

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

(Ecole doctorale des sciences chimiques moléculaires et supramoléculaires de Strasbourg)

par

Guillaume CHEVREUX

Etude des interactions moléculaires spécifiques par spectrométrie de masse : application à la chimie du vivant

Soutenue le 25 octobre 2005 devant la commission d'examen :

Dr. Alain VAN DORSSELAER

Directeur de thèse

Prof. Jacques HAIECH

Rapporteur interne

Prof. Jean-François MULLER

Rapporteur externe

Dr. Bernard MONSARRAT

Rapporteur externe

Dr. Michel ROBIN

Examineur

Dr. Noëlle POTIER

Examineur

« Il vaut mieux suivre le bon chemin en boitant que le mauvais d'un pas ferme. » (Saint Augustin)

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg, sous la direction de Mr. Alain Van Dorsselaer.

Je souhaite tout d'abord témoigner ma profonde reconnaissance à Alain Van Dorsselaer de m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de découvrir dans un cadre studieux et agréable la spectrométrie de masse, la biologie et la recherche.

J'adresse mes profonds remerciements à Sanofi-Aventis pour le financement de cette thèse et plus particulièrement à Mr. Michel Robin (l'initiateur de cette aventure) qui a apporté beaucoup d'énergie, d'idées et de bonne humeur.

Je remercie sincèrement Noelle Potier de m'avoir patiemment guidé tout au long de ce travail, encouragé dans les moments difficiles et surtout de l'amitié qu'elle m'a témoigné.

Ce travail étant le fruit de nombreuses collaborations, j'exprime mes remerciements à toutes les personnes qui y ont contribué et plus particulièrement à Anne Houdusse pour son enthousiasme communicatif.

Je remercie bien sûr amicalement toute l'équipe du LSMBO qui m'a elle aussi soutenu et avec qui j'ai passé d'agréables moments.

Un grand merci à vous :

Laurent, Fabrice V et B, Hélène, Jonathan, Véro, Rosella, Steph, Claude, Sarah, Nathalie, Audrey, Sébastien, Danièle, Haïko, Emmanuelle, Raymond, René, Christine C et S, François, Junior, Dominique D et R, Dimitri, Cécile, Xiuli.

Enfin, un grand merci à mes proches :

A ma famille,

A mes voisins, les guillaume(s)

A Agathe

PLAN GENERAL

INTRODUCTION GENERALE	11
Les objectifs de ce travail de thèse	13
INTRODUCTION, BIBLIOGRAPHIE ET MISE EN OEUVRE EXPERIMENTALE ...	15
CHAPITRE I : Introduction aux interactions moléculaires et à leurs techniques d'analyse	17
CHAPITRE II : Théorie et appareillage	27
CHAPITRE III : Mise en œuvre expérimentale et méthodologie	39
Références bibliographiques	57
RESULTATS	71
CHAPITRE I : Utilisation de la SM pour découvrir et développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique	73
CHAPITRE II : Etude de mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires	109
CHAPITRE III : Suivi de la dynamique d'échange dans le temps de complexes non-covalents	179
Références bibliographiques	191
CONCLUSION GENERALE	197
PARTIE EXPERIMENTALE	203

PLAN DETAILLE

INTRODUCTION GENERALE	11
Les objectifs de ce travail de thèse	13
INTRODUCTION, BIBLIOGRAPHIE ET MISE EN OEUVRE EXPERIMENTALE ...	15
CHAPITRE I : Introduction aux interactions moléculaires et à leurs techniques d'analyse	17
I. Les différents types d'interactions rencontrées dans des complexes biologiques non-covalents ...	17
1. Forces électrostatiques	17
1.1. Interactions ioniques	17
1.2. Interactions de Van der Waals	18
1.2.1. Effet de Keesom (interactions dipôle-dipôle).....	18
1.2.2. Effet d'induction de Debye (interactions dipôle-dipôle induit).....	19
1.2.3. Effet de dispersion de London (interactions dipôle induit-dipôle induit).....	19
1.2.4. Energie et rayon de Van der Waals	20
2. Liaison hydrogène	20
3. Effet hydrophobe	21
4. Le rôle des ponts disulfures dans les protéines : un renforcement de la structure tridimensionnelle	21
5. Les interactions moléculaires sont dépendantes du milieu : importance pour la conformation d'une protéine	22
II. Les techniques d'analyse des interactions inter-moléculaires	22
1. Les techniques physiques actuelles	22
1.1. Les méthodes spectroscopiques (UV, fluorescence)	22
1.2. La microcalorimétrie	22
1.3. Le biacore	23
1.4. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	24
1.5. La Diffraction des Rayons X (DRX)	24
2. La spectrométrie de masse électrospray : une nouvelle méthode d'analyse des complexes non-covalents	25
CHAPITRE II : Théorie et appareillage	27
I. La spectrométrie de masse électrospray : la technique d'ionisation de choix pour l'étude des complexes non-covalents	27
1. Historique	27
2. Le spectromètre de masse électrospray	27
2.1. La production des ions en phase gazeuse par électrospray	28
2.1.1. La production des gouttelettes chargées à partir d'une solution	28
2.1.2. L'explosion coulombienne	30

2.1.3. Le transfert des ions en phase gazeuse	30
2.2. L'interface	31
2.3. Les analyseurs	32
2.3.1. Performances d'un analyseur	32
2.3.2. L'analyseur quadripolaire (Q)	33
2.3.3. L'analyseur à temps de vol (TOF)	35
II. Les appareils utilisés au laboratoire	37
1. Le LCT (Micromass, Manchester, UK)	37
2. Le Q-TOF (Micromass, Manchester, UK)	37
3. Le micrOTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)	38
CHAPITRE III : Mise en œuvre expérimentale et méthodologie	39
I. Deux types de spectrométrie de masse : la spectrométrie de masse moléculaire et supramoléculaire	39
II. Mise au point et instrumentation en spectrométrie de masse supramoléculaire	39
1. Importance de la préparation de l'échantillon	39
1.1. Les tampons compatibles avec l'analyse de masse	39
1.2. Les différentes techniques d'échange de tampon	41
2. Optimisation des paramètres d'analyse du spectromètre de masse	41
2.1. Les paramètres importants pour la conservation des interactions non-covalentes en phase gazeuse	41
2.2. Les paramètres importants pour la transmission des ions en phase gazeuse	44
III. Les informations obtenues et leur validité	45
1. Les informations déduites de la spectrométrie de masse	46
1.1. Détermination de la stœchiométrie des espèces formées en solution	46
1.2. La spécificité des interactions détectées	46
1.3. Evaluation de l'affinité en solution	47
1.4. Suivi de la conformation des biomolécules	48
1.5. Evaluation de la nature des interactions (électrostatique ou effet hydrophobe) par dissociation en phase gazeuse	49
1.5.1. Les interactions moléculaires sont modifiées en phase gazeuse	50
1.5.2. La conformation native d'une protéine est elle maintenue en phase gazeuse ?	50
1.5.3. Intérêt de la dissociation en phase gazeuse	52
2. Validité de l'approche	53
2.1. Les molécules non-volatiles peuvent s'agréger non-spécifiquement sur les biomolécules	53
2.2. L'équilibre chimique en solution est-il déplacé durant le processus électrospray?	53
2.3. Réactions d'association ou de dissociation des molécules en phase gazeuse	54
IV. Conclusion de cette étude bibliographique et perspectives d'études	54
Références bibliographiques	57

RESULTATS	71
CHAPITRE I : Utilisation de la SM pour découvrir et développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique	73
I. Recherche de ligands de protéines cibles par criblage	73
1. L'utilité de la SM dans le cadre pharmaceutique	73
1.1. Stratégie générale de recherche de molécules actives	73
1.2. Intérêts et objectifs de la SM	74
1.3. Description des projets étudiés	75
1.3.1. <i>Etude de la protéine chaperone Hsp90 (Heat Shock Protein)</i>	75
1.3.2. <i>Etude d'une protéase X</i>	76
2. Mise au point de protocoles à partir de ligands connus.....	76
2.1. Protocole de validation d'une interaction spécifique	76
2.2. Protocoles de classement des molécules spécifiques	79
2.2.1. <i>Selon leur affinité en solution</i>	79
2.2.2. <i>Selon leur stabilité en phase gazeuse</i>	80
3. Les possibilités d'automatisation	82
3.1. Mise en oeuvre expérimentale au laboratoire : difficultés rencontrées	82
3.1.1. <i>Description des conditions expérimentales dans le cas de la SM supramoléculaire</i>	82
3.1.2. <i>Description du système commercialisé par la société Advion</i>	83
3.2. Investigation des approches indirectes telles que la SEC-MS (Size Exclusion Chromatography)	84
4. Présentation des résultats	86
II. Utilisation de la SM pour le développement de nouveaux inhibiteurs : le cas de l'aldose réductase (AR)	87
1. Contexte biologique	87
2. Spécificité des interactions détectées	87
2.1. La SM distingue des interactions stéréospécifiques en solution	88
2.2. Déplacement de l'équilibre en solution	89
3. Application de la CID au développement de nouvelles molécules	90
3.1. Mesure des stabilités relatives des complexes AR-inhibiteurs en phase gazeuse : comparaison entre la dissociation dans l'interface et la cellule de collision	90
3.2. Influence de différents groupements chimiques sur la dissociation en phase gazeuse	92
3.3. La SM en tandem peut elle fournir des informations supplémentaires ?	93
Publication : Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modelling and noncovalent mass spectrometry	95
III. Conclusion	107

