

Centre de la Formation et du Développement des Compétences Institut de Formation des Techniciens de Laboratoire Médical

Mémoire de fin d'études

Étude des anomalies de glycosylation plasmatique de patients cirrhotiques

URRUTY Laureen

Promotion: 2015 / 2018

Note aux lecteurs

« Les mémoires des étudiants de l'Institut de Formation de Technicien de Laboratoire Médical sont des travaux réalisés au cours de la 3ème année de formation. <u>Les écrits de ce mémoire n'engagent que les auteurs.</u>

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication, en tout ou partie, sans l'accord des auteurs et de l'Institut de Formation de Technicien de Laboratoire Médical »

Introduction

Dans le cadre de ma 3^{ème} année de formation à l'IFTLM (Institut de Formation de Technicien de Laboratoire Médical), j'ai effectué mon stage d'approfondissement à l'hôpital Bichat-Claude Bernard dans le service de Biochimie Métabolique et Cellulaire (Pr N. SETA) dans le secteur « Glycosylation » du 13 novembre au 22 décembre 2017.

Le laboratoire de biochimie est un centre de référence national pour le dépistage et le diagnostic de maladies génétiques rares nommées CDG « *Congenital Disorders of Glycosylation* ». Ce sont des maladies autosomiques récessives décrites au début des années 1980 et touchant la synthèse de la partie glycanique des glycoprotéines. Maladie orpheline peu connue en France et dans le monde, la fréquence des CDG est estimée à 1/50 000 à 1/100 000 cas dans le monde.

L'objectif de mon stage était de dépister et caractériser d'éventuelles anomalies acquises de la glycosylation chez des patients cirrhotiques (non-CDG) et de les comparer aux anomalies innées retrouvées dans les CDG. En d'autres termes, il s'agissait d'évaluer le risque de dépistage faussement positif de CDG dans un contexte clinique de cirrhose hépatique.

Dans un premier temps je vais présenter les maladies : CDG et cirrhose, dans un second temps je vais expliquer les différentes techniques utilisées : électrophorèse capillaire de la transferrine (Trf) ; Western-blot en une et deux dimensions de différentes glycoprotéines et spectrométrie de masse des glycanes et, pour finir, je vais analyser et discuter les résultats obtenus.

1. Contexte

1.1 Glycoprotéines et Glycosylation

Une glycoprotéine est une protéine composée d'une chaine d'acides aminés (polypeptide) à laquelle se lie par liaison covalente une chaine oligosaccharidique. La plupart des protéines synthétisées et sécrétées dans le sérum par le foie (à l'exception de l'albumine) sont glycosylées.

La glycosylation joue différents rôles importants dans la reconnaissance, la signalisation, les processus d'adhésion et l'adressage cellulaire [1]. Elle correspond à une succession de réactions enzymatiques à l'origine de la synthèse et de la liaison d'un oligosaccharide sur une protéine ou un lipide.

Il existe plusieurs types de glycosylation. Les glycoprotéines étudiées subissent la N-glycosylation correspondant à la liaison de l'oligosaccharide par l'intermédiaire d'un groupement amine (–NH₂) d'une asparagine. La N-glycosylation s'effectue en deux temps. Dans un premier temps la synthèse, l'assemblage et l'accrochage de l'oligosaccharide a lieu dans le cytoplasme, puis dans le réticulum endoplasmique (RE) (Fig. 1). Dans un second temps, la maturation de la glycoprotéine a lieu dans l'appareil de Golgi (Fig. 2) [2].

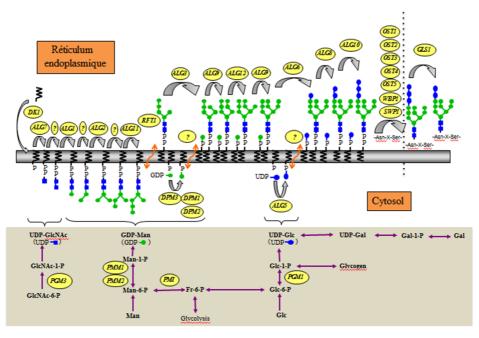


Figure 1 : N-glycosylation : Synthèse, assemblage, accrochage de l'oligosaccharide dans le RE

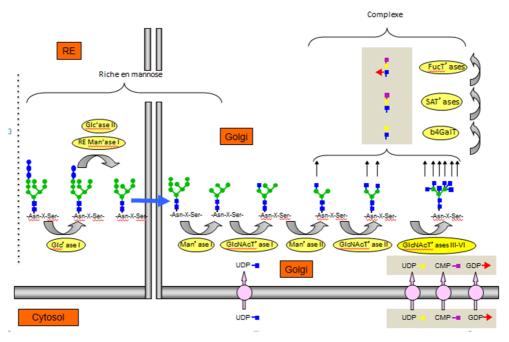


Figure 2: N-glycosylation: Maturation des de la N-glycosylation dans le RE et le Golgi

Les N-glycoprotéines (d'origine hépatique) analysées au laboratoire sont :

- La transferrine (Trf) transporte le fer de l'organisme. L'augmentation de la transferrine est retrouvée lors d'une carence martiale tandis que son déficit est associé à un syndrome inflammatoire, une malnutrition, une insuffisance de synthèse hépatocytaire. Elle possède 2 sites de N-glycosylation.
- L'α1-antitrypsine (AAT) inhibe des enzymes protéolytiques dont la trypsine. Elle protège les poumons contre l'activité protéolytique de l'élastase libérée par les polynucléaires neutrophiles. L'augmentation de l'AAT est retrouvée lors d'un syndrome inflammatoire tandis que son déficit est héréditaire et associé à des pathologies hépatiques dans l'enfance (cirrhose infantile) et pulmonaires chez l'adulte (bronchopneumopathie). Elle possède 3 sites de N-glycosylation.
- L'haptoglobine (Hpt) permet l'élimination de l'hémoglobine libérée lors d'une hémolyse intravasculaire en formant un complexe haptoglobine-hémoglobine qui sera éliminé par le système réticulo-endothélial. L'augmentation de l'haptoglobine est retrouvée dans l'inflammation tandis que son déficit est retrouvé en cas d'hémolyse intravasculaire et lors d'une insuffisance hépatique sévère. Elle possède 4 sites de N-glycosylation.

 L'α1-glycoprotéine acide ou orosomucoïde (oroso) dont le rôle dans l'organisme reste mal connu. Son augmentation peut être retrouvée lors d'une insuffisance rénale ou d'une inflammation, tandis que son déficit est retrouvé dans l'insuffisance hépatocellulaire. Elle possède 5 sites de N-glycosylation.

1.2 Les Congenital Disorders of Glycosylation

1.2.1 Définition

Les CDG sont des maladies génétiques autosomiques récessives rares affectant la synthèse des glycanes et entrainant des anomalies de la glycosylation des protéines [2]. Il existe deux grands types de CDG: type I et type II. Si l'on considère la N-glycosylation, les anomalies de l'élongation, de l'assemblage et du transfert de l'oligosaccharide (dans le RE) correspondent aux CDG de type I (CDG-I), tandis que les anomalies de la maturation, après la fixation de la chaine oligosaccharidique (dans le Golgi) correspondent aux CDG de type II (CDG-II). Les CDG-I sont les plus courants et se traduisent par l'absence partielle ou totale de chaines N-glycanes entières fixées sur les protéines. Si on considère la Trf qui possède 2 sites de N-glycosylation, on trouve dans les CDG-I des quantités anormales de Trf portant une seule chaine glycane ou n'en portant aucune. Ces 2 formes coexistant avec la forme normale portant 2 chaines (Fig. 3). Les CDG-II sont encore plus rares et correspondent à des défauts de maturation (partiels également) des chaines N-glycanes fixées à la protéine. Pour la Trf, ils se traduisent par la présence de quantités anormales de chaines glycanes immatures (ne portant donc pas d'acide sialique terminal) (Fig. 4).

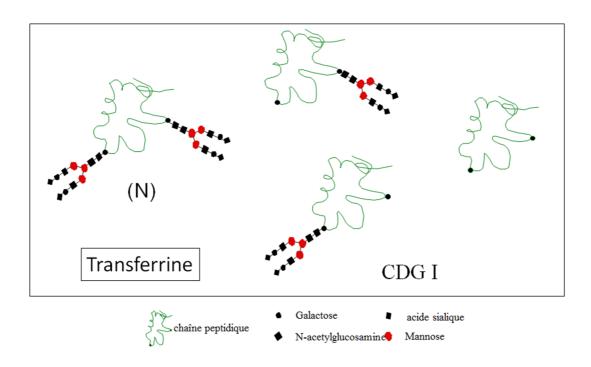


Figure 3: N-glycosylation de la Trf dans les CDG de type I

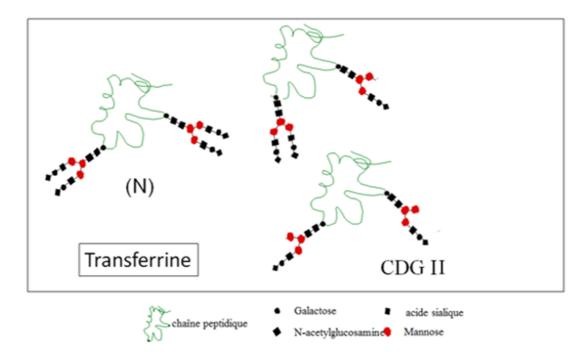


Figure 4 : N-glycosylation de la Trf dans les CDG de type II

1.2.2 Les Signes cliniques des CDG

Les CDG ont un spectre clinique très étendu avec des atteintes multi-viscérales de gravité variable. Les atteintes suivantes ont été décrites (liste non exhaustive) [3] :

Atteintes	Symptômes			
Neurologiques	retard du développement, hypotonie			
Digestives	diarrhée, malabsorption			
Hépatiques	hépatomégalie, cirrhose			
Cardiaques	péricardite			
Rénales	tubulopathie, glomérulopathie			
Endocriniennes	retard pubertaire, absence de caractère sexuel féminin, atrophie testiculaire			
Hématologiques	hyper- ou hypo-coagulabilité			
Syndromes malformatifs	base du nez large, mamelons ombiliqué			
Cutanées	aspect peau d'orange			

C'est dans ce contexte de maladies génétiques présentant des signes cliniques non spécifiques et de gravité variable que sont recherchés de façon systématique les CDG.

