

LC|GC's **CHROM**academy

powered by **crawford scientific**

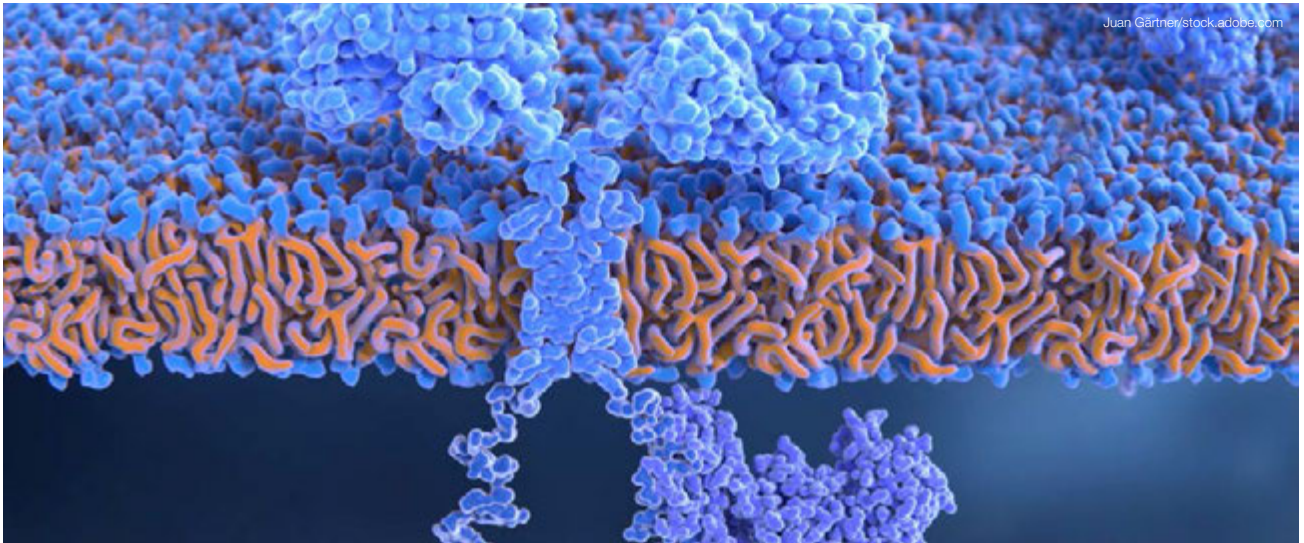


Nouvelles méthodes de séparation, d'identification et de quantification de biomolécules

Glycosylation et analyse de l'acide sialique contenu dans les glycoprotéines utilisées en biothérapie

Séparation de biomolécules par chromatographie en phase liquide bidimensionnelle

Identification, cartographie et quantification des glycopeptides spike du SARS-CoV-2



Glycosylation et analyse de l'acide sialique contenu dans les glycoprotéines utilisées en biothérapie

John Yan

Méthodes d'identification des différents N-glycanes sialylés et de quantification de l'acide sialique présent dans les glycoprotéines utilisées en biothérapie en utilisant des approches basées sur des plaques et la LC/FLD/MS.

Introduction

L'acide sialique joue un rôle clé dans la médiation de l'efficacité des glycoprotéines recombinantes thérapeutiques. La présence ou l'absence d'acide sialique sur l'extrémité non réductrice des glycanes peut modifier la pharmacocinétique de la protéine biothérapeutique ainsi que son immunogénicité. Par conséquent, il est important de surveiller et de contrôler la sialylation tout au long de la phase de production. Cet article présente une méthode d'identification des différents N-glycanes sialylés et de quantification de l'acide sialique présent dans les glycoprotéines utilisées en biothérapie en utilisant des méthodes basées sur des plaques ainsi que des méthodes associant la chromatographie en phase liquide (CPL), la détection par fluorescence (FL) et la spectrométrie de masse (MS). Cet article abordera également les avantages de l'utilisation de sondes fluorescentes dans l'analyse des N-glycanes, notamment l'amélioration de la quantification de l'acide sialique et des protocoles opératoires analytiques ainsi que les méthodes de séparation chromatographique qui combinent la détection par fluorescence et par spectrométrie de masse (MS).

GLYCOSYLATION ET ANALYSE DE L'ACIDE SIALIQUE CONTENU DANS LES GLYCOPROTÉINES UTILISÉES EN BIOTHÉRAPIE

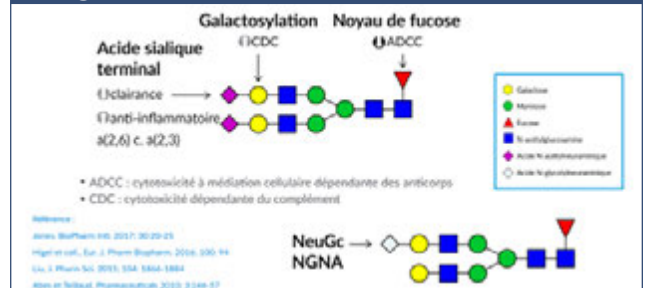
Protéines glycosylées utilisées en biothérapie

Bien que la glycomique n'ait pas bénéficié d'autant d'attention que la génomique ou la protéomique, un cinquième de l'ensemble des protéines présentes dans la base de données SwissProt sont glycosylées. La glycosylation peut affecter le repliement, la stabilité et la fonction d'une protéine, ainsi que la diversité des protéines par l'intermédiaire du site de glycosylation, de la composition en glycanes, de la longueur des glycanes et de leur structure. Plus de 60 % des biothérapies sur le marché contiennent des protéines glycosylées. La glycosylation peut représenter un paramètre clé de qualité, et/ou être surveillée comme paramètre de contrôle qualité d'un produit. Les deux principaux types de glycosylation sont l'ajout de protéines O-glycanées et N-glycosylées, mais la N-glycosylation, dans laquelle les glycanes sont liés à l'azote de la fonction amide de résidus asparagine situés dans une séquence consensus donnée, est le type de glycosylation le plus fréquemment rencontré dans les biothérapies.

En 2010, Epogen était l'unique biothérapie à contenir des protéines glycosylées parmi les 10 médicaments les plus vendus sur le marché. En 2018, sept des 10 médicaments les plus vendus sur le marché contenaient des protéines glycosylées. Le médicament le plus vendu était l'Humira, qui symbolise la transition effectuée par l'industrie pharmaceutique vers les médicaments issus de la biopharmacie.

Du point de vue de la caractérisation analytique, les médicaments biopharmaceutiques sont considérablement plus complexes que les petites molécules. Par exemple, l'aspirine, qui est une petite molécule thérapeutique, a une masse moléculaire d'environ 180 Da. En comparaison, les médicaments biopharmaceutiques à base d'immunoglobulines G (IgG) ont une masse moléculaire d'environ 150 000 Da, et subissent

FIGURE 1 : effet de la structure des N-glycanes sur les biothérapies.

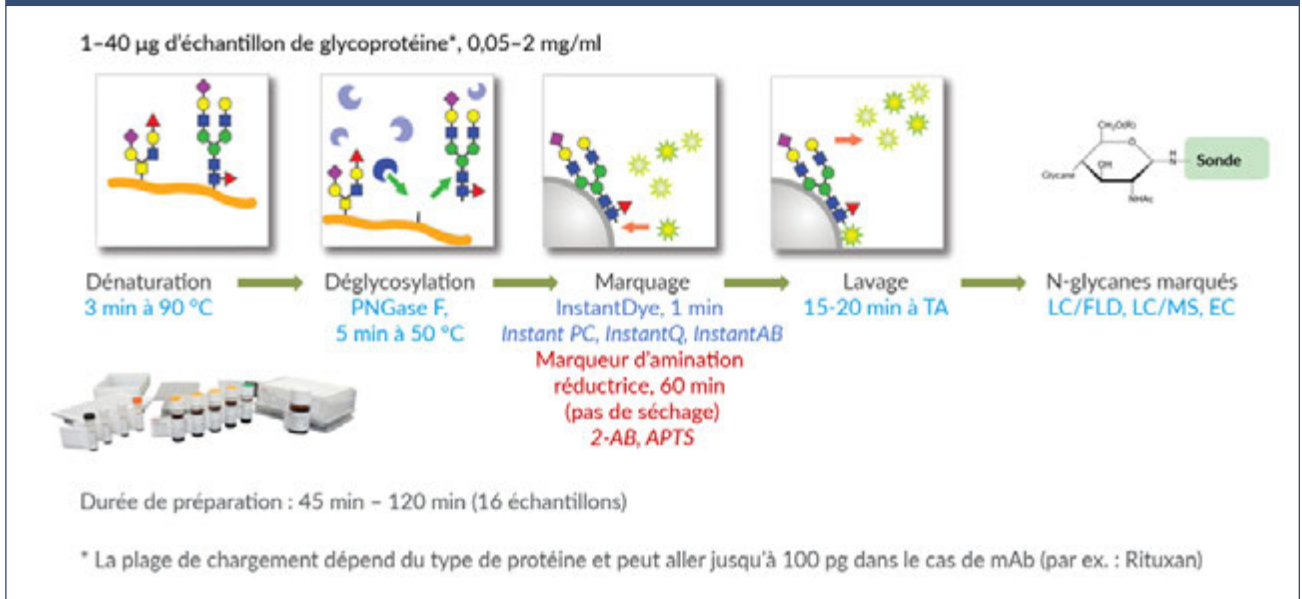


diverses modifications post-traductionnelles (notamment la glycosylation) qui peuvent affecter leur fonction. Les glycanes sont constitués de plusieurs unités de monosaccharides tels que le fucose, le mannose, le galactose, la N-acétylglucosamine et divers acides sialiques, comme illustré dans la **FIGURE 1**. La présence d'un noyau de fucose au cœur de la structure réduit la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), qui est un élément important dans l'efficacité des traitements contre le cancer. C'est la raison pour laquelle les entreprises développant des biothérapies tentent de réduire la quantité de fucose afin d'optimiser l'activité ADCC. Des études ont démontré que la présence de galactosylation peut augmenter la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), tandis que la présence d'un acide sialique terminal peut diminuer la clairance, et donc augmenter le temps de présence du médicament dans le corps.

Analyse des N-glycanes

Il existe de nombreuses techniques d'analyse des N-glycanes. Au niveau de la protéine intacte, les séparations par chromatographie en phase liquide (CPL), associées à la précision de la spectrométrie de masse exacte à haute résolution, permettent d'identifier le type de glycanes présents. Une autre méthode consiste à utiliser une protéase pour digérer et fragmenter la glycoprotéine en peptides. Ceux-ci sont ensuite séparés par CPL et analysés en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) associée à une

GLYCOSYLATION ET ANALYSE DE L'ACIDE SIALIQUE CONTENU DANS LES GLYCOPROTÉINES UTILISÉES EN BIOTHÉRAPIE

FIGURE 2 : technique Gly-X de préparation d'échantillons de N-glycanes.

recherche sur base de données pour déterminer le site spécifique de glycosylation. Une autre approche consiste à utiliser les enzymes de type PNGase F et à analyser les N-glycanes libérés à la suite de la digestion de la glycoprotéine. Les glycanes libérés sont soit directement analysés, soit, plus couramment, marqués à l'aide d'une sonde fluorescente permettant l'utilisation de techniques de séparation, telles que la CPL ou l'électrophorèse capillaire (EC), et de détection par fluorescence. Les résultats obtenus sont généralement exprimés en % relatif de chaque type de glycanes identifié.

