 : 1)

La précipitation des protéines par ajout de solvant organique, notamment le fractionnement éthanolique, est la méthode la plus classique. En effet, la procédure décrite par Cohn en 1946 (Cohn *et al.*, 1946) pour le fractionnement plasmatique est encore utilisée aujourd'hui par des laboratoires pharmaceutiques produisant, en particulier, des protéines thérapeutiques à partir de plasma. C'est le cas par exemple du Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB) qui produit de l'albumine sérique ou de l'antithrombine humaines à partir de fractionnement éthanolique (CNIMH, 1997). Il s'agit d'une méthode universelle et simple (Ashri & Abdel-Rehim, 2011) d'enrichissement de protéines de petite taille (<15 kDa) et avec une concentration suffisante (>100 ng/mL) (Ackermann & Berna, 2007). L'ApoC-III (9,5 kDa, 0,1-0,4 g/L) possède donc toutes les caractéristiques optimales pour être purifiée (soluble dans le surnageant) en précipitant les autres protéines interférentes du plasma.

Il est conseillé d'utiliser des ratios solvant :plasma de (1- 4):1 (v/v) (Ashri & Abdel-Rehim, 2011; Polson *et al.*, 2003). Seuls les ratios indiqués dans le Tableau V ont été testés et ils sont issus de différents articles qui ont cherché à éliminer des protéines de grosses tailles telles que l'albumine et les

IgG (Barton et al., 2010; G. Liu et al., 2014; Ouyang et al., 2012). Par exemple, le ratio utilisé pour l'acétonitrile (2,25 :1) a déjà démontré sa capacité à extraire l'ApoC-III à partir de plasma dans la littérature puisqu'elle a pu être détectée par SM après digestion trypsique du surnageant issu de la précipitation (Barton *et al.*, 2010).

Les techniques de précipitation ont tout d'abord été testées sur le standard commercial d'ApoC-III solubilisé dans un tampon 10mM de bicarbonate d'ammonium à pH 7,4 et les surnageants ainsi obtenus ont été analysés par ECZ-UV (Figure 66).

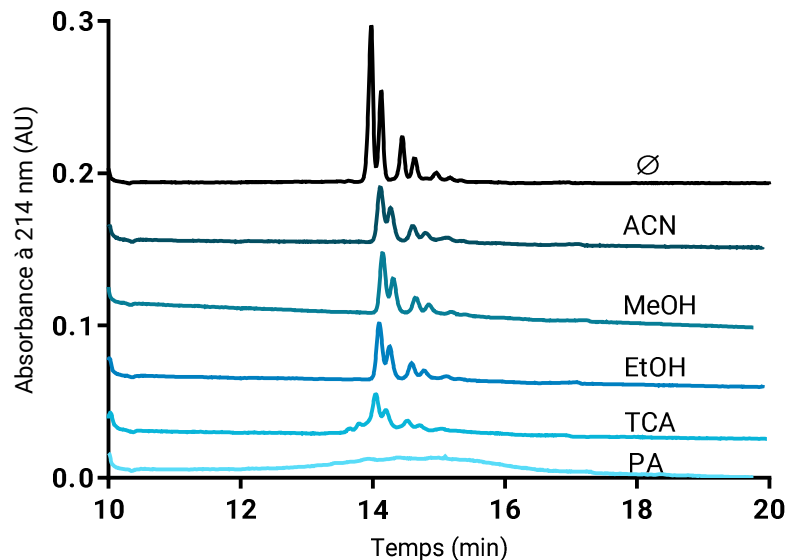


Figure 66 : Profils obtenus par ECZ-UV après traitement ou non (Ø) de l'ApoC-III standard (solubilisée dans 10mM de bicarbonate d'ammonium à pH 7,4) par différentes méthodes de précipitation effectuées avec les ratios présentés dans le Tableau V.

Les deux techniques (acide et solvant organique) montrent des différences très nettes. Il semble que les solvants organiques permettent de laisser l'ApoC-III soluble dans le surnageant et de l'extraire avec un rendement acceptable (~35,9%-38,3%). On note néanmoins une perte de résolution (R_s) assez importante entre les deux premiers pics ($R_s \sim 0,79-0,92$ contre 1,3 pour le standard non précipité). L'ApoC-III ne semble pas dégradée car les profils présentent toujours les six pics semblables à ceux présentés dans l'Article 1. Les solvants organiques (ACN, MeOH, EtOH) semblent donc compatibles avec l'extraction de l'ApoC-III aux ratios testés. Il ne semble donc pas nécessaire d'essayer plusieurs ratios pour ces solvants. Au contraire, les échantillons traités par des acides (TCA, PA) présentent des profils dégradés. Soit aucun pic d'ApoC-III n'est observé, soit des pics additionnels correspondant probablement à des formes dégradées sont présents. Les méthodes par précipitation par des acides ont donc été éliminées pour la suite des essais.

Les précipitations à l'aide de solvants organiques aux ratios précédents ont ensuite été réalisées sur le plasma (Figure 67A, B et C). Les résultats sont moins satisfaisants que ceux observés sur le standard. Lors de la comparaison des profils de plasma seul avec ceux obtenus par co-injection avec le standard, il semble que l'échantillon de plasma seul ne présente pas de pic dans la zone de migration où le standard commercial est observé lors de la co-injection (voir pics encadrés en violet). Cependant, un pic migrant vers 16min et des pics entre 12 et 14 min sont néanmoins présents sur l'ensemble des trois profils obtenus avec les différents solvants organiques pour le plasma seul. Ces nombreux pics de part et d'autre de la zone d'intérêt, correspondant à la zone de migration de l'ApoC-III standard, sont peut-être liés à la présence de complexes lipides-ApoC-III. En effet, comme vu précédemment, l'ApoC-III existe sous la forme de lipoprotéines dans le plasma. Ces complexes lipides-apolipoprotéine ont des

propriétés physicochimiques différentes de celles de l'ApoC-III libre et il est difficile de prédire leur mobilité électrophorétique par rapport à celle de l'ApoC-III libre, puisque ceux-ci présentent simultanément plus de charges et un volume hydrodynamique plus important. Les complexes peuvent donc migrer avant ou après le standard commercial. La précipitation des protéines étant une technique d'extraction non-spécifique, les pics observés peuvent aussi correspondre à d'autres protéines maintenues en solution lors de l'étape de précipitation avec les trois solvants testés. Il faut également noter que lors de la co-injection avec le standard, le pic vers 16 min disparaît des profils alors que ceux vers 17min apparaissent ainsi que les pics correspondant au standard. Suite à l'absence de pics dans la zone d'intérêt, de nouvelles conditions par ajout d'acide formique de 1 à 5% ont été essayées afin de modifier les solubilités des protéines du plasma. Il apparaît que l'ajout d'acide n'améliore pas l'extraction de l'ApoC-III car le profil est toujours similaire à celui observé sur la Figure 67C et aucun pic d'ApoC-III n'est détecté dans la zone d'intérêt.

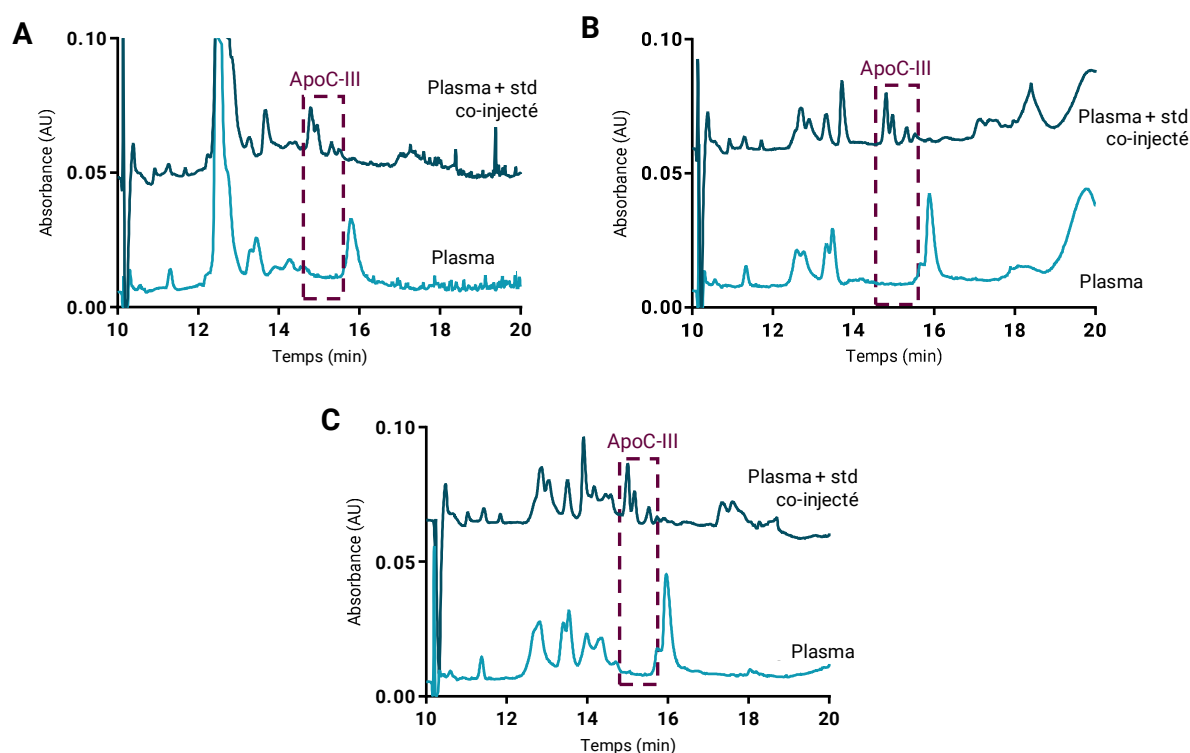


Figure 67 : Comparaison des profils d'ECZ-UV avec et sans co-injection du standard d'ApoC-III après précipitation par de l'éthanol (A), du méthanol (B) et de l'acétonitrile (C)

Le traitement par les solvants organiques (ACN, MeOH, EtOH) ne précipite pas l'ApoC-III standard libre puisque des pics sont détectés en ECZ mais aucun pic n'est détecté dans la zone de migration d'intérêt lors du traitement du plasma. Cette méthode a déjà démontré qu'elle permettait d'extraire l'ApoC-III du plasma lorsqu'elle est suivie d'une digestion trypsique et détectée par SM (Barton *et al.*, 2010). Toutefois, Barton *et al.*, ont probablement réussi à détecter l'ApoC-III après précipitation à l'acétonitrile car les méthodes employées (SM et digestion trypsique) peuvent rompre les interactions faibles entre lipides et protéines et donc libérer l'ApoC-III du complexe. La présence d'ApoC-III sous forme complexée explique peut-être pourquoi aucun pic n'est détecté dans la zone de migration de l'ApoC-III libre. Il faut donc essayer d'identifier les pics présents entre 12 et 14 min et à 16 min et essayer d'autres stratégies d'extraction plus spécifiques pour voir si ces pics sont toujours présents.

I.3.2.2. Extraction sur support solide (SPE)

L'extraction sur support solide (SPE) est la technique de prétraitement majoritairement employée lors de l'étude des glycoformes de l'ApoC-III issue de fluides biologiques pour le dépistage de pathologies, que ce soit pour des analyses en spectrométrie de masse MALDI-TOF ou en HPLC-SM (Jian et al., 2013; Yen-Nicolaÿ et al., 2015a). Il existe une méthode traitant un très faible volume d'échantillon (1 µL) mais la sensibilité de l'analyse par ECZ-UV nécessite de réaliser ce traitement sur un plus grand volume pour permettre la détection des glycoformes de l'ApoC-III. Un changement d'échelle a donc été réalisé à l'aide de colonnes de grand volume (1mL) pour permettre le dépôt de 100µL de plasma. Le volume de plasma introduit sur la colonne de SPE a été choisi pour respecter les proportions décrites dans la méthode sur ZipTip.

I.3.2.2.1. Optimisation de l'extraction de l'ApoC-III par SPE

Tout d'abord, les conditions de la littérature employant une élution avec 75% d'ACN sur une colonne SPE constituée d'une phase stationnaire C4 de 1mL ont été testées. Ces conditions ont montré un pic dans la zone de migration d'intérêt mais également beaucoup d'interférents qui causent une augmentation de la ligne de base. Ces conditions optimales pour une analyse en MALDI-TOF ne se révèlent pas très adaptées à l'analyse par ECZ. Afin d'extraire un minimum d'interférents, une optimisation de la solution d'élution de la procédure SPE a été réalisée. Tout d'abord, plusieurs éluions sur la même colonne avec des solutions contenant des quantités croissantes d'ACN (10, 30, 50, 75%) ont été réalisées sur un échantillon standard commercial d'ApoC-III. Après élution, les échantillons ont été analysés par la méthode d'ECZ-UV précédemment développée et ont montré que l'ApoC-III standard est presque entièrement éluée (~90%) dès l'utilisation d'une solution à 50% d'ACN et 0,1% TFA. Le même type d'élution a été réalisé sur le plasma (Figure 68). Les éluions avec 10%/30% et 75% ne présentent aucun pic dans la zone d'intérêt mais des pics interférents sont observés. Ainsi, comme observé pour le standard, l'ApoC-III du plasma semble presque entièrement éluée dès l'utilisation d'une phase composée à 50% d'ACN et 0,1% TFA, puisqu'il s'agit du profil présentant les pics les plus intenses dans la zone de migration de l'ApoC-III standard. Si l'élution la plus adaptée semble être celle obtenue par 50% d'ACN, ce profil présente également d'autres pics interférents ainsi qu'une ligne de base également perturbée entre 13 et 15min liée à la présence d'un grand nombre d'interférents. L'élution progressive ne semble donc pas efficace pour éliminer tous les interférents qui gênent la migration de l'ApoC-III lors de l'élution à 50% d'ACN.

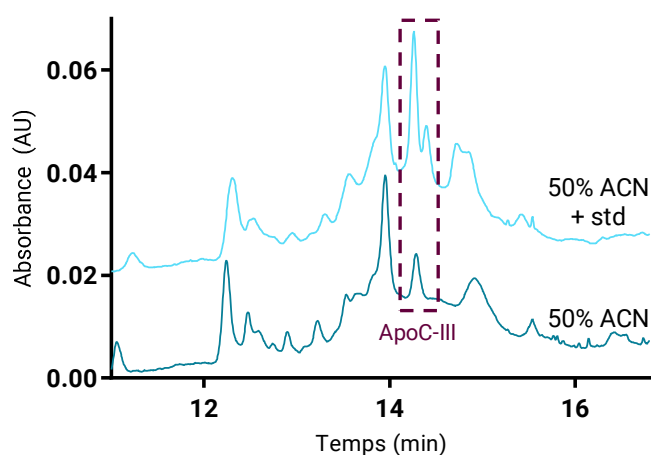


Figure 68 : Comparaison des profils obtenus par ECZ-UV après traitement par SPE du plasma avec élution progressive avec 50% d'ACN du plasma seul (A) et du plasma co-injecté avec le standard d'ApoC-III (0.2 mg/mL) (B) et après élution avec 75% d'ACN (C)

Afin de confirmer le choix d'une composition à 50% d'ACN pour l'élution de l'ApoC-III, une élution directe avec 50% et 75% d'ACN ont été réalisées (Figure 69). Les profils obtenus sont, comme attendus, assez similaires. Toutefois, l'élution à 75% présente plus d'interférents ce qui est logique puisque plus d'espèces sont éluées lorsque la quantité d'ACN est augmentée. Les deux profils présentent des pics d'ApoC-III libre dans la zone d'intérêt ce qui semble indiquer que l'ApoC-III est détectée sous sa forme libre (dans la zone d'intérêt) laissant présager que le complexe lipides-ApoC-III a peut-être été rompu par les conditions expérimentales employées (forte concentration en ACN et ajout de TFA). Pour les deux profils, de nombreux pics sont détectés également en dehors de la zone d'intérêt et correspondent à d'autres protéines interférentes éluées de la colonne de SPE. Certaines espèces interférentes sont également observées au niveau de la zone d'intérêt puisque les lignes de base augmentent (« bosse »). Pour confirmer la présence d'interférents, les fractions obtenues après les deux éluions ont également été analysées par SM MALDI-TOF qui a confirmé la présence d'ApoC-III sous ses trois glycoformes mais également celle d'interférents (ApoC-I et ApoC-II notamment) pour les deux compositions différentes (Figure 69B et C). Il semble donc que seule la glycoforme majoritaire est observée (monosialylée ApoC-III₁). La deuxième n'est pas visible à cause d'interférences dues aux autres protéines encore présentes dans l'extrait et qui co-migrent avec l'ApoC-III. Ceci s'explique par le fait que la SPE n'est pas une technique spécifique pour une protéine donnée mais plutôt d'une famille de protéines ayant des caractéristiques proches qui peuvent être éluées dans les mêmes conditions que l'ApoC-III.

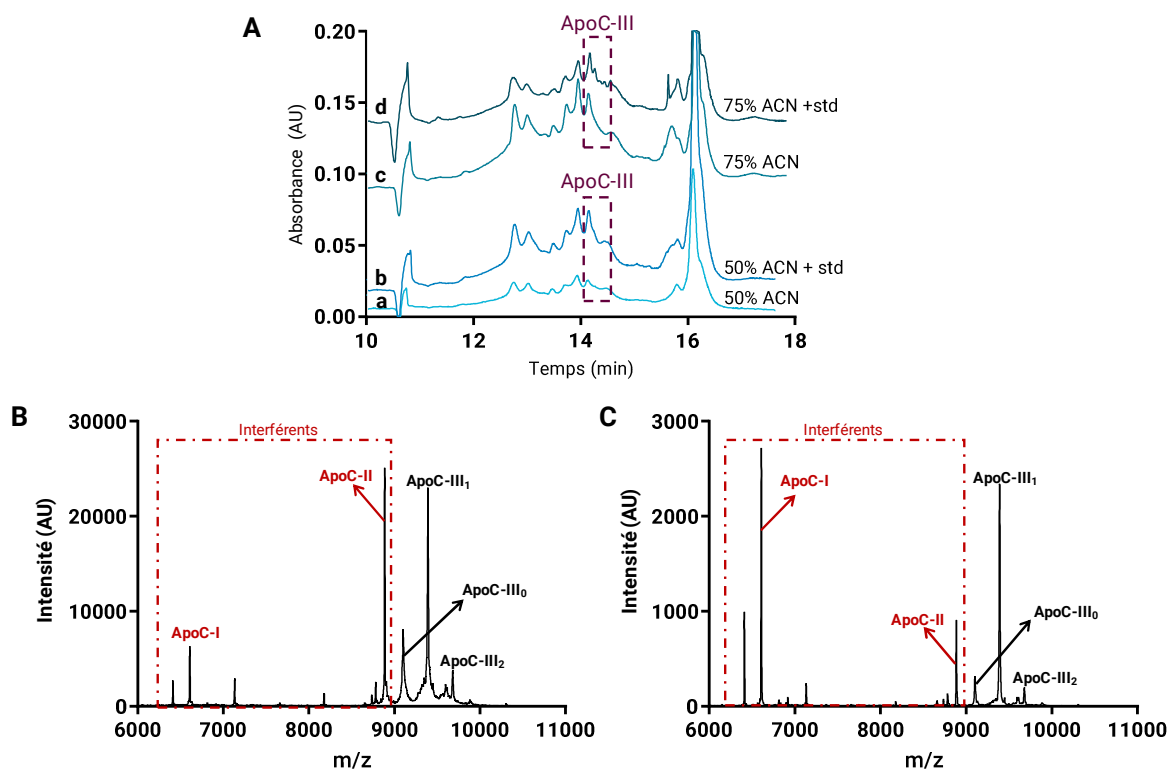


Figure 69 : Comparaison des profils obtenus pour des éluions directes de SPE du plasma avec 50% d'ACN (a) et 75% d'ACN (b) avec les co-injections respectives avec le standard d'ApoC-III (0.2 mg/mL) (c,d) (A) et profils obtenus par MALDI-TOF lors de l'élution avec 50% d'ACN (B) et 75% d'ACN (C)

Une diminution des interférents est nécessaire pour que la méthode d'ECZ permette de détecter toutes les glycoformes de l'ApoC-III. Afin d'essayer d'améliorer la détection de la deuxième glycoforme,

le profil présentant le moins d'interférents et la ligne de base la plus stable est sélectionné pour la suite des essais. Il s'agit du profil issu de l'élution avec 50% d'ACN.

1.3.2.2.2. Elimination supplémentaire des interférents par ultrafiltration

Afin d'éliminer davantage une partie des interférents subsistant dans l'échantillon après SPE, une ultrafiltration sur membrane a été réalisée en utilisant deux types de membranes (polyethersulfone et cellulose) deux seuils de coupure différents (10 et 30 kDa). Afin de tester l'efficacité du processus, la filtration a été réalisée en amont et en aval de la SPE pour éliminer les espèces ayant des masses supérieures à 10kDa, l'ApoC-III ayant une masse molaire d'environ 9,5 kDa. Les différents tests de filtration menés avant et après SPE ont montré que l'ApoC-III reste bloquée au-dessus du filtre même avec un seuil de coupure de 30 kDa. En effet, les filtrats et rétentats ont été analysés par SM MALDI-TOF et seuls les rétentats présentent des pics d'ApoC-III. Deux types de membranes ont été testées car une modification de la porosité des membranes en présence d'une forte concentration d'ACN a été suspectée. Ces supports n'ont pas la même compatibilité avec l'ACN, puisque la cellulose n'est compatible qu'avec 20% d'ACN, cependant les mêmes résultats ont été obtenus avec le polyethersulfone. L'absence de pics dans les filtrats est peut-être due à la présence du complexe lipide-ApoC-III non-dissocié dans les conditions d'élution de la SPE comme présumé. Sa taille dépasse alors largement le seuil de coupure et le complexe reste bloqué au-dessus de la membrane. Cela signifie que le complexe serait détecté à un autre temps de migration que la zone d'intérêt en ECZ-UV après SPE. Une autre hypothèse serait que la protéine s'agrège lors de la centrifugation, formant des espèces de plus haut poids moléculaire qui sont retenues par la membrane. La filtration n'est donc pas un moyen efficace pour éliminer une partie des interférents encore présents après SPE tout en conservant l'ApoC-III.

La SPE est en général une technique suffisamment efficace pour le traitement d'échantillons biologiques. C'est le cas également pour l'ApoC-III, mais seule une méthode d'analyse en SM permet de confirmer la présence d'ApoC-III en rompant les interactions faibles du complexe (liaisons hydrophobes, hydrogènes et de type Van der Waals) (S. B. Harvey et al., 2009; Wada et al., 2012; Yen-Nicolaÿ et al., 2015a). En revanche, la méthode d'ECZ pas les interactions le complexe lipides-ApoC-III est limitée par la présence potentielle du complexe qui aura une mobilité différente de celle de l'ApoC-III libre. Une autre méthode d'extraction plus spécifique à l'ApoC-III s'avère donc nécessaire pour extraire de manière fiable l'ApoC-III tout en minimisant les interférents. L'emploi d'une méthode plus sélective, d'immunodéplétion, a été envisagée pour limiter la présence d'interférents pour la suite des essais.

1.3.2.3. Immunocapture sur billes magnétiques

Certaines extractions sur support solide peuvent être spécifiques grâce à des interactions fortes entre les composés cibles et le support solide. L'immunoextraction est une technique parmi d'autres puisque différents types d'interactions peuvent intervenir pour extraire des molécules spécifiquement via l'affinité de phosphopeptides pour des ions métalliques, de glycoprotéines pour les lectines ou encore de la reconnaissance biotine-streptavidine. L'immobilisation de l'anticorps à la surface des supports solides peut être réalisée soit via une biomolécule déjà immobilisée sur le support et ayant une interaction biospécifique (biotine-streptavidine par exemple) soit par liaison covalente à l'aide d'une fonction chimique présente à la surface du support (Figure 70)(Le Nel, 2008). Lorsque l'anticorps se lie de manière covalente grâce aux fonctions NH₂ ou COOH présentes à sa surface que ce soit sur ses fragments Fab ou Fc, l'immobilisation est alors dite aléatoire. L'accès des antigènes aux sites de

reconnaissance peut alors être limitée, diminuant l'activité du support. Les liaisons covalentes peuvent également permettre une immobilisation orientée via le fragment Fc qui offre une meilleure activité du support ainsi fonctionnalisé. Les supports solides développés pour l'application de l'immunoextraction sont généralement à base de monolithes ou de particules magnétiques.

Contrairement aux deux méthodes d'extraction précédemment utilisées, l'immuno-capture mettant en jeu l'emploi d'anticorps dirigés contre l'ApoC-III permet son extraction spécifique tout en limitant la présence d'interférents aussi bien de nature protéique que des petites molécules présentes dans les liquides biologiques. En effet, l'affinité d'un anticorps pour son antigène est très élevée ($K_a=10^8-10^{11} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$).

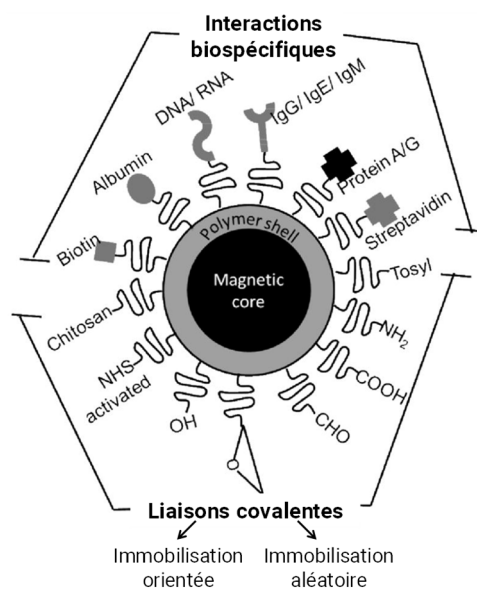


Figure 70 : Groupes fonctionnels ou biomolécules présentes à la surface de billes magnétiques commerciales d'après (Mani et al., 2011)

Nous avons ainsi développé une méthode d'immuno-capture sur billes magnétiques de l'ApoC-III en utilisant des anticorps polyclonaux anti-ApoC-III. Les billes magnétiques constituent un excellent support pour l'immunoaffinité grâce à la grande facilité pour changer les fonctions à leur surface, leurs propriétés magnétiques, leur petite taille (1nm - 5µm), leur grande surface spécifique et leur biocompatibilité (Schneck *et al.*, 2015). Aucune immuno-capture de l'ApoC-III sur billes magnétiques n'a été décrite dans la littérature. Cependant Trenchevska *et al.*, ont développé une méthode d'immuno-capture sur micro-colonnes monolithiques en format ZipTip, associée à la spectrométrie de masse (MSIA) pour quantifier les différentes protéoformes de l'ApoC-III par MALDI-TOF (Trenchevska *et al.*, 2015).

Tous les anticorps employés dans cette étude sont des anticorps polyclonaux (pAb) qui reconnaissent plusieurs épitopes sur le même antigène. En effet, aucun anticorps monoclonal (mAb) dirigé contre l'ApoC-III n'existe commercialement. Les pAb utilisés dans cette étude sont tous commerciaux et ont déjà montré une reconnaissance efficace de l'ApoC-III dans la littérature (Trenchevska et al., 2015; Yen-Nicolaÿ et al., 2015a).

Le point de départ des différentes optimisations menées pour les différents types de billes testés, a été le protocole préconisé par les fournisseurs. L'emploi de BSA comme agent bloquant, s'adsorbant

sur les zones non-greffées des billes afin de limiter les adsorptions non-spécifiques est conseillé dans les différents protocoles. Plusieurs paramètres ont été optimisés comme la fonction chimique (COOH, tosyl) ou la biomolécule (streptavidine) présente à la surface des billes, le rapport billes/anticorps, la durée de capture et le mode d'éluion.

Chaque échantillon obtenu après immunocapture est analysé par la méthode d'ECZ-UV.

1.3.2.3.1. Billes fonctionnalisées par des groupements tosyl

Les billes magnétiques tosylées, couramment employées pour l'immunoprécipitation de protéines, ont été testées. Le pAb anti-ApoC-III est immobilisé aléatoirement par liaison covalente par ses fonctions NH₂ aux groupements tosyl présents à la surface des billes magnétiques (Figure 71). Ce type de liaison met en jeu des forces de cohésion importantes, la rendant très stable.

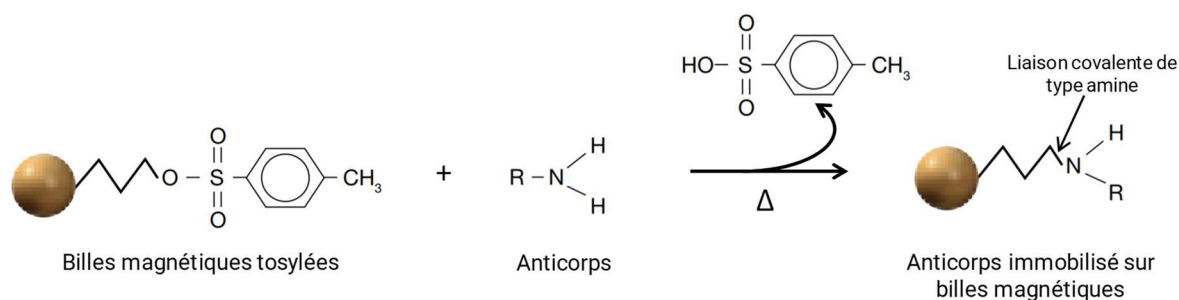


Figure 71 : Réaction d'immobilisation des anticorps à la surface des billes magnétiques tosylées

1.3.2.3.1.a. Efficacité de l'immobilisation des pAbs anti-ApoC-III et de l'immunocapture de l'ApoC-III standard

Afin de vérifier l'efficacité de l'immunocapture, la procédure a tout d'abord été appliquée à un échantillon d'ApoC-III standard. Après 4h de capture et une éluion thermique sur des billes anti-ApoC-III (1µg pour 5µL de billes), 4 pics sont observés et la comparaison avec le signal obtenu pour le standard sans traitement, permet de calculer un rendement de capture du standard qui est d'environ 33% (concentration attendue, $C_{attendue} = 0,5 \text{ mg/mL}$) (Figure 72). Ce premier résultat permet de confirmer que l'immobilisation du pAb anti-ApoC-III via une liaison covalente sur des billes tosylées a été efficace, que le pAb immobilisé reconnaît bien l'ApoC-III standard et que l'éluion thermique semblent fonctionner. Ce premier protocole donne des résultats encourageants. Néanmoins, la forte concentration de billes employées ($C_{billes} = 16,5 \text{ mg/mL}$) a été ajustée pour la suite des essais pour limiter la consommation d'anticorps et donc le coût mais surtout pour limiter les phénomènes d'agrégation des billes qui diminuent l'efficacité de capture.

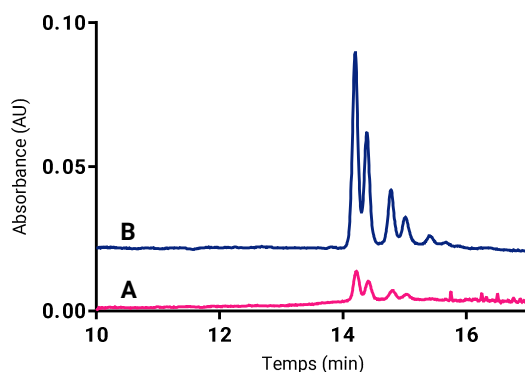


Figure 72 : Profils ECZ obtenus pour l'ApoC-III standard ($C_{attendue} = 0,5 \text{ mg/mL}$) après 4h d'immunocapture sur billes tosylées greffées anti-ApoC-III (A) et ApoC-III standard sans traitement (1 mg/mL) (B) avec $C_{billes} = 16,5 \text{ mg/mL}$.

Afin de voir l'influence de l'anticorps sur le rendement de capture, deux pAbs déjà utilisés dans la littérature (Trenchevska et al., 2015; Yen-Nicolaÿ et al., 2015a) ont été comparés (Figure 73). Le pAb fourni par Interchim est issu du lapin tandis que celui acheté chez Gentaur est produit chez la chèvre. Les deux pAbs permettent d'obtenir des rendements similaires pour l'immuno-capture de l'ApoC-III standard (33% et 37% respectivement) et semblent donc tous deux utilisables indifféremment.

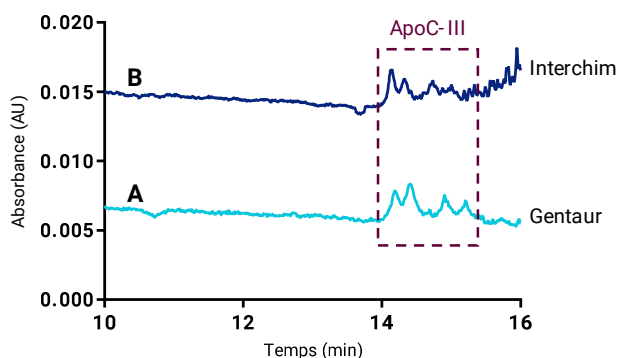


Figure 73 : Comparaison des profils ECZ obtenus pour la capture de l'ApoC-III standard par immobilisation d'un pAb acheté chez Interchim (A) et chez Gentaur (B) avec $C_{billes}=3,3$ mg/mL

1.3.2.3.1.b. Comparaison et choix de la méthode d'élution

Dans un objectif d'augmenter le rendement de l'immuno-capture de plasma implémenté d'ApoC-III standard, plusieurs méthodes d'élution ont été comparées en utilisant des billes fonctionnalisées avec le pAb de Gentaur. La méthode d'élution employée doit permettre de rompre les liaisons non-covalentes anticorps-antigène. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux observés pour la première méthode testée lors des développements précédents, à savoir l'élution thermique. Celle-ci a déjà montré son efficacité dans la littérature pour l'élution de peptides A β (Mai *et al.*, 2015) et semble également efficace pour éluer l'ApoC-III.

D'autres méthodes employant des pH extrêmes (pH 2,5 et 10) n'ont pas permis la détection d'ApoC-III puisque qu'aucun pic d'ApoC-III standard n'a pu être observé en ECZ après ces élu-tions. Ceci n'est peut-être pas directement lié à un problème d'élution inefficace mais peut-être dû à une dénaturation ou précipitation de l'ApoC-III lors d'un contact avec des pH extrêmes. De plus, la présence de tampons d'échantillon à des pH extrêmes peut aussi gêner la migration en ECZ en créant un phénomène de « destacking » qui peut empêcher la détection des pics. D'autres élu-tions, à l'aide de solution dénaturante contenant de l'urée ou de force ionique élevée ou encore à l'aide de chlorure de lithium n'ont pas donné de meilleur résultat puisqu'aucun pic d'ApoC-III standard n'a pu être détecté par ECZ.

L'élution thermique semble donc être la seule méthode efficace et compatible avec une analyse en ECZ. De plus, elle présente l'avantage du choix du tampon d'élution. Le tampon de dissolution de l'ApoC-III standard (10 mM de bicarbonate d'ammonium pH 7,4) a donc été choisi comme tampon d'élution de référence.

1.3.2.3.1.c. Mise en évidence de la spécificité de l'immuno-capture de l'ApoC-III dans le plasma

Les essais suivants ont porté sur l'extraction de l'ApoC-III du plasma dilué deux fois dans du PBS implémenté ou non avec de l'ApoC-III standard avec une concentration de billes plus faible ($C_{billes}=3,3$ mg/mL) pour estimer l'impact éventuel de la matrice du plasma sur la reconnaissance du standard par

le pAb (Figure 74). Pour le plasma, après 4h de capture un pic de faible intensité est détecté vers 14 min dans la même zone de migration que le standard. Cependant, le profil CZE présente beaucoup de bruit de fond et d'interférences avec notamment des pics vers 12 min. La ligne de base est également très perturbée après 13min (bosse), laissant suggérer la présence de nombreux interférents co-migrant dans cette zone et empêchant la détection de la deuxième glycoforme de plus faible abondance que celle détectée. Le profil obtenu pour le plasma contenant de l'ApoC-III standard montre des pics vers 12min ainsi que des pics migrant juste après 14min comme prévu et correspondant aux glycoformes de l'ApoC-III standard. La présence de pics vers 12min est surprenante puisqu'il s'agit des pics les plus intenses. La nature des espèces migrant ici est donc inconnue. Celles-ci pourraient peut-être correspondre aux lipoprotéines (complexes lipides-ApoC-III) puisque leur rupture n'est pas réalisée avant incubation du plasma avec les billes greffées avec le pAb. Le profil ECZ du plasma implémenté d'ApoC-III standard présente des pics avec des aires plus faibles que celles obtenues pour le standard seul (Figure 72). Il semble donc que des effets de matrice engendrent une perte d'efficacité de la capture. Il n'est donc pas possible d'estimer le rendement de capture de l'ApoC-III dans le plasma.

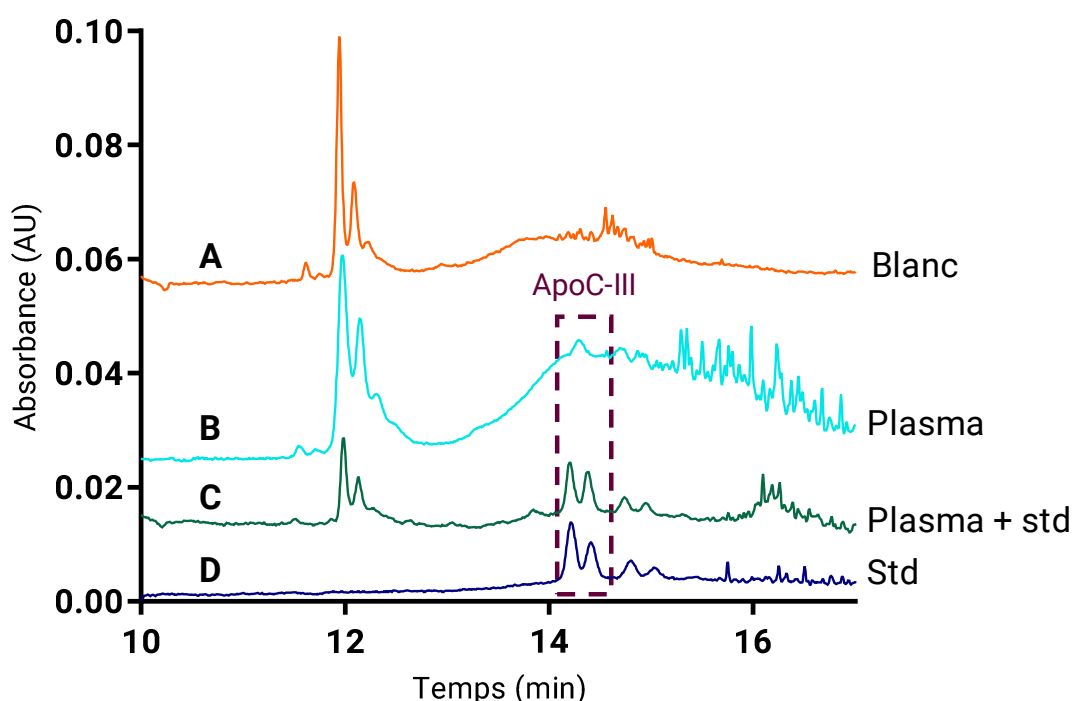


Figure 74 : Comparaison des profils ECZ obtenus pour le blanc d'immunocapture (A) et après 4h d'immunocapture du plasma (B), du plasma implémenté d'ApoC-III standard (C) et d'ApoC-III standard (D) avec $c_{billes}=3,3 \text{ mg/mL}$

Afin de contrôler cette étape, un blanc d'immunocapture consistant à utiliser des billes tosylées sans anticorps greffés à leur surface en contact avec du plasma et subissant la procédure complète d'extraction de l'ApoC-III a été analysé (Figure 74A). Le profil ainsi obtenu présente des pics vers 12 min identiques à ceux observés pour la capture de l'ApoC-III dans le plasma ainsi qu'une ligne de base qui présente une bosse à partir de 13 min. Ces pics étant absents du profil obtenu pour l'ApoC-III standard (Figure 74D) et ne peuvent donc pas provenir des billes elles-mêmes. Ce résultat suggère que les pics présents vers 12 min sont liés à de l'adsorption non-spécifique sur les billes par des espèces présentes dans le plasma. La comparaison des deux profils souligne la très grande importance des interférents sur le profil observé pour le plasma seul malgré l'emploi de BSA après immobilisation de l'anticorps, pendant la capture et les lavages. La grande proportion de capture non-spécifique gêne la détection des espèces d'intérêt.

Afin de s'assurer de la présence ou non d'espèces capturées de manière non-spécifique du plasma, des billes commerciales greffées avec des anticorps polyclonaux de mouton dirigés contre les IgG de souris et non-spécifiques du plasma humain ont été testées. Deux zones sont à nouveau observées en ECZ comme avec les billes-anti-ApoC-III (Figure 75A). Des pics vers 12 min sont encore présents avec cependant une intensité beaucoup plus faible. Dans la seconde zone entre 14 et 16 min, un pic très large de 2 min est observé. Ces billes-anti-IgG de souris montrent la migration de nombreuses espèces dans cette zone du profil. L'emploi de ces billes semble indiquer que ces pics proviennent en partie d'une capture non-spécifique confirmant ainsi la présence d'espèces capturées de façon non-spécifique lors de l'utilisation des billes tosylées-anti-ApoC-III et donc le bruit de fond observé malgré l'emploi de BSA lors du traitement du plasma. La BSA est en effet supposée recouvrir les sites où aucun anticorps n'a été greffé pour limiter l'adsorption non-spécifique d'espèces à la surface des billes.

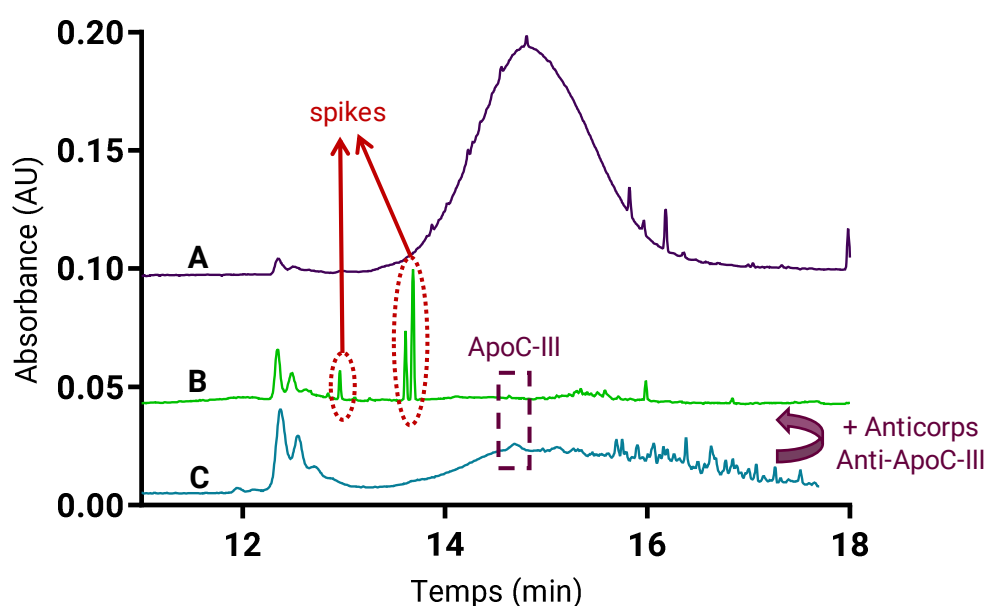


Figure 75 : Comparaison de profils ECZ obtenus après la procédure d'immunocapture du plasma avec des billes-anti-IgG de souris $c_{billes}=0,5 \text{ mg/mL}$ (A) ou des billes-anti-ApoC-III avec $c_{billes}=3,3 \text{ mg/mL}$ avec ajout d'anticorps anti-ApoC-III (B) et sans ajout (C)

Une deuxième stratégie a été employée pour vérifier si les différents pics observés vers 12 min sont liés à la présence de l'ApoC-III. Ainsi, un échantillon de plasma a été analysé après incubation avec le pAb anti-ApoC-III en solution (Figure 75B). Cette analyse montre la présence de nombreux spikes (pics présents à toutes les longueurs d'onde), traduisant probablement la précipitation d'espèces présentes dans le milieu, comme par exemple les complexes anticorps-antigène formés suite à l'ajout du pAb anti-ApoC-III dans l'échantillon.

Le profil ECZ est fortement modifié et le bruit de fond a fortement diminué. La zone de migration de l'ApoC-III standard (forme libre) entre 14 et 16 min ne présente plus de pic, confirmant ainsi la présence initiale d'ApoC-III issue du plasma dans cette zone. En effet, l'ApoC-III a probablement formé un complexe avec son anticorps lors de son incubation avec le plasma, qui possède une μep différente de celle de l'ApoC-III seule. La deuxième zone modifiée correspond aux pics migrant vers 12 min, dont l'intensité est largement diminuée après incubation avec l'anticorps. Ceci ne pouvant pas être expliqué

uniquement par le faible facteur de dilution employé (1,22), l'ApoC-III est probablement présente sous ces pics, sous la forme de complexes lipides-ApoC-III, même si ces pics proviennent essentiellement d'une adsorption non-spécifique d'espèces sur les billes.

Afin de diminuer la capture non-spécifique et d'interférents lors des analyses en ECZ, des lavages plus efficaces sont nécessaires. L'emploi de détergents non-ioniques tels que le Tween-20 ou le Triton X-100 à des concentrations entre 0,001 et 0,1% lors des étapes de capture et de lavage des billes permet de limiter les adsorptions non-spécifiques à leur surface. Lors de l'ajout de 0,1% de Tween-20 pendant la capture avec les billes tosylées anti-ApoC-III, les pics après 12min sont encore présents alors que le bruit de fond a été éliminé entre 14 et 16min. Malheureusement, l'élimination de la capture non-spécifique s'est faite au détriment de la capture spécifique d'ApoC-III puisque plus aucun pic n'est détecté après 14min. Deux autres essais avec des concentrations de 0.05% et 0.01% de Tween-20 ont donné des résultats similaires. L'utilisation de Tween-20 semble donc particulièrement limitant pour l'extraction d'ApoC-III et n'a pas été employé pour le reste des essais.

I.3.2.3.1.d. Amélioration du signal de l'ApoC-III issue du plasma

Afin de diminuer les effets de matrice qui génèrent de nombreuses interférences en ECZ et modifient l'aspect de la ligne de base (bosse), le plasma a été dilué par un facteur plus important (5 et 10) que le facteur 2 employé jusque-là. La stabilisation de la ligne de base est, en effet, indispensable pour réussir à détecter la deuxième glycoforme minoritaire qui migre potentiellement en même temps que des interférents. Les analyses en ECZ ont montré qu'aucun pic n'était détecté dans la zone de migration de l'ApoC-III standard (vers 14min). Néanmoins, une stabilisation de la ligne de base a été observée puisque que la bosse est beaucoup plus faible que lors d'une dilution par un facteur 2. La plus forte dilution diminue donc les effets de matrice générés par le plasma ce qui pourrait permettre la détection de la deuxième glycoforme de l'ApoC-III. Une amélioration de l'étape de capture semble cependant être indispensable pour réussir à détecter les deux glycoformes de l'ApoC-III dans le plasma.

Afin d'augmenter le rendement de capture en conservant une dilution d'un facteur 5 ou 10, une augmentation de la quantité d'anticorps greffés sur les billes d'un facteur 3 et 5 a été réalisée (3µg ou 5µg pour 5µL de billes) (Figure 76). Il apparaît que le profil obtenu par une dilution d'un facteur 5 présente encore beaucoup de bruit de fond et une ligne de base perturbée tandis que le profil dilué par 10 présente une ligne de base très stable. La plus grande dilution du plasma et l'augmentation de la quantité d'anticorps semblent bénéfiques pour la stabilisation de la ligne de base et les essais suivants ont été réalisés à partir d'une dilution au dixième du plasma. Ces résultats sont encourageants même si, malheureusement, un seul pic d'ApoC-III semble être détecté dans le plasma seul suggérant que la deuxième glycoforme n'est toujours pas détectée dans ces conditions. Dans le but de gagner encore plus en sensibilité, la quantité d'anticorps greffés aux billes a encore été augmentée (5µg pour 5µL de billes). Lors de cette augmentation de la quantité d'anticorps, il apparaît que le gain en sensibilité n'augmente plus puisque les mêmes profils sont obtenus qu'avec 3µg d'anticorps. Ceci est probablement dû à une plus grande viscosité du milieu quand la quantité en anticorps augmente trop qui provoque peut-être des phénomènes d'agrégation des anticorps qui ne peuvent alors plus être immobilisés sur les billes. La meilleure sensibilité est obtenue pour les billes greffées par 3µg d'anticorps pour 5µL de billes.

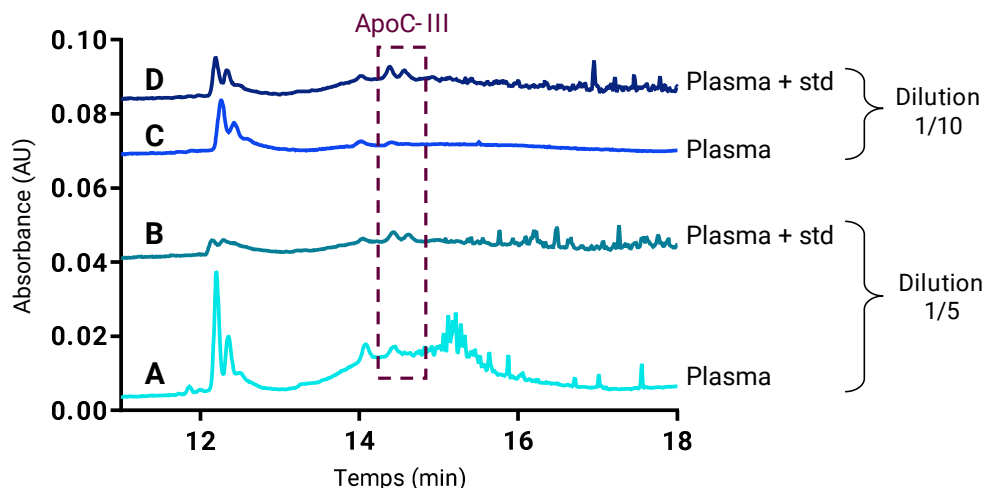


Figure 76 : Comparaison des profils obtenus lors de la capture du plasma dilué par 5 seul (A) et en présence de d'ApoC-III standard (B) ou de plasma dilué par 10 seul (C) et en présence d'ApoC-III standard (D)

Afin de limiter l'adsorption d'espèces non-spécifiques sur les billes magnétiques et ainsi peut-être réussir à détecter la deuxième glycoforme de l'ApoC-III dans le plasma, d'autres billes présentant une fonctionnalisation différente ont été testées.

1.3.2.3.2. Billes fonctionnalisées par des acides carboxyliques

Deux types de billes, de dimension et nature différentes, fonctionnalisées par des acides carboxyliques ont été testées, les billes MyOne (1µm) et les billes poreuses MagReSyn (5-10µm). Ces billes permettent également une immobilisation aélatoire via une liaison covalente entre les fonctions carboxyliques présentes sur les billes et les fonctions amines des anticorps (Figure 77). La réaction est activée en présence d'EDC et de S-NHS qui stabilise l'intermédiaire ester-NHS réactif.

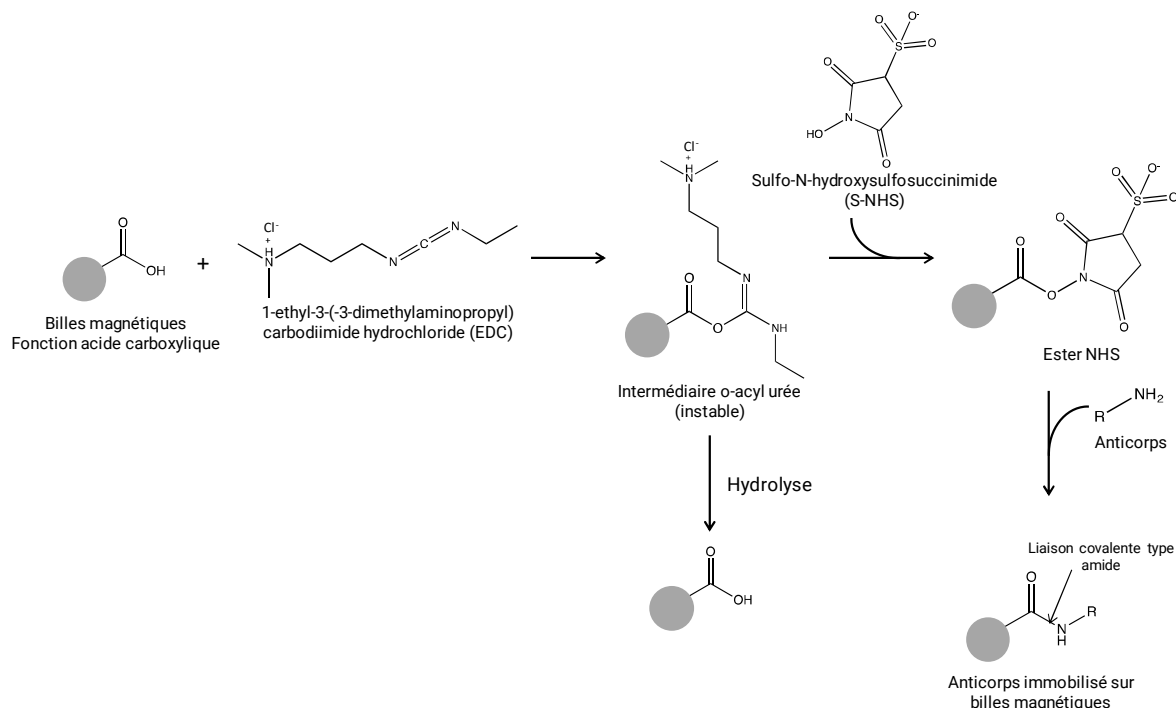


Figure 77 : Mécanisme d'immobilisation des anticorps sur les billes COOH à l'aide des fonctions EDC et S-NHS

En premier lieu, les billes avec le diamètre le plus faible et donc la plus grande surface spécifique ont été testées. La quantité d'anticorps ainsi que le temps d'incubation ont été optimisés. La quantité d'anticorps a été modifiée entre 2 et 15 µg pour 50 µL de billes (500 µg), avec une capture pendant 6h n'a pas permis d'extraire l'ApoC-III standard alors que le ratio billes:anticorps a dépassé celui recommandé par le fournisseur (10 µL d'anticorps à 1 mg/mL pour 50 µL de billes). Les temps de capture (6, 12 et 24h) ont été optimisés. Il apparaît que, quelles que soient les conditions employées, les billes avec des fonctions acides carboxyliques ne permettent pas une immobilisation des anticorps polyclonaux anti-ApoC-III suffisante. Plusieurs hypothèses sont suspectées. Soit la quantité d'anticorps immobilisé est suffisante mais comme l'immobilisation mise en œuvre étant non-orientée (effectuée à partir des amines NH₂ des chaînes de l'anticorps), la capture peut être limitée à cause de gênes stériques. Soit l'intermédiaire instable formé à partir des acides carboxyliques et l'EDC est hydrolysé trop rapidement ce qui empêche l'anticorps de s'immobiliser, soit l'EDC est dégradé et ne permet pas de former cet intermédiaire (Thermo Fisher Scientific, n.d.)(Figure 77). Toutes les précautions ont été prises pour favoriser la formation de l'intermédiaire o-acyl urée puisque la solution d'EDC a été systématiquement préparée fraîchement avant chaque immobilisation. Néanmoins, il semblerait que l'introduction des réactifs EDC et S-NHS en même temps que les anticorps avant incubation, comme cela a été réalisé dans cette étude, entraîne une très faible densité de greffage. L'incubation de l'anticorps seul, suivie par l'ajout des réactifs dans un deuxième temps permet d'augmenter cette densité de greffage d'un facteur 7. Cette différence d'efficacité d'immobilisation des anticorps vient sans doute d'une modification de l'état de surface des billes et des répulsions électrostatiques qui empêchent probablement les anticorps de s'approcher des fonctions réactives COOH lorsque les réactifs sont ajoutés trop tôt (Le Nel, 2008). Ce type de couplage n'est donc pas optimal pour réaliser l'immunocapture de l'ApoC-III.

Un autre type de billes fonctionnalisées par des fonctions carboxyliques, les MagReSyn ont été testées. Les billes MagReSyn sont constituées d'une matrice polymérique avec une très grande porosité permettant à l'échantillon de pénétrer dans la microparticule. Cette particularité permet d'augmenter la surface de greffage et d'augmenter ainsi la capacité de capture (≥ 20 mg/mL de BSA). L'essai d'extraction de l'ApoC-III dans le plasma est infructueux puisqu'aucun pic d'ApoC-III n'est détecté par ECZ dans la zone d'intérêt de l'ApoC-III libre. Les mêmes causes que précédemment citées sont probablement responsables ici aussi du mauvais rendement de capture, notamment le problème d'immobilisation de l'anticorps.

1.3.2.3.3. Billes fonctionnalisées par la streptavidine

Nous avons voulu tester les billes streptavidine MagReSyn présentant une capacité de capture de ~ 300 µg/mg d'anticorps biotinylé. Ces billes ont été mises sur le marché récemment et très peu d'applications ont été réalisées (Vilakazi *et al.*, 2017), le fournisseur nous a donné un échantillon de ces billes pour faire un essai.

La capture de l'ApoC-III dans le plasma a donc été réalisée une seule fois pendant 4h à 25°C en utilisant 3 µg d'anticorps par µL de billes (ratio conseillé par le fournisseur). L'élution a été réalisée par chauffage. Cependant, aucun pic d'ApoC-III n'a pu être détecté au cours de l'analyse par ECZ. La réaction d'immobilisation entre la streptavidine et l'anticorps biotinylé reposant sur une interaction biospécifique avec une constante d'affinité très élevée (ordre de 10¹⁵ mol⁻¹.L), l'immobilisation de l'anticorps est rapide et très efficace. Le défaut de capture ne peut donc pas venir d'un couplage défectueux. Le faible rendement de capture vient peut-être d'une mauvaise reconnaissance de l'ApoC-III par le pAb biotinylé utilisé. L'anticorps est fourni directement sous forme biotinylée, la

fonctionnalisation de cet anticorps ne peut pas être mise en cause. L'anticorps biotinylé n'a été utilisé que pour cet essai de billes streptavidine, aucun autre essai n'a été réalisé pour vérifier l'efficacité de la reconnaissance. D'ailleurs, cet anticorps ne semble pas avoir été utilisé dans la littérature. Une autre hypothèse est peut-être l'inefficacité de la méthode d'élution réalisée par chauffage à 95°C pour cet anticorps. L'utilisation de ces billes nécessiterait quelques optimisations et ne s'est pas avérée efficace dans les conditions employées.

Plusieurs méthodes d'extraction de l'ApoC-III du plasma, présentant des mécanismes d'enrichissement différents, ont été testées. La première stratégie a été l'emploi de techniques de précipitation des protéines non-spécifiques à l'ApoC-III. Si les premiers résultats ont été concluants sur l'ApoC-III standard avec un rendement de l'ordre de 35% lors de l'ajout de solvants organiques (ACN, MeOH, EtOH), la procédure s'est avérée inefficace sur le plasma puisqu'aucun pic n'a été détecté en ECZ dans la même zone de migration que l'ApoC-III standard. L'hypothèse suggérée par ces résultats a été que l'ApoC-III du plasma présente sous la forme de complexes lipides-ApoC-III était précipitée ou migrait à des temps différents.

La deuxième méthode mise en place est plus spécifique, il s'agit de la SPE. Celle-ci a été adaptée de la procédure en ZipTip C4 pour l'ApoC-III de la littérature (Yen-Nicolaÿ et al., 2015a). Les essais ont montré la présence très importante d'interférents qui limitent la détection de l'ApoC-III à une seule de ses glycoformes.

La dernière stratégie employée a reposé sur l'immunocapture spécifique de l'ApoC-III sur billes magnétiques fonctionnalisées par des pAbs anti-ApoC-III. Plusieurs types de billes fonctionnalisées (COOH, streptavidine et tosylées) ont été testées. Si les billes COOH et streptavidine ne se sont pas avérées concluantes pour l'extraction de l'ApoC-III du plasma, les billes tosylées ont permis de détecter par ECZ la glycoforme majoritaire sous forme libre. Les tests réalisés ont permis d'obtenir des conditions optimisées pour l'extraction de l'ApoC-III. Les optimisations menées pour diminuer les effets de matrice ainsi que les interactions non-spécifiques n'ont pas suffi pour détecter la seconde glycoforme moins abondante qui est probablement gênée par la présence de nombreux interférents. Ainsi, parmi les méthodes testées, la SPE et l'immunocapture ont permis l'extraction de la glycoforme majoritaire de l'ApoC-III (ApoC-III₁) du plasma dans la zone de migration de l'ApoC-III libre. Les autres pics présents sur les profils obtenus par ces deux méthodes semblent dus majoritairement à la présence d'espèces adsorbées de manière non-spécifique ainsi qu'à l'ApoC-III présente sous forme complexée avec les lipides. Il apparaît essentiel qu'une étape additionnelle permettant d'augmenter la sensibilité soit envisagée pour atteindre l'objectif fixé.

I.3.2.4. Amélioration de la sensibilité de la méthode d'ECZ

De toutes les méthodes d'extraction de l'ApoC-III comparées, l'immunocapture est la technique la plus intéressante car le profil présente le moins d'interférents. Néanmoins, comme vu précédemment, une seule glycoforme est détectée après traitement du plasma. Seule une amélioration de la sensibilité de la méthode pourrait permettre la détection des deux glycoformes attendues. Pour cela, plusieurs stratégies ont été étudiées, que ce soit l'élimination des sels, des méthodes de préconcentration électrocinétiques ou encore la dérivation de la chaîne polypeptidique des glycoformes par un fluorophore.

1.3.2.4.1. Elimination des sels

Afin de diminuer l'influence des sels provenant du plasma et peut-être encore présents dans l'échantillon après immunocapture, l'échantillon a été dilué deux fois dans le tampon échantillon. Cela peut permettre d'injecter un plus grand volume d'échantillon dans le capillaire (2-3% au lieu de 1%). Malheureusement, la dilution n'a pas amélioré la sensibilité du profil ECZ puisqu'aucun pic n'est détecté dans la zone d'intérêt lorsqu'une injection classique est effectuée et des pics larges, entraînant une perte de résolution, sont observés lorsque le volume injecté est augmenté. La filtration sur membrane (3 kDa) a été investiguée comme une autre méthode pour retirer les sels éventuellement présents mais le profil reste inchangé. L'élimination des sels ne semble donc pas adéquate pour améliorer la sensibilité avec notre méthode d'ECZ.

1.3.2.4.2. Méthodes de préconcentration électrocinétique

En ECZ, le volume d'échantillon injecté ne doit pas généralement dépasser 1 à 3% du volume du capillaire afin d'obtenir une bonne efficacité de séparation. Cependant les techniques de préconcentration permettent de surmonter cette limite (Breadmore *et al.*, 2017; Šlampová *et al.*, 2017). Afin de pouvoir détecter l'ensemble des glycoformes de l'ApoC-III dans le plasma, des méthodes de préconcentration électrocinétique « on-line » avant séparation ont été envisagées. Dans cette partie, seules des techniques dites dynamiques, basées sur les différences de vitesse des analytes, ont été mises en œuvre. Les méthodes ont été choisies pour leur compatibilité avec la méthode ECZ déjà développée. Les deux méthodes testées reposent sur l'utilisation d'un électrolyte de séparation (BGE) ayant une grande conductivité en comparaison à celle du tampon d'échantillon. Le champ électrique étant inversement proportionnel à la conductivité, les analytes migrent plus vite dans l'échantillon où le champ électrique est plus fort et ils sont ralentis lorsqu'ils atteignent la frontière échantillon/BGE (Breadmore *et al.*, 2017). Les analytes sont ainsi concentrés à l'interface entre la zone échantillon et la zone BGE.

1.3.2.4.2.a. Field amplified sample stacking (FASS)

La méthode FASS consiste à injecter hydrodynamiquement un volume d'échantillon supérieur à 1% du volume du capillaire mais inférieur à 10% pour conserver une bonne résolution (Figure 78). Le rapport de conductivité entre le tampon de séparation et celui de l'échantillon doit être autour de 10 (Burgi & Chien, 1991; Lian *et al.*, 2014). Une augmentation du rapport de conductivité au-delà de 10 génère un flux laminaire qui engendre un élargissement des pics tandis que l'augmentation du volume injecté provoque une perte de résolution due à une diminution du champ électrique dans la zone du BGE. Pour évaluer les gains en sensibilité, le facteur d'enrichissement (SEF : « Sensitivity Enhancement Factor ») est calculé selon la formule :

$$SEF = \frac{C_{\text{avant préc.}} \times H_{\text{après préc.}}}{C_{\text{après préc.}} \times H_{\text{avant préc.}}}$$

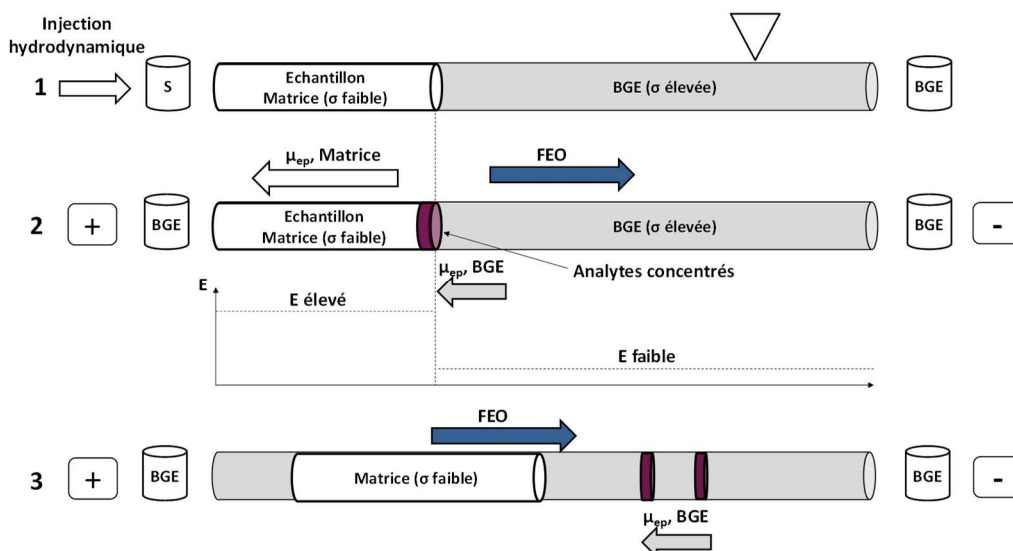


Figure 78 : Principe de la préconcentration par FASS dans un capillaire de silice (présence de flux électroosmotique, FEO) pour des molécules anioniques. 1. Injection hydrodynamique d'un grand volume d'échantillon (max 10%) dans un capillaire avec une conductivité moindre dans la zone échantillon. 2. Application d'une tension et création d'un champ électrique discontinu dans le capillaire, où les molécules migrent rapidement dans la zone à champ électrique plus élevé (zone échantillon) et lentement dans la zone à champ électrique plus faible (BGE). 3. Séparation classique des analytes en ECZ après la préconcentration par FASS.

Les conductivités du BGE (150mM borate de sodium à pH 9,5) et du tampon d'échantillon (10mM de bicarbonate d'ammonium à pH 7,4) sont respectivement de 6872 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Ces tampons ont été fixés lors de l'optimisation de la méthode ECZ (Article 1). Le rapport de conductivité est alors de 6.8. Celui-ci est donc trop faible pour garantir la conservation de la résolution lors de l'augmentation du volume injecté. Pour augmenter ce rapport, deux stratégies ont été appliquées afin de diminuer la conductivité de l'échantillon : ajouter du solvant organique dans l'échantillon (Danger *et al.*, 2009) ou modifier la composition du tampon échantillon après immunocapture.

Lors de l'ajout de 10% de MeOH dans l'échantillon de plasma implémenté d'ApoC-III standard obtenu après immunocapture, aucun pic n'est détecté lorsque le volume d'injection est gardé à 1%. L'augmentation du volume injecté à 3% du capillaire permet la détection des deux glycoformes de l'ApoC-III. On note donc une amélioration en sensibilité mais au détriment de la résolution (Figure 79B). Le SEF ainsi obtenu est de 2,8 et correspond à l'augmentation du volume injecté d'un facteur 3. Lorsque la quantité de MeOH est augmentée au-delà de 10%, la perte de résolution est totale et les deux pics d'ApoC-III sont confondus. Afin de voir l'importance de la nature du solvant organique choisi sur la résolution observée, le MeOH a également été remplacé par l'isopropanol. Malheureusement, la résolution est encore plus faible que celle obtenue avec le MeOH.

L'ajout de MeOH dans l'échantillon de plasma implémenté d'ApoC-III standard n'est pas concluante car la résolution entre les deux glycoformes de l'ApoC-III standard est perdue suggérant que le même phénomène sera observé sur le plasma seul empêchant de séparer les deux glycoformes.

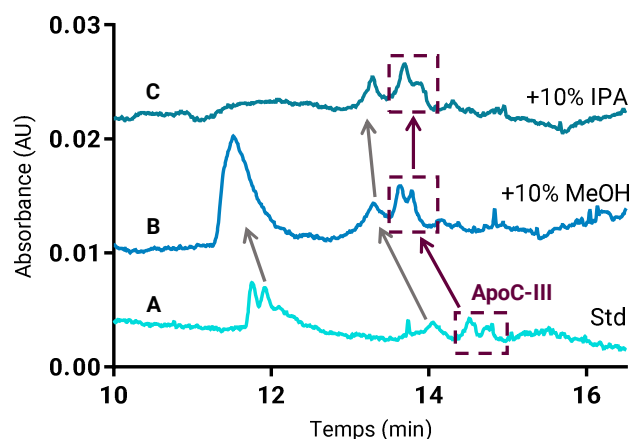


Figure 79 : Profils obtenus après préconcentration par FASS pour l'échantillon de plasma implémenté d'ApoC-III standard sans ajout de MeOH et une injection de 1% du capillaire (A) et lors de l'injection de 3% du volume du capillaire des échantillons obtenus après ajout de 10% de MeOH (B) ou 10% d'isopropanol (C).

La deuxième stratégie utilisée afin de diminuer la conductivité de l'échantillon a été de réaliser l'élution thermique après immunocapture en utilisant un tampon de plus faible conductivité. L'eau et le tampon bicarbonate d'ammonium pH 7,4 à 0,15mM au lieu de 10mM ont été testés (Figure 80 A et B respectivement). En effet, la dilution d'un échantillon dans de l'eau a déjà permis dans la littérature d'obtenir un SEF autour de 30 pour la détection d'albumine dans l'urine (Bessonova *et al.*, 2007).

Les résultats, obtenus dans les deux cas, montrent que la diminution de la conductivité permet de gagner légèrement en sensibilité puisque les SEF sont de 1,40 pour l'eau et de 1.46 pour le bicarbonate. Au vu de ces données, le volume injecté a été augmenté à 3% puis 5% du volume du capillaire. Lors d'une injection de 3% , une résolution correcte est conservée et les SEF obtenus sont de 3.60 pour l'eau et de 2.91 pour le bicarbonate. Le gain en sensibilité est donc très faible. L'augmentation du volume injecté à 5% du volume du capillaire a détérioré la qualité de séparation puisqu'il n'y a plus qu'un seul pic d'ApoC-III détecté. La perte de résolution est probablement due à la présence du flux électroosmotique (FEO) assez important ($\sim 2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), d'autant plus que l'ApoC-III migre grâce au FEO mais en contre électroosmose. Ce FEO génère un flux laminaire dans le capillaire qui provoque une diminution des différences de vitesse entre les différents glycoformes et engendre ainsi une perte de résolution (Bessonova *et al.*, 2007).