CHAPITRE II : Etude de mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires	109
I. La myosine VI est un moteur moléculaire dit non-conventionnel	109
1. Contexte biologique	109
2. Mesure des stœchiométries de chaque construit	112
2.1. Analyse des construits de bas poids moléculaires avec un domaine moteur tronqué	112
2.1.1. Analyse du construit « convertisseur + insertion »	112
2.1.2. Analyse du construit « convertisseur + insertion + motif IQ »	113
2.2. Analyse des construits de hauts poids moléculaires avec un domaine moteur non tronqué	114
2.2.1. Analyse du construit « MD »	114
2.2.2. Analyse du construit « MD + insertion »	114
2.2.3. Analyse du construit « MD + insertion + motif IQ »	115
2.2.4. Analyse du construit « MD + insertion + motif IQ + 78 AA »	116
3. Quelles informations peut on obtenir par dissociation en phase gazeuse ?	117
4. Une meilleure compréhension du mécanisme de motilité de la myosine VI	118
Publication : The myosin VI insert is a new calmodulin binding site	119
Publication : Electrospray ionization mass spectrometry studies of noncovalent myosin VI complexes reveal a new specific calmoduline binding site	127
II. Le mécanisme d'adhésion moléculaire impliquant les E-cadhérines	139
1. Contexte biologique	139
2. Titration suivie par SM : mise en évidence d'un phénomène de coopérativité	140
Publication : Folding maturation of the cadherin monomer modulated by cooperative binding of Ca ²⁺ ions	143
III. Etude du mécanisme de réduction de plusieurs méthionine sulfoxyde réductases par la thiorédoxine	159
1. Contexte biologique	159
2. Localisation de l'interaction msr-thioredoxine	160
Publication : The recycling of methionine sulfoxide reductases A and B by thioredoxin differs in the nature of the transient intermolecular disulfide species	163
IV. Conclusion	177
CHAPITRE III : Suivi de la dynamique dans le temps de complexes non-covalents	179
I. Dynamique d'échange des deux sous-unités du dimère de la glucosamine 6-phosphate synthétase (GlmS)	179
1. Contexte biologique	179
1.1. GlmS est une cible thérapeutique potentielle	179
1.2. La structure et le cycle catalytique de GlmS	180
2. Stratégie d'analyse et interprétation des données	182
3. Influence des substrats et produits sur la cinétique d'échange des sous-unités du dimère de GlmS ...	183
4. Influence de la mutation d'un acide aminé sur la stabilité du dimère de GlmS	184
II. Cinétique d'association et de dissociation de complexes protéine-ligand	185
1. Objectifs	185
2. Exemple de la cinétique d'association d'un substrat suicide sur une kinase X	186

3. Exemple de la cinétique de dissociation de ligands de l'AR	187
III. Conclusion	188
Références bibliographiques	191
CONCLUSION GENERALE	197
PARTIE EXPERIMENTALE	203

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ : peptide amyloïde β	IT : ion trap
AcNH₄ : acétate d'ammonium	ITC : isothermal titration calorimetry
ADH : alcool dehydrogenase	k_{off} : constante de dissociation cinétique
ADPMg : magnésium adénosine diphosphate	k_{on} : constante d'association cinétique
ATP : adénosine triphosphate	Ka : constante d'association thermodynamique
APP : amyloïd precursor protein	Kd : constante de dissociation thermodynamique
AR : aldose reductase	Maldi : matrix assisted laser desorption/ionization
Ca²⁺ : ion calcium	met : methionine
CE : voltage à la sortie du capillaire de transmission	MSMS : spectrométrie de masse en tandem
CID : collision induced dissociation	msr : méthionine sulfoxyde reductase
CRM : charged residue mechanism	metSO : méthionine sulfoxyde
DI : diamètre interne	m/z : rapport masse sur charge
DMSO : diméthylsulfoxyde	NADP : nicotinamide adenine dinucleotide
DRX : diffraction des rayons X	phosphate
Ec : énergie cinétique	NOE : nuclear overhauser effect
EGTA : ethylenebis(oxonitrilo) tetraacetate	Q : quadripôle
ESI : ionization électrospray	RF : radio-fréquence
ETD : electron transfer dissociation	RMN : résonance magnétique nucléaire
FWHM : full width at half maximum	SM : spectrométrie de masse
GImS : glucosamine 6-phosphate synthétase	TOF : time of flight
Hepes : 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic Acid	Tris : tris-(hydroxyméthyl)-aminoéthane
HPr : histidine containing protein	UV : ultraviolet
HSQC : heteronuclear single quantum coherence	Vc : voltage de cône
Hsp90 : heat shock protein 90	ΔG : énergie libre de Gibbs
HTS : high throughput screening	ΔH : enthalpie
ICR : ion cyclotron resonance	ΔS : entropie
IEM : ion evaporation mechanism	ϵ : constante diélectrique

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les objectifs de ce travail de thèse

La spectrométrie de masse (SM) avec ionisation par électrospray (ESI) a été décrite pour la première fois en 1991 par Ganem et Henion comme un outil d'étude des complexes non-covalents [Ganem et coll. **1991a**]. L'idée que des complexes non-covalents spécifiques puissent survivre au processus d'ionisation/évaporation et à l'analyse par SM a été longue à être acceptée par les spécialistes de la SM et plus encore par la communauté des biologistes. Cependant, un travail expérimental méthodique a été réalisé ces quinze dernières années par quelques laboratoires qui ont, petit à petit, développé des méthodologies et amené des éléments, qui prouvent que les spectres de masse électrospray de complexes non-covalents, peuvent apporter des informations pertinentes en biologie. Le terme « SM supramoléculaire » a alors été introduit pour définir l'étude des complexes non-covalents par SM.

Le développement d'approches expérimentales (traitement et préparation des échantillons, réglage des spectromètres de masse) a d'abord eu pour objectif d'obtenir des spectres de masse qui reflètent fidèlement « l'image » des espèces présentes à l'équilibre en solution, si possible d'un point de vue quantitatif. Depuis environ cinq ans, ces méthodologies sont régulièrement utilisées pour déterminer des stœchiométries d'interaction en réponse à des problèmes biologiques précis. Par exemple, dans notre laboratoire, il a été montré qu'une enzyme bifonctionnelle, la HPr kinase/phosphatase, est sous forme hexamérique à pH 7, fonctionnant alors en tant que phosphatase, alors qu'à pH basique, cette enzyme est trimérique et fonctionne en tant que kinase [Sanglier et coll. **2002**]. De la même manière, l'état d'oligomérisation d'hémocyanines de crabes de très hauts poids moléculaires (≈ 2 MDa) a pu être déterminé de manière très précise par SM : ces résultats ont pu être mis en relation avec les différents biotopes naturels des crabes étudiés [Sanglier et coll. **2003**]. Notre laboratoire a également largement participé à montrer que la SM permet de détecter des ligands spécifiques en interaction avec des protéines et que des applications dans le domaine de l'industrie pharmaceutique sont envisageables [Rogniaux et coll. **1999**]. Clairement, les possibilités de la SM ont certes, lentement, mais régulièrement progressé au fil des années.

L'objectif de ce travail de thèse est d'explorer les possibilités de la SM pour obtenir de plus amples informations que les stœchiométries d'interactions, afin de résoudre des problèmes biologiques. En plus de répondre à la question « quelles sont les molécules constitutives d'un complexe ? », nous souhaitons pouvoir donner des réponses plus poussées à des questions telles que : « Où interagissent les molécules ? Quelle est la nature des interactions ? Quelle est leur dynamique ? ».

La première partie de ce mémoire est bibliographique et a pour but de placer notre travail de recherche dans son contexte et de préciser notre objectif scientifique. Nous rappelons l'état d'avancement des connaissances actuelles dans le domaine de la SM supramoléculaire. Les différents types d'interactions ainsi que leurs principales méthodes d'analyses dans le domaine de la biologie sont tout d'abord abordés. Puis, nous décrivons la théorie de la SM à ionisation ESI ainsi que les instruments utilisés. Enfin, les différents aspects de mise en œuvre et de méthodologie de la SM sont présentés.

La seconde partie de ce mémoire est consacrée à la présentation des résultats expérimentaux que nous avons obtenus et à leur interprétation. Les résultats sur le développement de la SM sont présentés à travers une suite d'exemples où nous tentons de donner un supplément d'information par rapport à la détermination des stœchiométries d'interaction. Nous avons notamment utilisé la SM dans trois types d'applications :

- Pour découvrir et développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

A travers différents systèmes protéiques (Hsp90, une protéase X et l'aldose réductase), nous nous sommes attachés à démontrer la spécificité des interactions détectées et la nature des interactions mises en jeu.

- Pour aider à la compréhension de mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires.

Nous avons caractérisé un moteur moléculaire dit « non-conventionnel » : la myosine VI, étudié le mécanisme Ca^{2+} -dépendant de l'adhésion cellulaire à travers la E-cadherine et enfin précisé le mécanisme d'interaction entre la thiorédoxine et une famille de méthionine sulfoxide réductases.

- Pour suivre la dynamique d'échange dans le temps de complexes biologiques non-covalents.

Nous avons utilisé la SM comme détecteur afin d'observer dans le temps des échanges protéine-protéine (exemple de la glucosamine 6-phosphate synthétase) et protéine-ligand (exemple de l'aldose réductase et d'une kinase X).