Les glycanes peuvent également être surveillés à l'échelle du monosaccharide après hydrolyse acide directe ou consécutive à un marquage avec une sonde fluorescente.

Préparation d'échantillons de N-glycanes

La méthode conventionnelle de préparation d'échantillons de N-glycanes est très chronophage et peut durer plusieurs jours, avec des étapes de déglycosylation pendant la nuit et des étapes de

marquage des molécules. Il y a quelques années, un protocole opératoire tout-en-un a fait son apparition. Il utilisait des marqueurs d'amination réductrice, tels que le 2-aminobenzamide (2-AB) et l'aminopyrène-acide trisulfonique (APTS), et permettait de réduire le temps de préparation d'échantillons à 5 heures. Le protocole a ensuite été amélioré, grâce à des marqueurs instantanés qui marquent de façon très rapide le glycanes sous forme de glycosylamine, et a réduit le temps de préparation à 3-4 heures. Une nouvelle plateforme de préparation d'échantillons, AdvanceBio Gly-X, a été mise au point récemment. Cette nouvelle plateforme réduit le temps de préparation à 2 heures dans le cas d'un marquage d'amination réductrice (2-AB, APTS), et à moins de 1 heure en utilisant les marqueurs instantanés (InstantPC) de glycanes sous forme de glycosylamine.

Une représentation schématique de la plateforme de préparation d'échantillons de N-glycanes AdvanceBio Gly-X est présentée dans la **FIGURE 2**. La glycoprotéine est d'abord dénaturée avec un réactif exclusif pendant 3 minutes à 90 °C, préparant ainsi la protéine à la déglycosylation

GLYCOSYLATION ET ANALYSE DE L'ACIDE SIALIQUE CONTENU DANS LES GLYCOPROTÉINES UTILISÉES EN BIOTHÉRAPIE

par PNGase F qui s'effectue pendant 5 minutes à 50 °C. Les glycanes libérés sont ensuite marqués avec un fluorophore, tel que le marqueur instantané InstantPC de glycanes sous forme de glycosylamine, pendant environ 1 minute, ou avec un marqueur d'amination réductrice, tel que le 2-AB, pendant 60 minutes. Les glycanes sont ensuite lavés pour éliminer l'excès de marqueur et sont alors prêts à être analysés.

Séparation des N-glycanes marqués avec InstantPC

Une méthode couramment utilisée pour la séparation et l'analyse de glycanes marqués à l'aide de sondes fluorescentes est la chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) suivie de détection par fluorescence. La détection par MS est une autre méthode d'identification de différentes espèces de glycanes. La **FIGURE 3** illustre une méthode en gradient de 60 min basée sur la technique HILIC pour la séparation et l'analyse de glycanes marqués avec la sonde InstantPC à partir de rituximab, un médicament constitué d'IgG.

Une détection par MS peut également être utilisée. La **FIGURE 4** présente un chromatogramme d'ions totaux obtenu avec des N-glycanes marqués d'Enbrel. Le chromatogramme d'ions totaux obtenu en MS pour l'échantillon marqué avec la sonde InstantPC reflète presque parfaitement les résultats obtenus en fluorescence, ce qui aide à identifier les glycanes présents en faibles quantités. De plus, il existe une large gamme d'étalons de N-glycanes marqués pour contribuer à l'identification lorsqu'une analyse MS n'est pas possible. Il s'agit notamment d'étalons de glycanes individuels, tels que les N-glycanes bi-antennés couramment présents sur les molécules d'IgG issues de cellules ovariennes de hamster chinois, ainsi que des banques de glycanes pré-marqués présent sur des IgG humaines et des banques de glycanes alpha-(2,6) et alpha-(2,3)-sialylés.

Protocole de marquage avec la sonde 2-AB

La sonde 2-AB est couramment utilisée pour l'analyse des glycanes libérés. Les protocoles opératoires conventionnels de marquage 2-AB sont relativement chronophages, mais un nouveau protocole plus efficace permet de marquer rapidement les glycanes avec 2-AB tout en ayant la possibilité de comparer les nouveaux résultats aux anciens. La **FIGURE 2** présente un protocole de marquage express utilisant la technologie AdvanceBio Gly-X. Les étapes classiques de dénaturation et de déglycosylation en solution sont associées à une étape d'amination réductrice sur matrice dans une plaque de lavage à 96 puits, évitant ainsi l'étape supplémentaire de séchage. Après le marquage, les glycanes sont lavés afin d'éliminer l'excès de sonde, et sont ensuite prêts pour l'analyse. La durée de préparation est d'environ 2 heures, soit beaucoup moins qu'avec les méthodes conventionnelles. La **FIGURE 5** montre un exemple de séparation et d'analyse des glycanes présents dans le rituximab. Il s'agit principalement des glycanes neutres bi-antennés marqués 2-AB G0F, G1F et G2F avec de faibles pourcentages de CV pour l'ensemble des principaux glycanes.

Quantification de l'acide sialique

L'acide sialique joue un rôle clé dans la médiation de l'efficacité des glycoprotéines thérapeutiques. La présence ou l'absence d'acide sialique sur l'extrémité non réductrice des N- ou O-glycanes peut modifier la pharmacocinétique de la protéine ainsi que son immunogénicité. Il est donc essentiel de maintenir et de contrôler le taux d'acide sialique des protéines utilisées en biothérapie. Le kit de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio est une méthode de quantification à haut débit et de haute sensibilité des acides sialiques. Les analyses sont effectuées sur des plaques à 96 puits et reposent sur des réactions enzymatiques. La première réaction consiste en la conversion de l'acide sialique libéré par la sialidase-A

GLYCOSYLATION ET ANALYSE DE L'ACIDE SIALIQUE CONTENU DANS LES GLYCOPROTÉINES UTILISÉES EN BIOTHÉRAPIE

FIGURE 3 : analyse des glycanes du rituximab marqués avec InstantPC.

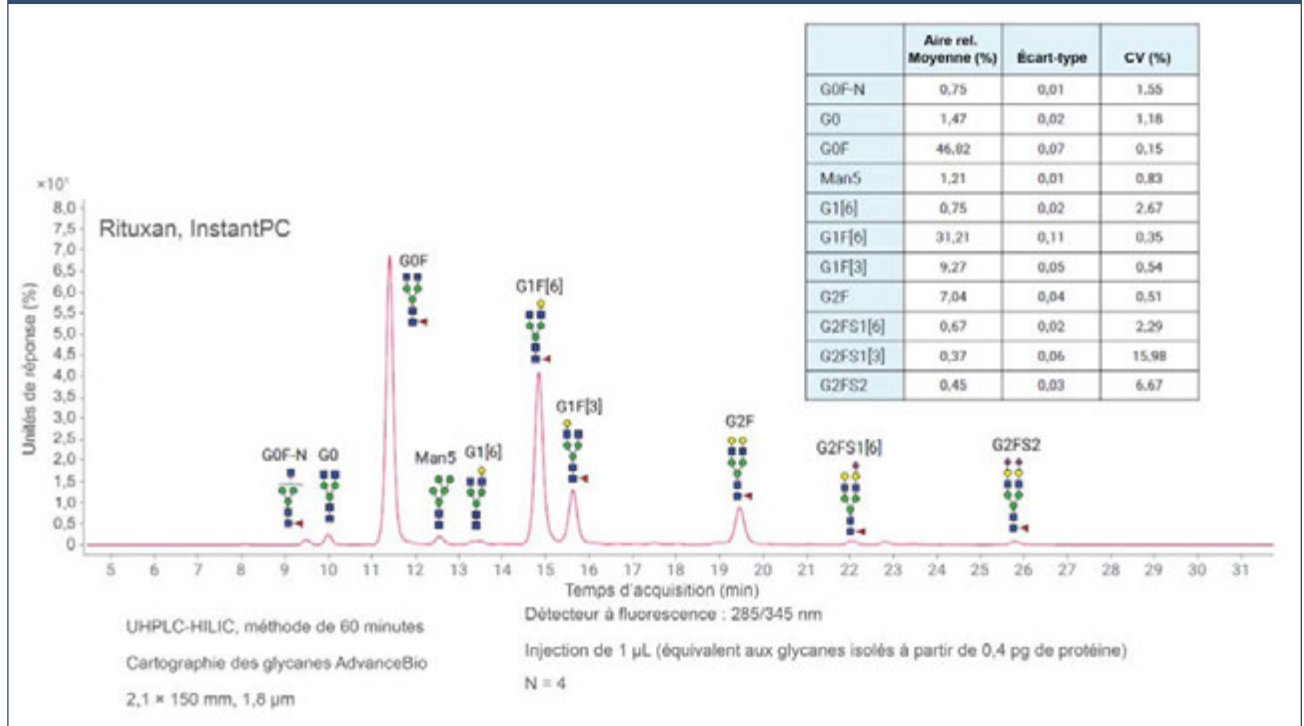
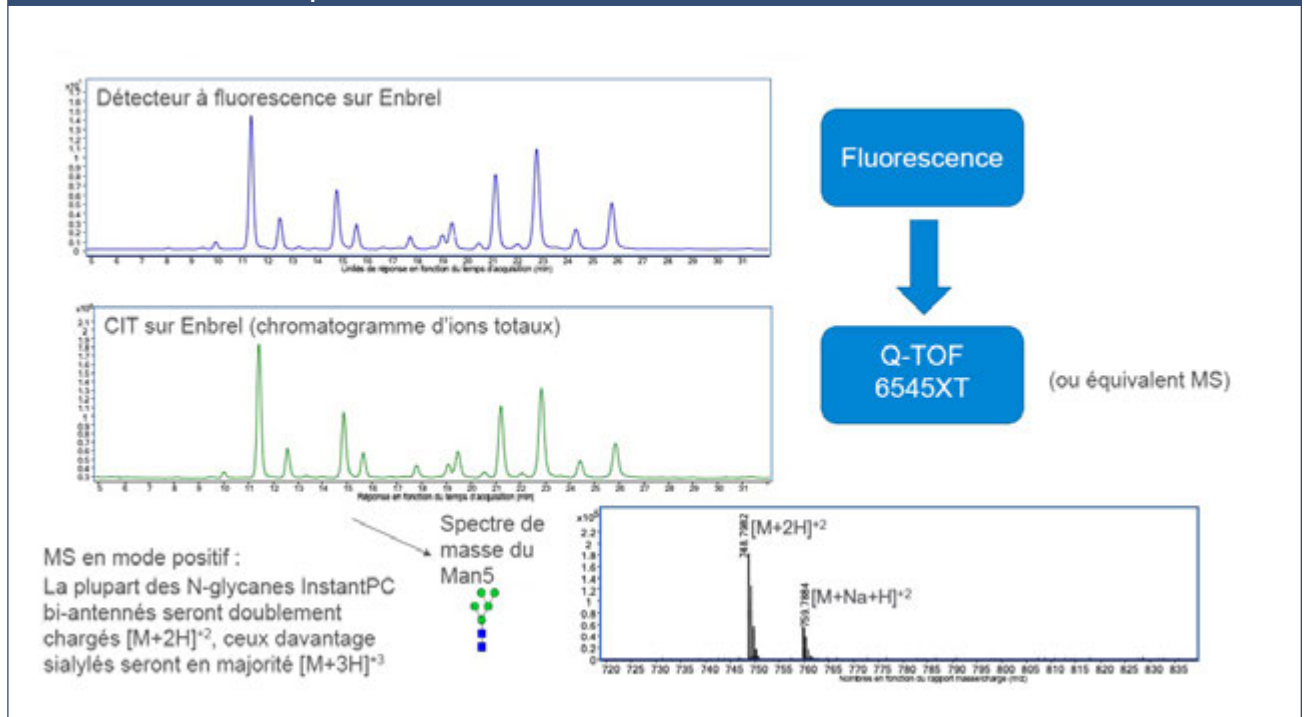
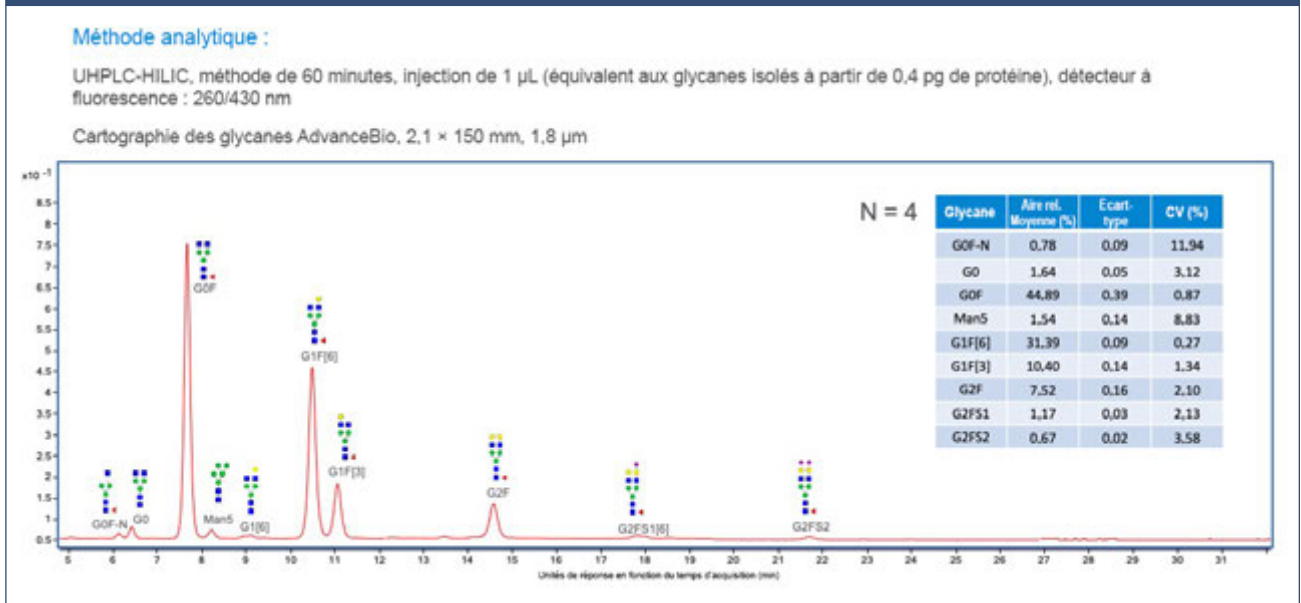