Le foie étant un site majeur de glycosylation, des troubles hépatiques peuvent possiblement être à l'origine d'anomalies acquises de la glycosylation et donc de dépistages de CDG faussement positifs. Avant d'envisager ce point dans le cadre de la cirrhose, sont présentées ci-dessous quelques caractéristiques physiopathologiques de cet organe métabolique majeur.

1.3 Le foie

1.3.1 Principales caractéristiques

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme (1,5 kg). Il filtre 1,5 litre de sang par minute. Il se situe dans la partie supérieure droite de l'abdomen. Le foie est un organe métabolique majeur assurant des fonctions de synthèse, stockage et de sécrétion de substrats énergétiques comme le glucose et les triglycérides. Il produit également du cholestérol, des lipoprotéines ou bien encore les facteurs de la coagulation (glycoprotéines). Il possède également des fonctions dans l'élimination de diverses molécules comme le cholestérol, les toxines et les médicaments.

1.3.2 La Cirrhose hépatique

La cirrhose est une maladie du foie irréversible. Elle est due à une atteinte chronique entraînant la destruction des hépatocytes. Elle conduit à la formation de fibrose (tissu cicatriciel) et à une organisation désordonnée des hépatocytes (formation de nodules) à l'origine de modifications de la structure du foie. Ces modifications peuvent provoquer une obstruction de la circulation sanguine hépatique aboutissant à l'altération de ses fonctions et menant à de multiples complications. Il est estimé en France environ 700 000 cas de cirrhose entrainant 10 000 à 15 000 décès par an. Le diagnostic survient en moyenne à l'âge de 50 ans. La consommation excessive et prolongée d'alcool, les infections chroniques par les virus de l'hépatite B et C, ainsi que le syndrome métabolique (diabète, surcharge pondérale, hypertension) sont responsables de plus de 90 % des cas de cirrhose. Les principaux symptômes cliniques de la cirrhose associent perte d'appétit, nausées, vomissements, perte de poids, fatigue, crampes musculaires... Il existe plusieurs complications liées à la cirrhose telles que le cancer du foie qui apparait 15-20 ans après l'émergence de la cirrhose ou bien encore l'encéphalopathie hépatique (20% des cas de cirrhose).

L'étude que j'ai menée lors de mon stage d'approfondissement a consisté à rechercher une anomalie de la glycosylation chez des patients atteints d'une cirrhose hépatique afin d'évaluer le risque de dépistage CDG faussement positifs dans le cadre d'une maladie sévère du foie.

2. Le dépistage des CDG

2.1 Le Capillarys (électrophorèse capillaire de la Trf)

Le Capillarys 2 Flex-PIERCING® est un automate d'électrophorèse capillaire automatisée. La technique d'électrophorèse capillaire permet une séparation en milieu basique (pH=8.8) des glycoformes de la Trf après une surcharge en fer. Dans ces conditions de pH, la Trf et ses glycoformes sont chargées négativement et migrent vers la cathode. Elles sont détectées à la sortie du capillaire par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 200 nm [4].

La Trf est une glycoprotéine (2 chaines N-glycanes) synthétisée par le foie et présente dans le plasma à des concentrations de 1 à 4 g/L. L'électrophorèse capillaire détecte et quantifie (proportions relatives) les différentes glycoformes en fonction du nombre d'acide sialiques terminaux portés par les chaines N-glycanes. Chez un sujet sain, la transferrine tétra-sialylée (4-sialo) est très majoritaire (Fig. 5).

Les valeurs normales (%) des différentes fractions de la Trf déterminées au laboratoire sont les suivantes :

5-sialo	4-sialo	3-sialo	2-sialo	1-sialo	0-sialo
11-18%	78-86%	0-6%	0-1,3%	0%	0%

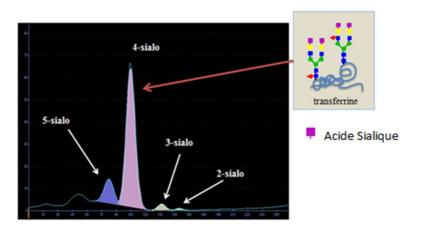


Figure 5 : Electrophorèse capillaire de la Trf normale

En cas de CDG-I, on observe classiquement une augmentation des formes bi-sialylées (2-sialo) et asialylées (0-sialo) (Fig. 6) :

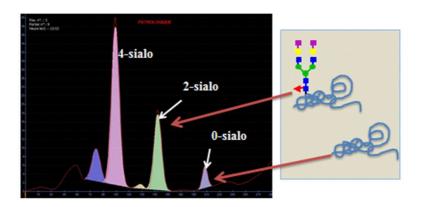


Figure 6 : Electrophorèse capillaire de la Trf dans les CDG-I

Les patients CDG-II présentent un profil montrant une augmentation des formes trisialylée (3-sialo), disialylée, monosialylée (1-sialo) et asialylée correspondant à un défaut de maturation des chaines glycanes (Fig. 7) :

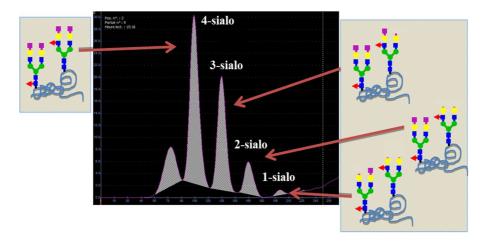


Figure 7 : Electrophorèse capillaire de la Trf dans les CDG-II

Si une anomalie est détectée sur le profil de l'électrophorèse capillaire de la Trf, un western-blot et/ou une électrophorèse bidimensionnelle (2D) est réalisée.

2.2 Le Western-blot

Le Western-blot est une technique séparative des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les protéines sont soumises à un champ électrique : c'est une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de LDS suivie d'un électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. Les glycoprotéines d'intérêt sont ensuite révélées par immuno-révélation [5] (Annexe).

2.2.1 Préparation des échantillons

Pour déposer une quantité d'environ 15 ng de protéines dans le puits du gel, il faut doser les glycoprotéines (Trf, Hpt, AAT et Oroso) sur l'automate VISTA (automate de biochimie générale ; dosages par néphélométrie). Suivant les résultats obtenus, des dilutions sont réalisées afin d'obtenir une concentration de 3 ng/µL.

Avant le dépôt des dilutions, il faut rajouter les réactifs suivants :

- nupage LDS (dodécyl-sulfate de lithium) : c'est une molécule qui se fixe sur les protéines et leur confère une charge négative. Cette charge négative permet aux protéines de migrer vers l'anode. La distance de migration des (glyco)protéines est inversement proportionnelle à leur masse. Cette solution contient également du glycérol qui alourdit le prélèvement et lui permet de rester dans le puits.
- nupage sample reducing agent : c'est une solution réductrice dénaturante qui rompt les ponts disulfures des protéines ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Cette linéarisation leur permet de migrer de façon optimale.

2.2.2 La migration

La migration est effectuée dans une cuve d'électrophorèse équipée de deux bornes : une cathode (pôle négatif) et une anode (pôle positif). Le dépôt est réalisé à la cathode. La migration dure de 70 à 80 min à 200 volts.

2.2.3 Le transfert

Afin de permettre la reconnaissance par les anticorps, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert correspond à la migration des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose. Le transfert dure 70 minutes à 100 volts.

2.2.4 L'immuno-révélation

Il est possible d'identifier les protéines sur la membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps spécifiques (Fig. 8). Après saturation des sites de fixation non spécifiques des anticorps sur la nitrocellulose par des protéines de lait, la révélation est réalisée en deux étapes. Tout d'abord, avec des anticorps primaires (de lapin) spécifiques des protéines recherchées et ensuite avec un anticorps secondaire (anti-lapin) marqué à la peroxydase qui hydrolyse le luminol (émission de photons) permettant la détection des protéines d'intérêt par la caméra Chemidoc XRS+.