INTRODUCTION, BIBLIOGRAPHIE ET MISE EN OEUVRE EXPERIMENTALE

**CHAPITRE I : Introduction aux interactions moléculaires et à leurs
techniques d'analyse**

CHAPITRE II : Théorie et appareillage

CHAPITRE III : Mise en œuvre expérimentale et méthodologie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

Introduction aux interactions moléculaires et à leurs techniques d'analyse

I. Les différents types d'interactions rencontrées dans des complexes biologiques non-covalents

Le fonctionnement des systèmes biologiques est basé sur de remarquables mécanismes d'assemblage et de reconnaissance impliquant des interactions moléculaires non-covalentes de faible énergie. A l'échelle d'une protéine, c'est un subtil équilibre entre attractions et répulsions non-covalentes, qui sera à l'origine de sa structure tridimensionnelle et donc, à l'origine de son activité au sein de la cellule. Les messages biologiques qui sont intégrés dans leur structure ne peuvent s'exprimer que par l'intermédiaire d'interactions spécifiques qui s'établissent, de façon souvent réversible, avec d'autres partenaires de choix.

Dans ce chapitre, nous présenterons les caractéristiques qui définissent ces différentes forces d'interaction (longueur, énergie, géométrie) ainsi que la façon dont ses forces peuvent être rompues ou préservées.

1. Forces électrostatiques

1.1. Interactions ioniques

Une solution est dite « électriquement neutre » car la somme des charges portées par l'ensemble de ses molécules est nulle. Les interactions entre molécules portant des charges électriques sont régies par la loi de Coulomb. L'énergie potentielle d'interaction de deux charges électriques Q_1 et Q_2 séparées par une distance d est obtenue en calculant le travail nécessaire à la séparation de ces deux charges à une distance infinie (cf. Figure 1).

Figure 1 : Illustration de l'interaction entre deux charges, V représente l'énergie d'interaction, Chimie Physique 6^{ème} édition de Peter W. Atkins 1997.

$$V = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 d}$$

avec :

ϵ_0 : la permittivité du vide
 ϵ : la permittivité du milieu dans lequel évoluent les charges
 d : la distance entre les deux charges

L'énergie d'interaction est dépendante de la constante diélectrique (ϵ) du milieu dans lequel les charges sont immergées. La constante diélectrique de l'eau vaut 80, ce qui signifie que les forces ioniques sont considérablement diminuées en milieu aqueux par rapport à l'air libre ($\epsilon = 1$), d'où la dissolution de la plupart des cristaux salins dans l'eau. La constante diélectrique d'une région moléculaire est difficile à estimer. Pour l'intérieur d'une protéine, une valeur comprise entre 3 et 5 est habituellement prise par analogie avec les constantes diélectriques mesurées à partir de substances qui ont des polarités identiques comme le benzène et l'éther éthylique.

Les interactions ioniques sont fortes mais ne stabilisent pas fortement les protéines. En effet, en milieu aqueux, les acides aminés chargés sont majoritairement exposés à la surface de la protéine et sont donc très solvatés, ce qui réduit considérablement l'interaction charge/charge.

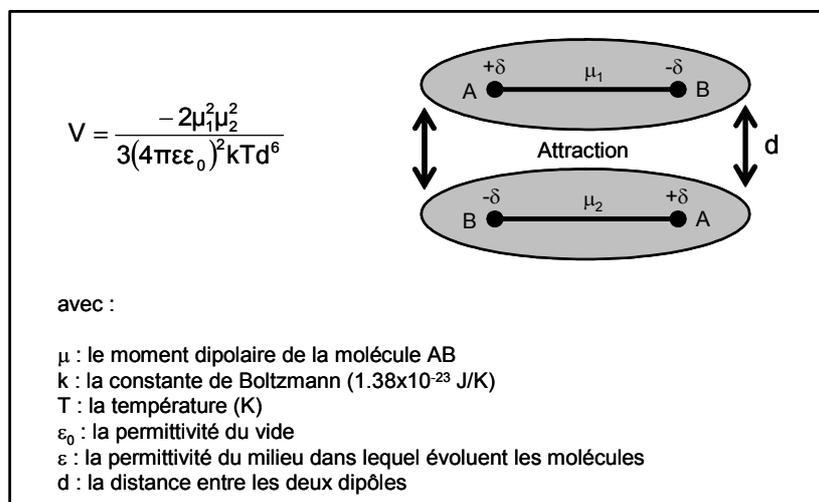
1.2. Interactions de Van der Waals

Les interactions entre molécules neutres se forment à partir d'interactions électrostatiques entre dipôles permanents et/ou dipôles induits. Les forces résultantes, sont responsables d'interactions multiples entre atomes voisins non liés et sont appelées communément forces de Van der Waals. On englobe sous le nom de liaison de Van der Waals trois types d'interactions intermoléculaires.

1.2.1. Effet de Keesom (interaction dipôle-dipôle)

Lorsque, dans une molécule neutre, les barycentres des charges positives et des charges négatives ne coïncident pas, on dit que la molécule est polaire et qu'elle possède un moment de dipôle électrique μ dirigé de la charge négative vers la charge positive. Deux molécules polaires peuvent trouver des positions favorables pour maximiser l'attraction entre elles (cf. Figure 2).

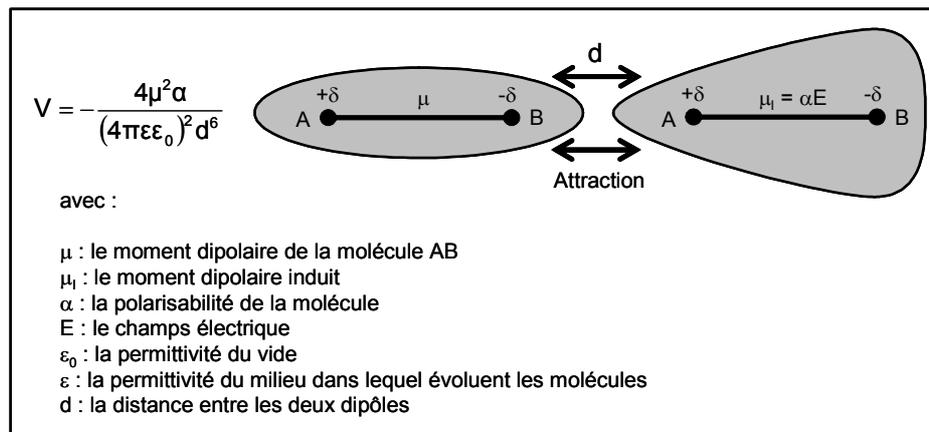
Figure 2 : Illustration de l'interaction dipôle-dipôle, V représente l'énergie moyenne d'interaction, Chimie Physique 6^{ème} édition de Peter W. Atkins 1997.



1.2.2. Effet d'induction de Debye (interaction dipôle-dipôle induit)

Une molécule polaire, de moment permanent μ , induit une déformation du nuage électronique des molécules apolaires voisines sous l'effet de son champ électrique E . Cette déformation du nuage électronique est caractérisée par la polarisabilité α de la molécule apolaire, qui augmente avec son nombre d'électrons. La molécule apolaire acquiert ainsi un moment dipolaire induit de norme $\mu_i = \alpha E$ qui interagit avec le dipôle permanent de la première molécule (cf. Figure 3).

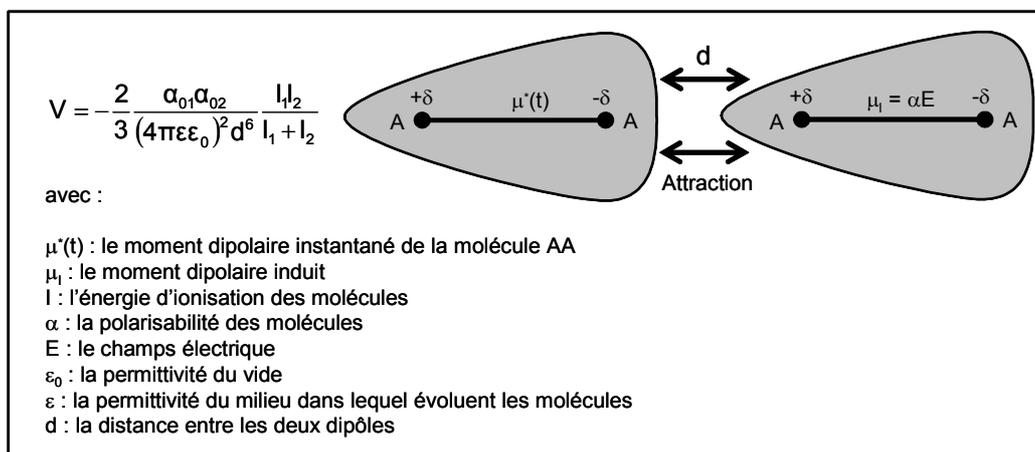
Figure 3 : Illustration de l'interaction dipôle-dipôle induit, V représente l'énergie moyenne d'interaction, Chimie Physique 6^{ème} édition de Peter W. Atkins 1997.



1.2.3. Effet de dispersion de London (interaction dipôle induit-dipôle induit)

Dans le cas des molécules apolaires, le mouvement des électrons de la molécule peut créer un moment de dipôle instantané μ^* qui peut polariser les molécules adjacentes et produire un moment de dipôle induit μ_i . Ces deux dipôles instantanés varient très rapidement au cours du temps et peuvent interagir ensemble (cf. Figure 4).

