



DÉPISTAGE DES ANOMALIES DE L'O-GLYCOSYLATION PAR WESTERN-BLOT BI-DIMENSIONNEL DE L'APOLIPOPROTÉINE C-III

Tiphaine Robert, Arnaud Bruneel, Geneviève Durand et Nathalie Seta

AP-HP, Service de Biochimie Métabolique et Cellulaire, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris

INTRODUCTION

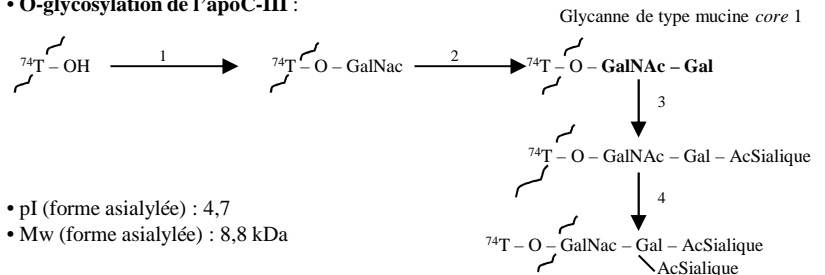
Les CDGs (*Congenital Disorders of Glycosylation*) sont un groupe de maladies génétiques rares dues à des anomalies de la N- et / ou de l'O-glycosylation des protéines. Ces pathologies présentent un tableau clinique polymorphe associant des atteintes neurologiques et multiviscérales de sévérité variable. L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) sépare les protéines selon leur point isoélectrique (pI) par isoélectrofocalisation (IEF), puis selon leur masse moléculaire (Mw) par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE-SDS). Appliquée à l'étude des isoformes de l'apolipoprotéine C-III (apoC-III), la 2-DE couplée au Western-blot permet le dépistage des désordres congénitaux de l'O-glycosylation de type mucine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Échantillon : 1 à 5 µL de sérum/plasma
- 2-DE : IEF pH 4-7 (40000 V.h)
PAGE-SDS 15%
- Transfert : 100 V pendant 50 min.
- Anticorps anti-apoC-III *Biodesign* (1/5000 v/v)
- Sialidase (Sigma) rapport 1:3 ; 1h à 37°C
- Révélation ECL (Amersham Bioscience)
- Analyse par le logiciel *Image Master Platinum* (Amersham Bioscience)

L'APOLIPOPROTÉINE C-III : une protéine uniquement O-glycosylée

O-glycosylation de l'apoC-III :



RÉSULTATS

Figure A : Séparation de l'apoC-III en 3 fractions distinctes

- spot 1 = fraction bi-sialylée (apoC-III₂)
- spot 2 = fraction mono-sialylée (apoC-III₁)
- la fraction asialylée (apoC-III₀) peut être séparée en 4 spots (3a, 3b, 3c et 3d) de même pI mais de Mw différentes.
- 3a et 3b correspondent respectivement aux formes GalNac et GalNac-Gal alors que 3c et 3d ne correspondent à aucune forme connue de la fraction asialylée.

Figure B : Sérum traité par la sialidase

- disparition des spots 1 et 2 confirmant leurs identifications respectives (apoC-III₂ et apoC-III₁)
- spot 3b augmenté en accord avec son identification comme étant la forme GalNac-Gal.

Figure C : valeurs normales établies chez l'adulte à partir de 24 sérums de témoins sains.

n = 24	%
ApoC-III ₀	1,5 (SD = 2,0)
ApoC-III ₁	52,8 (SD = 9,0)
ApoC-III ₂	45,7 (SD = 9,6)

Figure D : Étude de reproductibilité de la 2-DE sur 6 jours à partir d'un sérum témoin

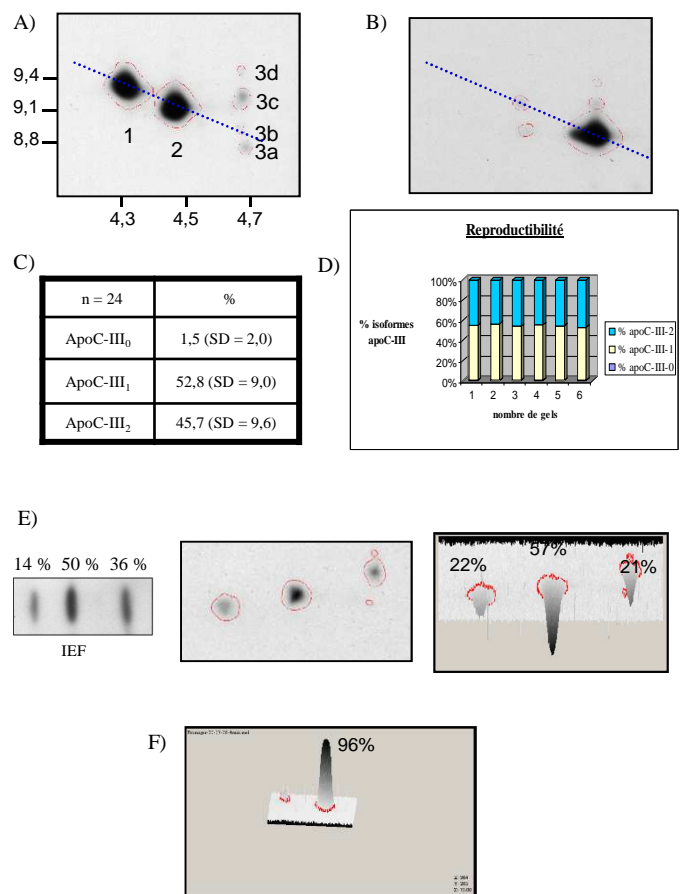
→ méthode reproductible

	% apoC-III ₀	% apoC-III ₁	% apoC-III ₂
moyenne	0,5	54,2	45,3
écart type	0,1	1,2	1,3

Figure E : Analyse d'un échantillon anormal dépisté par IEF (fraction apoC-III₀ augmentée ; Lefeber et col., Nijmegen, Pays Bas)

- confirmation de l'anomalie avec,
- En IEF : apoC-III_{0/1/2} = 36/50/14%
- En 2-DE : apoC-III_{0/1/2} = 21/57/22%

Figure F : Profil anormal de type "apoC-III₁" chez une patiente présentant, entre autres, une anomalie cutanée de type *Curtis laxa*.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La 2-DE associée au Western-blot est une technique sensible, spécifique, reproductible et relativement simple permettant le dépistage des anomalies de l'O-glycosylation de type mucine. Environ 50 sérums ont été analysés et trois cas ont montré un profil anormal dont celui présenté ici. Par ailleurs, cette approche a permis de mettre en évidence une hétérogénéité de la fraction asialylée ApoC-III₀ qui sera prochainement étudiée par spectrométrie de masse.