

Dépistage des anomalies congénitales de la O-glycosylation par analyse MALDI TOF des glycoformes de l'apoC-III. Comparaison avec l'électrophorèse bidimensionnelle

Céline Boursier¹, Stéphanie Yen-Nicolaÿ¹, Marlène Rio², Antoine Pilon^{3,4}, Nathalie Seta⁵ et Arnaud Bruneel^{3,5}

¹ UMS-IPsIT/US31/UMS3679, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

² Département de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

³ UMR-S 1193, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

⁴ Unité d'Endocrinologie et Immuno-analyse, Hôpitaux Universitaires Est-Parisien, Paris, France

⁵ AP-HP, Biochimie métabolique et cellulaire, Hôpital Bichat, Paris, France

Introduction

La glycosylation est une modification post-traductionnelle impliquant de nombreux partenaires moléculaires (sucres activés, enzymes, transporteurs...) intervenant dans la voie de sécrétion des protéines au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. On distingue essentiellement la N-glycosylation (liaison de la chaîne glycanne à une Asn) et la O-glycosylation (liaison à une Ser/Thr).

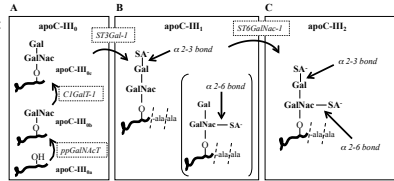
Les anomalies congénitales de la glycosylation (CDG pour *Congenital Disorders of Glycosylation*) sont des maladies rares qui concernent principalement la N-glycosylation. Ils sont définis comme étant de type I ou de type II selon l'étape déficitaire. Il a été récemment montré que des mutations dans des gènes codant pour des protéines structurales ou fonctionnelles du Golgi pouvaient être à l'origine d'anomalies de la N- et de l'O-glycosylation. Ces CDGs correspondent essentiellement à des mutations des gènes codant pour l'une des huit sous-unités du complexe « COG » (COG1 à COG8) impliquées dans le trafic vésiculaire golgien et pour la sous-unité « ATP6V0A2 » d'une pompe à protons intervenant principalement dans la régulation du pH intra-golgien. Cliniquement, les COG-CDG et les ATP6V0A2-CDG présentent des symptômes très hétérogènes allant de légères anomalies neurologiques à de très graves atteintes multiviscérales.

L'apolipoprotéine C-III (apoC-III) est une protéine circulante uniquement O-glycosylée (O-glycosylation type mucine core1). Nous avons précédemment montré que l'électrophorèse 2D permettait de séparer les principales glycoformes de l'apoC-III et montrait des anomalies de l'O-glycosylation chez les COG-CDG et les ATP6V0A2-CDG par rapport aux témoins. Dans ce travail, nous avons évalué l'intérêt de l'approche MALDI-TOF pour séparer et quantifier les différentes glycoformes de l'apoC-III dans l'objectif de pouvoir dépister simplement et rapidement les CDG avec anomalies de l'O-glycosylation. Une comparaison avec l'électrophorèse 2D a également été réalisée.

Matériel et Méthodes

Plasmas issus de patients :
- 15 CDG-négatifs
- 8 CDG-positifs : 4 COG-CDG et 4 ATP6V0A2-CDG

Les différents isoformes de l'apoC-III :
(A) glycoformes non-sialylées
(B) glycoformes mono-sialylées
(C) glycoforme bi-sialylée.