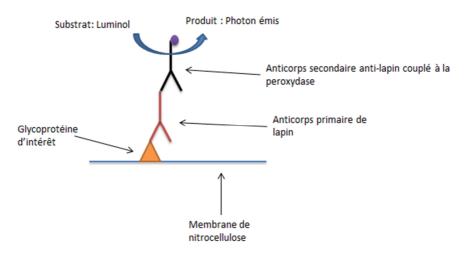


Figure 8 Réaction d'immuno-révélation

2.3 L'Électrophorèse bi-dimensionnelle (2D)

L'électrophorèse 2D est une combinaison de 2 électrophorèses : une isoélectrofocalisation (IEF) qui sépare les glycoprotéines selon leur point isoélectrique (pl) et un Western-blot (tel que défini ci-dessus) qui sépare les glycoprotéines selon leur masse moléculaire (Fig. 9). Ces deux séparations rendent le Western-blot 2D très résolutif. Cette technique permet de révéler des variations qualitatives (isoformes de glycosylation) des protéines étudiées sous forme de spots [6].

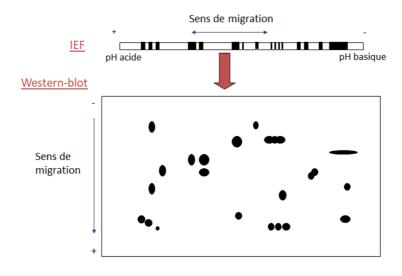


Figure 9: Western-blot 2D

2.3.1 L'Isoélectrofocalisation (IEF)

L'IEF permet de séparer les glycoprotéines en fonction de leur point isoélectrique (pl). Selon leur pl, les protéines dans le gel d'IEF sont chargées négativement ou positivement à un pH donné (- si pH>pI; + si pH<pI). Sous l'effet d'un champ électrique elles vont se déplacer pour atteindre le pH correspondant à leur pI et vont s'arrêter de migrer (charge nulle).

Pour que l'IEF fonctionne de façon optimale on mélange le plasma du patient pré-dilué à une solution de réhydratation contenant de l'urée, du CHAPS, du dithiothréitol (agent réducteur rompant les ponts disulfures), des ampholytes et de l'orange G (Annexe III).

2.3.2 Le Western-blot

Après l'IEF, les protéines dans les gels sont traitées successivement par 2 tampons. Le premier tampon est composé de nupage LDS sample buffer + *nupage sample reducing agent*. Le second tampon et composé de de nupage LDS sample buffer + iodoacétamide. L'iodoacétamide est ici utilisé pour empêcher la reformation des ponts disulfure permettant le maintien de la dénaturation des protéines.

Le gel d'IEF est ensuite placé dans le puits d'un gel de Western-blot. La migration se fait sous 200 volts pendant 1 h. Le transfert et l'immuno-révélation sont identiques au Western-blot classique. À signaler ici que les glycoprotéines d'intérêt (Tfr, Hpt, AAT et oroso) sont révélées simultanément sur la même membrane.

3. Résultats et interprétation

3.1 Les patients

Le laboratoire de biochimie de l'hôpital Bichat est un centre de référence national pour le dépistage et le diagnostic des CDG. Dans ce cadre, j'ai été sollicitée pour déterminer si les anomalies de glycosylation retrouvées dans la cirrhose étaient susceptibles d'être à l'origine de résultats faussement positifs pour le dépistage des CDG. **13** tubes de plasma de patients m'ont été confiés (2 ; 10 ; 13 ; 14 ; 17 ; 18 ; 20 ; 22 ; 23 ; 28 ; 32 ; 33 ; 34). Les N-glycanes de ces patients ont été préalablement analysés par spectrométrie de masse dans un laboratoire du CEA de Saclay (équipe du Dr François Fenaille).

Ces échantillons ont été analysés en première intention sur l'automate Capillarys, en seconde intention par la technique de Western-blot et pour finir, par Western-blot 2D. Les résultats obtenus ont été analysés et comparés à des contrôles CDG positif et/ou négatif. Ils ont été ensuite comparés aux résultats de spectrométrie de masse.

3.2 Capillarys

La figure 10 représente un profil normal d'électrophorèse capillaire de la Trf et la figure 11 représente le profil obtenu pour le patient 2.

Témoin normal:

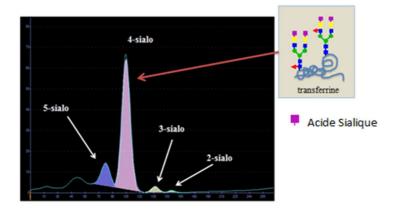


Figure 10 : Electrophorèse capillaire de la transferrine normale

Patient 2:

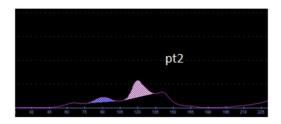


Figure 11: exemple de profil de la Trf (Pt.2)

Les 13 tubes des patients ont été analysés sur l'automate Capillarys. Les résultats obtenus présentent tous des profils similaires à celui du patient 2 (Annexe IV). Ces profils ne sont pas interprétables ce qui suggère la présence d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique) qui est un anticoagulant incompatible avec la technique de l'électrophorèse capillaire de l'automate Capillarys. L'EDTA est un chélateur de métaux, il perturbe certainement la saturation en fer des glycoformes de la Trf.

3.3 Western-blot

Les résultats attendus en Western-blot pour les glycoprotéines d'intérêt sont les suivants [5] :

- Pour les patients sans anomalie de la glycosylation : la Trf, l'AAT et l'oroso présentent 1 bande tandis que l'Hpt présente 2 bandes (Fig. 12).
- Pour les patients CDG-I: l'AAT et l'oroso présentent 2 bandes, la Trf peut présenter 2 à 3 bandes, l'Hpt présente 3 bandes (Fig. 12). La très grande majorité des CDG-II ne sont pas détectables par Western-blot (variations de masse moléculaire trop faibles)

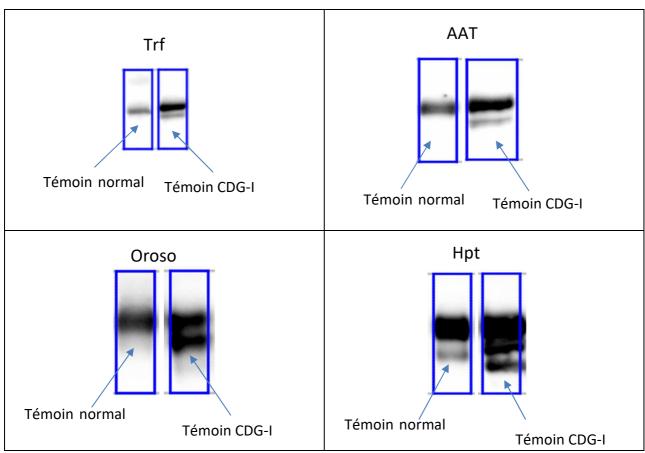


Figure 12: WB de la Trf, AAT, oroso et Hpt de patients normaux et CDG-I

Les résultats obtenus pour les patients sont présentés dans les figures ci-dessous :

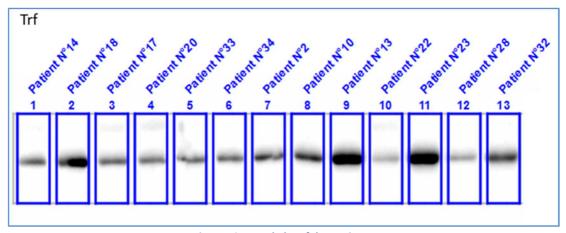


Figure 13: WB de la Trf des patients

Les patients 14 ; 17 ; 20 ; 33 ; 34 ; 2 ; 10 ; 22 ; 28 et 32 possèdent une seule bande (Fig. 13), ils ne présentent pas d'anomalie de la glycosylation évocatrice d'un CDG-I pour la Trf.

Les patients 18 ; 13 et 23 ont une bande trop intense c'est-à-dire une concentration de la Trf trop élevée (Fig. 13).

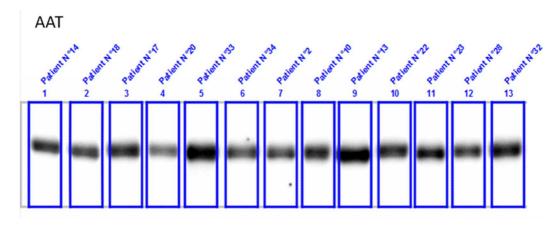


Figure 14: WB de l'AAT des patients

Les patients 14 ; 17 ; 20 ; 33 ; 34 ; 2 ; 10 ; 22 ; 28 et 32 possèdent une seule bande (Fig. 14), ils ne présentent pas d'anomalie de glycosylation évocatrice d'un CDG-I pour l'AAT.

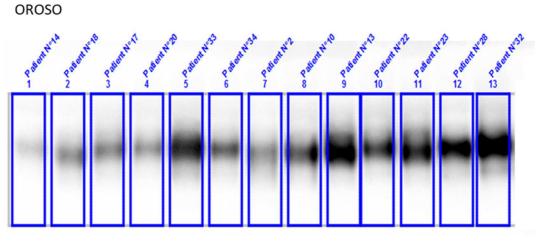


Figure 15: WB de l'oroso des patients

Tous les patients possèdent une seule bande, ils ne présentent pas d'anomalie de la glycosylation évocatrice d'un CDG-I pour l'oroso (Fig. 15).