Figure 4 : Illustration de l'interaction dipôle induit-dipôle induit, V représente l'énergie moyenne d'interaction, Chimie Physique 6^{ème} édition de Peter W. Atkins 1997.



Les forces de London sont très faibles, cependant le grand nombre de contacts inter-atomiques dans les protéines, implique un rôle important de ces forces dans la stabilité de la structure tridimensionnelle d'une protéine.

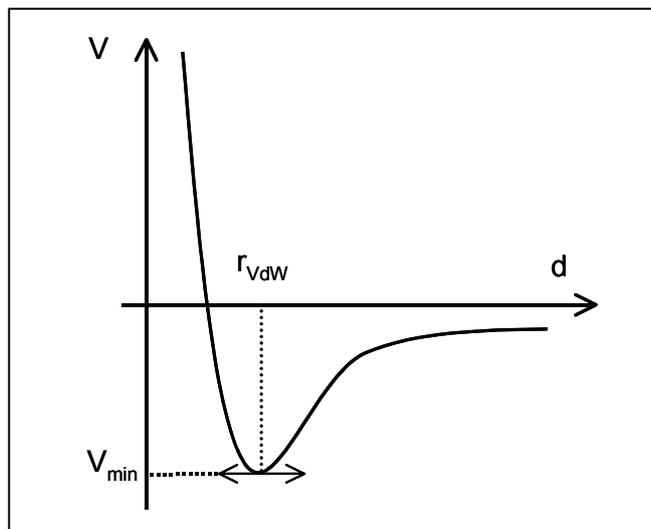
1.2.4. Energie et rayon de Van der Waals

Si seules existaient les forces attractives de Van der Waals, on ne pourrait pas expliquer l'existence d'une distance d'équilibre intermoléculaire. Des forces de répulsion viennent ainsi s'opposer aux forces d'interactions de Van der Waals, ces forces sont dues à l'impénétrabilité des molécules les unes dans les autres.

On peut tracer V en fonction de la distance intermoléculaire d et en déduire le rayon de Van der Waals à la position d'équilibre, c'est-à-dire au minimum d'énergie (cf. Figure 5). Cette représentation du potentiel est également connue sous le nom de « potentiel de Lennard Jones », il s'exprime sous la forme :

$$V = -\frac{k_1}{d^6} + \frac{k_2}{d^n} \text{ avec } n \text{ compris généralement entre } 10 \text{ et } 16 \text{ et } k_1, k_2 \text{ des constantes.}$$

Figure 5 : Graphique représentant le potentiel de Lennard Jones en fonction de d , le rayon de Van der Waals correspond au minimum d'énergie.



En conclusion, les interactions de Van der Waals sont faibles (de l'ordre de quelques kJ/mol) mais stabilisent significativement la structure des protéines.

2. Liaison hydrogène

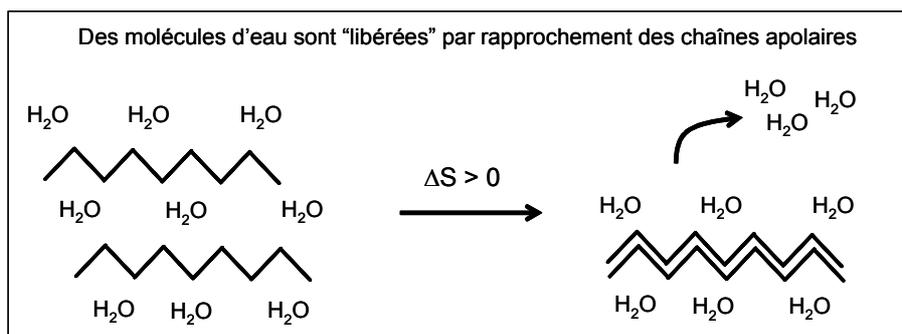
L'origine de la liaison hydrogène est essentiellement électrostatique et de type dipôle-dipôle induit. Un hydrogène porté par un atome fortement électronégatif va porter une fraction de charge positive qui polarisera fortement une autre molécule possédant un doublet non liant. L'interaction forte entre le dipôle et le dipôle

induit entraînera leur alignement et une grande proximité des atomes considérés par rapport aux interactions typiques de Van der Waals. La liaison hydrogène est donc dirigée et est de force supérieure aux liaisons de Van der Waals (10 à 30 kJ/mol).

3. Effet hydrophobe

L'effet hydrophobe est un comportement de ségrégation des molécules apolaires sous l'effet des propriétés très particulières de l'eau (en particulier de la valeur élevée de sa constante diélectrique). Dans l'eau, une chaîne carbonée apolaire ne peut ni accepter ni former de liaison hydrogène si bien que localement, les molécules d'eau se réorganisent pour former des liaisons hydrogène avec d'autres molécules selon leur mode habituel. La solvation d'une molécule non polaire est un processus de mise en ordre des molécules d'eau (formation de clathrates), qui est donc synonyme de diminution d'entropie [Tanford 1997]. Le regroupement de plusieurs chaînes carbonées dans l'eau sera à l'inverse un processus naturel, favorisé entropiquement ($\Delta S > 0$), qui « libérera » des molécules d'eau (cf. Figure 6).

Figure 6 : Illustration de l'effet hydrophobe.



Des données relatives à la diminution d'entropie lors de la solvation de molécules apolaires sont décrites dans la littérature [Widom et coll. 2003]. En particulier, une diminution d'entropie est déjà observée pour la solvation de molécules apolaires de petites tailles telles que le méthane, l'éthane ou le propane.

Etant donné que les protéines natives forment une sorte de « micelle intramoléculaire » dans laquelle les chaînes latérales non polaires sont fortement à l'abri de l'eau, l'effet hydrophobe doit constituer un facteur déterminant dans la structure des protéines [Pratt et coll. 2002]. La thermodynamique mesure cet effet hydrophobe par le terme d'entropie.

4. Le rôle des ponts disulfures dans les protéines : un renforcement de la structure tridimensionnelle

Les ponts disulfures se forment en même temps que la protéine se replie dans sa conformation native et servent à la stabilisation de la structure tridimensionnelle par le biais d'interactions covalentes fortes. Ce type d'interaction dépend du milieu plus ou moins oxydant dans lequel évolue la protéine.

5. Les interactions moléculaires sont dépendantes du milieu : importance pour la conformation d'une protéine

La stabilité conformationnelle d'une protéine dépend d'un équilibre subtil entre forces faibles non-liantes attractives et répulsives. Cet équilibre des forces peut facilement être modifié et la protéine peut alors perdre sa conformation native et donc son activité : on dit alors que la protéine est dénaturée. Citons par exemple les variations de pH, les détergents, les substances organiques et les variations de température qui peuvent influencer sur l'équilibre des interactions protéiques et donc qui peuvent induire la dénaturation de la protéine.

II. Les techniques d'analyse des interactions inter-moléculaires

1. Les techniques physiques actuelles

1.1. Les méthodes spectroscopiques (UV, fluorescence)

Les méthodes spectroscopiques sont souvent utilisées pour mettre en évidence des interactions moléculaires. Le principe est simple : il est basé sur la modification de l'absorbance d'une molécule suite à une interaction ou à une rupture d'interaction moléculaire. Ces méthodes sont très souvent utilisées pour suivre, par exemple, l'évolution d'une réaction enzymatique.

La simplicité de mise en œuvre, la très bonne sensibilité et le faible coût en matériel biologique sont les principaux atouts de ces techniques. Cependant, elles ne peuvent être appliquées que si l'une des molécules impliquée dans un complexe possède des propriétés spectrales particulières et que l'absorbance du groupement visé est affectée par l'interaction.

1.2. La microcalorimétrie

La microcalorimétrie isotherme (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) est une technique d'analyse basée sur la mesure de variations de chaleur induites au cours d'une titration. En pratique, une macromolécule située dans la cellule de mesure d'un calorimètre est progressivement saturée à température constante, par l'injection d'un ligand à partir d'une seringue. Pour chaque ajout de ligand, a lieu un échange thermique caractéristique de l'interaction macromolécule-ligand. Les quantités de chaleur mesurées au cours de la titration permettent d'obtenir l'isotherme de liaison et les paramètres thermodynamiques de l'interaction tels que les variations d'énergie libre (ΔG), d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS).

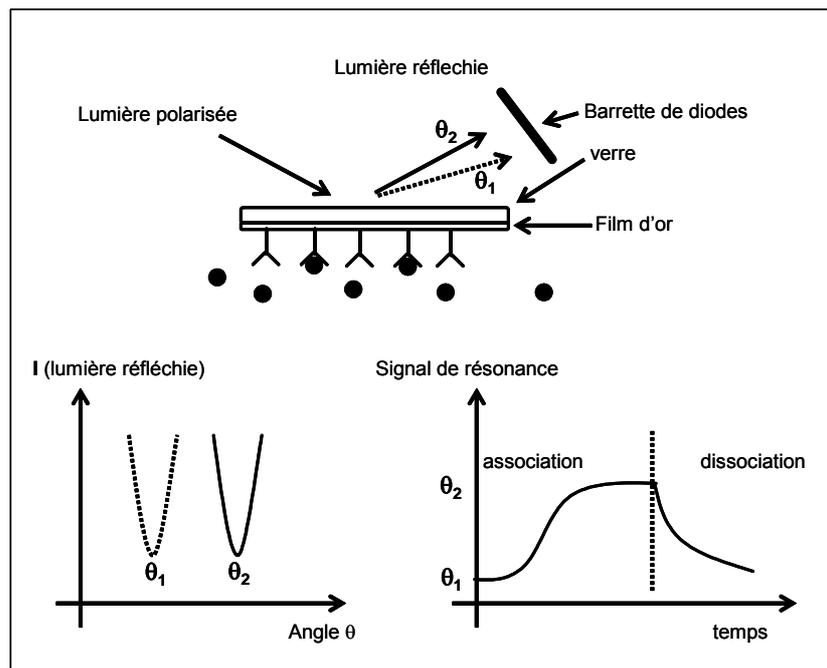
L'ITC permet donc de mettre en évidence une interaction, de déterminer la constante de dissociation K_d (10^{-3} à 10^{-8} M) et la stœchiométrie du système. De plus, les données thermodynamiques déduites par microcalorimétrie permettent de connaître très précisément les contributions enthalpique et entropique dans l'énergie d'interaction : on peut ainsi préciser la nature des forces contribuant à la formation des complexes (hydrophobe ou électrostatique). La microcalorimétrie peut aussi se révéler utile pour étudier des phénomènes d'ionisation, ou pour mettre en évidence et quantifier une compétition entre deux ligands.