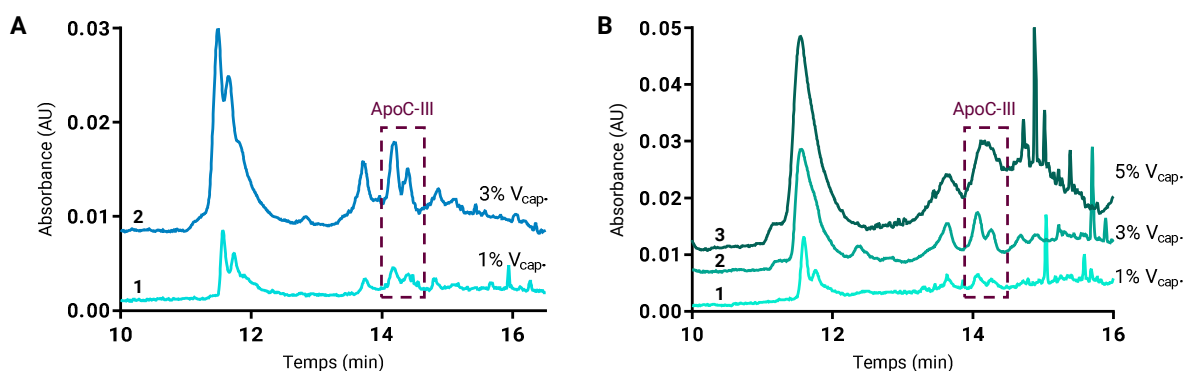


Figure 80 : Profils obtenus après préconcentration par FASS pour l'ApoC-III standard extrait par immunocapture et élué dans l'eau (A) avec une injection de 1% (A1) et de 3% du volume du capillaire (A2) ou dans le bicarbonate d'ammonium pH 7,4 à 0,15 mM (B) avec injection de 1% du capillaire (B1), 3% (B2) et 5% (B3) du volume du capillaire.

Le changement du milieu de l'échantillon par des tampons avec des conductivités plus faibles est une méthode intéressante mais le gain en sensibilité est insuffisant pour pouvoir détecter l'ensemble des glycoformes de l'ApoC-III. Pour obtenir une séparation de meilleure qualité en FASS tout en augmentant davantage le volume injecté, l'utilisation d'un capillaire avec un revêtement qui réduirait très fortement le FEO pourrait permettre d'éviter la perte de résolution mais nécessiterait un nouveau développement complet de la méthode d'ECZ.

I.3.2.4.2.b. Large-volume sample stacking (LVSS)

Compte-tenu des faibles SEF obtenus avec la méthode FASS, nous avons choisi de tester la méthode LVSS qui permet d'injecter de très grands volumes d'échantillon, pouvant atteindre 95% du volume du capillaire dès lors que la mobilité électrophorétique des analytes est opposée au FEO (Breadmore *et al.*, 2017), ce qui est le cas dans la méthode d'ECZ-UV que nous avons développée (Figure 81). Pour que le processus de préconcentration par LVSS se déroule efficacement, il faut s'assurer au préalable que les conductivités du tampon d'échantillon et du BGE diffèrent d'un facteur supérieur à 100. Dans cette méthode, les analytes sont concentrés par changement de polarité du champ électrique. Le capillaire est rempli avec un grand volume d'échantillon puis la tension est appliquée de sorte que le FEO soit dirigé vers le côté de l'injection du capillaire, ce qui va entraîner le tampon d'échantillon hors du capillaire. La différence de conductivité entre la matrice de l'échantillon et le BGE va induire une concentration des analytes à la frontière des deux milieux, comme dans le FASS. Au cours de cette étape, le courant augmente puisque de plus en plus de matrice est remplacée par le BGE et les analytes sont poussés vers l'entrée du capillaire. Lorsque presque toute la matrice de l'échantillon est éliminée hors du capillaire, c'est-à-dire quand l'intensité du courant est comprise entre 80% et 95% de l'intensité obtenue pour un capillaire rempli de BGE, la tension est inversée et la méthode de séparation classique est alors appliquée.

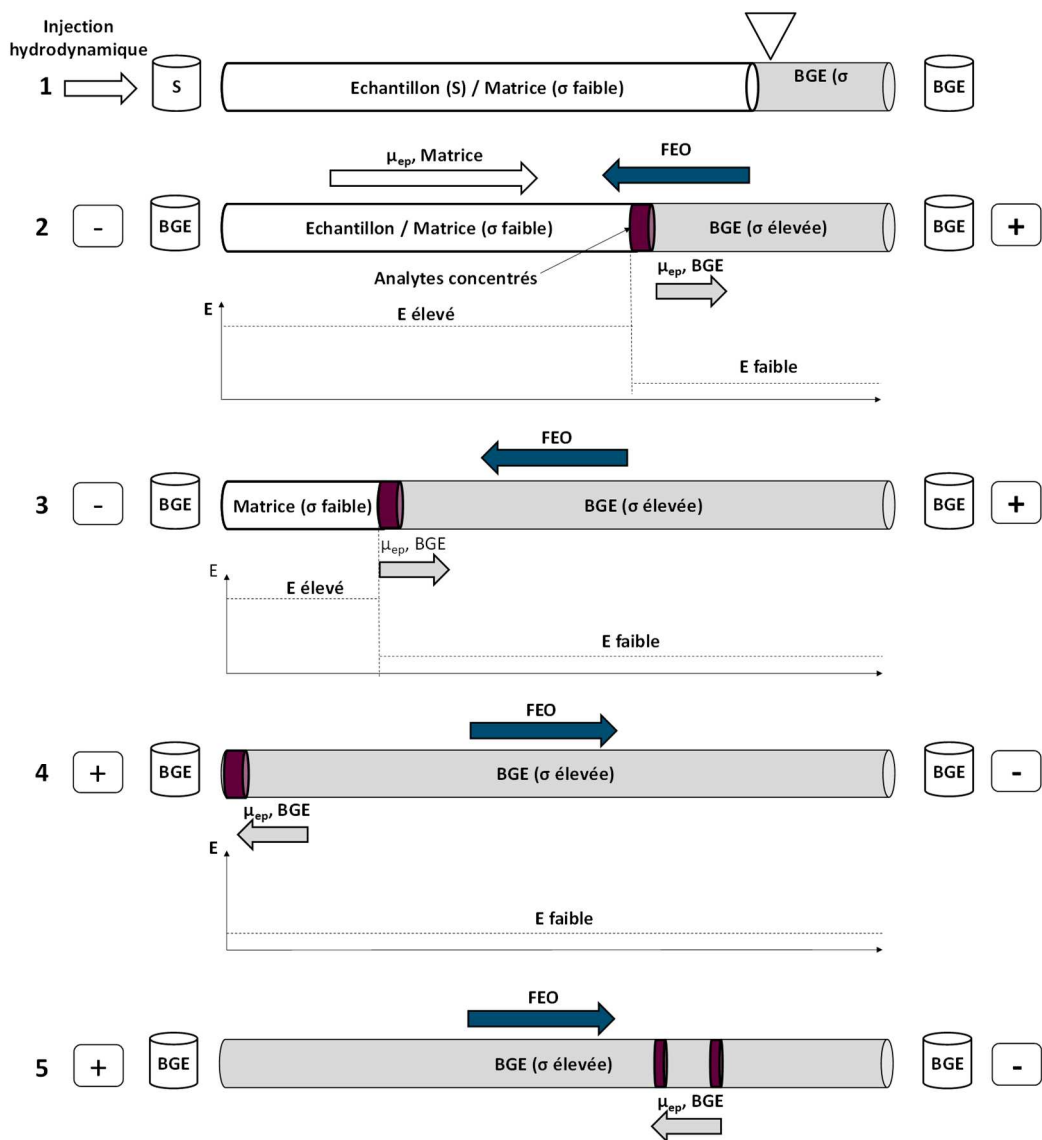


Figure 81 : Principe de la préconcentration par LVSS dans un capillaire de silice (en présence de FEO) pour des molécules anioniques. 1. Injection hydrodynamique d'un très grand volume d'échantillon (95% max) ayant une conductivité faible. 2. Application d'une tension et création d'un champ électrique discontinu dans le capillaire avec accumulation des molécules à la frontière échantillon / BGE. L'EOF généré commence à éliminer la matrice. 3. Elimination de la quasi-totalité de la matrice. 4. Inversion de polarité. 5. Séparation classique par ECZ

Dans cette étude, la procédure de LVSS a été appliquée à un échantillon de plasma implémenté d'ApoC-III standard préalablement purifié par immunocapture et élué dans un tampon bicarbonate d'ammonium pH 7,4 à 0,15mM (ici facteur de conductivités égal à 217). Cela signifie que théoriquement le volume d'échantillon injecté peut aller jusqu'à 100% du volume du capillaire. Différents volumes injectés ont été testés, entre 5% et 30% du capillaire. Le FEO étant très élevé dans les conditions de la méthode d'ECZ développée (capillaire en silice fondue et pH à 9,5), la polarité inverse est appliquée jusqu'à ce que l'intensité du courant atteigne 70% de sa valeur obtenue lorsque le capillaire est entièrement rempli par le tampon de séparation (soit 31,5 μ A) pour éviter de perdre l'échantillon hors du capillaire qui a une μ_{ep} plus faible. Les profils obtenus montrent une perte de la résolution entre les différents pics conduisant à la présence d'un seul pic lors d'une injection de 30% au lieu des deux pics initialement présents (Figure 82). Compte-tenu de la diminution de la résolution lors de l'augmentation du volume injecté de 5 à 30%, le volume injecté n'a pas été davantage augmenté. Tout comme pour le

FASS, le LVSS ne peut pas être appliqué à cause de la perte de résolution qui est probablement liée à un FEO trop important.

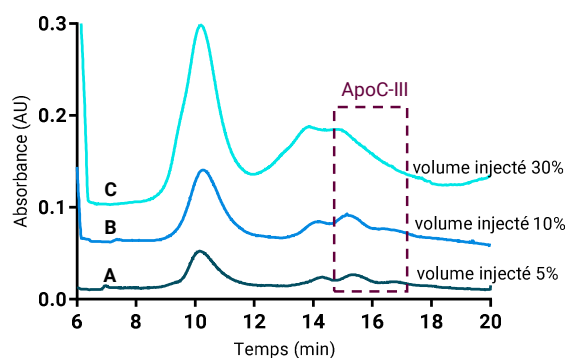


Figure 82 : Profils obtenus par LVSS pour l'analyse d'un échantillon de plasma implémenté d'ApoC-III standard après immunocapture avec injection de 5% (A), 10% (B) et 30% (C) du volume du capillaire

Les techniques de préconcentration électrocinétiques ne sont pas adaptées à la méthode d'ECZ développée dans l'Article 1. En effet, la meilleure séparation a été obtenue lors du changement du tampon d'élution par de l'eau avec un volume d'injection de 3% (SEF=3,6) mais le léger gain en sensibilité (=1,2) s'est fait au détriment de la résolution entre les deux glycoformes. L'emploi de capillaires possédant un revêtement neutre qui permet de réduire le FEO jusqu'à une valeur négligeable constitue une option efficace pour éviter la perte de résolution observée. Cependant, comme présenté dans l'Article 1, la séparation des glycoformes de l'ApoC-III dans des capillaires traités avec des revêtements commerciaux neutres (PVA et PAA) est impossible à cause d'un manque de résolution dû à des pics trop larges. L'emploi de méthodes électrocinétiques de préconcentration dans cette étude n'est donc pas concluant.

1.3.2.4.3. Dérivation avec un fluorophore

Puisque les méthodes de préconcentration électrocinétiques n'ont pas permis d'augmenter la sensibilité de la méthode ECZ mise au point pour la séparation des glycoformes de l'ApoC-III, une autre alternative a été envisagée. Il s'agit de dériver par un fluorophore la chaîne polypeptidique de la protéine directement sur les billes magnétiques après leur immunocapture. Cette dérivation permet de gagner en sensibilité grâce à une détection par fluorescence. Cette procédure de marquage réalisée sur billes en seulement 30 min a déjà été employée mais uniquement pour la détection de peptides A β dans le LCR (Mai *et al.*, 2015). La dérivation sur billes d'une protéine intacte n'a jamais été réalisée. Le transfert d'une méthode d'ECZ-UV en ECZ-LIF est tout de même un défi puisque l'ajout d'un fluorophore peut modifier la charge globale ainsi que le volume hydrodynamique de la protéine. Cela peut induire une modification de la migration et potentiellement une diminution de la résolution entre les espèces par exemple.

Le fluorophore FP-488 employé ici est un fluorophore dérivant les lysines et la partie N-terminale des protéines. Vu le nombre important de lysines (6) présentes dans la chaîne polypeptidique de l'ApoC-III, nous avons préféré éviter la dérivation des lysines qui entraînerait potentiellement des multiproduits de dérivation portant des nombres de fluorophores différents (1 à 7) et donc une complexification du profil des glycoformes. Pour cela, il convient de réaliser la dérivation à un pH autour de 8, inférieur au pKa des lysines (pKa ~10-11) et supérieur à celui de l'amine de la partie N-terminale de la chaîne polypeptidique (pKa=7) pour ne dériver que cette partie N-terminale (Toseland, 2013). Cette

méthode de dérivation a donc été réalisée après l'immunocapture de plasma implémenté d'ApoC-III standard sur les billes et avant son élution. Procéder à la dérivation de l'ApoC-III encore liée aux billes présente l'avantage d'éliminer la majeure partie du fluorophore en excès lors du lavage des billes magnétiques sans nécessiter une étape de purification supplémentaire. Les conditions de dérivation (tampon de dérivation, ratio fluorophore :protéine) n'ont pas été optimisées mais adaptées de la littérature pour le marquage de peptides A β (Mai *et al.*, 2015).

Afin d'optimiser le temps de dérivation, elle a été réalisée soit pendant 1h, soit pendant une nuit à température ambiante. Les profils obtenus après 1h de dérivation (Figure 83) présentent deux zones de pics absent du blanc et séparés par un pic saturant à 14 min qui correspond à l'excès de fluorophore car il est présent dans le blanc. L'échantillon de blanc correspond à une immunocapture réalisée avec des billes anti-ApoC-III mais uniquement avec du tampon (PBD/BSA 0,1%) puis dérivé avec le FP488. Le profil ECZ-LIF est assez similaire à celui observé en ECZ-UV (Figure 73). L'analyse de l'échantillon obtenu par immunocapture du plasma en présence de l'ApoC-III standard (Figure 83C) montre que l'ApoC-III standard migre entre 15 et 17min. En comparaison avec le profil obtenu pour le plasma seul (Figure 82B), un seul pic d'ApoC-III est détecté. La dérivation pendant 1h n'a donc pas permis de détecter la seconde glycoforme de l'ApoC-III. Les pics présents entre 12 et 13min sont sans doute majoritairement liés à la présence d'interférents protéiques capturés de manière non-spécifique (comme montré dans la partie I.3.2.3.1.c) mais aussi peut-être à la présence de complexes lipides-ApoC-III restés intacts pendant la procédure d'immunocapture et de dérivation par fluorescence

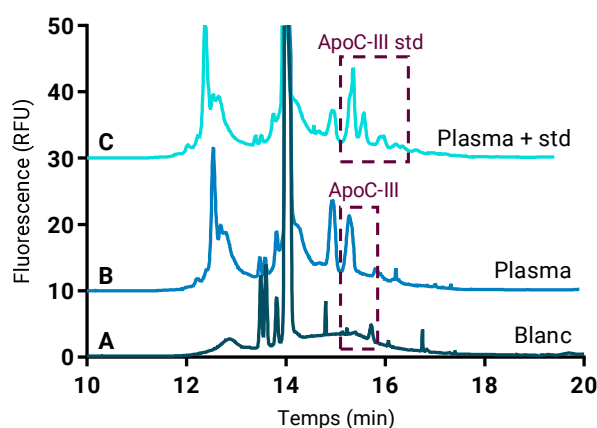


Figure 83 : Comparaison des profils obtenus après 1h de dérivation sur billes magnétiques pour les échantillons de blanc d'immunocapture et de dérivation (A), plasma seul (B) et plasma en présence d'ApoC-III standard (C)

L'analyse des échantillons obtenus après une nuit de dérivation montre une évolution des espèces par rapport à la dérivation pendant seulement 1h. En effet, en comparant la zone de migration d'intérêt (entre 15 et 16 min) dans l'échantillon de plasma en présence de standard et du plasma seul, on observe l'apparition d'un second pic d'ApoC-III (Figure 84B). Afin de montrer plus nettement l'apparition de ce deuxième pic, l'échantillon a été dilué par trois afin de diminuer le bruit de fond du profil (Figure 84B). Cela signifie que la deuxième glycoforme d'ApoC-III (ApoC-III₂) nécessite une incubation plus longue pour être efficacement dérivée et ainsi détectée en ECZ-LIF. Ce phénomène s'explique peut-être par la présence d'un acide sialique supplémentaire qui peut provoquer potentiellement une gêne stérique plus importante que pour la forme monosialylée ApoC-III₁. Le fluorophore aurait moins facilement accès au site de dérivation sur la partie N-terminale.

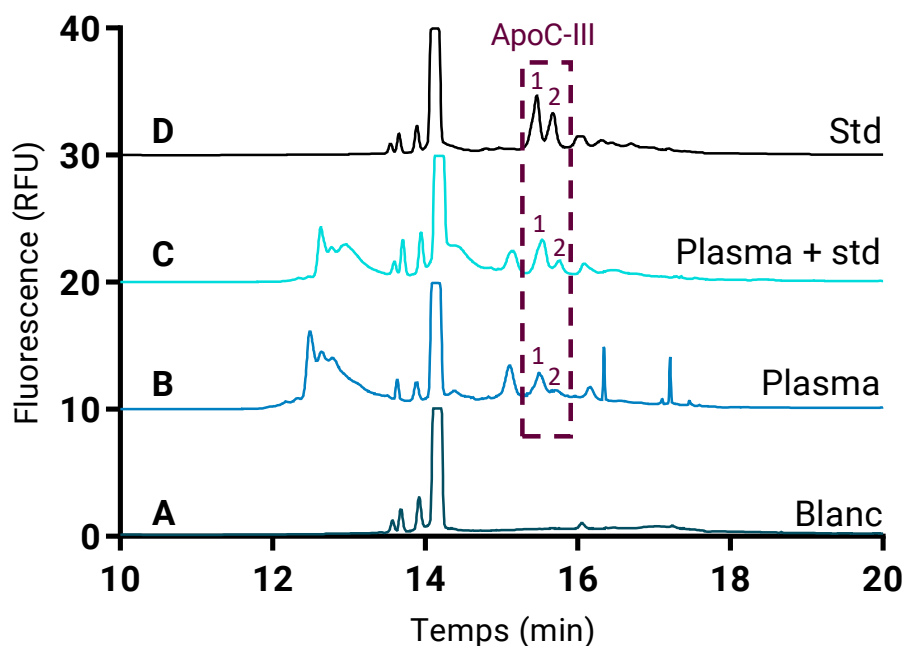


Figure 84 : Profils obtenus après une nuit de dérivation sur billes magnétiques pour les échantillons de blanc (A), plasma seul (B), plasma en présence d'ApoC-III standard (C) et d'ApoC-III standard seul (D)

Afin d'explorer la piste des complexes avec les lipides qui engendreraient une diminution du rendement de capture mais aussi des interférences (pics vers 12min), un échantillon de plasma a été délipidé afin de rompre les interactions lipides-ApoC-III. Il s'avère que le profil du plasma délipidé est identique à celui du plasma non-délipidé, que ce soit au niveau des pics d'ApoC-III libres (vers 15 min) ou les autres pics non-spécifiques (vers 12 min). Seules les aires relatives des pics non-spécifiques varient après délipidation. Ainsi, les pics situés avant l'excès de fluorophore (entre 12 et 14min) seraient probablement liés uniquement à la présence de molécules capturées de manière non-spécifique plutôt qu'aux complexes ApoC-III-lipides.

La dérivation sur billes de l'ApoC-III par un fluorophore permet de détecter par ECZ-LIF ses différentes glycoformes issu d'échantillons biologiques. Une optimisation plus fine de la dérivation de la chaîne polypeptidique en augmentant l'excès de fluorophore ou en réalisant la dérivation à 37°C pourrait peut-être permettre d'accélérer la dérivation de la seconde glycoforme et éviter l'incubation sur une nuit. Afin d'augmenter la sensibilité, il serait intéressant d'essayer de dériver tous les sites possibles de dérivation (6 lysines et le N-term) de la chaîne polypeptidique de l'ApoC-III afin d'avoir 7 molécules de fluorophore par protéine. Néanmoins, il faudra s'assurer que la dérivation est totale pour toutes les molécules d'ApoC-III pour ne pas ajouter une hétérogénéité additionnelle aux glycoformes à cause de multi-produits. La présence d'un plus grand nombre de molécules de fluorophore entraînera probablement une modification de la migration et une nouvelle optimisation des conditions de séparation sera sans doute nécessaire.

II. Séparation des glycoformes de l'ApoC-III par MALDI-TOF MS de patients atteints de CDGs

Au cours du développement de la méthode d'ECZ-UV, des échantillons biologiques de patients en attente de diagnostic ont dû être analysés. Afin de leur apporter une réponse rapide, l'analyse des N- et O-glycosylations a été réalisée en combinaison avec un séquençage génétique à la recherche de la mutation à l'origine des anomalies de glycosylation observées. Pour cela, une étude de trois N-glycoprotéines (Tf, haptoglobine et α -AGP) par gel SDS-PAGE et par électrophorèse 2D a été effectuée. Les glycoformes de la Tf intacte ont également été séparées par ECZ tandis que les glycoformes de l'ApoC-III ont été analysées par électrophorèse 2D. Afin de compléter les analyses réalisées, j'ai effectué les analyses des glycoformes de l'ApoC-III à l'aide de la technique de MALDI décrite dans la littérature (Yen-Nicolaï et al., 2015a). Néanmoins, comme vu précédemment, cette méthode reste coûteuse et non quantitative.

La première étude a concerné trois patients, sans lien familial, mais présentant des phénotypes très similaires à ceux de patients atteints de mitochondriopathie, de la maladie de Wilson ou encore de la maladie de Niemann-Pick type C. En effet, les deux premiers patients présentaient des fibroses hépatiques et des cirrhoses associées à des symptômes neurologiques sévères tandis que le troisième individu présentait uniquement une atteinte hépatique avancée. Ce tableau symptomatique a retardé le diagnostic puisque les premières recherches se sont focalisées uniquement sur des pathologies hépatiques héréditaires. Malgré des présentations cliniques différentes, le dépistage des CDGs via l'analyse de la glycosylation de ces trois patients a révélé qu'ils souffraient tous du même type de CDG, le CCDC115-CDG. Ce type de CDG a été découvert en 2016 par Jansen *et al.* (J. C. Jansen et al., 2016) et a été décrit pour 8 patients issus de 5 familles. Les patients étudiés dans cet article présentaient un profil de transferrine similaire aux CDGs de type II, une hépatosplénomégalie, des symptômes neurologiques, des transaminases et des phosphatases alcalines sériques élevées, une hypercholestérolémie ainsi qu'une anomalie du métabolisme du cuivre semblable à celle de la maladie de Wilson.

L'étude de la N-glycosylation à travers l'analyse de la transferrine sérique par ECZ et de l'analyse des N-glycanes du plasma pour ces nouveaux patients ont montré une accumulation des N-glycanes bi-antennés partiellement sialylés et des N-glycanes sans résidus d'acide sialique et de galactose ainsi qu'une faible augmentation des espèces fucosylées. L'étude a été complétée par l'électrophorèse en gel 2D et par MALDI des glycoformes de l'ApoC-III, qui ont mis en évidence une diminution de l'abondance de la forme bi-sialylée (Figure 85).

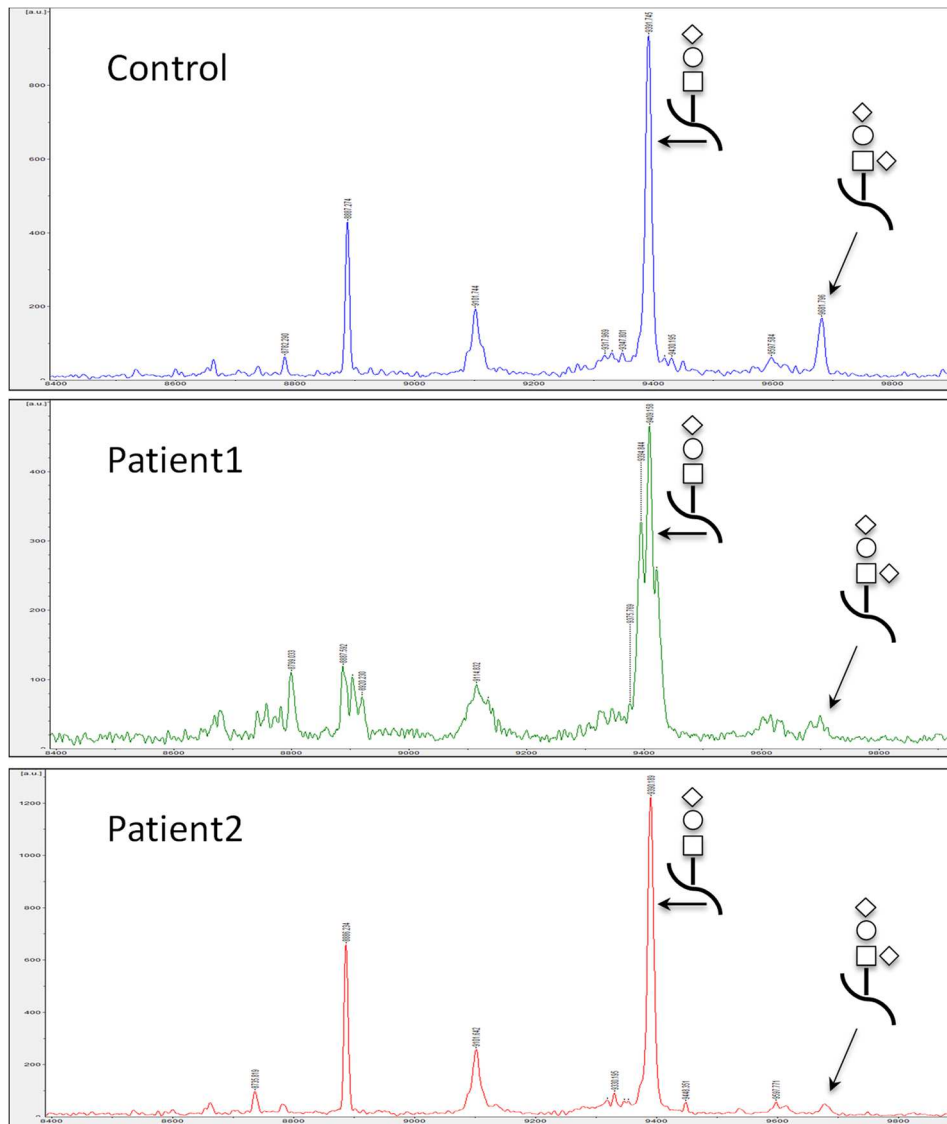


Figure 85 : MALDI-TOF MS analysis of serum mucin core1 O-glycosylated apolipoprotein C-III (apoC-III). Previous 2-DE results were corroborated in Pt1 and Pt2 (not done in Pt3) with MALDI-TOF MS spectra showing a decrease in the level of the bi-sialylated glycoform of apoC-III.

Ces résultats ont montré que le CCDC115-CDG affecte à la fois la N- et la O-glycosylation. L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'un article (Article 2) intitulé « CCDC115-CDG: A new rare and misleading inherited cause of liver disease » et publié en 2018 dans *Molecular Genetics and Metabolism* (vol 124, pp 228-235) qui est présenté en Annexe 3.

Un autre article (Article 3), intitulé « Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation » a été publié dans *Electrophoresis* en 2018 (vol 0, pp 1-10) et est présenté en Annexe 4. Cet article détaille toutes les étapes de la procédure employée pour le dépistage de 4 types de CDG particuliers : le MGAT2-CDG, le ATP6V0A2-CDG, le SLC35A2-CDG, et le SLC35A3-CDG. Les présentations cliniques très diverses des 4 patients présentés (de 7 mois à 14 ans), allant du retard mental modéré à sévère, au retard de croissance, à une microcéphalie ou à des malformations cardiaques témoignent de la grande variabilité des symptômes rencontrés en fonction du type de CDG mis en cause. Afin d'exposer les potentielles altérations de la O-glycosylation, l'analyse des glycoformes de l'ApoC-III par MALDI-TOF a été réalisée (Figure 86). Ainsi, la diminution de la

glycoforme bi-sialylée a été observée pour un seul patient sur les 4 (patient 2), atteint du ATP6V0A2-CDG. Les autres patients ont présenté des profils similaires à celui d'un individu sain, suggérant que la O-glycosylation n'était pas affectée pour ces CDGs. Il est à noter que certains profils présentent des glycoformes oxydées, probablement liées à une hémolyse des échantillons, cependant cela n'altère pas l'évaluation des abondances relatives des différentes glycoformes.

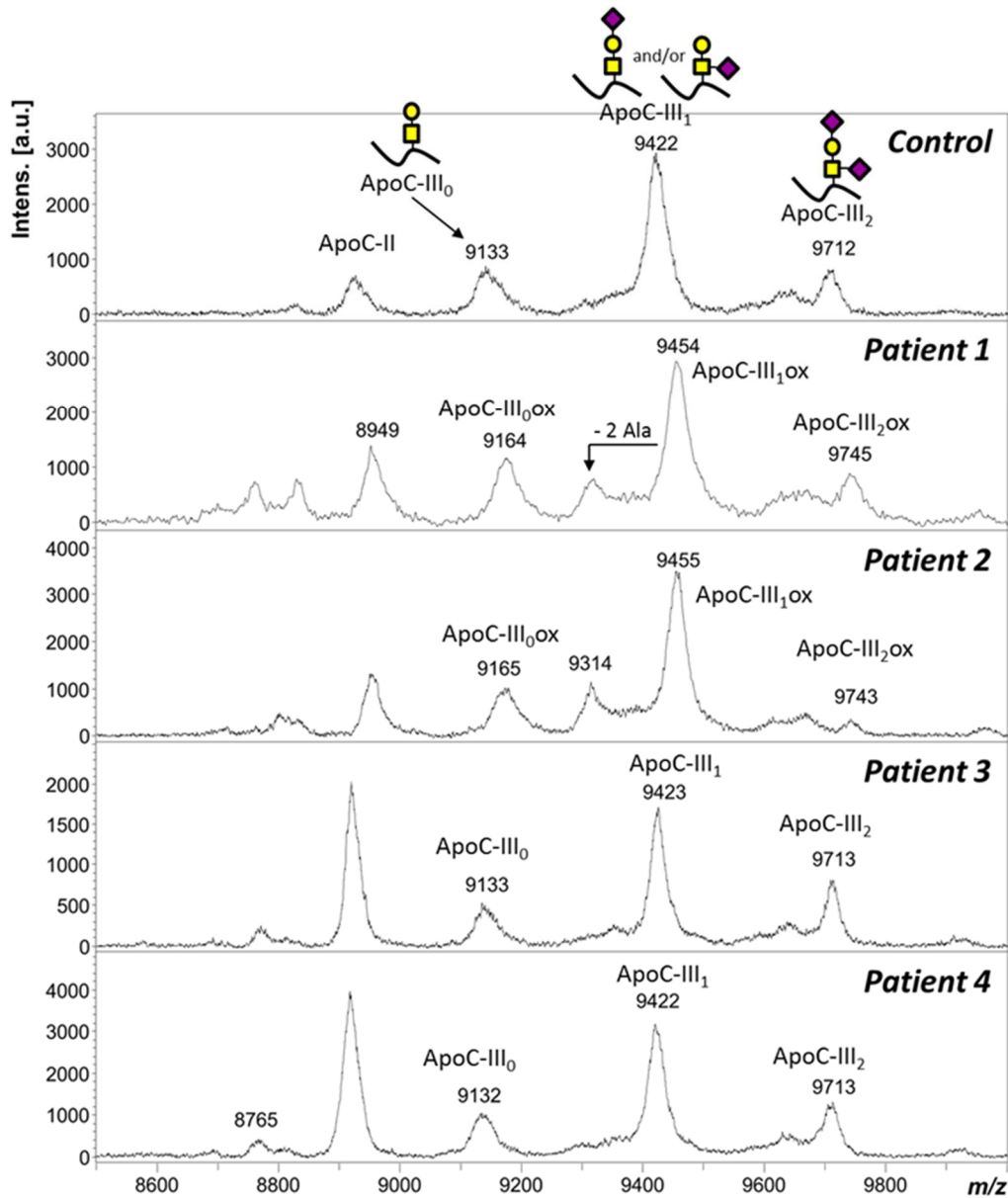


Figure 86 : MALDI-TOF mass spectra of apoC-III. Species were detected as $[M+H]^+$ ions. For patients 2 and 3, protein species were detected under their oxidized form (ox). Yellow squares, GalNAc; yellow circles, Gal; purple diamonds, Neu5Ac.

Néanmoins, l'emploi d'autres méthodes analytiques s'est avéré indispensable pour étudier la N-glycosylation et confirmer le diagnostic pour tous les patients. Ce travail souligne donc l'importance de combiner plusieurs approches fondées à la fois sur l'électrophorèse et la spectrométrie de masse pour étudier les N- et O-glycosylations mais également sur le séquençage génétique pour obtenir un diagnostic définitif et déterminer la mutation génétique à l'origine du CDG. Cet article propose, à travers les résultats obtenus pour ces 4 exemples de CDG, un arbre décisionnel pour le dépistage des CDGs (Figure 87).

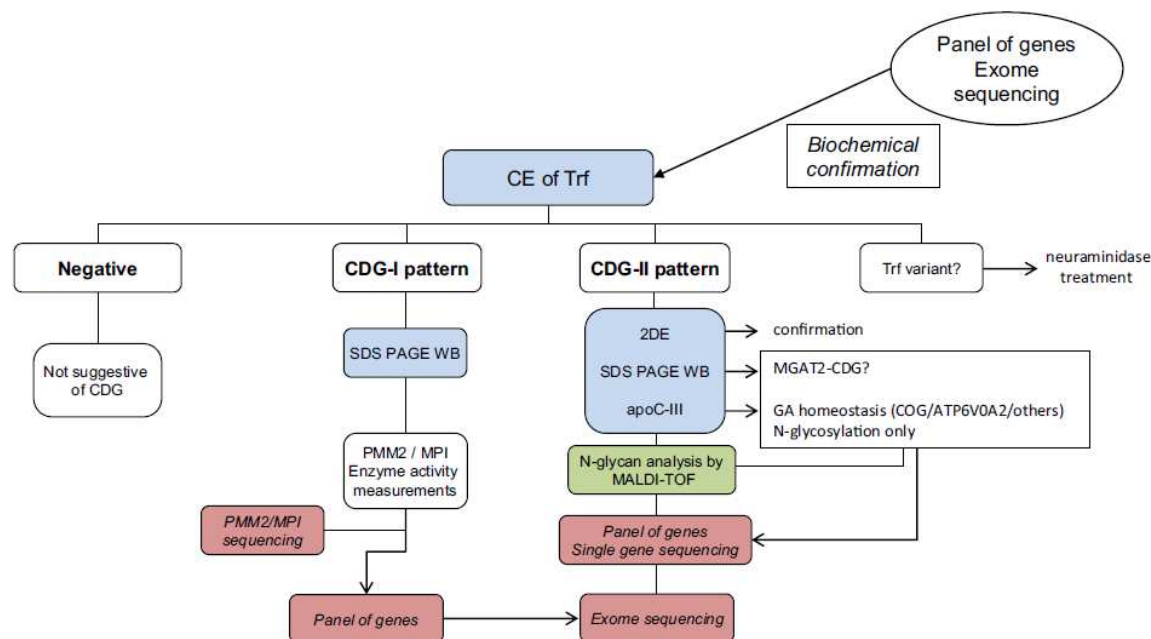


Figure 87 : Arbre décisionnel proposé pour réaliser le diagnostic des CDGs

Ainsi, les analyses par MALDI-TOF des glycoformes de l'ApoC-III ont été réalisées pour 5 types de CDG et a permis de montrer les différences d'abondance de la forme bi-sialylée pour les CCDC115-CDG et ATP6V0A2-CDG. Les autres types de CDG n'ont pas présenté d'anomalie de la O-glycosylation.

III. Conclusion

La méthode d'ECZ-UV développée dans cette étude a permis de séparer les différentes glycoformes de l'ApoC-III en seulement 20 min d'analyse. Aucune étude similaire des glycoformes de l'ApoC-III par EC n'avait été rapportée dans la littérature jusque-là. Cette étude a également mis en évidence une modification inattendue des échantillons d'ApoC-III standards commercialisés par divers fournisseurs correspondant à la carbamylation. La méthode ECZ ainsi développée a permis de séparer, avec d'excellentes reproductibilité et résolution, les glycoformes selon leurs degrés de sialylation mais aussi de carbamylation. Les sites de carbamylation artificielle ont été caractérisés par SM MALDI-TOF. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir quantifier les différentes glycoformes séparées. L'application de cette méthode à des échantillons biologiques (plasma) a nécessité la mise en place d'une étape d'extraction de l'ApoC-III et de simplification de la matrice biologique. Plusieurs stratégies d'extraction de plus en plus spécifiques ont été testées : précipitation des protéines, SPE et immunocapture sur billes magnétiques. La comparaison de plusieurs méthodes de traitement a été nécessaire puisque les méthodes les plus simples sont non-spécifiques et que les techniques spécifiques sont généralement plus complexes à mettre en œuvre.

Cette étude de la glycosylation de l'ApoC-III montre la difficulté d'appliquer une méthode d'ECZ à des échantillons biologiques avec une matrice aussi complexe que le plasma. En effet, peu d'études similaires ont été rapportées dans la littérature. C'est le cas par exemple, de l'ubiquitine issue du LCR mais le traitement du fluide biologique a seulement été réalisé par filtration sur une membrane de 3 kDa (Mesbah *et al.*, 2013) ou alors des peptides A β extraits du LCR par immunocapture sur des billes magnétiques (Verpillot *et al.*, 2011). L'optimisation de l'étape d'extraction de la protéine d'intérêt est très complexe et nécessite souvent de tester plusieurs techniques avec des spécificités différentes. Les

différents essais menés ont montré que les techniques d'extraction seules ne permettent pas de réaliser la détection des deux glycoformes de l'ApoC-III. Il est en effet nécessaire d'employer également une méthode de dérivation de la chaîne polypeptidique avec un fluorophore pour améliorer la sensibilité de la détection. Cette étude a permis de mettre au point une procédure pour séparer et détecter les glycoformes de l'ApoC-III dans le plasma. La dérivation par fluorescence sur billes magnétiques a été réalisée pour la première fois pour une protéine. Néanmoins, malgré la détection des deux glycoformes, la quantification semble un peu difficile compte-tenu du faible signal observé pour l'ApoC-III₂.

Un point critique reste la présence d'espèces inconnues très majoritaires migrant autour de 12-13min et issues d'adsorptions non-spécifiques à la surface des billes. Afin d'essayer d'éliminer ces interférents, une déplétion des protéines majoritaires du plasma pourrait être effectuée avant l'immunocapture sur billes magnétiques. Cette déplétion permettra peut-être de simplifier le profil obtenu par ECZ et de rendre la méthode quantitative. Une autre piste à creuser serait l'immobilisation des anticorps de manière orientée afin d'assurer une accessibilité maximale aux épitopes présents sur l'ApoC-III. En effet, l'anticorps est alors greffé à partir de son fragment Fc ce qui garantit une reconnaissance optimale entre les anticorps et l'ApoC-III et potentiellement aussi un gain en sensibilité. Enfin, une optimisation des conditions de dérivation pourrait permettre l'ajout de 7 molécules de fluorophore par protéine, permettant ainsi une amélioration de la sensibilité mais provoquant sans doute également une modification de la migration des espèces ainsi dérivées nécessitant d'optimiser à nouveau les conditions de séparation. Une application de la procédure complète à des échantillons biologiques de patients atteint de CDGs pourra alors être envisagée. Toutes ces pistes pourront peut-être donner lieu à la mise en place d'une méthode d'ECZ-LIF pour l'analyse des glycoformes de l'ApoC-III à l'hôpital destinée au dépistage des anomalies de la O-glycosylation réalisé simultanément à celles de la N-glycosylation.

Au cours du développement de la méthode d'ECZ, l'occasion de travailler sur des patients en attente de diagnostic ou de confirmation de celui-ci s'est présentée. Les analyses de l'ApoC-III intacte ont donc été effectuées à l'aide de la méthode de MALDI-TOF (Yen-Nicolaÿ et al., 2015a). Dans la première étude, la diminution de la glycoforme bi-sialylée observée par MALDI-TOF a permis de confirmer les observations faites par électrophorèse 2D de l'ApoC-III mais aussi de compléter les travaux menés sur la N-glycosylation. Il s'est avéré que ces patients présentant des symptômes proches de ceux observés chez des patients atteints de pathologies hépatiques étaient finalement atteints du CCDC115-CDG. Ces travaux ont donc montré la ressemblance entre des différentes pathologies hépatiques et les CDGs et l'importance de réaliser le dépistage des CDGs chez des patients où les autres pathologies ont été écartées. Une deuxième étude a proposé une méthodologie pour les étapes du dépistage des CDGs à travers 4 exemples différents. Cet article souligne l'importance de combiner plusieurs méthodes d'analyse de la glycosylation (électrophorèse capillaire, électrophorèse 2D, SM MALDI-TOF) pour déterminer les anomalies biochimiques ainsi que du séquençage des gènes pour déterminer la mutation à l'origine du CDG.

Références bibliographiques – Chapitre IV

- Ackermann, B. L., & Berna, M. J. (2007). Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers. *Expert Review of Proteomics*, 4(2), 175–186. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.2.175>
- Ashri, N. Y., & Abdel-Rehim, M. (2011, September). Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis*. <https://doi.org/10.4155/bio.11.201>
- Barton, C., Kay, R. G., Gentzer, W., Vitzthum, F., & Pleasance, S. (2010). Development of high-throughput chemical extraction techniques and quantitative HPLC-MS/MS (SRM) assays for clinically relevant plasma proteins. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 333–340. <https://doi.org/10.1021/pr900658d>
- Bessonova, E. A., Kartsova, L. A., & Shmukov, A. U. (2007). Electrophoretic determination of albumin in urine using on-line concentration techniques. *Journal of Chromatography. A*, 1150(1–2), 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.041>
- Breadmore, M. C., Wuethrich, A., Li, F., Phung, S. C., Kalsoom, U., Cabot, J. M., ... Quirino, J. P. (2017). Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2014–2016). *Electrophoresis*, 38, 33–59. <https://doi.org/10.1002/elps.201600331>
- Bruneel, A., Morelle, W., Carre, Y., Habarou, F., Dupont, D., Hesbert, A., ... Seta, N. (2008). Two dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and MALDI-TOF MS are complementary techniques for the study of combined defects in N- and mucin type O-glycan biosynthesis. *Proteomics - Clinical Applications*, 2(12), 1670–1674. <https://doi.org/10.1002/prca.200800089>
- Burgi, D. S., & Chien, R.-L. (1991). *Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis. Fourny, R. M. Appl. Theor. Electrophoresis* (Vol. 63). Guttman, A. Beckman Institute Inc. Retrieved from <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- CNIMH, D. du. (1997). Revue d'évaluation sur le médicament.
- Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M., & Taylor, H. L. (1946). *Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components 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* a, b, c, d. Retrieved from <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Danger, G., Pascal, R., & Cottet, H. (2009). On-line sample stacking of peptides in capillary electrophoresis for the study of prebiotic reactions between α,α -dialkylated amino acids and amino acid N-carboxyanhydrides. *Journal of Chromatography A*, 1216(30), 5748–5754. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.06.010>
- Grenier, A. (2011). Effet inattendu du Lipoclear® sur le dosage de protéine C réactive. *Annales de Biologie Clinique*, 69(5), 620–620. <https://doi.org/10.1684/ABC.2011.0628>
- Harvey, S. B., Zhang, Y., Wilson-Grady, J., Monkkonen, T., Nelsestuen, G. L., Kasthuri, R. S., ... Kellogg, T. A. (2009). O-glycoside biomarker of apolipoprotein C3: Responsiveness to obesity, bariatric surgery, and therapy with metformin, to chronic or severe liver disease and to mortality in severe sepsis and graft VS host disease. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 603–612. <https://doi.org/10.1021/pr800751x>
- Jaeken, J., & Péanne, R. (2017). What is new in CDG? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40(4), 569–586. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0050-6>
- Jansen, J. C., Cirak, S., van Scherpenzeel, M., Timal, S., Reunert, J., Rust, S., ... Lefeber, D. J. (2016). CCDC115 Deficiency Causes a Disorder of Golgi Homeostasis with Abnormal Protein Glycosylation. *American Journal of Human Genetics*, 98(2), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.12.010>
- Jian, W., Edom, R. W., Wang, D., Weng, N., & Zhang, S. (2013). Relative quantitation of glycoisofoms of intact apolipoprotein C3 in human plasma by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(5), 2867–2874. <https://doi.org/10.1021/ac3034757>

- Jong, M. C., Hofker, M. H., & Havekes, L. M. (1999). Role of apoCs in lipoprotein metabolism: Functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *19*(3), 472–484. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.3.472>
- Le Nel, A. (2008). *Développement d'un système miniaturisé dédié à l'analyse de la protéine du prion*.
- Lian, D.-S., Zhao, S.-J., Li, J., & Li, B.-L. (2014). Progress in stacking techniques based on field amplification of capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(25), 6129–6150. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8062-7>
- Liu, G., Zhao, Y., Angeles, A., Hamuro, L. L., Arnold, M. E., & Shen, J. X. (2014). A Novel and Cost Effective Method of Removing Excess Albumin from Plasma/Serum Samples and Its Impacts on LC-MS/MS Bioanalysis of Therapeutic Proteins. *Analytical Chemistry*, *86*(16), 8336–8343. <https://doi.org/10.1021/ac501837t>
- Mai, T. D., Pereira, I., Hiraoui, M., Viovy, J.-L., Descroix, S., Taverna, M., & Smadja, C. (2015). Magneto-immunocapture with on-bead fluorescent labeling of amyloid- β peptides: towards a microfluidized-bed-based operation. *Analyst*, *140*, 5891. <https://doi.org/10.1039/c5an01179e>
- Mani, V., Chikkaveeraiah, B. V., & Rusling, J. F. (2011). Magnetic particles in ultrasensitive biomarker protein measurements for cancer detection and monitoring. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, *5*(5), 381–391. <https://doi.org/10.1517/17530059.2011.607161>
- Matulis, D. (2016). Selective Precipitation of Proteins. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 83, p. 4.5.1–4.5.37). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0405s83>
- Mesbah, K., Oukacine, F., Lehnert, S., Otto, M., & Taverna, M. (2013). On-line capillary electrophoresis derivatization method for high sensitivity analysis of ubiquitin in filtered cerebrospinal fluid. *ELECTROPHORESIS*, *34*(18), 2733–2739. <https://doi.org/10.1002/elps.201300155>
- Ondrušková, N., Honzík, T., Kytarová, J., Matoulek, M., Zeman, J., & Hansíková, H. (2015). Isoelectric Focusing of Serum Apolipoprotein C-III as a Sensitive Screening Method for the Detection of O-glycosylation Disturbances. *Prague Medical Report*, *116*(2), 73–86. <https://doi.org/10.14712/23362936.2015.48>
- Ouyang, Z., Furlong, M. T., Wu, S., Slecicka, B., Tamura, J., Wang, H., ... Jemal, M. (2012). Pellet digestion: a simple and efficient sample preparation technique for LC-MS/MS quantification of large therapeutic proteins in plasma. *Bioanalysis*, *4*(1), 17–28. <https://doi.org/10.4155/bio.11.286>
- Petibois, C., Cazorla, G., Cassaigne, A., & Déléris, G. (2001). Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectrometry. *Clinical Chemistry*, *47*(4), 730–738. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274025>
- Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V., & Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *785*(2), 263–275. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5)
- Sakurabayashi, I., Saito, Y., Kita, T., Matsuzawa, Y., & Goto, Y. (2001). Reference intervals for serum apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E in healthy Japanese determined with a commercial immunoturbidimetric assay and effects of sex, age, smoking, drinking, and Lp(a) level. *Clinica Chimica Acta*, *312*(1–2), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00591-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00591-5)
- Sanz-Nebot, V., Balaguer, E., Benavente, F., Neusüß, C., & Barbosa, J. (2007). Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS. *Electrophoresis*, *28*(12), 1949–1957. <https://doi.org/10.1002/elps.200600648>
- Schneck, N. A., Lowenthal, M., Phinney, K., & Lee, S. B. (2015). Current trends in magnetic particle enrichment for mass spectrometry-based analysis of cardiovascular protein biomarkers. *Nanomedicine*, *10*(3), 433–446. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.188>
- Servier Medical Art. (n.d.). Lipoprotein. Retrieved August 8, 2018, from https://smart.servier.com/smart_image/lipoprotein/
- Šlampová, A., Malá, Z., Gebauer, P., & Boček, P. (2017). Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2014–2016). *ELECTROPHORESIS*, *38*(1), 20–32. <https://doi.org/10.1002/elps.201600292>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid. Retrieved from

<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-isolation-protocol/dynabeads-myone-carboxylic-acid.html#prot5>

- Toseland, C. P. (2013). Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology*, 6(3), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0094-5>
- Trenchevska, O., Schaab, M. R., Nelson, R. W., & Nedelkov, D. (2015). Development of multiplex mass spectrometric immunoassay for detection and quantification of apolipoproteins C-I, C-II, C-III and their proteoforms. *Methods*, 87, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2015.02.020>
- Verpillot, R., Esselmann, H., Mohamadi, M. R., Klafki, H., Poirier, F., Lehnert, S., ... Taverna, M. (2011). Analysis of Amyloid- β Peptides in Cerebrospinal Fluid Samples by Capillary Electrophoresis Coupled with LIF Detection. *Anal. Chem*, 83, 1696–1703. <https://doi.org/10.1021/ac102828f>
- Vilakazi, C. S., Dubery, I. A., & Piater, L. A. (2017). Identification of lipopolysaccharide-interacting plasma membrane-type proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.11.025>
- Wada, Y., Kadoya, M., & Okamoto, N. (2012). Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology*, 22(8), 1140–1144. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws086>
- Yen-Nicolaï, S., Boursier, C., Rio, M., Lefeber, D. J., Pilon, A., Seta, N., & Bruneel, A. (2015). MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation: Comparison with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics - Clinical Applications*, 9(7–8), 787–793. <https://doi.org/10.1002/prca.201400187>

Chapitre V : Analyse glycomique de fluides biologiques dans le cadre du dépistage de la maladie d'Alzheimer

I. Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative touchant plus de 35 millions de personnes dans le monde et caractérisée par la présence de plaques amyloïdes (formées par les peptides A β) et par des dégénérescences neurofibrillaires (formées par les protéines Tau et pTau) (voir Chapitre III). Malheureusement, aucun traitement curatif de la MA n'existe à ce jour. Actuellement, les seuls biomarqueurs « validés » de la MA sont les protéines Tau, pTau et le peptide A β -42 présents dans le LCR et mesurés par dosages immunologiques. Tous les essais menés pour diminuer la quantité de peptide A β -42, en augmentant leur clairance ou en diminuant leur production, dans le but de limiter l'apparition des plaques amyloïdes dans le cerveau, n'ont eu que très peu d'effets sur les patients malades. Ainsi, la recherche de nouveaux biomarqueurs de la MA est indispensable et l'une des nouvelles stratégies repose sur l'étude de la glycosylation des protéines. En effet, des modifications de glycosylation de certaines protéines telles que l'APP, la protéine Tau, la clustérine, la transferrine, l'ACHé ont déjà été rapportées dans le cas de la MA (Abou-Abbass *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2015; Nagamine *et al.*, 2016; Schedin-Weiss *et al.*, 2014). L'étude glycomique (non ciblée) de fluides biologiques tels que le plasma ou encore le LCR représente une solution intéressante pour détecter de nouveaux biomarqueurs de cette pathologie (Gizaw *et al.*, 2016; Palmigiano *et al.*, 2018).

Deux méthodes électrophorétiques sont présentées dans ce chapitre pour réaliser l'étude glycomique de fluides biologiques pour le dépistage de la MA c'est-à-dire déglycosyler un échantillon de fluide biologique, dériver les glycanes ainsi libérés par un fluorophore et les analyser par ECG-LIF ou EC-SM.

La première technique exposée correspond à l'ECG-LIF. Il s'agit de la méthode d'électrophorèse capillaire la plus utilisée pour réaliser des analyses glycomiques grâce à un pouvoir de résolution extrêmement élevé permettant de séparer des isomères de position et un temps d'analyse court. L'ECG-LIF a été appliquée à divers échantillons biologiques (plasma et LCR) et a permis d'établir une carte glycomique pour la recherche de nouveaux biomarqueurs de la MA.

Dans un deuxième temps, des premiers essais de développement d'une méthode d'EC-SM pour séparer des glycanes sont exposés. Cette technique s'est focalisée sur la démonstration de la possibilité d'utiliser un nouveau fluorophore, le RapiFluor-MS, en EC-SM. Celui-ci a été développé pour des analyses de N-glycanes en chromatographie HILIC mais n'a jamais été employé en électrophorèse capillaire.

II. Analyse glycomique de fluides biologiques en ECG-LIF

II.1. Introduction

L'ECG-LIF est une technique de choix pour réaliser l'analyse glycomique puisqu'elle a déjà démontré toute son efficacité lors d'études de glycanes libérés (Kovacs et al., 2017; Schwedler et al., 2014; Váradi et al., 2013; Weiz et al., 2016b). La séparation de glycanes libérés par ECG-LIF a été développée au milieu des années 1990 par Guttman *et al.* (Andras Guttman, 1996; András Guttman *et al.*, 1996) et constitue une méthode avec un pouvoir de résolution très élevé. Afin de transférer cette méthodologie au laboratoire, j'ai effectué un séjour de deux mois dans le laboratoire Horváth Csaba Laboratory of Bioseparation Sciences du Pr. Andras Guttman (Université de Debrecen, Hongrie) dans le cadre d'une collaboration financée par Campus France (projet Hubert Curien Balaton). Le laboratoire qui m'a accueillie est celui qui a développé les méthodes de préparation d'échantillon et ECG-LIF et possède toute l'expertise sur cette méthodologie pour permettre son transfert dans les meilleures conditions. Cette partie présente les résultats obtenus grâce à cette collaboration.

La première partie de ce travail traite de l'application de cette méthode ECG-LIF à des échantillons biologiques (plasma et LCR) pour réaliser des études glycomiques pour le dépistage de la MA. Tout d'abord, les performances de la méthode sur une glycoprotéine standard sont démontrées. Puis, les travaux sont séparés en deux sous-parties, l'une focalisée sur les analyses du plasma et l'autre sur le LCR. Cette application aux fluides biologiques a nécessité une optimisation qui est présentée. Puis, la validation de la méthode pour vérifier la bonne répétabilité de l'ensemble du processus de préparation d'échantillon est exposée. Une fois cette méthode validée, la procédure a été appliquée à des patients sains et un patient atteint de la MA et les profils types sont présentés. Enfin, l'identification des différentes structures est donnée et les conclusions tirées après la comparaison des différents profils glycomiques ainsi obtenus sont exposées.

II.2. Principe de la méthodologie

L'analyse de glycanes libérés de glycoprotéines par ECG-LIF repose sur l'utilisation d'un gel permettant d'augmenter la résolution des séparations observées pour des glycanes dérivés par l'APTS. Le groupe de Guttman a développé cette méthode et a proposé à plusieurs reprises des améliorations pour augmenter la sensibilité ou diminuer le temps de préparation par exemple (Bodnar *et al.*, 2016; Jarvas *et al.*, 2016; Kovács *et al.*, 2017; Reider *et al.*, 2018).

Récemment, la préparation des glycanes issus de glycoprotéines et dérivés par un réactif fluorescent a été totalement repensée pour permettre de réaliser l'ensemble du traitement d'échantillon en moins de 4h (Váradi *et al.*, 2014). Cette nouvelle méthode repose sur l'emploi de billes magnétiques présentant une surface greffée avec des groupements acides carboxyliques pour effectuer la purification des glycanes (Figure 39 du chapitre II). En effet, les billes permettent de capturer les glycanes libérés après digestion par la PNGase F en éliminant facilement les protéines issues du fluide biologique ainsi que les protéines déglycosylées. Ces glycanes sont ensuite dérivés par fluorescence. Ces billes sont également capables de les purifier en éliminant l'excès d'APTS utilisé. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'efficacité des billes pour capturer les

glycanes à toutes les étapes de leur préparation. Tout d'abord, les glycanes-APTS devraient être repoussés par les billes acides carboxyliques à cause d'interactions électrostatiques mais grâce à l'emploi d'une très forte concentration en ACN (>80%), considéré comme agent de rassemblement, permet de favoriser les interactions hydrophiles et donc la capture des glycanes libérés. Pour les glycanes libérés après digestion à la PNGase F, des interactions ioniques seraient présentes entre la charge positive de la glycosylamine du glycanes et les charges négatives des acides carboxyliques présents sur les billes. Le protocole ainsi que les réactifs ont été réoptimisés et sont maintenant commercialisés en kit sous le nom de « Fast glycan labeling and analysis kit ». Ce kit permet de réaliser l'ensemble du traitement d'échantillons et l'analyse des glycanes libérés et dérivés par l'APTS en moins de 90min. Une optimisation de l'étape de digestion à la PNGase F a conduit à une forte diminution du temps nécessaire pour la libération des glycanes qui se déroule ainsi en seulement 20min à 60°C au lieu d'une nuit à 37°C habituellement. Une optimisation des conditions de dérivation ont permis d'accélérer la réaction qui se déroule en 20 min à 60°C (Szigeti *et al.*, 2016). La dérivation est réalisée dans des tubes laissés ouverts pour favoriser l'évaporation qui entraîne la concentration des échantillons facilitant ainsi la réaction tout en diminuant la perte des acides sialiques (Reider *et al.*, 2018). L'ensemble des étapes de préparation d'échantillon ne nécessite aucune étape de centrifugation rendant possible ainsi sa complète automatisation à l'aide de robots pipeteurs (Szigeti *et al.*, 2016).

La méthode de séparation emploie un gel de séparation avec une très haute viscosité qui engendre un effet de tamisage permettant une séparation des glycanes liée à leur volume hydrodynamique. Ce nouveau kit proposé a également subi quelques optimisations de la composition du gel de séparation permettant ainsi de réaliser les analyses en 7min contre 20min avec le gel de séparation précédent. Ce nouveau gel garantit une meilleure résolution que le précédent en limitant la diffusion des glycanes, autorisant ainsi l'emploi d'un capillaire plus court pour conserver une résolution identique tout en diminuant les temps d'analyse.

II.3. Matériel et méthodes

II.3.1. Réactifs et consommables

L'acétonitrile (ACN) provient de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). La PNGase F (300 U/mL), le borohydride de sodium (Na CNBH₃, 1M dans le tétrahydrofurane) ont été achetés chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Le kit d'analyse « Fast glycan labeling and analysis » est un produit de Sciex (Framingham, MA, USA). Les capillaires en silice fondue proviennent de chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

II.3.2. Echantillons biologiques

Le pool de plasma d'individus sains a été acheté chez Biopredic International (Saint-Grégoire, France). Le plasma d'une patiente atteinte de la MA a été collecté par l'Hôpital psychiatrique de Debrecen (Hongrie). Les échantillons de LCR de donneurs sains et du patient atteint de la MA ont été collectés par l'Hôpital neurologique de Ulm (Allemagne).

II.3.3. Préparation d'échantillons

La préparation d'échantillon est réalisée à l'aide du kit « Fast glycan labeling and analysis ». Brièvement, les billes CleanSEQ sont re-suspendues et 200µL sont prélevés et placés sur un banc magnétique. Après avoir retiré le surnageant, 10µL d'échantillon sont ajoutés aux billes :

- ✓ Glycoprotéine standard : 10 µL de solution à 10 mg/mL
- ✓ Plasma : plasma dilué par 4 dans de l'eau
- ✓ LCR : LCR dilué par 2 dans de l'eau

La suspension obtenue est mélangée au vortex pendant 10 s (2000 rpm) puis 5 µL d'une solution de dénaturation préparée à partir des réactifs du kit (10 µL de D1, 10 µL de D2, 10 µL de D3 et 50 µL de D4) sont ajoutés pour dénaturer les protéines, réduire leurs ponts disulfures et les alkyliser. Le mélange est vortexé puis incubé à température ambiante pendant 7 min en laissant le vial ouvert. Après dénaturation, 11 µL de D4 et 8,3 µL de PNGase F (300 U_{Sigma}/mL) sont ajoutés puis le mélange est vortexé et incubé pendant 20min à 60°C avec le vial toujours ouvert. Après incubation, le mélange est vortexé pendant 10 s (2000 rpm) puis 200 µL d'ACN sont ajoutés pour favoriser les interactions hydrophiles entre les glycanes et les billes et provoquer ainsi la capture des glycanes par les billes. L'échantillon est à nouveau vortexé pendant 10s (2000 rpm) puis incubé 1min avant de retirer le surnageant à l'aide du banc magnétique. Les billes portant à leur surface les glycanes libérés sont alors re-suspendues avec 9 µL de solution d'acide acétique 20% contenant l'APTS à 40 mM, 1 µL de Na CN BH₃, 1 µL de NP-40 et 0,5 µL d'un standard interne le maltotriose, composé de trois unités de glucose (3 GU). Le marquage par fluorescence est ainsi réalisé pendant 20 min à 60°C avec le vial ouvert. Après dérivation, les billes sont mélangées avec 10 µL d'eau, l'échantillon est vortexé puis 165µL d'ACN sont ajoutés et le mélange est de nouveau vortexé puis le surnageant est retiré les glycanes dérivés étant maintenant capturés sur les billes magnétiques. La même procédure de lavage est répétée 5 fois en resuspendant dans 20 µL d'eau au lieu des 10 µL . Après ces étapes de lavage, l'élution est réalisée à l'aide de 20 µL d'eau dans lesquels les billes sont re-suspendues. L'élution est réalisée avec de l'eau pour briser les interactions hydrophiles faibles. Le surnageant est alors récupéré avant analyse en EC.

II.3.4. Analyse par ECG-LIF

Les analyses en EC ont été réalisées sur un instrument P/ACE TM MDQ (Sciex) équipé avec un détecteur à fluorescence induite par laser avec une longueur d'onde d'excitation à 488nm et d'émission à 520 nm. Les capillaires de 50µm de diamètre interne et de longueur effective 50 cm (longueur totale de 60,2 cm) ont été utilisés. Le logiciel d'acquisition et de traitement des data est 32 Karat™ version 7.0 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK). Les analyses ont été effectuées sur instruments et des capillaires différents, avec des gels différents également, expliquant les variations de temps de migration ainsi que les changements d'intensité observés entre les différents résultats présentés. Néanmoins, chaque série d'analyse commence par la séparation d'un calibrant de dextran et chaque échantillon contient un standard interne permettant de recalibrer toutes les analyses en temps de migration permettant de s'affranchir ainsi des différences observées d'une série d'analyses à une autre.

Le capillaire de silice fondue neuf est tout d'abord préconditionné avec de l'eau, NaOH à 1M, eau, HCl à 0,1M, eau puis le gel de séparation pendant 5 min à 80 psi. Avant chaque analyse, le

capillaire est rincé pendant 3 min à 80 psi avec le gel. Ensuite l'injection hydrodynamique de l'échantillon de 10s à 2 psi est exécutée. Les extrémités du capillaire sont alors rincées par de l'eau. La co-injection du standard « bracketing » (BST), qui contient deux oligomères du glucose (2GU et 15GU) dérivés par l'APTS est effectuée de manière hydrodynamique à 2psi pendant 10s. Les extrémités du capillaire sont de nouveau rincées par de l'eau puis la séparation est effectuée à -30kV (polarité inverse) pendant 25min. Après chaque analyse le capillaire est rincé avec de l'eau 5 min à 50 psi.

II.4. Vérification de l'efficacité du kit sur différentes matrices

II.4.1. Analyse d'une IgG humaine standard

Afin de vérifier l'efficacité du kit en termes de déglycosylation et de dérivation par fluorescence des essais sur une IgG humaine standard ont été réalisés puis analysés par ECG-LIF (Figure 88). En effet, la méthode de préparation d'échantillon ayant déjà été validée sur un échantillon d'IgG standard, cette analyse permet de vérifier la bonne prise en main de la méthodologie. Le profil obtenu présente 14 pics, observés entre 13 et 19min avec des intensités élevées confirmant ainsi la bonne efficacité de l'ensemble du processus de préparation d'échantillon. En effet, la saturation du standard interne 3GU indique que la dérivation a été efficace. Le profil est similaire à celui présenté dans la brochure du kit confirmant la bonne prise en main de la méthode.

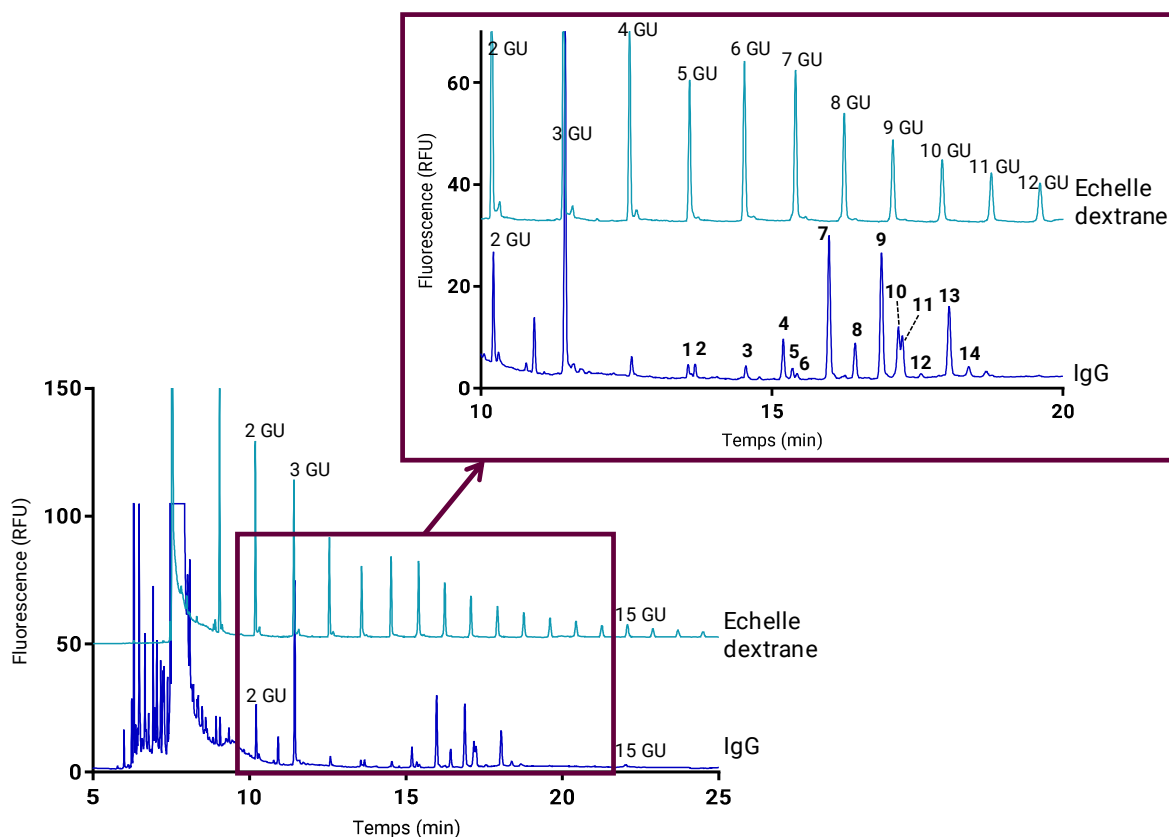


Figure 88 : Profils obtenus en ECG-LIF pour une échelle dextrane et des glycanes issus d'IgG standard (10 mg/mL) et dérivés par l'APTS en présence du standard interne (3GU) et du BST (2GU et 15GU), conditions : $L_{eff}=50cm$, $\varnothing=50\mu m$, -30kV.

Le profil obtenu pour l'IgG a été traité avec l'application GUcal récemment développée (Jarvas *et al.*, 2015)(<https://lendulet.uni-pannon.hu/index.php/tools>) pour identifier les différents glycanes présents sous les 14 pics (Tableau VI). Ce logiciel permet de transformer les temps de migration des pics en valeurs d'unité de glucose (GU) pour chacun des glycanes détectés. Ce calcul du nombre de GU est réalisé à partir de la comparaison des temps de migration des analytes avec ceux d'une échelle dextrane (mélange d'oligomères linéaires du glucose compris entre 2 GU et 15 GU) utilisé comme calibrant et analysé dans les mêmes conditions. Néanmoins, afin d'effectuer l'acquisition d'un profil de l'échelle dextrane pour la calibration une seule fois par jour, l'utilisation d'un standard interne, composé de trois résidus glucose (3 GU) ajouté à l'échantillon avant dérivatisation est nécessaire. La précision de la calibration des échantillons est également améliorée en réalisant la co-injection avec l'échantillon d'un standard BST contenant à la fois des oligomères de 2 et 15 résidus glucose (2GU et 15GU) (Jarvas *et al.*, 2016). Ces deux standards encadrant à l'intérieur de leur fenêtre de détection l'ensemble des pics de glycanes détectés. Après calcul du nombre de GU pour chaque pic, le logiciel propose également la structure glycanique associée à cette valeur de GU.

Les structures ainsi identifiées correspondent à celles présentées dans la note d'application du kit (Guttman *et al.*, 2018). Cette méthode permet d'obtenir une excellente résolution, même pour des glycanes très proches tels que des isomères de position d'un Gal sur une antenne GlcNAc en alpha1,3 ou 1,6 pour les pics 9 et 10 ou 11 et 12, ou ne différenciant que de 0,08 GU comme pour les pics 1 et 2.

Tableau VI : Attribution putative des structures pour chacun des pics du profil des glycanes d'IgG

Pic n°	Structure glycanique	Pic n°	Structure glycanique
1		8	
2		9	
3		10	
4		11	
5		12	
6		13	
7		14	

II.4.2. Analyse du plasma

La mise en place de la méthode pour l'étude de plasma humain a nécessité quelques ajustements par rapport au protocole classique. En effet, lors de l'étude d'une glycoprotéine standard telle que l'IgG, la préparation d'un échantillon pur ne pose pas de difficulté particulière. Dans le cas du plasma, lorsque celui-ci est utilisé directement sans prétraitement, des problèmes d'agrégation des billes magnétiques sont notés dès l'étape de dénaturation des protéines. En effet, les nombreux sels et protéines présents dans le plasma rendent l'échantillon très visqueux,

entraînant alors l'agrégation des billes (Figure 89). La préparation d'échantillon est alors moins efficace voire totalement inefficace puisqu'aucun pic n'est détecté en ECG-LIF. En effet, les billes ont une surface active beaucoup plus faible lorsqu'elles sont mal re-suspendues, ce qui engendre une faible capture des glycanes et donc le faible rendement observé en ECG-LIF.