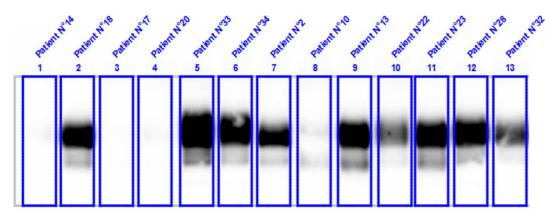


Figure 16:

WB de l'Hpt des patients

Les patients 18 ; 33 ; 34 ; 2 ; 13 ; 23 ; 22 ; 28 et 32 possèdent deux bandes, ils n'ont pas d'anomalie de la glycosylation évocatrice d'un CDG-I pour l'Hpt (Fig. 16). Pour les patients 14 ; 17 ; 20 et 10 aucune bande n'est visible. Cela peut être lié à une dilution trop forte de l'Hpt. Une nouvelle analyse a été réalisée avec des dilutions plus faibles mais sans succès (non montré). Les patients 14 et 10 ont toujours une Hpt en très faible quantité et les patients 17 et 20 n'ont toujours pas d'Hpt détectable ce qui ne permet pas d'interpréter les résultats.

Bilan des résultats du Western-blot

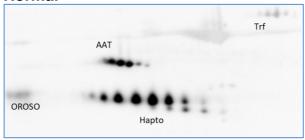
Si au moins 3 glycoprotéines sur 4 sont interprétables et sont normales il est alors rendu : « profil normal n'évoquant pas un CDG de type 1 ». Si au moins 3 glycoprotéines sur 4 présentent un nombre de bande supérieure à la normale, il est alors rendu : « profil évoquant un CDG de type 1 ». Dans les cas intermédiaires, un nouveau prélèvement est souvent demandé.

Les profils des 13 patients n'évoquent donc pas un CDG de type 1.

3.4 Western-blot 2D

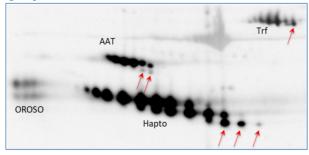
Résultats des témoins

Normal



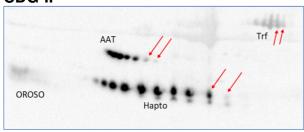
En 2D, on distingue 5 à 6 spots pour l'AAT, 3 à 4 spots pour la Trf, 2 « trains » de spots horizontaux pour l'Hpt.

CDG-I



Les spots supplémentaires (flèches rouges) présentent une masse moléculaire plus faible et des pl plus élevés correspondant à l'absence de chaines N-glycane entières.

CDG-II

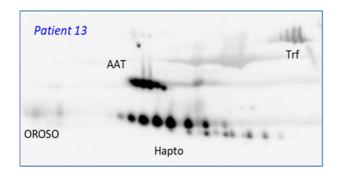


Les spots supplémentaires (flèches rouges) présentent essentiellement des variations de pl correspondant à un défaut de sialylation terminale des N-glycanes.

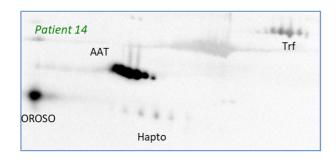
Dans ces profils 2D ainsi que dans les suivants, l'oroso est le plus souvent non-interprétable (pl < 4.0).

Résultats des patients :

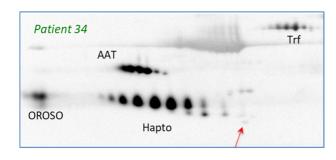
Les résultats des 13 patients sont résumés ci-dessous à partir d'exemples représentatifs :



L'AAT, l'Hpt et la Trf présentent des profils comparables au témoin normal. Le patient 13 est normal. Les patients 2; 10; 18; 22; 23; 28; et 32 présentent un profil similaire.

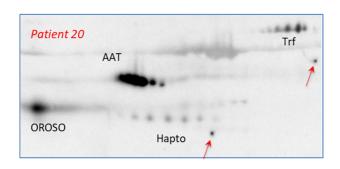


L'Hpt est trop faible pour être interprétée. L'AAT est comparable au témoin normal. Trf normale. Le patient 14 est normal. Le patient 17 présente le même profil.



L'AAT est comparable au témoin.

Le spot supplémentaire (flèche) sur l'Hpt suggère un CDG-I. Trf normale. Le patient 33 présente un profil similaire (discrète anomalie sur l'Hpt).



L'AAT est comparable au témoin.

Les spots supplémentaires (flèches) correspondent à du « bruit de fond ». Trf normale. Le patient 20 est considéré comme normal.

Bilan des résultats du western-blot 2D

L'Hpt et l'AAT sont les 2 glycoprotéines les plus sensibles pour le dépistage d'une anomalie de la glycosylation sur un western-blot 2D [6]. Si aucune anomalie n'est retrouvée sur l'Hpt et l'AAT, alors les patients sont considérés comme normaux. Les patients 14 ; 18 ; 17 ; 20 ; 2 ; 10 ; 13 ; 22 ; 23 ; 28 et 32 sont considérés comme

normaux. Les patients 33 et 34 montrent une discrète anomalie isolée sur l'Hpt. Limitée à une seule glycoprotéine parmi 4, ce résultat ne suggère pas une anomalie **majeure** de la glycosylation.

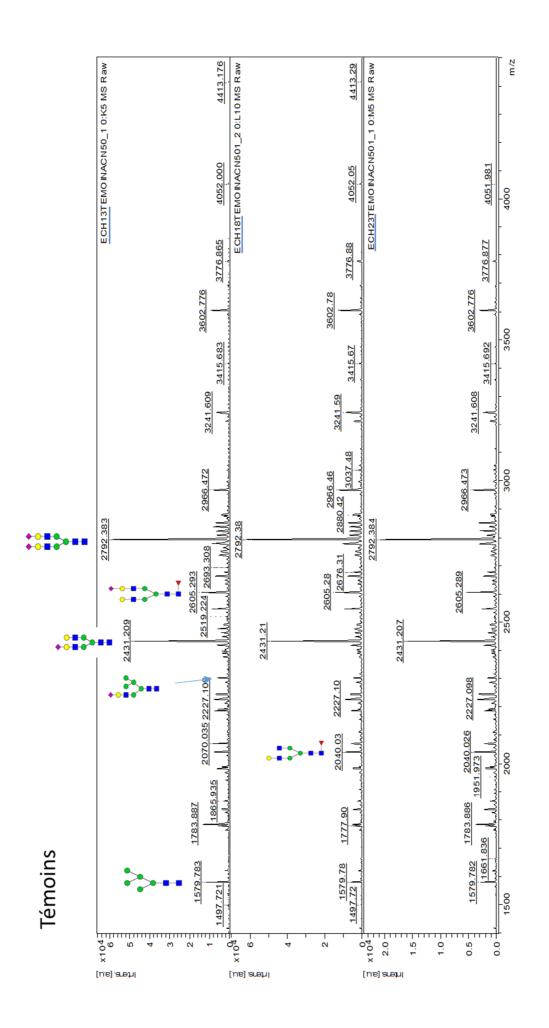
3.5 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

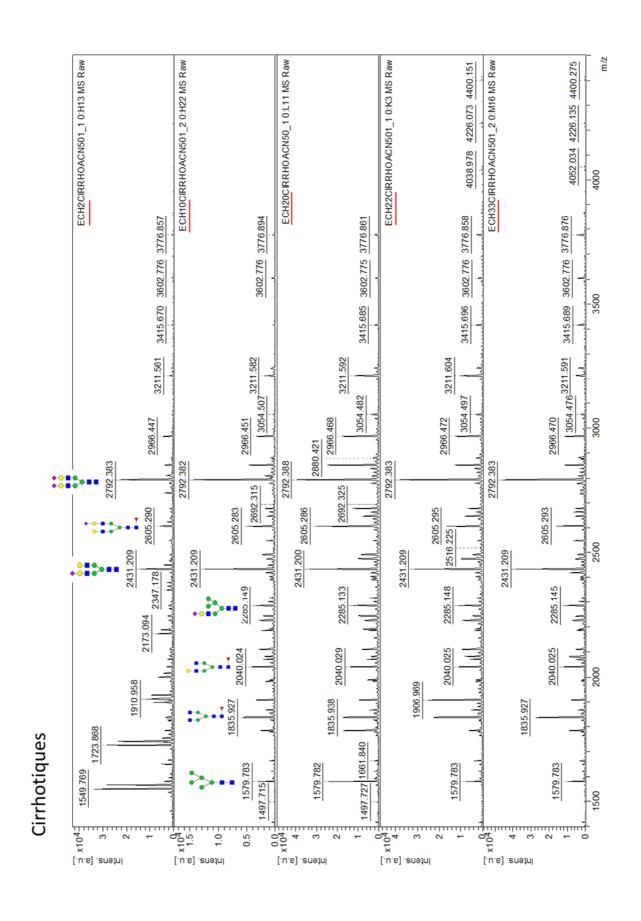
Le laboratoire du CEA de Saclay (Dr F. Fenaille) nous a transmis les caractéristiques des patients et leurs résultats de spectrométrie de masse MALDI-TOF des N-glycanes. Le principe de cette analyse est présenté dans l'Annexe X [7]. Les patients 13 ; 18 et 23 sont normaux. Les patients 2 ; 10 ; 20 ; 22 ; et 33 sont des patients cirrhotiques. Les patients 14 ; 17 ; 28 ; 32 ; et 34 sont des patients cirrhotiques avec encéphalopathie hépatique.