FIGURE 4 : chromatogramme d'ions totaux obtenu en MS de N-glycanes provenant de l'Enbrel et marqués avec Instant PC.



GLYCOSYLATION ET ANALYSE DE L'ACIDE SIALIQUE CONTENU DANS LES GLYCOPROTÉINES UTILISÉES EN BIOTHÉRAPIE

FIGURE 5 : rituximab : marquage des N-glycanes par Gly-X 2-AB Express.

en peroxyde d'hydrogène, qui réagit ensuite dans un ratio 1:1 avec une sonde fluorescente et génère un fort signal de fluorescence ou d'absorbance. Différentes glycoprotéines peuvent avoir différents taux de glycosylation, et donc différents taux de sialylation. Par conséquent, il est important d'avoir une quantité suffisante de protéine dès le début de l'analyse afin d'obtenir un bon niveau de signal. Par exemple, le MabThera ayant de faibles quantités d'acide sialique, une plus grande quantité de protéine sera nécessaire, tandis que la fétuine ou l'Enbrel nécessitent une plus faible quantité de protéine en raison de leur teneur plus élevée en acide sialique.

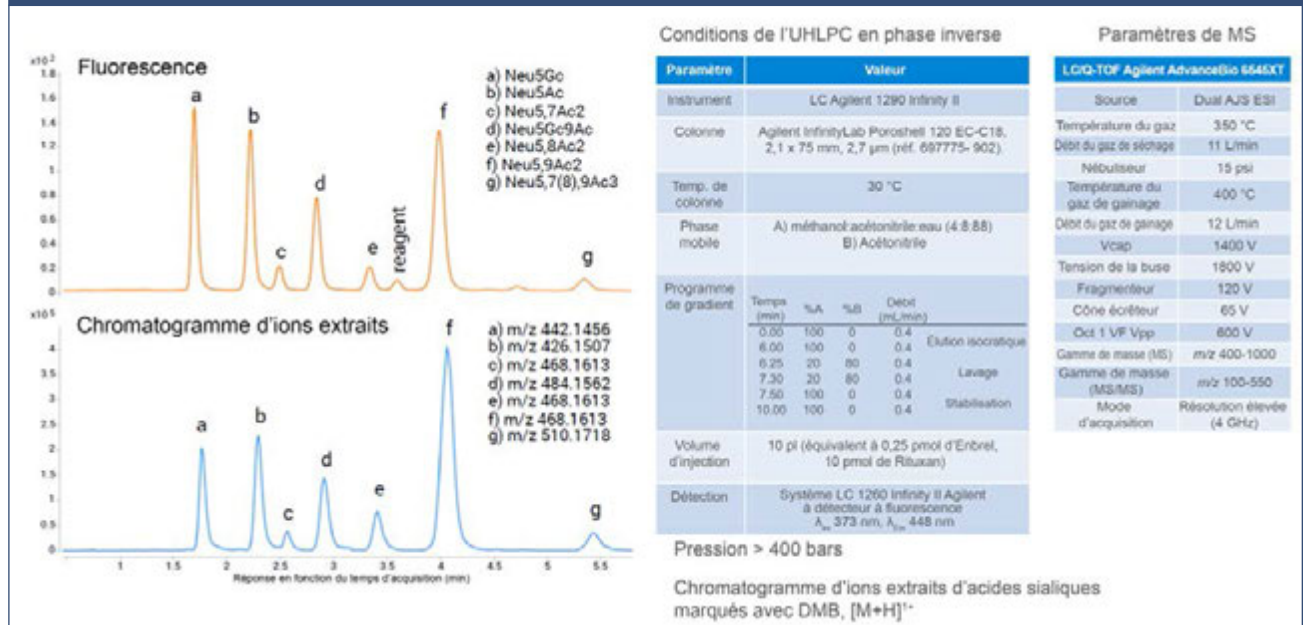
L'acide N-acétylneuraminique (NANA) et l'acide N-glycolylneuraminique (NGNA) sont deux types d'acide sialique de structure similaire qui ne diffèrent que par la présence d'un groupe hydroxyle (NGNA). Cette seule différence suffit à rendre le NGNA potentiellement immunogène chez l'homme. Une méthode couramment utilisée pour distinguer ces deux types d'acide sialique consiste à libérer l'acide sialique du glycanes et à le marquer avec la sonde : 1,2-diamino-4,5-

méthylènedioxybenzène-2HCl (DMB). Cette méthode est incluse dans le kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio, qui comprend également des étalons quantitatifs de NANA et NGNA. L'étape de marquage est suivie par une séparation par chromatographie liquide et une détection par fluorescence et/ou par une analyse MS. La **FIGURE 6** présente un exemple de vue d'ensemble-type, un mélange de différents types d'acides sialiques marqués avec la sonde DMB, initialement par CPL, suivie par une détection par fluorescence et d'analyse MS. Les deux premiers pics du chromatogramme correspondent respectivement à NGNA et

«La présence ou l'absence d'acide sialique sur l'extrémité non réductrice des N- ou O-glycanes peut modifier la pharmacocinétique de la protéine ainsi que son immunogénicité.»

GLYCOSYLATION ET ANALYSE DE L'ACIDE SIALIQUE CONTENU DANS LES GLYCOPROTÉINES UTILISÉES EN BIOTHÉRAPIE

FIGURE 6 : vue d'ensemble des analyses d'acide sialique marqué avec DMB (SARP).



NANA, et les autres pics sur le chromatogramme correspondent à différentes versions de l'acide sialique qui ont été observées dans la nature.

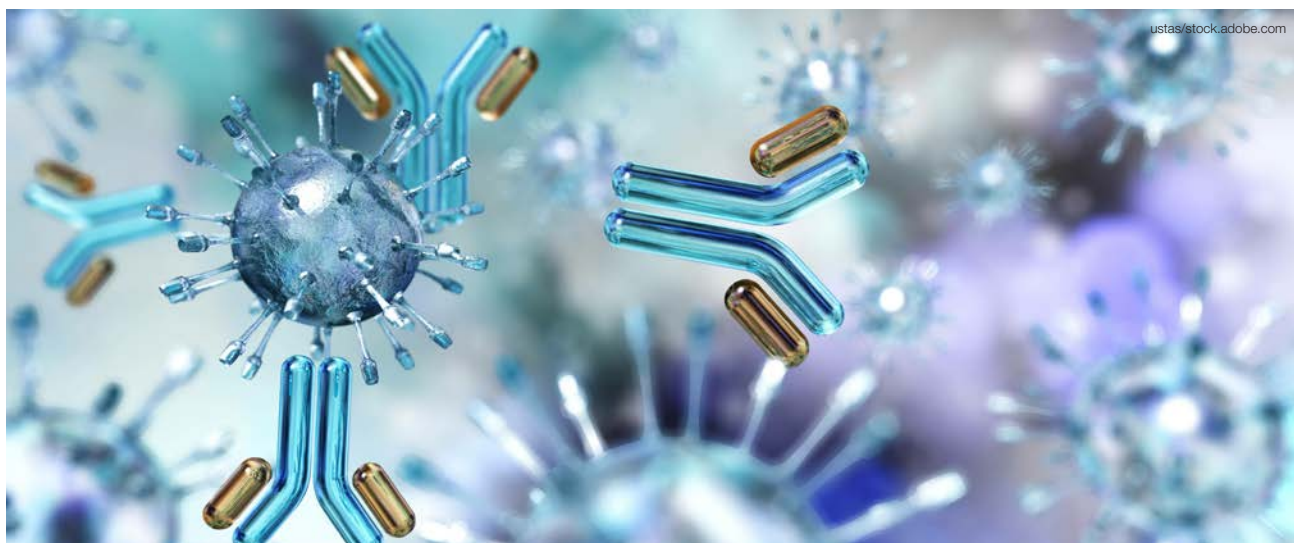
Conclusion

Les chercheurs disposent d'outils nombreux et variés pour préparer, séparer, détecter et identifier les N-glycanes présents sur une glycoprotéine type utilisée en biothérapie. Les protocoles opératoires les plus récents, tel que le kit de préparation d'échantillons AdvanceBio Gly-X, sont basés sur des techniques permettant de libérer, de marquer et d'isoler rapidement les glycanes pour les quantifier ensuite par détection par fluorescence. Le haut niveau d'efficacité de la phase d'ionisation avec les nouvelles sondes, telles qu'InstantPC, permet, en plus des récents protocoles de préparation d'échantillons plus rapides, de caractériser efficacement en MS les glycanes libérés. Ces nouveaux protocoles opératoires peuvent également être utilisés avec les marqueurs conventionnels de glycanes, tels que la sonde 2-AB, qui offre une méthode pratique

et rapide de préparation d'échantillons dans le cas où une comparaison des nouveaux résultats avec des plus anciens est nécessaire. En plus de l'analyse des glycanes libérés, Agilent offre une gamme de produits dédiés au profilage et à la quantification de l'acide sialique, complétée par un kit d'outils complet pour l'analyse de protéines glycosylées utilisées en biothérapie.