Cependant, la sensibilité de l'appareillage ne permet d'étudier la formation d'un complexe qu'avec une quantité de réactifs assez importante (de l'ordre du milligramme pour une protéine), les expériences sont relativement longues et difficiles à mettre en oeuvre. C'est pourquoi, la microcalorimétrie demeure une technique utilisée à faible débit afin de caractériser finement une interaction.

1.3. Le biacore

Le biacore a pour fonction de visualiser en temps réel des interactions entre un flux de biomolécules et des ligands greffés sur une surface (sensor-chip ou bio-capteur) [Hall **2001**, Rich et coll. **2001**]. L'analyse est basée sur un effet physique appelé « résonance plasmonique de surface » : une onde est envoyée sur une surface en verre sur laquelle est déposée une fine couche de métal riche en électrons libres. Pour un angle bien défini (angle de résonance), les électrons du métal entrent en résonance avec les photons du rayon incident. Cet angle de résonance dépend de l'indice de réfraction du milieu (cf. Figure 7). Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé avec une barrette de diodes présente une chute d'intensité à un angle défini.

Figure 7 : Schéma général de fonctionnement du biacore. La formation du complexe induit une modification de la réfringence du milieu qui est détectée par la modification de l'angle de polarisation θ .



L'analyte dilué dans un tampon circule à flux constant à la surface du bio-capteur. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le bio-capteur. A partir de modèles cinétiques appropriés [Cooper et coll. **1999**, Edwards et coll. **1998**], il est ensuite possible d'accéder à la constante de dissociation K_d de l'interaction mais aussi aux constantes cinétiques d'association et de dissociation (k_{on} , k_{off}).

Les limitations du biacore sont essentiellement liées au greffage du ligand sur le bio-capteur qui peut s'avérer être une étape délicate et à la régénération de la surface greffée (k_{off} très lent). Par ailleurs, les phénomènes d'absorption non spécifique des molécules peuvent compliquer l'interprétation des résultats.

1.4. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est une technique spectroscopique basée sur l'interaction entre un champ magnétique et les spins des noyaux atomiques. L'étude d'interactions protéine/ligand au niveau atomique par RMN a été rendue possible grâce au développement d'expériences adéquates basées sur les signaux de résonances de la protéine ou des ligands [Fielding **2000**, Clarkson et coll. **2003**]. En théorie, tous les paramètres spectroscopiques de la RMN peuvent servir à évaluer une interaction entre deux molécules (par exemple le déplacement chimique, le temps de relaxation, l'effet NOE ou les constantes de diffusion). En général, deux approches expérimentales sont plus souvent employées [Meyer et Peters **2003**]. La première consiste à cibler les signaux de RMN du ligand et notamment à regarder l'effet NOE transféré de la protéine au ligand lorsque celui-ci interagit avec sa cible. La seconde approche utilise le déplacement chimique de la protéine cible induit par l'interaction du ligand. En général, ces modifications de déplacement chimique sont déduites à partir d'expérience hétéro-nucléaires ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC ou $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC). De telles expériences nécessitent cependant une protéine marquée ^{15}N ou ^{13}C .

La RMN peut fournir beaucoup d'informations permettant de caractériser l'interaction entre une protéine et un ligand. Cependant, cette technique consomme des quantités importantes de matériel biologique, de l'ordre du milligramme par analyse. En outre, la vitesse de dissociation des complexes protéine/ligand doit être suffisamment rapide, ce qui ne permet d'analyser que des interactions avec une affinité de l'ordre du millimolaire ou intermédiaire au micromolaire.

1.5. La diffraction des rayons X (DRX)

La cristallographie utilise la diffraction des rayons X pour déduire la position exacte des atomes constituant le composé à analyser. Dans le cas des biomolécules, il est possible de cristalliser une protéine en interaction avec son ligand et d'en déduire la structure tridimensionnelle. Une telle structure permet de découvrir le site actif de la protéine, d'évaluer les modes de fixation du ligand et donc d'optimiser la structure du ligand afin d'améliorer son interaction avec sa cible. La cristallographie est la technique de choix employée dans les étapes de « drug design » lorsqu'une molécule active (appelée « lead ») a été sélectionnée. Nous présenterons dans la partie Résultats de ce manuscrit, une étude sur l'Aldose Réductase (AR) utilisant la structure cristallographique de la protéine pour développer de nouveaux ligands (collaboration avec l'IGBMC, Alberto Podjarny).

L'obtention des cristaux nécessaires à la mesure et la grande consommation en matériel sont les principaux désavantages de cette technique.

2. La spectrométrie de masse électrospray : une nouvelle méthode d'analyse des complexes non-covalents

Les années 80 marquent le début d'une nouvelle tendance dans les applications de la SM. L'apparition du mode d'ionisation électrospray apporta de nouvelles applications dirigées vers le domaine de la biologie [Fenn et coll. **1989**]. La SM électrospray permettait de mesurer avec une grande précision la masse de biomolécules. Peu de temps après, une nouvelle application originale fut reportée : il fut démontré qu'il était possible de conserver dans le spectromètre de masse des interactions non-covalentes spécifiques en solution [Ganem et coll. **1991b**, Katta et coll. **1991a**]. Cette découverte provoqua un réel enthousiasme, l'étude des interactions inter et intra-moléculaires par SM ne cessa de se développer par la suite [Henion et coll. **1993**, Jaquinod et coll. **1993**, Barth et coll. **1993**, Ogorzalek Loo et coll. **1993**]. L'enjeu et les défis étaient grands : il s'agissait d'établir les informations que pouvait apporter cette nouvelle stratégie et de prouver leur validité.

CHAPITRE II

Théorie et appareillage

I. La spectrométrie de masse électrospray : la technique d'ionisation de choix pour l'étude des complexes non-covalents

1. Historique

L'action d'un champ électrique sur un liquide est un phénomène connu depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Lord Rayleigh fut le premier à décrire l'instabilité d'une gouttelette chargée en 1882 [Rayleigh **1882**]. Un liquide soumis à un champ électrique suffisamment fort, se polarise. Le liquide contenant alors un excès de charges prend la forme d'un cône, qui émet un jet de liquide à sa pointe. Le jet liquide forme ensuite une multitude de gouttelettes chargées afin de compenser l'instabilité du liquide chargé par des forces de tension de surface. La première observation scientifique de ce phénomène a été reportée par le physicien John Zeleny en 1914 [Zeleny **1914**].

L'interaction entre un liquide et un champ électrique a été décrite physiquement 50 ans plus tard par Taylor [Taylor **1964**]. Ce sont enfin les expériences de Malcolm Dole à la fin des années 60 et au début des années 70 qui ont suggéré que le mécanisme électrospray pouvait être utilisé pour mesurer des masses élevées de molécules [Dole et coll. **1968**]. L'analyse par électrospray de polymères tels que des polystyrènes aboutissait à la formation d'ions mono et multi-chargés. C'est en 1984 que Yamashita et Fenn rapportent avec succès le couplage d'un spectromètre de masse électrospray avec un quadripôle [Yamashita et coll. **1984**]. Ils démontrent avec cet appareil que des ions peuvent être obtenus sans fragmentation à partir de molécules non-volatiles. Un peu plus tard, les premiers exemples de spectres de biomolécules obtenus par électrospray apparaissent [Chowdhury et coll. **1990a**, Gallagher et coll. **1990**, Larsen et coll. **1991**, Fenn et coll. **1989** et **1990**, Loo et coll. **1992**].

2. Le spectromètre de masse électrospray

Le spectromètre de masse électrospray peut être schématisé par quatre régions :

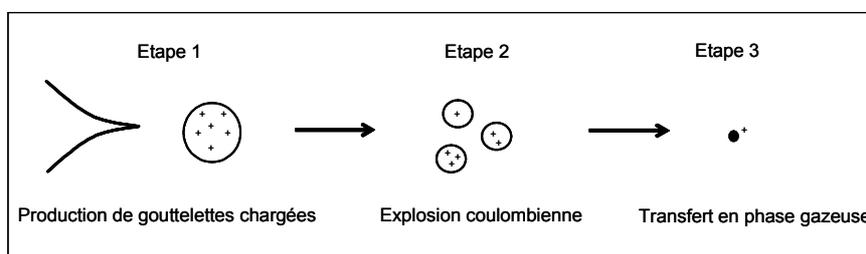
- La source, où s'effectuent l'ionisation et la désorption des ions.
- L'interface, qui assure le transfert des ions de la pression atmosphérique à la phase gazeuse.
- L'analyseur, où s'effectue la discrimination de masse en fonction du rapport m/z.
- Le détecteur, où s'effectuent la mesure et l'enregistrement des signaux.