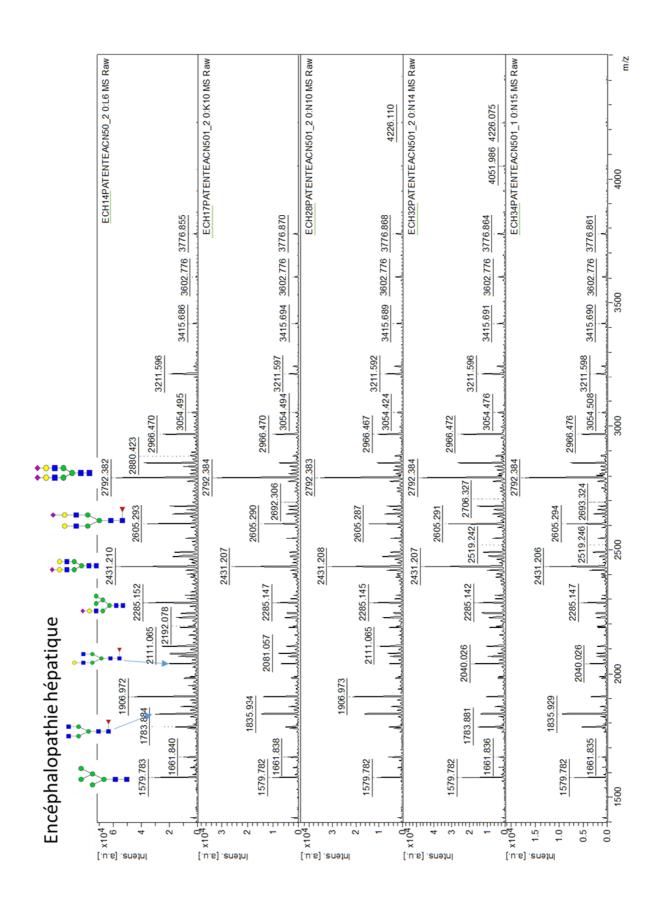
J'ai analysé les différents profils de spectrométrie de masse et ai choisi certains pics représentatifs (Fig. 18 ; 19 et 20). Chaque pic à un m/z donné correspondant à une structure N-glycane. Pour tous les patients, les pics à 2792 et 2431 sont majoritaires. Le pic à m/z = 2792 correspond à la forme majoritaire à 2 antennes portant chacune un acide sialique terminal. Celui à 2431 correspond à 2792 moins un acide sialique. Les pics à gauche de ces pics majoritaires correspondent à des formes immatures hyposialylées.

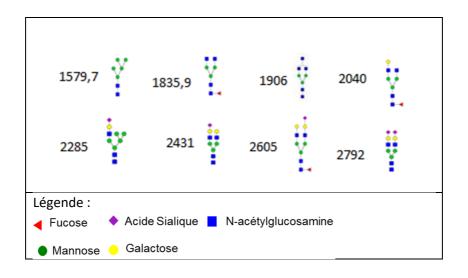
Sans rentrer dans les détails, il apparait clairement, qu'en comparaison avec les témoins (Fig. 18), les profils des patients cirrhotiques sans ou avec encéphalopathie hépatique (Fig.19 et Fig. 20) présentent de nombreux pics de m/z inférieur à ceux des 2 structures majoritaires. Si on envisage les 3 groupes de patients, les pics additionnels sont en nombre plus important chez les patients avec encéphalopathie (Fig. 20). Ces pics correspondent à des structures N-glycanes immatures. Par exemple, les pics à 1579.7; 1835 et 2285, correspondant aux structures détaillées dans la Fig. 21, sont clairement augmentés chez les patients cirrhotiques (sans encéphalopathie). Chez les patients avec encéphalopathie (Fig. 20), de nombreux pics s'ajoutent aux 3 précédents et notamment un pic à m/z 1906.

Ainsi, ces analyses par spectrométrie de masse des plasmas des patients cirrhotiques avec ou sans encéphalopathie montrent la présence de nombreuses structures immatures évocatrices de **CDG de type 2**.









4. Discussion

Des plasmas (n=13) m'ont été confiés afin de déterminer si la cirrhose hépatique est susceptible d'être à l'origine de dépistages CDG faussement positifs. J'ai utilisé les techniques classiquement utilisé au laboratoire pour le dépistage des CDG. Les résultats de ces analyses sont les suivants :

Electrophorèse capillaire de la Trf : les résultats sont ininterprétables, il s'agit de prélèvement effectué sur EDTA ne permettant pas de séparer correctement les différentes glycoformes de la Trf. Ce fait illustre l'importance du respect des conditions pré-analytiques pour l'électrophorèse capillaire de la Trf

Western-blot: Les résultats ne sont pas évocateurs d'un CDG-I chez les 13 patients. Cette technique n'étant pas assez résolutive pour dépister les CDG-II, les prélèvements ont ensuite été analysés par électrophorèse 2D.

Western-blot 2D: La technique du western-blot 2D est plus résolutive et permet de mettre en évidence des variations de charge. Elle est cependant plus délicate et longue que les techniques précédentes. A l'exception de très discrètes anomalies observées sur l'Hpt des patients 33 et 34, cette technique n'a pas mis en évidence d'anomalies **majeures** de la glycosylation évocatrices de CDG chez tous les patients.

Spectrométrie de masse des N-glycanes : je n'ai pas réalisé cette analyse. Les résultats m'ont été transmis par le Dr François Fenaille CEA de Saclay. Il faut signaler

que cette technique permet d'analyser l'ensemble des N-glycanes présents sur l'ensemble des glycoprotéines plasmatiques. D'autre part, elle s'applique seulement aux N-glycanes fixés aux glycoprotéines (clivage enzymatique) et ne permet donc pas de mettre en évidence les CDG-I.

Chez les patients cirrhotiques avec ou sans encéphalopathie, les spectres ont montré systématiquement des anomalies évocatrices de CDG de type 2.

Cette discordance (inattendue) entre les résultats de spectrométrie de masse et ceux des analyses électrophorétiques peut s'expliquer par le fait que la spectrométrie de masse permet d'étudier les N-glycanes portés par toutes les glycoprotéines plasmatiques contrairement aux techniques électrophorétiques analysant des glycoprotéines particulières. Ainsi, il est possible que les résultats de SM traduisent l'existence d'anomalies de glycosylation portées par d'autres gp que la Trf, l'AAT, l'oroso et l'Hpt. On peut suggérer que ces anomalies puissent être portées notamment par les immunoglobulines A (IgA) qui sont très glycosylées et dont la synthèse est très augmentée en cas de cirrhose [8]. A la suite de ces résultats, une analyse spécifique de la glycosylation des IgA plasmatiques de patients cirrhotiques sera d'ailleurs entreprise dans le laboratoire.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la cirrhose hépatique n'est heureusement pas cause de résultats faussement positifs pour le dépistage des CDG tel que pratiqué à l'Hôpital Bichat. Et ceci contrairement à la spectrométrie de masse des N-glycanes qui a montré chez les patients cirrhotiques de nombreuses anomalies très évocatrices de CDG-II.

Conclusions

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la cirrhose hépatique n'est heureusement pas cause de résultats faussement positifs pour le dépistage des CDG tel que pratiqué à l'Hôpital Bichat. Et ceci contrairement à la spectrométrie de masse des N-glycanes qui a montré chez les patients cirrhotiques de nombreuses anomalies très évocatrices de CDG-II. Compte-tenu du nombre réduit de patients analysés, ces conclusions sont encore préliminaires et seront confirmées sur un nombre plus important de patients.

Ce stage fut très intéressant et enrichissant, d'un point de vue technique j'ai pu découvrir les techniques encore très manuelles des western-blot en une et deux dimensions du laboratoire spécialisé de Bichat et d'un point de vue théorique j'ai acquis de nouvelles connaissances concernant la glycosylation et les CDG.

Je suis très satisfaite du déroulement de mon stage mes objectif de stage tant personnel que professionnel ont été atteint et un personnel toujours à l'écoute et disponible pour répondre à mes interrogations et une ambiance agréable

Bibliographie

- 1. Moremen, K.W., M. Tiemeyer, and A.V. Nairn, *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 448-62.
- 2. Dupre, T., G. Lavieu, S. Moore, and N. Seta, [Inherited disorders of protein glycosylation]. Med Sci (Paris), 2004. **20**(3): p. 331-8.
- 3. Peanne, R., P. de Lonlay, F. Foulquier, U. Kornak, D.J. Lefeber, E. Morava, B. Perez, N. Seta, C. Thiel, E. Van Schaftingen, G. Matthijs, and J. Jaeken, *Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis?* Eur J Med Genet, 2017.
- 4. Parente, F., N. Ah Mew, J. Jaeken, and B.M. Gilfix, *A new capillary zone electrophoresis method for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDG)*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(1-2): p. 64-6.
- 5. Seta, N., A. Barnier, F. Hochedez, M.A. Besnard, and G. Durand, *Diagnostic value of Western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome*. Clin Chim Acta, 1996. **254**(2): p. 131-40.
- 6. Bruneel, A., F. Habarou, T. Stojkovic, G. Plouviez, L. Bougas, F. Guillemet, N. Brient, D. Henry, T. Dupre, S. Vuillaumier-Barrot, and N. Seta, *Two-dimensional electrophoresis highlights haptoglobin beta chain as an additional biomarker of congenital disorders of glycosylation.* Clin Chim Acta, 2017. **470**: p. 70-74.
- 7. Goyallon, A., S. Cholet, M. Chapelle, C. Junot, and F. Fenaille, *Evaluation of a combined glycomics and glycoproteomics approach for studying the major glycoproteins present in biofluids: Application to cerebrospinal fluid.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2015. **29**(6): p. 461-73.
- 8. Klein, A., Y. Carre, A. Louvet, J.C. Michalski, and W. Morelle, *Immunoglobulins* are the major glycoproteins involved in the modifications of total serum *N-glycome in cirrhotic patients*. Proteomics Clin Appl, 2010. **4**(4): p. 379-93.