John Yan

John Yan, PhD, est un scientifique spécialiste des applications au sein d'Agilent



Introduction à la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle pour la séparation de biomolécules

Dwight R. Stoll

Principes fondamentaux de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle et applications contemporaines en bioanalyse.

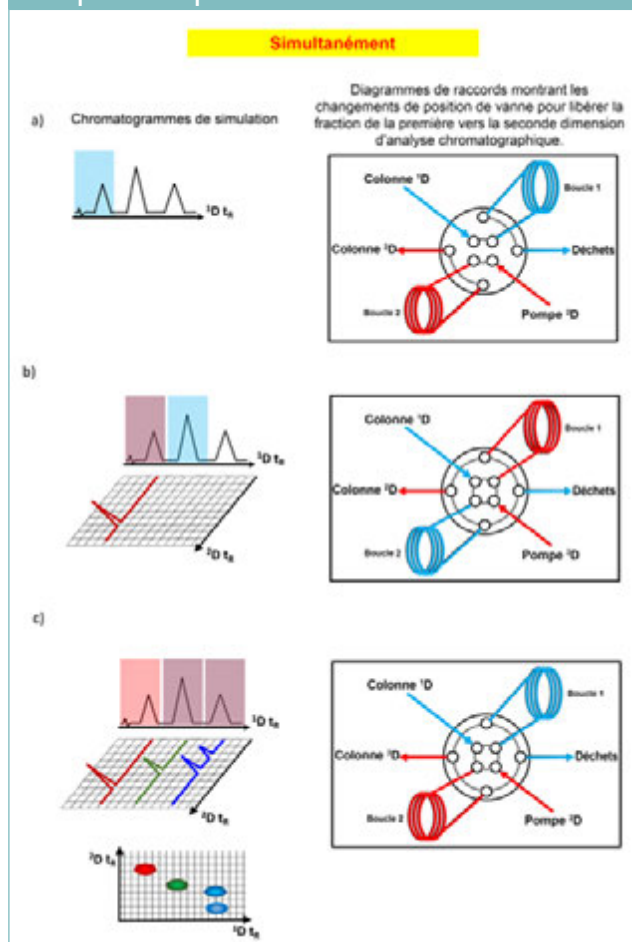
Introduction

Bien que la chromatographie en phase liquide unidimensionnelle (1D-LC) traditionnelle reste une méthode fiable en bioanalyse, la séparation chromatographique en deux dimensions présente un certain nombre d'avantages. Les séparations analytiques sur deux colonnes en tandem ou la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (2D-LC) permettent d'améliorer la résolution sans avoir recours à des augmentations de durée de séparation, qui sont coûteuses. L'adaptation des paramètres de séparation aux conditions propres à un mélange et aux composés cibles permet d'augmenter le rendement analytique de la 2D-LC. Ce résumé est une introduction aux concepts de séparation par chromatographie liquide bidimensionnelle. Il aborde certains principes de fonctionnement et modes opératoires clés de la 2D-LC et présente des exemples pertinents des bénéfices apportés par l'utilisation de la 2D-LC dans la résolution de problèmes rencontrés au cours d'analyses de molécules biologiques.

Fondamentaux de la séparation par 2D-LC

Des échantillons jugés simples sont très souvent complexes et quelques pics peuvent être non résolus lors de séparations chromatographiques

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

FIGURE 1 : principe de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle.

dans le cadre d'analyses de molécules biologiques. Dans certains cas, une seule étape de chromatographie en phase liquide ne convient pas pour séparer les composés d'un mélange, notamment lorsque ceux-ci ont une structure similaire, comme les mélanges d'isomères, ou lors de la présence de composés inconnus qu'il faut identifier. La **FIGURE 1A** présente un cas idéal, et les différents chromatogrammes de simulation permettent de comprendre l'intérêt de la 2D-LC. Dans les cas où les séparations de composés ne s'effectuent pas en fonction d'un seul paramètre, tel que la taille ou la charge, et où elles suffiraient à obtenir une résolution suffisante, la séparation des composés en fonction de ces deux

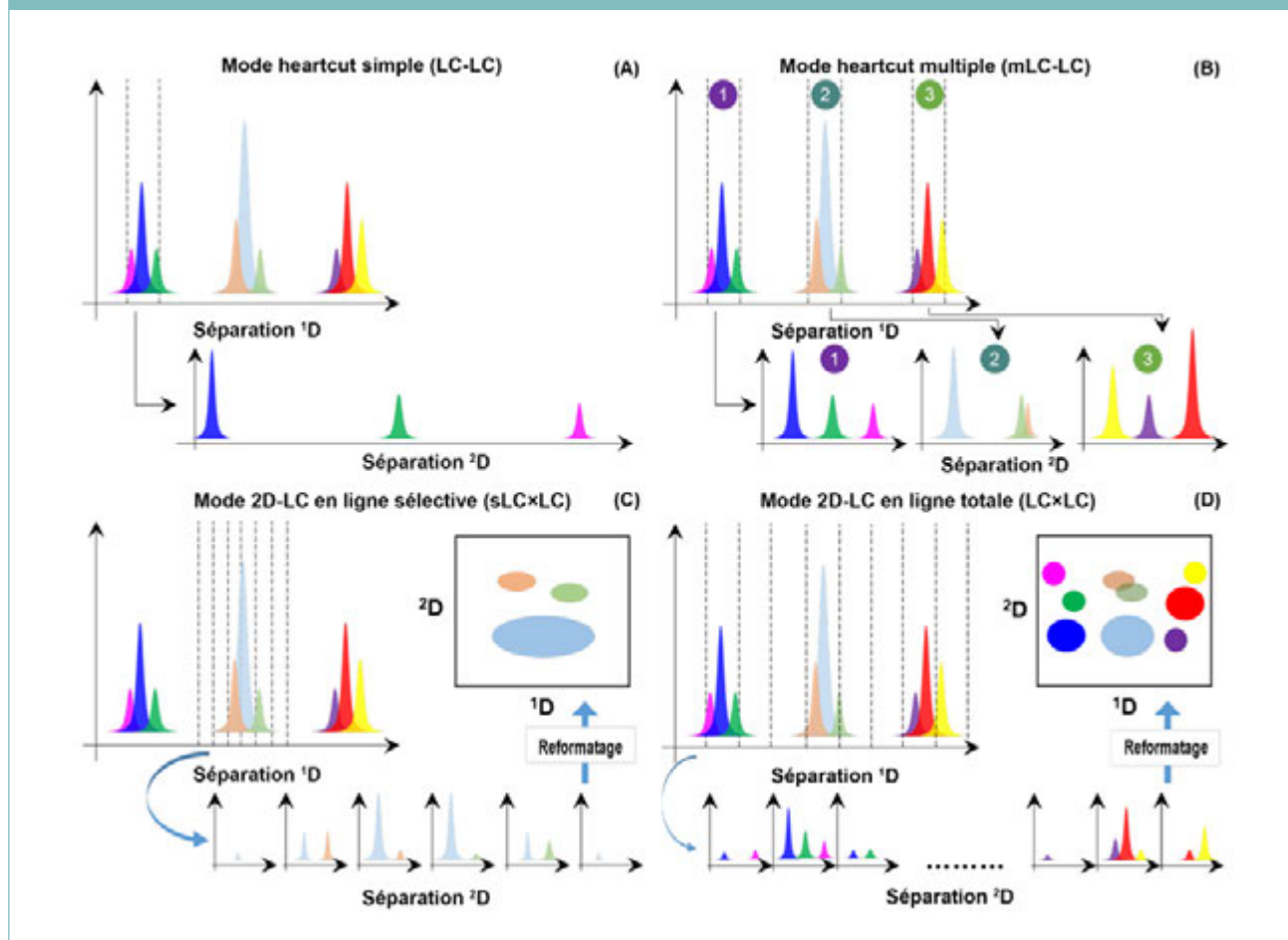
paramètres permet d'obtenir une résolution complète des différents composés.

La mesure du facteur de capacité de pics est une méthode couramment employée pour quantifier l'amélioration des séparations obtenues par 2D-LC. Elle apporte une démonstration chiffrée de l'utilité d'effectuer une CPL en deux dimensions par rapport au simple rallongement de la colonne en 1D-LC. Pour chaque dimension de chromatographie, les mesures analytiques sont regroupées en graphes en fonction de l'efficacité de la séparation et du résultat du cycle d'utilisation de l'instrument. Ceci permet d'obtenir des ensembles de graphes linéaires représentant la réponse de l'instrument dans le temps. L'ajout d'une seconde dimension permet de multiplier le facteur de capacité de pics et de générer des graphes de résultats en deux dimensions. Une sélection minutieuse des colonnes complémentaires et des paramètres de séparation permet d'utiliser cet espace de séparation pour différencier des composés non résolus jusque-là. De plus, la seconde dimension peut être ajoutée en cours d'analyse, si besoin est. Les protocoles opératoires de 2D-LC permettent une application ciblée de l'étape de séparation dans la seconde dimension (2D).

Comme avec la 1D-LC, les instruments nécessaires à la 2D-LC impliquent l'utilisation d'une vanne de commutation ainsi que des composants supplémentaires pour planifier les injections de l'échantillon. Une bonne planification de la commutation de la vanne et du chargement des deux boucles d'échantillonnage permet d'effectuer le processus de séparation sur les deux colonnes en même temps (**FIGURE 1B**). Une part de l'effluent de la colonne 1D est dirigée dans une boucle d'échantillonnage de volume déterminé, qui, une fois remplie, injecte la solution sur la colonne 2D. Les fragments issus

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

FIGURE 2 : méthodes de séparation 2D (6).



de la séparation de la première dimension (1D) sont donc groupés efficacement avant d'être injectés sur la seconde colonne. Les données chromatographiques de la 2D-LC montrent que les composés de chacun des pics obtenus en 1D sont ensuite séparés davantage avec les paramètres de la 2D. Tout composant dont la séparation ultérieure se produit à l'étape 2D (après la phase 1D) se traduira par la présence de pics supplémentaires sur le chromatogramme 2D.