2.1. La production des ions en phase gazeuse par électrospray

L'ionisation par électrospray consiste donc à générer des ions en phase gazeuse à partir d'un liquide soumis à un champ électrique intense. En pratique, un fort potentiel est appliqué à la pointe d'un capillaire métallique contenant une solution d'électrolytes. Trois étapes majeures interviennent dans la formation des ions (cf. Figure 1) :

- La production des gouttelettes chargées à la pointe du capillaire métallique.
- La fission des gouttelettes chargées par explosions coulombiennes.
- Le transfert des ions désolvatés en phase gazeuse.

Figure 1 : Illustration de la production des ions en mode d'ionisation électrospray.



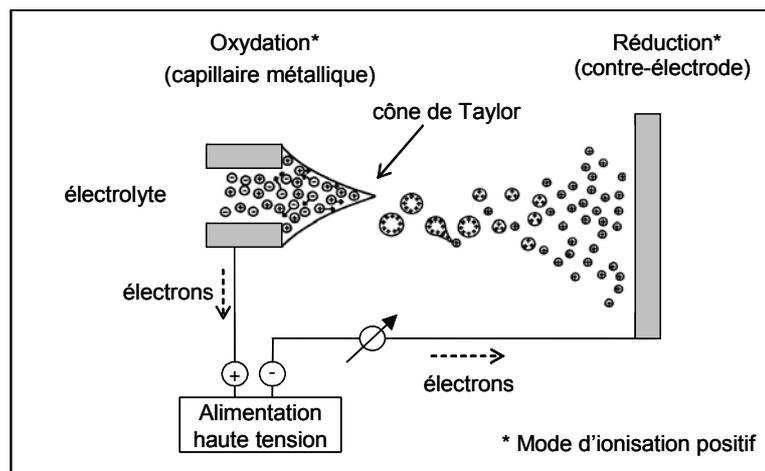
2.1.1. La production des gouttelettes chargées à partir d'une solution

Une solution d'électrolytes est introduite dans un capillaire sur lequel est appliqué un champ électrique intense (10^6 V/m). Le champ électrique provoque la séparation électrophoretique des charges positives et négatives en solution afin d'induire un champ électrique contraire au champ imposé à la pointe du capillaire.

En mode d'ionisation positif, le capillaire métallique constitue l'anode (oxydation), à cet endroit les charges négatives sont neutralisées par oxydation de l'électrolyte, du solvant ou du capillaire. Les charges positives s'accumulent à la pointe du capillaire et à la surface du liquide. Pour un champ électrique critique, le liquide prend la forme d'un cône mieux connu sous le nom de « cône de Taylor » où il y a formation de gouttelettes enrichies en ions positifs (cf. Figure 2). C'est pour cette raison que l'électrospray peut être considéré comme une cellule électrolytique [Blades et coll. **1991**, Van Berkel et coll. **1992** et **1995**, Fernandez de la Mora **2000**].

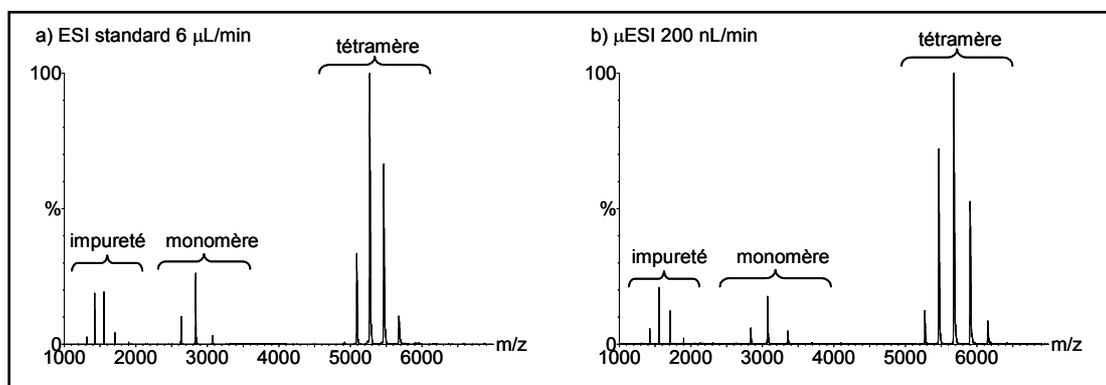
Pour une molécule, le courant d'ions produit par électrospray dépend de ses propriétés physico-chimiques et de sa concentration (dans une certaine gamme de dilution) [Tang et coll. **1991** et **1993**]. Des données quantitatives peuvent donc être obtenues par électrospray.

Figure 2 : Illustration de la production de gouttelettes chargées en mode d'ionisation électrospray.



En pratique, l'électrospray standard est obtenu à des débits de 1 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Une assistance pneumatique ou par ultrasons est requise pour obtenir une production stable et régulière de gouttelettes chargées [Ikonomou et coll. **1991**]. Une variante de l'électrospray appelée « nanospray » consiste à former des gouttelettes chargées de plus petite taille, ce qui a pour avantage de pouvoir travailler avec un débit en électrolyte moins important, de l'ordre de 10 à 100 nL/min [Wilm et coll. **1996**, Chernushevich et coll. **2004a**]. Dans ce cas, l'assistance gazeuse du spray n'est pas nécessaire. Les courants d'ions produits en électrospray et en nanospray sont similaires, cependant en nanospray, le volume d'échantillon consommé est considérablement réduit. Expérimentalement, l'obtention de gouttelettes chargées de petite taille est possible à partir d'un capillaire conducteur de très faible diamètre : souvent, ce sont des aiguilles métallées qui sont utilisées. Cependant, ces aiguilles qui ont une usure rapide, sont souvent remplacées par un fin capillaire en silice et une jonction métallique permettant de travailler à des débits de l'ordre de 100 à 300 nL/min : on parle alors de « microspray » (cf. Figure 3).

Figure 3 : Comparaison entre l'électrospray standard (a) et le microspray (b) sur un échantillon d'ADH (yeast) 10 μM dans AcNH_4 50 mM avec l'appareil de type LCT. Les spectres obtenus ont un rapport signal/bruit équivalents mais le volume d'échantillon utilisé est 30 fois inférieur dans le cas du microspray (30 μl consommé pour obtenir le spectre en (a) contre 1 μl en (b)). Plus le capillaire utilisé à un diamètre extérieur fin, plus les gouttelettes générées seront petites et plus il est possible de diminuer le débit d'introduction de l'échantillon.



Malgré le gain de sensibilité apporté par le nanospray ou le microspray, ces techniques sont encore peu employées dans le domaine des complexes non-covalents du fait des conditions expérimentales qui peuvent se révéler hasardeuses (précipitation dans le capillaire, volume mort important, spray moins stable). Plus récemment, une autre variante de l'électrospray est apparue, appelée « cold-spray ». Dans ce cas, la source entière est refroidie afin d'obtenir une ionisation dans des conditions douces susceptibles de mieux préserver les complexes non-covalents fragiles [Yamaguchi et coll. **2003**].

2.1.2. L'explosion coulombienne

Les gouttelettes chargées produites par électrospray se retrouvent dans une atmosphère souvent chauffée. L'énergie thermique de l'air ambiant va entraîner l'évaporation progressive des molécules de solvant des gouttelettes qui subiront ainsi une diminution de leur volume. La diminution du rayon de la gouttelette a lieu jusqu'à ce que la limite de stabilité de Rayleigh soit atteinte (cf. Figure 4) : c'est-à-dire au moment où les forces de répulsions électrostatiques sont égales aux forces de tension de surfaces [Gomez et coll. **1994**, Kebarle **2000**].

Figure 4 : Relation entre le rayon critique de Rayleigh et la charge Q de la gouttelette, d'après *Electrospray ionisation mass spectrometry : fundamentals, instrumentation and applications*, Richard B. Cole, 1997.

$$Q = 8\pi(\epsilon_0\gamma R_r^3)^{0.5}$$

avec :

- R_r : le rayon critique de Rayleigh
- Q : la charge de la gouttelette
- ϵ_0 : la permittivité du vide
- γ : la tension de surface

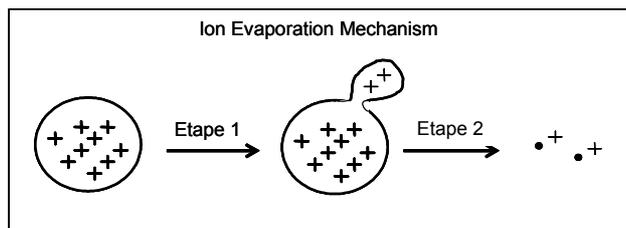
La gouttelette devient ensuite instable et produit de plus petites gouttelettes « filles » par fission coulombienne, qui contiennent environ 2% de la masse et 15 % de la charge de la gouttelette « mère ». Les gouttelettes filles subiront le même processus et cela sur plusieurs générations jusqu'à donner un ion complètement désolvaté.

2.1.3. Le transfert des ions en phase gazeuse

Actuellement, deux mécanismes décrivent la production d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir de gouttelettes chargées : le mécanisme proposé par Iribarne et Thomson appelé « Ion Evaporation Mechanism » [Iribarne et coll. **1976** et **1983**, Thomson et coll. **1979**] et le mécanisme proposé par Dole appelé « Charged Residue Mechanism » [Dole et coll. **1968**].