Sommaire des Annexes

Annexe I : La technique du western-blot

Annexe II : La technique du western-blot bidimensionnel

Annexe III : Les résultats de l'électrophorèse de la Trf

Annexe IV: Les résultats du western-blot 2D

Annexe V : Principes de la spectrométrie de masse MALDI-TOF des N-glycanes

plasmatiques

Annexe II La technique du western-blot

1. OBJET

La recherche d'un CDG (Congenital Disorder of Glycosilation) : western-blot des N-glycoprotéines sériques s'effectue par **western-blot** des 4 N-glycoprotéines sériques (transferrine, alpha1-antitrypsine, alpha1-glycoprotéine acide, haptoglobuline) et i**mmunorévélation des protéines fixées sur membrane de nitrocellulose**

Le Western Blot est une séparation des protéines par électrophorèse par la masse en gel de polyacrylamide en présence de SDS suivie d'un électrotransfert de ces dernières sur une membrane de nitrocellulose. La protéine étudiée est ensuite révélée par immunorévélation.

2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNÉES

Ce mode opératoire est destiné:

- aux techniciens du secteur glycosilation
- à l'interne rattaché au secteur glycosilation

3. DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

4. **DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS** (le cas échéant)

CDG: Congenital Disorder of Glycosilation

AAT: Alpha1- antitrypsine

TRF: Transferrine Hpt: Haptoglobine

Oroso: Alpha1-glycoprotéine acide ou Orosomucoïde

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminoethane

5. MATÉRIELS (le cas échéant)

Préparation des échantillons

- -Nupage LDS sample
- -Nupage sample reducing

Migration :

- -2 Xcell Surelock (cuve)
- -2 gel tension cam
- -2 buffer core
- -4 Nupage 4-12% bis-tris gel 1.0mm x 15 well
- -1 micro seringue
- -1 générateur
- -Mops SDS running buffer
- -Nupage antioxydant
- -Low range, marqueur de migration

Transfert :

- -1 générateur
- -2 Xcell surelock
- -2 gel tension cam

- -2 Xcell II blot module
- -Filter paper: papier buvard
- -Membrane de nitrocellulose
- -Sponge pad : scotch brite
- -1 couteau à gel
- -Nupage transfer buffer
- -Nupage antioxydant
- -Méthanol

Immunorévélation :

- -Agitateur « ping-pong »
- -Papier pH
- -Tween 20
- -Tris
- -NaCl
- -HCl pur à 37%
- -Lait en poudre écrémé
- -Anticorps primaires: Transferrine humaine

α1-antitrypsine humaine Haptoglobine humaine Anti-orosomucoïde humaine

-Anti-rabbit IgG

-ECL

Localisation du matériel et des réactifs cf Annexe « Localisation du matériel pour le Western Blot »

6. DESCRIPTION DU PROCESSUS

6.1 Prélèvements

Type

Cette technique peut être effectuée à partir de sérum, plasma ou spot test (papier buvard imprégné de sang).

Les sérums et plasmas sont décantés, pour les spots tests, on reprend une tache de sang dans du sérum physiologique (entre 400 et 100 μl en fonction de la taille du spot).

Conservation des échantillons

-Avant dosage:

-les prélèvements sont centrifugés et gardés à 4°c

-Après dosage:

-pour les CDG-, les prélèvements décantés sont conservés à -20° c dans le congélateur G pendant 5 ans, et les spots tests sont conservés dans un sachet plastique (1 sachet par semaine) à température ambiante, pendant 2 ans.

-pour les CDG+, les prélèvements sont aliquotés par 20µ1, pour servir de témoins positifs ultérieurement, à -20°c dans le congélateur G, et les spots tests sont conservés dans un sachet plastique spécial CDG+, à température ambiante.

Préparation des échantillons

Le dosage des glycoprotéines est effectué sur le Vista (Siemens) : cf MO « Utilisation du Vista pour la Glyco »

En fonction des concentrations obtenues pour chaque protéine, il faudra effectuer des dilutions pour obtenir une concentration finale de 0.003g/l.

Les dilutions sont déterminées à partir du tableau suivant :

Concentration en g/l	Dilutions
4,5	1/1500
4	1/1300
3,5	1/1150
3	1/1000
2,5	1/800
2	1/650
1,5	1/500
1	1/250
0,5	1/100
0,25	1/40
0,10	1/10

Pour les prélèvements insuffisants, qui n'ont pas pu être dosés, on effectue des dilutions approximatives :

-AAT : 1/250 -TRF : 1/400

-Oroso et Hpt: 1/100

Pour les spots tests les dilutions sont les suivantes :

-AAT et TRF: 1/10 -Oroso et Hpt: 1/5

- -Préparer ensuite la feuille de dilutions, en notant les numéros des échantillons et les dilutions correspondantes. (chaque série de chaque glycoprotéine comporte 13 échantillons + un témoin positif)
- -Préparations des portoirs et des eppendorfs :
 - -prendre un portoir pour chaque glycoprotéine
 - -numéroter les eppendorfs nécessaire aux dilutions (exp. a2, a3,)
- -Préparation des dilutions : ATTENTION volume minimum de 40 μ1
 - -mettre le volume d'eau distillée correspondant à la dilution (exp : $1/400 = >400 \mu l$)
 - -ajouter 1 µl d'échantillon
 - -vortexer
 - -faire une remise à niveau : le volume final de la dilution doit $\,$ être de $40\,\mu l$

A ce niveau les dilutions peuvent être conservées à 4°c pendant 24h ou à -20°c pendant 1 mois.

- -Préparations des échantillons pour le dépôt :
 - -ajouter 40 µl de Nupage LDS sample
 - -ajouter 8 µl de Nupage sample reducing
 - -vortexer
 - -Mettre chaque portoir pendant 10 minutes à 70°c dans le bain-marie

L'échantillon est prêt à être déposé.

6.2 Migration

• Préparation du tampon

Mops SDS running buffer 80 ml H2O qsp 1600 ml Reprendre 400 ml et ajouter 1 ml d'antioxydant Réserver le reste pour la suite

Préparation et montage des gels

Préparation des gels :

- -sortir le gel de son emballage
- -retirer la languette blanche au bas du gel
- -retirer délicatement le peigne du gel
- -rincer les puits à l'eau distillée

Montage des gels:

- -mettre un gel de chaque côté du buffer core, les puits vers l'intérieur
- -placer le tout dans un Xcell surelock, de telle sorte que l'anode et la cathode soient en contact
- -assuré l'étanchéité du montage en clampant le Gel tension cam à l'arrière du buffer core
- -remplir la chambre interne (formé par le buffer core entouré des gels) avec du tampon de migration contenant l'antioxydant, jusqu'à ce que les puits soient recouvert (~200 ml)
 - -remplir le reste du Xcell surelock avec le tampon de migration sans antioxydant
- -effectuer le dépôt (1° puit $10~\mu l$ de marqueur low range, des puits 2~a 14~mettre $14~\mu l$ d'échantillon, $8\mu l$ pour l'Oroso et dans le 15° puit déposer $10~\mu l$ du témoin +)
 - -mettre le couvercle en place
 - -brancher les électrodes sur le générateur
 - -faire migrer pendant 75 à 80 min à 200 volts

6.3 Transfert

• Préparation du tampon de transfert :

- Nupage transfer buffer 50 ml

Nupage antioxydant
 méthanol
 H2O
 qsp 1000 ml

Conserver le tampon au frigo ainsi qu'une bouteille d'eau distillée.