Choix des modes opératoires de 2D-LC en fonction de l'application

Il existe deux modes opératoires principaux

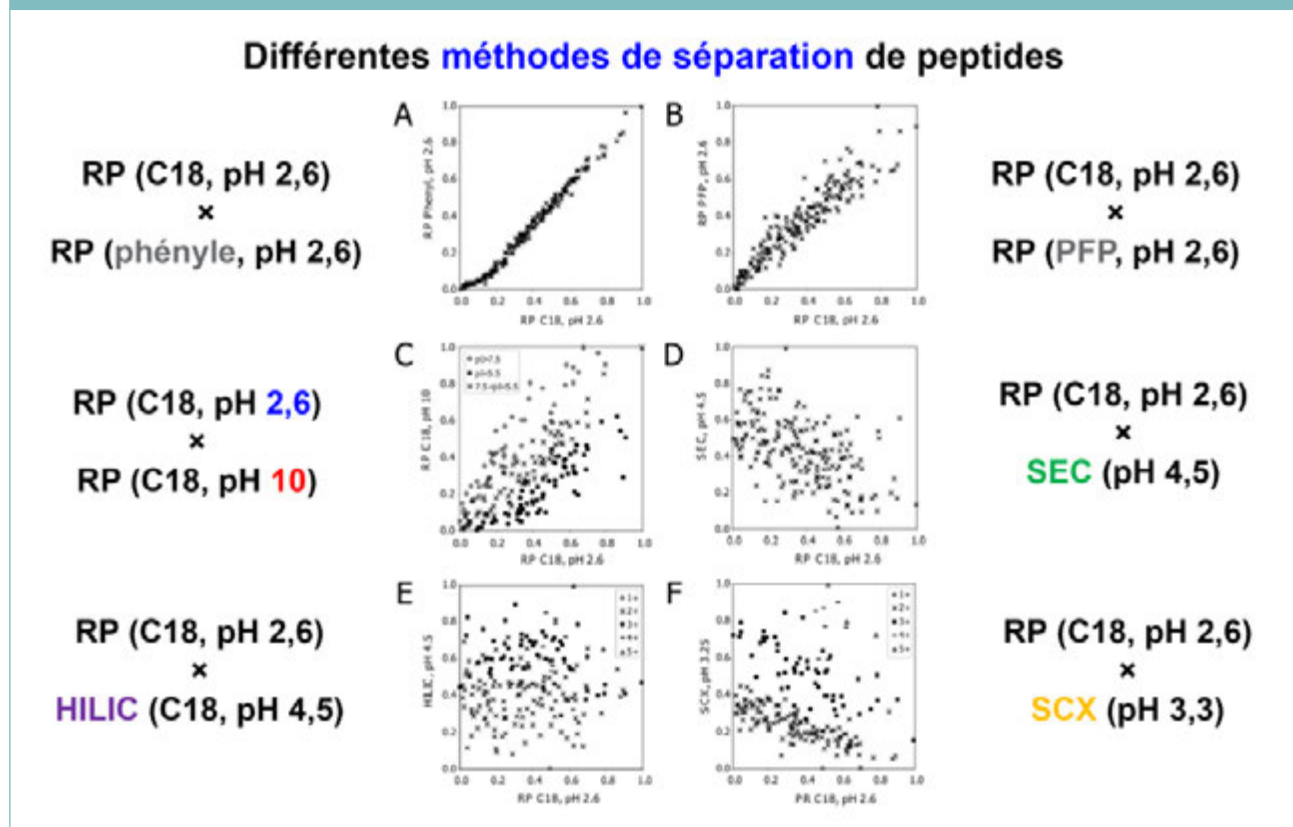
de 2D-LC, ainsi que deux modes hybrides. Ces quatre modes sont représentés dans la [FIGURE 2](#).

Le premier mode opératoire principal, heartcut, est abrégé LC-LC ([FIGURE 2A](#)). Le mode heartcut simple 2D-LC consiste à prélever l'effluent d'un seul segment temporel du chromatogramme 1D, tel qu'un seul pic ou un groupe de pics, et de soumettre cette portion d'effluent à une séparation sur la colonne 2D. LC-LC est particulièrement efficace pour la caractérisation poussée d'une seule région d'intérêt identifiée en 1D.

L'autre mode opératoire principal en 2D-LC consiste à rediriger la totalité de l'éluant de la 1D, sous forme de fractions, vers la 2D

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

FIGURE 3 : utilisation optimale de l'ensemble de l'espace de séparation 2D (10).



pour la séparation. Il s'agit de la 2D-LC en ligne totale, abrégée LCxLC (Figure 2d). LCxLC permet d'obtenir les résultats les plus complets concernant les composants d'un mélange cible. Ce mode est plus adapté dans le cas d'échantillons particulièrement complexes susceptibles de donner de multiples pics non résolus et des superpositions de pics, ainsi que pour obtenir l'analyse complète d'un mélange inconnu.

En plus des deux modes opératoires principaux de 2D-LC, il existe deux modes hybrides : le mode heartcut multiple (mLC-LC) et la 2D-LC en ligne sélective (sLCxLC). Le mode heartcut multiple présente des principes de fonctionnement semblables au mode heartcut, avec l'injection d'une portion spécifique de l'effluent 1D sur la colonne 2D

pour la séparation, mais dans ce cas, plusieurs fractions d'effluent sont prélevées au cours d'un même cycle (FIGURE 2B). La technique mLC-LC est utile lorsqu'une caractérisation plus poussée est requise pour plus d'une région du chromatogramme, sans toutefois nécessiter le niveau de complexité du mode LCxLC. Le mode 2D-LC en ligne sélective utilise le même concept d'échantillonnage de plusieurs segments temporels 1D sur un intervalle de temps spécifique, comme le mode LCxLC, mais ne s'applique pas sur la totalité de la durée de l'analyse (FIGURE 2C). Le mode sLCxLC convient parfaitement pour l'étude approfondie de certains composés cibles spécifiques, comme pour la caractérisation détaillée de protéines, et ne concerne qu'une fraction du cycle de chromatographie.

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

Une résolution optimale grâce à l'orthogonalité des modes de séparation

«Comme pour la 1D-LC traditionnelle, la réalisation d'une 2D-LC nécessite un ajustement précis des conditions de séparation en fonction de la sensibilité du détecteur utilisé.»

L'amélioration démultipliée du facteur de capacité de pics qui résulte de la 2D-LC repose essentiellement sur l'utilisation de phases stationnaires complémentaires (ou orthogonales) pour les colonnes 1D et 2D. La réalisation de séparations 2D-LC sur deux colonnes comprenant des phases stationnaires et mobiles identiques n'entraînerait aucune amélioration de séparation productive en ajoutant une seconde dimension. À l'inverse, l'obtention d'une meilleure séparation en 2D-LC nécessite d'utiliser des phases de composition différente dans chacune des dimensions. Dans l'exemple de la Figure 3a, l'association de phases stationnaires C18 et phényle avec un pH de la phase mobile identique ne montre presque aucune dispersion de pics en dehors de la zone de séparation correspondant approximativement à un rapport de corrélation de 1:1 pour l'élution d'un composé entre les deux colonnes. Cependant, en remplaçant simplement la phase stationnaire de la colonne 2D par une phase à base de phényle fluoré (FIGURE 3B), on observe l'apparition d'une dispersion des différents composés à chaque étape de séparation. Même dans le cas où le même type de colonne est utilisé à la fois pour

la 1D et la 2D (FIGURE 3C), le changement du pH de la phase mobile entre chaque dimension de séparation permet de créer des différences de conditions de séparation suffisamment importantes pour améliorer significativement la résolution de pic sur l'ensemble de l'espace analytique. De même, il est possible d'obtenir une amélioration de la résolution en utilisant des colonnes très différentes entre les dimensions, comme illustré dans la FIGURE 3D-F.

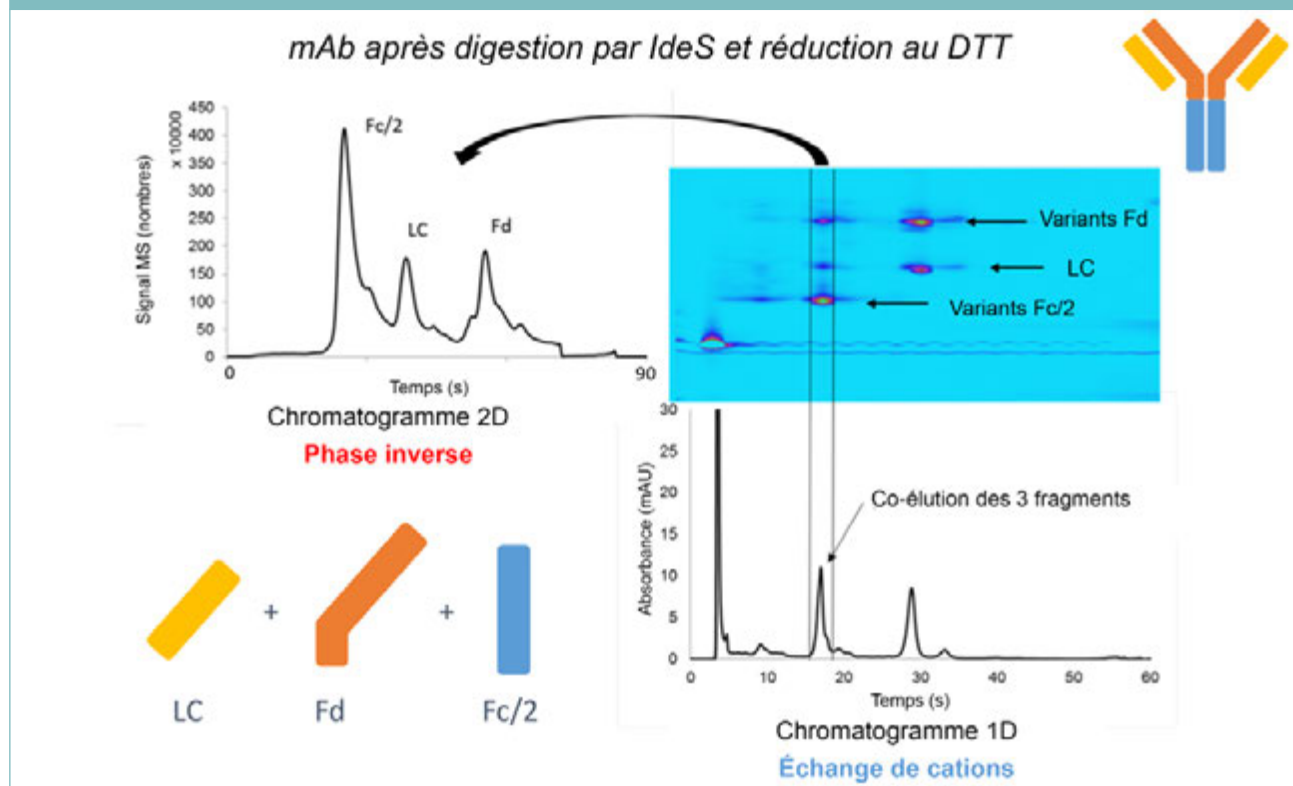
Amélioration de la vitesse d'échantillonnage 2D pour éviter tout sous-échantillonnage

Une étape capitale de la séparation par 2D-LC consiste à éviter de sous-échantillonner l'effluent de la colonne 1D lors du passage à la séparation 2D, problème connu sous le nom de sous-échantillonnage, ou de restructuration des échantillons. Le prélèvement de trop peu d'échantillon d'un pic 1D résulte en la restructuration, ou en l'analyse de moyennation de chaque composé isolé en 1D, réduisant ainsi la valeur de la première étape de séparation. Selon la théorie de Murphy-Schure-Foley (1), pour limiter le risque de sous-échantillonnage, il ne doit pas y avoir moins de quatre échantillons prélevés dans la zone d'un même pic chromatographique 1D. De plus, il est nécessaire d'optimiser la vitesse d'échantillonnage et de l'équilibrer entre la 1D et la 2D afin d'obtenir une capacité de pics optimale sur l'ensemble du système.