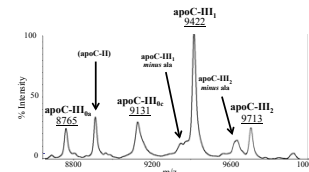
1 µL plasma + 15 µL eau-ACN-TFA (95:5:0,1)
C4 Zip-Tip : élution par 0.75 µL eau-ACN-TFA (25:75:0,1)
+ 0.75 µL solution d'acide sinapinique (solution saturée dans eau-ACN-TFA (50:50:0,1))
Dépôt MALDI → MALDI-TOF → Séparation des glycoformes de l'apoC-III

1 µL plasma
2DE = IEF : ZOOM strip pH 4-7 + SDS-PAGE : 4-12% NuPAGE Bis-Tris gel
Western Blot → Révélation des glycoformes de l'apoC-III

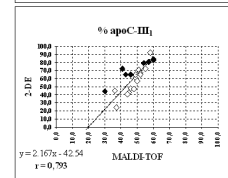
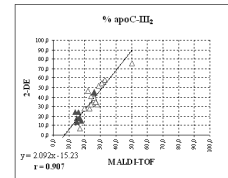
Résultats

Profil MALDI-TOF des glycoformes de l'apoC-III (plasma CDG négatif) :

Six glycoformes de l'apoC-III sont séparées par MALDI-TOF. Le pic correspondant à la glycoforme apoC-III₁ est le pic de référence.

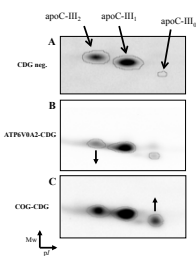


Comparaison des résultats de 2DE et de MALDI-TOF :

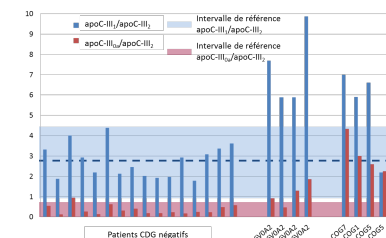


Pictogrammes noirs : patients CDG
Pictogrammes blancs : patients CDG négatifs

Profil 2D de l'apoC-III :



MALDI-TOF : ratios des isoformes de l'apoC-III :



Les profils Western Blot 2D des plasmas ATP6V0A2-CDG montrent une diminution de l'apoC-III₂, alors que pour les COG-CDG, une augmentation de la forme apoC-III₁ est observée.

En MALDI, la comparaison des intensités des pics montre que le ratio apoC-III₁/apoC-III₂ est discriminant pour les échantillons COG-CDG. Pour les échantillons ATP6V0A2-CDG c'est le ratio apoC-III₁/apoC-III₂ qui est discriminant.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation des glycoformes non-sialylées de l'apoC-III observée chez les COG-CDG correspond à une présence en quantité anormale de la forme non-glycosylée apoC-III_{0a}. Cela pourrait résulter d'une altération du trafic rétrograde entre le *trans* et le *cis*-Golgi chez ces patients.

Ils suggèrent également que la pompe à protons intra-golgienne joue un rôle important dans les étapes de sialylation des O-glycannes catalysées par ST3Gal-1 et ST6Gal-1.

Une bonne corrélation est observée entre les 2 techniques pour la forme bi-sialylée apoC-III₂ (r=0,907) et est moins significative pour la forme mono-sialylée apoC-III₁ (0,793). Pour l'apoC-III₁, les corrélations sont plus satisfaisantes si l'on considère séparément témoins (r = 0,896) et patients CDG (r = 0,946).

Conclusion et Perspectives

L'approche MALDI-TOF permet de séparer et de quantifier simplement et rapidement les différentes glycoformes circulantes de l'apoC-III. Elle apparaît comme une technique robuste et fiable pour le dépistage des COG-CDG et des ATP6V0A2-CDGs. L'association des techniques d'électrophorèse 2D et MALDI-TOF peut présenter un intérêt pour la caractérisation des anomalies de O-glycosylation type mucine core1.

Remerciement : Pierre Le Maréchal – I2BC, Université Paris-Sud.

Référence : 1. Stéphanie Yen-Nicolaÿ, Céline Boursier, Marlène Rio, Dirk J. Lefeber, Antoine Pilon, Nathalie Seta et Arnaud Bruneel. MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation. Comparison with two-dimensional electrophoresis. *Prot. Clin. Appl.* 2015, 1-7.