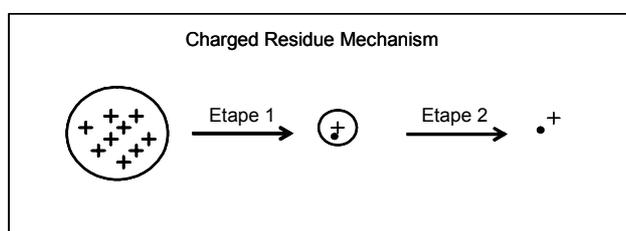
Le mécanisme d'Iribarne et Thomson (IEM) propose qu'à un stade intermédiaire de sa vie (avant le rayon critique de Rayleigh), le champ électrique à la surface de la gouttelette soit suffisant pour désorber des ions directement de la gouttelette (évaporation). Généralement, ce processus est très important pour une gouttelette avec $R < 10$ nM (cf. Figure 5).

Figure 5 : Illustration du mécanisme proposé par Iribarne et Thomson.



Le mécanisme de Dole (CRM) propose que la série de fissions coulombiennes de la gouttelette aboutisse à une gouttelette contenant une seule molécule chargée, les dernières molécules de solvant s'évaporant ensuite jusqu'à obtenir un ion complètement désolvaté (cf. Figure 6).

Figure 6 : Illustration du mécanisme proposé par Dole.

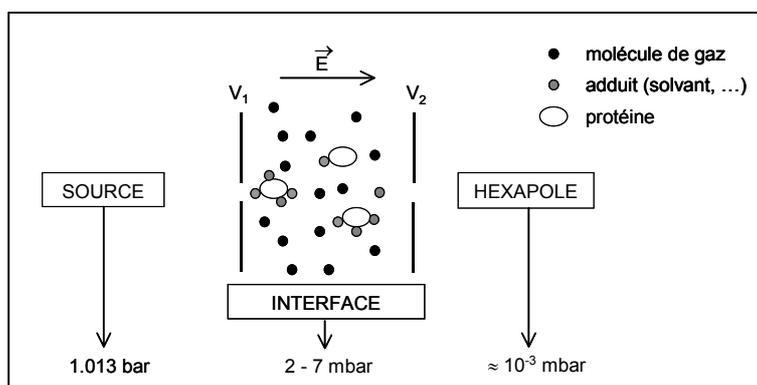


De nos jours, il est souvent admis que les petits ions (sels) sont produits majoritairement par le mécanisme d'évaporation d'ions [Kearle et coll. **1993**, Wang et coll. **2000**, Sakairi et coll. **1991**, Gamero-Castano et coll. **2000a**] alors que des protéines globulaires de taille importante sont produites par le mécanisme de Dole [Gamero-Castano et coll. **2000b**, Cole **2000**, Kearle **2000**].

2.2. L'interface

Après leur ionisation et leur désorption, les ions sont dirigés vers l'analyseur du spectromètre de masse sous l'action combinée de champs électriques et de gradients de pression. La zone du spectromètre de masse appelée « interface » joue dans ce cas un rôle important (cf. Figure 7).

Figure 7 : Illustration de l'interface d'un spectromètre de masse électrospray.



En effet, l'interface sépare la zone de production des ions à pression atmosphérique de l'analyseur (vide poussé $\approx 4 \times 10^{-7}$ mbar). Il règne donc dans cette zone une pression intermédiaire de l'ordre du millibar. Cette pression intermédiaire est suffisamment faible pour que les ions puissent acquérir une énergie cinétique importante (E_c) et suffisamment haute pour entraîner des collisions entre les ions et les molécules de gaz (N_2), convertissant ainsi l'énergie cinétique des ions en énergie interne. Ces collisions élèvent l'énergie interne des ions et favorisent leur désolvatation, voire leur fragmentation. En 1988, Loo exploite les collisions dans l'interface pour générer des ions fragments et en déduire des informations structurales, il introduit la CID « Collision Induced Dissociation » [Loo et coll. **1988**, Katta et coll. **1991b**]. L'importance de la CID sera abordée plus en détail par la suite (cf. **CHAP III. II. 2.1.**).

2.3. Les analyseurs

Le principe physique sur lequel est basé la détermination du rapport m/z dépend du type d'analyseur d'un spectromètre de masse. On dénombre plusieurs types d'analyseurs tels que l'analyseur quadripolaire (Q) [Yamashita et coll. **1984**], à temps de vol (TOF) [Mirgorodskaya et coll. **1994**], à trappe ionique (IT) [Stafford et coll. **1984**], à résonance cyclotronique (ICR) [Henry et coll. **1989**, Heeren et coll. **2004**] et à secteur magnétique [Gallagher et coll. **1990**].

Tous ces analyseurs peuvent être couplés à l'ionisation électrospray. Dans certains cas, plusieurs analyseurs sont combinés, on parle alors de spectromètre de masse hybride. Les études présentées dans ce travail de thèse ont été menées exclusivement sur des appareils de type ESI-TOF ou hybride ESI-Q-TOF, c'est pourquoi nous présenterons, uniquement dans cette partie, le fonctionnement des analyseurs quadripolaires et à temps de vol.

Tableau 1 : Récapitulatif des performances des différents analyseurs commercialisés.

Analyseurs	Gamme de masse (m/z)	Résolution (FWHM)
Quadripôle	4000	unitaire
Trappe Ionique	8000	unitaire
Temps de vol	Illimitée	5000-20000
Résonance Cyclotronique	8000	50000-1000000

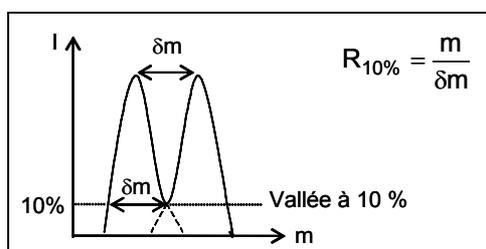
2.3.1. Performances d'un analyseur

Les performances d'un analyseur sont liées à, sa limite du rapport masse sur charge des ions analysables (m/z), sa transmission des ions et sa résolution.

La transmission est le rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui produit dans la source. Par exemple, un analyseur quadripolaire (à balayage) ou à temps de vol vont transmettre différemment les ions lors de l'analyse.

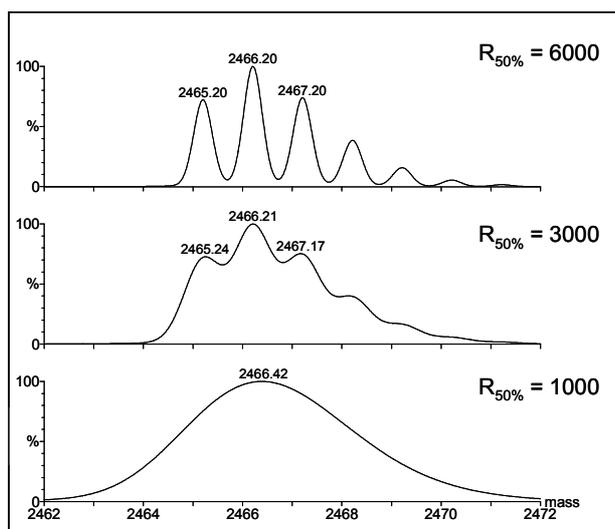
Enfin, la résolution correspond à la capacité de fournir des signaux que l'on peut distinguer pour deux ions de masses voisines. On admet que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces pics égale 10 % de l'intensité du pic le plus faible (on parlera de résolution à 10 %). La résolution pour un pic isolé se calcule par le rapport entre, la largeur du pic δm à 10 % de son maximum, et sa masse (cf. Figure 8).

Figure 8 : Définition de la résolution à 10 % de vallée.



On parle maintenant couramment de résolution FWHM (full width at half maximum), dans ce cas, la largeur δm est prise à 50 % de son maximum (cf. Figure 9).

Figure 9 : Profils théorique de l'ACTH obtenus pour différentes résolutions FWHM.



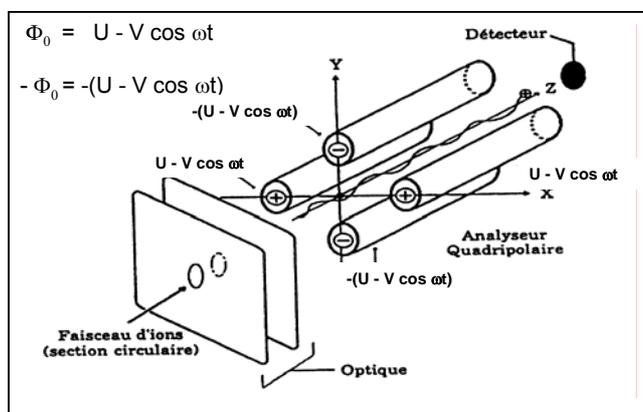
La résolution est un paramètre déterminant dans l'analyse par SM. Une bonne résolution permet de distinguer chaque isotope d'un composé et plus généralement permet de séparer des espèces différentes. Par ailleurs, la résolution influe aussi sur la précision de mesure de masse, une haute résolution permet d'obtenir de très grandes précisions de mesure lorsque l'appareil est bien calibré. Dans le cas des complexes non-covalents, la résolution de l'appareil sera un paramètre déterminant qui permettra de distinguer l'interaction de petites molécules sur une protéine de haut poids moléculaire.