Comme pour la 1D-LC traditionnelle, la réalisation d'une 2D-LC nécessite un ajustement précis des conditions de séparation en fonction de la sensibilité du détecteur utilisé. Pour chaque étape de chromatographie (1D et 2D), les concentrations des composés dans l'éluant seront inférieures à celles qui ont été injectées initialement dans chaque colonne. Par conséquent, il convient de définir un volume d'injection minimum et une durée

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

FIGURE 4 : analyse de sous-unités de mAb en 2D LC-MS par LCxLC (7).



d'échantillonnage minimale pour garantir la présence d'une concentration suffisante de chaque composé.

Résoudre les problèmes d'incompatibilité de phase mobile entre les deux dimensions

En plus du problème de sous-échantillonnage, une autre étape importante de la 2D-LC consiste à éviter les conséquences néfastes pour la séparation provoquées par une incompatibilité de phase mobile entre les colonnes. Ce problème vient du fait que la phase mobile présente dans le composé élué en 1D devient le solvant d'injection pour la 2D, ce qui nécessite donc une compatibilité des phases mobiles. Ce phénomène peut n'avoir que des effets mineurs pour certaines associations de colonnes et de phases mobiles, mais ses conséquences peuvent

être particulièrement importantes dans d'autres cas. Par exemple, la composition en phase mobile d'une séparation par échange d'ions comprend normalement un contenu aqueux qui est généralement compatible avec la phase mobile aqueuse en début de séparation des phases inverse. En revanche, la phase mobile fortement organique de la chromatographie en phase normale complique l'association d'une 1D en phase normale avec une 2D en phase inverse (RP) et peut entraîner une mise en opposition ou une perte de la séparation des composés.

Cependant, l'incompatibilité de phases mobiles peut être surmontée grâce à la technique de modulation de solvant active (ASM). Développés en partenariat avec Agilent, les systèmes 2D-LC équipés de l'ASM ajustent la composition du solvant de l'échantillon injecté sur la colonne 2D afin d'améliorer la compatibilité de phases.

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

L'introduction d'une boucle d'échantillonnage parallèle qui dilue l'effluent prélevé à l'issue de la 1D avant que l'échantillon n'atteigne la colonne 2D permet de réduire la force du solvant d'injection en 2D. L'ASM améliore la résolution 2D malgré la dilution de l'échantillon, car l'abaissement de la force du solvant empêche la dégradation du composé qui aurait lieu à cause de la solubilité anormalement élevée du composé dans la phase mobile au début de la seconde étape de séparation.

Exploitation de la 2D-LC pour bénéficier d'analyses 2-en-1

La 2D-LC est la méthode la mieux adaptée dans le cas où les résultats attendus de deux expériences indépendantes, voire davantage, correspondraient à ceux obtenus lors d'une seule analyse en 2D-LC. Un exemple type est la caractérisation d'un pic non identifié sur un chromatogramme dans des conditions incompatibles avec la spectrométrie de masse (MS), comme étudié par H. Luo et coll. (2). Au lieu d'effectuer une séparation supplémentaire, cette fois dans des conditions compatibles avec la MS, H. Luo et coll. ont effectué une CPL dans une seconde dimension, compatible avec la MS, à la suite de la première étape de chromatographie, permettant ainsi l'identification immédiate des pics non identifiés. Comme observé par R. Karongo et coll., la sLCxLC utilisée pour la caractérisation des impuretés dans des peptides thérapeutiques a permis de révéler la présence de trois impuretés qui étaient éluées simultanément avec le peptide d'intérêt, et qui n'auraient pas été détectées en 1D-LC (3). Grâce à l'association d'une colonne 1D de type RP achirale et d'une colonne 2D de type WAX chirale, U. Woiwode et coll. ont démontré que la sLCxLC permettait d'obtenir une séparation énantiosélective de tous les acides aminés au cours d'une seule analyse (4). La LCxLC joue un rôle capital dans la caractérisation d'extraits de plante tels que le thé ou le vin, car elle permet

d'identifier les composés phénoliques, comme démontré par M. Muller et coll. (5).

Méthodes de caractérisation avancée de protéines

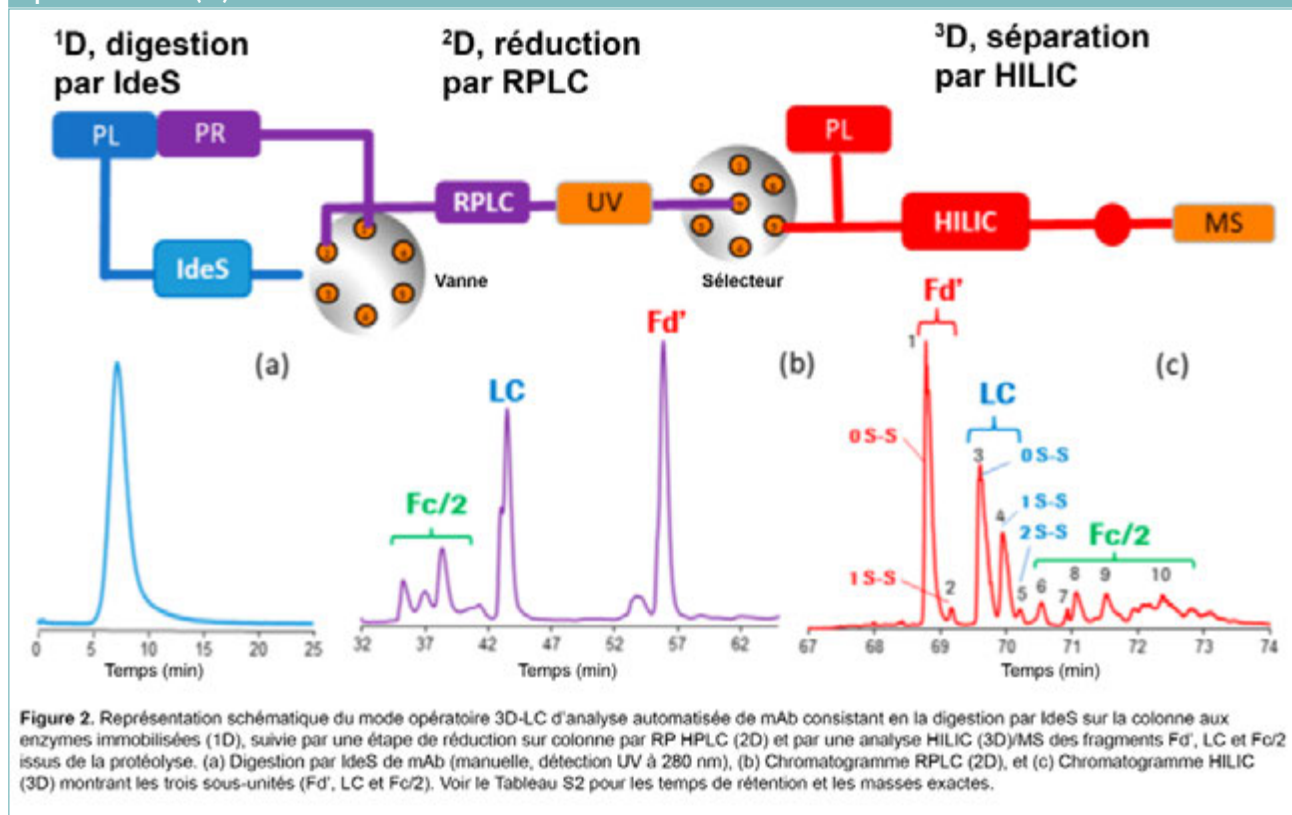
Un autre type d'analyse dans lequel la 2D-LC serait particulièrement utile est la caractérisation avancée de protéines. Associées à la spectrométrie de masse en fin d'analyse, les séparations en deux dimensions permettent d'optimiser significativement le processus d'identification des composés d'un échantillon. Un protocole adapté des traitements de l'échantillon et une analyse 2D-LC suivie d'une détection par MS permettent d'obtenir la caractérisation détaillée de la structure et de la composition d'un anticorps monoclonal. Il a été démontré que cette approche multidimensionnelle permettait d'identifier les sous-unités des anticorps, les chaînes légères et lourdes, les glycanes liés et les composés peptidiques (6). De plus, les résultats présentés par M. Sorensen et coll. soulignent la nécessité d'effectuer une séparation par chromatographie liquide à deux dimensions pour l'étude d'anticorps, car certains fragments d'anticorps clivés sont élués en même temps au cours de la chromatographie à une dimension, qui est donc insuffisante à elle seule (FIGURE 4) (7).

Développement de méthodes d'analyse 2D-LC automatisées

L'un des inconvénients des bioanalyses que la 2D-LC permet de surmonter est le problème de la durée de préparation d'échantillons et de la sélection manuelle des pics à analyser par la suite. Au lieu d'effectuer chacune des étapes de traitement des échantillons, telle que la digestion par la trypsine ou l'étape de réduction au dithiothéitol (DTT), ces étapes peuvent être intégrées à l'analyse 2D-LC automatisée. C. Gstöttner et coll. ont publié un exemple de séparation d'anticorps selon une méthode au cours

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

FIGURE 5 : applications contemporaines : systèmes automatisés de caractérisation pour mAb (9).



de laquelle les échantillons étaient d'abord séparés sur une colonne échangeuse d'ions, puis prélevés en fractions qui étaient ensuite injectées sur une colonne de réduction, avant de subir une séparation par 2D-RP et une détection par MS (8). De même, J. Camperi et coll. ont proposé une méthode de caractérisation de variants de glycosylation présents sur des anticorps monoclonaux au cours de laquelle les échantillons étaient soumis à une digestion par IdeS, suivie d'une réduction et d'une séparation sur colonne RP, puis d'une séparation par chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC), avant la détection par spectrométrie de masse (FIGURE 5) (9). Il a été démontré que cette dernière méthode automatisée mise en avant par J. Camperi et coll. ne présentait aucune différence significative avec les méthodes manuelles de traitement des échantillons au cours d'expériences de preuve de concept.