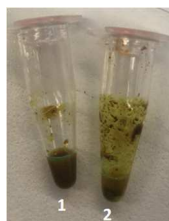


Figure 89 : Comparaison de l'aspect des billes magnétiques lors de la dérivation pour une IgG standard (1) et pour le plasma sans prétraitement (2)

Afin de prévenir ce phénomène, la dilution du plasma avec de l'eau avant le traitement d'échantillon s'avère indispensable. Deux facteurs de dilution (2 ou 4) ont donc été testés. La dilution du plasma permet de limiter les phénomènes observés précédemment et une dilution par 4 semble même encore plus efficace car elle permet aux billes magnétiques de retrouver le même aspect que lors du traitement d'une glycoprotéine standard. Les résultats obtenus montrent que des profils similaires sont observés avec les deux facteurs de dilution donnés (Figure 90). Seuls les pics ayant une aire relative ($A_{\%}$) supérieure à 1% ont été considérés.

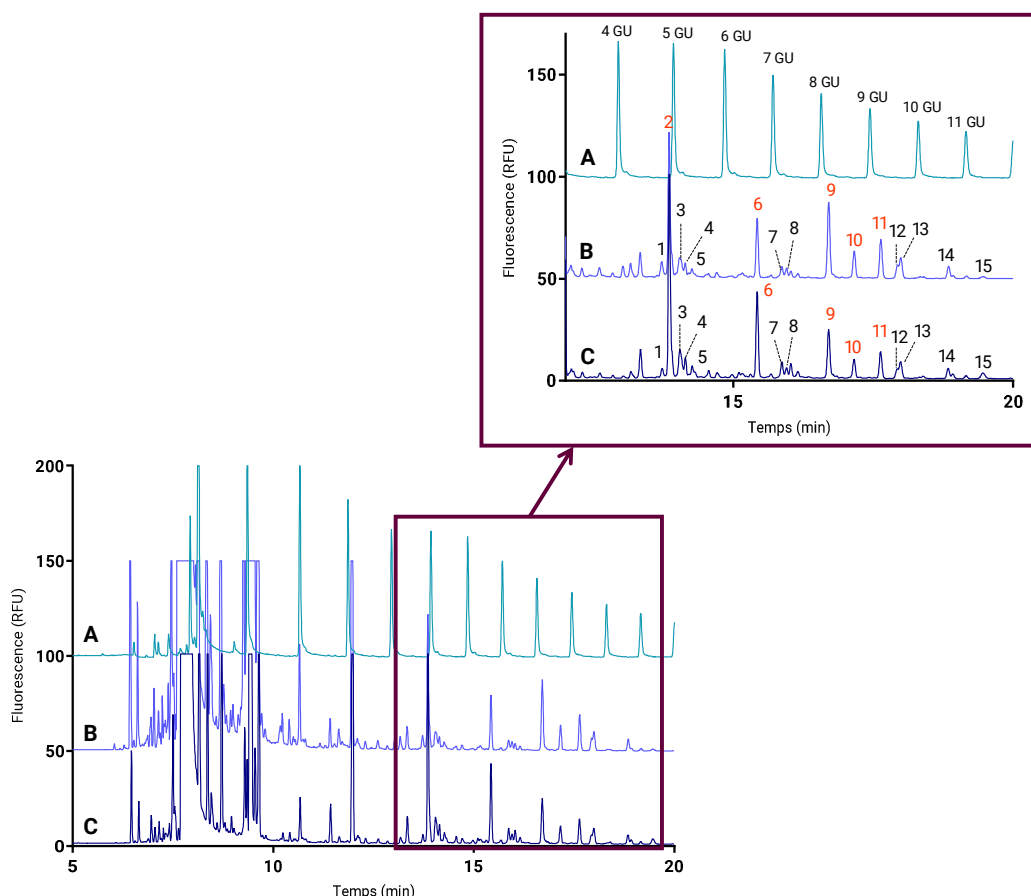


Figure 90 : Profils ECG-LIF obtenus pour l'échelle dextrane (A) et les glycanes issus des préparations d'échantillon à partir de plasma dilué par 2 (B) ou par 4 (C) (noir : pics minoritaires avec $A_{\%} < 5\%$ et orange : pics majoritaires avec $A_{\%} \geq 5\%$), conditions : $L_{eff}=50cm$, $\varnothing=50\mu m$, $-30kV$, $2,5\mu L$ de plasma

Il est à noter cependant que les A% des pics varient et ces modifications liées au passage d'une dilution par un facteur 2 à un facteur 4 sont rassemblées dans le Tableau VII. Il apparaît que tous les pics subissent une variation quand le facteur de dilution augmente. Les 8 premiers pics, entre 13,8 et 15,8 min, représentant des glycanes sialylés, sont plus abondants pour une dilution par 4 avec une variation moyenne de 15,2%. A l'inverse, les pics (9 à 15) migrant à partir de 16min et correspondant à des glycanes non-sialylés voire tronqués ont des A% plus faibles avec une dilution d'un facteur 4 avec une variation moyenne de 25,9%. La dilution semble donc changer la sélectivité de la méthode et favoriser la détection d'espèces sialylées lorsqu'elle est plus importante. La dénaturation est peut-être plus efficace lorsque le plasma est plus dilué et que les sels interfèrent moins sur les billes magnétiques, ce qui permet d'obtenir une plus grande efficacité du clivage à la PNGase F.

Tableau VII : Variations des A% observées pour les pics du profil de plasma en passant d'une dilution par un facteur 2 à un facteur 4

Pic n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Variation observée (%)	-57,6	+18,8	+8,5	+15,0	+14,8	+16,2	+17,8	-1,9	-41,2	-34,3	-33,4	-23,7	-21,5	-25,1	+60,9

Après avoir comparé les deux profils, la dilution par 4 permet de prendre en compte l'A% d'un 15^{ème} pic (A%=1,54%), qui est négligé lors de la dilution par 2 (A%=0,61%). De plus, il apparaît que la dilution d'un facteur 4 permet de faciliter la préparation d'échantillon en limitant encore davantage les phénomènes d'agrégation des billes magnétiques que le facteur 2. La dilution d'un facteur 4 a donc été choisie pour le reste des manipulations afin de limiter tout biais analytique dû à la préparation d'échantillons lors de la comparaison des profils de patients sains à des patients malades.

Une étude de répétabilité de la procédure de préparation d'échantillons biologiques a été menée pour s'assurer que la méthode est utilisable dans cette étude. En effet la procédure de préparation d'échantillon a déjà été employée sur des échantillons biologiques mais généralement sur une protéine enrichie issue d'un fluide (Kovacs *et al.*, 2017) ou sur une protéine standard. La procédure a été réalisée six fois sur un pool de plasma humain (avec une dilution par 4). Les profils obtenus ont été comparés en termes de temps de migration (t_m) et d'A% des différents pics en ne considérant que les pics suffisamment abondants (*i.e.* avec une A% >1%). Sur les profils, 15 pics sont détectés et utilisés pour vérifier la répétabilité de la méthode (Tableau VIII). Il faut toutefois noter que cette méthode est bien moins sensible que la SM MALDI-TOF qui permet en général de détecter plus de 45 glycanes dans le plasma (Borelli *et al.*, 2015; B. C. Jansen *et al.*, 2016). Avec cette méthode d'ECG-LIF, seuls les glycanes les plus abondants sont considérés, cependant, de nombreuses autres espèces sont détectées mais leur aires sont trop faibles pour assurer une répétabilité suffisante. Un exemple de profil obtenu est présenté en Figure 91.

Tableau VIII : Temps de migration (t_m) et aires relatives (A%) des 15 pics détectés dans le plasma dilué par 4 obtenus par ECG-LIF

Pic n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
t_m (min)	16,21	16,32	16,45	16,56	16,70	17,06	17,57	18,07	18,60	19,48	20,01	20,23	20,62	20,97	22,07
A% (%)	21,8	3,1	3,5	5,1	1,2	2,6	3,6	6,3	3,6	11,9	2,8	1,3	11,9	7,9	8,0

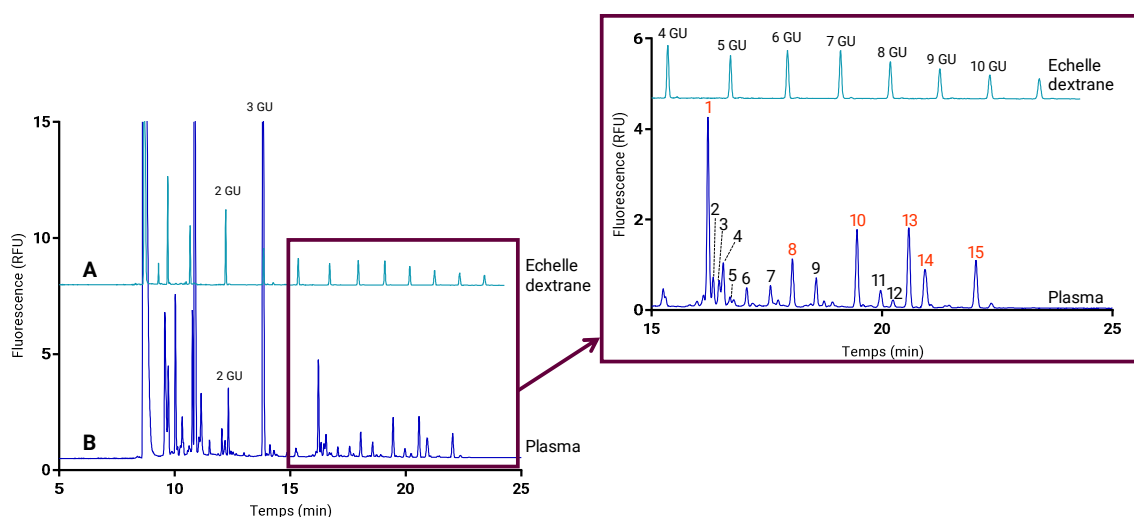


Figure 91 : Profils ECG-LIF obtenus pour l'échelle dextrane (A) et les glycanes dérivés par l'APTS issus de 2,5 μ L de plasma humain (B) et agrandissement de la zone des glycanes compris entre 15 et 25min avec leur numérotation (noir : pics minoritaires en avec $A\% < 5\%$ et orange : pics majoritaires avec $A\% \geq 5\%$), conditions : $L_{eff}=50cm$, $\varnothing=50\mu m$, $-30kV$

Une analyse des profils obtenus pour le plasma a montré que la méthode est répétable ($n=6$), aussi bien en t_m ($CV < 0,2$ et $0,3\%$ pour les pics majoritaires et minoritaires respectivement) qu'en $A\%$ ($CV < 3,8-9,6\%$ et $3,1-5,7\%$ pour les pics majoritaires et minoritaires respectivement). Les résultats obtenus pour la répétabilité de t_m et $A\%$ sont comparables à ceux présentés dans la littérature pour une IgG standard (Váradi *et al.*, 2014). Cette méthode semble donc tout à fait adaptée pour le traitement de fluides biologiques, tels que le plasma, pour réaliser une étude comparative de patients si une dilution du plasma par 4 est effectuée.

II.4.3. Analyse du LCR

L'analyse de LCR est tout à fait intéressante dans le cadre de l'étude d'une pathologie neurologique puisque ce fluide est au plus proche du cerveau, organe touché dans la MA. La préparation d'échantillons de LCR humain a nécessité encore un ajustement par rapport au protocole classique. Cette fois-ci, le facteur de dilution sélectionné pour limiter les phénomènes d'agrégation des billes est de 2 car les glycoprotéines sont moins concentrées dans le LCR que dans le plasma. La procédure complète de préparation des échantillons a donc été réalisée six fois sur un pool de LCR humain issus de donneurs sains (mélange de 6 individus) (avec une dilution par 2). Les profils obtenus ont été comparés en termes de t_m et d' $A\%$ des différents pics comme pour le plasma. Sur les profils, 16 pics sont ainsi détectés (Tableau IX) et considérés pour vérifier la répétabilité de la méthode et un exemple de profil type est montré en Figure 92.

Tableau IX : Temps de migration (t_m) et aires relatives ($A\%$) des 16 pics détectés dans le LCR

Pic n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
t_m (min)	14,83	15,73	16,13	16,89	17,49	17,64	18,10	18,65	18,77	19,90	20,98	21,35	21,52	22,07	23,16	24,25
$A\%$ (%)	14,9	4,6	14,5	1,5	8,7	1,5	6,7	9,2	6,8	6,7	5,7	1,7	4,3	5,0	4,6	3,6

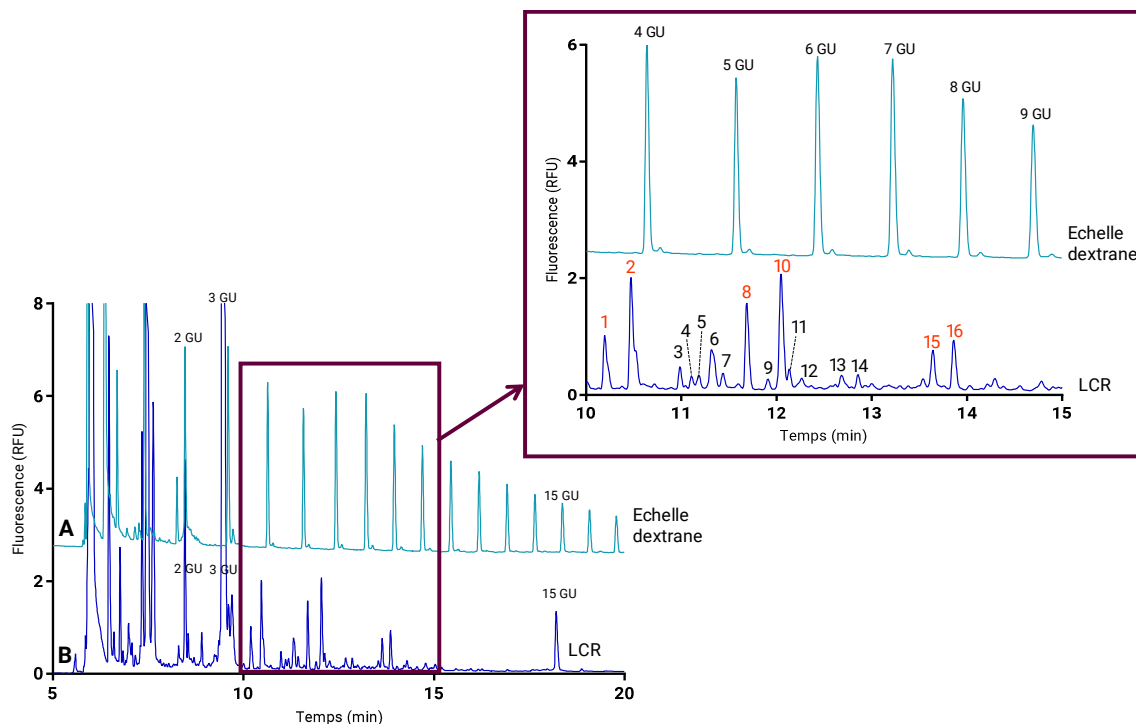


Figure 92 : Profils obtenus pour l'échelle dextrane (A) et les glycanes dérivés par l'APTS issus de 5 μ L de LCR humain (B) et agrandissement de la zone des glycanes compris entre 10 et 15min avec leur numérotation (noir : pics minoritaires avec $A_{\%} < 5\%$ et orange : pics majoritaires avec $A_{\%} \geq 5\%$), conditions : $L_{eff}=50\text{cm}$, $\varnothing=50\mu\text{m}$, -30kV.

La méthode semble répétable au niveau des t_m et des $A_{\%}$. Les résultats obtenus ont montré une excellente répétabilité des t_m pour les pics majoritaires ($CV < 0,6\%$) et minoritaires ($CV < 0,8\%$), comparables à celles calculées pour le plasma. Pour ce qui est des $A_{\%}$, les résultats sont moins satisfaisants puisqu'une plus grande variabilité est observée à la fois pour les pics majoritaires ($CV < 3,6-5,9\%$) et minoritaires ($CV < 10,4-13,3\%$). Néanmoins, cette méthode semble donc tout de même adaptée pour comparer les LCR de patients. Les glycanes détectés sont identiques à ceux rapportés dans la littérature pour le LCR (Fogli *et al.*, 2012; Goyallon *et al.*, 2015; Palmigiano *et al.*, 2016, 2018). Il est à noter que de plusieurs N-glycanes « brain-type » présentant un GlcNAc en position bissectrice sont détectés, ces glycanes sont très abondants dans le LCR et beaucoup moins dans les autres fluides biologiques.

II.5. Application à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer

II.5.1. Cas du plasma

C'est avec l'objectif de réaliser une étude glycomique sur une cohorte de patients atteints de la MA que la collaboration avec la Hongrie est née. Malheureusement, la gestion administrative des demandes d'approbation des protocoles par les comités d'éthique n'a pas permis de récolter les échantillons d'intérêt dans les temps. Ainsi, l'étude glycomique n'a pu être réalisée que sur une seule patiente atteinte de la MA. Néanmoins, les résultats obtenus sont présentés dans cette partie.

La procédure de traitement d'échantillon a été réalisée pour les deux types de patients (sain et MA) et les profils EC obtenus sont présentés en Figure 93. Le profil sain correspond à l'analyse d'un

pool de donneurs sains (6 individus) permettant de s'affranchir des variations inter-individus et avoir un profil réellement représentatif des donneurs sains. Comme attendu, la méthode est très répétable au niveau des temps de migration des 15 pics étudiés et la comparaison des A% a été effectuée. Le Tableau X rassemble les variations d'A% observées pour chacun des pics dans le profil du patient atteint de la MA par rapport à celui des individus sains. Il apparaît que quatre pics restent constants (numéro noir sur le profil MA et dans le Tableau X) tandis que la majorité d'entre eux présentent une augmentation (numéro vert sur le profil MA et Tableau X) ou une diminution (numéro orange sur le profil MA et Tableau X) de leur A%. Les pics présentés comme ayant une A% constante sont ceux dont la variation observée est inférieure au CV défini lors de l'étude de la répétabilité de la préparation d'échantillon.

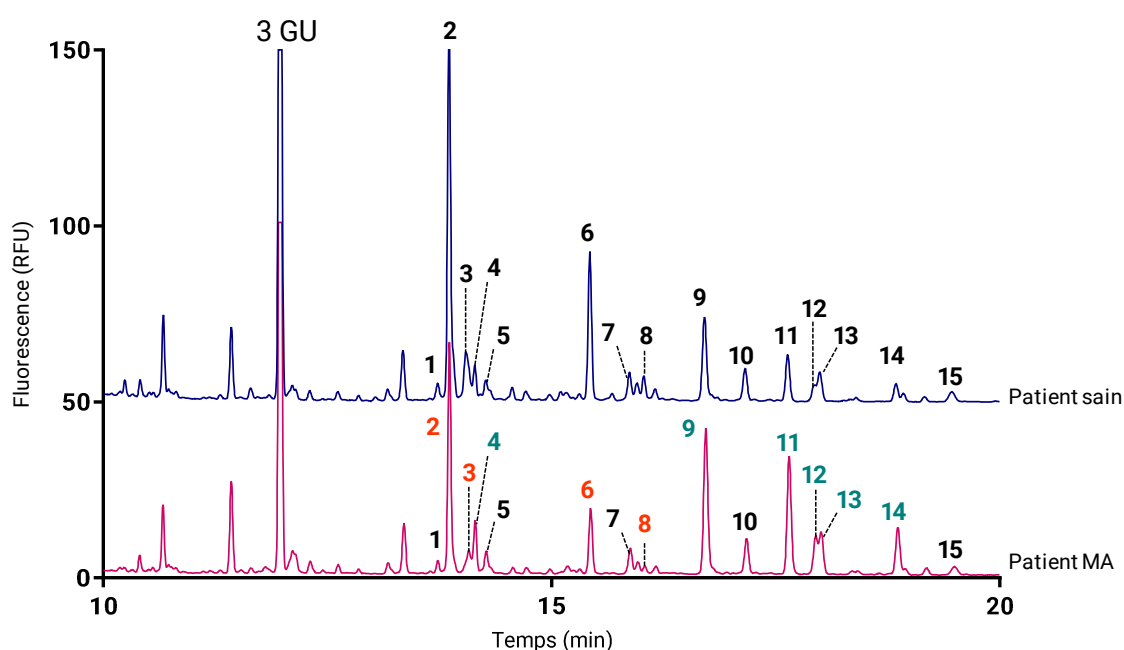


Figure 93 : Comparaison des profils obtenus par ECG-LIF pour les glycanes issus du plasma d'un donneur sain et d'un patient atteint d'AD. Les pics des glycanes sont numérotés et colorés en fonction de la modification de A% observée chez le patient MA par rapport au patient sain (orange : A% diminuée et vert : A% augmentée), conditions : $L_{eff}=50\text{cm}$, $\varnothing=50\mu\text{m}$, -30kV .

Tableau X : Variations des aires relatives observées pour les 15 pics du plasma dans le profil du patient atteint de la MA par rapport à celui de l'individu sain

Pic n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Variation observée (%)	-6,5	-20,8	-69,0	+33,7	-4,2	-37,6	+8,2	+48,7	+40,2	+5,6	+61,7	+65,8	-21,5	+74,0	+8,5

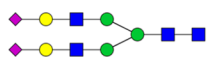



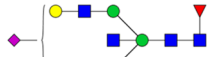



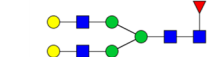
Afin de connaître les glycanes présents sous les pics ayant une modification d'A%, un traitement des électrophorégrammes à l'aide du logiciel GUcal a été réalisé. Ces pics ainsi que leurs structures associées, sont rassemblés dans le Tableau XI. Cette analyse a permis de montrer que le patient atteint de la MA semble présenter deux modifications de glycosylation. La première modification observée consiste en une augmentation des formes ayant un GlcNAc en position bissectrice (pics 4 et 8) par rapport au donneur sain. Cette hausse du pourcentage de glycanes avec un GlcNAc en position bissectrice a déjà été rapportée notamment au niveau du cerveau et du LCR

pour des patients atteints de la MA (Akasaka-Manyu *et al.*, 2010; Palmigiano *et al.*, 2018). Ce type de glycane serait plus abondant à cause d'une surexpression de la GnT-III.

La seconde modification détectée correspond à une diminution de la sialylation notamment des glycanes bi-antennés mono- ou bi-sialylés (pics 2, 3 et 6). Cette hyposialylation a déjà été montrée dans la littérature pour le sérum de patients atteints de la MA et serait due à une baisse de l'activité des sialyltransférases solubles (sialyltransférases α -2,3 et α -2,6) entraînant une diminution générale de la sialylation des protéines notamment de la Tf (Fodero *et al.*, 2008).

Enfin, une dernière modification est mise en évidence par cette étude, il s'agit de l'augmentation des formes tronquées (pics 9, 11, 12, 14). Cette modification n'a pas été rapportée dans la littérature pour la MA.

Tableau XI : Récapitulatif des pics de glycanes pour lesquels des variations de A% sont observées en comparant le patient MA avec l'individu sain avec leur temps de migration, le nombre de GU, la structure du glycane ainsi que le pourcentage de variation observée (orange variation négative, vert variation positive) associés.

Pic n°	t _m (min)	GU	Structure glycane	Variation observée
2	13,85	4,63		-20,8%
3	14,07	4,83		-69,0%
4	14,15	4,90		+33,7%
6	15,43	6,22		-37,6%
8	16,04	6,87		+48,7%
9	16,72	7,65		+40,2%
11	17,65	8,73		+61,7%
12	17,94	9,07		+65,8%
14	18,86	10,12		+74,0%

Ces premiers résultats sont plutôt encourageants et suggèrent que des modifications de glycosylation sont sans doute présentes chez des patients atteints de la MA. Afin de s'assurer que ces modifications sont bien relatives à la MA et non à une variation inter-individus, il faudrait s'en assurer en étudiant une cohorte d'au moins une cinquantaine de patients afin de réaliser des tests statistiques pour montrer la pertinence des variations observées.

II.5.2. Cas du LCR

La même procédure que celle appliquée au plasma a été effectuée sur des échantillons de LCR. Un patient atteint de la MA a été étudié et comparé à un pool de donneurs sains. Les profils ainsi obtenus sont présentés en Figure 94. Comme attendu, la méthode est très répétable au niveau des temps de migration des 16 pics étudiés et leurs variations de A% sont présentés dans le Tableau XII. De même que pour le plasma, certains pics restent constants en termes de A% (numéro noir sur le profil MA), d'autres ont une augmentation (numéro vert sur le profil MA) ou une diminution (numéro orange sur le profil MA).

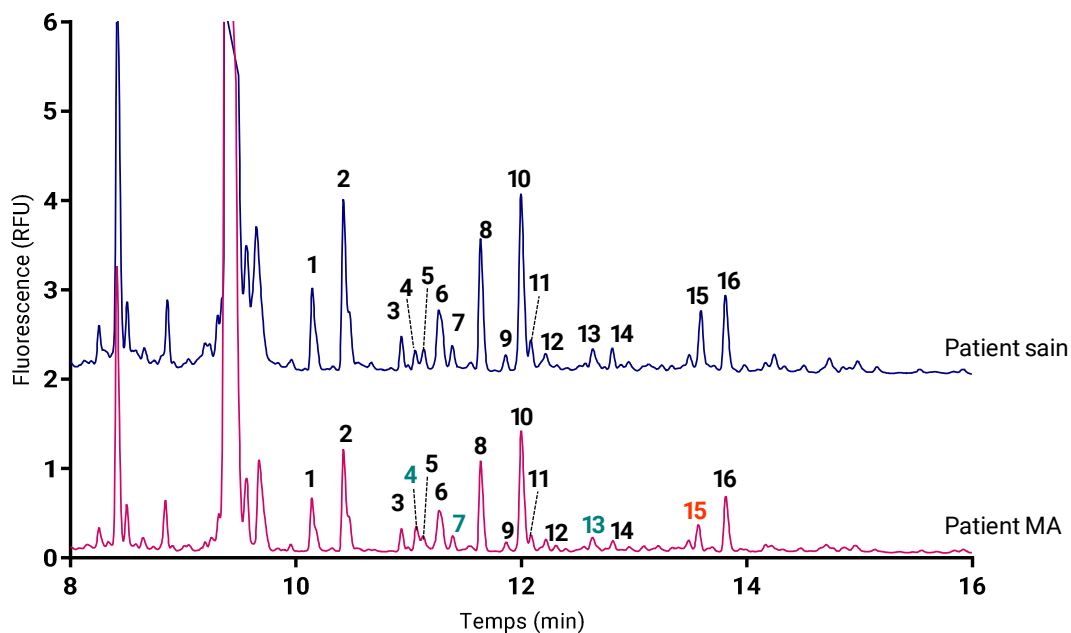
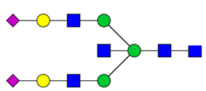
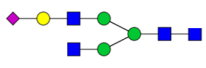
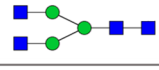



Figure 94 : Comparaison des profils obtenus par ECG-LIF pour les glycanes issus d'un LCR de donneur sain et de patient atteint d'AD. Les pics des glycanes sont numérotés et colorés en fonction de la modification de A% observée (orange : A% diminuée et vert : A% augmentée), conditions : $L_{eff}=50\text{cm}$, $\varnothing=50\mu\text{m}$, -30kV

Comme précédemment, les électrophorégrammes ont été traités par le logiciel GUcal pour identifier les différents glycanes présents. Les pics, pour lesquels des variations de A% ont été observées (uniquement des glycanes bi-antennés) sont présentés dans le Tableau XII ainsi que leurs structures associées. Les pics 1 et 2 ne sont pas considérés car leur identification n'est pas réalisable avec le logiciel GUcal car elles correspondent probablement à des structures tri-antennées.

Les modifications observées dans le LCR sont identiques à celles déjà présentées lors de l'analyse du plasma. En effet, on note tout d'abord une augmentation d'un glycanes avec un GlcNAc en position bissectrice (pic 4) par rapport à l'individu sain. La seconde modification détectée correspond à une augmentation du glycanes mono-sialylé (pic 7) ainsi que des glycanes tronqués (pic 13 et 15) soulignant la diminution de la sialylation des glycanes présents.

Tableau XII : Récapitulatif des pics de glycanes pour lesquels des variations de A% sont observées en comparant le patient MA avec l'individu sain avec leur temps de migration, le nombre de GU, la structure du glycanes ainsi que le pourcentage de variation observée (orange variation négative, vert variation positive) associés.

Pic n°	t _m (min)	GU	Structure glycanes	Variation observée
4	11,06	4,70		+35,6%
7	11,39	5,24		+14,7%
13	12,63	6,67		+22,5%
15	13,57	8,04		-36,3%

II.6. Conclusion

La nouvelle méthode de préparation de glycanes ainsi que la méthode de séparation par ECG-LIF sont tout à fait efficaces pour réaliser des analyses glycomiques de fluides biologiques tels que le plasma ou le LCR. En effet, la procédure de préparation d'échantillon montre une répétabilité excellente en termes de t_m et satisfaisante pour les A%. Cette nouvelle technique permet de préparer les échantillons très rapidement et s'avère ainsi parfaitement adaptée à l'étude de larges cohortes. D'ailleurs, une complète automatisation de la procédure a été réalisée à l'aide de robots pipeteurs sur des plaques 96 puits. Cependant, il faut noter qu'une optimisation est toujours nécessaire lors de l'application à un nouveau type de fluide biologique notamment pour limiter les phénomènes d'agrégation des billes magnétiques observés. Celle-ci est provoquée par la grande concentration de sels qui engendrent des phénomènes électrostatiques qui peuvent être limités par la dilution ou la filtration du fluide biologique initial. Néanmoins, il faut trouver le bon compromis entre limiter l'agrégation et conserver une quantité suffisante de glycoprotéines lors de la détermination du facteur de dilution à appliquer. Cette méthode est suffisamment sensible pour la plupart des glycanes, compte-tenu du très faible volume de fluide biologique de départ (2,5µL pour le plasma et 5µL pour le LCR). Cependant, certains pics présentent des aires très faibles. L'emploi d'une méthode d'enrichissement de glycanes ou glycoprotéines très peu abondants dans certains fluides biologiques peut s'avérer parfois nécessaire.

Les premiers essais menés sur le plasma et le LCR de patients atteints de la MA ont été très informatifs. En effet, ces cartes glycomiques réalisées par ECG-LIF ont permis d'obtenir une première image des modifications liées à la MA. Deux des phénomènes montrés lors de cette étude correspondent à des modifications de glycosylation déjà rapportées dans la littérature. Ainsi, on a noté tout d'abord une diminution de la sialylation globale due à une plus faible abondance des glycanes bi- et monosialylés à la fois dans le plasma et le LCR des patients atteints de la MA. Cette altération de la sialylation a déjà été décrite pour le LCR et le cerveau (Fodero *et al.*, 2008; Frenkel-Pinter *et al.*, 2017) et serait due à une diminution de l'abondance des sialyltransférases en cas de MA (Maguire *et al.*, 1994). Une augmentation de formes présentant un GlcNAc en position bissectrice a également été mise en évidence dans le plasma et le LCR de patients atteints de la MA.

De même, cette altération a été rapportée dans d'autres études et serait due à une surexpression de la GnT-III qui est responsable de l'ajout du GlcNAc en position bissectrice et empêche l'action des autres GnT après elle conduisant à la formation d'espèces moins branchées (Gizaw *et al.*, 2016; Palmigiano *et al.*, 2016, 2018). Enfin, une augmentation de l'abondance de formes tronquées a également été observée pour le plasma mais cette modification de la glycosylation n'a jamais été rapportée dans la littérature. Le LCR est néanmoins un fluide biologique plus intéressant pour étudier une maladie neurodégénérative de part sa proximité à le cerveau.

Ces premiers résultats sont très encourageants et semblent en accord avec les études précédentes déjà présentées dans la littérature. Néanmoins, un seul patient atteint de la MA a été étudié ici pour chacun des fluides biologiques. Il est indispensable de réaliser cette étude sur une cohorte de patients plus large pour réaliser une étude statistique plus approfondie afin de confirmer que les altérations de glycosylation observées sont bien liées à la MA et non à des variations inter-individus.

Cette nouvelle méthode de traitement d'échantillon ainsi que l'analyse par ECG-LIF constituent donc une approche simple et rapide pour étudier les modifications de glycosylation de protéines dans les fluides biologiques associées à certaines pathologies. Cependant, l'identification des glycanes est assez longue (utilisation de standards et du logiciel GUcal) et l'utilisation d'une technique d'EC couplée à la SM permettrait de surmonter les difficultés d'identification.

III. Développement d'une méthode de séparation de glycanes libérés par EC-SM

III.1. Introduction

Une autre stratégie, employant l'EC-SM, peut également être envisagée pour réaliser une étude glycomique de fluides biologiques dans le cadre du dépistage de la MA. En effet, le couplage à la SM permet de simplifier les étapes d'identification des espèces généralement complexe lors d'analyses par ECG-LIF. La dernière partie de ce travail de thèse s'est donc focalisée sur le début du développement d'une méthode de séparation en EC-SM de glycanes dérivés par un nouveau fluorophore, le RapiFluor-MS. Ce nouveau marqueur fluorescent n'a actuellement été employé que lors de séparations des N-glycanes issus d'anticorps monoclonaux à l'aide de chromatographie HILIC avec détection par fluorescence ou SM (Keser et al., 2018; Lauber et al., 2015; S. Zhou et al., 2017) mais jamais lors d'une séparation électrophorétique. L'objectif est donc de proposer une alternative à la méthode d'ECG-LIF pour étudier les glycanes issus d'échantillons biologiques. En effet, la grande sensibilité de ce fluorophore permet peut-être de détecter les glycanes très peu abondants présents dans les fluides biologiques et qui ne peuvent pas l'être par la méthode d'ECG-LIF

Après quelques notions générales sur le fluorophore RFMS développé récemment, le développement de la méthode de séparation des glycanes dérivés est présenté. Les premières optimisations du tampon de séparation ou encore du revêtement du capillaire réalisés en EC-UV sont exposées. Les paramètres du spectromètre de masse ont également été optimisés. La

performance de cette méthode EC-SM a été montrée par l'application à un échantillon issu d'un anticorps monoclonal standard.

III.2. Intérêt du RapiFluor-MS (RFMS)

Le RapiFluor-MS a été formulé par Waters pour augmenter la sensibilité de détection des N-glycanes en dérivant les fonctions glycosylamines. En effet, sa structure a été construite autour de trois fonctions chimiques pour apporter trois propriétés complémentaires (Figure 95) :

- ✓ La fluorescence grâce à la quinoléine (Cohen & Michaud, 1993)
- ✓ La sensibilité en SM en mode d'ionisation positif grâce à l'amine tertiaire (S. Zhou et al., 2017)
- ✓ La rapidité de la réaction de dérivatation des fonctions glycosylamines avec le carbamate NHS (Hermanson, 2013).

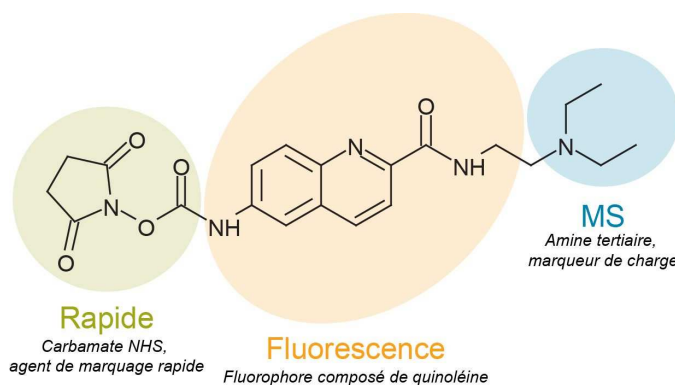


Figure 95 : Structure du RFMS et ses différentes propriétés d'après ("Kit GlycoWorks RapiFluor-MS pour l'analyse des N-glycanes : Waters," n.d.)

La dérivatation par le carbamate engendre la formation d'une liaison de type urée, très stable dans le temps (au moins 3j à 10°C), entre le glycane et le RFMS en seulement 5 min (Lauber *et al.*, 2015) (Figure 96). La préparation des glycanes (dénaturation, déglycosylation, dérivatation et purification) se déroule en moins de 30 min avec un rendement estimé à 73%.

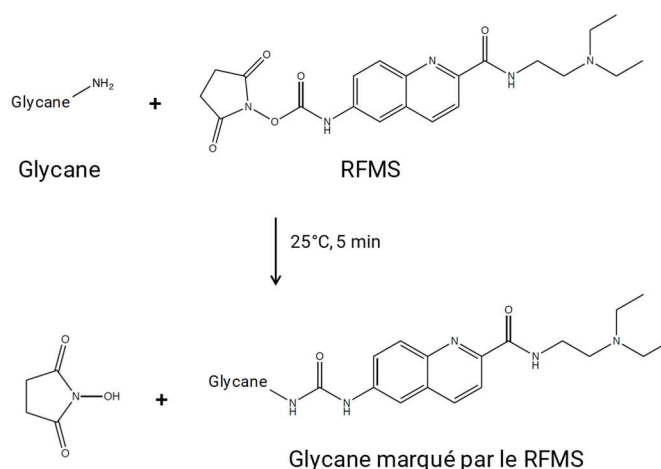


Figure 96 : Réaction de dérivatation d'un glycane par le RFMS

Ce fluorophore présente d'excellents facteurs de réponse aussi bien en fluorescence qu'en SM. Ainsi, il permet d'obtenir un signal 14 fois et 160 fois plus intense en fluorescence et SM respectivement par rapport au 2-AB qui est le fluorophore le plus utilisé lors d'analyses de glycanes par HPLC couplée à une détection par fluorescence. Il permet d'atteindre des LOD de l'ordre de 10 fM de glycanes-RFMS en SM. Le RFMS a été développé pour réaliser des applications en SM en mode d'ionisation positif grâce à la présence d'une amine tertiaire qui peut se charger positivement.

Aucun développement en EC n'a été réalisé avec ce fluorophore. Il a pourtant toutes les qualités nécessaires, à savoir la fluorescence et l'apport de charge, pour son utilisation avec une méthode électrophorétique. Cependant, l'apport de charges positives n'est pas habituel lors de la dérivation des glycanes avant séparation par EC qui est généralement effectuée par des fluorophores apportant des charges négatives (par exemple le 2-AA ou l'APTS).

III.3. Développement de la méthode

III.3.1. Matériel et méthodes

III.3.1.1. Produits et consommables

L'acétate d'ammonium (>99%), l'acide formique (>98%), l'acide acétique (>98%), l'hydroxyde d'ammonium (>25%) ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). L'acétonitrile (ACN), l'acide chlorhydrique (1M) et l'hydroxyde de sodium (1M) proviennent de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Tous les tampons sont préparés avec de l'eau déionisée préparée avec un système de purification d'eau Direct-QR 3 de chez Millipore (Billerica, MA, USA).

Les capillaires en silice fondue proviennent de chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) et les capillaires avec un revêtement en alcool polyvinylique (PVA) de chez Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Le kit « GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan » a été acheté chez Waters (Milford, MA, USA) et contient l'anticorps monoclonal standard (mAb), le RapiFluor-MS (RFMS), la PNGase F, la diméthylformamide (DMF) et la plaque de SPE HILIC de 96 puits. Le standard d'échelle dextrane dérivée au RFMS a également été acheté chez Waters.

III.3.1.2. Dérivation avec le RapiFluor-MS

Le vial de mAb est reconstitué dans 500µL d'eau (2 mg/mL). Les échantillons de glycoprotéines standard doivent également avoir une concentration à 2 mg/mL. Le RapiGest est solubilisé dans 200 µL de tampon GlycoWorks rapide (5% w/v).

Tout d'abord, 15,3 µL d'eau sont placés dans un vial et 7,5 µL de la glycoprotéine standard ou du mAb sont ajoutés suivis de 6µL de la solution de RapiGest (5% w/v) puis le mélange est dénaturé pendant 3 min à 90°C. Le mélange est ensuite refroidi en le laissant à température ambiante pendant 3min. La déglycosylation est effectuée par ajout de 1,2 µL de Rapid PNGase F, la solution est mélangée puis incubée pendant 5 min à 50°C. Le mélange est de nouveau refroidi à température ambiante pendant 3 min. Le fluorophore est solubilisé dans 131 µL de DMF anhydre. La réaction de dérivation est réalisée par ajout de 12 µL de la solution de fluorophore, le mélange est pipeté plusieurs fois pour l'homogénéiser puis est incubé 5 min à température ambiante. La réaction est

arrêtée en diluant l'échantillon avec 358 μL d'ACN. Les puits de la plaque de SPE HILIC utilisés pour purifier l'échantillon après dérivation (élimination de l'excès de fluorophore et sont conditionnés par 200 μL d'eau puis ils sont équilibrés par 200 μL d'une solution 15 :85 eau/ACN. L'échantillon est ensuite chargé (400 μL) sur le puit et il est rincé deux fois par 600 μL 1 :9 :90 (v/v/v) acide formique/eau/ACN. L'élution est réalisée par 3 fois 30 μL du tampon d'élution (200 mM acétate d'ammonium avec 5% d'ACN). Les échantillons sont ensuite dilués avec 100 μL de DMF puis avec 210 μL d'ACN comme préconisé par Waters. Or, cette composition en solvants organiques est bien trop élevée dans le cadre d'une analyse en EC et peut engendrer une rupture du courant. Afin d'éviter ce problème, l'échantillon est lyophilisé puis repris dans 20 μL d'eau.

III.3.1.3. Analyse par MALDI-TOF

Les analyses des glycanes dérivés par le RFMS ont été réalisées sur un instrument Bruker Ultraflextreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) équipé avec un laser smartbeam-II. Chaque échantillon (0,5 μL) a été déposé sur la cible du MALDI et mélangé sur la cible avec la matrice composée de DHB dans une solution de 50/50/0,1 Eau/ACN/TFA. Les spectres ont été enregistrés en mode réflectron avec une tension d'accélération de 20kV et un délai d'extraction de 130ns. Tous les spectres ont été obtenus en accumulant ~2000 tirs laser sur la gamme m/z 500–4000.

III.3.1.4. Analyse par électrophorèse capillaire

Les analyses d'EC ont été réalisées sur un instrument P/ACE TM MDQ (Sciex) et un instrument d'EC 7100 (Agilent) équipés avec un détecteur à barrette de diode avec une détection réalisée en UV à 214 nm. L'instrument d'EC d'Agilent est également couplé à un Q-TOF 6540 (Agilent). Les capillaires de 50 μm de diamètre interne et de longueur effective 50 cm (longueur totale de 60,2 cm) ont été utilisés pour les analyses en EC-UV et les capillaires de longueur totale 90 cm ont été utilisés en EC-SM (avec détection UV à 20cm). Le logiciel d'acquisition et de traitement des data est 32 KaratTM version 7.0 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) pour le MDQ et MassHunter version 7 pour l'EC 7100 (Agilent).

Pour les analyses en EC-UV, le capillaire de silice fondue est préconditionné pendant 10 min à 20 psi par du méthanol, de l'eau, 1M NaOH, 0,1M NaOH, eau, HCl 0,1M, eau puis tampon de séparation (BGE). Ensuite l'injection hydrodynamique de l'échantillon de 10 s à 0,5 psi est exécutée. La séparation est effectuée à 20 kV pendant 90 min. Après chaque analyse le capillaire est rincé avec de l'eau 5 min à 20 psi.

Pour l'EC-SM une double détection SM/UV est réalisée. Brièvement pour l'EC-SM, le capillaire PVA est préconditionné en le rinçant 10min à 1bar avec le BGE lors de sa première utilisation. Le capillaire est équilibré 300 s à 1 bar avec le BGE. Une injection hydrodynamique de l'échantillon est exécutée du côté inlet pendant 20 s à 50 mbar (1% du capillaire) suivie par celle du BGE pendant 10 s à 50 mbar. Afin de garder le champ électrique appliqué constant par rapport à la méthode développée en détection UV (=333,3 V/cm), la tension appliquée est augmentée à 30 kV puisque la longueur totale est de 90 cm au lieu de 60 cm. La séparation est donc effectuée sous 30 kV à 25°C pendant 60 min. Après chaque analyse, le capillaire est rincé pendant 180 s à 1 bar par de l'eau et séché à l'air en fin de journée. La tension d'électrospray appliquée est de 3200 V, la tension du fragmenteur de 175 V et le gaz asséchant est délivré à 5 L/min et sa température est de 250°C. Le liquide additionnel utilisé est composé de 49/50/1 eau/isopropanol/acide formique et il est délivré à

un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les spectres de masse sont collectés en mode d'ionisation positif sur la gamme m/z 100-3200.

III.3.2. Vérification de l'efficacité de la dérivation

La procédure de préparation d'échantillon a été réalisée sur un anticorps monoclonal de souris anti-citrinine (IgG) fourni dans le kit comme étant un contrôle. L'échelle dextrans est commercialisée directement sous sa forme dérivée par le RFMS. Afin de s'assurer que la dérivation avait bien eu lieu de manière efficace, les échantillons ont été analysés par MALDI-TOF juste après le traitement d'échantillon (Figure 97).

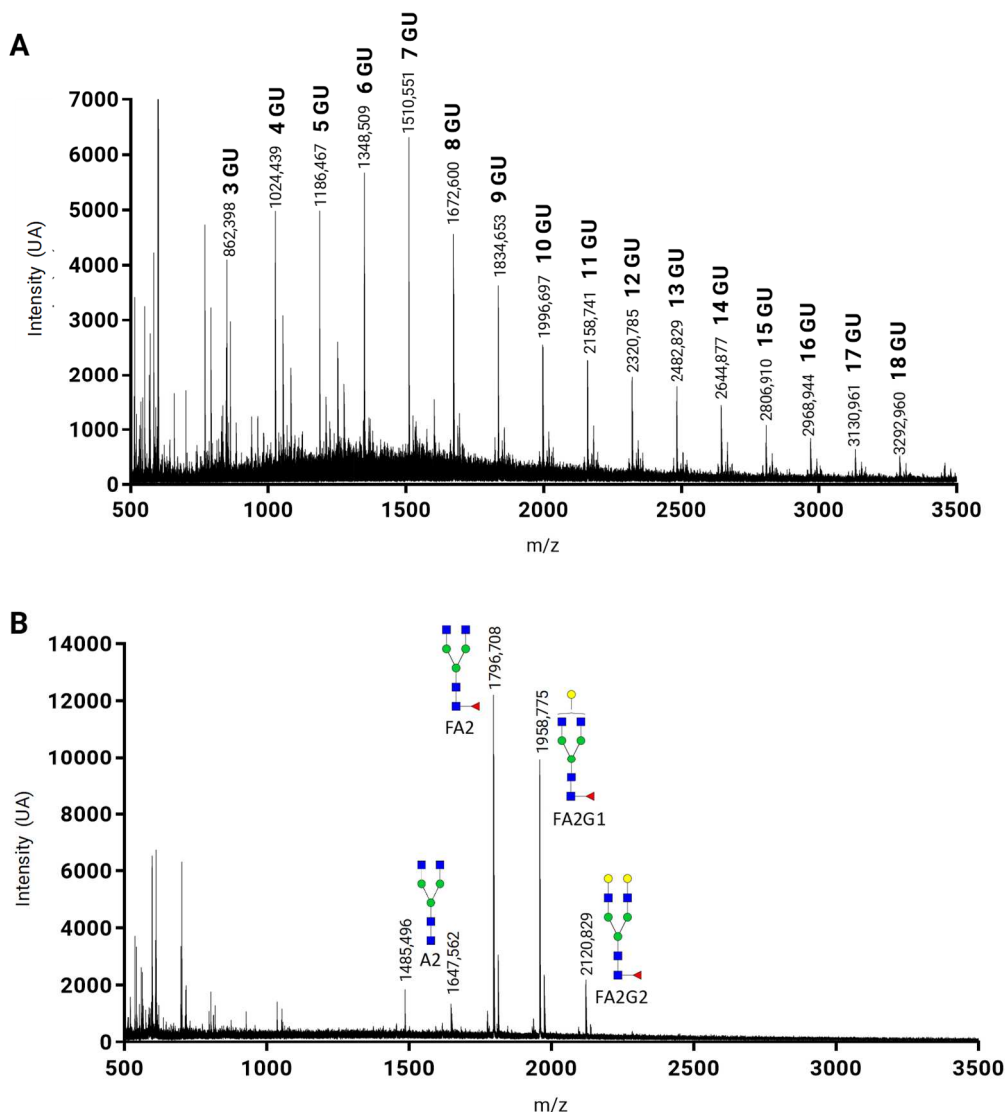


Figure 97 : Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF de l'échelle dextrans (A) et des glycanes issus d'un anticorps monoclonal (B) dérivés par le RFMS

Cette analyse a permis de confirmer la présence de glycanes dérivés dans l'échantillon de glycanes issus de l'IgG. Les glycanes ont des intensités similaires à celles observées pour l'échelle dextrans garantissant ainsi l'efficacité de la dérivation. Seuls trois glycanes (FA2, FA2G1, FA2G2) sont observés et correspondent aux glycanes les plus abondants de l'IgG standard détectés par la

méthode HILIC-SM développée par Waters (Figure 98). Les 15 autres glycanes représentent moins de 6% de l'ensemble des glycanes et ne sont pas détectés.

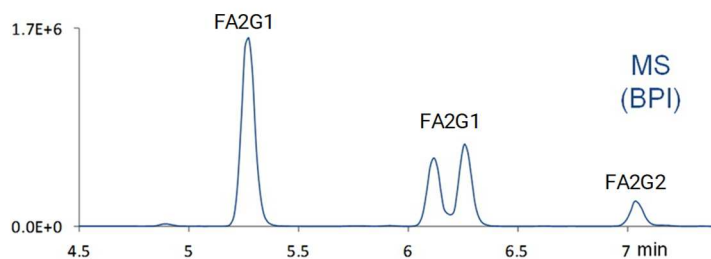


Figure 98 : Profil de BPC obtenu en HILIC-SM avec une colonne d'UHPLC Glycan BEH Amide (1.7 μ m, 2.1 x 150 mm) pour les glycanes issus d'une IgG et dérivés par le RFMS avec une détection par SM (Lauber *et al.*, 2015)

III.3.3. Optimisation de la séparation en EC-UV

Dans le but de simplifier les premiers développements, l'optimisation s'est tout d'abord déroulée en UV pour s'affranchir des difficultés liées au couplage avec la SM. Cependant, les conditions développées devaient pouvoir être transférables à l'EC-SM. Pour cela, seuls des tampons compatibles à la SM ont été testés. Les premiers essais ont porté sur l'analyse d'une échelle dextrane commerciale dérivée avec le RFMS.

Les premiers tests ont été réalisés à l'aide d'un capillaire en silice fondue. Dans ce cas, l'emploi de tampons de séparation acides, tels que 20 mM formate d'ammonium pH 3,0 sont généralement utilisés par exemple pour la séparation de N-glycanes dérivés par l'APTS issus de protéines thérapeutiques en EC-SM (Gennaro *et al.*, 2006). Les premiers résultats pour l'échelle dextrane sont excellents. En effet, tous les oligomères de glucose sont séparés avec une très bonne résolution en une heure (Figure 99). Le faible pH utilisé permet de limiter le FEO et ainsi d'obtenir une résolution très satisfaisante entre les pics ($R_s \sim 4,5-2,5$). Le profil en EC-UV des glycanes issus de l'IgG montre également une excellente séparation ($R_s=2,9$) des trois glycanes qui migrent en moins de 45min (Figure 99).

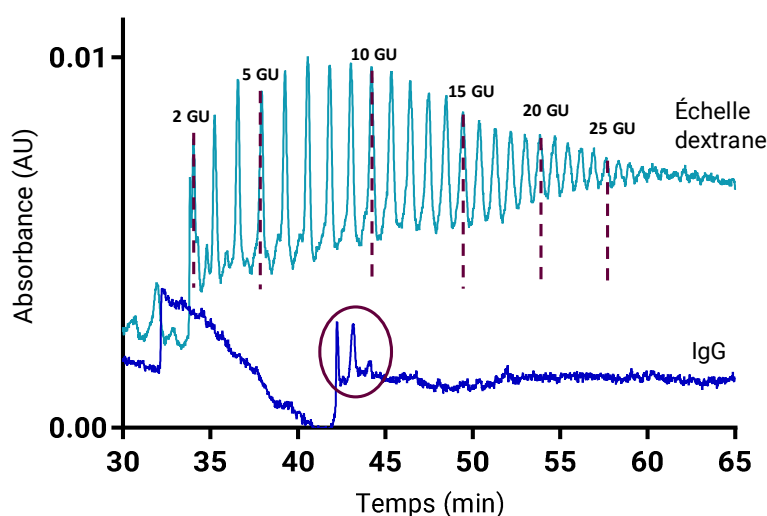


Figure 99 : Profil obtenu en ECZ-UV de l'échelle dextrane-RFMS (0,5 g/L) et des glycanes issus d'une IgG (0,015 g/L) dérivés par le RFMS, conditions : 20mM formate d'ammonium pH 3,0, capillaire silice fondue, $L_{tot}=60$ cm, $L_{eff}=50$ cm $\varnothing=50\mu$ m, 214nm, polarité normale 20kV, Instrument Sciex

III.3.4. Optimisation de la séparation en EC-SM

III.3.4.1. Séparation dans un capillaire de silice

Les conditions précédemment décrites permettant une séparation satisfaisante en UV, elles ont été implémentées en EC-SM. Tout d'abord, une infusion directe, a été effectuée afin d'optimiser les différents paramètres de masse pour obtenir la meilleure sensibilité possible. Cette première optimisation a permis de déterminer les valeurs des tensions du capillaire de transfert, du fragmenteur mais aussi les différentes températures dans la source.

Une fois les conditions optimisées en infusion directe, une première analyse en EC-SM de l'échelle dextrane a été réalisée. Lors de cette analyse, le profil du TIC présente plusieurs pics (Figure 100). Les pics entre 10min et 15min correspondent à l'excès de fluorophore encore présent dans l'échantillon ainsi qu'à des espèces dégradées. Le pic très large après 15min correspond aux masses attendues pour le dextrane. Néanmoins, les pics correspondant aux masses attendues sont de très faibles intensités en comparaison avec les autres pics visibles (Figure 100B). En effet, de nombreux signaux sont observés (par exemple 803,22 m/z ou 1063,21 m/z) et correspondent peut-être à des formes dégradées du dextrane dérivé. Après 17min, un large pic est détecté correspondant sans doute également à des formes dégradées. Aucune séparation n'est observée sur le BPC (base peak chromatogram) contrairement au profil UV précédemment montré. Ce premier résultat semble donc peu concluant.

Afin d'améliorer le profil observé, de l'acétonitrile est ajouté au tampon de séparation à hauteur de 10%, ce qui affecte la viscosité du milieu (viscosité augmentée) ainsi que les charges à la surface du capillaire. L'ajout de solvant organique permet d'améliorer la forme des pics en limitant les phénomènes d'adsorptions sur la surface du capillaire. Le profil du BPC est similaire au précédent même si les temps de migration sont légèrement retardés à cause de la viscosité du milieu plus importante. Cependant, le spectre de masse obtenu présente des pics correspondant aux masses attendues avec des intensités similaires (Figure 100C). Néanmoins, moins d'interférents sont détectés. Les conditions semblent donc moins dégradantes et elles améliorent la sensibilité. Quelques essais d'optimisation plus fine des paramètres de masse n'ont pas permis d'améliorer davantage la sensibilité et seuls 4 oligomères du glucose (2 à 5 GU) sont détectés. Les intensités relatives de ces différents oligomères ne correspondent pas du tout à celles observées en MALDI-TOF, un biais dû à l'ionisation est suspecté. L'ajout d'acétonitrile limite la présence d'interférents qui gênent la détection des glycanes, cependant la qualité de séparation reste toujours insuffisante pour observer une séparation sur le BPC.

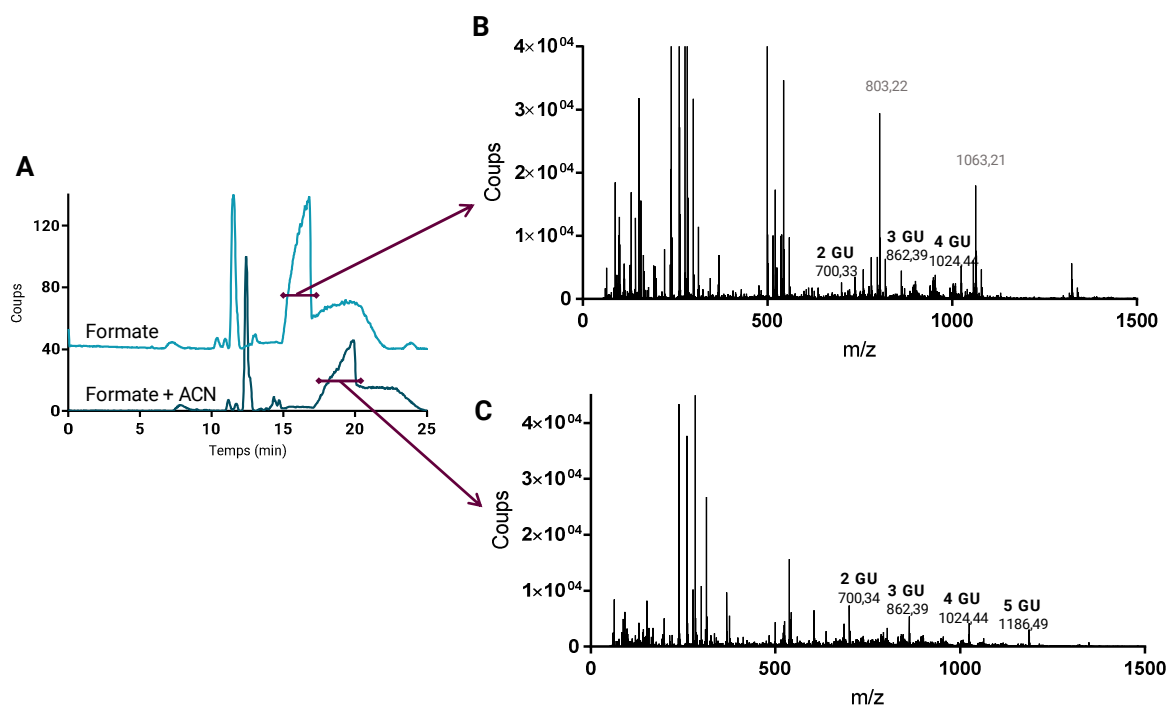


Figure 100 : Comparaison des profils de BPC obtenus lors de l'analyse de dextrane-RFMS (0,5 mg/mL) avec un tampon 20mM de formate d'ammonium pH 3 avec et sans l'ajout de 10% d'ACN (A) et spectres de masse associés respectivement aux deux BPC (B, C), conditions : 20mM formate d'ammonium pH 3,0, capillaire silice fondue, $L_{tot}=90\text{cm}$, $\varnothing=50\mu\text{m}$, 214nm, polarité normale 30kV, liquide additionnel : 50/49/1 MeOH/H₂O/AF

Le tampon employé ne semble donc pas aussi efficace en EC-SM qu'en EC-UV pour réaliser la séparation du dextrane-RFMS. Les oligomères de plus grosse taille (>5 GU) ne sont pas détectés, alors que les oligomères les plus abondants en MALDI-TOF présentent entre 6 et 8GU.

Par ailleurs, il s'est avéré que les deux profils UV de deux analyses du dextrane standard montrent que la répétabilité est mauvaise en termes de temps de migration (CV ~ 5%) (Figure 101). La co-injection d'un marqueur de flux pourrait permettre de corriger ce décalage observé en temps de migration. Néanmoins, on observe également que la ligne de base est perturbée. Ces variations sont probablement dues à des variations du FEO mais aussi à l'adsorption des glycanes sur les parois du capillaire. Ces conditions ne sont donc pas du tout optimales pour l'analyse de glycanes RFMS et de nouvelles conditions doivent être testées.

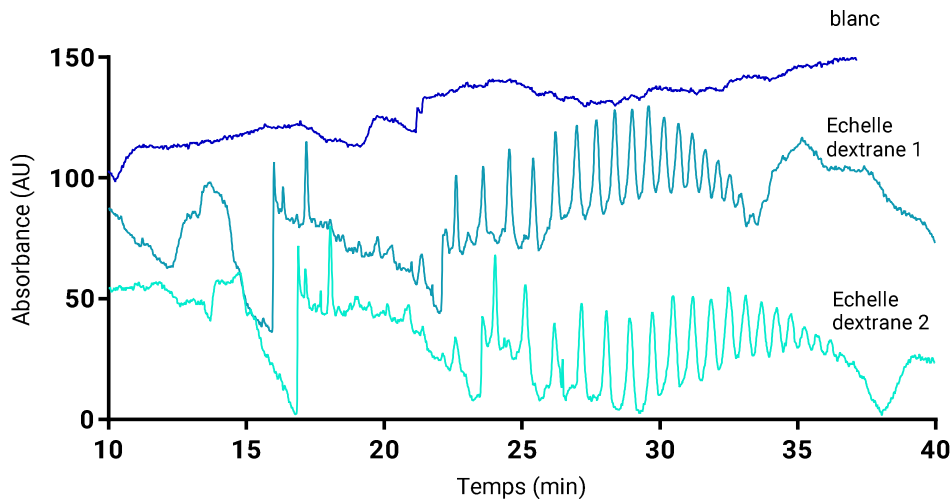


Figure 101 : Profils observés pour le blanc d'analyse (injection de tampon de séparation) ainsi que pour l'échelle dextrane, conditions : 20mM formate d'ammonium pH 3,0 +10%ACN, capillaire silice fondue, $L_{tot}=90cm$, $L_{eff}=20cm$, $\varnothing=50\mu m$, 214nm, polarité normale 30kV, Instrument Agilent

III.3.4.2. Séparation dans un capillaire avec un revêtement neutre

Le capillaire en silice donnant des résultats peu répétables a été abandonné au profit d'un capillaire avec un revêtement neutre en PVA. L'emploi d'un capillaire avec un revêtement neutre a déjà permis d'obtenir d'excellentes qualités de séparation de glycanes en EC-SM dans la littérature (S.-C. Bunz et al., 2013; Jayo et al., 2012; Váradi et al., 2016b) et est conseillé pour réaliser des séparations de N-glycanes en EC-SM (Babu & Gudihal, 2012). Le tampon de séparation a également été modifié pour un tampon à 50 mM d'acétate d'ammonium pH 4,5 (Jayo et al., 2014; Váradi et al., 2016b). La combinaison d'un capillaire PVA avec un tampon acétate d'ammonium pour séparer des glycanes dérivés en EC-SM a déjà été rapportée dans la littérature (Jayo et al., 2012; Váradi et al., 2016b). Les paramètres de SM ont tout d'abord été fixés à l'aide de ceux décrits dans une analyse de glycanes dérivés par du 2-AA réalisée avec un capillaire PVA et un tampon d'acétate d'ammonium (Váradi et al., 2016b) mais également ceux d'une note d'application d'Agilent sur la séparation de N-glycanes d'anticorps monoclonaux (Babu & Gudihal, 2012). Néanmoins, l'influence des différents paramètres de masse sur la sensibilité observée sur le standard de dextrane a été étudiée. Un exemple d'optimisation de la tension du fragmenteur est présenté et illustre l'impact de cette tension sur la sensibilité observée. En effet, un facteur 2 est observé entre les deux intensités extrêmes. Le même type d'optimisation a été effectué pour la tension du capillaire de transfert, les températures de la source et du gaz asséchant, la pression du nébuliseur et le débit de gaz asséchant. Cette étude des paramètres de masse en infusion directe a permis de déterminer les conditions utilisées dans la suite des travaux.

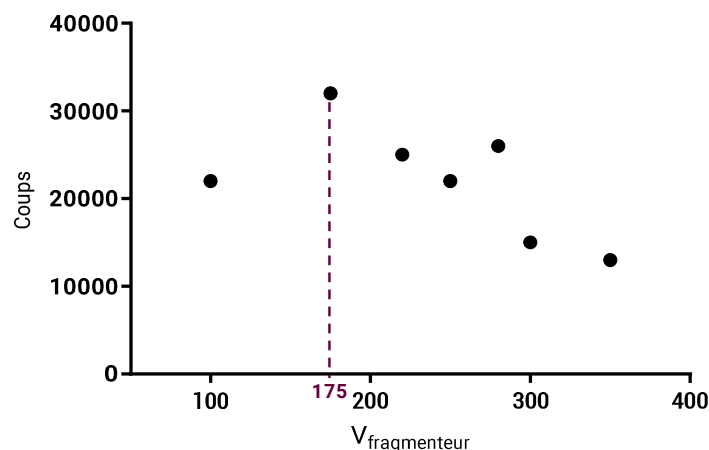


Figure 102 : Variation de l'intensité observée pour le pic 3GU de l'échelle dextrane lors de l'optimisation de la tension du fragmenteur

Le profil BPC de l'échelle dextrane présente plusieurs ensembles de pics (Figure 103). Entre 15min et 20min, les pics observés correspondent à des formes dégradées du fluorophore. Entre 25 min et 50min, un ensemble de pics très bien résolus est visible. Les spectres de masse de chacun des pics permettent de les identifier comme étant les différents oligomères du glucose dérivés. Dans ces conditions, il est possible de détecter plus d'une vingtaine d'oligomères parfaitement séparés. Un large pic, non symétrique est détecté entre 60min et 65min. Il correspond au fluorophore en excès et probablement aussi à des espèces dégradées. Ces conditions de séparation en EC-SM semblent donc optimales pour l'analyse de glycanes issus de l'IgG standard.

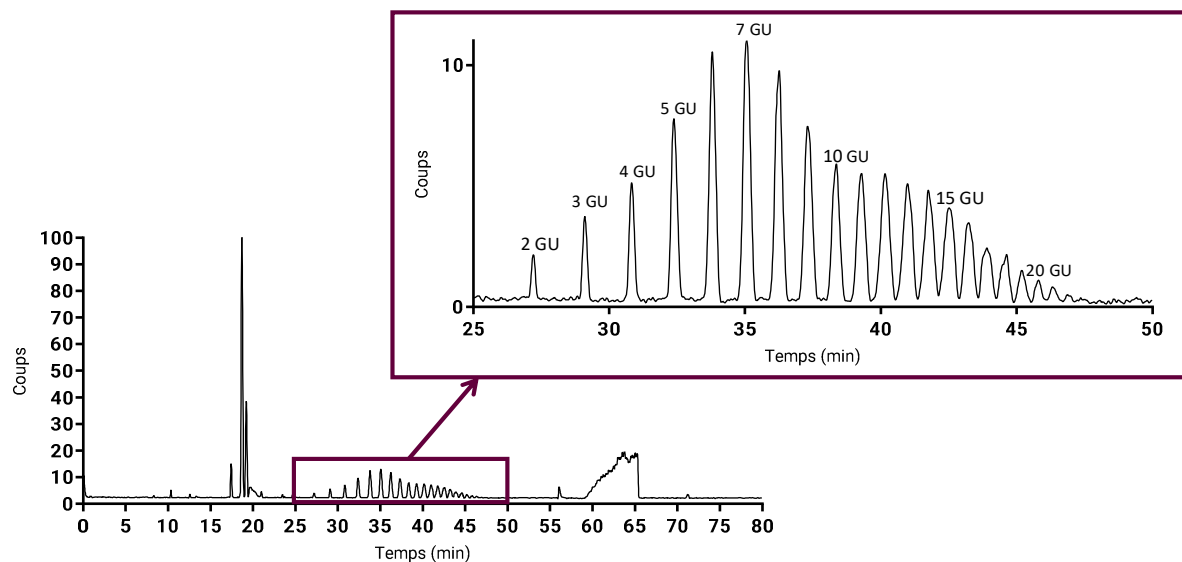


Figure 103 : Profil BPC obtenu pour l'échelle dextrane (0,5 mg/mL) et agrandissement de la zone d'intérêt. Conditions : capillaire PVA, $L_{eff}=20cm$, $L_{tot}=90cm$, $\varnothing=50\mu m$, polarité normale : 30kV, 50mM acétate d'ammonium pH 4,5, liquide additionnel : 50/49/1 MeOH/H₂O/AF

L'analyse de l'échelle dextrane permet d'obtenir une courbe de calibration reliant le nombre d'unités glucose d'une espèce à son temps de migration (Figure 104). Cette courbe permet *abrs* de déterminer le nombre d'unité de glucose d'espèces inconnues, ce qui aide à la détermination de leurs structures.

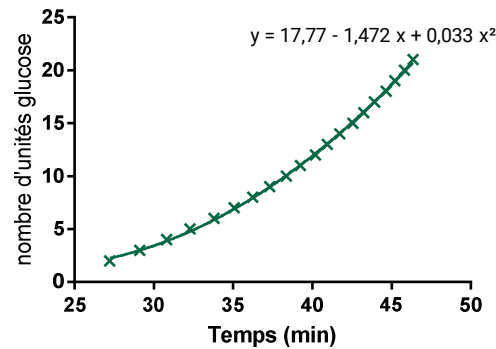


Figure 104 : Courbe reliant le nombre d'unités glucose et le temps de migration des espèces

Cette méthode a été appliquée à un échantillon de glycanes issus d'une IgG standard. Le BPC présente des pics entre 15 et 20min correspondant à des formes dégradées du fluorophore tandis que les pics des glycanes sont détectés vers 35min (Figure 105). Trois pics sont observés et correspondent aux trois glycanes détectés en MALDI-TOF (FA2, FA2G1 et FA2G2) dans la même zone de migration que l'échelle dextrane. La résolution entre les glycanes est excellente. Les spectres de masse associés montrent les masses attendues des différents glycanes. Ainsi, sur le spectre de masse du pic à 36,6min, seuls les états de charges (2+ et 3+) du FA2 sont visibles, la même observation est notée pour le FA2G1. Pour le FA2G2, la présence d'autres espèces est plus marquée, ceci est lié à la plus faible abondance de ce glycanes. Les autres glycanes minoritaires qui représentent ensemble une abondance relative de moins de 6% (A2, A2G1, FA1G1, A2G2, FA2G2Ga1, FA2G2S1 et FA2G2Ga2) ne sont pas détectés mais leur détection est également impossible avec la méthode d'HILIC-SM. Les performances de l'EC-SM sont satisfaisantes mais ne permettent pas de séparer les isomères du FA2G1 de position (Gal sur une antenne ou l'autre) contrairement à l'HILIC qui parvient à les distinguer. En revanche, une optimisation du tampon de séparation peut sûrement permettre la séparation de ces isomères.

Les aires relatives des trois glycanes (47,0%, 49,8%, 3,2%) en EC-SM assez proches de celles mesurées en HILIC par fluorescence (46,0%, 40,1%, 8,0%) (Lauber *et al.*, 2015). Les différences sont en partie dues au fait que les glycanes minoritaires représentant 6% de l'abondance totale en fluorescence ne sont pas pris en compte pour la méthode d'EC-SM. De plus, l'emploi de la masse peut entraîner des différences d'ionisation entre les glycanes, en favorisant ou au contraire en limitant l'efficacité de leur ionisation et ainsi leur détection. Il semble dans ce cas que l'ionisation des glycanes FA2G1 soit favorisée car leur abondance est plus élevée et se fait au détriment du glycanes FA2G2 qui a une aire relative plus faible qu'en fluorescence.

De plus, en utilisant la courbe de calibration (Figure 104), les trois glycanes présentent des valeurs calculées de 8,10 GU, 9,03 GU et 9,96 GU qui sont attribués à des structures de 8, 9 et 10 GU. Or ils possèdent en effet bien 8, 9 et 10 monosaccharides respectivement. Cette courbe semble donc fiable pour déterminer le nombre de GU d'espèces inconnues.

La sensibilité est satisfaisante compte-tenu des faibles volumes injectés en EC-SM. En effet, l'analyse des glycanes d'IgG a été obtenue à partir d'une injection de 100 fmoles de glycanes. La même analyse en HILIC-SM nécessite l'injection de 2,5 pmoles soit une quantité 25 fois plus importante. La sensibilité est donc plus élevée avec cette méthode EC-SM ce qui est important pour l'étude de fluides biologiques contenant certaines espèces à de très faibles concentration.

