

La glycosylation est une modification post-traductionnelle des protéines assez courante. La gonadotrope chorionique humaine (hCG), une protéine essentielle de la grossesse, est fortement glycosylée car elle contient 4 sites de N- et 4 sites de O- glycosylation dans ses deux sous-unités, l'alpha (hCG α) et la bêta (hCG β), ce qui peut générer un grand nombre de glycoformes de la hCG. Il a été observé que la glycosylation de la hCG change en fonction du semestre de la grossesse, de l'apparition de diverses pathologies liées à la grossesse ou en cas de tumeurs gestationnelles et non gestationnelles. Par conséquent, la caractérisation de la glycosylation de la hCG pourrait révéler l'existence de glycoformes qui seraient des biomarqueurs de certains états pathologiques. Dans ce travail, l'optimisation d'une séparation par nano chromatographie en phase liquide (nanoLC) couplée à une détection en spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) a été réalisée pour l'analyse des glycoformes de la hCG à l'échelle intacte. Ceci a été effectué en incorporant une étape de pré-concentration, en optimisant le gradient de la phase mobile et en étudiant l'effet d'additifs acides dans la phase mobile sur la séparation et la détection des glycoformes des deux sous-unités. L'ajout d'acide trifluoroacétique a permis de séparer les glycoformes des deux sous-unités hCG α et de hCG β , permettant la détection de nombreuses glycoformes. La disponibilité de cette méthode a permis d'aborder l'objectif principal de cette thèse qui était le développement d'une étape de traitement de l'échantillon pour fractionner les glycoformes avant leur analyse en nanoLC-HRMS, afin de révéler certaines glycoformes qui seraient potentiellement "masquées" par d'autres plus abondantes ou plus facilement ionisées. Par conséquent, des supports d'affinité à base de lectines ont été développés. En effet, les lectines sont des protéines qui ont de l'affinité avec des glycanes d'autres protéines, mais avec un profil spécifique pour certains glycanes. Tout d'abord, la lectine Concanavaleine A (Con A) a été sélectionnée car elle a de l'affinité pour les glycanes riches en mannose et bi-antennés complexes. Des supports ont été préparés en immobilisant la Con A sur de la Sépharose et des valeurs répétables et élevées de rendement de greffage ont été obtenues. Après l'évaluation de la capacité, le protocole d'extraction en phase solide (SPE) couplée hors ligne avec l'analyse en nanoLC-HRMS a été optimisé pour obtenir des rendements d'extraction répétables d'environ 60%. Le potentiel de la SPE avec les supports à base de Con A pour fractionner les glycoformes de la hCG a été évalué avec deux préparations de hCG, un médicament à base de hCG recombinante (rhCG) et un autre d'origine urinaire (uhCG). Les supports synthétisés au laboratoire ont également été comparés à ceux commercialisés et ils ont tous les deux permis un fractionnement des glycoformes de la hCG, puisque certaines avec des N-glycanes plus complexes ont été détectées dans la fraction SPE de lavage. Une deuxième lectine, la Jacaline, qui a une affinité pour certains types de O-glycanes, a été ensuite évaluée de manière similaire en utilisant un support commercialisé. Après l'évaluation de la capacité et l'optimisation de la procédure SPE, un fractionnement de l'échantillon uhCG a de nouveau été obtenu avec quelques glycoformes de hCG α et de hCG β de faible abondance détectées dans la fraction SPE de lavage. Ainsi, une étape de SPE avec des supports à base de lectine couplée à une analyse en nanoLC-HRMS a permis d'améliorer la caractérisation de la glycosylation de la protéine hCG.