Conclusion

L'efficacité des séparations multidimensionnelles a été démontrée pour l'obtention de multiples informations analytiques que la 1D-LC seule ne permet pas d'obtenir, tout en ne nécessitant que peu de préparation supplémentaire. Cependant, l'obtention de bons résultats avec cette méthode nécessite de respecter les principes fondamentaux des analyses chimiques. Comme pour tout instrument analytique, le développement de méthodes de 2D-LC nécessite d'adapter le mode opératoire utilisé (LC-LC, mLC-LC, sLCxLC ou LCxLC) en fonction du type d'échantillon à analyser, et du type d'informations recherchées. Après avoir défini le mode opératoire le mieux adapté, il est capital de déterminer les conditions de séparation optimales dans les deux dimensions (orthogonalité des séparations). Une résolution optimale sur l'ensemble de l'espace de séparation 2D ne

INTRODUCTION À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE POUR LA SÉPARATION DE BIOMOLÉCULES

peut être obtenue qu'en choisissant des phases stationnaires complémentaires et des conditions de phases mobiles, telles que le pH, en fonction de la classe de composé. Il est donc capital de prendre en compte les propriétés moléculaires. De plus, il est important d'éviter tout sous-échantillonnage à l'issue de la 1D, qui pourrait annuler les effets de la première phase de séparation effectuée. Ce point doit être considéré en fonction de la sensibilité du détecteur : les fractions à séparer en 2D ne doivent pas avoir un volume trop faible, et donc une quantité de composés trop faible qui ne serait pas détectée. De plus, la composition des phases mobiles entre les deux dimensions doit être vérifiée pour éviter tout problème d'incompatibilité. Lorsque l'incompatibilité des phases mobiles est inévitable, des méthodes alternatives et la technique ASM doivent être utilisées.

Références

1. R. E. Murphy, et coll., *Anal. Chem.* **70**(8), 1585-1594 (1998). DOI : 10.1021/ac971184b
2. H. Luo, et coll., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137**, 139-145 (2017). DOI : 10.1016/j.jpba.2016.11.012
3. R. Karongo, et coll., *J. Chrom. A*, **1627**, 461430 (2020). DOI : 10.1016/j.chroma.2020.461430
4. U. Woiwode, et coll., *J. Chrom. A*, **1562**, 69-77 (2018). DOI : 10.1016/j.chroma.2018.05.062
5. M. Muller, et coll., *Chromatographia*, **82**, 181-196 (2019). DOI : 10.1007/s10337-018-3662-6
6. D. R. Stoll, et coll., dans *Advances in Chromatography*, (CRC Press : Boca Raton, FL, 2018).
7. M. Sorensen, et coll., *mAbs*, **8**(7), 1224-1234 (2016). DOI : 10.1080/19420862.2016.1203497
8. C. Gstöttner et coll., *Anal. Chem.* **90**(3), 2119-2125 (2017). DOI : 10.1021/acs.analchem.7b04372
9. J. Camperi et coll., *Anal. Chem.* **92**(6), 4357-4363 (2020). DOI : 10.1021/acs.analchem.9b05193
10. M. Gilar, et coll., *Anal. Chem.* **77**(19), 6426-6434 (2005). DOI : 10.1021/ac050923i

Dwight R. Stoll, PhD

Professeur
Gustavus Adolphus College



ustas/stock.adobe.com



Attila Németh/stock.adobe.com

Identification, cartographie et quantification relative des glycopeptides spike du SARS-CoV-2 par profilage par temps de rétention et masse exacte

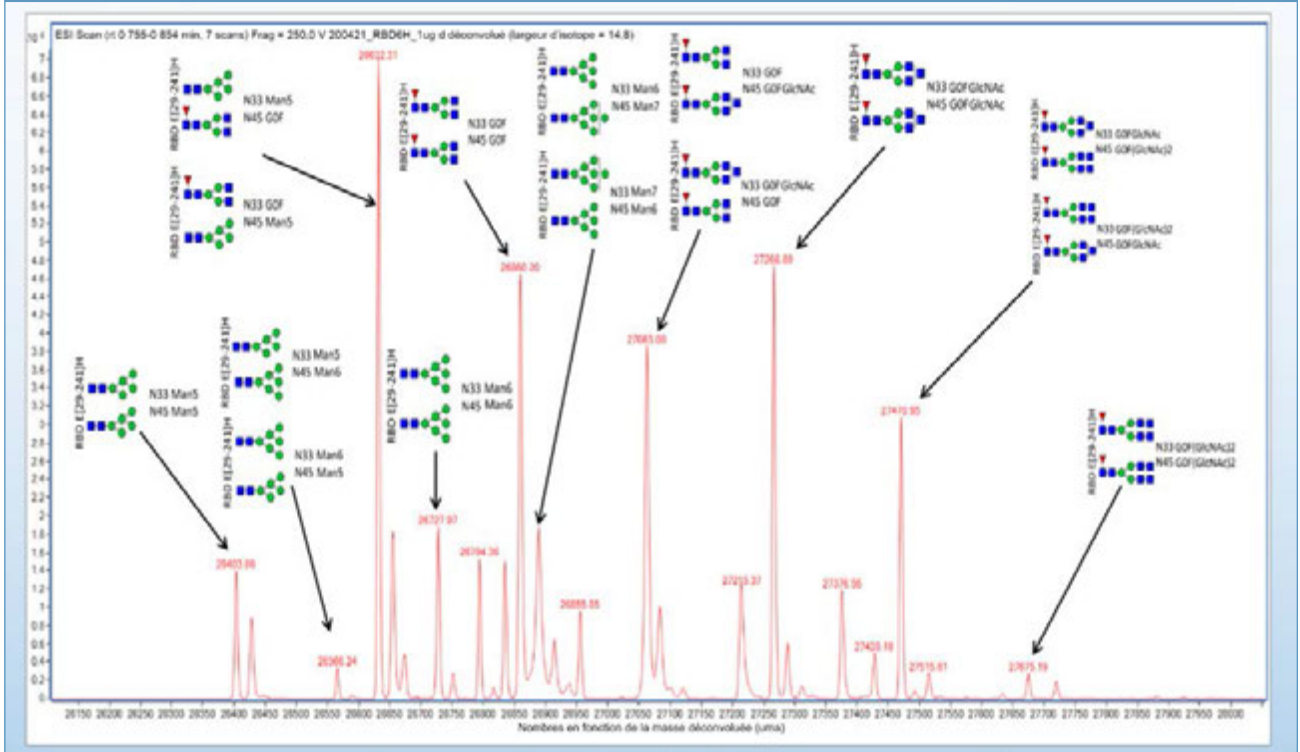
Rod Chalk

Une base de données principale permettant le profilage et la cartographie des glycopeptides de la protéine spike contribue à simplifier un processus analytique complexe et chronophage.

Introduction

La glycosylation complexe de la protéine spike du virus SARS-CoV-2 est supposée être impliquée dans le contournement de la réponse immunitaire et être responsable d'une plus grande pathogénicité. De nombreux laboratoires se penchent sur la protéine spike dans le cadre de leurs recherches, et ont besoin de méthodes analytiques fiables pour sa caractérisation complète. Ce point est important, car le motif de glycosylation est déterminé par le système d'expression cellulaire hôte utilisé et par les conditions de culture. Ces conditions sont difficiles à contrôler avec précision et la protéine spike produite est susceptible de varier d'un lot à l'autre. La complexité de cette glycosylation est à l'origine de nombreuses complications techniques pour la caractérisation complète de la protéine. L'analyse de la masse intacte par chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) n'est pas réalisable en raison du nombre trop important de glycanes potentiellement présents sur chacun des 22 sites de glycosylation. Ceux-ci entraîneraient un niveau exceptionnellement élevé de diversité et donc une dilution du signal. Et même si cette analyse était possible, elle ne permettrait pas d'obtenir la position des glycanes. L'analyse des glycanes libérés est possible, mais elle ne permet pas non plus d'obtenir la position des glycanes.

IDENTIFICATION, CARTOGRAPHIE ET QUANTIFICATION RELATIVE DES GLYCOPEPTIDES SPIKE DU SARS-COV-2 PAR PROFILAGE PAR TEMPS DE RÉTENTION ET MASSE EXACTE

FIGURE 1 : le domaine de liaison au récepteur de la protéine spike du SARS-CoV2 a deux sites de glycosylation (N343, N331), et plusieurs glycanes peuvent se lier à ces sites.

Cet article présente une nouvelle méthode dont la première étape consiste à générer une base de données incluant la masse et le temps de rétention des glycopeptides en couplant les techniques de LC-Q-TOF MS-MS. Cette base de données, qui est constituée de l'identification précise de chaque glycopeptide par la valeur couplée de sa masse exacte et de son temps de rétention, est ensuite intégrée à une méthode de caractérisation simple, efficace et rapide.

Problématiques liées à la protéine spike

La protéine spike native est trimérique. Le domaine de liaison au récepteur (RBD) du monomère spike n'a que deux sites de glycosylation (N343 et N331), mais chacun de ces sites peut accueillir différents types de glycanes. Malgré le faible nombre de sites de glycosylation du RBD, son profil de glycosylation

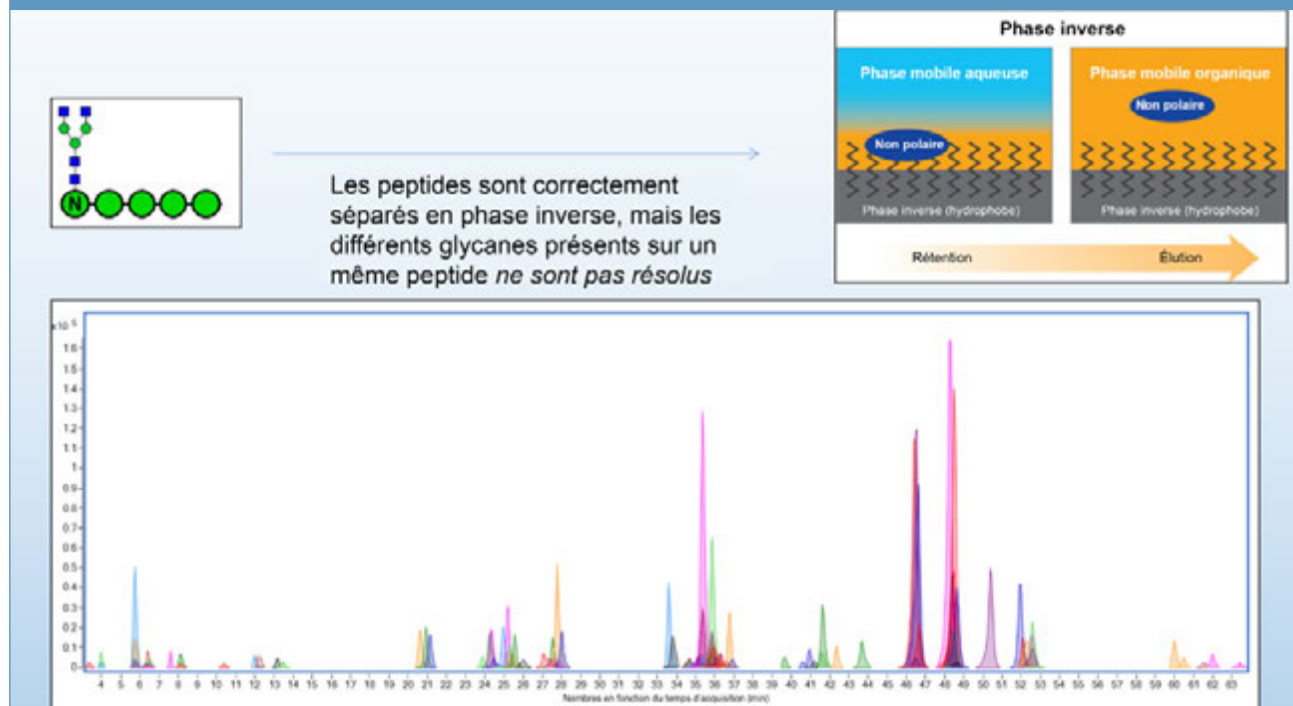
est complexe et présente de grandes variations entre échantillons, comme le montre le spectre de masse du site intact (FIGURE 1). La présence de deux sites entraîne l'existence de deux structures différentes pour une même masse, il est donc impossible de déterminer laquelle de ces structures est la bonne, et donc d'effectuer une identification complète.