La méthode EC-SM permet donc de séparer et détecter efficacement les glycanes neutres dérivés par le RFMS pour la première fois avec une méthode électrophorétique.

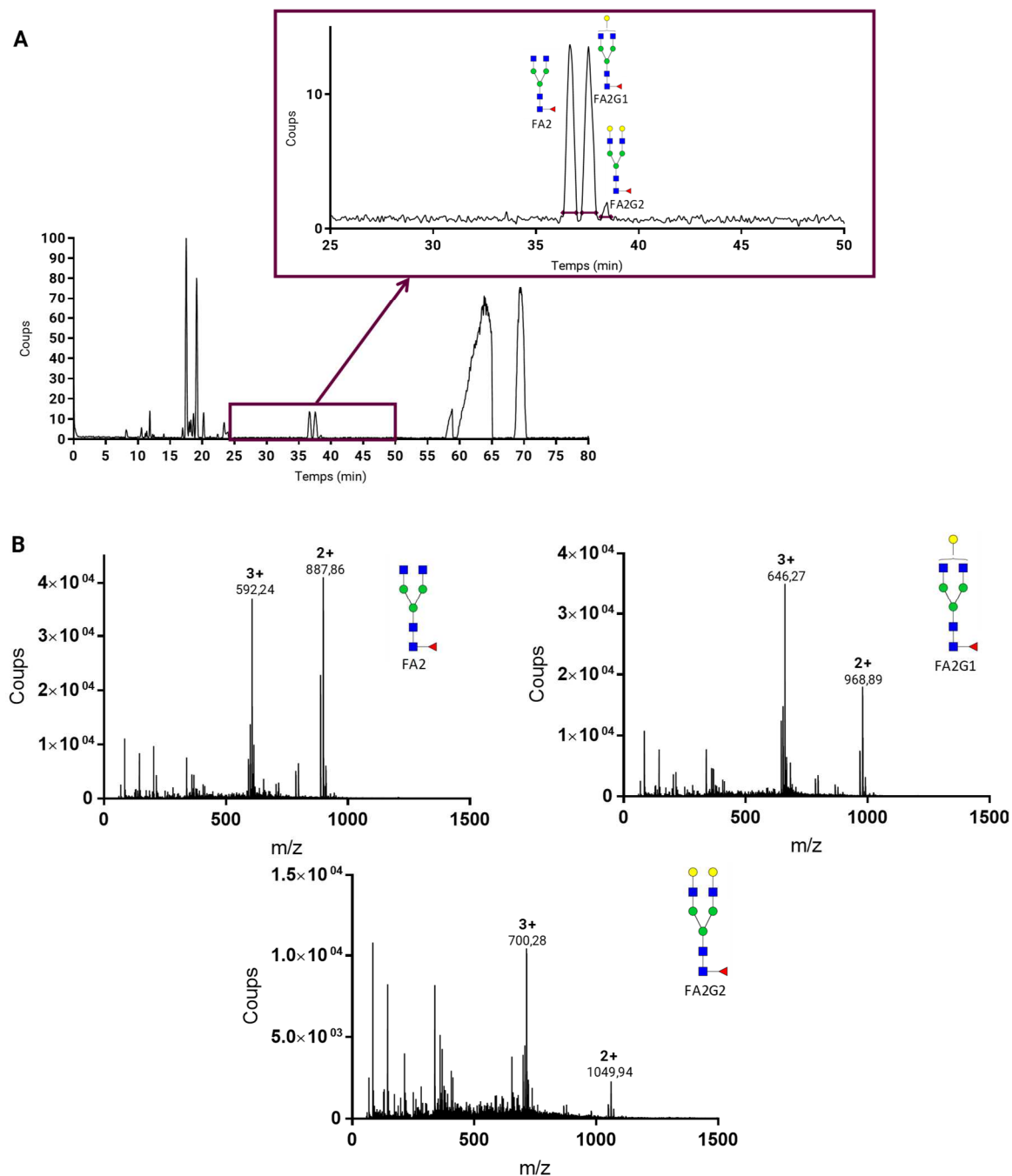


Figure 105 : BPC issu d'une analyse EC-SM des glycanes libérés d'une IgG et dérivés par le RFMS (0,015 mg/mL) (A) et spectres de masse associés aux différents pics à 36,6 min, 37,6min et 38,4 min correspondant aux glycanes FA2, FA2G1 et FA2G2 respectivement. Conditions : capillaire PVA, $L_{eff}=20cm$, $L_{tot}=90cm$, $\varnothing=50\mu m$, polarité normale :30kV, 50mM acétate d'ammonium pH 4,5, liquide additionnel : 50/49/1 MeOH/H₂O/AF

Cette méthode possédant un pouvoir de résolution élevé, elle semble bien adaptée à l'analyse de glycanes dérivés par le RFMS. Afin de voir la répétabilité de ces conditions par rapport aux conditions précédentes, les deux profils UV obtenus grâce à la double détection UV/SM lors d'injections successives de dextrane standard lors d'analyses par EC-SM ont été comparés (Figure 106). Il apparaît que les profils ne sont pas répétables. La ligne de base est toujours très perturbée et les temps de migration varient (CV ~ 4%) même si une légère amélioration par rapport au BGE

précédent est observé. Les profils BPC associés quant à eux, présentent également des temps de migration non répétables. Cette méthode étant réalisée pour le couplage avec la SM, l'identification ne sera pas biaisée malgré ces variations.

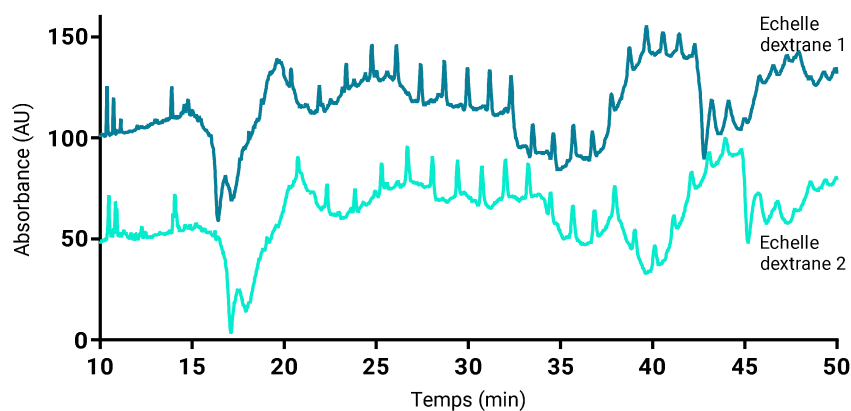


Figure 106 : Comparaison des profils UV obtenus lors de l'analyse de deux injections d'échelle dextrane en EC-SM. Conditions : capillaire PVA, $L_{eff}=20\text{cm}$, $L_{tot}=90\text{cm}$, $\varnothing=50\mu\text{m}$, 214nm , polarité normale : 30kV , 50mM acétate d'ammonium pH 4,5.

III.4. Conclusion et perspectives

La méthode EC-SM présentée permet d'obtenir la séparation de glycanes neutres dérivés par le RFMS avec des sensibilité et résolution satisfaisantes. Cependant, la séparation des deux isomères de position du glycanes FA2G1 n'est pas observée. Ce manque de résolution est probablement lié à l'effet de succion produit par le couplage de l'EC-SM et à l'emploi de tampons de séparation avec une force ionique faible. Ces premiers résultats, cependant, sont très encourageants et montrent l'intérêt d'employer le RFMS pour la séparation des glycanes en EC-SM. Malheureusement cette étude n'a pas pu être davantage développée et nécessiterait la réalisation d'autres optimisations afin de proposer une méthode utilisable pour des échantillons biologiques avec une visée diagnostique.

Tout d'abord, la méthode nécessite un gain en sensibilité qui est très importante dans le cadre de la recherche de biomarqueurs glycosylés généralement de faible abondance. La procédure de dérivation des glycanes devrait donc être re-adaptée pour obtenir des échantillons finaux avec des volumes d'échantillons plus faibles et donc une concentration plus élevée compatible avec une utilisation en EC puisque le kit a été développé par Waters pour des analyses en HILIC-SM. L'optimisation du débit du liquide additionnel est importante. Il est notamment possible de le réduire par cinq (soit $2\ \mu\text{L}/\text{min}$) ce qui permet de limiter la dilution obtenue en sortie de capillaire et d'augmenter la sensibilité de la méthode.

La répétabilité doit également être améliorée. La variabilité observée jusque-là est probablement due à l'instabilité du courant en début de séparation qui ne se stabilise qu'à une valeur de $45\mu\text{A}$ après environ 30 min d'analyse. Cette instabilité est probablement liée à une différence du nombre de particules chargées à l'interface EC/SM soit entre l'extrémité du capillaire et le liquide additionnel. En effet le tampon de séparation et le liquide additionnel n'ont pas la même composition, le premier étant composé d'ions acétates et le deuxième d'acide formique. Des essais

d'harmonisation en remplaçant soit l'acide formique du liquide additionnel par l'acide acétique ou les ions acétates du BGE par des ions formates ont montré que le courant est alors stable dès la mise sous tension. Les lignes de base sont également moins perturbées, cependant la répétabilité des méthodes avec ces ajustements n'a pas été évaluée.

Actuellement, aucune étude de glycanes-RFMS issus de fluides biologiques n'a été réalisée et seuls des glycanes issus de protéines standard ont été analysés en HILIC comme les travaux de Zhou *et al*/ par exemple (S. Zhou et al., 2017). Enfin, avant d'appliquer la préparation d'échantillon à des fluides biologiques, il faudrait réaliser la dérivation par fluorescence de glycanes standard avec différents degrés de sialylation. En effet, selon le degré de sialylation des glycanes, une forte hétérogénéité de charge est observée (glycanes négatifs, neutres et positifs) et lorsqu'ils seront dérivés par le RFMS qui apporte une charge positive, certains glycanes sialylés seront alors neutres et il sera impossible de les séparer en EC. La sélectivité de la SM pourrait permettre de les différencier mais leur différence de charge ne permettra pas de tous les analyser avec la même polarité de SM. Il est possible de s'affranchir des charges apportées par les acides sialiques en les estérifiant. Ainsi neutralisés, les glycanes pourront être dérivés par le RFMS et être séparés grâce aux charges positives apportées par le RFMS.

IV. Conclusion

Ce chapitre a été l'occasion de comparer deux méthodes EC couplées à deux types de détection différentes pour analyser des glycanes issus de fluides biologiques.

La première méthode testée, l'ECG-LIF présente l'avantage d'être déjà développée et le BGE à base de gel existe commercialement. La prise en main du kit de préparation d'échantillon est rapide et il permet d'obtenir des résultats fiables et répétables. Nous avons montré que son application à des fluides biologiques non traités (plasma, LCR) était tout à fait possible mais nécessitait d'optimiser la dilution de l'échantillon initial pour limiter les phénomènes d'agrégation des billes magnétiques employées pour la préparation des glycanes. Cette application aux fluides biologiques a montré le pouvoir de cette méthode d'ECG-LIF pour la séparation de glycanes, avec une résolution excellente, permettant même la séparation d'isomères de position. L'identification putative des glycanes est réalisée à l'aide du logiciel GUcal qui attribue le nombre d'unités glucose à chaque pic et détermine la structure du glycanes associé grâce à une base de données intégrée. La répétabilité de la méthode s'avère excellente pour les t_m pour le plasma et le LCR (CV < 0,8%) et assez satisfaisante pour les $A_{\%}$ même si les résultats sont plus variables pour le LCR. La comparaison des profils obtenus pour un pool d'individus sains avec celui d'un patient atteint de la MA pour le plasma ou le LCR a permis de mettre en évidence quelques modifications de glycosylation. En effet, une augmentation des formes avec un GlcNAc en position bissectrice a été observée ainsi qu'une diminution de la sialylation global (glycanes bi- et monosialylés). Ces deux types de modification ont déjà été décrites dans la littérature dans le cas de la MA confirmant les résultats ainsi obtenus dans cette étude. La confirmation de la structure des glycanes par analyses de standards ou par SM/SM semble néanmoins indispensable. L'étude d'un plus grand nombre de patients malades doit être envisagée pour confirmer les premiers résultats obtenus dans cette étude. Une véritable exploitation statistique pourra alors être réalisée pour apporter plus de poids aux variations observées et déterminer s'il s'agit bien d'altérations spécifiques à la MA avant de procéder à une validation clinique. La sensibilité de la méthode est correcte compte-tenu de la très faible consommation

d'échantillon biologique (2,5µL pour le plasma et 5µL pour le LCR). Néanmoins les glycanes très peu abondants ne peuvent pas être détectés et nécessiteront une méthode avec une meilleure sensibilité. Il apparaît donc que le kit « Fast glycan labeling and analysis kit » couplé à une analyse par ECG-LIF s'avère être une stratégie très adaptée à l'étude des glycanes dérivés dans le cadre de la recherche de biomarqueurs de pathologies.

La deuxième méthode proposée emploie l'EC-SM dont les premiers développements ont été réalisés au cours de cette étude. Le développement d'une méthode d'EC-SM présente plusieurs contraintes qu'il faut garder à l'esprit : emploi de tampons de séparation compatibles avec la SM qui ne sont généralement pas les mieux adaptés pour obtenir les très bonnes résolutions escomptées en EC, forte dilution des échantillons engendrée par le liquide additionnel, perte de résolution due à l'aspiration provoquée par le spectromètre de masse. Le développement de méthode est donc souvent plus complexe à mettre en place que pour une méthode d'EC classique. Dans cette étude, la possibilité d'employer un nouveau fluorophore, le RFMS, pour la séparation de N-glycanes en EC-SM a été démontrée. En effet, les méthodes d'EC-SM employant des glycanes dérivés existent déjà. L'emploi d'un capillaire en silice s'est avéré incompatible en EC-SM avec les glycanes dérivés par le RFMS sans doute à cause de phénomènes d'adsorption à sa surface. Le choix d'un capillaire avec un revêtement PVA a permis de séparer tout d'abord les oligomères du glucose d'un dextrane avec une excellente résolution. Puis, l'analyse d'une IgG standard vendu par Waters a également montré la séparation des trois glycanes majoritaires avec une résolution satisfaisante. Cependant, la séparation des deux isomères de position n'a pas été obtenue, contrairement à la méthode HILIC développée par Waters. Cette perte de résolution en EC-SM est liée aux effets de succion engendrés par le liquide additionnel et la faible force ionique du tampon d'analyse. Cette perte de résolution peut sans doute être limitée par l'emploi d'un nouveau tampon. La méthode présente une bonne sensibilité puisque les glycanes ont été détectés malgré une très faible quantité injectée en EC (100 fmoles). Celle-ci pourra d'ailleurs être encore augmentée en réduisant le débit de liquide additionnel qui engendre une dilution de l'échantillon. Néanmoins une mauvaise répétabilité des t_m a été notée. De plus, la méthode a été appliquée uniquement à un échantillon d'IgG standard possédant des glycanes neutres. L'application à des échantillons plus complexes, ayant des glycanes chargés négativement nécessite l'optimisation d'autres étapes, notamment de dérivation des acides sialiques, pour éviter les phénomènes d'annulation des charges par ajout du RFMS qui empêcherait la séparation des glycanes devenus neutres par EC. Ainsi, l'emploi de cette technique d'EC-SM pour étudier des fluides biologiques semble être une option intéressante, néanmoins quelques optimisations devront être étudiées pour obtenir une cartographie de tous les glycanes d'échantillons aussi complexes.

Ainsi, l'analyse glycomique est très informative et peut être réalisée par ECG-LIF ou EC-SM, chacune des méthodes présentant ses avantages et inconvénients. Ainsi l'EC-SM des glycanes-RFMS apporterait la meilleure sensibilité tandis que la méthode d'ECG-LIF présente la meilleure résolution. Pour l'instant les premiers tests réalisés sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont été réalisés uniquement par ECG-LIF ce qui a permis de mettre en lumière certaines altérations de glycosylation présentes dans deux types de fluides biologiques, le plasma et le LCR. Le LCR est néanmoins sans doute plus adapté à la recherche de modifications de glycosylation liées à la MA que le plasma de par sa très grande proximité avec l'organe touché, le cerveau. Cette méthode est très intéressante car il est possible de séparer les glycanes ayant des structures très

proches (isomères de position) et de connaître précisément quelle structure est altérée lors de la pathologie.

Références bibliographiques – Chapitre V

- Abou-Abbass, H., Abou-El-Hassan, H., Bahmad, H., Zibara, K., Zebian, A., Youssef, R., Ismail, J., Zhu, R., Zhou, S., Dong, X., Nasser, M., Bahmad, M., Darwish, H., Mechref, Y., & Kobeissy, F. (2016). Glycosylation and other PTMs alterations in neurodegenerative diseases: Current status and future role in neurotrauma. *Electrophoresis*, *37*(11), 1549–1561. <https://doi.org/10.1002/elps.201500585>
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B. S., Kozutsumi, Y., Saito, Y., Taniguchi, N., Murayama, S., Spitalnik, S. L., & Endo, T. (2010). Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on α -amyloid production in Alzheimer's disease. *Glycobiology*, *20*(1), 99–106. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp152>
- Babu, S., & Gudihal, R. (2012). *Application note: Analysis of N-glycans from a Monoclonal Antibody by Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry*. Retrieved from <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-1020EN.pdf>
- Bodnar, J., Szekrenyes, A., Szigeti, M., Jarvas, G., Krenkova, J., Foret, F., & Guttman, A. (2016). Enzymatic removal of N-glycans by PNGase F coated magnetic microparticles. *Electrophoresis*, *37*(10), 1264–1269. <https://doi.org/10.1002/elps.201500575>
- Borelli, V., Vanhooren, V., Lonardi, E., Reiding, K. R., Capri, M., Libert, C., Garagnani, P., Salvioli, S., Franceschi, C., & Wuhrer, M. (2015). Plasma N-Glycome Signature of Down Syndrome. *Journal of Proteome Research*, *14*(10), 4232–4245. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00356>
- Bunz, S.-C., Rapp, E., & Neusüss, C. (2013). Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry of APTS-Labeled Glycans for the Identification of Unknown Glycan Species in Capillary Electrophoresis/Laser-Induced Fluorescence Systems. *Analytical Chemistry*, *85*(21), 10218–10224. <https://doi.org/10.1021/ac401930j>
- Cohen, S. A., & Michaud, D. P. (1993). Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1270>
- Fodero, L. R., Sáez-Valero, J., Barquero, M.-S., Marcos, A., McLean, C. A., & Small, D. H. (2008). Wheat germ agglutinin-binding glycoproteins are decreased in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry*, *79*(5), 1022–1026. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00640.x>
- Fogli, A., Merle, C., Roussel, V., Schiffmann, R., Ughetto, S., Theisen, M., & Boespflug-Tanguy, O. (2012). CSF N-glycan profiles to investigate biomarkers in brain developmental disorders: application to leukodystrophies related to eIF2B mutations. *PloS One*, *7*(8), e42688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042688>
- Frenkel-Pinter, M., Shmueli, M. D., Raz, C., Yanku, M., Zilberzwige, S., Gazit, E., & Segal, D. (2017). Interplay between protein glycosylation pathways in Alzheimer's disease. *Science Advances*, *3*(9), e1601576. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601576>
- Gennaro, L. A., Salas-Solano, O., & Ma, S. (2006). Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins. *Analytical Biochemistry*, *355*(2), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.002>
- Gizaw, S. T., Ohashi, T., Tanaka, M., Hinou, H., & Nishimura, S.-I. (2016). Glycoblotting method allows for rapid and efficient glycome profiling of human Alzheimer's disease brain, serum and cerebrospinal fluid towards potential biomarker discovery ☆. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.009>
- Goyallon, A., Cholet, S., Chapelle, M., Junot, C., & Fenaille, F. (2015). Evaluation of a combined glycomics and glycoproteomics approach for studying the major glycoproteins present in biofluids: Application to cerebrospinal fluid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *29*(6), 461–473. <https://doi.org/10.1002/rcm.7125>

- Guttman, A. (1996). High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis, *38*(6573), 461–462. <https://doi.org/10.1038/380461a0>
- Guttman, A., Chen, F.-T. A., & Evangelista, R. A. (1996). Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *17*(2), 412–417. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170221>
- Guttman, A., Szigeti, M., Lou, A., & Gutierrez, M. (2018). FAST GLYCAN LABELING AND ANALYSIS: High-Resolution Separation and Identification in Minutes, 1–4. Retrieved from https://sciex.com/Documents/tech_notes/Fast-Glycan-Labeling-and-Analysis-High-Resolution-Separation-and-Identification-in-Minutes.pdf
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jansen, B. C., Bondt, A., Reiding, K. R., Lonardi, E., De Jong, C. J., Falck, D., Kammeijer, G. S. M., Dolhain, R. J. E. M., Rombouts, Y., & Wuhrer, M. (2016). Pregnancy-associated serum N-glycome changes studied by high-throughput MALDI-TOF-MS. *Scientific Reports*, *6*, 23296. <https://doi.org/10.1038/srep23296>
- Jarvas, G., Szigeti, M., Chapman, J., & Guttman, A. (2016). Triple-Internal Standard Based Glycan Structural Assignment Method for Capillary Electrophoresis Analysis of Carbohydrates. *Analytical Chemistry*, *88*(23), 11364–11367. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03596>
- Jarvas, G., Szigeti, M., & Guttman, A. (2015). GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis. *Electrophoresis*, *36*(24), 3094–3096. <https://doi.org/10.1002/elps.201500397>
- Jayo, R. G., Li, J., & Chen, D. D. Y. (2012). Capillary electrophoresis mass spectrometry for the characterization of O-Acetylated N-glycans from fish serum. *Analytical Chemistry*, *84*(20), 8756–8762. <https://doi.org/10.1021/ac301889k>
- Jayo, R. G., Thaysen-Andersen, M., Lindenburg, P. W., Haselberg, R., Hankemeier, T., Ramautar, R., & Chen, D. D. Y. (2014). Simple capillary electrophoresis-mass spectrometry method for complex glycan analysis using a flow-through microvial interface. *Analytical Chemistry*, *86*(13), 6479–6486. <https://doi.org/10.1021/ac5010212>
- Keser, T., Pavić, T., Lauc, G., & Gornik, O. (2018). Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan Analysis. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 324. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00324>
- Kit GlycoWorks RapiFluor-MS pour l'analyse des N-glycanes : Waters. (n.d.). Retrieved September 19, 2018, from http://www.waters.com/waters/fr_FR/GlycoWorks-RapiFluor-MS-N-Glycan-Kit/nav.htm?cid=134828150&locale=fr_FR
- Kovács, Z., Papp, G., Horváth, H., Joó, F., & Guttman, A. (2017). A novel carbohydrate labeling method utilizing transfer hydrogenation-mediated reductive amination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *142*, 324–327. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.05.017>
- Kovacs, Z., Simon, A., Szabo, Z., Nagy, Z., Varoczy, L., Pal, I., Csanky, E., & Guttman, A. (2017). Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma. *Electrophoresis*, *38*(17), 2115–2123. <https://doi.org/10.1002/elps.201700006>
- Lauber, M. A., Yu, Y. Q., Brousmiche, D. W., Hua, Z., Koza, S. M., Magnelli, P., Guthrie, E., Taron, C. H., & Fountain, K. J. (2015). Rapid preparation of released N-glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection. *Analytical Chemistry*, *87*(10), 5401–5409. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00758>
- Liang, H. C., Russell, C., Mitra, V., Chung, R., Hye, A., Bazenet, C., Lovestone, S., Pike, I., & Ward, M. (2015). Glycosylation of Human Plasma Clusterin Yields a Novel Candidate Biomarker of Alzheimer's Disease. *Journal of Proteome Research*, *14*(12), 5063–5076. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00892>
- Maguire, T. M., Gillian, A. M., O'Mahony, D., Coughlan, C. M., & Breen, K. C. (1994). A decrease in serum sialyltransferase levels in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *15*(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(94\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0197-4580(94)90149-X)
- Nagamine, S., Yamazaki, T., Makioka, K., Fujita, Y., Ikeda, M., Takatama, M., Okamoto, K., Yokoo, H., & Ikeda, Y. (2016). Hypersialylation is a common feature of neurofibrillary tangles and granulovacuolar

- degenerations in Alzheimer's disease and tauopathy brains. *Neuropathology*, *36*(4), 333–345. <https://doi.org/10.1111/neup.12277>
- Palmigiano, A., Barone, R., Sturiale, L., Sanfilippo, C., Bua, R. O., Romeo, D. A., Messina, A., Capuana, M. L., Maci, T., Le Pira, F., Zappia, M., & Garozzo, D. (2016). CSF N-glycoproteomics for early diagnosis in Alzheimer's disease. *J Proteomics*, *137*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.10.006>
- Palmigiano, A., Messina, A., Bua, R. O., Barone, R., Sturiale, L., Zappia, M., & Garozzo, D. (2018). CSF N-glycomics using MALDI MS techniques in Alzheimer's disease. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1750, pp. 75–91). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7704-8_5
- Reider, B., Szigeti, M., & Guttman, A. (2018). Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination. *Talanta*, *185*, 365–369. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.03.101>
- Schedin-Weiss, S., Winblad, B., & Tjernberg, L. O. (2014). The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS Journal*, *287*(1), 46–62. <https://doi.org/10.1111/febs.12590>
- Schwedler, C., Kaup, M., Weiz, S., Hoppe, M., Braicu, E. I., Sehouli, J., Hoppe, B., Tauber, R., Berger, M., & Blanchard, V. (2014). Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(28), 7185–7193. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8168-y>
- Szigeti, M., Lew, C., Roby, K., & Guttman, A. (2016). Fully Automated Sample Preparation for Ultrafast N-Glycosylation Analysis of Antibody Therapeutics. *Journal of Laboratory Automation*, *27*(2), 281–286. <https://doi.org/10.1177/2211068215608767>
- Váradi, C., Lew, C., & Guttman, A. (2014). Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies. *Analytical Chemistry*, *86*(12), 5682–5687. <https://doi.org/10.1021/ac501573g>
- Váradi, C., Mittermayr, S., Millán-Martín, S., & Bones, J. (2016). Quantitative twoplex glycan analysis using $^{12}\text{C}_6$ and $^{13}\text{C}_6$ stable isotope 2-aminobenzoic acid labelling and capillary electrophoresis mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(30), 8691–8700. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9935-8>
- Váradi, C., Mittermayr, S., Szekrényes, Á., Kádas, J., Takacs, L., Kurucz, I., & Guttman, A. (2013). Analysis of haptoglobin N-glycome alterations in inflammatory and malignant lung diseases by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *34*(16), 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/elps.201300041>
- Weiz, S., Wiecek, M., Schwedler, C., Kaup, M., Braicu, E. I., Sehouli, J., Tauber, R., & Blanchard, V. (2016). Acute-phase glycoprotein N-glycome of ovarian cancer patients analyzed by CE-LIF. *ELECTROPHORESIS*, *37*(11), 1461–1467. <https://doi.org/10.1002/elps.201500518>
- Zhou, S., Veillon, L., Dong, X., Huang, Y., & Mechref, Y. (2017). Direct comparison of derivatization strategies for LC-MS/MS analysis of N-glycans. *The Analyst*, *142*(23), 4446–4455. <https://doi.org/10.1039/C7AN01262D>

Chapitre VI : Etude de la glycosylation de la transferrine pour le dépistage de pathologies oculaires

I. Introduction

Le travail présenté dans ce dernier chapitre est issu d'une collaboration entre notre laboratoire et l'équipe « Physiopathologie et thérapeutique des maladies rétinienne » (UMRS 1138) du Centre de Recherche des Cordeliers à Paris, qui s'intéresse à l'implication du fer dans les dégénérescences rétinienne et plus particulièrement au rôle de la transferrine (Tf) dans les mécanismes pathogéniques fer-dépendants.

Le fer est un oligo-élément issu de l'alimentation. Il est réduit de l'état ferrique (Fe^{3+}) à l'état ferreux (Fe^{2+}) pour être transporté dans les entérocytes puis dans le flux sanguin par la ferroportine. La ferroportine fonctionne simultanément avec les ferroxidases, la ceruloplasmine ou l'hephaestine qui permettent d'oxyder le Fe^{2+} en Fe^{3+} . Le fer est alors transporté dans le sang par la Tf. Celle-ci ne pouvant traverser les barrières hémato-rétiniennes, elle se lie donc à son récepteur situé au niveau des cellules de cette barrière puis l'acidification des endosomes entraîne la libération du fer au niveau de la rétine. Celui-ci est alors envoyé soit dans un compartiment de transit, de stockage ou fonctionnel.

Le fer est essentiel pour le fonctionnement des photorécepteurs situés dans la rétine mais il contribue également au stress oxydant et à l'inflammation impliqués notamment dans la dégénérescence rétinienne (Picard *et al.*, 2015). En effet, l'excès de fer situé dans le compartiment de transit peut générer des radicaux libres oxygénés par la réaction de Fenton à partir de peroxyde d'hydrogène (Figure 107). Celui-ci est formé par la réaction d'électrons, issus de l'activité mitochondriale, avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme (Haleng *et al.*, 2007). Les radicaux formés par la réaction de Fenton génèrent des lésions sur l'ADN et les protéines (Jeanny *et al.*, 2012).

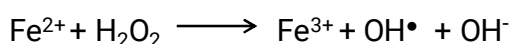


Figure 107 : Réaction de Fenton générant des radicaux libres à partir du fer

Le taux de fer contenu dans la rétine est généralement contrôlé par des protéines régulatrices du fer exprimées localement comme la ferroportine et la Tf (Gnana-Prakasam *et al.*, 2010; D. Song & Dunaief, 2013). Néanmoins, un excès de fer libre peut être retrouvé dans la rétine de patients âgés et s'y accumuler lors de pathologies rétinienne (Ciudin *et al.*, 2010; R. W. Wong *et al.*, 2007). Une élévation de la concentration en fer dans l'humeur vitrée a également été rapportée (Jünemann *et al.*, 2013). Cet excès de fer est très toxique pour les photorécepteurs et conduit à des dommages irréversibles pouvant aller jusqu'à la cécité (Rogers *et al.*, 2007). La Tf semble jouer un rôle protecteur de la rétine en limitant la mort des photorécepteurs (Jeanny *et al.*, 2012). De fait, l'apport d'Apo-Tf (sans fer), directement dans l'œil de rats souffrants de dégénérescence rétinienne par

injection intrapéritonéale, permet de limiter la mort cellulaire des photorécepteurs (Jeanny *et al.*, 2012). Celle-ci permettrait de réguler le métabolisme du fer, résultant en une diminution de l'excès de fer présent dans la rétine ainsi qu'à une diminution du stress oxydant (Picard *et al.*, 2015). Il semblerait donc que la Tf sécrétée de manière endogène par les cellules rétinienne soit inefficace pour contrôler le taux de fer libre présent dans la rétine chez les patients atteints de pathologies de dégénérescence rétinienne.

L'humeur vitrée est un liquide oculaire qui remplit la cavité de l'œil derrière le cristallin et représente 90% du volume de l'œil (Figure 108). Ce fluide biologique est tout aussi complexe que des fluides plus classiquement étudiés tels que le plasma et le LCR. En effet, il est composé d'autant de protéines mais dans des proportions qui diffèrent. Néanmoins, contrairement aux autres fluides biologiques précédemment cités, l'humeur vitrée n'est disponible que dans de faibles volumes à cause de son origine (~700µL). Ce fluide présente une plus grande viscosité que la plupart des fluides biologiques, deux à quatre fois plus importante que celle de l'eau pure. Comme pour le LCR, la Tf a une concentration 10 à 100 fois plus faible dans l'humeur vitrée que dans le plasma ($C_{\text{plasma}}=2,0-3,6 \text{ g/L}$) (Rodríguez-Capote *et al.*, 2013).

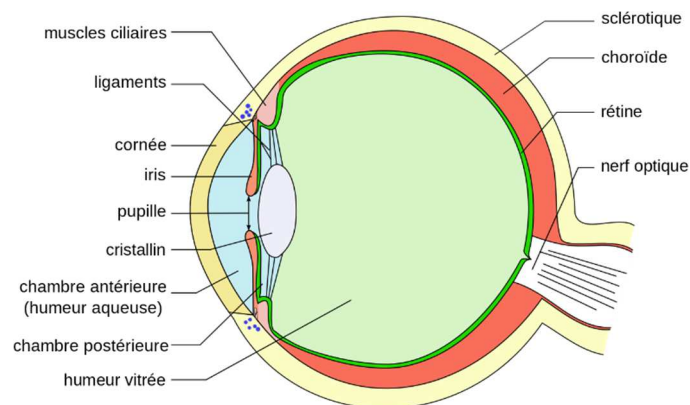


Figure 108 : Anatomie de l'œil humain

La Tf est une glycoprotéine de 679 acides aminés et de 79 570 Da impliquée dans le transport du fer (Fe^{3+}) grâce à deux sites de liaison. Chez un individu sain, la Tf sérique est saturée en fer à hauteur de 30%. Elle possède deux sites de N-glycosylation (Asn^{413} et Asn^{611}) et ses N-glycanes sont de type complexe, bi- et tri-antennés bi- et tri-sialylés dans le sérum (Caslavská & Thormann, 2018). La glycosylation de la Tf dans d'autres fluides biologiques comme le LCR ou l'humeur vitrée semble différente de celle de la Tf plasmatique (Figure 109). En effet, un glycane additionnel tronqué (sans Gal et sans acide sialique) mais fucosylé et avec un GlcNAc en position bissectrice a été décrit dans le LCR (Futakawa *et al.*, 2012; Hoshi *et al.*, 2017). Cette même forme serait présente dans l'humeur vitrée (Tripathi *et al.*, 1990). Cette glycoforme asialylée de la Tf est appelée $\beta 2$ -Tf.

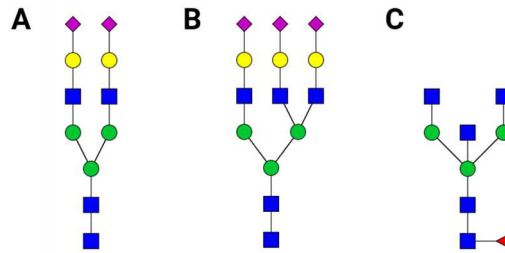


Figure 109 : Glycanes de la Tf plasmatique (A et B) et glycanes additionnel présent dans le LCR et l'humeur vitrée (C)

L'équipe « Physiopathologie et thérapeutique des maladies rétinienne » suspecte le rôle important de la β 2-Tf dans le mécanisme de ces pathologies oculaires. En effet, il a déjà été rapporté qu'une glycosylation incomplète de la Tf conduit à une diminution de sa capacité à transporter le fer (Hoefkens *et al.*, 1997). Ainsi, la β 2-Tf présente dans l'humeur vitrée pourrait jouer un rôle dans l'excès de fer retrouvé dans l'œil de patients atteints de dégénérescences rétinienne. Ce groupe est donc à la recherche d'une méthode permettant de réaliser le profil de glycosylation de la Tf dans l'humeur vitrée afin de quantifier la β 2-Tf.

Actuellement, l'analyse de la Tf plasmatique est réalisée en routine notamment pour le dépistage de l'alcoolisme chronique ou des CDGs. Plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour séparer les différents glycoformes de la Tf dans le plasma. Tout d'abord des méthodes en gel, tels que l'IEF ou l'électrophorèse 2D ont été employées (Arndt, 2001a; Jaak Jaeken, 2010b). Elles permettent de séparer les glycoformes selon le nombre d'acides sialiques qu'elles portent mais leur reproductibilité n'est pas optimale et la quantification difficile. Deux approches en IEFc ont également été rapportées mais peu employées à cause de la difficulté des méthodes et des temps d'analyse élevés (Luo *et al.*, 2011). D'autres approches plus récentes, telles que l'ECZ ou l'HPLC ont été développées (Carchon, 2004; Dave *et al.*, 2018; Parente *et al.*, 2010; Quintana, Montero, *et al.*, 2009). Des kits d'analyse de la Tf par ECZ ont ainsi été commercialisés par Analis et Sebia (CEofix-CDT et Capillarys-CDT respectivement) pour quantifier les différentes formes de la Tf et en particulier la CDT impliquée dans le dépistage de l'alcoolisme chronique (Caslavská & Thormann, 2018). Ces kits permettent d'analyser la Tf en moins de 10min et nécessite uniquement une étape de saturation de la Tf en Fe^{3+} . Néanmoins, certains interférents peuvent parfois gêner la détection des glycoformes de la Tf et une immunocapture du plasma de cette dernière peut être réalisée pour simplifier les profils obtenus (Caslavská *et al.*, 2012; de l'Escaille & Falmagne, 2007). Des méthodes employant le couplage à la SM comme l'EC-SM ont également été étudiées (Kleinert *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2014) mais restent difficilement applicables à l'hôpital du fait de la faible disponibilité de ces instruments dans le milieu hospitalier.

L'analyse de la β 2-Tf a également été réalisée dans le LCR à l'aide d'un des kits commerciaux d'ECZ décrits précédemment pour séparer les glycoformes de la Tf (Rodríguez-Capote *et al.*, 2013). Les échantillons de LCR ont été concentrés sur membrane de 30 kDa puis analysés par le kit CEofix qui a permis de quantifier la β 2-Tf (0,3-2,8 mg/mL) chez des patients présentant des fuites de LCR. Une analyse par SM MALDI-TOF a permis de déterminer la structure du glycanes présent sur la β 2-Tf (Futakawa *et al.*, 2012). Néanmoins, pour le moment, seule une analyse de la Tf intacte par électrophorèse SDS-PAGE a confirmé la présence de la β 2-Tf dans l'humeur vitrée (Tripathi *et al.*, 1990). Compte-tenu de la faible résolution de cette méthode, la caractérisation du glycanes porté par

cette glycoforme présente dans l'humeur vitrée doit être réalisée afin de confirmer qu'elle est identique à celle présente dans le LCR.

Nos travaux se sont donc concentrés sur la combinaison de deux approches analytiques complémentaires. L'analyse des glycoformes de la Tf en ECZ est utilisée pour confirmer la présence d'une β 2-Tf et montrer la possibilité de détecter la Tf dans l'humeur vitrée. L'analyse des glycanes libérés de la Tf issue de l'humeur vitrée est mise au point pour caractériser le glycane présent sur cette β 2-Tf de l'humeur vitrée. Les deux stratégies d'étude de la glycosylation de la Tf employées sont présentées. Tout d'abord, l'analyse des glycoformes de la Tf par ECZ à l'aide du kit CEofix-CDT est détaillée et a été employée pour vérifier l'efficacité de l'immunopurification de la Tf réalisée sur l'humeur vitrée. Ensuite, une carte N-glycanique de la transferrine a été réalisée en ECG-LIF à l'aide de la méthode présentée dans le Chapitre V, pour confirmer la présence du N-glycane atypique recherché.

II. Matériel et méthodes

II.1.1. Réactifs et consommables

Les colonnes de déplétion IgY anti-Tf (15 mg IgY/mL billes) ont été achetées chez GenWay Biotech (San Diego, CA, USA). La transferrine issue de sang humain (>95%), les sels Tris (>99,9%), Glycine (>99,9%), l'azoture de sodium (NaN_3 , >99,9%) et le Tween-20[®] (polyoxyéthylènesorbitan monolaurate) sont des produits provenant de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Les sels NaCl (100%) ont été achetés chez Euromedex (Souffelweyersheim, France). L'acétonitrile (ACN), l'acide chlorhydrique (1M) et l'hydroxyde de sodium (1M) proviennent de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Tous les tampons sont préparés avec de l'eau déionisée préparée avec un système de purification d'eau Direct-QR 3 de chez Millipore (Billerica, MA, USA).

Le sérum artificiel a été acheté chez Merck (Darmstadt, Allemagne) et l'échantillon d'humeur vitrée a été fourni par le Centre de Recherche des Cordeliers.

Les dispositifs de filtration Nanosep (membrane Oméga de 10 kDa) ont été achetés chez Pall Corporation (Fontenay-sous-bois, France) et les Amicon (membrane cellulose, 100 kDa) proviennent de chez Merck Millipore (Guyancourt, France). La centrifugeuse Micro Star 17R provient de chez VWR.

Le kit d'analyse de la transferrine CEofixTM-CDT a été acheté chez Analis (Namur, Belgique). Le kit d'analyse « Fast glycan labeling and analysis » est un produit de Sciex (Framingham, MA, USA). Les capillaires en silice fondue proviennent de chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

II.1.2. Immunopurification de la transferrine de l'humeur vitrée

Les colonnes de déplétion sont tout d'abord agitées manuellement pour re-suspendre les billes. Puis, elles sont centrifugées à 500g pendant 1min à 4°C. Ces conditions de centrifugation seront utilisées pour tout le reste de la procédure. Les billes sont re-suspendues dans 500 μ L de tampon 10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4 puis de nouveau centrifugées. 200 μ L d'échantillon sont dilués dans 200 μ L du tampon précédent. Cette solution d'échantillon est ensuite ajoutée aux billes précédemment centrifugées puis le mélange est agité manuellement puis incubé pendant 15min sur

roue tournante à 40 rpm. Les colonnes sont à nouveau centrifugées puis rincées avec 500µL de tampon 10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4 avant une nouvelle centrifugation. Les billes sont alors lavées trois fois avec 500µL de tampon 10mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20 pH 7,4 pour éliminer les interférents liés par des interactions non-spécifiques. L'élution de la transferrine capturée est ensuite effectuée par deux fois 500µL de tampon 0,1M glycine pH 2,5, le mélange est agité manuellement puis est incubé pendant 2-3min à température ambiante avant centrifugation. Ces deux fractions sont rassemblées puis neutralisées par 100µL de tampon Tris 1M pH 8,0. Les colonnes de déplétion sont ensuite régénérées par deux lavages par 500µL avec la solution de 0,1M glycine pH 2,5, le mélange est agité manuellement puis est incubé pendant 2-3min à température ambiante comme pendant l'élution. Les colonnes sont alors neutralisées par 500µL d'une solution de 0,1M Tris pH 8,0, la suspension est agitée manuellement puis est incubée 5min à température ambiante. Après cette dernière centrifugation, les billes sont re-suspendues dans 500µL de tampon 10mM Tris, 150mM NaCl, 0,02% NaN₃ pH 7,4, agitées manuellement puis incubées 5 min à température ambiante avant de les conserver à 4°C.

Les fractions de transferrine immunopurifiée sont ensuite lyophilisées puis reprises dans 500µL de tampon 20mM de Tris à pH 8,0. Le tampon d'échantillon est échangé par filtration sur membrane. Les membranes de 10kDa sont préalablement préconditionnées avec 500µL d'eau milli-Q (centrifugation à 6000 g pendant 4 min). 500µL d'échantillon sont ensuite déposés sur la membrane puis filtrés 20min à 6000g puis l'échantillon est récupéré lorsque le volume est d'environ 10µL. Les premiers essais d'analyse avec le kit CEofix de la fraction récupérée après purification sans changement de tampon se sont avérés infructueux. En effet, il semble qu'une interaction entre la glycine présente dans le tampon d'élution et le tampon de séparation gêne la migration en ECZ. Cette incompatibilité n'est pas liée au pH puisque celui-ci est neutralisé après élution. Néanmoins le changement de tampon permis par la filtration semble permettre de diminuer les problèmes de détection.

II.1.3. Concentration de la transferrine de l'humeur vitrée sur membrane

Les membranes de 100kDa et 10 kDa sont préalablement préconditionnées avec 500µL d'eau milli-Q (centrifugation à 6000 g pendant 4 min). 500µL d'échantillon sont ensuite déposés sur la membrane de 100 kDa puis filtrés 10min à 6000g (4°C). Le filtrat est récupéré puis déposé sur la membrane de 10 kDa puis filtré 10min à 6000g (4°C). Le tampon de l'échantillon est échangé en centrifugeant 3 fois 500µL de tampon 20mM Tris pH 8,0. Le rétentat est récupéré lorsque le volume est d'environ 20µL. Le filtrat est ensuite lyophilisé puis repris dans 5µL de tampon 20mM de Tris à pH 8,0.

II.1.4. Analyse des glycoformes de la transferrine

Les analyses d'EC ont été réalisées sur un instrument P/ACE TM MDQ (Sciex) équipé avec un détecteur à barrette de diode avec une détection réalisée en UV à 200 nm. Les capillaires de 50µm de diamètre interne et de longueur effective 40 cm (longueur totale de 50 cm) ont été utilisés. Le logiciel d'acquisition et de traitement des data est 32 Karat™ version 7.0 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK).

Après immunopurification, l'échantillon est analysé par le kit CEofix-CDT pour s'assurer que la transferrine a bien été récupérée. Avant analyse, 0,5 µL d'une solution de Fe(III) sont ajoutés à 4,5 µL d'échantillon de transferrine. Brièvement, le capillaire est preconditionné en le rinçant 1 min à 25 psi par la solution de conditionnement du kit (0,2 M NaOH). Le capillaire est ensuite incubé 10 min avant une séparation en pression de 1 min à 25psi réalisée avec ce même tampon. Le capillaire est ensuite vidé et rincé par une solution d'initiateur (Tris-phosphate pH 2,0 avec un polycation polymérique) pendant 0,3 min à 25 psi. Il est ensuite rincé par le tampon d'analyse (Tris-borate pH 8,5 avec un polyanion polymérique) 0,7 min à 25 psi. Une injection hydrodynamique de l'échantillon est exécutée du côté inlet pendant 12 s à 0,5 psi. La séparation est effectuée sous 28kV à 30°C pendant 8 min. Après chaque analyse, le capillaire est rincé pendant 0,5 min à 25psi par de l'eau.

II.1.5. Analyse des N-glycanes par ECG-LIF

La préparation d'échantillon des N-glycanes a été réalisée à l'aide du kit « Fast glycan labeling and analysis » et selon le même protocole que celui présenté dans le Chapitre V (partie II.3.3). Les analyses en ECG-LIF ont été réalisées sur un instrument P/ACE TM MDQ (Sciex) équipé avec un détecteur à fluorescence induite par laser avec une longueur d'onde d'excitation à 488nm et d'émission à 520 nm. Les capillaires de 50µm de diamètre interne et de longueur effective 50 cm (longueur totale de 60,2 cm) en silice fondue ont été utilisés. Le logiciel d'acquisition et de traitement des data est 32 Karat™ version 7.0 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK).

Le capillaire de silice fondue neuf est tout d'abord preconditionné avec de l'eau, NaOH à 1M, eau, HCl à 0,1M, eau puis le gel de séparation pendant 5 min à 80 psi. Avant chaque analyse, le capillaire est rincé pendant 3 min à 80 psi avec le gel. Ensuite l'injection hydrodynamique de l'échantillon de 10s à 2 psi est exécutée. Les extrémités du capillaire sont alors rincées par de l'eau. L'injection du standard « bracketing » (BST, 2GU et 15GU) dérivé par l'APTS est effectuée de manière hydrodynamique à 2psi pendant 10s. Les extrémités du capillaire sont de nouveau rincées par de l'eau puis la séparation est effectuée à -30kV (polarité inverse) pendant 25min. Après chaque analyse le capillaire est rincé avec de l'eau 5 min à 50 psi.

III. Séparation des glycoformes de la transferrine de l'humeur vitrée

Les travaux présentés ici ont été réalisés sur un échantillon d'humeur vitrée d'un patient atteint d'un décollement de la rétine. La concentration en Tf globale, estimée à 226,34 µg/mL a été mesurée par un dosage ELISA effectuée par l'équipe « Physiopathologie et thérapeutique des maladies rétinienne ». La concentration en Tf de cet échantillon étant environ 10 fois plus faible que celle du plasma, un traitement d'échantillon a tout d'abord été effectué pour préconcentrer la Tf.

Une immunopurification de la Tf issue de ce liquide biologique a été réalisée. Cette méthode a déjà été rapportée dans la littérature pour éliminer des interférents présents lors de l'analyse les glycoformes de la Tf du sérum (Caslavská *et al.*, 2017; de l'Escaille & Falmagne, 2007; Lanz *et al.*, 2008). Cependant, celle-ci n'a pas été réalisée sur des échantillons aussi peu concentrés en Tf que dans l'humeur vitrée. L'immunopurification, réalisée sur des colonnes commerciales contenant des anticorps IgY anti-Tf immobilisés sur des billes polymériques est suivie d'un changement de tampon effectué par filtration sur une membrane de 10 kDa. L'analyse par ECZ des glycoformes de

la Tf est ensuite réalisée à l'aide du kit « CEofixTM-CDT » afin de contrôler l'efficacité de l'étape d'immunocapture. Celui-ci est généralement appliqué à des échantillons de plasma ayant simplement subi une saturation en fer grâce à l'ajout d'une solution de Fer(III). Les conditions analytiques développées dans ce kit permettent de détecter spécifiquement la Tf en 8 min même si le plasma contient une multitude d'autres protéines.

Tout d'abord, une analyse de sérum artificiel commercial (albumine, transferrine et insuline et de sels) a été réalisée pour vérifier l'efficacité de l'enrichissement sur une matrice plus simple qu'un échantillon biologique réel mais néanmoins plus complexe qu'un simple échantillon de Tf standard solubilisé dans l'eau. L'emploi d'un sérum artificiel permet en effet de prendre en compte un certain nombre d'effets liés à la matrice et à la présence de protéines majoritaires dans les fluides biologiques. Le profil obtenu pour l'échantillon déplété a été comparé à celui d'un échantillon de plasma non traité qui sert de contrôle pour la méthode d'ECZ CEofix (Figure 110A). Il est difficile d'évaluer le rendement des prétraitements puisque la concentration de la Tf n'a pas été estimée dans le plasma de contrôle ainsi que dans le sérum artificiel. Le plasma de contrôle permet d'identifier les pics correspondant aux diverses glycoformes de la Tf, migrant entre 6 et 7 min. Afin de simplifier les notations, les pics sont numérotés de 1 à 6 en fonction du nombre total d'acides sialiques présents sur les deux sites de glycosylation de la Tf. Par exemple, le pic 4 majoritaire correspond à une glycoforme avec un glycane bi-antenné et bi-sialylé (i.e. glycane de la Figure 109A) sur chacun des deux sites de glycosylation, possédant donc 4 acides sialiques au total (Figure 110B). Comme la β 2-Tf n'existe pas dans le plasma/sérum, aucun pic correspondant à cette glycoforme ne peut être détecté dans le profil du sérum artificiel. Le profil obtenu pour le sérum artificiel ne présente donc que 4 glycoformes (3 à 6).

Après les résultats encourageants obtenus sur le sérum artificiel, des essais ont été menés sur l'échantillon d'humeur vitrée. Après immunopurification, seules trois glycoformes sont visibles (4, 5 et 6) et la glycoforme β 2-Tf est absente du profil de l'humeur vitrée. Le profil déplété présente également deux pics très intenses autour du pic de FEO vers 5min. Ces pics correspondent probablement à des sels encore très concentrés malgré le changement de tampon d'échantillon avant analyse ECZ pour le liquide oculaire alors que ce phénomène est beaucoup moins important dans le cas du sérum artificiel. La glycine contenue dans le tampon d'élution (c=0,1 M) employée lors du processus d'immunocapture n'a sans doute pas été totalement éliminée lors du changement de tampon. Son influence sur la migration est d'autant plus importante que la concentration en Tf est faible. En effet, lorsque le tampon d'échantillon reste le tampon d'élution et n'est pas échangé, aucun pic de Tf n'est détecté même pour le sérum artificiel où la Tf est concentrée. Il semble donc que l'élimination de la glycine du tampon d'échantillon est indispensable pour détecter les glycoformes de la Tf.

Deux hypothèses peuvent expliquer pourquoi la glycoforme β 2-Tf n'est pas visible sur le profil ECZ. Soit la β 2-Tf n'est pas présente dans l'échantillon après extraction soit elle n'est pas détectée. L'absence de β 2-Tf après immunopurification peut signifier que la méthode d'extraction engendre une sélectivité dans la capture et ne permet pas d'enrichir l'ensemble des glycoformes de la Tf. Si la β 2-Tf n'est pas détectée, cela peut être dû à la présence de glycine dans le tampon d'échantillon qui influe sur la séparation. Une autre possibilité est la présence d'un plus grand nombre d'interférents lors de l'étude de l'humeur vitrée qui gêne la détection des glycoformes moins abondantes à cause d'une augmentation de la ligne de base. Ces interférents sont probablement capturés de manière

non-spécifique sur les billes IgY et sont alors élués en même temps que la Tf. Le fait que l'échantillon de sérum artificiel ayant également été déplété ne présente pas cette augmentation de la ligne de base semble confirmer qu'il s'agit d'un effet de matrice généré par le fluide oculaire.

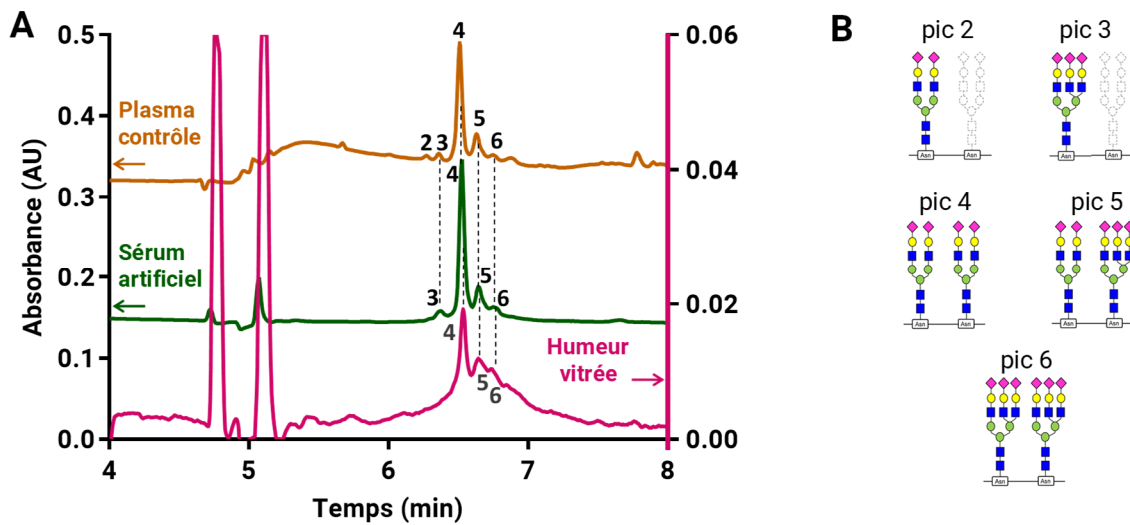


Figure 110 : Profils ECZ des glycoformes de la Tf pour un échantillon de plasma non traité, un échantillon de sérum artificiel et d'humeur vitrée après immunopurification (A) et représentation des glycoformes associées à chaque pic (B)

Afin de vérifier l'efficacité de l'immunopurification et contrôler qu'elle n'engendre pas un biais de sélectivité, une autre méthode de préconcentration non-spécifique a été testée : la filtration sur membrane. Une double filtration a été exécutée dans le but d'éliminer une partie des interférents lors de la filtration. Tout d'abord, une première étape a été réalisée sur une membrane de 100 kDa pour retirer les protéines de grande taille telles que les IgG puis la deuxième filtration a été effectuée sur une membrane de 10 kDa pour retirer les sels et concentrer la Tf. Tout comme l'immunocapture, la filtration a tout d'abord été réalisée sur un échantillon de sérum artificiel. Le profil présenté en ECZ indique la détection de 4 glycoformes (3 à 6) comme après immunopurification (Figure 111). Il est à noter néanmoins que l'intensité des pics est plus importante pour l'échantillon ayant subi une immunopurification que celui ayant été filtré. Le rendement semble inférieur après filtration puisque la différence entre les deux traitements est de l'ordre de 40%. Ceci est peut-être dû à une concentration de Tf trop élevée localement lors de la filtration, entraînant sa précipitation sur la membrane. De plus, comme la procédure de filtration est réalisée sur deux membranes successivement, la perte d'échantillon est sans doute beaucoup plus élevée que lors de la méthode d'immunopurification qui ne comporte qu'une étape de filtration sur membrane. La comparaison des aires relatives (n=2) des 4 pics indique que les deux traitements semblent concentrer les différentes glycoformes de la même manière puisque les aires relatives des glycoformes ne varient que très légèrement entre les deux méthodes. L'immunopurification n'engendre donc pas de sélectivité lors du traitement de l'humeur vitrée.

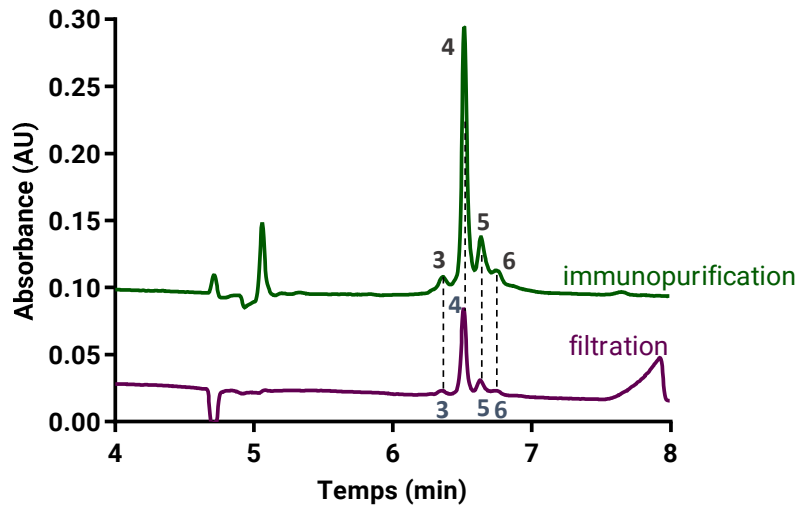


Figure 111 : Comparaison des profils ECZ de sérum artificiel traité par immunopurification ou filtration

La filtration a également été appliquée au même échantillon d'humeur vitrée (Figure 112). Le profil obtenu est similaire à celui observé pour l'immunopurification en termes d'intensité, toutefois, les deux profils ne présentent pas le même nombre de pics. L'échantillon après filtration permet de détecter 7 glycoformes de la Tf, dont la forme particulière $\beta 2$ -Tf, alors que seules 3 glycoformes sont présentes dans le profil après immunopurification. Cela signifie que de la $\beta 2$ -Tf est bien présente dans l'échantillon d'humeur vitrée. Cette analyse suggère que la sensibilité de la méthode d'immunopurification n'est peut-être pas suffisante pour détecter la forme $\beta 2$ -Tf. Afin de dépasser ce problème de sensibilité en ECZ-UV, l'analyse des glycanes dérivés par un fluorophore permettant d'améliorer la sensibilité de la détection a été envisagée pour détecter la $\beta 2$ -Tf.

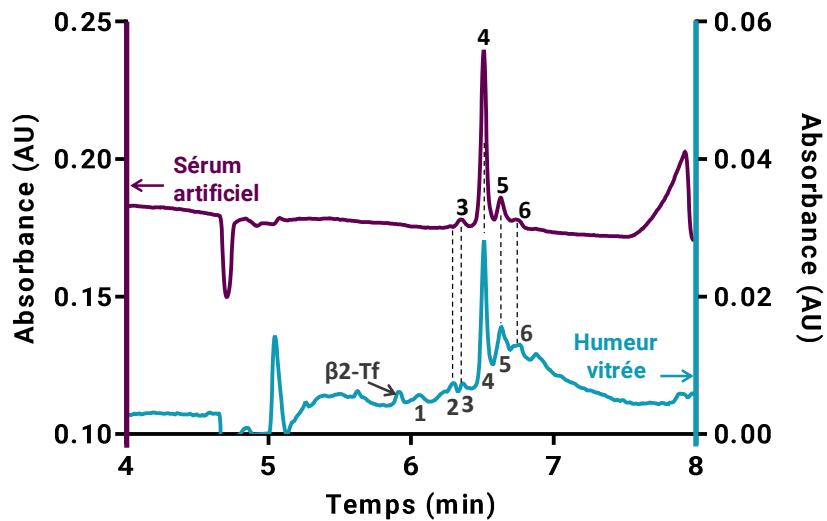


Figure 112 : Profils ECZ des glycoformes de la Tf d'un échantillon de sérum artificiel et d'humeur vitrée obtenus après filtration.

IV. Séparation des glycanes de la transferrine

Une deuxième approche a été envisagée. Les glycanes libérés de la Tf extraite de l'humeur vitrée ont ensuite été analysés afin de pouvoir vérifier la structure du glycanes additionnel présent sur la β 2-Tf. La procédure de préparation des glycanes est la même que celle utilisée dans le Chapitre V. Afin d'observer uniquement les glycanes libérés de la Tf, seuls les échantillons issus de l'immunopurification ont été analysés. En effet, l'objectif de travail lié aux dégénérescences oculaires, à la différence de l'analyse glycomique présentée dans le Chapitre V, est de vérifier que le glycanes porté par la Tf présente dans l'humeur vitrée est identique à celui identifié dans le LCR (Figure 109C).

Le profil glycanique obtenu pour le sérum artificiel présente plusieurs pics de glycanes, bien distincts du bruit de fond (Figure 113A). Le pic majoritaire (b) correspond au glycanes bi-antenné bi-sialylé issu de la glycoforme la plus abondante et numérotée 4, attribué à partir du profil ECZ d'un échantillon de Tf standard non traité. Comme attendu, le glycanes de la β 2-Tf n'est pas visible sur ce profil puisqu'elle n'existe que dans le LCR et l'humeur vitrée. Pour ce qui est de l'humeur vitrée, le profil obtenu est très différent de celui du sérum artificiel puisque les pics sont de très faible intensité (Figure 113A). De plus on voit que la ligne de base est perturbée. Il est à noter également que les proportions de chacun des glycanes change entre les deux profils, ce qui est attendu puisque les glycanes de la Tf sont différents dans le sérum et dans l'humeur vitrée. Aucun pic additionnel par rapport au sérum artificiel n'est détecté dans l'humeur vitrée. Il apparaît donc que le glycanes spécifique à l'humeur vitrée de la forme β 2-Tf n'est pas détecté. Plusieurs explications sont possibles. En effet, lors de la préparation des glycanes des deux échantillons, les billes n'avaient pas le même aspect dès l'étape de déglycosylation. En effet, pour le sérum artificiel aucun problème n'a été noté mais pour l'humeur vitrée, les billes se sont complètement agrégées et ont formé une sorte de gel qui s'est collé sur toute la surface du tube (Figure 113B). Il était alors impossible de remettre les billes en suspension. Bien que difficilement explicable, cette agrégation des billes observée les rend moins efficaces pour capturer les glycanes. Il est possible également que ce soit la présence d'interférents qui limitent la détection des glycanes issus de l'humeur vitrée. La Tf étant beaucoup moins concentrée, la concentration en glycanes est probablement trop faible pour être détectés. Il faudrait préconcentrer davantage l'échantillon, un volume d'humeur vitrée plus important serait alors nécessaire.

Ainsi l'emploi du kit «Fast glycan labeling and analysis» nécessite de prendre des précautions quant à la composition de l'échantillon qui peut provoquer l'agrégation des billes magnétiques employées pour capturer les glycanes, diminuant fortement leur activité.

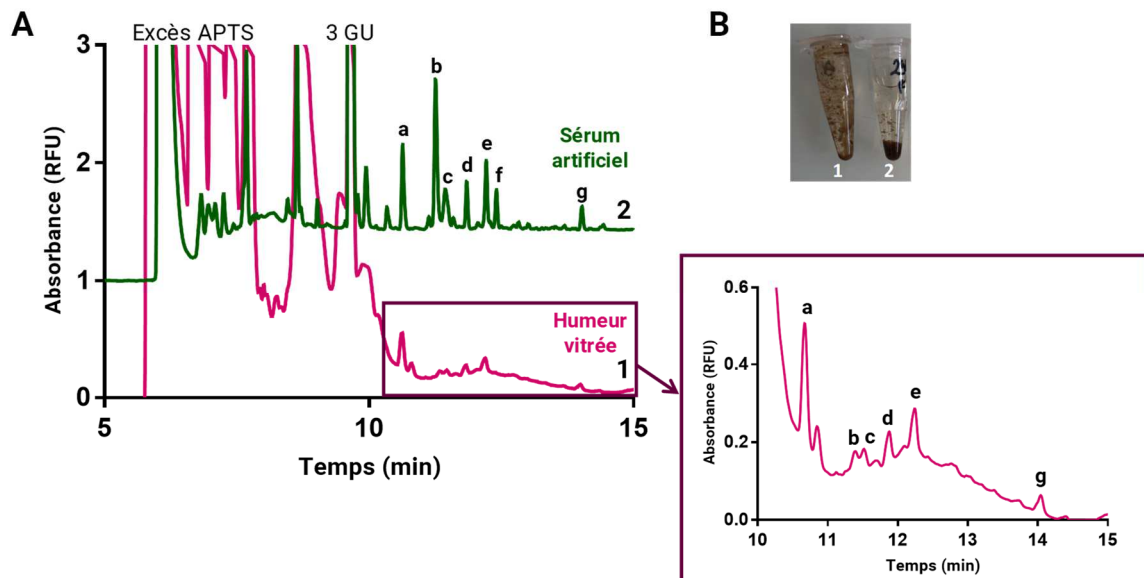


Figure 113 : Profils des N-glycanes de la Tf déplétée à partir d'humeur vitrée (1) et de sérum artificiel (2) et obtenus par ECG-LIF (A) et photographie des deux préparations d'échantillon des glycanes de la Tf issue (B) de l'humeur vitrée (1) et du sérum artificiel (2)

V. Conclusion

Afin d'étudier la glycosylation de la Tf de l'humeur vitrée faiblement concentrée et de caractériser le glycanes de la β 2-Tf, la préconcentration de l'échantillon est une étape cruciale. Pour cela, l'immunopurification de la Tf a été implémentée. L'analyse par ECZ des glycoformes obtenues après immunocapture a montré que la Tf de l'humeur vitrée a été détectée malgré sa faible concentration (226,34 μ g/mL) bien que la forme d'intérêt (β 2-Tf) soit absente du profil. Les explications envisagées pour expliquer cette absence du profil ECZ ont été la présence de glycine dans le tampon d'échantillon après extraction, la présence d'interférents purifiés de manière non-spécifiques sur les billes IgY engendrant une perturbation de la détection ainsi que le manque de sensibilité de la méthode d'ECZ-UV dans le cas de l'analyse d'échantillons faiblement concentrés. Afin de surmonter l'insuffisante sensibilité de la méthode d'ECZ-UV, l'analyse des glycanes dérivés par fluorescence a été effectuée pour permettre non seulement une détection plus sensible par ECG-LIF mais également la caractérisation du glycanes de la β 2-Tf dans l'humeur vitrée. Finalement, l'analyse des glycanes du liquide oculaire pour caractériser le glycanes de la β 2-Tf s'est avérée plus complexe que prévue. En effet, l'agrégation des billes magnétiques durant la préparation des échantillons de N-glycanes a limité leur détection puisqu'ils ont été détectés avec des intensités très faibles et le glycanes de la β 2-Tf n'a pas pu être détecté.

L'analyse par ECZ des glycoformes de la Tf ne nécessite pas obligatoirement l'immunopurification de la Tf pour la préconcentrer et ainsi augmenter la sensibilité du kit CEofix-CDT. En effet, une méthode non-spécifique telle que la filtration sur membrane peut permettre d'augmenter sa concentration pour assurer sa détection puisque la méthode d'ECZ est spécifique à la Tf. Le profil de l'humeur vitrée ainsi obtenu est très satisfaisant puisque toutes les glycoformes, y compris la forme d'intérêt β 2-Tf sont visibles. Cette préconcentration de l'échantillon permet de quantifier la forme d'intérêt (β 2-Tf) et pourra permettre de comparer les abondances relatives de chacune des glycoformes entre individus sains/malades pour déterminer la pertinence de cette glycoforme dans le mécanisme pathogénique des dégénérescences rétinienne. Pour cela, l'étude

d'un plus grand nombre de patients mais aussi d'individus sains est nécessaire. Pour l'instant, un seul échantillon a été analysé avec cette méthode et représente une humeur vitrée relativement concentrée en Tf (226,34 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cependant, certains patients peuvent présenter des concentrations 20 fois plus faibles que la concentration testée dans cette étude. La procédure de préconcentration devra donc être adaptée pour permettre la détection de la Tf en très faible abondance. Le prélèvement d'un plus grand volume de liquide vitré sur les patients pour assurer une quantité suffisante de Tf devra être envisagé.

Une étape de dialyse pourrait être envisagée pour éliminer plus efficacement la glycine présente dans le tampon d'échantillon et ainsi assurer la détection de toutes les glycoformes présentes dans l'échantillon. Si les glycanes obtenus après préconcentration de la Tf sont toujours trop faiblement concentrés pour une analyse par ECG-LIF, l'emploi d'une méthode analytique plus sensible devra être envisagée. L'utilisation de stratégies de « stacking » peuvent être de bonnes solutions pour améliorer la sensibilité mais incompatible avec l'emploi du gel de séparation fourni dans le kit « Fast glycan labeling and analysis » et quelques développements annexes sur le tampon de séparation seront nécessaires. Certaines techniques de préconcentration des glycanes réalisées par exemple à l'aide de supports monolithiques fonctionnalisés par des lectines, des fonctions boronates ou l'emploi de chromatographie d'interaction à l'aide d'une phase HILIC peuvent également constituer des solutions envisageables pour préconcentrer les glycanes avant leur analyse. Une autre stratégie serait l'emploi de la SM. En effet, il est possible d'analyser les N-glycanes perméthylés par SM MALDI-TOF ou encore par EC-SM en utilisant le RFMS comme cité dans le Chapitre V puisqu'il peut permettre d'atteindre des LOD de l'ordre du fM. L'emploi du RFMS pourra d'ailleurs être réalisé sans l'étape de dérivation des acides sialiques, utile pour éviter la formation d'espèces neutres une fois dérivées par le RFMS qui est chargé positivement, puisque la β 2-Tf n'est pas sialylée.

