

Développement de méthodes séparatives pour la caractérisation d'une glycoprotéine à l'échelle intacte : application à l'hormone chorionique gonadotrophine humaine

Résumé :

La glycosylation est la forme la plus courante de modification post-traductionnelle (PTM) des protéines humaines, puisque plus de 70% d'entre elles sont glycosylées. Celle-ci régule de nombreuses propriétés biologiques comme leur stabilité, leur demi-vie et leur activité.

Néanmoins, les protéines peuvent également présenter d'autres types de PTM, ce qui peut conduire pour une protéine donnée à un très grand nombre d'isoformes variant par leur masse, leurs propriétés biologiques et physico-chimiques et leur concentration dans les échantillons biologiques. Ainsi, caractériser une glycoprotéine comporte de nombreux défis et nécessite la mise en œuvre de méthodes séparatives très performantes et de détection très sensibles et informatives.

La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est l'hormone spécifique de la grossesse humaine. Elle est essentielle au développement du placenta et du fœtus. Elle est composée de deux sous-unités hCG α et hCG β qui sont fortement glycosylées (4 sites de N-glycosylation et 4 sites d'O-glycosylation). Récemment, des travaux ont montré une corrélation entre sa glycosylation et une bonne implantation du fœtus. Une caractérisation de ces glycoformes s'avère donc nécessaire. Par conséquent, de nouvelles méthodes en LC/CE-MS ont été développées pour la caractérisation de la hCG à l'échelle intacte en utilisant deux médicaments à base de hCG ayant des glycosylations différentes. Alors que la méthode en CZE-MS (TQ) a permis de différencier les profils des glycoformes de la sous-unité hCG α des deux médicaments, la complémentarité des méthodes RP- et HILIC-MS (qTOF) a conduit à leur identification. Pour limiter les erreurs potentielles d'identification dues au chevauchement des profils isotopiques, le profil de chaque isoforme a été résolu par FT-ICR MS. Dans ce but, une séparation au format nanoLC en mode RP a été développée, améliorant ainsi la sensibilité de la méthode d'un facteur 500 par rapport au format conventionnel. Cette méthode a permis de confirmer l'identification des glycoformes de la sous-unité hCG α . D'autre part, il a été possible d'obtenir des profils différents de glycosylation de la sous-unité hCG β en favorisant leur ionisation par réduction de la hCG. Enfin, un traitement à la PNGase a conduit à l'élimination des N-glycanes pour l'obtention des profils d'O-glycosylation de la sous-unité hCG β .