La situation se complique davantage dans le cas de la protéine spike entière. Elle comporte en effet 22 sites de glycosylation, et même en supposant qu'il n'y ait que six glycanes par site, le nombre total de configurations possibles avoisine les 130 milliards. L'analyse par spectrométrie de masse de la protéine intacte est donc irréalisable. De plus, une telle analyse n'apporterait aucune information de position.

Une autre méthode consiste en l'analyse des glycopeptides. Dans ce cas, il est nécessaire de créer un site de glycosylation par peptide,

IDENTIFICATION, CARTOGRAPHIE ET QUANTIFICATION RELATIVE DES GLYCOPEPTIDES SPIKE DU SARS-COV-2 PAR PROFILAGE PAR TEMPS DE RÉTENTION ET MASSE EXACTE

FIGURE 2 : séparation des glycopeptides en phase inverse.



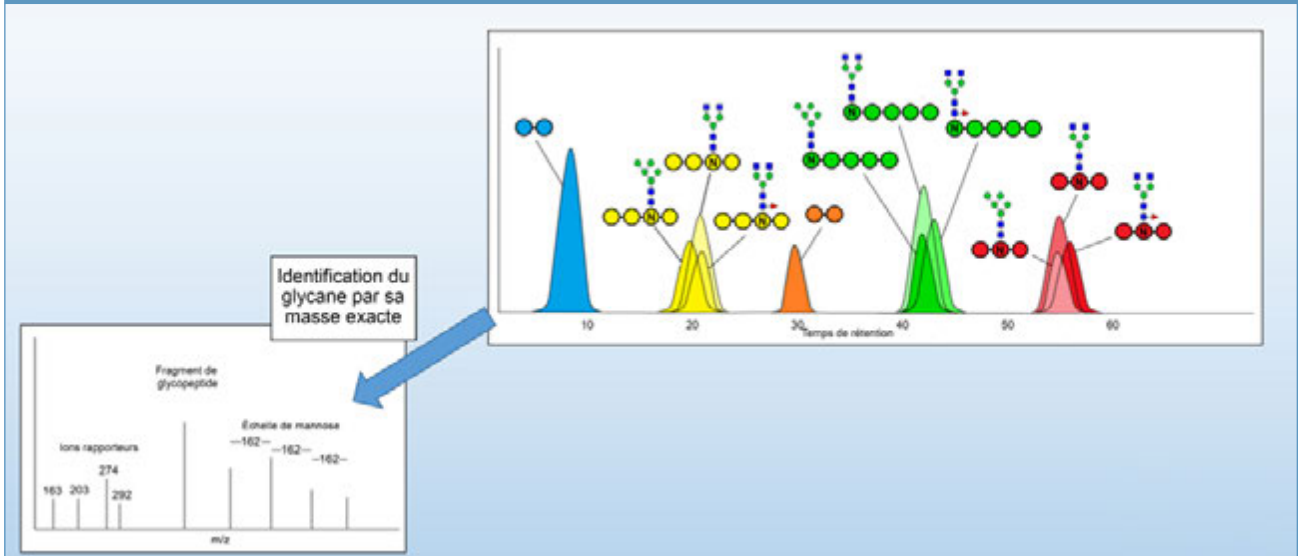
et de cartographier de façon définitive chacun desdits sites. Une digestion par la trypsine seule n'est pas suffisante, car il manque un site de clivage par la trypsine entre les deux sites de glycosylation présents sur le RBD. De plus, les masses du précurseur étant inconnues, aucune comparaison avec une base de données sur le précurseur n'est possible, nécessitant une analyse MS-MS. D'autres problématiques sont à prendre à compte : la molécule de glycopeptide est une molécule hybride composée d'une chaîne peptidique principale et de glycanes présentant des conditions optimales de fragmentation différentes. Une fragmentation optimale du glycane laisse le peptide intact, tandis qu'une fragmentation optimale du peptide implique de perdre l'information relative au glycane.

Méthode améliorée de séparation et de détection

Puisque l'utilisation de plusieurs enzymes entraînerait des complications supplémentaires,

les chercheurs du Centre for Medicines Discovery de l'Université d'Oxford ont décidé d'utiliser une seule enzyme, l'élastase, qui a davantage de sites de digestion que la trypsine, et permet d'obtenir des peptides plus petits. En particulier, l'élastase permet d'obtenir un seul peptide par site de glycosylation, ce qui est essentiel pour effectuer une cartographie fiable des glycopeptides. Les glycanes étant principalement polaires, ils peuvent être facilement isolés par chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC), tandis que les peptides, non polaires, peuvent être facilement isolés par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). Les peptides plus courts augmentent le signal de MS sur le chromatogramme d'ions totaux (CIT), et permettent d'obtenir une meilleure résolution en RP-HPLC. On voit en effet une excellente résolution des peptides après séparation, mais les glycanes sont élués simultanément et ne peuvent pas être isolés, ils apparaissent donc sous forme de multiples pics superposés (FIGURE 2).

IDENTIFICATION, CARTOGRAPHIE ET QUANTIFICATION RELATIVE DES GLYCOPEPTIDES SPIKE DU SARS-COV-2 PAR PROFILAGE PAR TEMPS DE RÉTENTION ET MASSE EXACTE

FIGURE 5 : l'échelle de mannose est le détail structural propre aux glycanes contenant du mannose.

Ce point pourrait être considéré comme problématique, mais les chercheurs ont décidé de l'utiliser pour mettre au point une nouvelle méthode afin d'identifier et de cartographier ces glycopeptides. L'équipe a utilisé une colonne Agilent AdvanceBio Peptide Mapping pour séparer les peptides et a remarqué que les mêmes peptides ayant des glycanes différents sont élués en même temps. Par conséquent, des glycanes ayant un même temps de rétention peuvent être cartographiés sur le même peptide. Puisque les glycanes d'un même peptide ont le même temps de rétention, et que leur masse exacte est connue, l'association des informations portant sur leur masse exacte et leur temps de rétention fournit un profilage permettant l'identification totale du glycopeptide.

Élaboration de la base de données

Mode opératoire de découverte des glycopeptides. Le mode opératoire (FIGURE 3) débute par une digestion enzymatique par l'élastase pendant la nuit, permettant d'obtenir un mélange de peptides et de glycopeptides. Une RP-HPLC est ensuite effectuée, au cours de laquelle les glycanes d'un même peptide

sont élués en même temps, et leur temps de rétention permet leur identification. Par exemple, le peptide GEVFNAT présente 27 glycoformes différentes et le chromatogramme d'ions avancé de la FIGURE 4 montre qu'elles sont toutes éluées dans un intervalle de temps de rétention de quatre minutes. L'étape suivante consiste à identifier les glycanes à partir de leur masse exacte. Le cycle de LC-MS/MS en contient plusieurs. Les glycopeptides sont caractérisés par des ions rapporteurs spécifiques correspondant aux sucres libres, au fragment de peptide et à l'échelle de mannose (détail structural propre aux glycanes contenant du mannose), comme le montre la représentation schématisée de la FIGURE 5. Après déconvolution du spectre de masse apparaît la séquence complète du glycanes, avec chacun des sucres, avec une précision en masse de 10 ppm.

La seconde étape du mode opératoire consiste en l'identification du peptide. Elle est effectuée par pseudo MS3, une méthode utilisant une haute tension du fragmenteur sur l'instrument de MS pour effectuer une fragmentation à la source du glycopeptide et éliminer les glycanes. La

IDENTIFICATION, CARTOGRAPHIE ET QUANTIFICATION RELATIVE DES GLYCOPEPTIDES SPIKE DU SARS-COV-2 PAR PROFILAGE PAR TEMPS DE RÉTENTION ET MASSE EXACTE

Une analyse MS/MS n'est pas nécessaire dans ce cas, car l'utilisation de la base de données permet d'attribuer les structures des glycopeptides à partir des informations de masse et de temps de rétention obtenues lors du cycle de LC-MS avec un bon niveau de confiance. Cette étape est effectuée de façon automatisée par le système Agilent MassHunter Qualitative Analysis, version B.07, et l'outil Molecular Feature Extraction (**FIGURE 6**). Cette méthode présente l'avantage supplémentaire de ne pas nécessiter de connaissance particulière en analyse des glycanes.

Conclusions

La base de données regroupant les informations de masse et de temps de rétention, élaborées à la suite d'une analyse détaillée permettant la découverte des peptides, simplifie de façon considérable la cartographie des glycopeptides spike du SARS-CoV-2 et évite d'avoir recours à une analyse complexe par MS/MS. Elle permet d'identifier les structures des glycopeptides simplement grâce à leur temps de rétention et à leur masse exacte. Ce mode opératoire simplifié est utilisable sur une large gamme d'instruments et de configurations de HPLC-MS. La méthode détaillée sera disponible gratuitement dès publication (Chalk, R., Greenland, W. et coll., *Identification, Mapping and Relative Quantitation of SARS-CoV-2 Spike Glycopeptides by Mass-Retention Time Fingerprinting*, sous presse) et la base de données est disponible en ligne (Chalk, R., Greenland, W. et coll., (2020). SARS-COV2 Spike Glycopeptide Mass-Retention Time PCDL database (Version 1) [Data set]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3958218>).

Pour la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins de diagnostic. Les produits Agilent ne sont pas homologués pour le dépistage, le diagnostic, le traitement ou l'atténuation de la COVID-19. Agilent n'a pas validé de produit pour détecter le nouveau coronavirus.

Rod Chalk, Ph.D.

Directeur du service de spectrométrie de masse,
Centre for Medicines Discovery
Université d'Oxford