Références bibliographiques – Chapitre VI

- Arndt, T. (2001). Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: A critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical Chemistry*, 47(1), 13–27. Retrieved from <http://clinchem.aaccjnl.org/content/47/1/13>
- Carchon, H. A. (2004). Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation by Capillary Zone Electrophoresis of Serum Transferrin. *Clinical Chemistry*, 50(1), 101–111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021568>
- Caslavska, J., Joneli, J., Wanzenried, U., Schiess, J., & Thormann, W. (2012). Transferrin immunoextraction for determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum by capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 35(24), 3521–3528. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200712>
- Caslavska, J., Lanz, C., Burda, P., Tobler, M., & Thormann, W. (2017). Analysis of genetic variants of transferrin in human serum after desialylation by capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Journal of Separation Science*, 40(11), 2488–2497. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700211>
- Caslavska, J., & Thormann, W. (2018). Monitoring of transferrin isoforms in biological samples by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 41(1), 303–322. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700914>
- Ciudin, A., Hernández, C., & Simó, R. (2010). Iron overload in diabetic retinopathy: a cause or a consequence of impaired mechanisms? *Experimental Diabetes Research*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/714108>
- Dave, M. B., Dherai, A. J., Udani, V. P., Hegde, A. U., Desai, N. A., & Ashavaid, T. F. (2018). Comparison of transferrin isoform analysis by capillary electrophoresis and HPLC for screening congenital disorders of glycosylation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1), e22167. <https://doi.org/10.1002/jcla.22167>
- de l'Escaille, F., & Falmagne, J.-B. (2007). *Application Note CEofix-CDT: Purification of Transferrin Isoforms from Serum prior to analysis with Capillary Electrophoresis*. Retrieved from https://www.analis.be/site/objects/media/0/0/7/3/6/0073655_media/media1.pdf
- Futakawa, S., Nara, K., Miyajima, M., Kuno, A., Ito, H., Kaji, H., ... Hashimoto, Y. (2012). A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.023>
- Gnana-Prakasam, J. P., Martin, P. M., Smith, S. B., & Ganapathy, V. (2010). Expression and function of iron-regulatory proteins in retina. *IUBMB Life*, 62(5), 363–370. <https://doi.org/10.1002/iub.326>
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, C., Charlier, J. O., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2006.02.001>
- Hoefkens, P., Huijskes-Heins, M. I. E., De Jeu-Jaspars, C. M. H., Van Noort, W. L., & Van Eijk, H. G. (1997). Influence of transferrin glycans on receptor binding and iron-donation. *Glycoconjugate Journal*, 14(2), 289–295. <https://doi.org/10.1023/A:1018510309524>
- Hoshi, K., Matsumoto, Y., Ito, H., Saito, K., Honda, T., Yamaguchi, Y., & Hashimoto, Y. (2017). A unique glycan-isoform of transferrin in cerebrospinal fluid: A potential diagnostic marker for neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(10), 2473–2478. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.07.005>
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1214(1), 190–198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05840.x>
- Jeanny, J.-C., Picard, É., Sergeant, C., Jonet, L., Yefimova, M., & Courtois, Y. (2012). *Fer et protéines régulatrices dans la rétine normale et pathologique*. *Bull. Acad. Natle Méd* (Vol. 197). Retrieved from <http://www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2014/09/tap-661-676.pdf>
- Jünemann, A. G. M., Stopa, P., Michalke, B., Chaudhri, A., Reulbach, U., Huchzermeyer, C., ... Rejdak, R. (2013). Levels of aqueous humor trace elements in patients with non-exsudative age-related macular degeneration: a case-control study. *PloS One*, 8(2), e56734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056734>

- Kleinert, P., Kuster, T., Durka, S., Ballhausen, D., Bosshard, N. U., Steinmann, B., ... Troxler, H. (2003). Mass Spectrometric Analysis of Human Transferrin in Different Body Fluids. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41(12), 1580–1588. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.241>
- Kohler, I., Augsburger, M., Rudaz, S., & Schappler, J. (2014). New insights in carbohydrate-deficient transferrin analysis with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Forensic Science International*, 243, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.03.014>
- Lanz, C., Falmagne, J.-B., de l'Escaille, F., Marti, U., & Thormann, W. (2008). Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum with capillary zone electrophoresis: Sample preparation strategies for the removal of interferences caused by increased levels of immunoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 1206(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2008.05.025>
- Luo, L.-Z., Jin, H.-W., & Huang, H.-Q. (2011). Application of capillary isoelectric focusing and peptide mass fingerprinting in carbohydrate-deficient transferrin detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(10), 1391–1398. <https://doi.org/10.1002/rcm.4993>
- Parente, F., Mew, N. A., Jaeken, J., & Gilfix, B. M. (2010). A new Capillary Zone Electrophoresis method for the screening of Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). *Clinica Chimica Acta*, 411(1–2), 64–66. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.10.004>
- Picard, E., Le Rouzic, Q., Oudar, A., Berdugo, M., Sanharawi, M. El, Andrieu-Soler, C., ... Behar-Cohen, F. (2015). Targeting iron-mediated retinal degeneration by local delivery of transferrin. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1105–1121. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.018>
- Quintana, E., Montero, R., Casado, M., Navarro-Sastre, A., Vilaseca, M. A., Briones, P., & Artuch, R. (2009). Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(24), 2513–2518. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.031>
- Rodríguez-Capote, K., Turner, J., & Macri, J. (2013). Evaluation of a commercially available carbohydrate deficient transferrin kit to detect beta-2-transferrin in cerebrospinal fluid using capillary electrophoresis. *Clinical Biochemistry*, 46(16–17), 1770–1773. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.07.001>
- Rogers, B. S., Symons, R. C. A., Komeima, K., Shen, J., Xiao, W., Swaim, M. E., ... Campochiaro, P. A. (2007). Differential Sensitivity of Cones to Iron-Mediated Oxidative Damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1), 438. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0528>
- Song, D., & Dunaief, J. L. (2013). Retinal iron homeostasis in health and disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 24. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00024>
- Taniguchi, M., Okayama, Y., Hashimoto, Y., Kitaura, M., Jimbo, D., Wakutani, Y., ... Urakami, K. (2008). Sugar chains of cerebrospinal fluid transferrin as a new biological marker of Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 26(2), 117–122. <https://doi.org/10.1159/000147479>
- Tripathi, R. C., Millard, C. B., Tripathi, B. J., & Noronha, A. (1990). Tau fraction of transferrin is present in human aqueous humor and is not unique to cerebrospinal fluid. *Experimental Eye Research*, 50(5), 541–547. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(90\)90043-T](https://doi.org/10.1016/0014-4835(90)90043-T)
- Wong, R. W., Richa, D. C., Hahn, P., Green, W. R., & Dunaief, J. L. (2007). Iron toxicity as a potential factor in AMD. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 27(8), 997–1003. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318074c290>

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a eu pour but essentiel de développer des méthodes électrophorétiques pour étudier la glycosylation de protéines issues de différents fluides biologiques. L'objectif était d'évaluer l'apport de l'électrophorèse capillaire pour détecter des anomalies de glycosylation dans le cadre du dépistage de diverses pathologies telles que les CDGs, la MA ou encore les dégénérescences rétinienne. En effet, ces glycoprotéines ou glycanes montrant des anomalies peuvent être considérées comme sources de biomarqueurs potentiels de pathologies.

Pour répondre à cet objectif, plusieurs approches ont été évaluées pour analyser la N- et la O-glycosylation des protéines. Deux stratégies ont été envisagées : l'analyse des glycoformes intactes ou celle des glycanes préalablement libérés de protéines.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'ApoC-III, une O-glycoprotéine utilisée pour le dépistage des troubles de la O-glycosylation. Cette glycoprotéine existe sous trois glycoformes majoritaires différant par leur nombre d'acides sialiques (0, 1 ou 2). Actuellement réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou par électrophorèse en gel 2D, l'analyse des glycoformes de l'ApoC-III nécessite l'emploi d'une méthode plus reproductible, résolutive et quantitative que les méthodes disponibles. Nous avons ainsi développé une méthode d'ECZ-UV tout d'abord sur un échantillon d'ApoC-III standard. L'analyse de différents lots d'ApoC-III standard produits par différents fournisseurs a montré qu'ils avaient tous subi une dégradation. La combinaison des analyses en ECZ et en SM-MALDI-TOF a permis de caractériser cette dégradation comme étant de la carbamylation, une modification artéfactuelle. Malgré cette hétérogénéité additionnelle liée à la carbamylation, la méthode ECZ développée a permis de séparer les différentes glycoformes selon leur degré de sialylation mais aussi de carbamylation en moins de 20 min avec une résolution très satisfaisante et une excellente répétabilité en temps de migration et aires relatives des pics. L'application de cette méthode à des échantillons biologiques tels que le plasma a nécessité l'implémentation et l'optimisation d'une étape d'extraction de l'ApoC-III et d'élimination de protéines interférentes. Plusieurs procédures avec des spécificités différentes telles que la précipitation des protéines, la SPE ou l'immunocapture ont été comparées. Les méthodes de précipitation des protéines et de SPE ont été éliminées à cause de l'absence de pic d'ApoC-III sous forme libre c-a-d non liée aux lipides dans la zone de migration d'intérêt et de la présence d'un grand nombre d'interférents respectivement. Nous avons montré qu'une seule méthode d'extraction/concentration ne permettait pas de détecter toutes les glycoformes de l'ApoC-III du plasma en ECZ avec suffisamment de sensibilité. La combinaison de l'immunocapture de l'ApoC-III sur billes magnétiques avec la dérivation de sa chaîne polypeptidique par fluorescence s'est avérée indispensable pour améliorer la sensibilité de la méthode et permettre de détecter la seconde glycoforme. Ces travaux ont démontré pour la première fois la possibilité de dériver directement une protéine capturée sur des billes magnétiques ce qui permet d'éliminer en partie l'excès de fluorophore employé lors de la dérivation sans étape de purification additionnelle. Des améliorations de l'étape d'immunocapture via, par exemple, une immobilisation orientée des anticorps, permettrait sans doute d'améliorer le rendement de capture.

L'emploi d'un autre type de support pour immobiliser les anticorps tels que des cônes de pipette contenant un support solide est également possible mais nécessiterait l'emploi d'un robot pipeteur. Une optimisation de la température de dérivation par fluorescence peut être envisagée, elle diminuerait sans doute le temps de préparation de l'échantillon. D'autres conditions de dérivation par fluorescence pourraient également être développées pour permettre de dériver toutes les lysines en plus du N-term de l'ApoC-III. Pour éviter une hétérogénéité supplémentaire due à la présence de multiproduits de dérivation, il faudra s'assurer que toutes les lysines sont bien dérivées. Ainsi dérivée, chaque glycoforme pourrait compter jusqu'à 7 molécules de fluorophore, augmentant la sensibilité de la détection. Cependant, l'ajout de molécules de fluorophore s'accompagne également d'un ajout de charges négatives pouvant également engendrer une perte de résolution, la séparation des glycoformes sera alors sans doute à ré-optimiser. La combinaison de la stratégie de « stacking » LVSS testée conjointement avec la dérivation de l'ApoC-III peut également être envisagée pour améliorer la sensibilité de la méthode. Cependant cette stratégie nécessiterait le développement d'une méthode d'ECZ sur un capillaire avec un revêtement neutre (PVA ou PAA) pour garantir une résolution maximale. Ce type de revêtement n'étant pas toujours compatible avec le tampon borate de sodium employé dans la méthode d'ECZ développée dans cette étude pour améliorer la résolution grâce à la complexation des ions borates avec les glycanes, de nouvelles conditions de séparation devraient également être optimisées. Une application à des échantillons de plasma de patients atteints de CDGs pourra être envisagée lorsque toutes ces pistes auront été étudiées. Ces perspectives permettront peut-être de mettre en place cette méthode d'analyse des glycoformes de l'ApoC-III à l'hôpital et ainsi aider au niveau le dépistage de CDGs.

Le deuxième volet des travaux présentés s'est focalisé sur l'analyse glycomique de différents fluides biologiques par ECG-LIF qui permet de séparer et de quantifier de manière absolue les différents glycanes. Pour cela, l'application d'une nouvelle procédure de préparation d'échantillon à des fluides biologiques comme le plasma et le LCR a été réalisée et a montré une répétabilité très satisfaisante en termes de t_m et $A\%$. Néanmoins, l'emploi de cette procédure sur des fluides biologiques a souligné la nécessité d'optimiser la quantité initiale de fluide traitée pour limiter des phénomènes d'agrégation des billes magnétiques. Cette analyse glycomique a montré la versatilité de l'approche qui a permis d'obtenir des profils de N-glycanes à partir de plasma et de LCR. Les profils de N-glycanes obtenus en ECG-LIF illustrent la bonne sensibilité de la méthode compte-tenu du faible volume d'échantillon au départ (2,5 μ L de plasma et 5 μ L de LCR). Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis de comparer les profils obtenus pour des individus sains avec ceux d'un patient atteint de la MA. Cela a permis de mettre en évidence la présence de modifications de glycosylation particulières. Ainsi, il est apparu que la sialylation globale était diminuée (glycanes bi- et mono-sialylés moins abondants) et que la présence d'espèces avec un GlcNAc en position bissectrice était augmentée. Ces altérations étaient décrites pour les deux types de fluides biologiques et en accord avec les modifications déjà rapportées dans la littérature. Une dernière modification de la glycosylation a été observée pour le plasma et correspond à l'augmentation de formes tronquées. Ce type de modification n'a jamais été rapporté dans la littérature pour la MA. Dans le cadre de la recherche d'anomalies de la glycosylation spécifiques, la préconcentration d'espèces peu abondantes et non détectées avec le protocole de préparation des N-glycanes est une voie d'investigation possible. En effet, l'enrichissement de ces glycanes peu abondants peut être réalisé à l'aide de supports monolithiques à base de lectines ou fonctionnalisés par des fonctions boronates mais aussi par SPE en mode HILIC. En conclusion, l'étude d'un plus grand nombre de patients (20 ou 50) s'avère indispensable pour conclure définitivement quant à la pertinence

des modifications observées et exclure de potentielles variations inter-individus. Ce travail nécessitera également l'emploi d'outils statistiques pour évaluer la spécificité des modifications observées par rapport à la MA.

Une autre approche a également été brièvement présentée dans ce manuscrit, l'emploi de l'EC-SM pour analyser des glycanes dérivés avec un nouveau fluorophore le RFMS. Celui-ci a été développé pour améliorer la sensibilité des analyses par SM grâce à la présence d'une amine tertiaire. Cette étude a montré l'intérêt d'utiliser ce nouveau fluorophore en EC pour la première fois. Ces premiers développements ont permis de séparer des glycanes RFMS issus d'une IgG standard à l'aide d'un capillaire avec un revêtement neutre et un tampon de séparation à pH 4,5 en moins de 45min. Quelques problèmes de répétabilité des t_m ont été notés. La qualité de séparation obtenue est très satisfaisante, cependant la séparation de deux N-glycanes isomères de position (liaisons α 1-3 ou α 1-6) n'est pas obtenue alors qu'une méthode HILIC permet de les séparer. Toutefois, cette absence de séparation des isomères est probablement liée à l'effet de succion engendré par le liquide additionnel et l'optimisation de certains paramètres, tels que la composition du tampon de séparation pourra peut-être y remédier. La méthode d'EC-SM semble néanmoins assez sensible puisque seulement 100 fmoles d'échantillon ont été injectés. L'emploi d'un système d'EC-SM sans liquide additionnel (CESI) pourrait permettre de réduire les effets de succion tout en limitant également les effets de dilution et ainsi améliorer encore davantage la sensibilité de la méthode. Des essais sur des échantillons plus complexes, contenant des glycanes sialylés devront également être réalisés avant d'appliquer la méthode à des échantillons de fluides biologiques. L'estérification des acides sialiques sera sans doute indispensable pour éviter que la charge globale des glycanes sialylés ne se retrouve neutre une fois les glycanes dérivés par le RFMS qui est chargé positivement.

Enfin, les derniers travaux ont concerné l'étude de la Tf dans un fluide oculaire, la Tf peut être présente sous plusieurs glycoformes dont une spécifique au LCR et à l'humeur vitrée appelée β 2-Tf. Cette glycoforme de la Tf porte un glycanes particulier (tronqué fucosylé et avec un GlcNAc en position bissectrice) qui serait un biomarqueur potentiel de pathologies de dégénérescence rétinienne. Malgré sa faible concentration (10 à 100 fois plus faible que dans le plasma), sa quantification dans les liquides oculaires est souhaitée. Afin de réussir à détecter la Tf en ECZ, une méthode de préconcentration, l'immunopurification, a été implémentée. Les travaux réalisés ont montré que la Tf extraite de l'humeur vitrée est détectée mais la β 2-Tf est absente du profil ECZ, potentiellement à cause d'un manque de sensibilité. Afin de contourner ce problème, l'analyse des glycanes issus de la Tf purifiée de l'humeur vitrée et dérivés par fluorescence a été testée dans le but d'améliorer la sensibilité de la détection et de permettre la caractérisation du glycanes de la β 2-Tf. L'analyse des glycanes de la Tf après immunocapture s'est avérée infructueuse probablement à cause d'une trop faible concentration des glycanes provoquée par une agrégation des billes magnétiques employées pour leur préparation. Pour améliorer la sensibilité de la méthode dans le cas de l'analyse d'échantillon encore plus faiblement concentrés, l'emploi de méthodes de « stacking » pourra être investigué. L'analyse des glycanes libérés peut également être réalisée par EC-SM en les dérivant par du RFMS ou par SM MALDI-TOF après perméthylation puisque la SM permet d'atteindre des limites de détection beaucoup plus faibles et ainsi d'améliorer la sensibilité de la détection. Finalement, la méthode ECZ (kit CEofix) étant spécifique à la Tf, la préconcentration de la Tf a été réalisée par filtration sur membrane. Celle-ci a permis de détecter toutes les glycoformes de la Tf, notamment la β 2-Tf. La sensibilité observée en ECZ permet de

quantifier la forme β 2-Tf et permettra de comparer les abondances relatives de cette forme chez des individus sains et des patients malades.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de souligner la difficulté de rechercher des biomarqueurs glycosylés potentiels de pathologies dans des fluides biologiques comme le plasma, le LCR ou l'humeur vitrée. Cette difficulté ralentit la mise en place de méthodes robustes de dépistage à l'hôpital pour aider les praticiens dans leur diagnostic. En effet, ces milieux complexes nécessitent la mise en place de méthodes de prétraitement assurant un double rôle : l'élimination des interférents et la préconcentration, si nécessaire, de la glycoprotéine d'intérêt (*i.e.* en faible abondance). Ces techniques de préparation d'échantillon doivent être optimisées conjointement avec la méthode d'analyse souhaitée. En effet, une méthode d'extraction de la glycoprotéine d'intérêt pourra s'avérer efficace lorsqu'elle est couplée à une méthode d'analyse, compatible par exemple avec le tampon d'élution de l'immunocapture ou la phase d'élution de SPE, tandis qu'avec d'autres techniques, la présence d'interférents limitera la détection de la glycoprotéine d'intérêt. C'est, par exemple, ce qui a été observé lors de l'étude des glycoformes de l'ApoC-III puisque la méthode d'extraction du plasma par SPE était adaptée uniquement à l'analyse par SM MALDI-TOF et non à l'ECZ-UV ou encore lors de la précipitation des protéines par de l'acétonitrile incompatible avec l'ECZ mais adaptée à une analyse par spectrométrie de masse après digestion trypsique. La méthode de détection doit également être évaluée afin de permettre un maximum de sensibilité et doit être adaptée à l'abondance initiale du biomarqueur de pathologie étudié. Dans cette thèse, seuls quelques essais sur le couplage EC-SM ont été réalisés pour étudier des glycanes marqués par un nouvel agent de dérivation permettant d'améliorer la sensibilité. Le couplage EC-SM aurait pu être davantage investigué puisque la SM est très intéressante pour obtenir une identification directe des espèces présentes, qui est une information indispensable lors de la recherche de biomarqueurs de pathologies. Néanmoins, le couplage EC-SM n'est pas trivial et il n'est pas du tout envisageable à l'hôpital pour des analyses de routine puisque l'opérateur doit posséder une formation et un minimum d'expérience. La SM MALDI-TOF aurait également pu être envisagée puisqu'elle est régulièrement employée à des fins diagnostiques. Malheureusement la quantification ainsi obtenue est seulement relative et peu d'hôpitaux sont équipés de tels instruments. Une alternative réalisable aurait pu employer une chaîne de UHPLC afin de séparer les micro-hétérogénéités de la glycosylation des protéines sous la forme de glycanes. Comme vu dans la partie bibliographique, la chromatographie liquide est une technique robuste permettant d'atteindre des résolutions très élevées notamment avec les modes HILIC et phase inversée sur colonne PGC, et aurait pu être une alternative aux méthodes d'EC présentées. Cependant, cette méthode consomme des volumes d'échantillon beaucoup plus élevés que l'EC, ce qui peut être un facteur limitant lors de l'étude de fluides biologiques moins abondants que le plasma. Les études réalisées au cours de cette thèse ont donc montré le potentiel des méthodes d'analyse basées sur l'EC pour étudier à différents niveaux les micro- et macro-hétérogénéités de la glycosylation des protéines, que ce soit pour l'analyse des glycanes ou des glycoformes intactes. Dans les prochaines années, une alternative possible reposera peut-être sur l'IMS-SM. Cette méthode d'analyse présente un fort potentiel pour discriminer des structures glycaniques isomères se différenciant uniquement par le type de liaison ou par son anomérie grâce à son pouvoir de résolution très élevé.

ANNEXES

Annexe 1

Vol. 56 of Advances in Chromatography series

Chapter V: Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a powerful tool to investigate heterogeneities, conformers and oligomers of intact proteins

AUTHORS: Yannis-Nicolas Francois⁽¹⁾, Anne-Lise Marie⁽²⁾, Coralie Ruel⁽³⁾, Rabah Gahoual⁽⁴⁾,
Nguyet Thuy Tran ⁽³⁾ & Myriam Taverna⁽³⁾

(1) Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS) UMR 7140
(Unistra-CNRS), Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, 67084, Strasbourg, France.

(2) Barnett Institute of Chemical and Biological Analysis, Department of Chemistry and Chemical
Biology, Northeastern University, 360 Huntington Ave., Boston, Massachusetts
02115, United States.

(3) Institut Galien Paris Sud, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-
Malabry cedex, France.

(4) Faculté de Pharmacie de Paris - Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la
Santé (UTCBS), University Paris Descartes, France.

CORRESPONDENCE: Nguyet Thuy Tran
Institut Galien Paris Sud, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-
Malabry cedex, France.

Phone: +33 1 46 83 59 03

E-mail: thuy.tran-maignan@u-psud.fr

Table of content

V.1 Introduction	3
V.2 Technical and practical aspects	6
V.2.1 Principle and different types of interfaces	6
V.2.1.1 CE-ESI-MS interfaces	7
X.2.1.1.1 <i>Sheath-liquid CE-ESI-MS interfaces</i>	7
X.2.1.1.2 <i>Liquid junction CE-ESI-MS interfaces</i>	10
V.2.1.1.3 <i>Sheathless CE-ESI-MS interfaces</i>	12
V.2.1.2 CE-MALDI-MS and 2D-CE-ESI-MS interfaces	14
V.2.1.2.1 CE-MALDI-MS interfaces	14
V.2.1.2.2 2D-CE-ESI-MS interface	16
V.2.2 Practical issues of CE-MS coupling	16
V.2.2.1 CE modes and coupling strategies	16
V.2.2.2 Capillary coatings	20
V.2.2.3 Preconcentration techniques	22
V.3 From dimer to oligomer analysis of proteins	25
V.4 Investigation of conformation and folding of proteins	32
V.5 Mapping the heterogeneities of intact proteins	38
V.5.1 Post-translational modifications	38
V.5.1.1 Glycosylation	39
V.5.1.2 Acetylation	43
V.5.1.3 Phosphorylation	46
V.5.1.4 Sulfonation	47
V.5.1.5 Citrullination	47
V.5.2 Chemical degradations of proteins	48
V.6 Conclusion	53

V.1 Introduction

The introduction in the 1980s of electrospray (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) have successfully addressed the transfer to the gas phase of ions from biological molecules such as proteins. These ionisation processes have offered an entirely unexplored field to mass spectrometry (MS) represented by the analysis of biological compounds and/or samples. Thus, more than thirty years later, we are still experiencing the outcome of these major breakthroughs.

Consequently, the implementation of separation techniques prior to MS analysis has been investigated in order to enable e.g. the characterisation of complex samples. In this context, capillary electrophoresis (CE) hyphenation with mass spectrometry (CE-MS) has been rapidly considered as particularly relevant for several reasons. In CE separation, the mobility of a compound is partially determined by the charge in solution, which is mainly influenced by the BGE's pH and the hydrodynamic radius of the compound. The mobility differences between the analytes composing the sample leads to their separation. For intact proteins, the selectivity provided by CE appears interesting and complementary to that obtained with chromatographic methods which drives its implementation in conjunction with MS. The separation of proteins has been achieved for decades using electrokinetic separation like conventional gel electrophoresis. CE represents the most performant electrophoretic separation format in terms of resolution, separation efficiency and peak capacity.

From a MS prospect, CE selectivity is completely orthogonal to m/z measurements provided by MS analysis, which strongly suggests a suitable complementarity between the two techniques. In addition, ESI and MALDI ionisation yields are constant but limited. The introduction of a high quantity of ionisable compounds like salts could reduce the sensitivity by ion suppression effect. Due to the miniaturised format of CE instrumentation, BGE flowrates in the nanoliter range are involved for the separation which could provide an optimal ionisation efficiency of the sample content, resulting in a maximisation of MS sensitivity.

In order to hyphenate CE directly to MS instrumentation, the principal requirement resides in maintaining the electrical field necessary to the electrophoretic separation, the capillary outlet needing to be transferred into the MS source. Over the past decades, different types of interface have been designed to enable CE coupling with ESI- and MALDI-MS instruments. In order to provide a robust coupling, the first generation of CE-MS interfacing had to heavily compromise on sensitivity and this prevented the achievement of optimal CE-MS coupling performance. Nevertheless, CE-MS systems have recently benefited from major instrumental improvements which allowed to enhance the compatibility between both techniques. These improvements proved to be particularly significant in the case of CE-ESI-MS coupling.

Concomitantly, the analysis of intact proteins has demonstrated a growing interest in various research fields like the study of non-covalent complexes or the characterisation of

biopharmaceutical products. Intact proteins represent complex macromolecules with an extended range of potential heterogeneities. Microheterogeneity represents small variations compared to the global structure of the protein, such is the case of post-translational modifications (PTMs) like glycosylation, acetylation, phosphorylation, sulfonation or citrullination. These PTMs have been often identified to play a key role in *in vivo* signalling. The presence of conformational protein isomers is another source of heterogeneity implying a difference only in the hydrodynamic radius but not in the charge. Heterogeneity can also arise from major alterations of the protein like denaturation, misfolding dimerization, oligomerization or aggregation. All these variations may modify in a drastic manner the physicochemical properties or biological activity of the protein. Therefore, it is important to develop analytical methodologies able to finely characterise these modifications without complex dissociation induced in the ionisation source mainly in the case of dimers, oligomers or aggregates. The specific selectivity provided by the electrophoretic separation in addition to the characteristics of MS analysis, with possible access to structural information, has showed that CE-MS analysis is particularly relevant with the opportunity to separate proteins only exhibiting faint differences.

This chapter aims at offering a comprehensive and critical insight on the key aspects of CE-MS analysis of intact proteins, from a method development and an application point of view. CE-MS analysis of intact proteins, from a method development and an application point of view. If CE-MS has already fully demonstrated its potential for digested proteins analysis, intact protein analysis remains an area to be explored and which constitutes the main focus of this chapter. First, the different types of instrumental designs developed in order to perform CE-MS hyphenation are discussed, with the objective to highlight the specificities and limitations of each type of CE-MS interface. The analysis of intact proteins using CE have demonstrated dramatic adsorption of proteins on the capillary walls when using bare fused silica capillaries, especially due to electrostatic interactions. To alleviate that limitation, semi-permanent or covalent coatings are applied to the capillary walls in order to prevent protein adsorption during the separation. The major type of coatings compatible with CE-MS experiments are then described to emphasize their chemical nature and impact on the electrophoretic separation. Because of the reduced volume of CE capillary, Because of the reduced volume of CE capillary, the quantity of injected sample most often is not sufficient for providing a good MS sensitivity. To maximize the loading of the sample, a preconcentration step may be implemented offline or online. The most important strategies used in CE-MS analysis for sample preconcentration are herein described. The applications reported shows that CE-MS analysis could be successfully implemented to study intact proteins over the different facets defining their structure. That versatility is illustrated in this chapter with the application of CE-MS to the study of protein aggregates (formation and full characterization), and protein conformational changes. From another angle, the other applications described demonstrated the possibility to perform a detailed analysis of the major types of PTMs in order to study in an extensive manner natural proteoforms or potential chemical degradations.

V.2 Technical and practical aspects

V.2.1 Principle and different types of interfaces

The coupling of high-resolution CE separations with high-sensitivity and selectivity MS detections represents a relevant approach for targeted or comprehensive analyses of intact proteins. Since the end of the 1980s, a large number of CE-MS interfaces have been developed especially with two major MS sources: (i) electrospray (ESI), (ii) matrix assisted laser desorption ionization (MALDI). Basically, the development of CE-MS interfaces proceeds in two different ways, using sheath-liquid or sheathless devices. Proving the interest of CE-MS coupling for analytical applications, CE-MS interfaces are in constant development and are marketed under different forms. These past decades, several reviews and a recent book were published to describe and to discuss deeply principles and fundamentals of CE-MS interface strategies (von Brocke *et al.* 2001, Gelpi 2002, Stutz 2005, Maxwell *et al.* 2008, Hommerson *et al.* 2011, Bonvin *et al.* 2012a, Zhong *et al.* 2014, Kleparnik 2015, Týčová *et al.* 2017, De Jong 2016). The following part is focusing on the description of the different CE-MS interfaces which have proved their usefulness for characterization of intact proteins.

V.2.1.1 CE-ESI-MS interfaces

V.2.1.1.1 Sheath-liquid CE-ESI-MS interfaces

For the last three decades, the sheath-liquid interface has been the most commonly used CE-ESI-MS interface. The first development of this interface has been described by the group of Smith in 1987 (Olivares *et al.* 1987). On this type of interface, the output of CE capillary is positioned in a specially designed nebulizer (Figure V.1.a). The electrical contact is maintained by mean of an additional liquid named sheath-liquid. This liquid circulates in the nebulizer coaxially with CE capillary thanks to pneumatic assistance to continuously inject the additional liquid (5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$). A junction is formed at the end of the CE capillary between the sheath-liquid and the background electrolyte (BGE). The electrical contact is maintained at this junction because sheath-liquid is connected to the CE output electrode. As conventionally in ESI, a nebulization gas is used to facilitate the formation of a stable spray.

Sheath-liquid must therefore be a conductive liquid. In some applications, the sheath-liquid has the capacity to promote ionization. A special attention is therefore paid to adjust the composition of the additional liquid to obtain the best performances (Bonvin *et al.* 2014). The other advantage of the sheath-liquid is that it renders possible substantial improvement of the tolerance of MS to certain non-volatile BGEs, like borate and phosphate buffers commonly used for CE separation of proteins but with high ESI-MS interference (Foret *et al.* 1994).

The major drawback of this type of interface paradoxically comes from the sheath-liquid itself. Indeed, the flow of additional liquid is much greater than the BGE created by the electroosmotic flow (EOF). Thereby, some effects of "dilution" of the analytes are observed during ESI ionization. As a result, the sensitivity obtained with this type of interface is relatively limited. Haselberg *et al.* reported limits of detection between 33 and 106 nM for four model proteins using sheath liquid CE-ESI-MS interface (Haselberg *et al.* 2010b). There is thus some ambivalence between the miniaturized character of CE, which induces a limited quantity of injectable sample, and the use of a high additional liquid flow rates. The historical sheath-flow interface, commercialized by Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) was used in a large number of applications including the separation of intact proteins (Haselberg *et al.* 2007, Haselberg *et al.* 2011b, Haselberg *et al.* 2013a).

Since the beginning of the 21st century, significant progresses have been made in the area of sheath-liquid interfacing. For example, Dovichi's group developed in 2010, an electro-kinetically

pumped sheath-flow interface. In their design, the separation capillary was placed inside a tapered glass emitter. Typical sheath-liquid flow rate, driven by electroosmosis which is produced by the zeta potential, could be between 100-1000 nL/min (Wojcik *et al.* 2010). This interface has several advantages compared to the traditional sheath-flow interfaces, including reduced sample dilution due to a very low flow rate of sheath-liquid generated by electrokinetic forces, elimination of mechanical pumps, and stable operation in the nanoelectrospray regime. The performance of the electro-kinetically pumped sheath-flow interface has been evaluated for a large number of applications, especially in the field of intact protein separation with the development of a methodology to perform fast top-down intact protein characterization (Sun *et al.* 2013). Recently, CMP Scientific (Brooklyn, USA) has commercialized this interface as the EMASS-II ion source. Evaluation of this interface has been performed and provides promising performances for intact protein analysis (Peuchen *et al.* 2017).

Microfabricated devices can also be considered as CE-ESI-MS interfaces even if the geometry of the CE system is totally different. Indeed, using chip-based CE-ESI-MS, additional liquid is used to obtain stable sprays. ESI ionization is performed at one end of the microchip according to different strategies such as the use of an ESI needle (Li *et al.* 2000), or directly from the edge of a chip with the spray potential applied between a reservoir and the inlet of the mass spectrometer (Ramsey *et al.* 1997). When the classical CE-ESI-MS interfacing requires capillary length above 60 cm due to CE instrument properties, the miniaturization of chip-based CE-ESI-MS allows to perform rapid separation with ultra-low sample volumes and can be customized in terms of channel lengths for specific applications (Zhong *et al.* 2014). Over the past decades, various approaches in the field of chip-based CE-ESI-MS devices have been described in the literature (Foret *et al.* 2006, Lazar *et al.* 2006, Koster *et al.* 2007, Kleparnik 2015, Kašička 2016, Týčová *et al.* 2017). In 2008, the team of Ramsey published a fully integrated glass microfluidic device for performing high-efficiency CE-ESI-MS (Mellors *et al.* 2008). A thin glass microchip corner served as an ESI emitter (Figure V.1.b). CE separation channel ends at the 90° corner of the chip and generates a flow out of the device by the incorporation of an electroosmotic pump. In 2013, the same group updated the system as an online hybrid multidimensional microfluidic system for comprehensive online liquid chromatography-CE-ESI-MS (Mellors *et al.* 2013). Major papers in the field of biotherapeutics characterization at the intact level were published these last years, proving the performance of the system for the separation and characterization of intact proteins (Redman *et al.* 2015, Redman *et al.* 2016). Recently, a commercially version of this interface, named ZipChip™ is proposed by 908 devices Inc. (Boston, USA).

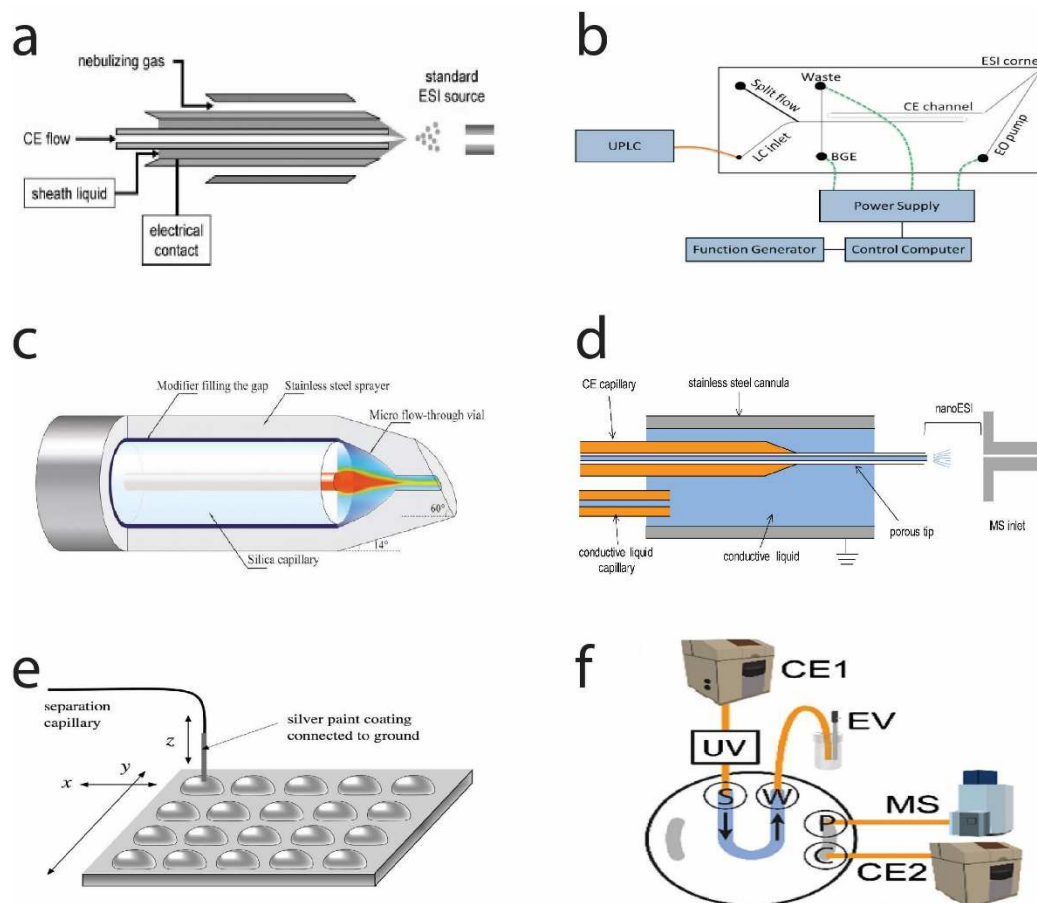


Figure V.1. Schematic of CE-MS interfaces: (a) sheath-liquid CE-ESI-MS, (b) chip-based CE-ESI-MS, (c) junction liquid CE-ESI-MS, (d) sheathless CE-ESI-MS, (e) sheath-liquid CE-MALDI-MS and (f) 2D CE-CE-ESI-MS. Reprinted with permission from (a) (Haselberg *et al.* 2007). Copyright (2017), Elsevier. Reprinted or adapted with permission from (b) (Mellors *et al.* 2013), (c) (Zhong *et al.* 2011), (d) (Moini 2007) (e) (Busnel *et al.* 2009). Copyright (2011), (2007), (2013) and (2009), respectively, American Chemical Society. Adapted with permission from (f) (Jooß *et al.* 2017) Copyright (2017), Springer.

V.2.1.1.2 Liquid junction CE-ESI-MS interfaces

Liquid junction interfaces retain some of the characteristics of sheath-liquid interfaces. The electrical contact is maintained by mean of an additional liquid too. The development of liquid junction interfaces aims to preserve the advantages provided by additional liquids (favored ionization, stable ESI), while minimizing the effects of dilution induced by this latter. This kind of interface was introduced by Lee *et al* in 1988 (Lee *et al.* 1988). Several designs of liquid junction interfaces have since been developed (Maxwell *et al.* 2008), their main difference being how to make the junction between the BGE and the additional liquid.

At its origin, the liquid junction interface was designed based on the use of a T-junction for the additional liquid to be brought into contact with the end of the CE capillary. This T-junction provides the connection between the CE capillary, the additional liquid and a needle used to nebulize the liquid in the ESI source (Lee *et al.* 1989). As in the case of sheath-liquid interfaces, the additional liquid is connected to the CE output electrode to maintain the electrical contact. Inside the junction, the distance between the CE capillary and the ESI needle is minimized to avoid peak broadening effects (typically between 25 and 50 μm). By maintaining the electrical contact in this manner, the additional liquid flow rate is significantly reduced to a few hundred nL/min. The direct consequence is that it is not necessary to use a nebulizing gas with this CE-ESI-MS interface (Fanali *et al.* 2006). The use of this interface enables to

significantly reduce the effects of dilution comparatively to those observed with the sheath-liquid interface. Moreover, the separation between the CE capillary and the ESI needle facilitates its use because of the possibility to change them independently. However, the use of a T-junction creates dead volumes in the system, which tend to disrupt the flat front of the EOF and decrease the separation efficiency due to peak widening.

Recent improvements of liquid junction interfaces have been described by the group of Chen with the development of a more physically robust junction-at-the-tip interface (Zhong *et al.* 2011). In this design, CE capillary is inserted entirely into a tapered stainless steel hollow electrospray emitter. The needle is filled with an additional liquid connected to the CE output electrode. The small volume between the capillary end and the inner wall of the needle electrode tip forms a flow-through micro-vial that completes the CE setup requirement by acting as both the outlet vial and the terminal electrode (Figure X.1.c). During the separation, the additional liquid is injected at a low flow rate around 300 nL/min through the CE hydrodynamic injection. To promote the formation of small diameter droplets, the design of the ESI needle is modified in order to be beveled. Chen's group reported the evaluation of this interface for intact protein analysis (Zhong *et al.* 2011).

V.2.1.1.3 Sheathless CE-ESI-MS interfaces

Sheathless interfaces are distinguished from those mentioned above by the absence of additional liquid. The continuity of the electric field then becomes crucial and is thus assured by different connection systems directly with the CE capillary. The objective is to obtain the most direct CE-ESI-MS interfacing in order to maximize the separation performance of CE as well as the MS sensitivity. Indeed, capillary diameters generally used in CE (20 to 75 μm) allow to provide EOF flow rate with an order of a few tens of nL/min. Such flow rates are similar to the conditions used in nanoESI and promote ionization efficiency (Wilm *et al.* 1996). This explains the superior performance of sheathless interfaces compared to their counterparts which use additional liquid (Bonvin *et al.* 2012b, Gahoual *et al.* 2014). The first CE-ESI-MS interface, introduced by Olivares *et al.* in 1987, was in fact a sheathless interface (Olivares *et al.* 1987). That design was later abandoned for several years in favor of sheath-liquid interfaces due to their better compatibility and robustness with hyphenated techniques. However, sheathless interfaces have renewed interests over the last decade because they meet the need for sensitivity that researchers now require, but also because of a better control of the implementation processes. Several approaches have been developed to ensure the maintenance of the electrical contact, such as a conductive coating applied to the capillary tip, a wire inserted at tip or a porous etched capillary wall. (Maxwell *et al.* 2008).

Certainly the most widely developed method for achieving electrical contact is the coating of the capillary tip outer surface with a conductive material such as gold or silver. This type of interface is relatively simple to set up and allows obtaining higher sensitivities than that of sheath-liquid interfaces. Unfortunately, the major drawback of these interfaces arises from the lifetime of the coated tip. Repetitions of high electrical field separations lead to premature wear of the conductive coating that subsequently lead to a rapid loss of the electrical contact.

Another way to perform sheathless CE-ESI-MS consisted of inserting a wire electrode into the capillary channel in order to maintain the electrical field. Different developments of this strategy have been described, such as the direct insertion of the wire electrode in the capillary tip when larger inner diameter capillaries are used (Fang *et al.* 1994), or into a small hole pierced near the end of the capillary (Cao *et al.* 1997). In general, this interface system has similar characteristics to other sheathless interfaces. However, the presence of the wire inside the capillary tends to create turbulences that

involve EOF disruption and may have negative consequences on the separation and coupling performance (decrease of resolution, alteration of the spray).

An alternative to produce more robust sheathless CE-ESI-MS interfaces, has been developed by the group of Moini. It consisting in manufacturing a porous section of the outside surface of the fused silica capillary by hydrofluoric acid (HF) etching. By this process, the porosity of the surface allows electrons and small ions to pass through the capillary walls. The electrical field can thereby be maintained through the capillary wall by inserting the porous section in a stainless steel cannula filled by a conductive liquid. Since 1997, Moini's group developed different strategies to increase the robustness of their sheathless interface (Cao *et al.* 1997, Moini 2001). In 2007, they developed a simplified and more robust version using a separation capillary having the outlet etched with HF to provide a 4-5 cm outer porous terminus (Moini 2007) (Figure X.1.d). In 2014, Sciex Separation (Brea, USA) marketed this interface named CESI 8000. Performances of this interface have been assessed in a large number of applications like proteomic (Faserl *et al.* 2015), metabolomic (Gulersonmez *et al.* 2016), and intact protein analysis (Haselberg *et al.* 2011c). These works underline the robustness of the generated spray and the significant reduction of limits of detection and quantification compared to sheath liquid interfaces (Haselberg *et al.* 2010b, Bonvin *et al.* 2012b). Indeed, particularly for the application of protein separation, the group of Somsen reported a comparison study of limits of detection for four model protein using commercialized sheath liquid interface and CESI8000 device. They demonstrated that detection limits were improved by a factor 6.5–20 with sheathless CE–MS (Haselberg *et al.* 2010b).

V.2.1.2 CE-MALDI-MS and 2D-CE-ESI-MS interfaces

V.2.1.2.1 CE-MALDI-MS interfaces

An attractive alternative to CE-ESI-MS is proposed with the coupling between CE and MALDI-MS. Indeed, several advantages of this hyphenation, such as a better tolerance to salts, sample collection with possibility of individual treatment (enrichment, digestion) or independent optimization of separation and detection condition, explain the strong and recent interest in this coupling. The first strategy to hyphenate CE with MALDI-MS consisted in developing online interfaces (Hommerson *et al.* 2011). However, because sample is first dried on a solid surface before insertion into the MALDI source, heavy instrumental development appeared as one of the most significant issues for the implementation of this interface. This strategy was abandoned in favor of offline interfaces. As both ESI-MS and MALDI-MS are post-capillary detection, the major issue for the offline CE-MALDI-MS coupling is to maintain the electrical field during the separation and the fraction collection process. Several reports on instrumentation developments were published in the last decades (Stutz 2005, Zhong *et al.* 2014). Two approaches based on several capillary outlet configurations used in CE-ESI-MS have been adapted for CE-MALDI-MS: a sheath-liquid and a sheathless interface. In 2009, Busnel *et al.* have designed an iontophoretic fraction collection approach using a silver coating applied to the capillary tip to avoid the sheath-flow (Figure X.1.e) (Busnel *et al.* 2009). On the same system, Gasilova *et al.* analyzed allergenic milk proteins by immuno-affinity CE-MALDI-MS (Gasilova *et al.* 2012). However, this strategy suffers the same drawback described previously for CE-ESI-MS interfaces, namely the lifetime of the coated tip. For this reason, majority of the existing interfaces is based on the coaxial sheath-flow interface using a T-junction. Recently, the group of Leize-Wagner described a fully automated offline CE-MALDI-MS interface with additional UV detection and integrated delivery matrix system (Biacchi *et al.* 2014). Using this interface, authors performed the first analysis of intact mAb charge variants by CZE using a MS detection. To date, no interface has been marketed, certainly due to technical constraints.

V.2.1.2.2 2D-CE-ESI-MS interface

Today, the instrumental developments regarding CE-MS are not only confined to interfacing efficiently both techniques. In a recent work, Neusüß group described a system allowing bi-dimensional (2D) CE-ESI-MS (Hühner *et al.* 2016). This instrumental development uses a set of mechanical valves to perform two consecutive electrophoretic separations in order to enhance electrophoretic resolution and peak capacity (Figure X.1.f). The outlet of the second capillary was positioned inside the ESI source by the intermediate of a regular sheath liquid CE-MS interface. Regardless to the position of each valves, the CE capillaries extremities are always connected to the electrodes, which prevents variations, shortage of the electrical fields or current leakages. Despite the apparent complexity of the system, all elements (valves, connectors) are commercially available and then can be homemade assembled. As incompatibility of the CE separation medium components is a major limitation in hyphenation of CE to MS, 2D CE-ESI-MS could be used to realize in the first dimension a CE separation (capillary zone electrophoresis (CZE), capillary isoelectric focusing (CIEF)) using ESI-MS interfering BGE. To enable its hyphenation to ESI-MS, CZE using a volatile BGE was performed in the second dimension (Jooß *et al.* 2017, Montealegre *et al.* 2018). Neusüß group reported the evaluation of this interface for biopharmaceutics.

V.2.2 Practical issues of CE-MS coupling

V.2.2.1 CE modes and coupling strategies

For the analysis of intact proteins, three CE modes are largely used: CZE, CIEF, and capillary gel electrophoresis (CGE). Up to now, CZE has been the most frequently used mode for CE-MS analyses of proteins (Haselberg *et al.* 2007, Haselberg *et al.* 2011b, Pioch *et al.* 2012, Haselberg *et al.* 2013a). Indeed, CZE is characterized by its great simplicity of implementation since the capillary is merely filled with a BGE and analytes are separated based on differences in their electrophoretic mobility (μ_{ep}). Using sophisticated electrolytes (non volatile components) at often high concentrations, high separation efficiencies (theoretical plates up to one million or more) can be obtained as longitudinal diffusion is ideally the only source of band broadening. Simple and MS compatible (i.e., volatile) BGE can be employed, such as formic/acetic acid or ammonium acetate/bicarbonate buffers. In addition, by selecting a physiological pH, proteins can be studied in their native state. The major drawbacks are linked to the limited number of volatile electrolytes compatible with MS, and the need of low buffer concentrations. Indeed, a too high quantity of salts entering the MS detector may cause ionization suppression, source contamination, and high background signals (Haselberg *et al.* 2011b). Another drawback of CZE-MS is linked to the relatively poor limits of detection (LODs) obtained with CZE, due to the limited amount of sample which can be introduced into the capillary. Therefore, several strategies have been developed to preconcentrate the samples before the CZE analysis in order to obtain high sensitivity MS detection (see Section X.2.2.3).

CIEF is also frequently used in CE-MS. CIEF is a powerful strategy to separate, in the presence of ampholytes, amphoteric molecules according to their isoelectric point (pI) into narrow zones along a pH gradient created through an electric field (E). The molecules migrate through E as long as they possess a charge. Reaching the position where the pH equals their pI , the net charge becomes zero and they get focused in this region. The most common kind of CIEF is achieved by applying a voltage to an ampholyte system inside a neutral coated capillary to create a continuous pH gradient and no EOF. The whole process of CIEF can be divided into two steps. First, the focusing step with an acid solution at the anode end and a alkaline solution at the cathode end. Secondly the mobilization step during which the analytes are pushed toward the detection system (by applying a pressure to the capillary inlet or by

modifying the electrolyte composition of one reservoirs to achieve a chemical mobilization). An advantage of CIEF is that very low LODs can be reached. Indeed, the entire capillary can not only be filled with sample but the focusing of proteins induces moreover a preconcentration effect, resulting in a higher peak intensity. One disadvantage of CIEF is that the mobilization step causes either focused band broadening (hydrodynamic mobilization) or distortion of pH gradient (chemical mobilization). However, this can be minimized by applying an electrical field during mobilization. Imaging CIEF (iCIEF) is another alternative since it abolishes the mobilization step, the IEF process within the entire capillary being monitored online by the whole-column detection system.

With CIEF, ionization suppression effects are much more pronounced than with CZE-ESI-MS owing to the presence of ampholytes, acids and bases in the analytes and catholytes. Different approaches have been developed to couple CIEF with MS (Hühner *et al.* 2015, Montealegre *et al.* 2018). CIEF-MS with catholyte/spray solution exchange after focusing is by far the most frequently used technique. It consists of placing the catholyte vial inside the ESI housing for focusing, switching to the ESI sprayer and sheath liquid for mobilization and detection (Tang *et al.* 1995). This technique enables fast and reproducible CIEF-ESI-MS analyses, and can achieve LODs which are two orders of magnitude smaller than with CZE for standard proteins. However, it requires one capillary replacing step and a voltage interruption between focusing and mobilization. This may result in a loss of separation efficiency and hinders automation. To avoid the negative effect of ampholytes, acids and bases on the ESI process, a CIEF-MS approach consists of using a membrane or a dialysis device integrated between the separation capillary and the ESI source. Another way to avoid the entry of interfering compounds into the ESI-MS is the placement of a free flow electrophoresis (FFE) unit between the CIEF separation and the MS detector (Chartogne *et al.* 2000). This set-up enables to fully separate the analytes from interfering molecules but results in poor separation efficiency. Another strategy consists of coupling a LC system between the CIEF and the ESI-MS instrument. However, this requires often complex and expensive interfaces, and results in longer run times.

CIEF can also be coupled to MALDI-MS (see Section X.2.1). Like with CIEF-ESI-MS, compounds like ampholytes and catholytes are responsible for the decrease of MS signal intensities (e.g., the use of 1% ampholyte induces a signal decrease of 50%) (Hühner *et al.* 2015). On the other hand, it might be argued that the co-crystallization process in MALDI is a purification process itself which might help avoiding unfavorable effects of ampholytes on ionization yield. However, this has not been sufficiently documented in the reported offline CIEF-MALDI-MS studies. The first interface for offline coupling of CIEF to MALDI-TOF-MS, using a Tee junction, was reported by Karger's team (Foret *et al.* 1995). Since then, several designs have been proposed (Minarik *et al.* 2000, Lechner *et al.* 2008, Silvertand *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011). Yet, all these concepts had to deal with interference from ampholytes, limited resolution and sensitivity for larger analytes, and limited separation efficiency under more MS friendly conditions.

For the analysis of intact proteins, CGE is another option. CGE is particularly well suited to the analysis of dimers or oligomers of proteins. However, this mode is less suitable to CE-MS analysis of proteins due to the presence of non-volatile separation media (i.e. polymers and surfactants). The strategy developed by Neusüß's group to remove SDS from denatured protein samples by co-injection of cationic surfactant prior to MS analysis (Sánchez-Hernández *et al.* 2017) could be applied to CGE-MS analysis. However further investigations are required. At the present time, CGE remains a difficult option for CE-MS analysis of intact proteins.

V.2.2.2 Capillary coatings

A major issue in CE is the adsorption of proteins onto the fused-silica capillary wall (due mainly to electrostatic or hydrophobic interactions), which degrades the separation performance. However, adsorption can be minimized through different strategies, the most efficient being the coating of the capillary. This can be accomplished via static (permanent or semi-permanent) coatings. For CE-MS of intact proteins, various capillary coatings have been proposed. Coatings of the silica capillary have a strong impact on the generated EOF, which in turns can lead to different flow rates at the exit of the capillary and have an impact on the spray stability. In addition, leakage of coatings is a major concern when dealing with CE-MS.

Positively charged coatings like polybrene (PB) (Balaguer *et al.* 2006) and polyethyleneimine (PEI) (Taichrib *et al.* 2012) proved to be useful for CE-MS analysis of proteins. Under these separation conditions, both the proteins and the capillary wall are positively charged, avoiding protein-wall interactions and providing highly efficient separations. These charged coatings generate an appreciable and constant EOF toward the capillary outlet when a reversed polarity is applied, enabling adequate and reproducible CE-MS interfacing. To improve the stability, the reproducibility and the life time of physisorbed capillaries, Katayama *et al.* (Katayama *et al.* 1998a) introduced, in 1998, successive multiple ionic-polymer layer (SMIL) coatings, the principle of which consists in sandwiching a cationic polymer between an anionic polymer and the negatively charged surface of the capillary by non-covalent bonding (Figure V.2). Katayama's group developed a double layer coating PB-dextran sulfate (DS), with a negative surface, for the analysis of acidic ($pI < 7$) proteins at neutral pH (Katayama *et al.* 1998a), and a triple layer coating PB-DS-PB, positively charged, for the analysis of basic ($pI > 7$) proteins at low pH (Katayama *et al.* 1998b). A few years later Somsen's team largely exploited PB-polyvinyl sulfonic acid (PVS) (Catai *et al.* 2005, Haselberg *et al.* 2011a, Catai *et al.* 2007a) and PB-DS-PB (Haselberg *et al.* 2010a, Tengattini *et al.* 2016, Haselberg *et al.* 2011a) multilayer coatings for the analysis of intact proteins. In parallel to SMIL coatings, positively charged copolymers like *N,N*-dimethylacrylamide-ethylpyrrolidine metacrylate (DMA-EpyM) have been developed by Cifuentes' group (González *et al.* 2003). DMA-EpyM has been successfully applied to the CE-MS analysis of intact proteins (Ongay *et al.* 2010b, Taichrib *et al.* 2012, Ongay *et al.* 2010a).

The disadvantage of the high EOF generated by these positively or negatively charged capillaries is that the analyte resolution can be limited. For CE-MS of intact proteins, neutral coatings (EOF near zero) like hydroxypropylcellulose (HPC) (Marie *et al.* 2013, François *et al.* 2016, Biacchi *et al.* 2017), polyvinyl alcohol (PVA) (Marie *et al.* 2016, Sánchez-Hernández *et al.* 2017), and polyacrylamide (PAA) (Balaguer *et al.* 2006, Taichrib *et al.* 2012, Sánchez-Hernández *et al.* 2017) have also been investigated. Taichrib *et al.* (Taichrib *et al.* 2012) compared the use of several neutral coatings (dynamic PAA (UltraTrol™ LN), permanent PAA, and Guarant™ composed of thermally immobilized galactomannans guaran and locust bean gum) and positively charged coatings (PEI, cationic PAA (UltraTrol™ HR), and DMA-EpyM copolymer) for the analysis of model proteins as well as erythropoietin (EPO) with sheath liquid CE-MS using low-pH BGE. The neutral coatings all resulted in higher separation resolution when compared to the positively charged coatings, at the expense of longer analysis times. Moreover, it was demonstrated that the nebulizer gas, commonly used in sheath liquid interfacing, significantly increased the residual EOF of the neutral coated capillaries due to suction. This shortened the protein's migration time and could have a negative effect on the separation efficiency if the suction phenomenon was too strong.

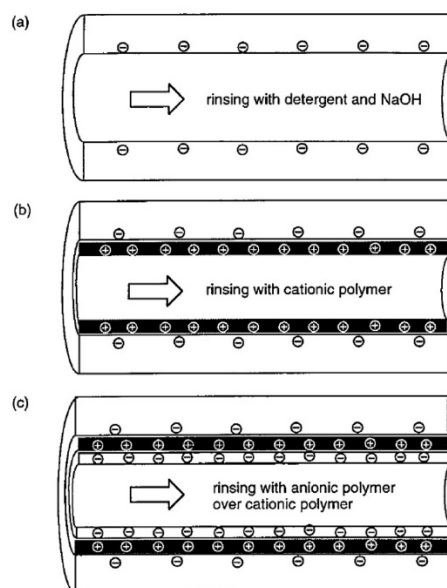


Figure V.2 SMIL coating procedure. a) Activation of the silanol groups. b) First layer coating. c) Second layer coating. Reprinted with permission from (Katayama *et al.* 1998a) Copyright (1998), American Chemical Society.

V.2.2.3 Preconcentration techniques

Over the past decades, different preconcentration techniques have been developed to increase the sensitivity of CZE-MS analyses of intact proteins. They can be classified into two categories, those that are performed by electrokinetic processes and those which use a solid support present at the inlet of the separation capillary.

Among the electrokinetic approaches, large volume sample stacking (LVSS) has been applied in CZE-MS analysis of proteins to enhance the loading capacity (Alvarez-Llamas *et al.* 2003, Chamoun *et al.* 2005). In LVSS of acidic proteins a large plug of low conductivity sample with a pH above the pI of the proteins is hydrodynamically injected in a fused-silica capillary, previously filled with a BGE of relatively high conductivity. Then, a negative voltage is applied and the EOF leads the large plug in the direction of the capillary inlet, hence pushing this plug out of the capillary. Meanwhile, the negatively charged proteins are subjected to a strong local electric field and consequently move with a high electrophoretic velocity towards the boundary between the sample plug and the BGE zone. Once the proteins reach this boundary, their velocity is slowed down in the lower electric field of the higher conductivity buffer, resulting in the stacking of the analytes. When the main part of the sample plug is removed and most of the proteins are concentrated in a narrow zone, the voltage polarity is switched to positive and the separation starts under normal CE conditions. For basic proteins (positively charged at $pH < pI$), the same procedure can be used. In this case, a positive stacking voltage should be applied and a positively charged coated capillary should be employed in order to reverse the EOF. The concentration factors typically obtained with LVSS in CE-MS are around 10.

Another way to increase the loadability of proteins before the CZE separation is to perform an isotachopheresis (ITP) preconcentration step (Gysler *et al.* 1999, Stutz *et al.* 2004). The ITP step takes place in a discontinuous electrolyte system consisting of a leading electrolyte of high mobility and a terminating electrolyte of low mobility. Proteins, which are introduced in a relatively large plug, with mobilities between the two electrolytes, will be focused during the CZE separation step to form narrow zones. For CE-MS of proteins, the most commonly used leading and terminating electrolytes are

ammonia and acetic acid, respectively. Concentration factors between 10 and 50 can be obtained, using injection plugs between 15 and 45 % of the capillary volume.

Solid-phase extraction (SPE) is another way to achieve preconcentration of proteins in CZE (Tomlinson *et al.* 1997, Figeys *et al.* 1998). The micro-SPE cartridge, filled with e.g. C18 or C8 reversed phase material, is inserted at the inlet side of the CE capillary, allowing the loading of a relatively large volume of sample. Proteins are trapped on the SPE material and matrix components are removed via a rinsing step. After preconcentration, the proteins are desorbed in a small volume into the CE capillary and separated by CZE. Recently, Sanz-Nebot's group developed an on-line immunoaffinity (IA)-SPE-CE-MS method using magnetic beads (MBs) for the analysis of serum transthyretin (TTR), a homotetrameric protein ($M_r \sim 56,000$) involved in different types of amyloidosis (Peró-Gascón *et al.* 2016). The suitability of three Protein A (ProA) MBs (ProA Ultrarapid Agarose™ (UAPA), Dynabeads® ProA (DyPA) and SiMAG-ProA (SiPA)), and AffiAmino Ultrarapid Agarose™ (UAAF) MBs to prepare an IA sorbent with an intact polyclonal antibody (Ab) against TTR was studied. Figure V.3 presents the microcartridge designs. All the different MBs enabled identification and quantitation of the relative abundance of the six most abundant TTR proteoforms. For on-line immunopurification, UAAF MBs were selected because Ab was not eluted from the MBs. The LODs achieved with this IA-SPE-CE-MS methodology, using TTR standards, were 25 times lower than those obtained by CE-MS ($\sim 1 \mu\text{g/mL}$ and $\sim 25 \mu\text{g/mL}$, respectively). Using Fab' antibody fragments covalently attached to succinimidyl silica particles, the same group managed to slightly decrease the LODs (two-fold) for the analysis of TTR, which allowed the detection of proteoforms found at lower concentrations (Pont *et al.* 2017).

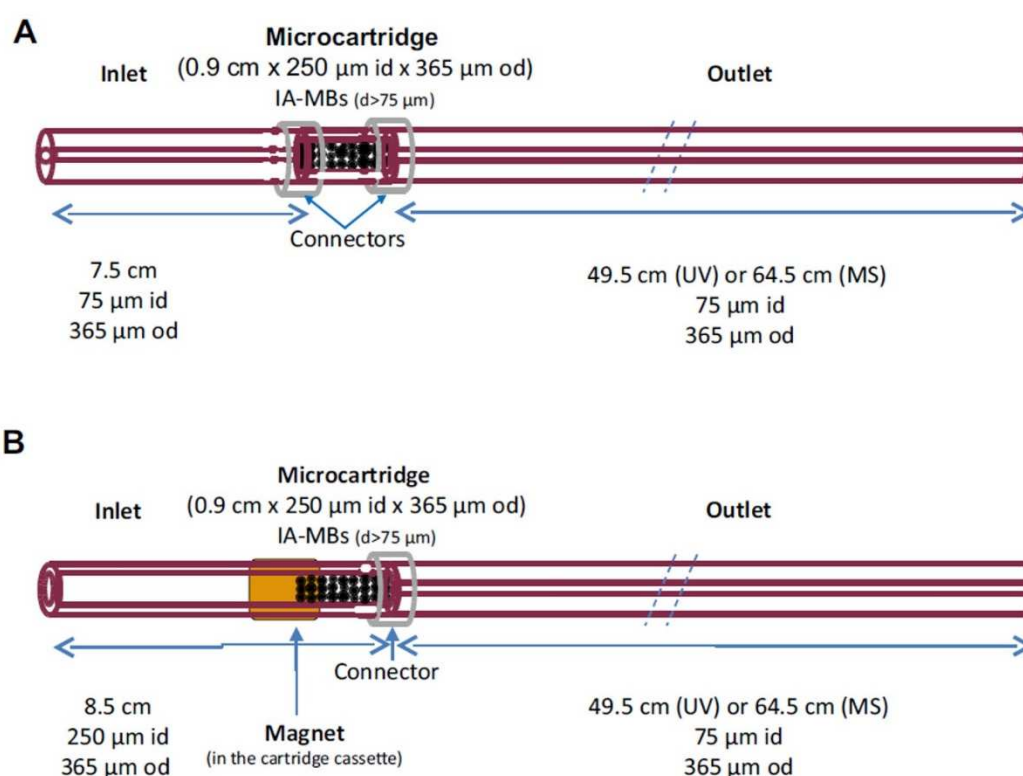


Figure V.3 Representations of the microcartridge designs (A) UAPA or UAAF MBs are trapped in a microcartridge body of 250 μm id due to their particle size, and (B) UAPA or UAAF MBs are retained in one of the ends of a piece of 250 μm id capillary and a magnet prevents the shift and loss of the MBs. (The first design could not be applied with SyPA and DyPA MBs because both are very small. Similarly, in the second case the magnet should cover the whole microcartridge body). Reprinted with permission from (Peró-Gascón *et al.* 2016) Copyright (2016), Wiley.

V.3 From dimer to oligomer analysis of proteins

Proteins derived from plasma as well as recombinant ones are subjected to modification of their spatial structure due to either bioprocessing steps (pasteurization, ultra/diafiltration, lyophilization) or during protein handling, storage leading to their denaturation and formation of oligomers or aggregates. Many techniques including X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, high performance size exclusion chromatography, native polyacrylamide gel electrophoresis, analytical ultracentrifugation, CE-UV, MS, ion mobility spectrometry coupled to MS are available for studying protein oligomerization. CE-ESI-MS is an alternative technique to analyze protein complexes, but the challenge consists in maintaining weak assemblies. Up to now, sheath liquid interfaces have been used in most of the reported studies to analyze dimers or oligomers of proteins but using different CE modes including CZE, ACE or CIEF. Although the use of CE-ESI-MS is becoming more popular for complex protein analysis these last decade, there are not so much studies describing the major factors impacting the performance of this method for non-covalent protein complexes. Indeed, special attention should be paid on separation and detection conditions not to cause protein unfolding or disrupt weak forces holding non-covalent complexes, oligomers or aggregates. The most important challenge is to select (i) non-denaturing electrophoretic separation conditions but providing high resolution power enough, (ii) sheath-liquid containing optimal organic solvent and acid quantity allowing the optimal protein detection sensitivity and (iii) soft MS parameters to prevent in-source dimer/oligomer dissociation or association but sufficiently efficient in terms of ionization.

In 1999, Gysler *et al.* reported a CZE-MS method for monitoring the recombinant human interleukin-6 (rhIL-6) dimer formation throughout an acidic incubation, using a 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.2 and a sheath-liquid consisted of methanol-water (80:20, v/v) with 1%(v/v) acetic acid (Gysler *et al.* 1999). Unfortunately, they failed to detect the dimer (detection of only the monomeric rhIL-6) in MS while the CZE-UV method showed two peaks for the dimer, supporting that rhIL-6 forms two different dimeric complexes. This finding also indicated the dissociation of the non-covalently bound dimeric rhIL-6 complexes during the mixing with the methanol-containing sheath liquid (methanol in high quantity). This concept was supported by complete disappearance of the dimer peaks and the simultaneous increase of the monomer peak when 30% methanol was added to samples containing dimeric rhIL-6. Other authors have also demonstrated that the composition of the sheath-liquid affects greatly the dissociation of intact non covalent protein complexes (Jensen *et al.* 1998, Martinović *et al.* 2000).

Beside this parameter, Sanz-Nebot's group showed that in the case of the bovine Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD-1) the acidity of the BGE was this time the main factor influencing the detection of the native form of SOD-1 (Borges-Alvarez *et al.* 2010). The native form is a homodimer that coordinates one Cu²⁺ and one Zn²⁺ ions per monomer, these ions playing crucial roles in enzyme activity and structural stability, respectively. The dimer formation is essential for SOD-1 functionality and in humans several SOD-1 mutant forms have been associated to certain types of amyotrophic lateral sclerosis. Using 1 M acetic acid BGE (pH 2.3), the analysis of the SOD-1 dimer showed a separation into one minor and one broad peak. The calculated molecular mass (15601 Da) after deconvolution of the major peak was close to the theoretical molecular mass of the metal ions free monomeric SOD-1 (apo-SOD-1) (Figure V.4a), suggesting that acidic electrophoretic conditions generates apo-SOD-1 *e.g.* dimer dissociation and complete release of metal ions. Using 10 mM ammonium acetate BGE (pH 7.3) the mass spectrum of the main electrophoretic peak showed the

presence of the monomer (Cu₂Zn-SOD-1) and the dimer (Cu₂Zn₂-SOD-1) with a molecular mass of 15721 Da and 31441 Da, respectively (Figure V.4b). The authors have verified that the acidic sheath-liquid containing isopropanol/water (60/40: v/v) and 0.1% formic acid did not contribute to the enzyme dissociation but affected only the sensitivity by performing experiments without formic acid and obtaining similar results. This suggests that the monomer was already present in the original dimer solution and was not an artifact of ionization. The authors claimed also that the neutral BGE provided enhanced detection of the native enzyme (dimer form), taking into account that MS parameters are finely tuned to prevent the disruption of non-covalent protein complexes from solution into gas phase.

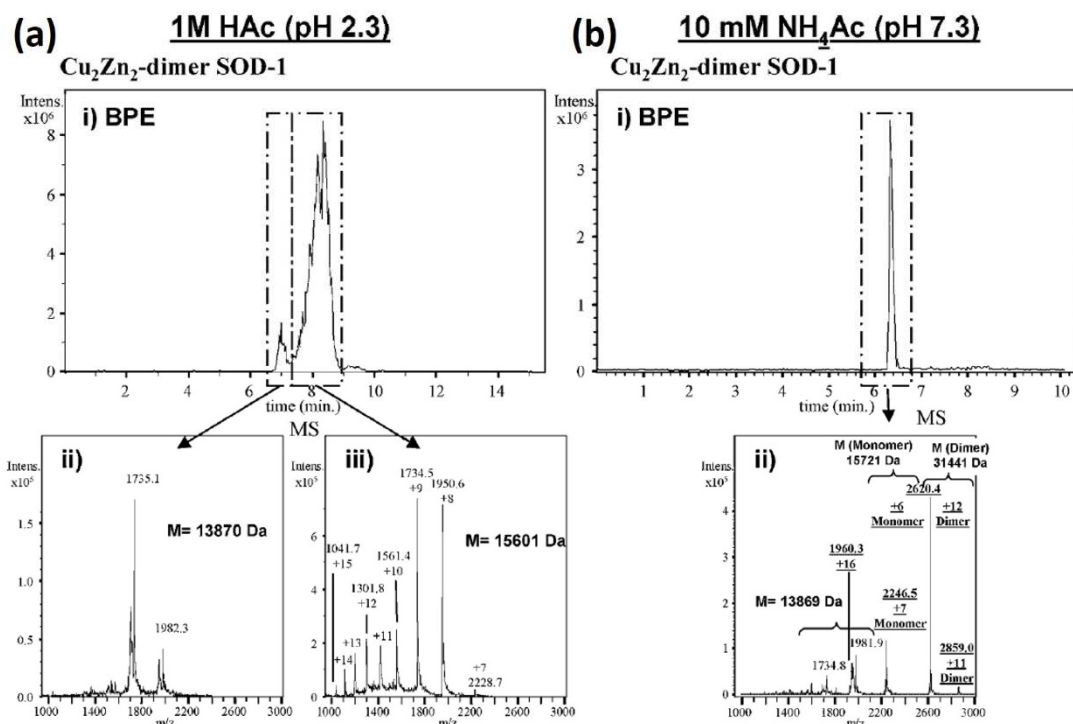


Figure V.4 CZE-ESI-MS BPEs for (i) Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 samples using a BGE of (a) 1M HAc (pH 2.3) and (b) 10mM NH₄Ac (pH 7.3). The molecular mass values obtained after deconvolution are shown in the insets of the mass spectra (ii) and (iii). Conditions: MS positive mode; sheath liquid, isopropanol-water 60:40 (v/v) with 0.5% formic acid delivered at a flow rate of 0.2 mL/h; CE voltage, 15 kV; injection, 10 s at 50 mbars, fused silica capillary. Reprinted with permission from (Borges-Alvarez *et al.* 2010) Copyright (2010), Wiley.

In a second paper, these authors highlighted also the importance of selecting the appropriate fragmentor voltage to minimize in-source induced collision dissociation of the human SOD-1 dimer to obtain reliable quantitative information (Borges-Alvarez *et al.* 2012). When changing the fragmentor voltage from 275 V to 375 V, the proportion of the monomer relative to the dimer increased, showing in-source fragmentation (Figure V.5).