Préparation du « sandwich »

- -découper 8 papiers buvard de la taille des scotchs brite, ainsi que 4 membranes de nitrocellulose en y faisant des coches comme pour les gels
- -faire tremper les membranes dans du tampon de transfert
- -à la fin de la migration, éteindre le générateur
- -retirer le couvercle
- -déclamper le gel tension cam
- -retirer les gels
- -désassembler les gels en insérant le couteau dans chaque arrêtes de la cassette et faire levier pour casser les soudures plastiques
- -découper les gels pour enlever le surplus (exemple : les puits) et faire des coches pour les

différencier : -TRF : pas de coche -AAT : 1 coche -HPT : 2 coches

-OROSO: 3 coches

- -faire tremper les gels dans le tampon de transfert
- -dans le Xcell II blot module, mettre 2 scotch brite imbibés de tampon
- -faire glisser un gel sur un papier buvard imbibé de tampon de transfert et le mettre dans le Xcell II blot module
- -y mettre un peu de tampon de transfert
- -y déposer la membrane correspondant au gel
- -passer délicatement le doigt sur la membrane pour supprimer les bulles éventuelles
- -mettre un papier buvard imbibé de tampon de transfert
- -mettre deux scotch brite imbibés de tampon
- -mettre de nouveau un papier buvard avec un gel
- -y mettre un peu de tampon de transfert
- -y déposer la membrane correspondante
- -passer à nouveau le doigt pour supprimer les éventuelles bulles
- -mettre un papier buvard imbibé de tampon
- -compléter avec des scotch brite jusqu'à ce que ça dépasse légèrement du Xcell II blot module de telle façon qu'il y ai pression quand on met le couvercle
- -mettre le « sandwich » ainsi formé dans le Xcell surelock de telle sorte que l'anode et la cathode soient en contact
- -insérer le gel tension cam et le clipser pour assurer l'étanchéité du montage
- -remplir le Xcell II blot module avec du tampon de transfert jusqu'à immersion du « sandwich »
- -remplir le Xcell surelock avec le reste de tampon de transfert et compléter avec de l'eau distillée froide
- -mettre le couvercle
- -brancher les électrodes sur le générateur
- -faire migrer 70 minutes à 100 volts

6.4 IMMUNOREVELATION

• Préparation des tampons et des anticorps

• Tampon 10X:

Tris 200 mmol/l 48,4g
NaCl 5 mol/l 590g
H2O qsp 2 L
pH ajusté à 7,5 avec HCl

• TBS:

Tampon 10X 100 ml H2O qsp 1000 ml

• <u>TTBS:</u>

 Tampon 10X
 100 ml

 Tween 20
 1 ml

 H2O
 qsp 1000 ml

• TTBS-lait:

lait écrémé en poudre 10 g TTBS qsp 100 ml

• anticorps primaires :

Diluer chaque anticorps au 1/3000 TTBS 30 ml chacun des anticorps 10 µl

• anticorps secondaire:

Diluer l'Anti-rabbit IgG au 1/5000

TTBS 50ml anticorps Anti-rabbit IgG 10 µl

• Préparation des membranes pour le marquage spécifique

-à la fin du transfert mettre les membranes à tremper dans du TBS pendant 5 min (pour neutraliser le méthanol)

∧ Mettre la face de la membrane en contact avec le gel en surface

- -ensuite dans un plateau contenant le lait, y transférer les membranes (bloque les sites additionnels de fixation)
- -laisser les membranes dans le lait jusqu'au lendemain

Marquage spécifique

- -faire des bains rapides de TTBS pour éliminer le lait
- -mettre les membranes dans quatre plateaux différents
- -ajouter l'anticorps correspondant à chaque membrane
- -agiter 1 heure entre 50 et 60 oscillations/min
- -rincer avec du TTBS pendant 1 heure entre 60 et 70 oscillations/min, en effectuant plusieurs bains
- -mettre les membranes dans un même plateau
- -ajouter l'anticorps secondaire
- -agiter 1 heure entre 50 et 60 oscillations/min
- -rincer avec du TTBS pendant 1 heure entre 60 et 70 oscillations/min, en effectuant plusieurs bains
- -mettre les membranes dans du TBS

Révélation

- -allumer la caméra pour qu'elle chauffe
- -dans un tube conique de 6 ml préparer l'ECL : mettre 3 ml des deux flacons du kit ECL
- -agiter
- -mettre en contact 1 min avec les membranes
- -jeter l'ECL
- -révéler dans l'heure

Annexe III: la technique du western-blot bidimensionnel

OBJETS

Electrophorèse bi-dimensionnelle (2D) suivie d'un *Western-blot*. Mise en évidence des isoformes de 4 glycoprotéines par immunorévélation.

DOCUMENT DE RÉFÉRENCE

Bruneel A., Robert T., Lefeber D.J., Benard G., Loncle E., Djedour A., Durand G., Seta N. 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.* 2007;1:321-324.

DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

DTT: Dithiothreitol

IEF : Isoélectrofocalisation SDS : Sodium dodécyle sulfate

MATÉRIELS

> Isoélectrofocalisation (IEF) :

- Urée (placard)
- CHAPS (Frigo)
- ZOOM Carrier Ampholytes pH 4-7 (Frigo)
- DTT (frigo)
- Orange G (placard)
- Gels d'IEF 4.0 7.0 (ZOOM Strip, pH 4.0-7.0) (congélateur -30)
- ZOOM IPGRunner Mini-Cell
- ZOOM IPGRunner Cassettes
- Electrode Wicks (papiers filtre pour électrodes)
- Sealing tape (autocollants pour réhydratation à l'abri de l'air)
- Vortex
- Mini-centrifugeuse
- Une aiguille de seringue

> SDS PAGE

- Nupage 4-12% bis-tris gel IPG well

Tampon de migration:

- **MOPS** SDS running buffer 20X

120 ml

- H2O distillée

qsp 2400 ml

Reprendre 600 ml et y ajouter 1.5 ml d'antioxydant (Nupage antioxydant) Réserver le reste pour la suite

6. DESCRIPTION DU PROCESSUS

> Prélèvements :

-Sérum/plasma

Diluer le sérum/plasma au $1/10^{\text{ème}}$ dans de <u>l'eau déminéralisée</u> (10+ 90 ou 5 + 45 ou 1+9) et déposer **2** μ L de la dilution.

- spot-test

Reprendre un rond de perforatrice dans 100 µL d'eau déminéralisée et déposer 10 µL de l'éluat

6.1 IEF (1^{ère} dimension):

Préparation de la solution de réhydratation (idem apoC-III):

- Urée (GE healthcare, T amb) = 4.8 g - CHAPS (+4°) = 0.4 g - DTT 50 mM (+4°) = 77 mg - Ampholytes 0.5 % (4-7) (+4°) = 50 μL

- Orange G une pointe de cône p1000

Eau déminéralisée (bouteille) QSP 10 mL

A aliquoter en fractions de 160 μL à conserver à - 30 °C dans le congélateur « FRI 189 »

> Préparation des échantillons pour l'IEF des glycoprotéines :

Une série d'IEF comporte 5 patients et 1 témoin négatif

- Sortir les prélèvements du congélateur, les laisser décongeler
- Sortir les solutions de réhydratation (1 par prélèvement)
- Après décongélation, vortexer puis centrifuger
- Attention ! Bien identifier les solutions de réhydratation

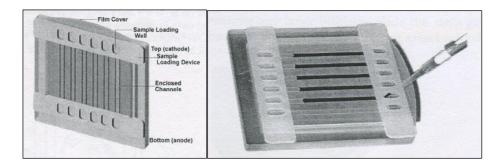
Mélanger $\underline{2 \ \mu L}$ (sérum/plasma dilué au $1/10^{\rm ème}$) ou $\underline{10 \ \mu L}$ (rond perforatrice repris dans $100 \ \mu L$ eau déminéralisée) de chaque prélèvement à la solution de réhydratation lui correspondant.

> Isoélectrofocalisation des glycoprotéines :

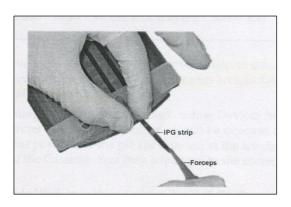
- Sortir les gels d'IEF (pH 4.0-7.0) du congélateur quelques minutes avant de préparer l'IEF.

Réhydratation:

- Poser une **cassette** (*ZOOM IPGRunner Cassettes*) sur une surface plane (**partie arrondie à droite**).
- Numéroter les puits au feutre indélébile (n°1 en haut, n°6 en bas)
- Pipeter délicatement dans chaque puits <u>155 μL</u> de la solution de réhydratation contenant l'échantillon (photo) ; **positionner incliné l'embout de pipette**. Oter les bulles avec l'aiguille. **ATTENTION AUX BULLES!**



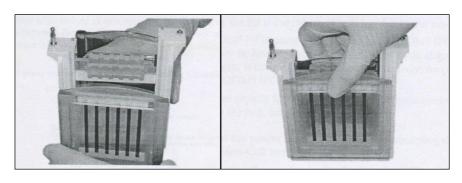
- Détacher délicatement un gel d'IEF de son conditionnement (prendre le gel <u>par l'extrémité négative</u>; le film protecteur reste normalement collé; à vérifier) le retourner et l'insérer délicatement (**gel vers le haut**) par l'extrémité positive dans une rigole de la cassette (photo). Les écritures sur le gel ne doivent pas être lisibles. Prendre garde aux bulles à l'intérieur de la rigole; si besoin, les faire sortir (les pousser délicatement) avec le gel d'IEF.



- Répéter l'opération pour les autres gels
- Une fois les 6 gels insérés, boucher les puits à l'aide de 2 autocollants « Invitrogen ».
- Laisser réhydrater pendant au moins 1 heure.