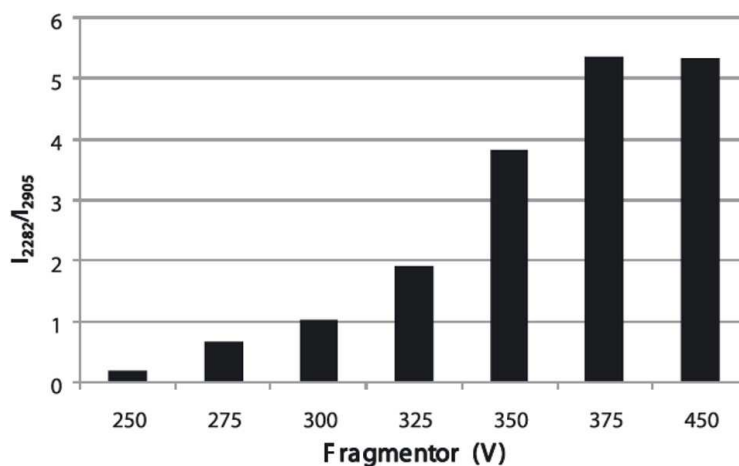


Figure V.5 Bar graph of the ratio between the intensity of the ions corresponding to monomer and dimer of human SOD-1 at different fragmentor voltage values. Conditions: Fused silica capillary BGE; 10 mM NH₄Ac (pH 7.3); MS positive mode; sheath liquid, isopropanol-water 60:40 (v/v) with 0.5% formic acid delivered at a flow rate of 3.3 μ L/min; CE voltage, 15 kV; injection, 10 s at 50 mbar. Reprinted with permission from (Borges-Alvarez *et al.* 2012) Copyright (2012), Wiley.

The first experiments on bovine SOD-1 were performed using an ion trap analyzer that enabled to scan up to 3000 m/z , this is the reason why it allowed detecting only the ion with +11 charge state of the dimer SOD-1 (Borges-Alvarez *et al.* 2010). In the second paper studying human SOD-1, a TOF mass spectrometer was used and the scanning range was extended until 4500 m/z , allowing the detection of the ion with +10 charge state of the dimer SOD-1 (Borges-Alvarez *et al.* 2012). This shows that the TOF analyzer and in a wider manner the QTOF is totally adapted for the analysis of multimer proteins when the cluster of multicharged ions of the proteins is displaced to high m/z values.

In 2015, the same group had described a method for the detection and characterization of normal and variant forms of TTR in serum samples from healthy controls and familial amyloidotic polyneuropathy type I (FAP-I) patients. FAP-I is associated with a mutant TTR form (substitution of Val for Met30), the native TTR form being a tetrameric structure (Pont *et al.* 2015). In contrast to previous studies on homodimeric SOD-1 of this group (Borges-Alvarez *et al.* 2010, Borges-Alvarez *et al.* 2012), the neutral BGE which is generally advantageous for detecting the native form of protein allowed to detect only the monomer and dimer but not the native tetramer in the case of TTR. The authors attributed this to the tetramer disruption either through the acidic sheath liquid as 0.25% of formic acid v/v in the sheath-liquid was necessary to detect the protein or the high vacuum-pressure inside the mass spectrometer. Furthermore, the TTR concentration in serum samples is too low, leading to the use of acidic BGE that produces higher sensitivity. Finally, this study did not require working under non-denaturing conditions as detecting the monomer TTR (non native form) was sufficient to distinguish control individuals from FAP-I patients.

Nguyen and Moini developed a CZE-ESI-QTOF-MS to detect a protein complex in red blood cells, hemoglobin (Hb) that exists as a tetramer (average MW 66446) consisting of four non covalently bonded protein subunits (two α chains and two β chains with each chain attached to a heme group) (Nguyen *et al.* 2008). In addition to the BGE pH (in this case physiological pH) which is one of the critical factor, the polarity of the CE separation was also found important for detecting Hb tetramer. Surprisingly, under positive ESI mode, the tetramer detection was made possible only under normal (called forward) polarity CE while Hb dimer was observed rather under reverse polarity CE (Figure V.6). The authors explained the complete dissociation of the tetramer in reverse polarity mode and minor

fragmentation in normal polarity by two electrochemical reactions occurring simultaneously at the CE outlet / MS inlet electrode. Under reverse polarity CE, the shared electrode acts as the anode for both the CE and ESI electrical circuits, leading to an important decrease of the solution pH (from 7.4 to ≈ 5) that dissociated all the tetramer. In this case, all dissociation products comigrate in a single electrophoretic peak as the dissociation is happening close to the CE capillary outlet.

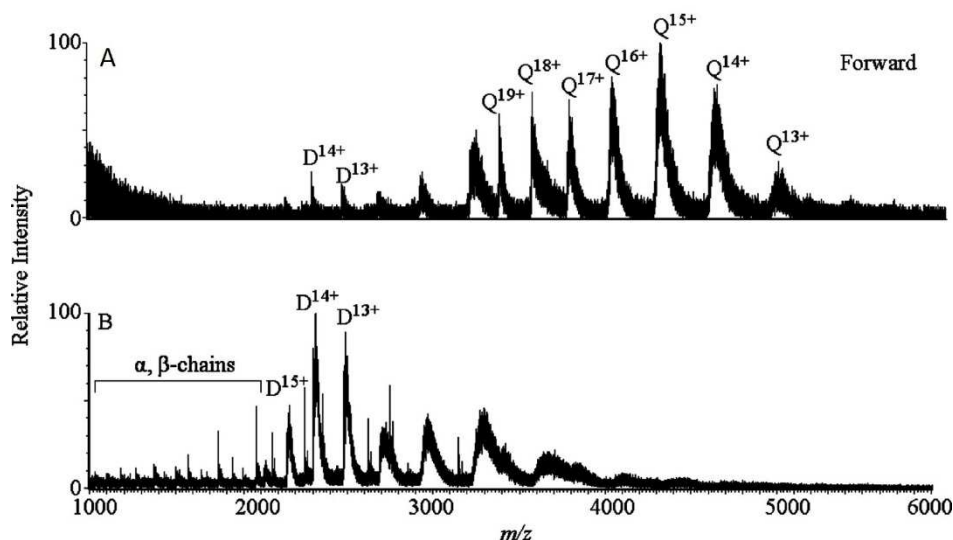


Figure V.6 Mass spectra of the Hb in (A) normal polarity CE and (B) reversed polarity CE. The Hb-dimer and tetramer are indicated by D and Q, respectively. Conditions: Polybren coated capillary BGE; 1.7 mM ammonium acetate (pH 7.4); CE voltage: +/- 30 kV; MS positive mode; sheathless interface. Reprinted with permission from (Nguyen *et al.* 2008) Copyright (2008), American Chemical Society.

However, until 2016 CE has never been hyphenated to MS for monitoring protein dimer formation and detecting the dimeric state. Francois *et al.* performed the characterization of mAbs $F_{c/2}$ dimers by off-line CZE-UV/ESI-MS. Authors report an off-line strategy to enable CZE-ESI-MS using CZE-UV/fraction collection technology, followed by ESI-MS infusion of the different fractions using sheathless CE-ESI-MS interface as the nanoESI infusion platform. This strategy allowed to highlight the presence of homo- and hetero-dimers of cetuximab $F_{c/2}$ fragments due to possible lysine truncation (François *et al.* 2016). The same year, Marie *et al.* developed a CZE-ESI-QTOF-MS method using a sheath liquid interface to analyze and separate native antithrombin (AT) and its dimer which is an inactive form that decreases the quality and efficacy of therapeutic AT preparations administered for their anticoagulant activity (Marie *et al.* 2016). For the first time the detection of the dimeric state of AT was observed. The deconvolution MS spectra yielded an average molecular mass of 115 kDa, which is in agreement with the expected mass of an AT dimer (homodimer or heterodimer). Dedicated CE-MS experiments consisting in successive injections of native and latent forms (for additional information on conformer separation, see Section X.4) separated by a small BGE plug present two partly resolved peaks. The mass spectrum of the later migrating peak corresponded to the native form, but the first migrating peak contained both latent and dimeric forms, suggesting that native and latent form associate during the CE analysis to form a heterodimer. Thus, the method does not unfortunately allow an accurate quantification of the AT forms in pharmaceutical AT preparations.

More recently, Ivanov's group reported the first attempt of the intact mAb characterization using a native CZE-MS with unaltered non-covalent interactions and sheathless instrumentation (Belov *et al.*

2018). High-efficiency separation of Trastuzumab components was shown using a neutral PAA-coated capillary with hydrofluoric acid-etched emitter and a BGE of 20 mM ammonium acetate pH 8.0. The mass spectrum corresponding to the main electrophoretic peak revealed the presence of the monomer and less than 1% of dimeric species while dimers of Trastuzumab could not be observed in denaturing CZE-ESI-MS experiments (Beck *et al.* 2012). Deconvolution of this native CZE-MS in selected target mass range and m/z range, the intensities of the dimer peaks were 140-250-fold lower than the intensity of the predominant monomer peak. This demonstrated that relative quantitation can be achieved using this approach to evaluate the determination of mAb aggregation.

Daniel's group developed the coupling with MS to other CE modes which are more delicate to hyphenate than CZE because of the presence of several agents in the electrolyte. Fermas *et al.* showed the effect of glycosaminoglycans (GAGs) on the dimerization of chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) using affinity capillary electrophoresis (ACE) hyphenated to MS (Fermas *et al.* 2008). A major effect of the GAG binding to SDF-1 may be on the quaternary structure of this protein which has been reported as a dimer, this dimerization affecting the presentation of SDF-1 to the receptor. The presence of fucoidan pentasaccharide in the BGE led to the detection in MS of three charge state distributions, corresponding to the monomeric SDF-1, the 1/1 SDF-1/fucoidan and the 2/1 SDF-1/ fucoidan complex. This indicated that the binding of this GAG promoted the SDF-1 dimerization. Przybylski *et al.* reported a CIEF-ESI-MS method using a glycerol/water medium in silica capillary instead of an aqueous gel medium in coated capillary in order to avoid the contamination of the mass spectrometer (Przybylski *et al.* 2015). Under positive ionization mode and using pH 3-10 ampholytes at 1.5% in glycerol/water 60/40 medium combined to a volatile aqueous sheath liquid composed of 10 mM ammonium acetate, pH5.0, interferon (IFN) γ which is a homodimeric cytokine could be detected as its dimeric form. This indicates that IFN- γ migrates in CIEF under a dimer state and that the acetate buffer sheath liquid enabled to keep the non-covalent association of IFN- γ monomers at the capillary exit in the ion source and up to the MS detection.

V.4 Investigation of conformation and folding of proteins

The biological activity of a given protein greatly depends on its conformation. Indeed, the protein needs to be in a correct folded state (the so-called native structure) to be active. It is therefore of paramount importance to develop analytical methods capable of detecting conformational protein isomers.

CE is very attractive to study protein conformation since near-physiological conditions can be employed. This contrasts with chromatographic methods for which solvents and extreme pH conditions needed to repel proteins from ionized silanols are likely to affect the conformation. In addition, the fact that CZE separations are driven by differences in the charge to hydrodynamic volume ratio of the analytes renders this separation step quite helpful in distinguishing protein conformers. In the past two decades, CE-based methods have been developed to study folding/unfolding or misfolding of proteins (Righetti *et al.* 2001, Stutz *et al.* 2005, Sergeev *et al.* 2001, Hapuarachchi *et al.* 2011, Bertolotti *et al.* 2015). For example, protein isoforms corresponding to different disulfide bridge arrangements have been detected using CZE (Sergeev *et al.* 2001) or CGE (Hapuarachchi *et al.* 2011).

The analysis of protein conformers with MS is a complicated task since no mass difference is expected between two conformers; and if it is relatively easy to distinguish a folded from an unfolded form (this latter exhibiting a higher degree of ionization), it is quite a challenge to separate two

conformers in a folded state. CE-MS coupling represents therefore a promising approach for the analysis of protein conformers, CE being capable of separating two conformers, and MS providing accurate molecular mass. Very recently, several groups investigated the potential of CE-MS to separate and analyze conformers of intact proteins.

In 2016, Marie *et al.* developed a CZE-ESI-QTOF-MS method using a sheath liquid interface for the characterization of native and latent forms of antithrombin (AT) (Marie *et al.* 2016). It has been demonstrated that only the native form of AT is active. Indeed, in this form, the reactive center loop (RCL) is exposed as a target for coagulation proteases (Figure V.7A). The presence of latent AT could thereby decrease the quality and efficacy of the drug. For CE separation, a PVA-coated capillary was employed. The preservation of the protein conformation was obtained using a BGE composed of 50 mM ammonium acetate, at pH 7.4. The sheath liquid consisted of isopropanol-water 50:50 (v/v) with 14 mM ammonium acetate, and was delivered at a flow rate of 120 $\mu\text{L/h}$. As shown in Figure V.7B the mass spectra of the two AT conformers presented differences regarding their respective charge state envelopes. For both conformers, a charge state envelope in the 3200-4200 m/z range was observed but the charge state envelope of the native form was centered on the 16+ ion, whereas that of the latent form was centered at 15+. In addition, for the latent form, no charge state envelope centered around 33+ in the 1500-2200 m/z region was observed in the mass spectrum, indicating that this conformer is more resistant to denaturation. The developed CZE-ESI-MS method is therefore capable to unambiguously distinguish the two AT conformers. The CZE-ESI-MS method was applied to a stability study. For this purpose, a commercial AT preparation was stored at room temperature for three weeks before its analysis by CZE-ESI-MS. The mass spectrum obtained revealed the formation of a high quantity of latent form.

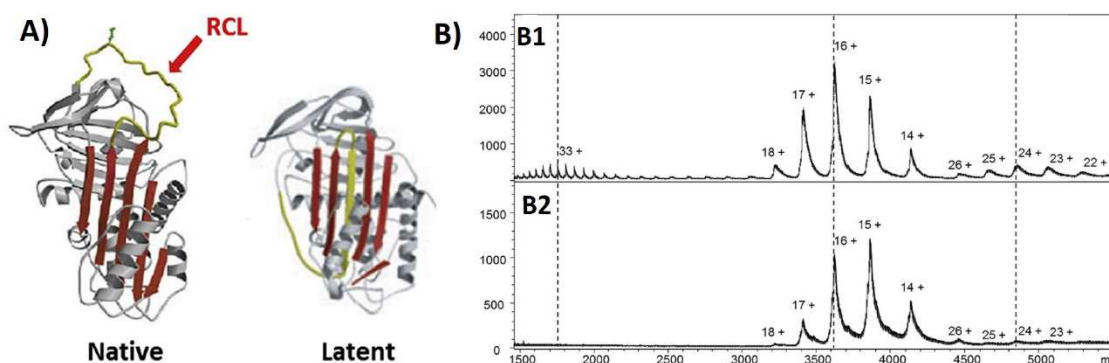


Figure V.7 A) Native and latent forms of antithrombin. In the latent form the reactive center loop (RCL) is buried inside the molecule, and no binding can occur with the coagulation proteases. B) CE-MS analyses of AT (molecular mass, 57858 Da). Mass spectra obtained during the analysis of preparations containing a high proportion of B1) AT native form (>70%), and B2) AT latent form (>70%). Conditions: PVA coated capillary; BGE, 50 mM ammonium acetate, pH 7.4; sheath liquid, isopropanol-water 50:50 (v/v) with 14 mM ammonium acetate delivered at a flow rate of 120 $\mu\text{L/h}$; CE voltage, -20 kV; capillary pressure during CE analysis, 0.7 psi; injection, 30 s at 0.5 psi. The charge state distributions centered at 33+ and from 18+ to 14+ correspond to monomeric forms of AT, and those from 26+ to 22+ to dimeric forms of AT. Adapted with permission from (Marie *et al.* 2016) Copyright (2016), Elsevier.

Additional information was obtained from the developed CZE-ESI-MS method. Especially, several co-injections experiments showed that the two AT conformers could associate to form a heterodimer (see Section X.3) in the course of CE analysis. That is the reason why the developed method is not fully adapted to quality control of pharmaceutical AT preparations.

The same year, Bertolotti *et al.* investigated different CE-ESI-MS set-ups for the analysis of conformational states of beta2-microglobulin (β_2 -m), a protein often taken as a model of amyloidogenic globular proteins (Bertolotti *et al.* 2016). For all experiments, a BGE consisting of 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.4, and uncoated capillaries were employed. Two kinds of interfaces were tested using ESI ionization: a sheath liquid interface coupled with a single quadrupole (SQ)-MS or a TOF-MS, and a sheathless interface coupled with high resolution QTOF-MS. A sheath liquid composed of isopropanol-water-formic acid (49.5:49.5:1, v/v/v) delivered at a flow rate of 4 μ L/min allowed to obtain high ionization efficiency. β_2 -m was analyzed either under native conditions (i.e. diluted in water) or in a partially denatured state after dilution in acetonitrile. By analyzing β_2 -m with sheath liquid CZE-ESI-SQ-MS, two peaks in dynamic equilibrium were separated, the ratio of which depending on the injected β_2 -m sample (Figure V.8A, B). The first peak in the total ion electropherogram was attributed to the native form, whereas the later migrating species to the partially unfolded conformer. Yet, no MS identification was possible owing to the limited performance of the SQ. With sheath liquid CZE-ESI-TOF-MS, different capillary lengths were tested (100, 200, and 300 cm). After injection of β_2 -m partially denatured with acetonitrile two peaks were observed, but the charge state distributions of each peak were clearly alike. Interestingly, the peak ratio appeared to depend on the capillary length (Figure V.8C, D, E), certainly due to protein refolding during CE analysis. The sheathless CE-ESI-QTOF-MS analysis of β_2 -m after incubation with acetonitrile enabled the separation of three peaks (Figure V.8F). As shown in Figure X.8G differences between the charge state distributions of peaks 1 and 2 were observed regarding the relative abundance of 6+ and 7+ charge states, indicating that peaks 1 and 2 corresponded to the native and partially unfolded forms of β_2 -m, respectively. This result demonstrates the suitability of the sheathless interface to preserve the protein structure integrity.

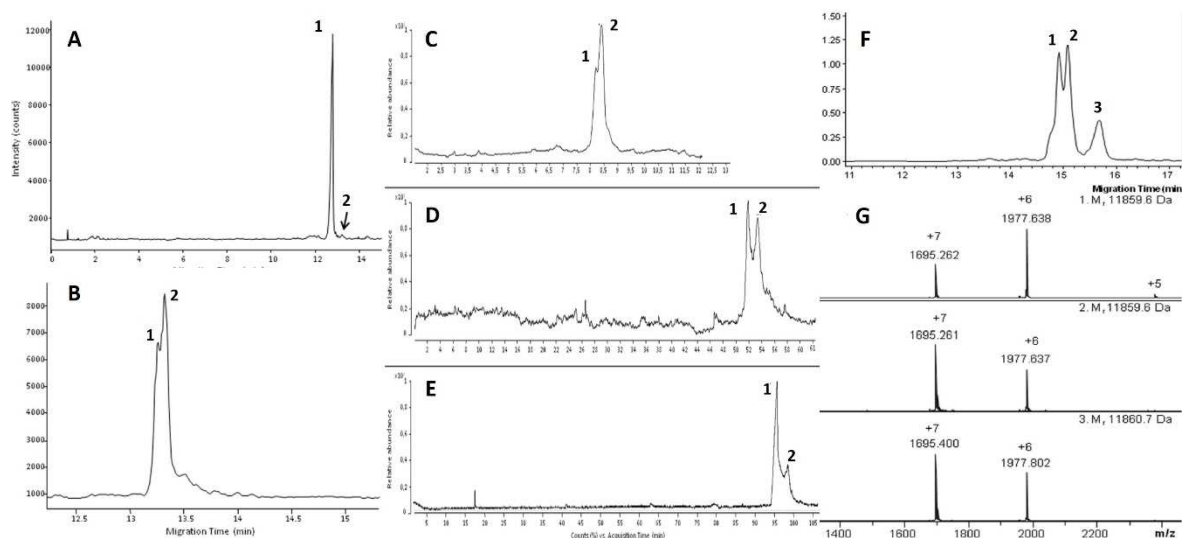


Figure V.8 CE-MS analyses of beta2-microglobulin (molecular mass, 11860 Da). Sheath liquid CE-ESI-SQ-MS analysis of β_2 -m in A) water, and B) acetonitrile (extracted ion electropherograms). Sheath liquid CE-ESI-TOF-MS analysis of β_2 -m in acetonitrile using a capillary length of C) 100 cm, D) 200 cm, and E) 300 cm (total ion electropherograms). Sheathless CE-nanoESI-Q-TOF-MS analysis of β_2 -m in acetonitrile: F) Cumulative extracted ion electropherograms of m/z 1695-1696 (6+) and 1977-1978 (7+); and G) Mass spectra of peaks 1-3. Adapted with permission from (Bertolotti *et al.* 2016) Copyright (2016), Elsevier.

Tengattini *et al.* reported a CE-MS method to monitor the integrity of an antigenic protein during glycoconjugate vaccine synthesis (Tengattini *et al.* 2016). In order to prevent protein adsorption to the

inner capillary wall and to achieve efficient separation of the antigen proteoforms, a BGE of 1.5 M acetic acid pH 2.3 was selected, and the capillary was coated with PB-DS-PB. MS coupling was performed with a sheath liquid interface and ESI ionization. The sheath liquid consisted of isopropanol-water (50:50, v/v) with 0.1% formic acid, and was delivered at a flow rate of 3 μ L/min. The analysis of the protein Ag85B with the developed CE-MS method allowed to separate one main peak (0) from three relatively small ones (1 to 3) (Figure V.9a). The mass spectra obtained for peaks 0 and 1 revealed, after deconvolution, a similar molecular mass of 31345 Da, indicating the separation of two Ag85B conformers. However, differences in the charge state distribution were observed. The mass spectrum of the main peak (Figure V.9a₁) exhibited a shift of the distribution to lower m/z values, probably due to partial unfolding of the protein during ESI. The mass spectrum of peak 1 (Figure V.9a₂) showed a significantly lower relative abundance of the charge states at lower m/z values, indicating less susceptibility to unfolding. Deconvolution of the mass spectra of peaks 2 and 3 led to the same molecular mass of 30424 Da, corresponding to a truncated form of Ag85B. However, peaks 2 and 3 differed in their charge state distributions in a similar fashion as with peaks 0 and 1, again suggesting the presence of two protein conformers.

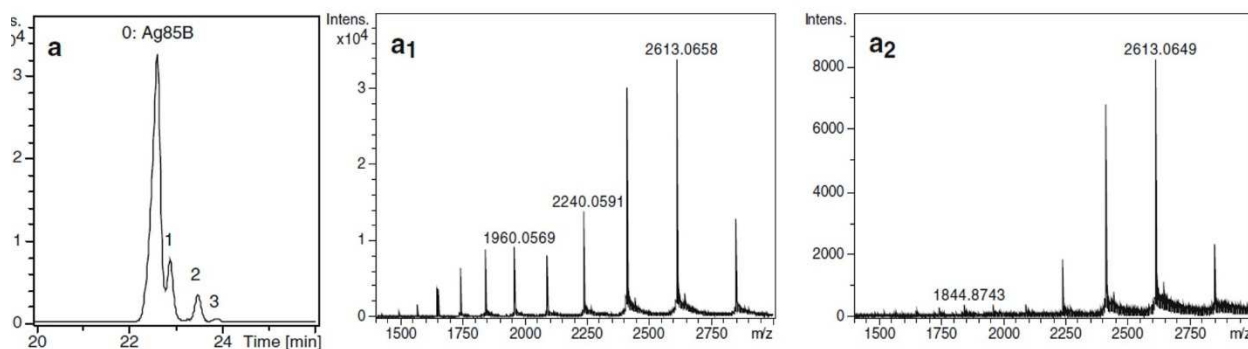


Figure V.9 CE-MS of Ag85B (molecular mass, 31345 Da). a) Base peak electropherogram (BPE). a₁) and a₂) Mass spectra obtained at the apex of peaks 0 and 1, respectively. Reprinted with permission from (Tengattini *et al.* 2016) Copyright (2016), Springer.

In parallel, in 2016, Berezovski's group (Mironov *et al.* 2016) exploited an emerging technology called kinetic capillary electrophoresis, hyphenated to UV detection and ion mobility mass spectrometry (CE-UV-IM-MS) for simultaneous analysis of enzyme structure and activity (Figure V.10). The human tissue transglutaminase (TG2, Mr \sim 78 kDa) was used as a model. In the crystal structure of the guanidine diphosphate (GDP)-bound form, TG2 adopts a compact, 'closed' form that restricts access to its active site. In contrast, the crystal structure of TG2 following its calcium-dependent reaction with an irreversible inhibitor reveals an extended, 'open' conformation. The biological activity of TG2 is thought to be regulated through a dramatic conformational change between the open and closed forms. Previously, the same group (Clouthier *et al.* 2012) had shown that the slow interconversion of these two conformers allowed them to be separated and monitored by kinetic CE (first introduced by Berezovski and Krylov in 2002 (Berezovski *et al.* 2002), and defined as separation of molecules that interact inside a capillary during electrophoresis). By coupling on-line this CE method (using a BGE composed of 15 mM Tris-acetate, pH 7.85, and uncoated capillaries) with IM and MS (using electrospray ionization), a simultaneous, real-time observation of the effect of small molecule inhibitors on both the conformational distribution and enzymatic activity of TG2 becomes possible. Indeed, kinetic CE-UV allows to separate protein conformers and monitor their interconversion dynamics in solution, IM estimates the size of each TG2 conformer, and MS informs on the mass of each conformer and

quantifies the added substrates (donor and acceptor) and the product generated by the TG2-mediated transamidation reaction.

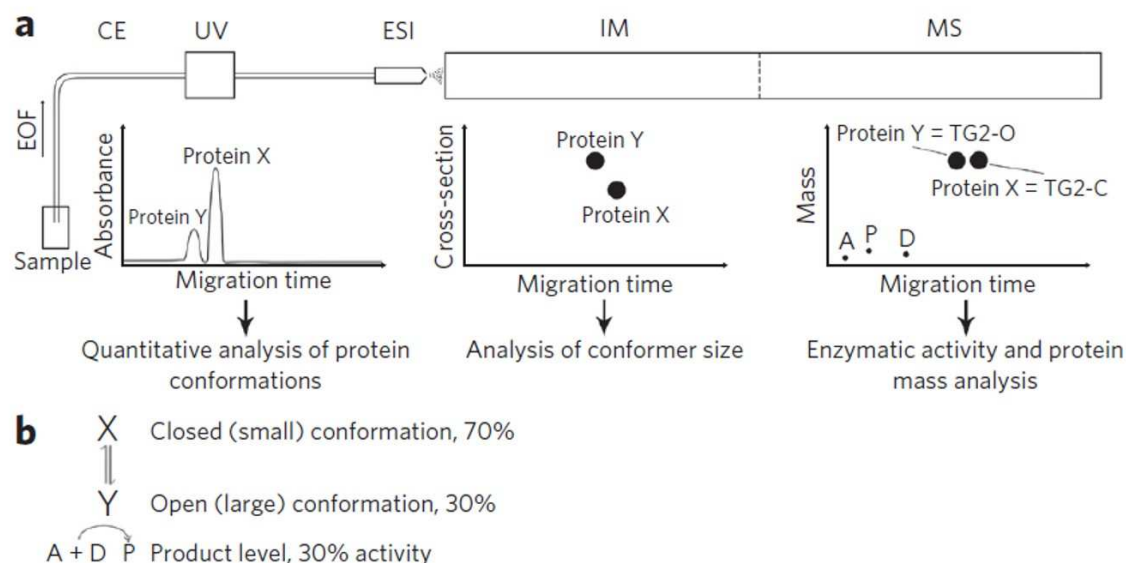


Figure V.10 Schematic representation of CE-UV-IM-MS method. (a) A, acceptor substrate; D, donor substrate; P, product; TG2-O, 'open' conformation of TG2 (protein Y); TG2-C, 'closed' conformation of TG2 (protein X). (b) A theoretical model of conformation changes and enzymatic activity of TG2. Proteins X and Y, with relative abundance of 70% and 30%, respectively. Reprinted with permission from (Mironov *et al.* 2016) Copyright (2016), Springer Nature.

Up to now CE-MS has been rarely exploited for studying protein folding and conformers. However, the recent works reported in this chapter prove that with the advance of ESI-MS instruments and CE-MS interfaces, CE-MS coupling is an emerging technique in this field. Intact proteins in their most native-like state can be analyzed, and, in the future, new applications of CE-MS could arise like the analysis of non-covalent protein-protein or protein-ligand complexes.

V.5 Mapping the heterogeneities of intact proteins

V.5.1 Post-translational modifications

Post-translational modifications (PTMs) refer to the covalent modification of proteins during or after protein biosynthesis, generally due to enzymes. PTMs contribute to the structural variety of proteins and can significantly affect their physicochemical properties and biological activity. There are different types of PTMs including phosphorylation, glycosylation, acetylation, sulfonation.... Characterization of PTMs is crucial and challenging, it involves the development of hyphenated techniques such as HPLC or CE coupled to MS. CE-MS is a powerful tool thanks to its high sensitivity, speed and peak capacity allowing subtle structural variations to be detected such as positional isomers. Unlike liquid chromatography techniques, mild conditions without the need of solvents can be used avoiding protein denaturation during analysis.

Separation of intact proteins PTMs by CE-MS encounters two challenges. Firstly, the separation efficiency should be high enough to enable the separation of very close structures. The second challenge is to avoid protein adsorption onto the silica surface of the capillary, which lower the

separation efficiency and lead to analyte loss. The most common approach to reduce protein adsorption in CE-MS is the modification of the capillaries using permanent or semi-permanent coating materials. This has been already discussed in X.2.2.2. This part focuses on new developments for PTMs analysis of intact proteins by CE-MS since 2010 and is divided according the concerned PTM. For all cited examples in this part, the combination of coated capillaries (either neutral or cationic) with acidic BGE (acetic or formic acids) allowed the separation of the different proteoforms. Indeed, those conditions offer a lot of advantages as limitation of protein adsorption and control of EOF enabling the migration of isoforms according to their own electrophoretic mobilities.

V.5.1.1 Glycosylation

Glycosylation is the common PTM and it corresponds to the attachment of an oligosaccharidic chain to either an asparagine for N-glycosylation or to a serine or threonine for O-glycosylation. Glycosylation plays a critical role in a wide range of biological processes, such as inter and intracellular signaling, inflammation, protein folding and protein stabilization (Varki *et al.* 2009). Regarding glycosylation, it is mainly investigated either to characterize biopharmaceuticals or to identify abnormal glycoforms as potential disease biomarkers.

Biopharmaceuticals or biologic drugs have gained increasing importance on the drug market. Over 40% of approved biopharmaceuticals are glycoproteins, so the characterization of this PTM is of great importance to assess the quality of biopharmaceuticals. Indeed, glycosylation is a major source of protein heterogeneity and can affect clinical safety and efficacy profiles (Schiestl *et al.* 2011).

In 2011, Taichrib *et al.* (Taichrib *et al.* 2011) developed a CZE method for the detection of isotope distributions of intact erythropoietin (EPO) using a neutrally coated capillary. The high decrease of the EOF allowed to partially separate proteins glycoforms differing by the number of sialic acids but also the number of neutral hexoses. Thereby, isoforms with a mass difference of 1% could be separated based on electrophoretic mobility differences. The isoforms were detected with a high resolution TOF mass spectrometer ($R_s > 40000$), enabling the detection of isotope distributions of partially overlapping glycoforms.

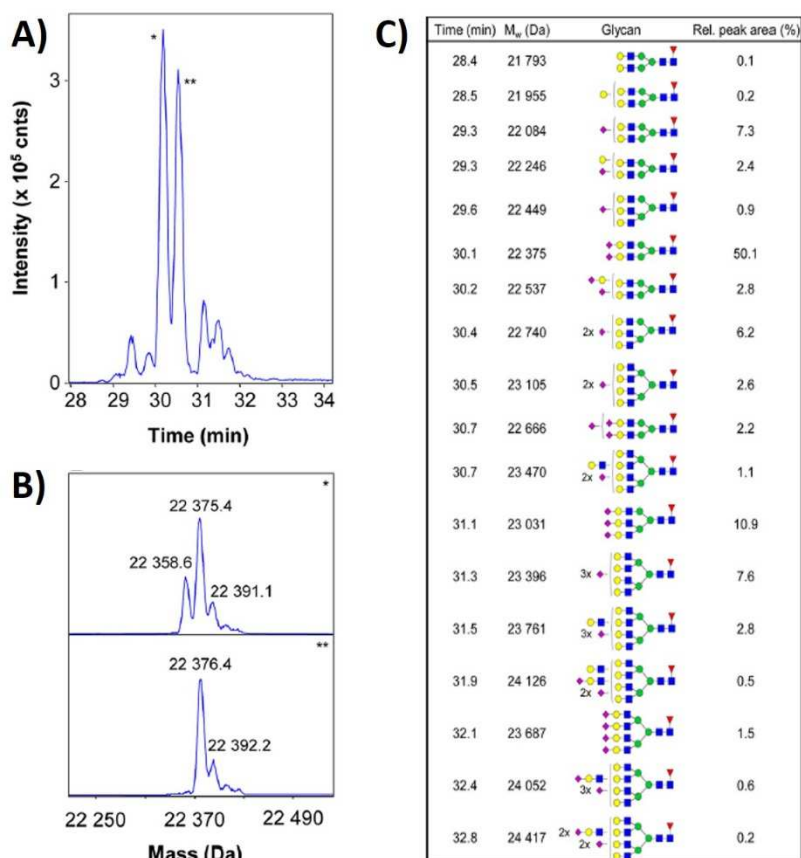


Figure V.11 (A) BPE obtained during sheathless CE-ESI-MS of rhIFN- β (45 $\mu\text{g/mL}$) employing a neutrally coated capillary. (B) Deconvoluted mass spectra obtained in the apexes of the peaks migrating at 30.1 min (*) and 30.5 min (**). (C) Migration time, molecular mass, N-glycan composition and structure, and relative peak area for rhIFN- β glycoforms as observed with sheathless CE-ESI-MS employing a neutrally-coated capillary

Symbols: green circle/yellow circle, hexose (mannose/galactose); red triangle, fucose; blue square, N-acetylhexosamine; purple diamond, sialic acid. Conditions: BGE, 50 mM acetic acid (pH 3.0); CE voltage, 15 kV; tip-to-end plate distance, 1.0 mm. Adapted with permission from (Haselberg *et al.* 2013b) Copyright (2013), American Chemical Society.

Moreover, as some biopharmaceuticals come off patent, a high number of biosimilars have appeared. In order to compare different biosimilars of EPO to the original molecule, Taichrib *et al.* developed in 2012 (Taichrib *et al.* 2012) a multivariate statistics tool based on the CZE-ESI-MS separation method that they previously developed in 2011, using a neutrally coated capillary (Ultratrol™ LN). Thanks to this neutral coating and an acidic buffer (1M acetic acid), EOF was suppressed to near zero so glycoforms were separated due to their own mobility only (i.e. based on the number of sialic acids and the number of HexHexNAc units). They applied different chemometrical approaches for the data analysis of glycoform profiles. Relative peak areas of selected intact EPO isoforms were used as variables in principal component analysis and hierarchical agglomerative clustering. Both approaches were suited for the clear differentiation of all EPO preparations differing by the manufacturer, production cell-line or batch number.

Haselberg *et al.* investigated a triple layer of polybrene and dextran PB-DS-PB for the CZE-ESI-MS separation of recombinant human interferon- β -1a (rhIFN- β) glycoform heterogeneity (Haselberg *et al.* 2013b). This method allowed separating ten glycoforms depending on their number of sialic acids or

neutral hexoses, where five out of the six glycoforms described in the *European Pharmacopoeia* monograph of IFN- β (Pharmacopoeia 2010) were observed. Each glycoform could be quantified, enabling a quality control of rhIFN- β batches. In 2013, the same group developed a new method using a porous tip sprayer as a new sheathless CE-ESI-MS interface and a polyacrylamide coated capillary to increase sensitivity (Haselberg *et al.* 2013b) allowing the increase of detection up to 18 glycoforms using a 10 times lower concentration of rhIFN- β (Figure V.11). The gain in glycoform coverage obtained with this sheathless system was due to both the improved resolution obtained with neutral coated capillaries and the high nanoESI sensitivities provided by this porous tip interface. This new system enables also to improve the limit of detection (in the picomolar-range). A more efficient glycoprofiling of recombinant human EPO (rhEPO) was also observed (separation of 74 glycoforms). Bush *et al.*, (Bush *et al.* 2016) reported a CZE coupled via a sheathless CZE-ESI-MS interface to an Orbitrap ELITE MS for the intact analysis of recombinant human interferon- β 1 (Avonex, rhIFN- β 1). Using a positively charged PEI coating, column efficiencies between 350,000 and 450,000 plates were produced, allowing separation based on charge and subtle hydrodynamic volume differences. An acidic buffer (3% acetic acid, pH 2.5) was used to protonate the various proteoforms for favorable CZE separation and electrospray ionization. A total of 138 proteoforms were found, and 55 were quantitated. The separation of isobaric positional isomers such as isomers with the sialic acid residue on either the α (1-3) or α (1-6) galactose antenna was achieved.

The combination of CZE and ESI-MS was also employed for the analysis of intact glycoproteins in biological samples for the study of the potential of protein glycoforms as cancer biomarkers. Indeed, Ongay *et al.*, (Ongay *et al.* 2010b) investigated the use of a positively charged coated capillary (DMA-EPyM) for the analysis of alpha acid-1-glycoprotein (AGP). The concentration of this plasma glycoprotein is affected during inflammation. This study focused on the characterization of AGP in serum samples, and enabled for the first-time clinical studies on detailed isoform distribution of intact glycoproteins. Using a coated capillary showing anodal EOF at low pH values (BGE of 1M acetic acid), this method allowed the separation of glycoforms, in reverse polarity, based on AGP variants charge or sialic acid differences and conducted to the separation of more than 150 proteoforms. This method was applied to 16 serum samples and revealed the high variability of human AGP expression as well as some changes in the relative proportions of the observed glycoforms. The same year, this group tested (Ongay *et al.* 2010a), different statistical techniques such as ANOVA, principal components analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to investigate AGP isoforms as potential biomarkers in bladder cancer using the previous CZE-ESI-MS developed method. They compared data obtained by both CZE-UV and CZE-ESI-TOF-MS. It appeared that CZE-UV did not provide statistically different variables allowing group distinction (healthy/cancer). However, CZE-ESI-TOF-MS was found optimal to point out differences between the two groups based on the composition of glycoforms of intact AGP. Statistical differences between both groups (healthy/cancer) were observed mainly due to the presence of tri and tetra-antennary fucosylated glycoforms in higher abundance in cancer patients. The combination of CZE with this statistical tool showed the usefulness of CZE-MS for the study of potential biomarkers.

Very recently CZE-ESI-MS on an intact mAb performed in an acidified methanol-water background electrolyte on a capillary with a positively-charged coating (M7C4I) coupled to an Orbitrap mass spectrometer and using a sheathless interface was reported. Under denaturing conditions, baseline separation of the 2X-glycosylated, 1X-glycosylated, and aglycosylated populations as a result

of hydrodynamic volume differences was obtained. The presence of a trace quantity of dissociated light chain was also detected in the intact protein analysis (Belov *et al.* 2018).

V.5.1.2 Acetylation

Acetylation is an in-vivo enzymatic PTM playing an important role in the synthesis, stability and localization of proteins and corresponds to the addition of a COCH₃ functional group to N-terminus or lysines. Concerning the characterization by CE-MS of intact proteins containing acetylated forms, which differ only from 42Da and one positive charge, two different strategies were proposed. Firstly, positively charged coatings for the separation of acetylated forms have been widely investigated. From all articles, it seems that those cationic coatings were suitable for the study of samples with a simplified matrix (after a RPLC prefractionation for instance) for very fast separations.

Indeed, Haselberg *et al.* (Haselberg *et al.* 2010a) tested the performance of PB-DS-PB coating by working on a test mixture of in-vitro acetylated lysozyme, a model protein where six lysines and the N-terminus can be acetylated. The separation revealed that the mixture contained unmodified lysozyme but also seven other acetylated lysozyme forms at different degrees (1 to 7 acetylations). It showed that this positive coating combined with an acidic buffer (50mM acetic acid pH 3) was suitable for the separation of highly closed protein species.

In 2014, Han *et al.* (Han *et al.* 2014) used a cationic coating composed of PEI for the top-down characterization of *Pyrococcus Furiosus* proteome by sheathless CZE-ESI-MS after a RPLC prefractionation to reduce the sample complexity. To increase sample loading up to 14% of the capillary, transient isotachopheresis was performed using 50mM ammonium acetate pH 4.5 while the separation was achieved with a BGE composed of 0.1% acetic acid and 20% isopropanol. This work was the first one to reveal PTMs of *Pyrococcus Furiosus* proteome such as disulfide bonds and acetylation at the N-terminus (representing 4% of the proteins identified).

In 2013, Sarg *et al.* (Sarg *et al.* 2013) used a M7C4I-coated capillary (positively charged) to develop a fast sheathless CZE-ESI-MS method as an alternative method to HILIC to study acetylation and methylation of intact histones H4 (highly alkaline protein found in cell nuclei). Contrary to HILIC, the separation was performed depending solely on the acetylation state of histone into its non-, mono-, di-, tri-, and tetraacetylated forms in less than 18 min using a BGE of 0.1% formic acid. Concerning the methylation, which could occur on lysine or arginine residues, the different forms (non-, mono-, di-, and trimethylated) co-migrated with the different acetylated species. Nevertheless, the selectivity of sheathless CZE-ESI-MS enabled a confident assignment between isobaric modifications (acetylation and trimethylation) without the use of high resolution mass spectrometry because of their migration time differences. Thereby, it allowed a fast evaluation and quantification of acetylation and methylation status of histone but modification sites were not highlighted.

The second strategy developed was the use of a neutral coating as it reduces until almost suppress EOF and so increases the separation window allowing a higher resolution of more complex samples. The CE-MS system using porous tip ESI emitter and a LPA coated capillary developed by Haselberg *et al.* (Haselberg *et al.* 2013b) enabled the detection of many acetylated forms of rhEPO. In 2014, Zhao *et al.* (Zhao *et al.* 2014) showed the use of a linear polyacrylamide (LPA) neutral coating for the top-down analysis of the *Mycobacterium marinum* secretome after only an acetone precipitation. In 2016, (Zhao *et al.* 2016) the same group used this LPA coating to perform the largest top-down

proteome data set from yeast by CZE-ESI-MS. For both studies, this neutral coating combined with a sheath liquid with a low concentration in organic solvent (only 10% methanol with 0.5% formic acid), allowed them to identify PTMs such as acetylation in less than 35min.

V.5.1.3 Phosphorylation

Phosphorylation is an important mechanism for regulating the activity of enzymes but most studies in CE-MS are performed on phosphopeptides and not on intact phosphoproteins, which are mostly analyzed by CIEF (capillary isoelectrofocalisation) due to their isoelectric point (pI) shift. In 2014, Han *et al* (Han *et al.* 2014) used a positively charged PEI coated capillary for the study of the Dam1 complex, a stable heterodecamer composed of 10 subunits that can be phosphorylated. CZE allowed to detect nine of the ten protein subunits, using a sheath liquid and a BGE with the same composition (5% formic acid with 5% isopropanol) whereas LC-separation only detected eight of them using 100-fold more sample. Phosphorylation increases both the total protein mass and the overall negative charge which changes the electrophoretic mobility and allow to separate phosphoforms with different phosphorylation degree. Applying this top-down method, they were able to separate phosphoforms with different phosphorylation stoichiometries (up to 5 phosphoryl groups) and to determine either the phosphorylation site or the region of the modification (in case of low abundance specie). Top-down analysis was completed with bottom-up and middle-up MS to have additional information about the position of phosphorylated amino acid in the protein sequence.

V.5.1.4 Sulfonation

O-sulfonation refers to the transfer of the sulfonate group (SO_3^-) to tyrosine, serine or threonine residues. Pattky *et al* (Pattky *et al.* 2015) characterized an unexpected covalent O-sulfonation of threonine residues of a commercial peptide RPRTRLHTHRNR called peptide D3 (selected by mirror phage display against monomeric or low molecular weight amyloid- β -peptide ($\text{A}\beta$ 1-42)) in CZE-ESI-MS. The high hydrophilicity and basicity of this peptide (pI 12.6) hampered the use of LC-separation methods but was compatible with CE-MS. They compared two types of coatings, either a neutral (acrylamide-based) or a positively charged one (PB) using the same running buffer of a 3:1 (v/v) mixture of 1M acetic acid and 1M formic acid. The acrylamide-LN coating (neutral) allowed a fast separation of D3 isoforms (free, with O-sulfonation or with ion-pairing) and MS detection allowed the differentiation between ion-pairing and single O-sulfonation species. Unlike this, the positively charged coating (polybrene) induced a high counter EOF which increased analysis time and improved resolution enabling the determination of isobaric species with single or double O-sulfonation.

V.5.1.5 Citrullination

Very recently, Faserl *et al* (Faserl *et al.* 2017) extended their study on histones to a challenging PTM which is citrullination by using a PAA coated capillary in CZE-ESI-MS. Citrullination corresponds to the replacement of the arginine by a citrulline (presence of an oxygen atom instead of the imine group in arginine). This conversion adds 0.984 Da to the mass of the intact protein. The separation was performed in acidic conditions and an external pressure of 1.0 or 1.5 psi was applied at the inlet end. The analysis of intact histone H4 showed a heterogeneity that was not only explained by acetylation or methylation as previously (Sarg *et al.* 2013) but was due to the replacement of the charge of arginine by a new uncharged citrulline amino acid. Thereby, the non-, mono-, di-, and trimethylated forms co-

migrated with the different acetylated and citrullinated species. The selectivity of this separation enables the differentiation of species differing from only a mass of 1Da.

V.5.2 Chemical degradations of proteins

Sources of heterogeneity of therapeutic proteins include a variety of glycoforms and phosphoforms, as previously discussed in this chapter, but also disulfide bond scrambling or sequence mutations, or chemical modifications such as oxidation, deamidation, isomerization, and N- and C-terminal alteration/truncation. Most often, these latter forms are structurally very close to the native one and may be difficult to detect. For instance, deamidation on an asparagine (Asn) residue increases the protein mass by only 0.98 Da, but most important introduces one additional negative charge to the protein due to the conversion of the Asn residue into aspartic (Asp) or isoaspartic (isoAsp) acid. In contrast, isomerization of Asp into isoAsp acid does not change the mass nor the local charge of the residue. Detailed characterization and quantitation of these proteoforms is important, as specific modifications can affect the efficacy and safety of the drug (Hmiel *et al.* 2015). For example, oxidation has been linked to protein aggregation, which has potential for immunogenicity (Eon-Duval *et al.* 2012) (Cacia *et al.* 1996) (Huang *et al.* 2005). Depending on the site of action, deamidation can have functional implications. It has been reported that the formation of a stable succinimide intermediate at Asn55 in the CDR2 region of IgG1 high chain led to a 70 % drop in the drug potency (Yan *et al.* 2009).

In 2007, Catai *et al.* (Catai *et al.* 2007b) demonstrated the possibility of using a noncovalent polymeric bilayer PB-PVS coating for CE-MS analyses of proteins under alkaline conditions. The developed CZE-ESI-MS method used an ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ion source *via* a coaxial sheath liquid interface and was applied to the characterization of thermally stressed or aged samples of recombinant human growth hormone (rhGH) (Catai *et al.* 2007a). The CZE-ESI-MS analysis of thermally degraded rhGH (Somatropin CRS), using a BGE of 75 mM ammonium formate (pH 8.5), revealed the formation of two additional species (peaks 2 and 3 of Figure V.12A). The mass spectra obtained for the detected peaks (Figure V.12B–D) showed that the degradation products had virtually the same mass as rhGH (22124 Da). These results suggest that the additional peaks are desamido forms of rhGH. Indeed, mono and di-deamidation add only 1 or 2 Da, respectively, to the total protein mass. Detection of such a mass difference would have required a mass spectrometer with a higher resolution than the ion trap.

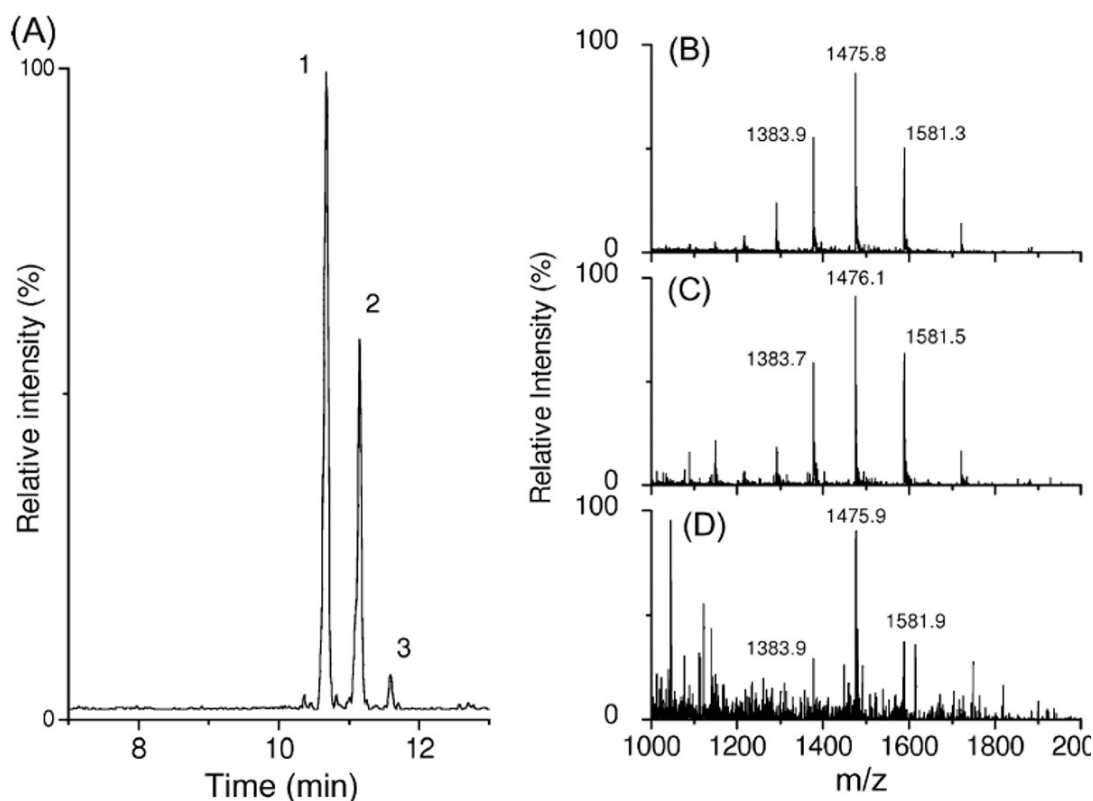


Figure V.12 CZE-ESI-MS of an rhGH exposed to heat (40°C) for 96h. A PB-PVS coating was used with a 75mM ammonium formate pH 8.5 buffer. (A) Sum of extracted ion electropherograms obtained at m/z 1475.9 and 1581.5. (B-D) Average mass spectra of peak 1 (intact rhGH), 2 and 3 respectively which correspond to degradation products. Reprinted with permission from (Catai *et al.* 2007a) Copyright (2007), Elsevier.

The performances of CZE-ESI-MS systems employing PB-PVS and PB-DS-PB coated capillaries for the characterization of therapeutic proteins (rhGH and IFN- β) subjected to prolonged storage, heat exposure, and/or different pH values were investigated by Haselberg *et al.* (Haselberg *et al.* 2011a). The acidic protein rhGH could be analyzed using a negatively charged PB-PVS coated capillary and a medium-pH BGE, whereas a positively charged PB-DS-PB coated capillary in combination with a low-pH BGE appeared to be very suitable for the analysis of rhIFN- β , a basic protein. Modifications could be assigned based on accurate masses as obtained with TOF-MS and migration times with respect to the parent compound. For heat-exposed rhGH, oxidations, sulfonate formation, and deamidations were observed.

In 2013, the same group explored a sheathless CE-MS interface employing capillaries with a porous tip ESI emitter and a LPA neutral coating for the analysis of intact proteins (Haselberg *et al.* 2013b). Crucial interfacing parameters, like ESI voltage and ESI tip to-end plate distance, were optimized for very low flow rates (~ 5 nL/min) in order to attain maximum sensitivity and stable performance. Analysis of a sample of rhIFN- β allowed the assignment of a variety of deamidation, succinimide, and oxidation products, representing a considerable improvement over sheath-liquid CE-MS.

Besides rhIFN- β 1 glycan proteoform separation (described in section X.5.1), the sheathless CZE-ESI-MS developed by Bush *et al* (Bush *et al.* 2016) allowed the detection of its oxidation and deamidation. In addition to deamidation, an associated succinimide was found based on accurate mass. A truncated form with an N-terminal methionine loss (-131 Da mass difference) was also observed. The results could highlight very interesting features, showing for instance potential correlations between the methionine loss and the amount of deamidation, as well as between the level of deamidation and the glycan structure. The authors stressed however that when multiple PTMs and numerous glycan structures exist on a complex glycoprotein, structures corresponding to similar molecular masses can exist, this can potentially lead to mis-assignment. High resolution separation coupled to high resolution MS and the ability to conduct top-down MS² is in these cases of high heterogeneity critical.

Recently, Neussus' group developed 2D capillary electrophoretic techniques coupled to MS for a highly precise mass detection of charge variants. This is an elegant approach to hyphenate ESI-interfering buffer systems (allowing high resolution) online to a MS compatible second separation dimension. A mechanical four-port nanoliter valve previously introduced (Kohl *et al.* 2016) was used as the interface between the first and second dimension. A heart-cut CZE-CZE-MS method has been developed and allowed the detection of intact model antibody deamidation (Jooß *et al.* 2017). Related mass differences (deviation 0.4-0.8 Da) were obtained for glycosylated and deglycosylated variants of trastuzumab. mAb charge variants were first separated in a fused silica capillary using an electrolyte composed of 380 mM EACA, 1.9 mM triethylenetetramine and 0.05% w/w (hydroxypropyl)methyl cellulose at pH 5.7. These analytes are then separate in a PVA-coated capillary using 2M acetic acid as BGE before reaching directly the mass spectrometer. Another paper reported an iCIEF-CZE-MS developed for the analysis of therapeutics. This method resulted in less contamination to MS and thus improved spectra quality, enabling therefore the detection of accurate masses for not only the main trastuzumab isoform but also its main acidic and basic variants which are attributed to deamidation and succinimide formation or partial cyclisation of N-terminal glutamic acid (Montealegre *et al.* 2018).

For intrinsic (*in vivo* natural source) and extrinsic (bioprocess, storage) reasons therapeutic HSA preparations, obtained from plasma fractionation, are very heterogeneous. Native HSA can undergo physical (aggregation, dimerization) or chemical (truncation, oxidation, nitrosylation, glycation) modifications. The free sulfhydryl residue (SH) of the native albumin is implicated in a great number of oxidation reactions. Furthermore, owing to its long half-time, serum albumin is a plasma protein highly sensitive to glycation. The glycation process 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 essentially lysine and arginine residues. This reaction forms reversible adducts that can subsequently be oxidized, polymerized or cleaved to give irreversible conjugates, called Advanced Glycation End products (AGEs). 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. A permanent HPC capillary coating was used to minimize albumin adsorption onto the capillary wall, but also to avoid ionization suppression and/or ion source contamination by the removing of coating agents. The BGE consisted of 100 mM ammonium bicarbonate pH 7.8. The CE-MS experiments were carried out with a sheath liquid composed of acetonitrile–water (60:40, v/v) containing 1% formic acid. To balance the low EOF resulting from the permanent HPC coating, a

continuous hydrodynamic pressure was applied during the CZE-ESI-MS analyses. As generally observed with CZE-ESI-MS experiments using a sheath-liquid interface, the coupling led to a loss of resolution. Still AGE derivatives of HSA such as HSA + MOLD, HSA + Vesperlysines, HSA + DOLD, HSA + DGH or HSA + THP could be detected by this technique. Some multiple AGEs, like HSA + DOLD + 2-Pentosidine or HSA + Argpyrimidine + 3-Pentosidine were reported for first time. (Marie *et al.* 2013)

The CZE-ESI-MS method developed by Tengattini *et al.* (described in section X.4) was also dedicated for the characterization and integrity assessment of the Mycobacterium tuberculosis (MTB) antigens TB10.4 (11 kDa) and Ag85B (31 kDa) which were conjugated with 2-iminomethoxyethyl-mannose (Man-IME) and 2-iminomethoxyethyl-mannose (1–6) mannose (Man(1–6)Man-IME). These neo-glycoconjugates are candidate vaccines against tuberculosis. The MTB antigens were exposed to experimental conditions used for chemical glycosylation in order to investigate their stability during glycovaccine production. CZE-ESI-MS analyses revealed the presence of several closely related degradation products, including truncated, oxidized and conformational variants, which were assigned by accurate mass. For both antigens it was observed that glycoforms with a higher number of conjugated saccharides showed a greater susceptibility for deamidation (Tengattini *et al.* 2016)

V.6 Conclusion

Since the introduction of CE-MS hyphenation, the specific interfaces required an important number of technical developments. In particular, the improvements of CE-MS interfaces have aimed at reducing the impact of the sheath liquid by providing the hyphenation with nanoESI sources in order to improve the sensitivity of the analysis. Thus, several types of high sensitivity CE-ESI-MS interfaces have been commercially available, which ensures the accessibility of this technique to a large community. In various research fields, the study of intact proteins appears to be relevant specially to obtain informations regarding not only to the primary structure but also to the 3D structure. Also, the analysis of intact proteins does not rely on heavy sample preparation which can introduce experimental biases and generate to some extent, chemical degradations of proteins which are not desirable for quality control of biopharmaceuticals. Therefore, it provides a characterization of proteins in a state as close as possible to the actual sample. As a matter of fact, the analysis of intact proteins is meeting a growing interest, even though it has revealed to be more demanding in terms of analytical performances.

This chapter shows that CE-MS represents a powerful analytical tool for the characterization of intact proteins. Indeed, the conjunction of the unique separation selectivity provided by CE to the outstanding performances of MS allows studying massive intact proteins in a complementary manner compared to liquid chromatography-based analysis. On top of that, one major advantage of CE-MS analysis lies in its ability to separate, according to their slight differences in net charge to hydrodynamic radius ratio, a high number of proteoforms with very close structure originated from a wide variety of PTMs, mutations or chemical degradations of proteins. These modified forms generally involve a mass difference as low as one dalton (citrullination, deamidation) or only one charge difference (acetylation). CE-MS analyses not only allowed differentiation between species with different phosphorylation, oxidation or sulfonation degree, but also enabled detection of glycoforms differing by one

monosaccharide in the glycan chain or as close as two isobaric positional isomers differing by the glycosidic bond (α 1-3 or α 1-6) between sialic acid and galactose residues. The analysis of these modifications is challenging especially on the intact protein level regardless of the total size of the protein. The most challenging application described in this chapter (for the first time) is related to the determination of intact mAb aggregation. A native sheathless CE-ESI-MS enabled the detection of monomer and dimer of Trastuzumab without artifactual association / dissociation occurrence during the ionization process. The most advanced research work cited here has even demonstrated the possibility using sheath liquid CE-ESI-MS to achieve the separation and independent characterization of a therapeutic protein exhibiting only a faint conformational change but not the charge nor the mass. The various applications of CE-MS for the analysis of intact proteins have demonstrated the versatility of this instrumental approach to enrich the level of characterization.

The analysis of intact proteins using CE-MS methods still remains at its early stages. Further challenges need to be addressed in order to improve the intrinsic performances and the application field of CE-MS analysis for intact proteins. The implementation of a preconcentration step prior to the separation, illustrated currently by micro SPE, LVSS or ITP, have allowed to improve in a drastic manner the sensitivity of the analysis by enabling the injection of larger volumes of sample. The strategies described for protein preconcentration offer various alternatives which are still emerging and further developments are expected concerning that aspect. The coatings compatible with CE-MS experiments currently remain limited and the development of novel types of capillary coatings may as well benefit significantly to CE-MS analysis of intact proteins. Therefore, innovative capillary coatings open the potentiality to improve further the resolution of intact proteins separation or tune differently the selectivity. The stability of the coating is of outmost importance in order to provide a satisfying separation robustness in addition to optimal compatibility with MS analysis. The electrophoretic mode almost systematically used is zone electrophoresis. While this separation mode already demonstrated to be compatible with high resolution separation of intact proteins, the implementation of additional modes like isoelectric focusing, or gel electrophoresis could further benefit to this type of analysis. Different instrumental developments have been already described to improve the compatibility of CIEF with ESI-MS. Also, the application of specific CE methodologies could be further extended like affinity CE for example. Thus, affinity CE represents an interesting approach able to distinguish the formation of protein-ligand complexes and determine their affinity constants using electrophoretic mobility changes. Another promising application field of CE-MS is protein analysis in native conditions. Native MS often suffers from the absence of a separation method prior to the MS measurement. The implementation of CE-MS in native conditions could alleviate this limitation in order to improve the performance especially regarding to sample complexity and broaden the applicability of native MS. In conclusion, the numerous developments involving CE-MS methodologies show the acknowledgment of CE-MS from the scientific community as an appropriate technique for the comprehensive characterization of intact proteins.

The major challenge for further implementation of CE-MS are probably the knowledge transfer and an increased implementation and ease of use of CE-MS instruments

Reference

- Alvarez-Llamas, G., del Rosario Fernandez de la Campa, M., and Sanz-Medel, A. 2003. Sample stacking capillary electrophoresis with ICP-(Q)MS detection for Cd, Cu and Zn speciation in fish liver metallothioneins. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (5):460-6.
- Balaguer, E., Demelbauer, U., Pelzing, M., *et al.* 2006. Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 27 (13):2638-50.
- Beck, A., Sanglier-Cianferani, S., and Van Dorsselaer, A. 2012. Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 84 (11):4637-46.
- Belov, M.A., Zang, L., Sebastiano, R., *et al.* 2018. Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis – mass spectrometry. *Electrophoresis* online available.
- Berezovski, M., and Krylov, S.N. 2002. Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures – A Single Experiment Reveals Equilibrium and Kinetic Parameters of Protein–DNA Interactions. *Journal of the American Chemical Society* 124 (46):13674-5.
- Bertoletti, L., Bisceglia, F., Colombo, R., *et al.* 2015. Capillary electrophoresis analysis of different variants of the amyloidogenic protein β 2-microglobulin as a simple tool for misfolding and stability studies. *Electrophoresis* 36 (19):2465-72.
- Bertoletti, L., Schappler, J., Colombo, R., *et al.* 2016. Evaluation of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of the conformational heterogeneity of intact proteins using beta2-microglobulin as model compound. *Analytica Chimica Acta* 945:102-9.
- Biacchi, M., Bhajun, R., Said, N., *et al.* 2014. Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface. *Electrophoresis* 35 (20):2986-95.
- Biacchi, M., Said, N., Beck, A., Leize-Wagner, E., and François, Y.-N. 2017. Top-down and middle-down approach by fraction collection enrichment using off-line capillary electrophoresis – mass spectrometry coupling: Application to monoclonal antibody Fc/2 charge variants. *Journal of Chromatography A* 1498:120-7.
- Bonvin, G., Rudaz, S., and Schappler, J. 2014. In-spray supercharging of intact proteins by capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry using sheath liquid interface. *Analytica Chimica Acta* 813:97-105.
- Bonvin, G., Schappler, J., and Rudaz, S. 2012a. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry interfaces: Fundamental concepts and technical developments. *Journal of Chromatography A* 1267:17-31.
- Bonvin, G., Veuthey, J.L., Rudaz, S., and Schappler, J. 2012b. Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling. *Electrophoresis* 33 (4):552-62.
- Borges-Alvarez, M., Benavente, F., Barbosa, J., and Sanz-Nebot, V. 2010. Capillary electrophoresis/mass spectrometry for the separation and characterization of bovine Cu,Zn-superoxide dismutase. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (10):1411-8.
- Borges-Alvarez, M., Benavente, F., Barbosa, J., and Sanz-Nebot, V. 2012. Separation and characterization of superoxide dismutase 1 (SOD-1) from human erythrocytes by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 33 (16):2561-9.
- Bush, D.R., Zang, L., Belov, A.M., Ivanov, A.R., and Karger, B.L. 2016. High Resolution CZE-MS Quantitative Characterization of Intact Biopharmaceutical Proteins: Proteoforms of Interferon- β 1. *Analytical Chemistry* 88 (2):1138-46.
- Busnel, J.-M., Josserand, J., Lion, N., and Girault, H.H. 2009. Ionophoretic Fraction Collection for Coupling Capillary Zone Electrophoresis with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 81 (10):3867-72.
- Cacia, J., Keck, R., Presta, L.G., and Frenz, J. 1996. Isomerization of an Aspartic Acid Residue in the Complementarity-Determining Regions of a Recombinant Antibody to Human IgE: Identification and Effect on Binding Affinity. *Biochemistry* 35 (6):1897-903.
- Cao, P., and Moini, M. 1997. A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8 (5):561-4.

- Catai, J.R., Sastre Toraño, J., Jongen, P.M.J.M., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2007a. Analysis of recombinant human growth hormone by capillary electrophoresis with bilayer-coated capillaries using UV and MS detection. *Journal of Chromatography B* 852 (1-2):160-6.
- Catai, J.R., Tervahauta, H.A., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2005. Noncovalently bilayer-coated capillaries for efficient and reproducible analysis of proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1083 (1):185-92.
- Catai, J.R., Torano, J.S., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2007b. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of proteins at medium pH using bilayer-coated capillaries. *Analyst* 132 (1):75-81.
- Chamoun, J., and Hagege, A. 2005. Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry for metal/protein interactions analysis by using large volume stacking with polarity switching. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (10):1030-4.
- Chartogne, A., Tjaden, U.R., and Van der Greef, J. 2000. A free-flow electrophoresis chip device for interfacing capillary isoelectric focusing on-line with electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14 (14):1269-74.
- Clouthier, C.M., Mironov, G.G., Okhonin, V., Berezovski, M.V., and Keillor, J.W. 2012. Real-Time Monitoring of Protein Conformational Dynamics in Solution Using Kinetic Capillary Electrophoresis. *Angewandte Chemie International Edition* 51 (50):12464-8.
- De Jong, G.J. 2016. *Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry (CE-MS) Principles and Applications*. Wiley-VCH.
- Eon-Duval, A., Broly, H., and Gleixner, R. 2012. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: An assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnology Progress* 28 (3):608-22.
- Fanali, S., D'Orazio, G., Foret, F., Kleparnik, K., and Aturki, Z. 2006. On-line CE-MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface-coated capillaries. *Electrophoresis* 27 (23):4666-73.
- Fang, L.L., Zhang, R., Williams, E.R., and Zare, R.N. 1994. Online time-of-flight mass spectrometric analysis of peptides separated by capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 66 (21):3696-701.
- Faserl, K., Kremser, L., Müller, M., Teis, D., and Lindner, H.H. 2015. Quantitative Proteomics Using Ultralow Flow Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 87 (9):4633-40.
- Faserl, K., Sarg, B., Maurer, V., and Lindner, H.H. 2017. Exploiting charge differences for the analysis of challenging post-translational modifications by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1498:215-23.
- Fermas, S., Gonnet, F., Sutton, A., *et al.* 2008. Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology* 18 (12):1054-64.
- Figeys, D., Gygi, S.P., Zhang, Y., *et al.* 1998. Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: Powerful tools for the analysis of proteins and proteomes. *Electrophoresis* 19 (10):1811-8.
- Foret, F., and Kusy, P. 2006. Microfluidics for multiplexed MS analysis. *Electrophoresis* 27 (24):4877-87.
- Foret, F., Muller, O., Thorne, J., Gotzinger, W., and Karger, B.L. 1995. Analysis of protein fractions by micropreparative capillary isoelectric-focusing and matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A* 716 (1-2):157-66.
- Foret, F., Thompson, T.J., Vouros, P., *et al.* 1994. Liquid sheath effects on the separation of proteins in capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 66 (24):4450-8.
- François, Y.-N., Biacchi, M., Said, N., *et al.* 2016. Characterization of cetuximab Fc/2 dimers by off-line CZE-MS. *Analytica Chimica Acta* 908:168-76.
- Gahoual, R., Busnel, J.M., Wolff, P., François, Y.N., and Leize-Wagner, E. 2014. Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (4):1029-38.
- Gasilova, N., Gassner, A.L., and Girault, H.H. 2012. Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS. *Electrophoresis* 33 (15):2390-8.
- Gelpi, E. 2002. Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments. *Journal of Mass Spectrometry* 37 (3):241-53.

- González, N., Elvira, C., San Román, J., and Cifuentes, A. 2003. New physically adsorbed polymer coating for reproducible separations of basic and acidic proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1012 (1):95-101.
- Gulersonmez, M.C., Lock, S., Hankemeier, T., and Ramautar, R. 2016. Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for anionic metabolic profiling. *Electrophoresis* 37 (7-8):1007-14.
- Gysler, J., Mazereeuw, M., Helk, B., *et al.* 1999. Utility of isotachopheresis–capillary zone electrophoresis, mass spectrometry and high-performance size-exclusion chromatography for monitoring of interleukin-6 dimer formation. *Journal of Chromatography A* 841 (1):63-73.
- Han, X., Wang, Y., Aslanian, A., *et al.* 2014. Sheathless Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry for Top-Down Characterization of *Pyrococcus furiosus* Proteins on a Proteome Scale. *Analytical Chemistry* 86 (22):11006-12.
- Hapuarachchi, S., Fodor, S., Apostol, I., and Huang, G. 2011. Use of capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate to monitor disulfide scrambled forms of an Fc fusion protein during purification process. *Analytical Biochemistry* 414 (2):187-95.
- Haselberg, R., Brinks, V., Hawe, A., Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2011a. Capillary electrophoresis-mass spectrometry using noncovalently coated capillaries for the analysis of biopharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (1):295-303.
- Haselberg, R., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2011b. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins 2007-2010. *Electrophoresis* 32 (1):66-82.
- Haselberg, R., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2010a. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene-dextran sulfate-Polybrene-coated capillaries: System optimization and performance. *Analytica Chimica Acta* 678 (1):128-34.
- Haselberg, R., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2007. Capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of intact proteins. *Journal of Chromatography A* 1159 (1-2):81-109.
- Haselberg, R., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2013a. CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012. *Electrophoresis* 34 (1):99-112.
- Haselberg, R., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2013b. Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins. *Analytical Chemistry* 85 (4):2289-96.
- Haselberg, R., Harmsen, S., Dolman, M.E.M., *et al.* 2011c. Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 698 (1-2):77-83.
- Haselberg, R., Ratnayake, C.K., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2010b. Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins. *Journal of Chromatography A* 1217 (48):7605-11.
- Hmiel, L.K., Brorson, K.A., and Boyne, M.T. 2015. Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (1):79-94.
- Hommerson, P., Khan, A.M., de Jong, G.J., and Somsen, G.W. 2011. Ionization techniques in capillary electrophoresis mass spectrometry: principles, design, and application. *Mass Spectrometry Reviews* 30 (6):1096-120.
- Huang, L., Lu, J., Wroblewski, V.J., Beals, J.M., and Riggin, R.M. 2005. In Vivo Deamidation Characterization of Monoclonal Antibody by LC/MS/MS. *Analytical Chemistry* 77 (5):1432-9.
- Hühner, J., Lämmerhofer, M., and Neusüß, C. 2015. Capillary isoelectric focusing-mass spectrometry: Coupling strategies and applications. *Electrophoresis* 36 (21-22):2670-86.
- Hühner, J., and Neusüß, C. 2016. CIEF-CZE-MS applying a mechanical valve. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (15):4055-61.
- Jensen, P.K., Harrata, A.K., and Lee, C.S. 1998. Monitoring Protein Refolding Induced by Disulfide Formation Using Capillary Isoelectric Focusing-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 70 (10):2044-9.
- Jooß, K., Hühner, J., Kiessig, S., Moritz, B., and Neusüß, C. 2017. Two-dimensional capillary zone electrophoresis–mass spectrometry for the characterization of intact monoclonal antibody charge variants, including deamidation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (26):6057-67.
- Kašička, V. 2016. Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2013–middle 2015). *Electrophoresis* 37 (1):162-88.

- Katayama, H., Ishihama, Y., and Asakawa, N. 1998a. Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers. *Analytical Chemistry* 70 (11):2254-60.
- Katayama, H., Ishihama, Y., and Asakawa, N. 1998b. Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 70 (24):5272-7.
- Kleparnik, K. 2015. Recent advances in combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: Methodology and theory. *Electrophoresis* 36 (1):159-78.
- Kohl, F.J., Montealegre, C., and Neusüß, C. 2016. On-line two-dimensional capillary electrophoresis with mass spectrometric detection using a fully electric isolated mechanical valve. *Electrophoresis* 37 (7-8):954-8.
- Koster, S., and Verpoorte, E. 2007. A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: An overview. *Lab on a Chip* 7 (11):1394-412.
- Lazar, I.M., Grym, J., and Foret, F. 2006. Microfabricated devices: A new sample introduction approach to mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25 (4):573-94.
- Lechner, M., Seifner, A., and Rizzi, A.M. 2008. Capillary isoelectric focusing hyphenated to single- and multistage matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry using automated sheath-flow-assisted sample deposition. *Electrophoresis* 29 (10):1974-84.
- Lee, E.D., Muck, W., Henion, J.D., and Covey, T.R. 1989. Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis ion spray mass-spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 18 (9):844-50.
- Lee, E.D., Muck, W., Henion, J.D., and Covey, T.R. 1988. Online capillary zone electrophoresis ion spray tandem mass-spectrometry for the determination of dynorphins. *Journal of Chromatography* 458:313-21.
- Li, J.J., Wang, C., Kelly, J.F., Harrison, D.J., and Thibault, P. 2000. Rapid and sensitive separation of trace level protein digests using microfabricated devices coupled to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer. *Electrophoresis* 21 (1):198-210.
- Marie, A.-L., Dominguez-Vega, E., Saller, F., *et al.* 2016. Characterization of conformers and dimers of antithrombin by capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 947:58-65.
- Marie, A.-L., Przybylski, C., Gonnet, F., *et al.* 2013. Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin. *Analytica Chimica Acta* 800:103-10.
- Martinović, S., Berger, S.J., Paša-Tolić, L., and Smith, R.D. 2000. Separation and Detection of Intact Noncovalent Protein Complexes from Mixtures by On-Line Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 72 (21):5356-60.
- Maxwell, E.J., and Chen, D.D.Y. 2008. Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 627 (1):25-33.
- Mellors, J.S., Black, W.A., Chambers, A.G., *et al.* 2013. Hybrid Capillary/Microfluidic System for Comprehensive Online Liquid Chromatography-Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 85 (8):4100-6.
- Mellors, J.S., Gorbounov, V., Ramsey, R.S., and Ramsey, J.M. 2008. Fully Integrated Glass Microfluidic Device for Performing High-Efficiency Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 80 (18):6881-7.
- Minarik, M., Foret, F., and Karger, B.L. 2000. Fraction collection in micropreparative capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis* 21 (1):247-54.
- Mironov, G.G., Clouthier, C.M., Akbar, A., Keillor, J.W., and Berezovski, M.V. 2016. Simultaneous analysis of enzyme structure and activity by kinetic capillary electrophoresis-MS. *Nature Chemical Biology* 12:918.
- Moini, M. 2001. Design and performance of a universal sheathless capillary electrophoresis to mass spectrometry interface using a split-flow technique. *Analytical Chemistry* 73 (14):3497-501.
- Moini, M. 2007. Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip. *Analytical Chemistry* 79 (11):4241-6.
- Montealegre, C., and Neusüß, C. 2018. Coupling imaged capillary isoelectric focusing with mass spectrometry using a nanoliter valve. *Electrophoresis* 39 (9-10):1151-4.
- Nguyen, A., and Moini, M. 2008. Analysis of Major Protein-Protein and Protein-Metal Complexes of Erythrocytes Directly from Cell Lysate Utilizing Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 80 (18):7169-73.

- Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., and Smith, R.D. 1987. Online mass-spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* 59 (8):1230-2.
- Ongay, S., and Neusüß, C. 2010a. Isoform differentiation of intact AGP from human serum by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2):845-55.
- Ongay, S., Neusüß, C., Vaas, S., Díez-Masa, J.C., and de Frutos, M. 2010b. Evaluation of the effect of the immunopurification-based procedures on the CZE-UV and CZE-ESI-TOF-MS determination of isoforms of intact α -1-acid glycoprotein from human serum. *Electrophoresis* 31 (11):1796-804.
- Pattky, M., Nicolardi, S., Santiago-Schübel, B., *et al.* 2015. Structure characterization of unexpected covalent O-sulfonation and ion-pairing on an extremely hydrophilic peptide with CE-MS and FT-ICR-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (22):6637-55.
- Peró-Gascón, R., Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., and Sanz-Nebot, V. 2016. Analysis of serum transthyretin by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry using magnetic beads. *Electrophoresis* 37 (9):1220-31.
- Peuchen, E.H., Zhu, G., Sun, L., and Dovichi, N.J. 2017. Evaluation of a commercial electro-kinetically pumped sheath-flow nanospray interface coupled to an automated capillary zone electrophoresis system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (7):1789-95.
- European Pharmacopoeia. Supplement 6.8 2010. *Interferon beta-1a concentrated solution (sixth ed.)*.
- Pioch, M., Bunz, S.C., and Neususs, C. 2012. Capillary electrophoresis/mass spectrometry relevant to pharmaceutical and biotechnological applications. *Electrophoresis* 33 (11):1517-30.
- Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., and Sanz-Nebot, V. 2017. On-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry using Fab antibody fragments for the analysis of serum transthyretin. *Talanta* 170 (Supplement C):224-32.
- Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., and Sanz-Nebot, V. 2015. Analysis of transthyretin in human serum by capillary zone electrophoresis electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Application to familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Electrophoresis* 36 (11-12):1265-73.
- Przybylski, C., Mokaddem, M., Prull-Janssen, M., *et al.* 2015. On-line capillary isoelectric focusing hyphenated to native electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of interferon-gamma and variants. *Analyst* 140 (2):543-50.
- Ramsey, R.S., and Ramsey, J.M. 1997. Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping. *Analytical Chemistry* 69 (6):1174-8.
- Redman, E.A., Batz, N.G., Mellors, J.S., and Ramsey, J.M. 2015. Integrated Microfluidic Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Devices with Online MS Detection for the Separation and Characterization of Intact Monoclonal Antibody Variants. *Analytical Chemistry* 87 (4):2264-72.
- Redman, E.A., Mellors, J.S., Starkey, J.A., and Ramsey, J.M. 2016. Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 88 (4):2220-6.
- Righetti, P.G., and Verzola, B. 2001. Folding/unfolding/refolding of proteins: Present methodologies in comparison with capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 22 (12):2359-74.
- Sánchez-Hernández, L., Montealegre, C., Kiessig, S., Moritz, B., and Neusüß, C. 2017. In-capillary approach to eliminate SDS interferences in antibody analysis by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Electrophoresis* 38 (7):1044-52.
- Sarg, B., Faserl, K., Kremser, L., *et al.* 2013. Comparing and Combining Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Nano-Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of Post-translationally Modified Histones. *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (9):2640-56.
- Schiestl, M., Stangler, T., Torella, C., *et al.* 2011. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 29:310.
- Sergeev, N.V., Gloukhova, N.S., Nazimov, I.V., *et al.* 2001. 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. *Journal of Chromatography A* 907 (1):131-44.
- Silvertand, L.H.H., Toraño, J.S., de Jong, G.J., and van Bennekom, W.P. 2009. Development and characterization of cIEF-MALDI-TOF MS for protein analysis. *Electrophoresis* 30 (10):1828-35.
- Stutz, H. 2005. Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis* 26 (7-8):1254-90.

- Stutz, H., Bordin, G., and Rodriguez, A.R. 2004. Capillary zone electrophoresis of metal-binding proteins in formic acid with UV- and mass spectrometric detection using cationic transient capillary isotachopheresis for preconcentration. *Electrophoresis* 25 (7-8):1071-89.
- Stutz, H., Wallner, M., Malissa, H., Bordin, G., and Rodriguez, A.R. 2005. Detection of coexisting protein conformations in capillary zone electrophoresis subsequent to transient contact with sodium dodecyl sulfate solutions. *ELECTROPHORESIS* 26 (6):1089-105.
- Sun, L.L., Knierman, M.D., Zhu, G.J., and Dovichi, N.J. 2013. Fast Top-Down Intact Protein Characterization with Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 85 (12):5989-95.
- Taichrib, A., Pelzing, M., Pellegrino, C., Rossi, M., and Neusüß, C. 2011. High resolution TOF MS coupled to CE for the analysis of isotopically resolved intact proteins. *Journal of Proteomics* 74 (7):958-66.
- Taichrib, A., Pioch, M., and Neususs, C. 2012. Toward a screening method for the analysis of small intact proteins by CE-ESI-TOF MS. *Electrophoresis* 33 (9-10):1356-66.
- Tang, Q., Harrata, A.K., and Lee, C.S. 1995. Capillary isoelectric focusing-electrospray mass spectrometry for protein analysis. *Analytical Chemistry* 67 (19):3515-9.
- Tengattini, S., Domínguez-Vega, E., Temporini, C., Terreni, M., and Somsen, G.W. 2016. Monitoring antigenic protein integrity during glycoconjugate vaccine synthesis using capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (22):6123-32.
- Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Jameson, S., Johnson, D.H., and Naylor, S. 1997. Utility of membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry in overcoming limited sample loading for analysis of biologically derived drug metabolites, peptides, and proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8 (1):15-24.
- Týčová, A., Ledvina, V., and Klepárník, K. 2017. Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications. *Electrophoresis* 38 (1):115-34.
- Varki, A., and Lowe, J.B. 2009. *Biological role of glycans, Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- von Brocke, A., Nicholson, G., and Bayer, E. 2001. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* 22 (7):1251-66.
- Wilm, M., and Mann, M. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry* 68 (1):1-8.
- Wojcik, R., Dada, O.O., Sadilek, M., and Dovichi, N.J. 2010. Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (17):2554-60.
- Yan, B., Steen, S., Hambly, D., *et al.* 2009. Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (10):3509-21.
- Zhang, Z.C., Wang, J.H., Hui, L.M., and Li, L.J. 2011. Membrane-assisted capillary isoelectric focusing coupling with matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform mass spectrometry for neuropeptide analysis. *Journal of Chromatography A* 1218 (31):5336-43.
- Zhao, Y., Sun, L., Zhu, G., and Dovichi, N.J. 2016. Coupling Capillary Zone Electrophoresis to a Q Exactive HF Mass Spectrometer for Top-down Proteomics: 580 Proteoform Identifications from Yeast. *Journal of Proteome Research* 15 (10):3679-85.
- Zhao, Y.M., Sun, L.L., Champion, M.M., Knierman, M.D., and Dovichi, N.J. 2014. Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry for Top-Down Characterization of the Mycobacterium marinum Secretome. *Analytical Chemistry* 86 (10):4873-8.
- Zhong, X., Zhang, Z., Jiang, S., and Li, L. 2014. Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS. *Electrophoresis* 35 (9):1214-25.
- Zhong, X.F., Maxwell, E.J., and Chen, D.D.Y. 2011. Mass Transport in a Micro Flow-Through Vial of a Junction-at-the-Tip Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Interface. *Analytical Chemistry* 83 (12):4916-23.

Annexe 2

Nomenclature des CDG (Jaeken and Péanne, 2017)

Localisation	Gène déficient	Protéine déficiente
Cytosol	Anomalies de la N-glycosylation	
	PMM2-CDG (<i>CDG-1a</i>)	Phosphomannomutase 2
	MPI-CDG (<i>CDG-1b</i>)	Phosphomannose isomérase
	GMPPA-CDG	Guanosine diphosphate mannose pyrophosphorylase A
	GMPPB-CDG	Guanosine diphosphate mannose pyrophosphorylase A
	Anomalies de la O-glycosylation	
	<i>Anomalies dans la synthèse des O-N-acétylgalactosaminylglycanes</i>	
	EOGT-CDG	Domaine EGF GlcNAc transférase O spécifique
	Anomalies de plusieurs types de glycosylation et d'autres voies métaboliques	
	<i>Anomalies dans la synthèse du dolichol</i>	
	DHDDS-CDG	Dehydrodolichyl diphosphate
	<i>Anomalies dans la synthèse du monosaccharide</i>	
	CAD-CDG	Activités carbamoyl-phosphate synthetase 2 et aspartate transcarbamylase de l'enzyme trifonctionnelle CAD
	GFPT1-CDG	Glutamine : fructose 6-phosphate amidotransférase 1
	GNE-CDG	UDP-GlcNAc épimérase/kinase
	NANS-CDG	Synthase acide N-acétylneuraminique
	PGM1-CDG	Phosphoglucomutase 1
	PGM3-CDG	Phosphoglucomutase 3
	<i>Anomalies dans la synthèse du sucre-nucléotide</i>	
CPS2-CDG	Carbamylphosphate synthétase 2	

Réticulum endoplasmique	Anomalies de la N-glycosylation	
	ALG1-CDG (<i>CDG-1k</i>)	β -1,4-mannosyltransférase 1
	ALG2-CDG (<i>CDG-1i</i>)	α -1,3-mannosyltransférase 2
	ALG3-CDG (<i>CDG-1d</i>)	α -1,3-mannosyltransférase 6
	ALG6-CDG (<i>CDG-1c</i>)	α -1,3-glucosyltransférase 1
	ALG8-CDG (<i>CDG-1h</i>)	α -1,3-glucosyltransférase 2
	ALG9-CDG (<i>CDG-1l</i>)	α -1,2-mannosyltransférase 7/9
	ALG11-CDG (<i>CDG-1g</i>)	α -1,6-mannosyltransférase 4/5
	ALG12-CDG (<i>CDG-1q</i>)	α -1,6-mannosyltransférase 8
	ALG13-CDG (<i>CDG-1j</i>)	UDP-GlcNAc : Dol-P-GlcNAc-P transférase
	ALG14-CDG (<i>CDG-1j</i>)	UDP-GlcNAc : Dol-PP-GlcNAc transférase
	DDOST-CDG (<i>CDG-1r</i>)	Sous-unité DDOST du complexe d'oligosaccharyltransférase
	DPAGT1-CDG	UDP-GlcNAc : Dol-P-GlcNAc-P
	MOGS-CDG	Glucosidase 1
	GANAB-CDG	α -1,2-Glucosidase 2
	PRKCSH-CDG	β -1,2-Glucosidase 2
	RFT1-CDG (<i>CDG-1n</i>)	Flippase
	STT3A-CDG	Sous-unité STT3A d'oligosaccharyltransférase
	STT3B-CDG	Sous-unité STT3B d'oligosaccharyltransférase
	SSR3-CDG	Récepteur 3 de signal de séquence du complexe TRAP
	SSR4-CDG	Récepteur 4 de signal de séquence du complexe TRAP
	TUSC3-CDG	Sous-unité TUSC3 du complexe d'oligosaccharyltransférase
	Anomalies de la O-glycosylation	
	<i>Anomalies dans la synthèse des O-xylosyl/N-acétylgalactosaminyglycanes</i>	
	SLC35D1-CDG	
	<i>Anomalies dans la synthèse des O-glucosylglycanes</i>	
	POGLUT1-CDG	Protéine O-glucosyltransférase
	Anomalies de la synthèse de la glycosylation des lipides et des ancras de glycosylphosphatidylinositol	
	<i>Anomalies dans la synthèse du glycosylphosphatidylinositol</i>	
	PIGA-CDG	Sous-unité A du complexe (GPI)-N-acétylaglucosaminyltransférase

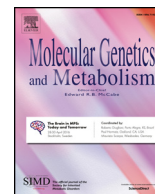
Réticulum endoplasmique	PIGC-CDG	Sous-unité C du complexe (GPI)-N-acétylaglucosaminyltransférase	
	PIGG-CDG	Sous-unité G du complexe (GPI)-N-acétylaglucosaminyltransférase	
	PIGL-CDG	GlcNAc-phosphatidylinositol désacétylase	
	PIGM-CDG	Phosphatidylinositol mannosyltransférase 1	
	PIGN-CDG	Glycosylphosphatidylinositol éthanolamine phosphate transférase 1	
	PIGO-CDG	Glycosylphosphatidylinositol éthanolamine phosphate transférase 3	
	PIGQ-CDG	Sous-unité Q du complexe (GPI)-N-acétylaglucosaminyltransférase	
	PIGT-CDG	Sous-unité PIGT transamidase	
	PIGV-CDG	Phosphatidylinositol mannosyltransférase 2	
	PIGW-CDG	Phosphatidylinositol acylase	
	PIGY-CDG	Sous-unité Y du complexe (GPI)-N-acétylaglucosaminyltransférase	
	PGAP1-CDG	Phosphatidylinositol désacylase	
	Anomalies de plusieurs types de glycosylation et d'autres voies métaboliques		
	<i>Anomalies dans la synthèse du dolichol</i>		
	DOLK-CDG	Dolichol kinase	
	NUS1-CDG	Récepteur Nogo-B	
	SRD5A3-CDG	Stéroïde 5 α -réductase 3	
	<i>Anomalies dans l'utilisation du dolichol</i>		
	DPM1-CDG (<i>CDG-le</i>)	Dol-P mannosyltransférase 1	
	DPM2-CDG (<i>CDG-lu</i>)	Dol-P mannosyltransférase 2	
	DPM3-CDG (<i>CDG-lo</i>)	Dol-P mannosyltransférase 3	
	MPDU1-CDG (<i>CDG-lf</i>)	Man-P-Dol utilisation 1	
	<i>Anomalies dans le complexe v-ATPase</i>		
ATP6AP1-CDG	Protéine accessoire Ac45 du v-ATPase		
<i>Autres anomalies</i>			
TRAPPC11-CDG	Sous-unité 11 du complexe de TRAP III		
Golgi	<i>Anomalies de la N-glycosylation</i>		
	MAN1B1-CDG	Golgi α -1,2-mannosidase 1	
	MGAT2-CDG	β -1,2-N-acétylglycosaminyltransférase 2	
	Anomalies de la O-glycosylation		

Golgi	Synthèse des O-xylosylglycanes	
	B4GALT7-CDG	β -1,4-galactosyltransférase 7
	B3GALT6-CDG	β -1,3-galactosyltransférase 6
	B3GALT3-CDG	β -1,3-galactosyltransférase 3
	CHSY1-CDG	Chondroïtin β -1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase 1
	EXT1-CDG	Exostosine 1
	EXT2-CDG	Exostosine 2
	XYLT1-CDG	Xylotransférase 1
	XYLT2-CDG	Xylotransférase 2
	Synthèse des O-N-acétylgalactosaminylglycanes	
	GALNT3-CDG	Polypeptide N- acétylgalactosaminyltransférase 3
	Synthèse des O-fucosylglycanes	
	LFNG-CDG	β -1,3-N-acétylglucosaminyltransférase spécifique O-fucose
	POFUT1-CDG	Protéine O-fucosyltransférase 1
	Anomalies de la synthèse de la glycosylation des lipides et des ancres de glycosylphosphatidylinositol	
	Anomalies de la glycosylation des lipides	
	B4GALNT1-CDG	β -1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase 1
	ST3GAL5-CDG	Lactosylceramide α -2,3-sialyltransférase
	Anomalies de la synthèse du glycosylphosphatidylinositol	
	SLC35A1-CDG (<i>CDG-II_f</i>)	Transporteur CMP-acide sialique
	SLC35A2-CDG	Transporteur UDP-galactose
	SLC35A3-CDG	Transporteur UDP-GlcNAc
	SLC35C1-CDG (<i>CDG-II_c</i>)	Transporteur GDP-fucose 1
	Anomalies du complexe conservé oligomérique Golgien	
	COG1-CDG (<i>CDG-II_g</i>)	Sous-unité 1 du complexe conservé oligomérique Golgien
	COG2-CDG	Sous-unité 2 du complexe conservé oligomérique Golgien
	COG4-CDG (<i>CDG-II_j</i>)	Sous-unité 4 du complexe conservé oligomérique Golgien
	COG5-CDG (<i>CDG-II_i</i>)	Sous-unité 5 du complexe conservé oligomérique Golgien
COG6-CDG (<i>CDG-II_h</i>)	Sous-unité 6 du complexe conservé oligomérique Golgien	
COG7-CDG (<i>CDG-II_e</i>)	Sous-unité 7 du complexe conservé oligomérique Golgien	

Golgi	COG8-CDG (<i>CDG-IIIh</i>)	Sous-unité 8 du complexe conservé oligomérique Golgien
	<i>Anomalies dans le complexe v-ATPase</i>	
	ATP6V0A2-CDG	V0 sous-unité A2 du V-ATPase
	<i>Autres anomalies</i>	
	TMEM165-CDG (<i>CDG-IIIk</i>)	Protéine transmembranaire 165
	VPS13B-CDG	Protéine 13B associée à protéine vacuolaire
ERGIC	Anomalies de plusieurs types de glycosylation et d'autres voies métaboliques	
	<i>Anomalies dans le COPII</i>	
	SEC23B-CDG	composant SEC23B des vésicules COPII
	<i>Autres anomalies</i>	
	CCDC115-CDG	Domaine 115 de la superhélice
	TMEM199-CDG	Protéine transmembranaire 199
Membrane plasmique	Anomalies de plusieurs types de glycosylation et d'autres voies métaboliques	
	SLC39A8-CDG	Transporteur de cuivre et de zinc
Membrane sarcolemmique	Anomalies de la O-glycosylation	
	<i>Synthèse des O-mannosylglycanes</i>	
	B3GALNT2-CDG	β -1,3-N-acétylgalactosaminyltransférase 2
	FKTN (cong. muscular dystrophy spectrum)	Fukutine
	FKRP (cong. muscular dystrophy spectrum)	Protéine liée à la fukutine
	ISPD-CDG	Cytidine diphosphate ribitol synthase
	LARGE (cong. muscular dystrophy spectrum)	N-Acétyleglucosaminyltransférase-like protéine
	POMGNT1 (cong. muscular dystrophy spectrum)	Protéine -O-mannose β -1,2-N-acétylglucosaminyltransférase
	POMT1	Protéine-O-mannosyltransférase 1
	POMT2	Protéine O-mannosyltransférase 2
	TMEM5-CDG	O-mannosylation β 1,4-xylosyltransférase

Annexe 3

Article : M. Girard, A. Poujois, M. Fabre, F. Lacaille, D. Debray, M. Rio, F. Fenaille, S. Cholet, C. Ruel, E. Caussé, J. Selves, L. Bridoux-Henno, F. Woimant, T. Dupré, S. Vuillaumier-Barrot, N. Seta, L. Alric, P. de Lonlay, A. Bruneel, « *CCDC115-CDG: A new rare and misleading inherited cause of liver disease* » publié dans *Molecular Genetics and Metabolism* en 2018 (vol 124, p 228–235)



Regular Article

CCDC115-CDG: A new rare and misleading inherited cause of liver disease

Muriel Girard^{a,k}, Aurélia Poujois^b, Monique Fabre^c, Florence Lacaille^a, Dominique Debray^a, Marlène Rio^d, François Fenaille^e, Sophie Cholet^e, Coralie Ruel^{e,f}, Elizabeth Caussé^g, Janick Selves^h, Laure Bridoux-Hennoⁱ, France Woimant^b, Thierry Dupré^j, Sandrine Vuillaumier-Barrot^j, Nathalie Seta^{j,k}, Laurent Alric^l, Pascale de Lonlay^m, Arnaud Bruneel^{l,n,*}

^a AP-HP, Necker University Hospital, Hepatology and Gastroenterology Unit, French National Reference Centre for Biliary Atresia and Genetic Cholestasis, France

^b AP-HP, French National Reference Centre for Wilson Disease, Neurology Department, Lariboisière Hospital, Paris, France

^c AP-HP, Necker University Hospital, Department of Pathology, Paris, France

^d AP-HP, Necker University Hospital, Department of Genetics, Paris, France

^e Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI), Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA, INRA, Université Paris Saclay, MetaboHUB, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

^f Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Proteins and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

^g Biochemistry, CHU Purpan, Toulouse, France

^h Department of Pathology, University Hospital Toulouse, Paul Sabatier University, Toulouse, France

ⁱ Department of Pediatric Gastroenterology, CHU, Rennes, France

^j AP-HP, Bichat University Hospital, Biochemistry, Paris, France

^k Paris Descartes University, France

^l Internal Medicine-Digestive Department CHU Purpan, UMR152 IRD Toulouse 3 University, France

^m AP-HP, Necker University Hospital, French National Reference Centre for Inborn Errors of Metabolism, Paris, France

ⁿ INSERM UMR-1193 "Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'adaptation au stress et cancérogenèse", Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France



ARTICLE INFO

Keywords:

CCDC115

CDG

Copper

Glycosylation

Liver fibrosis

Liver steatosis

ABSTRACT

Congenital disorders of glycosylation (CDG) linked to defects in Golgi apparatus homeostasis constitute an increasing part of these rare inherited diseases. Among them, COG-CDG, ATP6V0A2-CDG, TMEM199-CDG and CCDC115-CDG have been shown to disturb Golgi vesicular trafficking and/or lumen pH acidification. Here, we report 3 new unrelated cases of CCDC115-CDG with emphasis on diagnosis difficulties related to strong phenotypic similarities with mitochondriopathies, Niemann-Pick disease C and Wilson Disease. Indeed, while two individuals clinically presented with early and severe liver fibrosis and cirrhosis associated with neurological symptoms, the other one "only" showed isolated and late severe liver involvement. Biological results were similar to previously described patients, including hypercholesterolemia, elevated alkaline phosphatases and defects in copper metabolism. CDG screening and glycosylation study finally led to the molecular diagnosis of CCDC115-CDG. Besides pointing to the importance of CDG screening in patients with unexplained and severe liver disease, these reports expand the clinical and molecular phenotypes of CCDC115-CDG. The hepatic involvement is particularly addressed. Furthermore, hypothesis concerning the pathogenesis of the liver disease and of major biological abnormalities are proposed.

1. Introduction

Congenital disorders of glycosylation (CDGs) are rare inherited diseases sharing very diverse and variable clinical symptoms related to defects in the glycosylation process of proteins and lipids. CDGs with abnormal protein N-glycosylation are classically sub-grouped as type I (CDG-I) or type II (CDG-II) according to affected metabolic steps. In

CDG-I, the defect alters the oligosaccharide synthesis or its transfer to proteins in endoplasmic reticulum leading to N-glycosylation sites under-occupancy. In CDG-II, the defect alters the maturation of protein-linked oligosaccharide in the Golgi apparatus (GA) leading to the accumulation of N-glycan intermediate motifs [1]. In CDG-II subgroup, those related to disturbance of GA homeostasis constitute an increasing part with major involvement of deficient proteins normally involved in

* Corresponding author at: Hôpital Bichat, Biochimie Métabolique et Cellulaire, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.

E-mail address: arnaud.bruneel@aphp.fr (A. Bruneel).

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.05.002>

Received 19 March 2018; Received in revised form 7 May 2018; Accepted 7 May 2018

Available online 09 May 2018

1096-7192/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

vesicular trafficking (COG-CDGs) and/or in pH regulation (ATP6V0A2-CDGs) [2]. Coiled-Coil Domain Containing 115 genetic deficiency (CCDC115-CDG) has been recently described in a single report of 8 patients sharing similar CDG-II transferrin profiles associated with hepatosplenomegaly (HSM), neurological symptoms, elevated serum aminotransferases (ATs) and alkaline phosphatases (ALP), hypercholesterolemia and Wilson disease (WD)-like disturbed copper metabolism [3]. Since CCDC115 protein is probably involved in the V-ATPase proton pump assembly, mutations have been suggested to alter GA lumen acidification, indirectly leading to glycosylation defects [3]. Furthermore, genetic deficiency in TMEM199, a CCDC115 interacting protein, has been concomitantly described presenting with milder neurological and hepatic symptoms and with very similar biological phenotypes [4]. The present work describes clinical, histological, biological, genetic, and glycosylation profiles of 3 newly identified unrelated cases of CCDC115-CDG. It expands the genotype (2 new mutations) and clinical phenotype of this disease and particularly points to multiple diagnosis difficulties related to clinical and biological symptoms suggesting either mitochondrialriopathy, Niemann Pick disease C (NPC) or Wilson disease (WD). In order to avoid diagnostic wavering, it also illustrates the importance of systematic CDG screening when confronted with unexplained and severe liver disease with or without associated neurological disorders.

2. Results

2.1. Clinical description

Patient1 (Pt1) is a French girl from non-consanguineous parents. She was born at term after an uneventful pregnancy. At birth, major hepatosplenomegaly (HSM) and cholestasis were reported. At 6 months of age, HSM was persistent with elevated liver enzymes but cholestasis spontaneously normalized. Psychomotor development was mildly delayed with hypotonia. At that time, based on neurological involvement and important HSM, NPC disease was suggested but biologically and genetically excluded. At 4 years of age, in a context of persistent and unexplained HSM and cytotoxicity, a needle liver biopsy was performed showing a very fragmented liver specimen, with several portal-to-portal bridging fibrosis without regenerative nodules, fatty hepatocytes, foamy histiocytes and iron overload. At 13 years of age, she had sub-normal intellectual capacities but behavioral troubles with intolerance to frustration, aggressiveness and agitation. Brain magnetic resonance imaging (MRI) was normal. She showed mild dysmorphic features and persistent HSM. Aminotransferases (ASAT/ALAT) and alkaline phosphatases (ALP) were discreetly elevated (ASAT = 56 U/L, ALAT = 45 U/L, N < 40 U/L; ALP = 196 U/L, N < 119 U/L) while γ -glutamyltransferase (GGT), bilirubin and CK were normal. She had mild hypercholesterolemia (5.50 mmol/L, N < 5.20 mmol/L) and normal glucose and lactic acid. Metabolic investigations including plasma amino acids, urinary organic acids, and lysosomal acid lipase were regarded as normal. Chromatographic analysis of the lipids from the liver showed high level of Bis(Monoacylglycerol)Phosphate (not shown). Copper metabolism-related findings were low serum ceruloplasmin (0.55 μ mol/L, N = 2–4.5 μ mol/L), low serum total copper (5.44 μ mol/L, N = 12.5–22.5 μ mol/L), slightly elevated relative exchangeable copper (REC = exchangeable copper/total copper %) (10.7%, N = 3.0–8.1%) and elevated urinary copper (0.48 to 1.89 μ mol/24 h, N < 0.40 μ mol/24 h). Kayser-Fleisher ring was absent and *ATP7B* gene sequencing failed to diagnose Wilson disease (WD). At 16 years of age, a second liver biopsy showed enlarged portal tracts with slender portal-to-portal bridging fibrosis (stage F2 in METAVIR scoring system) (Fig. 1A, B). A proliferation of bile ductules was present in some portal tracts with apoptotic bodies and nuclear dystrophy of cholangiocytes (Fig. 1C–D). Macro- and micro-steatosis was slight (< 5%) but focally present (Fig. 1E). Rhodanine copper staining showed faint cytoplasmic staining in isolated periportal hepatocytes (Fig. 1F) and also glycogen

vacuolization in some hepatocyte nuclei. Signs of steatohepatitis such as Mallory–Denk bodies, ballooned hepatocytes and active portal inflammation, were absent.

Patient 2 (Pt2) is a French man from non-consanguineous parents. No specific medical history was reported until he was 20 years old. He was referred for chronic hepatitis with elevated serum liver enzymes i.e., ALAT = 154 U/L and ASAT = 137 U/L (N < 40 U/L) for > 6 months. Serum GGT level was normal (35 U/L; N < 40 U/L) but ALP was increased (218 U/L; N < 119 U/L). Serum CK were elevated (519 U/L; N < 190 U/L) without clinical muscular disease. He had marked hypercholesterolemia (8.16 mmol/L; N < 5.7 mmol/L) with an increase of LDL-cholesterol despite normal body mass index. No splenomegaly or hepatomegaly was found. Psychomotor development was normal without dysmorphic features. Ceruloplasmin concentration was low (0.54 μ mol/L; N = 2–4.5 μ mol/L) and the 24 h-urinary copper excretion was normal (0.20 μ mol/24 h; N < 0.40 μ mol/24 h). Moreover, REC was increased (19%; N = 3.0–8.1%) as well as liver copper concentration (2.47 μ mol/g, N = 0.3–0.9 μ mol/g). Kayser-Fleisher ring was absent and cerebral MRI was normal. Liver biopsy showed portal fibrosis with numerous portal-to-portal bridging fibrosis without cirrhosis (stage F2/F3 in METAVIR scoring system) and partial loss of interlobular ducts. A proliferation of bile ductules was present in some portal tracts. Taking into account the low ceruloplasmin concentration, the clinical profile was rather consistent with WD. D-penicillamin treatment (600 mg/day) was started while waiting for the results of *ATP7B* gene sequencing. Two months later, liver blood tests were not improved and urinary copper excretion was not increased. D-penicillamin therapy was stopped. None *ATP7B* gene mutation was found and WD diagnosis could not be asserted. MRI liver cholangiography was normal and autoimmune hepatitis or primary sclerosing cholangitis were ruled out as well as all other causes of acute and chronic liver disease.

Patient 3 (Pt3) is a French boy from non-consanguineous parents. He was born at term after an uneventful pregnancy. At birth, axial hypotonia, major HSM and cholestasis were reported. Explorations ruled out all classical causes of neonatal cholestasis [5] and also Gaucher and Niemann-Pick diseases. He had particular high serum cholesterol (9.92 mmol/L; N < 5.2 mmol/L), and acid lipase deficiency was also excluded. In absence of diagnosis, a liver biopsy was performed at 2 months of age, and identified enlarged portal tracts with several portal-to-portal bridging fibrosis (stage F3 in METAVIR scoring system), focal portal inflammation, loss of interlobular ducts in 1/3 of portal tracts and proliferation of bile ductules. A non-systematized microvacuolar steatosis was present (70%). There was no foamy hepatocyte or bile plug. A mitochondrial cytopathy was suspected in absence of other causes of liver disease despite normal lactate serum level. Enzymatic measurements in the liver identified isolated mitochondrial complex III (CIII) enzyme deficiency, which was not observed in lymphocytes and fibroblasts. Clinical evolution led to cirrhosis presentation with enlarged liver and portal hypertension. At this stage, a moderate delay in the global development was identified. A second liver biopsy was performed at 2.5 years of age and identified micronodular cirrhosis with non-inflammatory fibrosis, mild bile ductular proliferation. Lobular steatosis persisted with very mild intensity (10%). CIII liver deficiency was confirmed on this second sample. Mutation in the CIII gene and deletion in the mitochondrial DNA were discarded. In this context, sequencing of a panel of 215 genes involved in the mitochondrial metabolism was performed and did not identify any disease-causing mutation. CGH-Array was normal. Pt3 developed moderate mental retardation (normal brain MRI) and had also elevated CK and absent deep tendon reflex. For this reason, a muscular biopsy was performed at the age of 16 years. No ragged-red fibers were observed with Gomori Trichrome. The cytochrome oxidase was normal and the succinic dehydrogenase showed thin darkly cytoplasmic rim of mitochondria in a minority of muscle fibers, against the diagnosis of mitochondrial cytopathy. CIII of the muscular mitochondrial chain was normal. The PAS

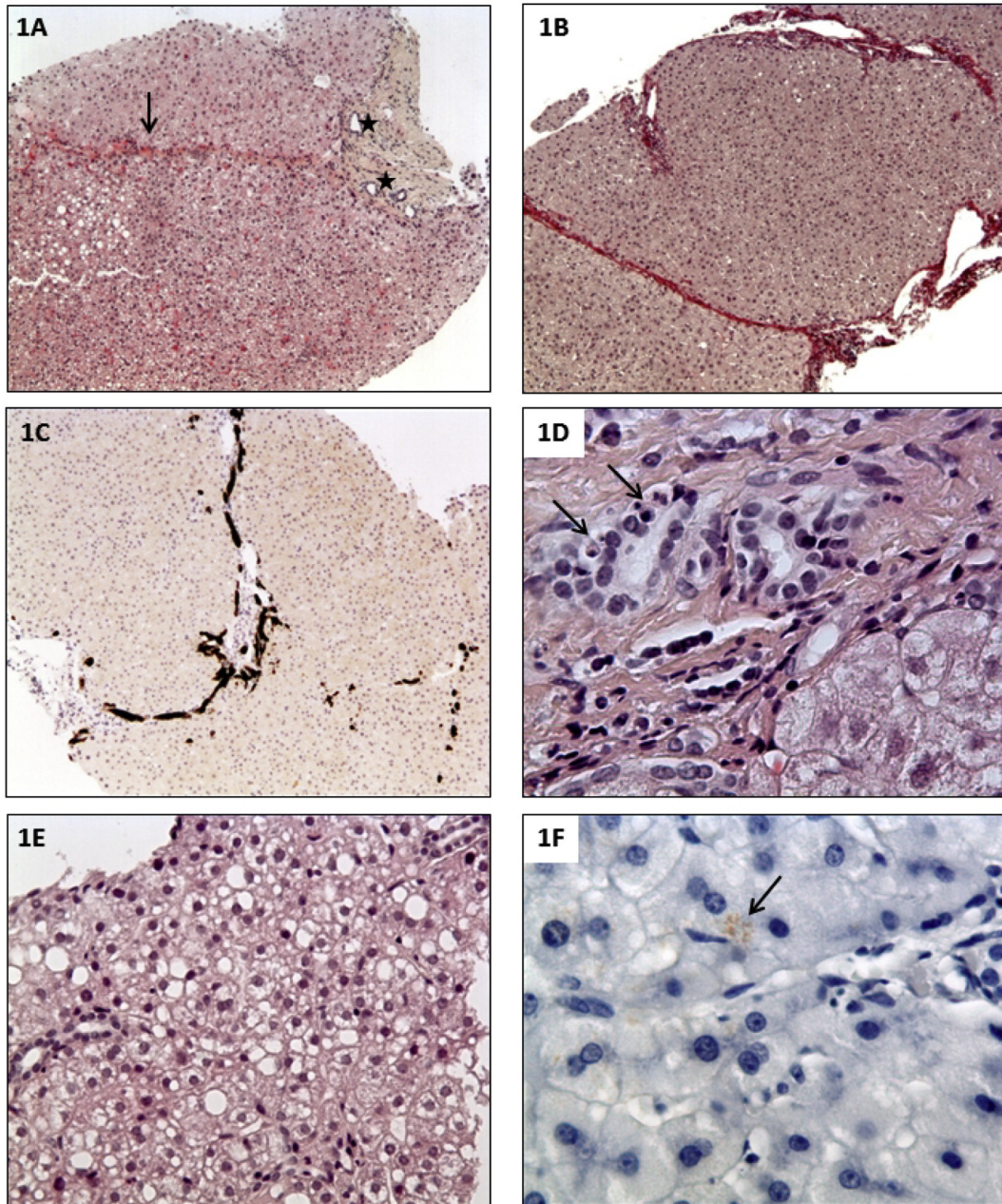
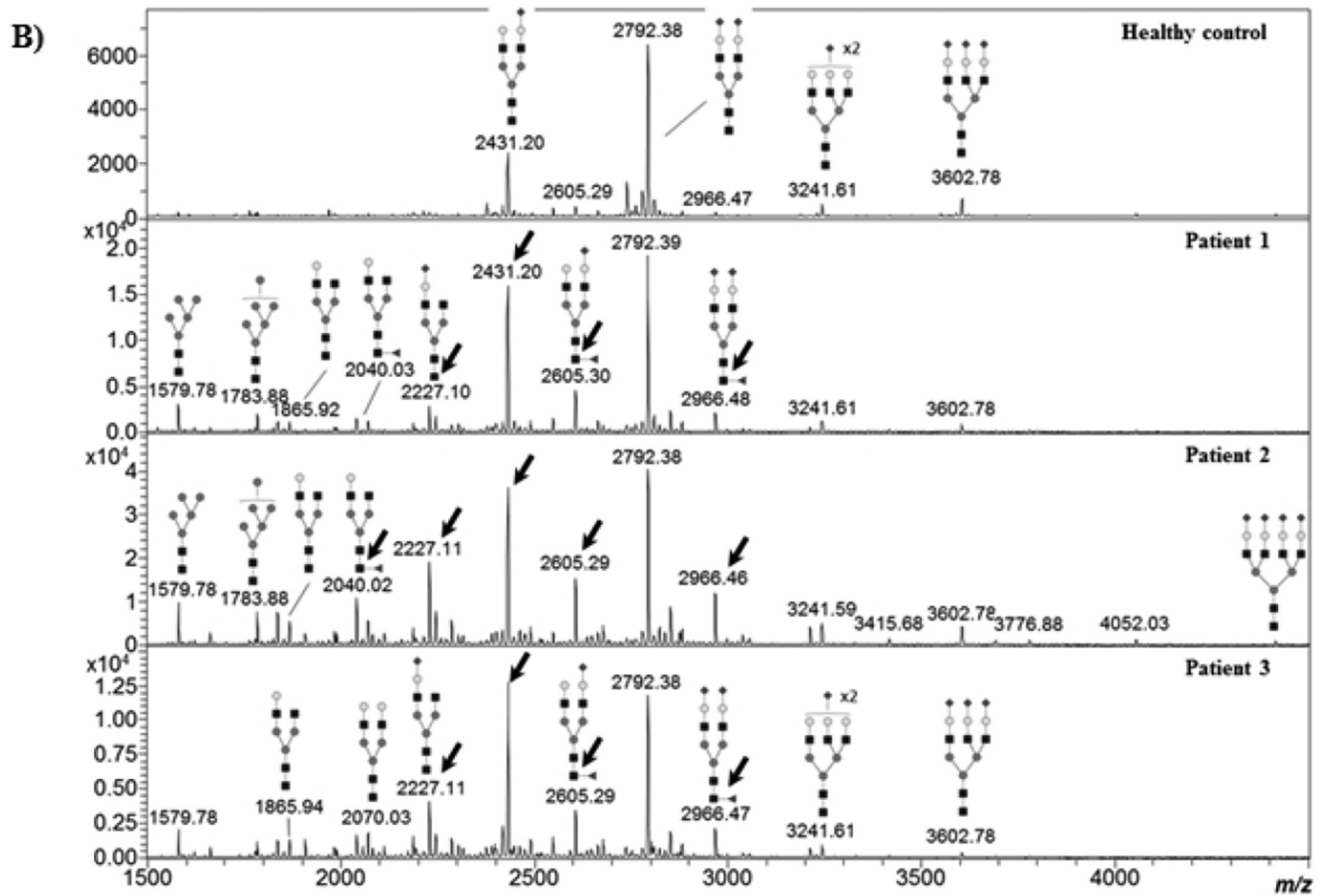
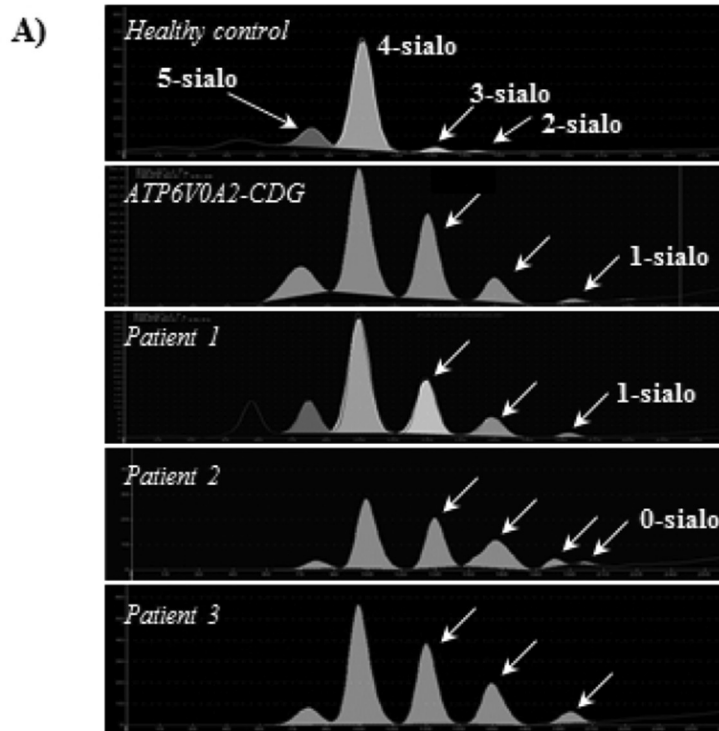


Fig. 1. 1A. Slender portal-to-portal bridging fibrosis (arrows). Irregular sized ductular proliferation (asterisks) (HES staining). 1B. Slender portal-to-portal bridging fibrosis, METAVIR F3 (Picro-Sirius staining). 1C. Proliferation of bile ductules highlighted with cytokeratin 7 staining. 1D. Apoptotic bodies, nuclear dystrophy of cholangiocytes (arrow). Note slight portal inflammation (HES staining). 1E. Focal macro- and micro-steatosis (HES staining). 1F. Faint cytoplasmic copper staining in isolated periportal hepatocytes (Rhodanine staining).

staining showed a normal glycogen content in the majority of muscle fibers, only scattered fibers were free of glycogen and contained alpha-amylase resistant periodic acid Schiff positive cytoplasmic inclusions. A type IV glycogen storage disease was suspected but ruled out after negative molecular analysis. Lastly, exome sequencing was performed and identified compound heterozygous mutation in *CCDC115* gene. Supplementary explorations at the age of 18 years confirmed persistent hypercholesterolemia and showed disturbed copper metabolism. Ceruloplasmin concentration was low (0.09 g/L; N = 0.2–0.5 g/L), REC was increased (18%; N = 3.0–8.1%) while serum copper (4.16 $\mu\text{mol/L}$) and exchangeable copper (0.75 $\mu\text{mol/L}$) were normal.

2.2. Glycosylation study

Mainly because of the unexplained liver involvements, a CDG screening and additional glycosylation studies were performed separately in both patients' sera and showed very similar glycosylation defects. Capillary electrophoresis of serum transferrin showed a CDG-II pattern (Fig. 2A) which was in agreement with the MALDI-TOF MS profiles of serum N-glycans, indicating essentially accumulation of (i), partially sialylated biantennary N-glycans (m/z 2605.3 and 2431.2) and of (ii), N-glycans lacking both sialic acid and galactose residues (m/z 2227.1 and 2040.0). Also, core fucosylation seemed slightly increased (m/z 2040.0, 2605.3 and 2966.5) (Fig. 2B). Two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF MS of mucin core1 O-glycosylated apolipoprotein C-III also showed O-glycans sialylation defects with a decrease



(caption on next page)

Fig. 2. Glycosylation studies 2A. Transferrin glycoforms profiles: Serum transferrin capillary electrophoresis patterns of Pt1 and Pt2 (lower profiles) by comparison with control and ATP6V0A2-CDG (upper profiles). Similarly to ATP6V0A2-CDG, it can be observed in patients, typical CDG-II patterns showing decreased level of tetra-sialotransferrin (4-sialo) coupled to increased levels of hyposialylated glycoforms (0- to 3-sialo). 2B. MALDI-TOF MS of N-glycans: When compared with control (upper profile), MALDI-TOF MS of serum N-glycans of patients (lower profiles) showed relative accumulation (arrows) of partially sialylated biantennary N-glycans (m/z 2605.3 and 2431.2) and of N-glycans lacking both sialic acid and galactose residues (m/z 2227.1 and 2040.0). Also, core fucosylation seemed slightly increased (m/z 2040.0, 2605.3 and 2966.5).

of the bi-sialylated glycoform percentages (Supplementary files).

2.3. Molecular study

Based on presented phenotypes associated to typical N- and O-glycosylation abnormalities, CCDC115 and TMEM199 encoding gene were sequenced in the 3 individuals. For Pt1, two mutations were found at heterozygous state in exon 1 of *CCDC115* gene: one missense mutation c.92T > C p.Leu31Ser (rs751325113), already described in CCDC115-CDG patients [3], and a new nonsense mutation c.19C > T p.Arg7* (rs374624586). Pt2 had two missense mutations in exon 1 of *CCDC115* gene at heterozygous state, the already described c.92T > C p.Leu31Ser and a new mutation c.38T > C p.Leu13Pro predicted as being pathogenic by Polyphen2 software package. Pt3 shared exactly the same mutations than Pt1. All mutations were found < 0.01% in ExAc database and were inherited each from one parent. Taken together, these results asserted CCDC115-CDG inherited in an autosomal recessive manner for the 3 patients. All mutations identified in this study concerned the first exon encoding for the first predicted coiled-coil domain of the protein. Lastly, no mutations were found in TMEM199 encoding gene for the 3 patients (not shown).

3. Discussion

CCDC115-CDG was recently discovered by Jansen et al. reporting 8 affected individuals from 5 families [3]. Besides CDG related N- and O-glycans abnormalities, key features of this new disease were described as psychomotor disability (PMD) and marked HSM associated with elevated ATs and ALP and hypercholesterolemia. Furthermore, basic copper metabolism parameters were assessed in 5/8 patients showing decreased serum ceruloplasmin and copper. We described here 3 additional unrelated CCDC115-CDG cases. Because of multiple clinical overlaps with various other inherited liver diseases, screening and definitive diagnosis were difficult and sometimes (except for Pt2) greatly delayed. Indeed, Pt1 presented at birth with neonatal cholestasis, hypotonia and major HSM. When associated to marked neurological symptoms and lipids abnormalities, the main diagnosis hypothesis was NPC disease. But it was biochemically (normal Filipin test) and genetically ruled out and no other diseases, including WD, could be asserted until CDG was identified at 16 years old. Pt2 presented at 20 years old without any medical history and showing isolated elevated ATs. Despite the absence of neurological symptoms and atypical lipid and CK abnormalities, WD was suspected based mainly on hypoceruloplasminemia. But WD could not be asserted (no identified ATP7B mutations, D-penicillamin inefficiency, normal 24 h-urinary copper excretion) until CDG diagnosis at 22 years old. Pt3 presented at birth with severe cholestasis, HSM and axial hypotonia, which first suggested NPC disease. Since the latter was genetically excluded, liver and neurological phenotypes, when associated to liver CIII deficiency, secondly evoked possible mitochondriopathy. But corresponding genetic study i.e., the sequencing of a panel of 215 mitochondria-related genes was unsuccessful. With time, associated moderate mental retardation and mild muscular involvement led to suspect atypical type IV glycogenesis that was also discarded. Finally, the diagnosis of CDG was made at 17 years old.

The neurological phenotype of these 3 new patients, ranging from absence of symptoms (Pt2) to PMD and hypotonia (Pt1 and Pt3), expanded the clinical spectrum of CCDC115-CDG, overlapping it with

TMEM199-CDG (showing mild neurological symptoms) [4]. The liver phenotype appeared to be rather homogeneous associating severe fibrosis for all patients with HSM for 2 among 3. Histologically, we observed in all cases portal-to-portal bridging fibrosis with cirrhosis in one case. At the beginning of the disease, some portal inflammation, some decrease of the number of interlobular ducts and a bile ductular proliferation were present in all cases. Central veins and microcirculation were normal and steatosis was present in all cases, mainly focal (5 to 10%). Copper rhodanine staining showed slight hepatocyte accumulation in periportal area for one case. Mild elevated liver-copper concentration was observed in another case. Despite clinical signs of cirrhosis for Pt1 and Pt3, they did not develop signs of severe portal hypertension with over 15 years of follow-up. Furthermore, Pt1 had a liver biopsy at 16 years old, which did not evidence major fibrosis progression. By contrast, 3 among the first patients described by Jansen et al. [3] developed severe liver failure indicating that hepatic involvement could also be variable in CCDC115-CDG. Concerning biological data, we retrieved in all patients: hypercholesterolemia, elevated ATs and PAL and hypoceruloplasminemia, as previously described. Together with typical N- and O-glycosylation defects (i.e. hypo-galactosylation/sialylation of N-glycans and hyposialylation of apoC-III), these biochemical abnormalities appeared to be highly conserved among all CCDC115-CDG patients. The respective involvements of liver cirrhosis and CDG in the genesis of the majority of these biological defects could be questioned and will need deeper evaluation. Lastly, elevated CK observed in some patients, could suggest possible associated muscular involvement.

CCDC115 protein has been shown to be mainly located in the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) in HeLa cells and immortalized human hepatocytes and was proposed to participate (with TMEM199) in Golgi vacuolar type H⁺ ATPase (V-ATPase) proton pump assembly [3]. Similar roles at the lysosomal-endosomal system have also been described, in agreement with CCDC115 localization in mouse [6]. Furthermore, whether this protein is implied in V-ATPase-related trafficking and/or pH regulation functions needs additional investigations.

The main assumption regarding the pathogenesis of hepatopathies (i.e. steatosis and fibrosis leading to cirrhosis) in CCDC115-CDG patients is a defect in the liver autophagy process. Indeed, in the field of CDG, it has been recently reported that genetic deficiency in ATP6AP2 protein, another subunit of the V-ATPase complex, was notably associated with very similar liver phenotypes coupled to marked autophagic dysregulation [7]. Since this latter was shown to be tightly associated with defects in lysosomes acidification and mTor signaling, a similar process could also be highly suspected in CCDC115 deficiency. Furthermore, defective autophagy has been described as promoting steatosis in non-alcoholic fatty liver disease [8] and under high fat diet [9]. Also, a few data suggested that defects in autophagy could contribute to liver fibrosis (in balance with the inhibition of the “activation” process of hepatic stellate cells) by triggering apoptosis of hepatocytes and by reducing anti-inflammatory properties of macrophages [10,11]. In this context, it should be interesting to assess the liver autophagic status of misleading NPC, WD and mitochondriopathies by comparison with CCDC115-CDG and other related diseases including TMEM199-CDG.

Concerning glycosylation and other main biological abnormalities, we propose (as schematized in Fig. 3) that CCDC115 mutations globally affect GA and lysosomal-endosomal homeostasis leading to defects in N- and O-glycosylation as well as in cholesterol and copper intracellular

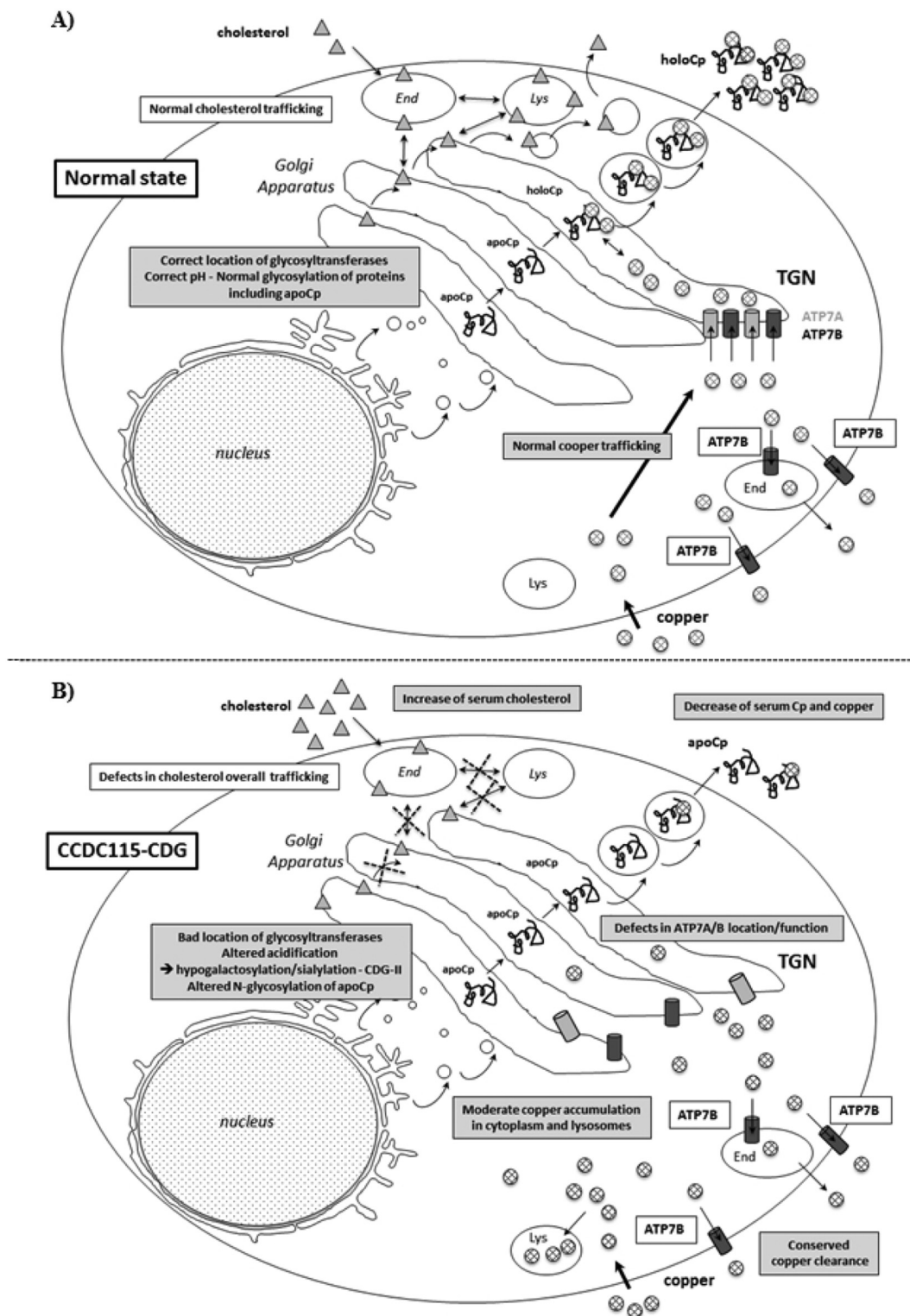


Fig. 3. Suggestion of an integrative view of CCDC115-CDG related GA defects affecting glycosylation of proteins, cholesterol trafficking (triangles) and copper circulation (grid circles) into hepatocytes. A: in normal state; B: in CCDC115-CDG. “Lys” = lysosomes; “End” = endosomes; “TGN” = trans-Golgi Network; “apoCp” = apoceruloplasmin; “HoloCp” = holoceruloplasmin.

trafficking. More precisely, as described in ATP6V0A2-CDG [12], CCDC115-CDG associated glycosylation defects could be related to disturbed Golgi trafficking and/or acidification impacting location and function of glycosyltransferases and leading to N- and O-glycans abnormalities (hypo-galactosylation/sialylation of N-glycans and disturbed sialylation of mucin core1 O-glycans). Concerning

hypercholesterolemia, although a Golgi trafficking defect could also be evoked, it has been shown that disturbed endosomal/lysosomal acidification indirectly impairs normal trafficking of cholesterol [13], which could lead to its higher serum concentration in CCDC115-CDG. Furthermore, since Bis(Monoacylglycerol)-Phosphate membranous level has been shown to greatly impact lysosomal cholesterol homeostasis in

NPC [14], its observed increase in the liver of Pt1 (not measured in other patients), appears as a possible interesting clue for the better understanding of CCDC115-CDG related cholesterol metabolism defects.

Concerning copper, once imported in the cytoplasm of hepatocytes, it normally enters the trans Golgi network (TGN) thanks to ATP7A and ATP7B, two membranous transporters with ATPase activity. In the TGN, copper associates with the glycoprotein “apoceruloplasmin” forming “holoceruloplasmin”, which is then delivered into the blood. Additionally, in response to rising copper levels in the cytosol, copper can associate with ATP7B redistributed to plasma membrane or into endosomal-like vesicles, before being secreted/excreted [15] (Fig. 3A). In CCDC115-CDG (Fig. 3B), disturbed GA trafficking probably induced bad location of ATP7B and ATP7A as well as altered N-glycosylation of apoceruloplasmin. Furthermore, ATPase enzymatic activities of ATP7A/B could be deficient due to impaired TGN and endosomal acidification. Under these pathological conditions, copper bile excretion could be disturbed leading to its tendency to accumulate in cytosol and lysosomes of hepatocytes. Nevertheless, since liver copper accumulation appeared relatively moderate in our patients (as determined by liver histology or direct measurement), it can be speculated that ATP7B relocation at the plasma membrane is probably poorly affected allowing effective copper cellular clearance.

4. Conclusions

As corroborated in this work, genetic deficiencies in CCDC115 protein globally affect GA homeostasis impacting both N-glycosylation, O-glycosylation, intracellular cholesterol trafficking and copper metabolism. These “Golgilation” defects seem to be systematically associated with severe liver involvement in a misleading ambience of other inherited liver diseases such as NPC disease, Wilson disease and mitochondriopathies. Thus, we strongly recommend CDG screening in all patients with unexplained liver disease associated with hypercholesterolemia and disturbed copper metabolism.

5. Materials and methods

5.1. Capillary electrophoresis of transferrin

Separation of serum transferrin glycoforms was carried out as previously described [16] using capillary zone electrophoresis method (Sebia Capillarys® CDT).

5.2. Mass spectrometry-based profiling of serum N-glycans

Sample processing for N-glycomic profiling of the serum samples was carried out essentially as described previously [17]. The serum samples (5 µL) were diluted in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 10 mM dithiothreitol solutions, and then heated at 95 °C for 5 min. Peptide N-glycosidase F digestion of the resulting solutions was then performed overnight at 37 °C (Roche Diagnostics, Meylan, France). After sample acidification, proteins were precipitated using ice-cold ethanol. Released N-glycans were purified using porous graphitic carbon solid phase extraction cartridges (Thermo Scientific, les Ulis, France). The native N-glycans were subsequently permethylated and purified on a C18 spin-column (Thermo Scientific) before analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

The dried permethylated samples were resuspended in 10 µL of a 50% methanol solution. 0.5 µL of the sample was then spotted on the MALDI target and thoroughly mixed with 0.5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid solution (10 mg/mL in 50% methanol containing 10 mM sodium acetate). Glycan analyses were performed on an UltrafleXtreme instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operating in the reflectron positive ion mode. Manual assignment of glycan sequences was

done from MS and MS/MS data on the basis of previously identified structures [17] and with the help of GlycoWorkBench software [18].

5.3. Two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF MS of apolipoprotein C-III

Two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF MS of mucin Core1 O-glycosylated apolipoprotein C-III were conducted as previously described [19].

Funding

This work was supported by grant ANR-15RAR3-0004-06 under the frame of E-RARE-3, the ERA-Net for Research on Rare Diseases; it was also supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the ERA-NET cofund action N° 643578. The authors confirm independence from the sponsors; the content of the article has not been influenced by the sponsors.

A competing interest statement

No competing interest.

Patient consent statement

Informed consent was obtained for the 3 presented patients.

Details of ethics approval

The work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans (Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals).

Details of the contributions of individual authors

MG: clinical evaluation of Pt1; wrote the article with AB.
 AP: clinical evaluation of Pt2; specialized in WD.
 MF: significant participation in the design of the study, histology collection, drafting and critical revision of the article.
 FL: clinical evaluation of Pt1.
 DD: clinical evaluation of Pt3.
 MR: genetics of Pt3
 FF: mass spectrometry of N-glycans; supervision of mass spectrometry studies.
 SC: mass spectrometry of N-glycans.
 CR: mass spectrometry of apoC-III.
 EC: biological evaluation of Pt2.
 JS: liver histology of Pt2.
 LBN: clinical evaluation of Pt1.
 FW: clinical evaluation of Pt2; specialized in WD.
 TD: CDG screening.
 SVB: genes sequencing.
 NS: CDG screening; supervision of the work related to glycosylation.
 LA: clinical evaluation of Pt2.
 PDL: clinical evaluation of Pt1; supervision of the work related to clinic.
 AB: CDG screening; wrote the article with MG. supervision of the work related to glycosylation. And a special word of thanks to Antoine Legendre for his precious help in the elaboration of Fig. 3.

Appendix A. Supplementary data

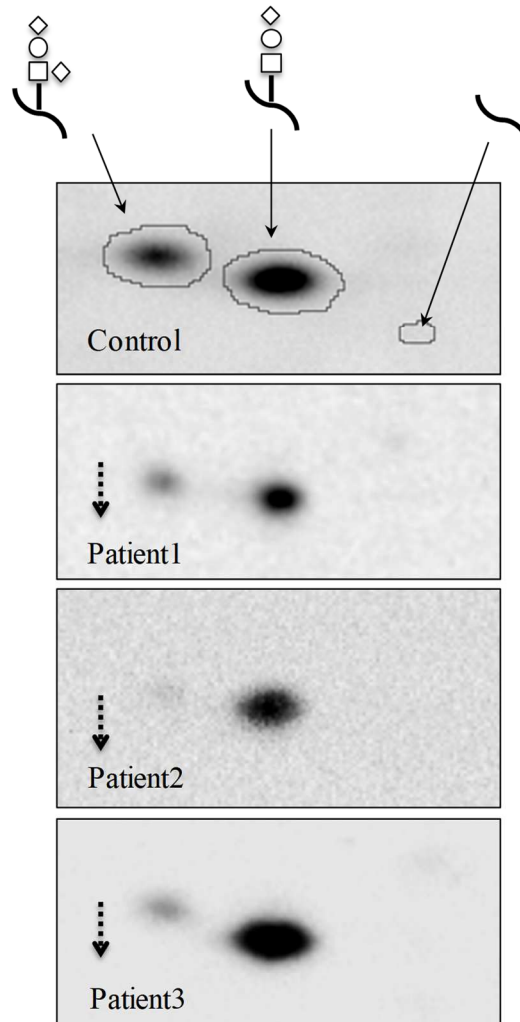
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.05.002>.

References

- [1] H.H. Freeze, Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge, *J. Biol. Chem.* 288 (10) (2013) 6936–6945.
- [2] C. Rosnoblet, et al., Glycosylation disorders of membrane trafficking, *Glycoconj. J.* 30 (1) (2013) 23–31.
- [3] J.C. Jansen, et al., CCDC115 deficiency causes a disorder of golgi homeostasis with abnormal protein glycosylation, *Am. J. Hum. Genet.* 98 (2) (2016) 310–321.
- [4] J.C. Jansen, et al., TMEM199 deficiency is a disorder of golgi homeostasis characterized by elevated aminotransferases, alkaline phosphatase, and cholesterol and abnormal glycosylation, *Am. J. Hum. Genet.* 98 (2) (2016) 322–330.
- [5] R. Fawaz, et al., Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: joint recommendations of the north American Society for Pediatric Gastroenterology, hepatology, and nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, hepatology, and nutrition, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 64 (1) (2017) 154–168.
- [6] A.L. Miles, et al., The vacuolar-ATPase complex and assembly factors, TMEM199 and CCDC115, control HIF1 α prolyl hydroxylation by regulating cellular iron levels, *Elife* 6 (2017).
- [7] M.A. Rujano, et al., Mutations in the X-linked ATP6AP2 cause a glycosylation disorder with autophagic defects, *J. Exp. Med.* 214 (12) (2017) 3707–3729.
- [8] R. Singh, et al., Autophagy regulates lipid metabolism, *Nature* 458 (7242) (2009) 1131–1135.
- [9] C.W. Lin, et al., Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice, *J. Hepatol.* 58 (5) (2013) 993–999.
- [10] M.J. Czaja, et al., Functions of autophagy in normal and diseased liver, *Autophagy* 9 (8) (2013) 1131–1158.
- [11] J. Lodder, et al., Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice, *Autophagy* 11 (8) (2015) 1280–1292.
- [12] B. Fischer, et al., Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa, *Hum. Genet.* 131 (11) (2012) 1761–1773.
- [13] C. Staudt, E. Puissant, M. Boonen, Subcellular trafficking of mammalian lysosomal proteins: an extended view, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (1) (2016).
- [14] S.R. Cheruku, et al., Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport, *J. Biol. Chem.* 281 (42) (2006) 31594–31604.
- [15] L. Banci, et al., Molecular recognition in copper trafficking, *Nat. Prod. Rep.* 27 (5) (2010) 695–710.
- [16] F. Parente, et al., A new capillary zone electrophoresis method for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDG), *Clin. Chim. Acta* 411 (1–2) (2010) 64–66.
- [17] A. Goyallon, et al., Evaluation of a combined glycomics and glycoproteomics approach for studying the major glycoproteins present in biofluids: application to cerebrospinal fluid, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (6) (2015) 461–473.
- [18] A. Ceroni, et al., GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans, *J. Proteome Res.* 7 (4) (2008) 1650–1659.
- [19] S. Yen-Nicolay, et al., MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation. Comparison with two-dimensional electrophoresis, *Proteomics Clin. Appl.* 9 (7–8) (2015) 787–793.

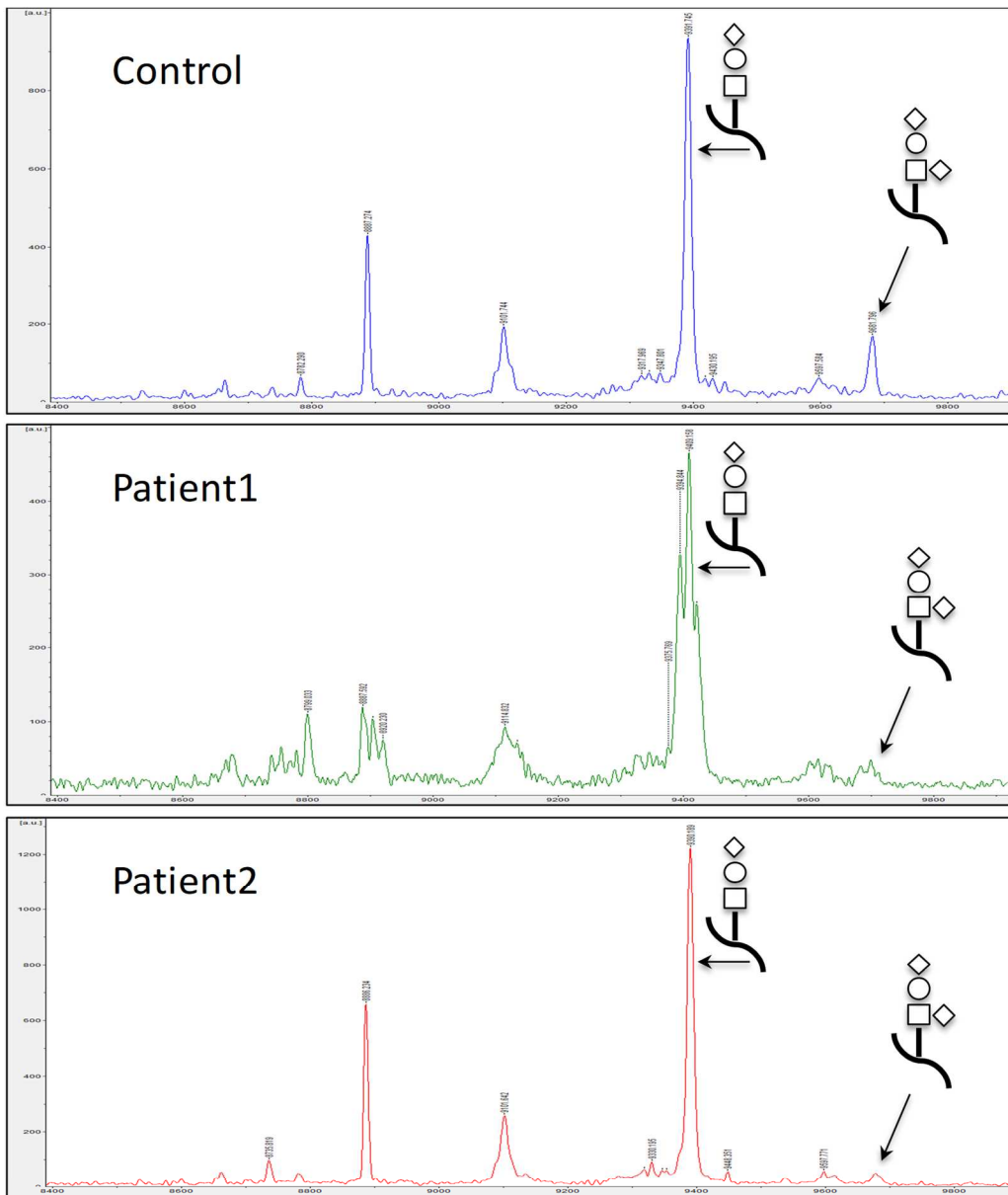
Supporting Information

CCDC115-CDG: A new rare and misleading inherited cause of liver disease



Supplementary File 1:

Two-dimensional electrophoresis (2-DE) of serum mucin core1 O-glycosylated apolipoprotein C-III (apoC-III). By comparison with control (upper profile), the 3 presented patients harbored a marked decrease in the level of the bi-sialylated glycoform of apoC-III.