Isoélectrofocalisation:

- Retirer les autocollants « Invitrogen », tenir fermement la casette à plat et arracher les 2 languettes portant les puits.
- Appliquer précisément (traits noirs) un papier « électrode » (*electrode wick*) sur les 2 surfaces adhésives découvertes. **Appuyer sans excès**.
- Pipeter 600 µL d'eau déminéralisée sur chaque papier.
- Assembler les 2 cassettes dans le *IPG Runner* (couvercle violet ; photos). Les papiers doivent se trouver dans le compartiment **interne**. Le compartiment interne doit **absolument** rester vide. A contrôler en disposant dans le réservoir interne une étroite languette de sopalin qui doit rester sèche lors de la prochaine étape.



- Remplir le compartiment <u>externe</u> avec 600 mL <u>d'eau du robinet</u>.
- Vérifier l'absence d'eau dans le compartiment interne (sopalin ; à retirer)
- Mettre le couvercle
- Appliquer le protocole IEF apoC-III (générateur Bio-Rad spécial IEF)
- Une fois l'IEF achevée, mettre <u>rapidement</u> la cassette à -80°C
 (dans sac plastique fermé avec liste patients et sachet déshydratant)

2ème Partie de la 2D : PAGE-SDS

Conditionnement des gels d'IEF:

- Préparer les tampons pour le conditionnement

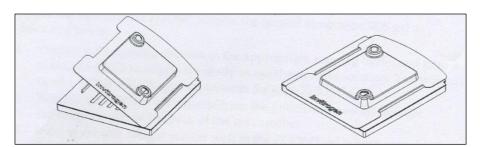
Tampon 1: 5 mL 4X NuPAGE LDS sample buffer (solution bleue idem WB) + 15 mL **d'eau distillée = 20 mL de tampon** 1X.

Tampon 2: 1 mL NuPAGE Sample reducing Agent (10 X) + 9 mL de 1X NuPAGE LDS Sample buffer (Tampon 1).

Tampon 3: 10 mL de Tampon 1 + 232 mg de iodoacétamide (+ 4° frigo).

Sortir du congélateur -80° une cassette contenant 6 gels

- Laisser décongeler les 6 gels dans la cassette pendant <u>5 à 10 minutes maximum</u>
- Tenir fermement la cassette à plat et arracher le film plastique portant les papiers. **Commencer** par le haut de la cassette.
- Coller un ZOOM *equilibration tray* sur la cassette (photo). <u>Bien appuyer</u> pour assurer une bonne étanchéité (avec l'extrémité d'un cône eppendorf).



NE PAS LAISSER ATTENDRE LES GELS D'IEF DECONGELES !!!

- verser le **tampon 2** dans le *tray* et incuber sous agitation pdt 10 minutes.
- remplacer le tampon 2 par le **tampon 3** et incuber sous agitation pdt 10 minutes.

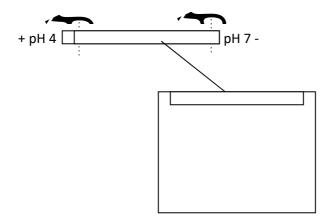
7. PAGE-SDS

Pendant le conditionnement,

- préparer le tampon MOPS (à partir du 20 X ; 800 mL par cuve) : PREVOIR 3 CUVES SOIT 2400 mL = 120 mL de MOPS 20x + 2280 ml d'eau distillée.
- Préparer une solution d'agarose (placard) à 0.5 % (0.25 g dans 50 mL) **dans le tampon MOPS** (sans anti-oxydant) et la faire chauffer jusqu'à limpidité.
- Préparer 6 gels PAGE-SDS (Nupage 4-12% bis-tris gel IPG well) et les numéroter. Rincer les puits avec le tampon (1 mL par puits) puis retirer délicatement le tampon avec une languette de papier filtre (papier Whatman).

Après conditionnement,

- vider délicatement la solution bleue (bidon à colorants)
- arracher délicatement le *Tray* puis **prendre le 1**^{er} **gel** par l'extrémité négative, le tremper dans du tampon (dans un Falcon de 50 mL), l'égoutter sur du papier filtre, couper l'extrémité plastique du côté +, et déposer délicatement le gel d'IEF au-dessus du puits du gel de seconde dimension n°1 (face plastique sur la grande plaque ; + à gauche, à droite). Couper l'extrémité plastique du côté et faire glisser délicatement le gel dans le puits du gel de seconde dimension (schéma ; avec l'aiguille ou une fine spatule).
- Eviter dans la mesure du possible que le gel d'IEF ne se plaque sur l'avant.
- Répéter la manipulation avec les 5 autres gels



- Déposer assez rapidement (au centre) 400 μL de la solution d'agarose sur les gels d'IEF.

PRENDRE GARDE AUX BULLES. La polymérisation de l'agarose est très rapide.

- Disposer les gels de seconde dimension par paire sur les supports (idem WB) et mettre **200 mL** de tampon MOPS + **0,5 mL anti-oxydant** dans le <u>réservoir central</u> et 600 mL de tampon MOPS sans anti-oxydant dans le <u>réservoir extérieur</u>.
- **Déposer le marqueur** (10 μL).
- Faire migrer sous **120 volts pendant 15 minutes** puis sous **200 volts pendant environ 45 minutes. Surveiller le front de migration** et arrêter lorsqu'il arrive en bas du gel.

Essayer dans la mesure du possible de réaliser le transfert « dans la foulée ». Eviter de trop faire attendre les gels avant transfert.

TRANSFERT: idem WB pendant 1 heure (100 Volts, 500 mA).

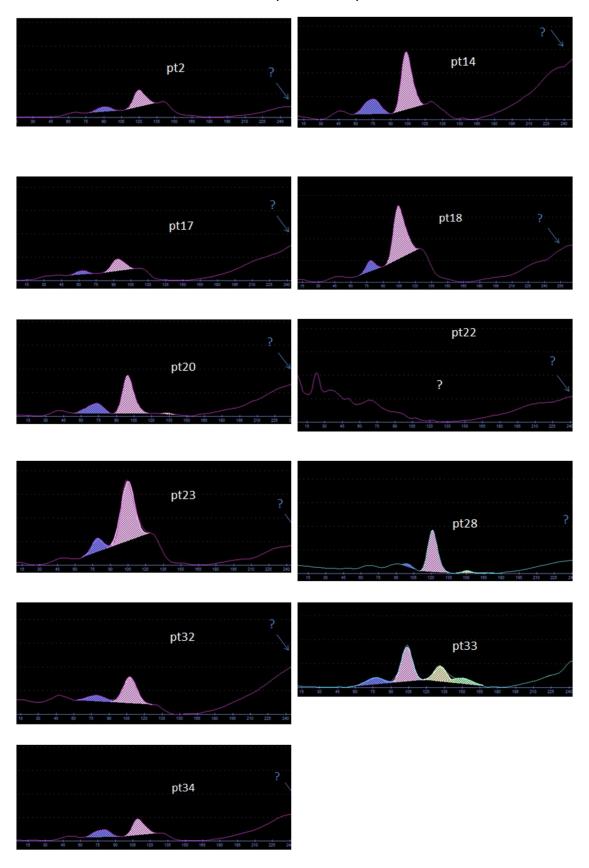
IMMUNOREVELATION: tout idem WB mais:

<u>5 ANTICORPS PRIMAIRES ENSEMBLE DANS 100 mL DE TTBS :</u>

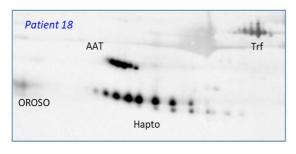
- Ac anti-Trf = $25 \mu L$
- Ac anti AAT = $\underline{10} \mu L$
- Ac anti-Hpt = $\underline{20} \mu L$
- Ac anti-oroso = $55 \mu L$
- Ac anti A1M = $75 \mu L$

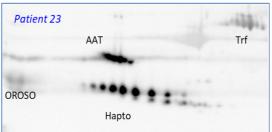
PENDANT AU MOINS 1 HEURE.

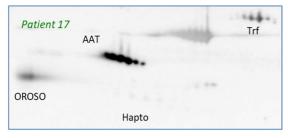
Annexe IV : Les résultats de l'électrophorèse capillaire de la Trf



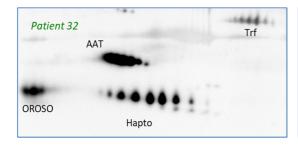
Annexe V: Les résultats du western-blot 2D

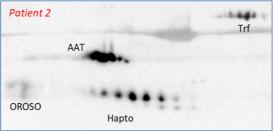


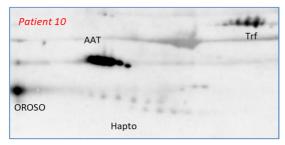


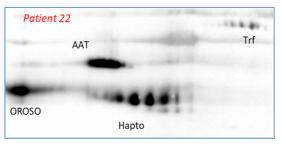


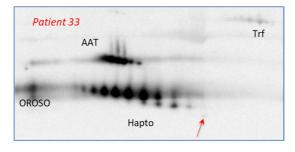




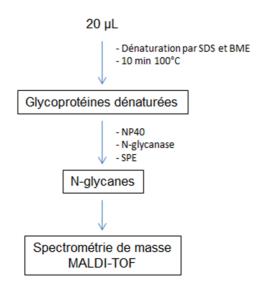








Annexe V : Principes de la spectrométrie de masse MALDI-TOF des N-glycanes plasmatiques



Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight - mass spectrometry