Supplementary file 2:

MALDI-TOF MS analysis of serum mucin core1 O-glycosylated apolipoprotein C-III (apoC-III). Previous 2-DE results were corroborated in Pt1 and Pt2 (not done in Pt3) with MALDI-TOF MS spectra showing a decrease in the level of the bi-sialylated glycoform of apoC-III.

Annexe 4

Article : A. Bruneel, S. Cholet, V. Drouin-Garraud, M. Jacquemont, A. Cano, A. Mégarbané, C. Ruel, D. Cheillan, T. Dupré, S. Vuillaumier-Barrot, N. Seta, F. Fenaille: *Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric and gene sequencing techniques for the screening and characterization of congenital disorders of glycosylation*. Electrophoresis (2018) DOI: 10.1002/elps.201800021.

Arnaud Bruneel^{1,2} 
 Sophie Cholet³
 Valérie Drouin-Garraud⁴
 Marie-Line Jacquemont⁵
 Aline Cano⁶
 André Mégarbané⁷
 Coralie Ruel^{3,8}
 David Cheillan⁹
 Thierry Dupré¹
 Sandrine Vuillaumier-Barrot¹
 Nathalie Seta^{1,10}
 François Fenaille^{3*}

¹AP-HP, Biochimie Métabolique et Cellulaire, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

Received January 15, 2018
 Revised May 9, 2018
 Accepted May 25, 2018

Research Article

Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are rare autosomal genetic diseases affecting the glycosylation of proteins and lipids. Since CDG-related clinical symptoms are classically extremely variable and nonspecific, a combination of electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing techniques is often mandatory for obtaining a definitive CDG diagnosis, as well as identifying causative gene mutations and deciphering the underlying biochemical mechanisms. Here, we illustrate the potential of integrating data from capillary electrophoresis of transferrin, two-dimensional electrophoresis of *N*- and *O*-glycoproteins, mass spectrometry analyses of total serum *N*-linked glycans and mucin core1 *O*-glycosylated apolipoprotein C-III for the determination of various culprit CDG gene mutations. “Step-by-step” diagnosis pathways of four particular and new CDG cases, including MGAT2-CDG, ATP6V0A2-CDG, SLC35A2-CDG, and SLC35A3-CDG, are described as illustrative examples.

Keywords:

2DE / congenital disorders of glycosylation / MS / SLC35A2-CDG / SLC35A3-CDG
 DOI 10.1002/elps.201800021



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

1 Introduction

Glycosylation is a complex posttranslational modification of proteins and lipids taking place within the secretory pathway in endoplasmic reticulum (ER) and/or Golgi apparatus (GA). Protein glycosylation can be *N*- or *O*-linked depending

Correspondence: Dr. Arnaud Bruneel, AP-HP, Biochimie Métabolique et Cellulaire, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, F-75018 Paris, France

Fax: +33-1-40-25-88-21

E-mail: arnaud.bruneel@aphp.fr

Abbreviations: AAT, α -antitrypsin; AGP, acid α 1-glycoprotein; apoC-III, apolipoprotein C-III; CDG, congenital disorders of glycosylation; ER, endoplasmic reticulum; GA, golgi apparatus; Hpt, haptoglobin; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MGAT2, mannosyl glycoprotein *N*-acetylglucosaminyl transferase II; Mw, molecular weight; SA, sialic acid; TFA, trifluoroacetic acid; Trf, transferrin; Trf IEF, isoelectric focusing of serum transferrin; UDP-GlcNAc, Uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine; WES, whole exome sequencing

on the attachment site to the protein backbone. *N*-linked glycans are attached to the amide group of an asparagine residue within an NX-S/T motif (X being any amino acid except proline), while *O*-linked glycans are commonly linked to the hydroxyl group of serine or threonine residues [1]. Congenital disorders of glycosylation (CDGs) are rare autosomal recessive inherited diseases sharing diverse and variable multiorgan clinical symptoms [2]. CDGs with abnormal protein *N*-glycosylation are classically sub-grouped as type I (CDG-I) or type II (CDG-II) according to the affected biosynthetic steps.

In CDG-I, the defect alters the lipid-linked oligosaccharide synthesis or its transfer to protein backbone in the ER leading to under-occupancy of *N*-glycosylation sites (but with normally structured glycans). In CDG-II, the defect affects the maturation of protein-linked oligosaccharide in the ER or in

*Additional corresponding author: Dr. François Fenaille
 E-mail: francois.fenaille@cea.fr

Color Online: See the article online to view Figs. 3–5 in color.

the GA leading to the inappropriate production of *N*-glycans intermediate motifs [3].

Since CDGs are accompanied by significant changes in glycoproteins electric charge and/or molecular weight (Mw), various electrophoresis methods can be used for the routine screening of these diseases. Isoelectric focusing of serum transferrin (Trf IEF) has been historically employed to detect CDGs [4]. Indeed, using either gel-based or CE methods, Trf IEF assays are still considered as the methods of choice for CDG screening. By separating Trf glycoforms according to the number of negatively charged terminal sialic acid (SA) residues, it efficiently evidences and distinguishes tetra-, bi-, and a-sialo Trf in CDG-I (two, one, or zero bi-antennary mature *N*-glycan chains) and tetra-, tri-, bi-, mono-, and a-sialo Trf in CDG-II (two bi-antennary chains lacking zero to two terminal SA) [4, 5]. SDS-PAGE followed by Western blot using specific antibodies targeting various serum *N*-glycoproteins can also be successfully used to detect the loss of entire *N*-glycan chains linked to CDG-I but does not allow to detect the subtle Mw variations associated with the majority of CDG-II [6]. Besides these two techniques, we have recently reported that 2DE, by coupling glycoform separations according to both their charge and Mw, can represent a particularly relevant tool for the detection of all types of CDGs [7]. Furthermore, 2DE can be used to screen for *O*-glycosylation defects by monitoring the mucin core1 *O*-glycoprotein apolipoprotein C-III (apoC-III), thus enabling the detection and characterization of CDG-II related to protein defects impacting overall GA homeostasis [8].

Once evidenced using electrophoresis methods, CDG-I related enzymatic defects are now commonly determined using targeted genes or whole exome sequencing (WES) approaches [9]. In the case of CDG-II-characteristic electrophoresis profile, since potentially involved molecular defects remain numerous and poorly understood, MS techniques applied to enzymatically removed *N*-glycans or to entire apoC-III constitute valuable tools for going deeper into glycan structural elucidation [8, 10]. The precise characterization of abnormal *N*- and *O*-glycan structures can provide precious clues for the delineation of related molecular deficiencies and further identification of ‘culprit’ gene mutations. Also, these glycomic tools can be very useful to corroborate suspected CDG-II causative mutations issued from targeted genes sequencing panels or WES data [9].

As discussed above, CDG are often difficult to clinically and accurately diagnose because they can affect many organs and functions, and lack symptom uniformity. In this study, we illustrate the value and the necessity of combining electrophoresis, MS based, and gene sequencing approaches for obtaining a definitive CDG diagnosis and getting deeper insight into the underlying biochemical mechanisms of type-II CDGs. This is exemplified in different manners using four distinct but representative and new CDG-II patients intentionally chosen including MGAT2-CDG, ATP6V0A2-CDG, SLC35A2-CDG, and SLC35A3-CDG.

2 Materials and methods

2.1 Patient's samples

The four CDG patient serum samples analyzed in this work were sent to our laboratory for CDG screening (Patients 1 and 2) or for targeted genes sequencing/WES data validation (Patients 3 and 4). All results were compared to those from non-CDG patients (‘controls’).

2.2 CDG screening electrophoresis methods

SDS-PAGE Western-blot analyses of three serum glycoproteins, i.e., transferrin (Trf), haptoglobin (Hpt), and acid α 1-glycoprotein (AGP), were conducted as previously described [6]. Capillary electrophoresis based separation of serum transferrin glycoforms was carried out as previously described [11] using CZE method (Sebia Capillarys[®] CDT). 2DE of serum *N*-glycoproteins, i.e., α -antitrypsin (AAT), Trf, and Hpt, and of mucin core1 *O*-glycosylated apoC-III, were conducted as described in [7] and [8], respectively.

2.3 MS-based profiling of serum *N*-glycans

Sample processing for *N*-glycomic profiling of the serum samples was carried out essentially as described previously [12]. The samples (5 μ L) were diluted in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 10 mM dithiothreitol solutions, and then heated at 95°C for 5 min. *N*-glycosidase F digestion was then performed overnight at 37°C (Roche Diagnostics, Meylan, France). After acidification, proteins were precipitated using ice-cold ethanol. Released *N*-glycans were purified using porous graphitic carbon solid phase extraction cartridges (Thermo Scientific, les Ulis, France). The native *N*-glycans were subsequently permethylated and purified on a C18 spin-column (Thermo Scientific) before analysis by MALDI-TOF-MS. The dried permethylated samples were resuspended in 10 μ L of a 50% methanol solution. A total of 0.5 μ L suspension was then spotted on the MALDI target and thoroughly mixed with 0.5 μ L of 2,5-dihydroxybenzoic acid solution (10 mg/mL in 50% methanol containing 10 mM sodium acetate). Glycan analyses were performed on an UltrafleXtreme instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operating in the reflectron positive ion mode. Manual assignment of glycan sequences was done from MS and MS/MS data on the basis of previously identified structures [12] and with the help of GlycoWorkBench software [13].

2.4 MALDI-TOF analysis of mucin core1 *O*-glycoforms of apoC-III

MALDI-TOF-MS analysis of intact apoC-III was performed essentially as described before [8, 14]. Briefly, 1 μ L of serum

was diluted in 15 μL of water/acetonitrile (95:5) containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), allowed to stand 1 h at room temperature and then purified/desalted by ZipTip C4 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). ApoC-III was eluted with 5 μL of 70% acetonitrile containing 0.1% TFA, 0.5 μL of this solution was then thoroughly mixed on-target with 0.5 μL of a saturated solution of sinapinic acid in water/acetonitrile (50:50) containing 0.1% TFA. MS analyses were performed on a Bruker Ultraflex extreme MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam-II laser. Mass spectra of intact apoC-III were collected at 2 kHz laser repetition rate in the positive linear ion mode, using a 20 kV acceleration voltage and an extraction delay of 250 ns. All spectra were obtained by accumulating ~ 1000 laser shots over the 5000–20000 m/z range.

2.5 Molecular studies

Direct Sanger sequencing of MGAT2 and ATP6V0A2 genes was done respectively for Patient 1 and Patient 2 since electrophoretic and MS profiles, as well as clinical data (Patient 2), were pointing to these genes. For Patient 3, targeted sequencing was performed on MiSeq sequencer (Illumina) with a custom kit of 17 CDG-II genes (Agilent). For Patient 4, WES was performed on NextSeq (Illumina) with a Med-Exome kit (Nimblegen) and analyzed with Polyweb Imagine (www.polyweb.fr). Filtering of WES data was done as follows: homozygote variants (consanguineous parents); <1% frequency; supposed recessive mode of inheritance; variant not known in dbSNP; and deleterious as determined with SIFT and Polyphen. Sanger sequencing for all index cases and their parents confirmed all identified causative variants.

3 Results

3.1 Brief clinical description of CDG patients

The CDG patients were three girls (Patient 1–3) and one boy (Patient 4). Only Patient 1 was issued from consanguineous parents. Ages at diagnosis ranged from 7 months to 14 years old. Since “all is clinically possible in CDG”, the majority of reported clinical symptoms were rather unspecific, including severe to moderate mental retardation, dysmorphic features, failure to thrive (all patients), microcephaly (Patients 1, 2 and 4), cardiac malformations (Patients 2 and 3), encephalopathy (Patients 2 and 4), hyperlaxity (Patients 2 and 3), and epilepsy (Patient 4). Some more specific additional clinical symptoms, such as large anterior fontanel and *Cutis laxa* (skin anomaly with redundant skinfolds and abnormal elasticity) were reported in Patient 2 (Supporting Information Fig. 1).

3.2 SDS-PAGE Western-blot of *N*-glycoproteins and transferrin CE patterns

While 1D SDS-PAGE Western-blot analysis could not distinguish Patients 2–4 from the healthy subject (Supporting Information Fig. 2), profiles of Trf, Hpt, and AGP from Patient 1 harbored markedly lower bands in the absence of expected ones (Fig. 1A). Since the M_w differences could be easily detected by a rather poorly resolving method, these results strongly suggested an unusual complete deficiency in the early steps of the enzymatic maturation of *N*-glycans, after the transfer of the oligosaccharide chain. Also, a CDG-I was rapidly excluded since profiles did not evoke absence of entire *N*-glycan chains that would typically result in additional lower mass bands co-existing with the normal ones (Fig. 1A).

When mainly separated according to electric charge using CE, Trf profiles of Patients 2–4 both showed more or less elevated proportions of hyposialylated glycoforms (3-sialo to 0-sialo) highly suggestive of CDG-II (Fig. 1B). Noticeably, CE Trf profile of Patient 3 showed rather normal proportions of the 3- and 2-sialo glycoforms but discreetly elevated levels of the 1-sialo and 0-sialo glycoforms, always absent in samples from control subjects. For Patient 4, 3- and 2-sialo glycoforms percentages were clearly elevated while 1-sialo and 0-sialo glycoforms were undetectable. Due to a lack of serum sample, this analysis could unfortunately not be performed for Patient 1. In this particular case, analysis by 2DE was privileged over CE analysis of Trf.

3.3 2DE profiles of *N*- and *O*-glycoproteins

When compared to control (Fig. 2A), 2DE profile of Patient 1 showed high levels of abnormal less acidic glycoforms of markedly lower masses for all the tested serum *N*-glycoproteins (Fig. 2B), probably highlighting the presence of presumably incomplete and partially sialylated glycan structures. 2DE patterns of Patients 2–4 (Fig. 2C–E) all exhibited less acidic (i.e., less sialylated) additional glycoforms (‘cathodic shift’ but without significant M_w differences) but still coexist with important proportions of correctly glycosylated protein species. By contrast to Patient 2 and Patient 4, who showed relatively discrete abnormalities, Patient 3 profile was characterized by several additional abnormal spots (with up to five additional spots for Hpt; Fig. 2D). For Patient 4 (Fig. 2E), Hpt spots were not detectable (as a probable consequence of intravascular hemolysis) depriving us from this very sensitive 2DE biomarker of CDG [7].

Concerning apoC-III mucin core1 *O*-glycosylation, dedicated 2DE patterns (Fig. 3) showed abnormalities only for Patients 2 and 3. The apoC-III pattern of Patient 1 (Fig. 3B) could not be distinguished from the control (Fig. 3A) indicating that *O*-glycosylation was not affected in this individual. In Patient 2 (Fig. 3C), the level of the bi-sialylated glycoform (substituted with *N*-acetylgalactosamine-galactose

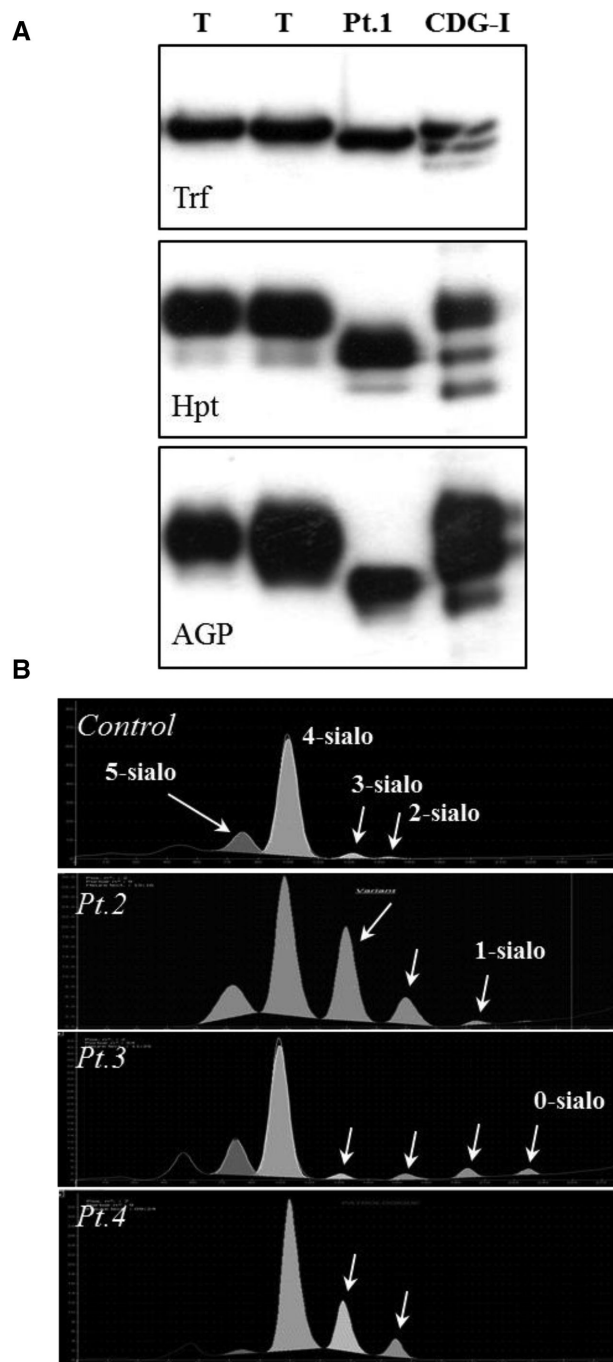


Figure 1. Western-blot of *N*-glycoproteins and CE of serum transferrin (A) SDS-PAGE Western-blot analysis of serum transferrin (Trf), haptoglobin (Hpt), and acid α 1-glycoprotein (AGP) from (left to right) two controls (T), Patient 1 and CDG-I. (B) CE serum transferrin patterns of one control, and Patients 2–4.

carrying two SA) proved severely decreased. When detected along *N*-glycans defects, such marked abnormalities tend to suggest a global disturbance in GA homeostasis. For Patient 3 (Fig. 3D), an unusual asialylated apoC-III glycoform could be detected at a rather low level (this particular species

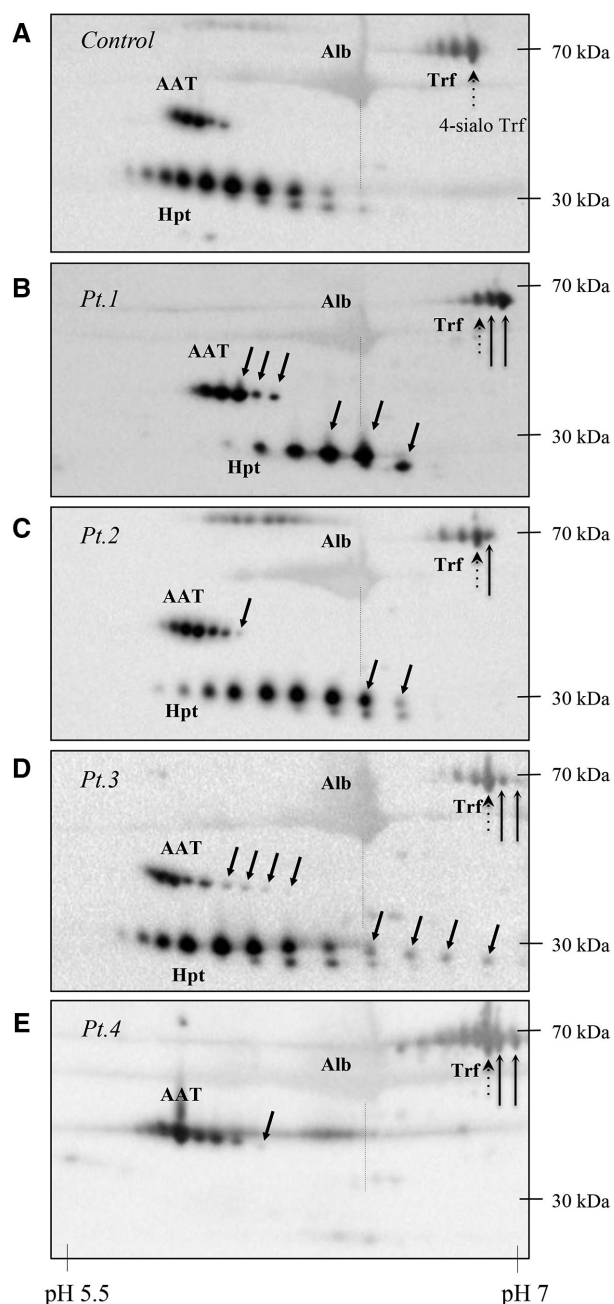


Figure 2. 2DE patterns of *N*-glycoproteins. 2DE patterns of serum α 1-antitrypsin (AAT), haptoglobin (Hpt) and transferrin (Trf) from one control (Alb) and Patients 1–4. In all patterns, non-glycosylated albumin (Alb) can be detected in the ‘background’ constituting a useful landmark (vertical dotted line) for accurate visual interpretation. Plain arrows indicate additional abnormal spots corresponding to hyposialylated glycoforms. Vertical dotted arrow indicates the tetra-sialylated (4-sialo) transferrin glycoform.

is always absent in control individuals) suggesting a partial defect in the linkage of the galactose (Gal) and/or the first SA residue. ApoC-III pattern of Patient 4 (Fig. 3E) appeared normal suggesting that only the GA-located *N*-glycans

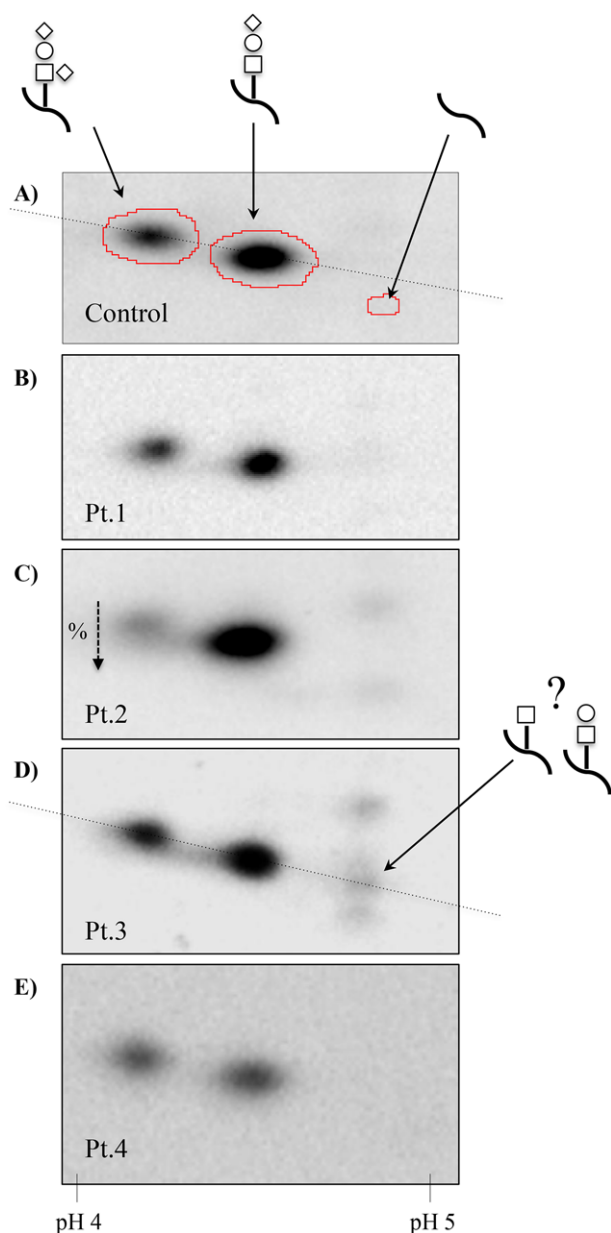


Figure 3. 2DE patterns of mucin core1 *O*-glycosylated apoC-III. 2DE patterns of serum apoC-III from one control, and Patients 1–4. In control pattern, apoC-III glycoforms structures corresponding to each spot are detailed: square, *N*-acetylgalactosamine; circle, galactose; diamond square, SA. In pattern of Patient 3, an unusual spot is indicated (arrow), probably corresponding to one between two putative schematized glycan structures. Dotted line (in control and Patient 3) is a landmark for accurate interpretation of spots corresponding to asialylated structures. Vertical dotted arrow in profile of Patient 2 schematizes the decreased percentage of di-sialylated apoC-III.

maturation pathway was affected in this individual. The same conclusions can be drawn from the MALDI-TOF analyses of apoC-III (Supporting Information Fig. 3), while no specific additional information was brought by this MS-based technique.

3.4 MS studies of serum *N*-glycans

MALDI-TOF analysis of *N*-linked glycans resulted in the detection of almost 50 distinct mass signals in the serum sample from the healthy subject (Fig. 4A), corresponding to the generally recognized glycan structures [10, 15] with bi-antennary bi-sialylated structures (m/z 2792.4) as the most abundant species accounting for ~30% of the total *N*-glycan pool. Besides, bi-antennary mono-sialylated (m/z 2431.2), and fully sialylated tri-antennary and tetra-antennary *N*-glycans (m/z 3602.8 and 4413.1, respectively) were also identified among the protruding structures (Fig. 4A). MALDI-TOF profiles of permethylated total serum *N*-glycans were obtained for the four patients and compared with that of the healthy control. The spectrum of Patient 1 (Fig. 4B) was highly characteristic with mono-antennary sialylated *N*-glycans as most abundant species (m/z 1981.9 and 2156). The presence of such highly dominant *N*-glycan structures lacking one antenna was highly evocable of deficiency in mannosyl glycoprotein *N*-acetylglucosaminyl transferase II (MGAT2). *N*-glycan profiles of Patients 2 and 3 (Fig. 4C–D) shared some similarities with accumulation of partially sialylated bi-antennary *N*-glycans (m/z 2431.2 and 2605.3), of *N*-glycans lacking both terminal SA and galactose residues (m/z 1835.9, 2040.0, and 2227.1), and of oligomannose structures (m/z 1579.8 and 1783.9). Patient 4 presented a rather atypical *N*-glycan pattern (Fig. 4E). Although this sample predominantly contained bi-antennary mono- and bi-sialylated species as in samples from healthy subjects, it showed abundant mono-antennary sialylated structure at m/z 1981.9 as well as oligomannose structures at m/z 1579.8 and 1783.9. Furthermore, the total absence of polyantennary structures at m/z 3241.8 and 3602.8, whose synthesis is initiated by linkages of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues, was also noticeable in this sample.

3.5 Molecular studies

Patient 1 carried a homozygote deletion of one base (c.693delA) on MGAT2 encoding gene in tight agreement with electrophoresis and MS studies of glycoproteins and *N*-glycans. Both consanguineous parents were heterozygote. Patient 2 carried a non-sense homozygote variant (c. p.Val44X) on ATP6V0A2 encoding gene. Both nonconsanguineous parents were heterozygote. For Patient 3, a missense heterozygote variant (c.262G > C) was found on SLC35A2 gene on one chromosome X, de novo inherited, as it was absent in parents. In this girl, normal X chromosome was determined to be totally inactivated. SLC35A2 encodes for UDP-Gal transporter, which is required for the entry of activated galactose into the GA lumen [16]. For Patient 4, WES was performed and mutations on the three following genes were filtered: SLC35A3 encoding for the golgi UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter, PTPN23 (ciliogenesis control), and TBX22 (transcription factor). Presence of a missense

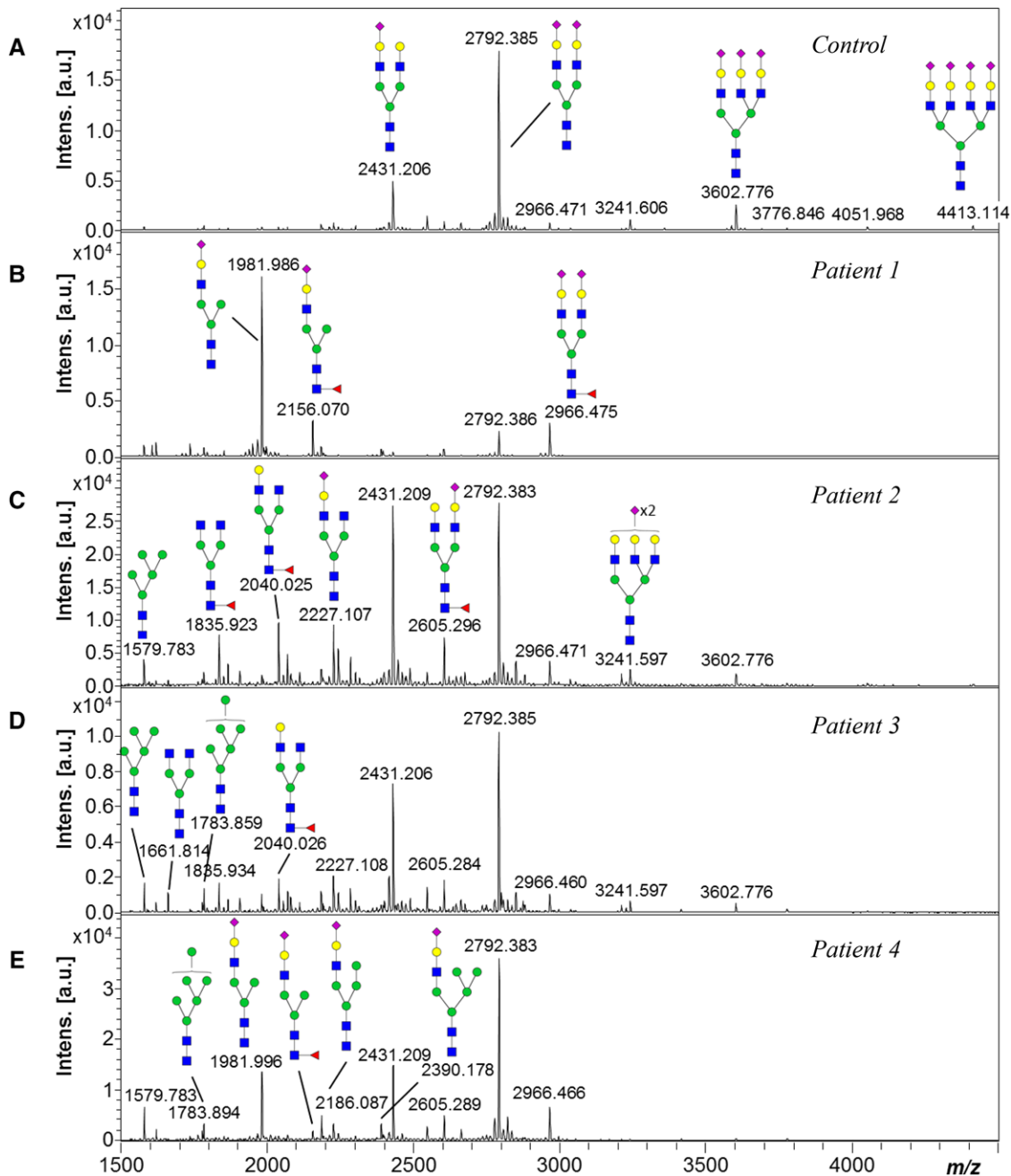


Figure 4. MALDI-TOF mass spectra of permethylated *N*-glycans released from serum samples. Measurements were performed in the positive-ion mode and all ions are present in sodiated form. Green circles, mannose; yellow circles, galactose; blue squares, *N*-acetyl glucosamine; red triangles, fucose; purple diamonds, SA.

homozygote variant (c.797A > T p.Asp266Val) on *SLC35A3* was retained as causative. Both parents were heterozygote. The protein product of this gene is necessary for the entry of activated GlcNAc into the GA [16]. In summary, these genetic results led to the unambiguous diagnosis of MGAT2-CDG (Patient 1), ATP6V0A2-CDG (Patient 2), *SLC35A2*-CDG (Patient 3), and *SLC35A3*-CDG (Patient 4).

4 Discussion

Patient 1 showed nonspecific but severe neurological and multiorgan clinical symptoms motivating CDG screening. SDS-PAGE Western blot and 2DE profiles of serum glycoproteins from this patient proved extremely altered with almost the complete loss of complex sialylated oligosaccharide structures leading to the appearance of unusual species with both

markedly lower M_w and cathodic shift when compared to control individuals. Since analysis of apoC-III glycoform profile proved normal, we assumed that the deficiency did not alter mucin core1 O-glycosylation but was probably restricted to N-glycosylation. MS analysis of serum N-glycans confirmed our preliminary assumption and demonstrated a strong accumulation of a mono-antennary mono-sialylated glycan lacking one [GlcNAc-Gal-SA] trisaccharidic arm (\pm fucosylated; m/z 1981.9 and 2156.1) (Supporting Information Fig. 4). Such particular N-glycan accumulation can be caused by mutation(s) in the *MGAT2* gene encoding UDP-GlcNAc: α 6-D-mannoside β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II. This enzyme localized in the Golgi membrane adds the second N-acetylglucosamine of bi-antennary complex-type chains, the most common N-glycans in serum glycoproteins. Molecular sequencing of the corresponding gene unambiguously corroborated the diagnosis of *MGAT2*-CDG. Noticeably, this particular type-II CDG was the first one described in 1990 [17]. Trace amounts of bi-antennary bi-sialylated N-glycans (m/z 2792.4) indicated the almost complete inactivation of this enzyme, which is in sharp contrast with the majority of other type-II CDGs where causative mutations typically preserved significant residual enzyme/protein activity [2].

Patient 2 presented with nonspecific and moderate neurological and dysmorphic features associated to a peculiar skin disease, i.e., 'Cutis laxa' (Supporting Information Fig. 1). In this individual, CE profile of serum Trf demonstrated a characteristic CDG-II profile with high levels of hyposialylated glycoforms. 2DE of serum N-glycoproteins and apoC-III both showed abnormal hyposialylation, suggesting a global defect in N- and mucin core1 O-glycosylation pathways. MALDI-TOF-MS analysis of N-linked glycans corroborated the abnormal accumulation of mono-sialylated species (m/z 2431.2 and 2605.3) but also revealed the presence of truncated structures lacking galactose residues on one or both arms (m/z 1835.9, 2040.0, 2227.1). Altogether, these abnormalities suggested a global defect of GA, and more precisely of terminal parts of this organelle where galactosylation and sialylation of N- and mucin core1 O-glycans occur [1]. Among CDG linked to GA homeostasis disturbances, emerging ones are notably COG-CDG (Conserved Oligomeric Golgi) [18] and *ATP6V0A2*-CDG [19]. Since *ATP6V0A2* gene encodes the α 2 subunit of the vesicular ATPase, which plays a pivotal role in GA pH regulation through proton translocation [20], its association with N- and O-glycosylation defects was presumably linked to abnormal pH in medial and trans-Golgi, thus impacting the enzymatic activity of galactosyl- and sialyltransferases. Furthermore, to our knowledge, all *ATP6V0A2*-CDG cases described to date shared clinical *cutis laxa* [21]. For all these reasons, we sequenced the *ATP6V0A2* gene and formally diagnosed *ATP6V0A2*-CDG in this individual.

In Patient 3, CE-based Trf analysis showed an atypical CDG-II pattern with subtle but significant levels of asialylated and monosialylated glycoforms (absent in the serum of control individuals). 2DE analysis of the N-glycoproteins corroborated the presence of hyposialylated glycoforms with

numerous small additional cathodical spots. Although not evident on the corresponding MALDI-TOF mass spectrum, 2DE analysis of apoC-III mucin core1 O-glycosylation revealed an abnormal tiny spot potentially corresponding to asialylated apoC-III harboring GalNAc-Gal disaccharide (hyposialylation) and/or only one GalNAc residue (hypogalactosylation). MS profile of N-glycans shared similarities with that of Patient 2 in terms of hyposialylation (m/z 2431.2) and hypogalactosylation (m/z 1661.8, 1835.9, 2040.0, 2227.1). Nevertheless, hyposialylation looked less marked in Patient 3, notably with the absence of the oligosaccharidic structure at m/z 2605.3. Furthermore, the glycan moiety lacking the two subterminal galactoses (m/z 1661.8) was specifically retrieved in Patient 3 suggesting a higher level of hypogalactosylation of N-glycans. These results, when combined with nonspecific clinical symptoms, did not evidently suggest a culprit CDG-related gene. COG subunits as well as *ATP6V0A2* encoding genes were sequenced but gene sequencing did not evidence any mutation. Then, sequencing of a panel of targeted genes was performed and revealed one de novo mutation in *SLC35A2* gene carried by one X chromosome of the related girl (the second one being completely inactivated). In light of this result, N-glycan data could be re-interpreted and, as described above, observed levels of hypogalactosylation, putatively associated to hypogalactosylation of apoC-III, finally appeared highly coherent with the diagnosis of *SLC35A2*-CDG. Indeed, *SLC35A2* protein corresponds to the Golgi UDP-Gal transporter allowing the entry of 'activated' galactose into the GA lumen before its addition to N- and O-oligosaccharide elongating chains (Supporting Information Fig. 3) [16]. Since nucleotide sugar transporters have been suggested to cooperate with each other [22], it could be speculated that *SLC35A2* mutation could also impact *CMP-SA* transporter (*SLC35A1*) functions in Patient 3 putatively explaining the observed associated hyposialylation.

Patient 4 showed atypical CDG-II Trf CE profile with high levels of 3- and 2-sialo glycoforms but without detectable 1- and 0-sialo glycoforms. 2DE of N-glycoproteins further confirmed hyposialylation of Trf but proved poorly informative for AAT (one faint additional spot) while Hpt was undetectable. One might notice slight differences between the CE and 2DE Trf profiles for this patient. This is probably linked to the fact that the CE method employed to analyze Trf glycosylation efficiently quantifies Trf glycoforms containing up to five SA residues but does not sensitively detect hypersialylated glycoforms with less than six SA residues [11]. In the opposite, 2DE, especially when combined with an antibody-based detection, can reveal all the Trf sialylated glycoforms with equivalent sensitivity.

2DE of apoC-III did not evidence any specific abnormalities suggesting that observed Trf defects did not translate into mucin core1 O-glycosylation. By contrast with 2DE, MS-based analysis of serum N-glycans proved highly informative revealing strong accumulation of mono-antennary monosialylated structures lacking one complete [GlcNAc-Gal-SA] arm (m/z 1981.9 and 2156.1). Strikingly, these *MGAT2*-CDG-typical structures (as found in Patient 1) were here

associated to significant levels of normal complex-type biantennary bi-sialylated *N*-glycan species at m/z 2792.4 and 2966.4 (at very low levels in Patient 1; Supporting Information Fig. 4). In addition, atypical hybrid and oligomannose structures at m/z 2390.2, 1783.9, and 1579.8 were also detected at significant levels suggesting an associated deficiency in mannosidase II enzymatic activity (Supporting Information Fig. 4). Lastly, total absence of tri-antennary structures at m/z 3241.8 and 3602.8 was also evidenced in Patient 4. Considering these rather complex glycosylation profiles associated with nonspecific clinical symptoms, no immediate conclusion regarding any particular causative gene mutations could be drawn. Sequencing of MGAT2 and mannosidase II encoding genes, as well as targeted genes panel sequencing, was performed but both proved unsuccessful. Then, a WES was performed and interestingly revealed relevant mutations in SLC35A3 gene encoding for the UDP-GlcNAc transporter. Since UDP-GlcNAc is the substrate of MGAT2-encoded enzyme and of other GlcNAc transferases involved in the synthesis of polyantennary *N*-glycans (Supporting Information Fig. 4) [16], observed accumulations of mono-antennary sialylated *N*-glycans at m/z 1981.9 and 2156.1 along with the absence of polyantennary structures, were first strong arguments for causative SLC35A3 mutations. Furthermore, the absence of any mucin core1 *O*-glycosylation defect on apoC-III (glycan motifs devoided of any GlcNAc residues), as well as the reported interaction of UDP-GlcNAc transporter with mannosidase II and various GlcNAc transferases [23,24], were in strong agreement with our experimental results. Altogether these data confirmed the unambiguous diagnosis of SLC35A3-CDG in Patient 4. To our knowledge, this patient is only the second case (among ten described patients) of SLC35A3-CDG presenting with clear serum glycans abnormalities [25, 26].

The usefulness and complementarity of the presented electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing methods can be highlighted at different levels through the four detailed CDG cases. First, CE analysis of serum Trf allows fast (10 min per sample), simple and robust first-line CDG screening (as exemplified for Patients 2–4). Although we describe only CDG-II cases in this paper, this technique can also efficiently detect CDG-I [11]. The main limitation of this efficient CE approach is that it cannot be applied to EDTA plasma and dried blood spot samples. When serum or heparinized plasma is not available or in insufficient quantity (as for Patient 1; minimal volume = 150 μ L),

glycoproteins from EDTA plasma samples or dried blood spots can be conveniently analyzed by 2DE. Furthermore, this technique monitors simultaneously the potential occurrence of *N*-glycosylation defects on up to three distinct glycoproteins, thus strengthening the sensitivity and specificity of the CDG screening (Patients 1–4). Despite a rather poor ability to distinguish protein glycoforms, SDS-PAGE Western-blot analysis of *N*-glycoproteins can easily be applied in a straightforward routine manner to all sample types for evidencing CDG-I as well as peculiar CDG-II such as MGAT2-CDG (Patient 1).

In parallel, 2DE of apoC-III efficiently determines if mucin core1 *O*-glycosylation is impacted concomitantly to *N*-glycosylation, thus suggesting an overall defect in GA homeostasis (Patient 2) or a defect common to both *N*- and *O*-glycosylation pathways (Patient 3). In the case of Patients 1 and 4, apoC-III electrophoresis analysis did not show particular abnormality orientating toward specific *N*-glycosylation defects. Additionally, apoC-III patterns have been showed to distinguish between ATP6V0A2-CDG and COG-CDG [8]. Altogether, when considering the very low prevalence of CDG, we assume that such fast, simple, and inexpensive electrophoretic techniques are mandatory prior to MS-based glycan study.

By furnishing accurate information about accumulated or lacking *N*-glycan structures, MALDI-TOF analysis of enzymatically released total serum *N*-glycans can be, in some instances, directly indicative of the CDG-II causative genetic defect. For instance, the intense peak at m/z 1981.9 can be considered as 'diagnostic' of MGAT2-CDG (Patient 1). Also, global *N*-glycan profiling is essential to get insight into the electrophoretic patterns, by providing unsurpassed structural information regarding both negatively charged (sialylated) and neutral fucosylated or galactosylated *N*-glycan species (Patients 2 and 3). However, as illustrated for Patients 2–4, MS-based *N*-glycan profiles are often complex and potentially difficult to interpret (especially for nonexpert people), which might prevent its use as single screening method in routine conditions. In addition, this technique does not easily distinguish CDG-I and CDG-II [27], and might be potentially confounded by some external nongenetic causes of *N*-glycosylation modification, such as liver cirrhosis that could produce CDG-II-like *N*-glycan profiles [28, 29]. Table 1 summarizes some of the main features of these different electrophoretic approaches used to screen for *N*-glycosylation disorders.

Table 1. Analytical characteristics of the electrophoretic and MS-based approaches used in this study for the screening and diagnosis of *N*-glycosylation disorders

	Time-to-result	Ease of use	Diagnostic power	Information provided
Western blot SDS-PAGE	~48 h	+++	+	+
CE	~10 min	+++	+++	++
2DE	~48 h	++	++(+)	++
MALDI-TOF	~48 h–72 h ^{a)}	+	++(+)	+++

a) Under the conditions of the present study [12], but method throughput can be substantially improved [30, 31].

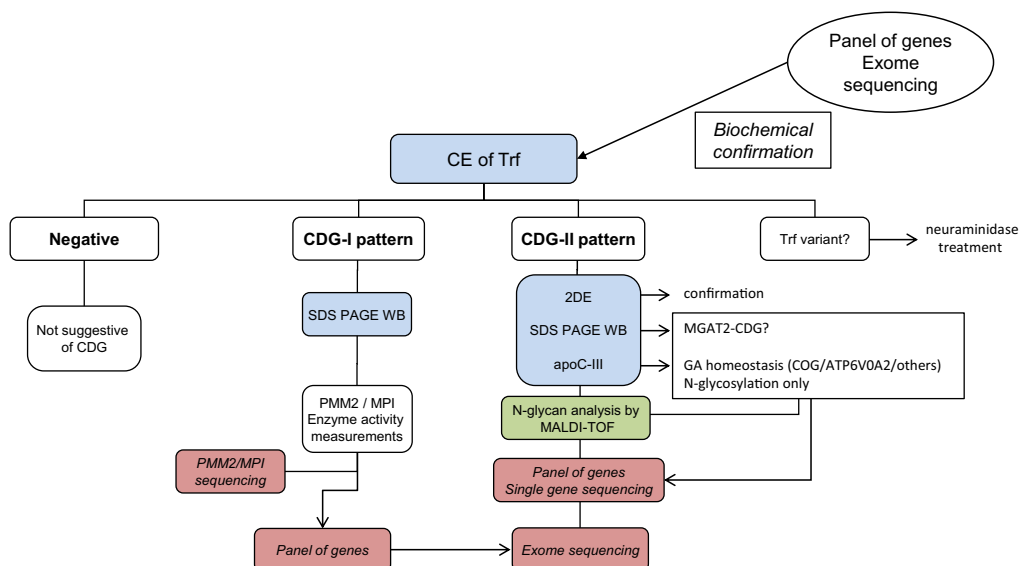


Figure 5. Proposed analytical flowchart for CDG diagnosis.

Concerning molecular studies, targeted sequencing of single or panel of genes often suffices to corroborate suspected CDG causative mutations (Patients 1–3). When unsuccessful or if preliminary information regarding potential culprit genes is lacking, WES can reveal (mutated) gene candidates whose causality can eventually be asserted by reinterpreting glycosylation-related data such as MS-based total N-glycan profiles (Patient 4). Finally, it should be noticed that specialized biochemical laboratories are now increasingly solicited for validating the causality of initially unsuspected CDG-related mutations issued from WES data.

To summarize, in this paper we show through four specific examples that a panel of complementary tools is often mandatory to obtain a definitive CDG diagnosis, and for getting deeper insight into the underlying biochemical mechanisms. Altogether, these data led us to propose the analytical flowchart from Fig. 5 for CDG diagnosis. Thus, glycomic tools (from electrophoresis to MS) and gene sequencing approaches represent essential analytical partners in the intricate diagnosis pathway of these inherited diseases. Capillary and/or gel electrophoresis techniques can be regarded as efficient first-line approaches for CDG screening. In case of CDG suspicion, MS-based analyses can be performed to confirm the preliminary diagnosis but also to highlight potential abnormal accumulation of particular glycan species. Targeted gene sequencing can be used for validating the potentially incriminated genes. If no obvious or consistent hypothesis can be drawn from the electrophoretic and mass spectrometric data, WES would be performed to get new perspectives.

This work was supported by grant ANR-15RAR3-0004-06 under the frame of E-RARE-3, the ERA-Net for Research on Rare Diseases. This work was also supported by the Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives and the MetaboHUB infrastructure (ANR-11-INBS-0010 grant).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Moremen, K. W., Tiemeyer, M., Nairn, A. V., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012, *13*, 448–462.
- [2] Peanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D. J., Morava, E., Perez, B., Seta, N., Thiel, C., van Schaftingen, E., Matthijs, G., Jaeken, J., *Eur. J. Med. Genet.* 2017 <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.012>.
- [3] Jaeken, J., *Ann. NY Acad. Sci.* 2010, *1214*, 190–198.
- [4] Jaeken, J., van Eijk, H. G., van der Heul, C., Corbeel, L., Eeckels, R., Eggermont, E., *Clin. Chim. Acta* 1984, *144*, 245–247.
- [5] Lefeber, D. J., Morava, E., Jaeken, J., *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011, *34*, 849–852.
- [6] Seta, N., Barnier, A., Hochedez, F., Besnard, M. A., Durand, G., *Clin. Chim. Acta* 1996, *254*, 131–140.
- [7] Bruneel, A., Habarou, F., Stojkovic, T., Plouviez, G., Bougas, L., Guillemet, F., Brient, N., Henry, D., Dupre, T., Vuillaumier-Barrot, S., Seta, N., *Clin. Chim. Acta* 2017, *470*, 70–74.
- [8] Yen-Nicolay, S., Boursier, C., Rio, M., Lefeber, D. J., Pilon, A., Seta, N., Bruneel, A., *Proteomics Clin. Appl.* 2015, *9*, 787–793.
- [9] Timal, S., Hoischen, A., Lehle, L., Adamowicz, M., Huijben, K., Sykut-Cegielska, J., Paprocka, J., Jamroz, E., van Spronsen, F. J., Korner, C., Gilissen, C., Rodenburg, R. J., Eidhof, I., van den Heuvel, L., Thiel, C., Wevers, R. A., Morava, E., Veltman, J., Lefeber, D. J., *Hum. Mol. Genet.* 2012, *21*, 4151–4161.
- [10] Guillard, M., Morava, E., van Delft, F. L., Hague, R., Korner, C., Adamowicz, M., Wevers, R. A., Lefeber, D. J., *Clin. Chem.* 2011, *57*, 593–602.
- [11] Parente, F., Ah Mew, N., Jaeken, J., Gilfix, B. M., *Clin. Chim. Acta* 2010, *411*, 64–66.

- [12] Goyallon, A., Cholet, S., Chapelle, M., Junot, C., Fenaille, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2015, *29*, 461–473.
- [13] Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A., Haslam, S. M., *J. Proteome Res.* 2008, *7*, 1650–1659.
- [14] Ruel, C., Morani, M., Bruneel, A., Junot, C., Taverna, M., Fenaille, F., Tran, N. T., *J. Chromatogr. A*, 2018, *1532*, 238–245.
- [15] Biskup, K., Braicu, E. I., Sehouli, J., Fotopoulou, C., Tauber, R., Berger, M., Blanchard, V., *J. Proteome Res.* 2013, *12*, 4056–4063.
- [16] Caffaro, C. E., Hirschberg, C. B., *Acc. Chem. Res.* 2006, *39*, 805–812.
- [17] Stibler, H., Jaeken, J., *Arch. Dis. Child* 1990, *65*, 107–111.
- [18] Zeevaert, R., Foulquier, F., Jaeken, J., Matthijs, G., *Mol. Genet. Metab.* 2008, *93*, 15–21.
- [19] Kornak, U., Reynders, E., Dimopoulou, A., van Reeuwijk, J., Fischer, B., Rajab, A., Budde, B., Nurnberg, P., Foulquier, F., Lefeber, D., Urban, Z., Gruenewald, S., Annaert, W., Brunner, H. G., van Bokhoven, H., Wevers, R., Morava, E., Matthijs, G., van Maldergem, L., Mundlos, S., *Nat. Genet.* 2008, *40*, 32–34.
- [20] Guillard, M., Dimopoulou, A., Fischer, B., Morava, E., Lefeber, D. J., Kornak, U., Wevers, R. A., *Biochim. Biophys. Acta* 2009, *1792*, 903–914.
- [21] Mohamed, M., Kouwenberg, D., Gardeitchik, T., Kornak, U., Wevers, R. A., Morava, E., *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011, *34*, 907–916.
- [22] Hadley, B., Maggioni, A., Ashikov, A., Day, C. J., Haselhorst, T., Tiralongo, J., *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2014, *10*, 23–32.
- [23] Slusarewicz, P., Nilsson, T., Hui, N., Watson, R., Warren, G., *J. Cell Biol.* 1994 *124*, 405–413.
- [24] Maszczak-Seneczko, D., Sosicka, P., Kaczmarek, B., Majkowski, M., Luzarowski, M., Olczak, T., Olczak, M., *J. Biol. Chem.* 2015, *290*, 15475–15486.
- [25] Edvardson, S., Ashikov, A., Jalas, C., Sturiale, L., Shaag, A., Fedick, A., Treff, N. R., Garozzo, D., Gerardy-Schahn, R., Elpeleg, O., *J. Med. Genet.* 2013, *50*, 733–739.
- [26] Edmondson, A. C., Bedoukian, E. C., Deardorff, M. A., McDonald-McGinn, D. M., Li, X., He, M., Zackai, E. H., *Am. J. Med. Genet. A* 2017, *173*, 2758–2762.
- [27] Zhang, W., James, P. M., Ng, B. G., Li, X., Xia, B., Rong, J., Asif, G., Raymond, K., Jones, M. A., Hegde, M., Ju, T., Cummings, R. D., Clarkson, K., Wood, T., Boerkoel, C. F., Freeze, H. H., He, M., *Clin. Chem.* 2016, *62*, 208–217.
- [28] Morelle, W., Flahaut, C., Michalski, J. C., Louvet, A., Mathurin, P., Klein, A., *Glycobiology* 2006, *16*, 281–293.
- [29] Klein, A., Carre, Y., Louvet, A., Michalski, J. C., Morelle, W., *Proteomics Clin. Appl.* 2010, *4*, 379–393.
- [30] Kang, P., Mechref, Y., Novotny, M. V., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, *22*, 721–734.
- [31] Shubhakar, A., Kozak, R. P., Reiding, K. R., Royle, L., Spencer, D. I., Fernandes, D. L., Wuhrer, M., *Anal. Chem.* 2016, *88*, 8562–8569.

6 Addendum

²INSERM UMR-1193 “Mécanismes cellulaires et moléculaires de l’adaptation au stress et cancérogénèse”, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

³Service de Pharmacologie et d’Immunoanalyse, Laboratoire d’Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA, INRA, Université Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France

⁴Génétique Médicale, CHU Rouen, Rouen, France

⁵Génétique Médicale, CHU-Groupe hospitalier Sud-Réunion, La Réunion, France

⁶Centre de Référence des Maladies Héritaires du Métabolisme, CHU la Timone-Marseille, Marseille, France

⁷Institut Jérôme Lejeune, Paris, France

⁸Proteins and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

⁹Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, UM Pathologies Métaboliques, Erythrocytaires et Dépistage Périnatal, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est–Hospices Civils de Lyon, Bron, France

¹⁰Paris Descartes University, Paris, France

Supporting Information

Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation

Arnaud Bruneel^{1,2}, Sophie Cholet³, Valérie Drouin-Garraud⁴, Marie-Line Jacquemont⁵, Aline Cano⁶, André Mégarbané⁷, Coralie Ruel^{3,8}, David Cheillan⁹, Thierry Dupré¹, Sandrine Vuillaumier-Barrot¹, Nathalie Seta^{1,10}, François Fenaille³.

¹*AP-HP, Biochimie Métabolique et Cellulaire, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France*

²*INSERM UMR-1193 "Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'adaptation au stress et cancérogène", Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France*

³*Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA, INRA, Université Paris Saclay, MetaboHUB, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.*

⁴*Génétique Médicale, CHU Rouen, Rouen, France.*

⁵*Génétique Médicale, CHU - Groupe hospitalier Sud-Réunion, Saint-Pierre, La Réunion, France*

⁶*Centre de Référence des Maladies Héritaires du Métabolisme, CHU la Timone-Marseille, Marseille, France.*

⁷*Institut Jérôme Lejeune, Paris, France.*

⁸*Proteins and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France.*

⁹*Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, UM Pathologies Métaboliques, Erythrocytaires et Dépistage Périnatal; Centre de Biologie et de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est – Hospices Civils de Lyon, BRON, France.*

¹⁰*Paris Descartes University*

Corresponding authors:

Arnaud Bruneel

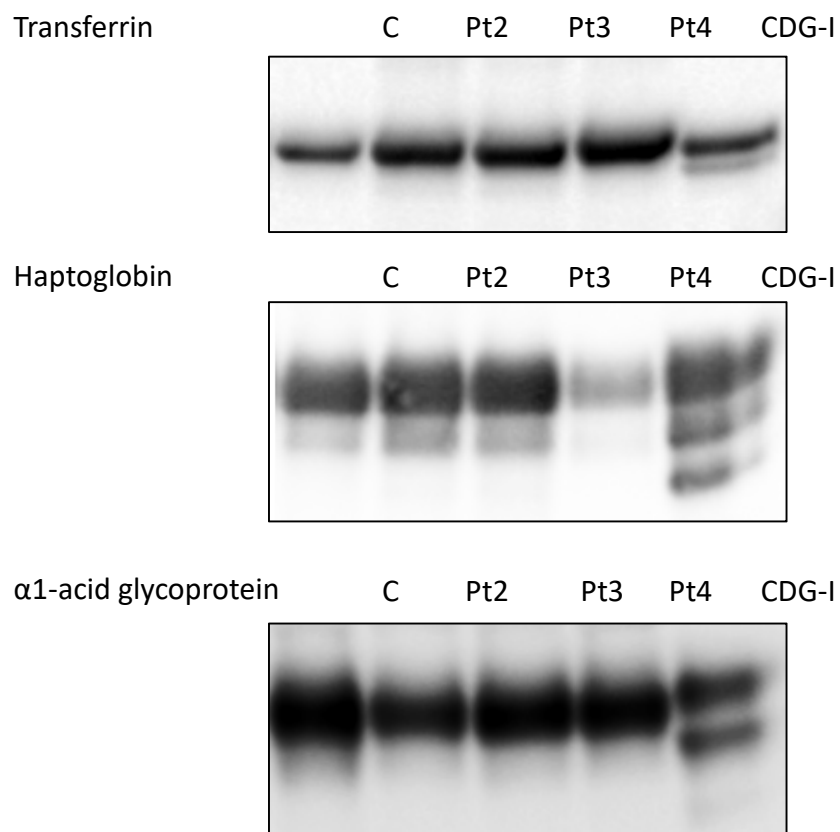
AP-HP, Biochimie Métabolique et Cellulaire, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, F-75018 Paris - France. Fax: +33-1-40-25-88-21. E-mail : arnaud.bruneel@aphp.fr

François Fenaille

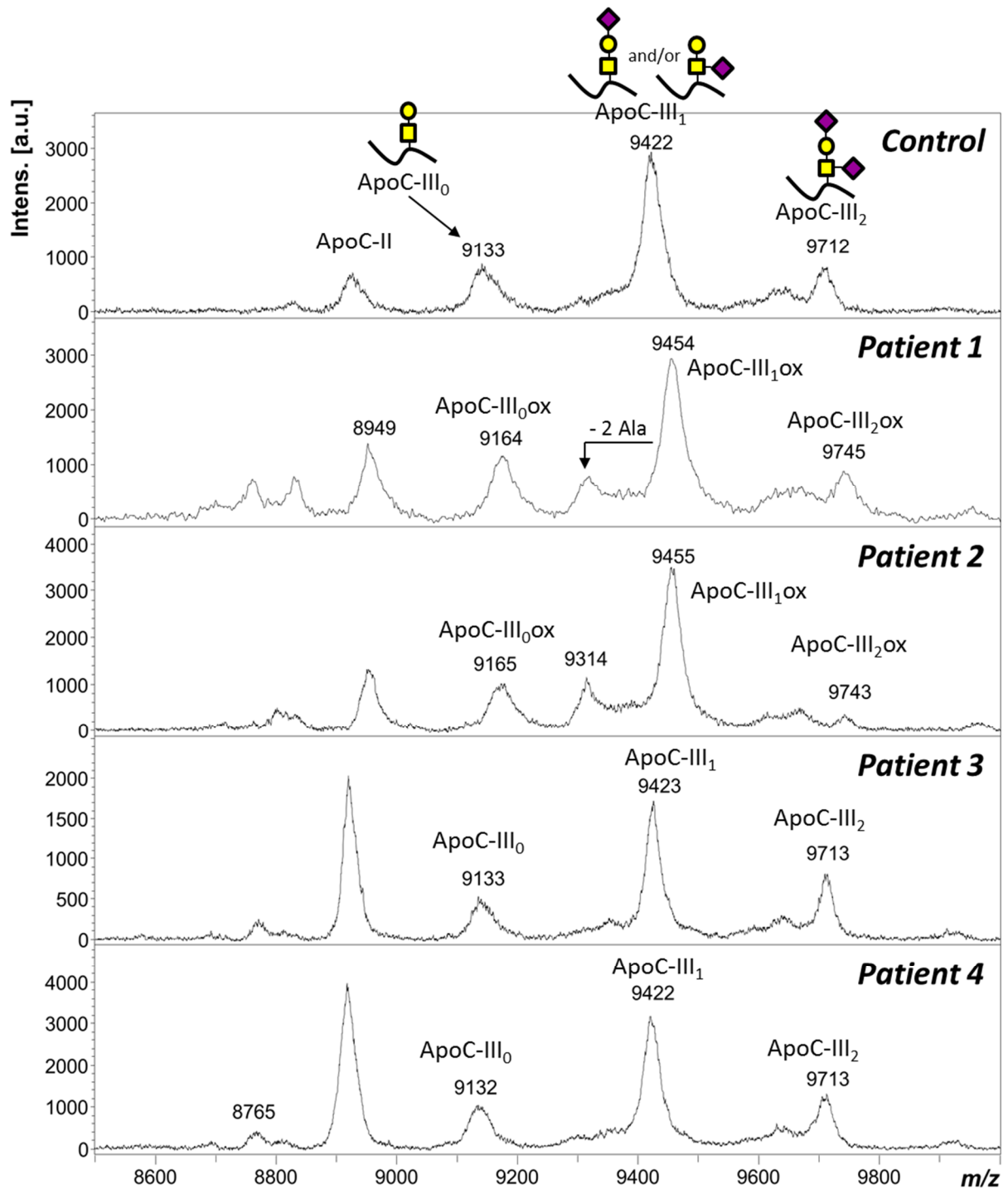
Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA, INRA, Université Paris Saclay, MetaboHUB, F-91191 Gif-sur-Yvette, France. Fax: 133-1-69-08-59-07. E-mail : francois.fenaille@cea.fr



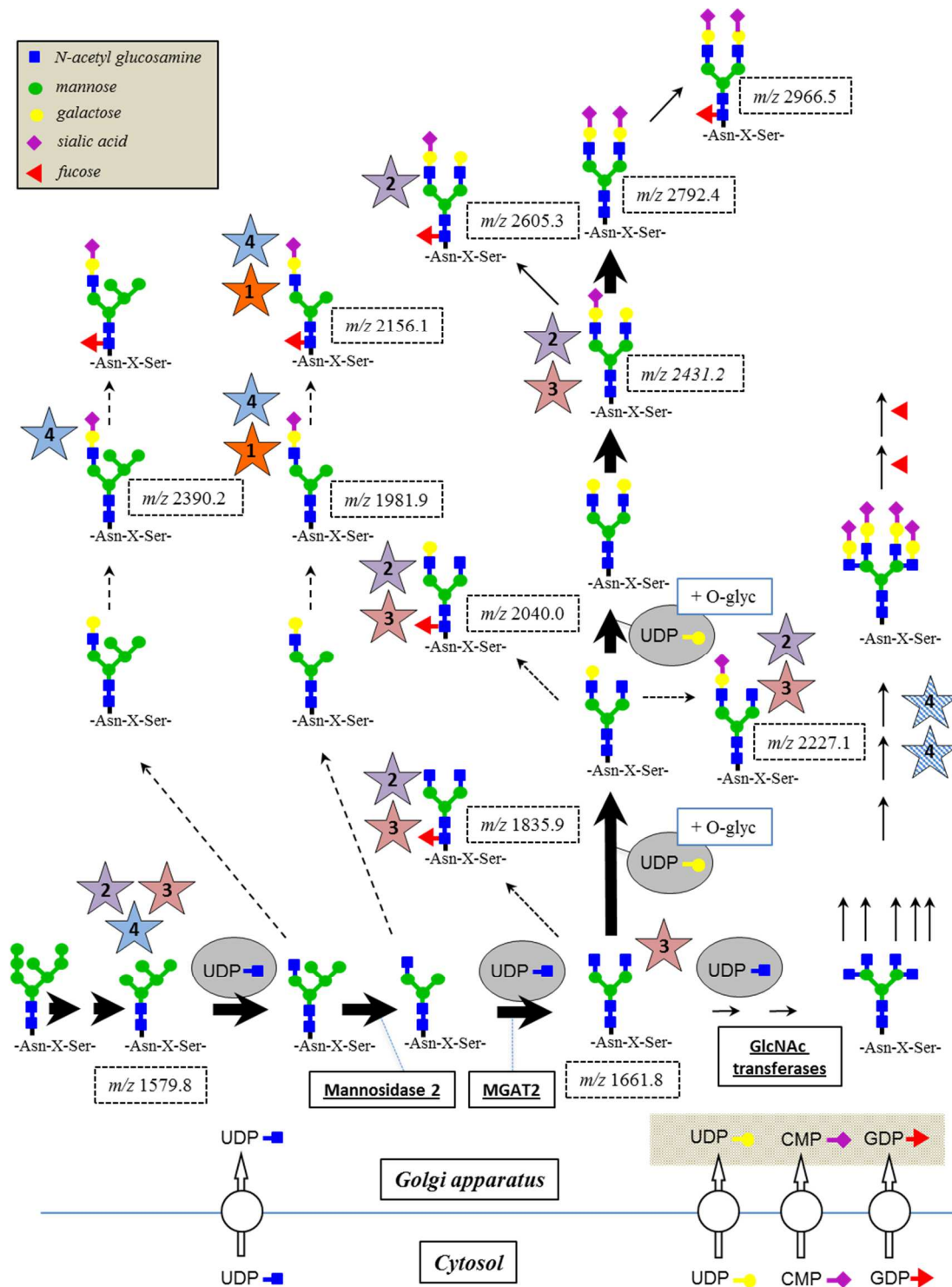
Supporting Information Figure S1. Picture of abdominal '*Cutis laxa*' as observed in patient 2.



Supporting Information Figure S2. SDS-PAGE Western-blot of transferrin, haptoglobin and α 1-acid glycoprotein for Pt2 to Pt4. Profiles of these patients (Pt2 to Pt4) could not be differentiated from the control (C) and were not evocative of a CDG-I pattern typically showing additional bands of lower mass for all tested glycoproteins.



Supporting Information Figure S3. MALDI-TOF mass spectra of apoC-III. Species were detected as $[M+H]^+$ ions. For patients 2 and 3, protein species were detected under their oxidized form (ox). Yellow squares, GalNAc; yellow circles, Gal; purple diamonds, Neu5Ac.



Supporting Information Figure S4. Simplified view of GA-located N-glycan biosynthesis pathway (maturation of protein-linked N-glycans). Given m/z values are those of the corresponding permethylated N-glycans as measured by MALDI-TOF MS ($[M + Na]^+$ species). Numbered stars are related to the four patients studied (plain stars: accumulation; channeled stars: absence).

Titre : Apport de l'électrophorèse capillaire pour l'étude des anomalies de glycosylation de protéines liées à des pathologies : vers l'identification de nouveaux biomarqueurs

Mots clés : électrophorèse capillaire – glycosylation – préparation d'échantillon – analyse glycomique

Résumé : La glycosylation est l'une des principales modifications post-traductionnelles des protéines. La glycosylation des protéines est fortement modifiée lors de diverses pathologies comme le cancer, la polyarthrite rhumatoïde ou les troubles congénitaux de la glycosylation («Congenital disorders of glycosylation», CDGs). Ainsi, la nature et les proportions relatives des oligosaccharides liés aux protéines peuvent être utilisées pour dépister, pronostiquer voire suivre l'évolution de pathologies. Les travaux de cette thèse se sont focalisés sur l'étude de la glycosylation pour permettre le dépistage de certaines pathologies : les CDGs, la maladie d'Alzheimer (MA) et la dégénérescence rétinienne. Plusieurs stratégies fondées sur l'électrophorèse capillaire (EC) ont été envisagées pour répondre à cet objectif. Tout d'abord, le développement d'une méthode par EC de zone (ECZ) l'apolipoprotéine C-III (ApoC-III) intacte, une O-glycoprotéine impliquée dans le dépistage des troubles de la O-glycosylation, a permis de séparer les différentes glycoformes selon leur degré de sialylation. L'analyse d'échantillons d'ApoC-III standard provenant de différents fournisseurs par spectrométrie de masse (MS)

MALDI-TOF a mis en évidence une hétérogénéité liée à la présence (inattendue) de formes carbamylées. Un traitement du plasma basé sur une immunocapture de l'ApoC-III suivie d'une dérivation sur billes magnétiques de la protéine par un fluorophore a permis de séparer ses différentes glycoformes en ECZ. Ensuite, une analyse N-glycomique de fluides biologiques employant une nouvelle technique de préparation d'échantillon que nous avons adaptée au plasma et au liquide céphalorachidien, a été réalisée par EC en gel couplée à une détection par fluorescence induite par laser (ECG-LIF) sur des patients sains et atteints de la MA. Cette étude a permis de mettre en évidence quelques modifications des N-glycanes chez ces patients. Enfin la combinaison des deux stratégies d'analyse de la glycosylation (glycoprotéine intacte et glycanes libérés), a permis de détecter la transferrine intacte présente dans le liquide vitré à des concentrations faibles ainsi que ses N-glycanes libérés, dans le cadre du dépistage d'une maladie oculaire. L'EC-QTOF-MS a également été explorée pour l'analyse de N-glycanes dérivés avec un nouveau fluorophore permettant d'améliorer la sensibilité en MS.

Title: Contribution of capillary electrophoresis for the study of disease-associated modifications in protein glycosylation: towards the identification of new biomarkers

Keywords: capillary electrophoresis – glycosylation – sample treatment – glycomic analysis

Abstract: Glycosylation is one of the most main types of post-translational modifications of proteins. Disease-associated modifications in protein glycosylation have been observed for various pathologies such as cancer, rheumatoid arthritis, or «Congenital disorders of glycosylation» (CDGs). They are often exploited for diagnosis, prognosis and monitoring of these diseases. This thesis work focused on the glycosylation study with the aim to allow the screening of different pathologies: CDGs, Alzheimer's disease and retinal degeneration diseases. Different strategies based on capillary electrophoresis (CE) were considered to fulfil this goal. First, the development of a CZE analysis of intact apolipoprotein C-III (ApoC-III), an O-glycoprotein implied in the screening of O-glycosylation disorders, allowed the separation of its glycoforms according to their sialylation degree. The MALDI-TOF mass spectrometry (MS) analysis of standard ApoC-III batches from different standard

ApoC-III batches from different suppliers highlighted an additional heterogeneity due to (unexpected) carbamylated species. A plasma pretreatment based on an immunocapture of apoC-III followed by protein derivatization on magnetic beads using a fluorophore allowed to separate its glycoforms by CZE. Second, a glycomic analysis of biological fluids using a new sample treatment method that we adjusted to plasma and cerebrospinal fluid samples was performed by CZE-LIF on controls and Alzheimer's patients. It allowed to highlight some modifications of N-glycans for this disease. Finally, the combination of both strategies of glycosylation analysis (intact glycoprotein and released N-glycans) allowed the detection of intact transferrin present in vitreous humor but also of its released N-glycans for the screening of retinal degeneration disease. CE-QTOF-MS was also investigated for the analysis of released N-glycans derivatized by a new fluorophore which increases MS sensitivity.