2.3.2. L'analyseur quadripolaire (Q)

L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre barres métalliques parallèles [Friedman et coll. 1982]. Les barres opposées, connectées électriquement, sont portées au même potentiel Φ_0 ou $-\Phi_0$ de sorte

que deux barres adjacentes soient de potentiels opposés. Le potentiel Φ_0 comprend une composante continue U et une composante sinusoïdale $V \cos \omega t$: $\Phi_0 = U - V \cos \omega t$ (cf. Figure 10).

Figure 10 : Schéma d'un analyseur quadripolaire, d'après [Campana 1980].



Le quadripôle est un analyseur à balayage, qui utilise la stabilité de la trajectoire des ions entre les barres pour les séparer en fonction de leur rapport m/z . Les ions accélérés suivant l'axe z pénètrent entre les barres du quadripôle et conservent leur vitesse suivant cet axe. Cependant, ils sont soumis suivant x et y aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques. Les équations régissant la trajectoire des ions dans un quadripôle ont été établies en 1866 par le physicien Mathieu pour décrire la propagation d'ondes dans des membranes (cf. Figure 11).

Figure 11 : Equation de Mathieu permettant le calcul de la trajectoire d'un ion dans un quadripôle.

$$F_x = ma = m \frac{d^2x}{dt^2} = -ze \frac{\delta\phi}{\delta x} \quad \text{Avec :}$$

$$F_y = ma = m \frac{d^2y}{dt^2} = -ze \frac{\delta\phi}{\delta y} \quad \begin{array}{l} m = \text{masse de l'ion} \\ a = \text{accélération} \\ q = -ze = \text{la charge.} \end{array}$$

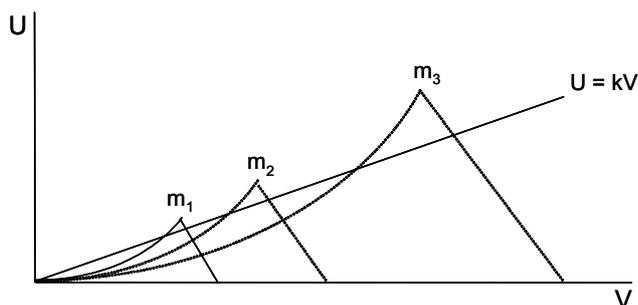
En posant :

$$u = x \text{ ou } y, \quad \xi = \frac{\omega t}{2}, \quad a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \quad \text{et} \quad q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2}$$

- Avec $2r_0$ égal à la distance entre deux barres.
- On obtient : $\frac{d^2u}{d^2\xi} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$

NB : Un traitement mathématique détaillé peut être trouvé dans l'ouvrage du mathématicien R. Campbell : *Théorie Générale de l'Equation de Mathieu*, Masson, Paris, 1955

Pour un quadripôle donné, r_0 et ω sont constants, U et V sont les variables. Pour une masse donnée, il est possible de tracer le diagramme de stabilité en fonction des valeurs U et V . Avec cette représentation, les zones de stabilité d'une masse ont une forme de triangle (cf. figure 12). On voit dans un tel diagramme qu'un balayage maintenant le rapport U/V constant permet de transmettre successivement des masses différentes.

Figure 12 : diagramme de stabilité en fonction des valeurs U et V pour un quadripôle.

En l'absence de tension continue ($U = 0$), la résolution devient nulle. Cependant, la valeur de V ne permet pas la transmission de tous les ions. En effet, si de 0 on augmente V de manière à dépasser tout juste la zone de stabilité m_1 , tous les ions de masses inférieures ou égales à m_1 auront une trajectoire instable et tous ceux de masse supérieure à m_1 auront une trajectoire stable. Dans le cas d'un spectromètre de masse hybride de type ESI-Q-TOF, le quadripôle peut fonctionner soit comme un analyseur ($U > 0$), soit comme un guide d'ions. Dans le premier cas, l'ion sélectionné sera transmis vers la cellule de collision puis fragmenté. L'analyse des fragments sera réalisée par l'analyseur suivant (à temps de vol), on parle de spectrométrie de masse en tandem ou MSMS.

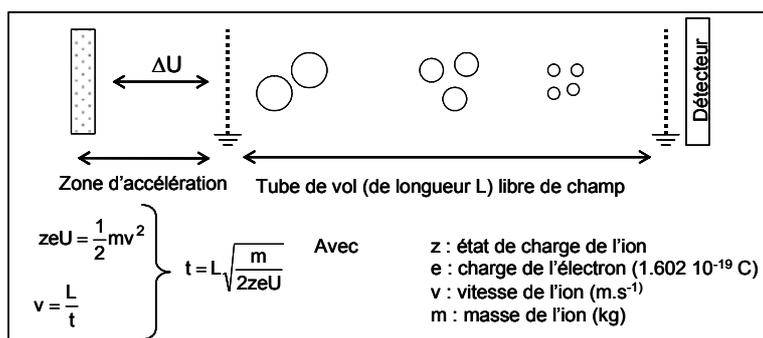
Lorsque le quadripôle fonctionne comme guide d'ions ($U = 0$), les ions sont analysés par le second détecteur à temps de vol. Dans ce cas, on revient au schéma classique d'un spectromètre de masse usuel, on dit que le quadripôle fonctionne en « RF only ». Il est cependant important de noter que la transmission des ions le long du quadripôle discriminera les masses suivant la valeur V de la tension alternative. Pour moyenniser cet effet, il est possible de modifier la valeur V au cours d'une analyse afin de laisser passer successivement certaines catégories d'ions (sur le Q-TOF, cette fonctionnalité est disponible à partir du « MS profile »).

La gamme de m/z de la plupart des analyseurs quadripolaires commerciaux est limitée (typiquement < 4000 m/z) mais il est possible de l'étendre en diminuant la fréquence liée à la tension alternative. Une telle modification de la fréquence a permis au groupe de Robinson [Sobott et coll. **2002**] de sélectionner un ion dans le quadripôle à 22000 m/z , bien sûr, la diminution de fréquence entraîne malheureusement une diminution de la résolution de l'analyseur [Winger et coll. **1993**]. Enfin, le quadripôle a en théorie une résolution unitaire sur toute la gamme de masse.

2.3.3. L'analyseur à temps de vol (TOF)

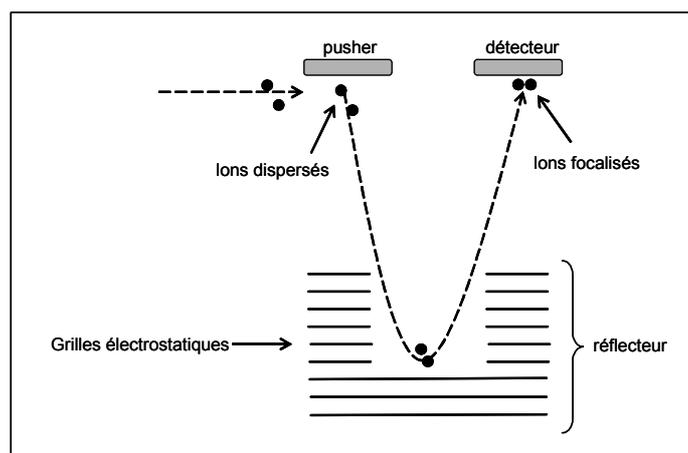
L'analyseur à temps de vol est constitué de deux zones, une zone d'accélération des ions par application de potentiels élevés et une zone libre de champs (cf. Figure 13). Les ions accélérés dans la première zone vont ensuite évoluer à différentes vitesses dans la zone libre de champs (tube de vol). Leur rapport m/z est déduit par la mesure du temps de traversée du tube de vol. Il faut retenir que le rapport m/z évolue proportionnellement au carré du temps.

Figure 13 : Principe de l'analyseur à temps de vol.



Les analyseurs TOF ont été décrits dans les années cinquante [Wiley et coll. **1955**], mais furent ensuite délaissés pendant de nombreuses années à cause de leur mauvaise résolution. Plusieurs avancées technologiques aboutirent plus tard à la renaissance du TOF [Standing **2000**]. Classiquement, le TOF était couplé au mode d'ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) car l'injection pulsée des ions était compatible avec une mesure de temps. Le couplage entre le mode d'ionisation électrospray et l'analyseur TOF nécessita une injection orthogonale pulsée des ions dans l'analyseur, afin de limiter la perte de résolution due à la dispersion transversale en énergie cinétique. Une seconde amélioration, qui consiste à appliquer un miroir ou réflecteur électrostatique à l'extrémité de l'analyseur (cf. Figure 14), a été apportée afin d'augmenter la résolution [Mamyrin et coll. **1973**]. La dispersion en énergie cinétique des ions est diminuée après réflexion des ions dans un miroir constitué de grilles cylindriques sur lesquelles sont appliqués des potentiels décroissants. Cette stratégie peut être de nos jours conduite plusieurs fois afin d'augmenter la résolution au détriment bien sûr de la sensibilité (ultrTOF-Q, Bruker Daltonics, résolution > 40000 avec la technologie MultiPass™).

Figure 14 : Principe du réflecteur électrostatique.



Les analyseurs TOF sont désormais des analyseurs ayant de bonnes résolutions et présentent l'avantage unique de pouvoir analyser en théorie des composés de rapport m/z infini. Le mode d'ionisation électrospray couplé au TOF semble donc particulièrement bien adapté à l'analyse de molécules biologiques de très hauts poids moléculaires [Thèse Sanglier **2002**].

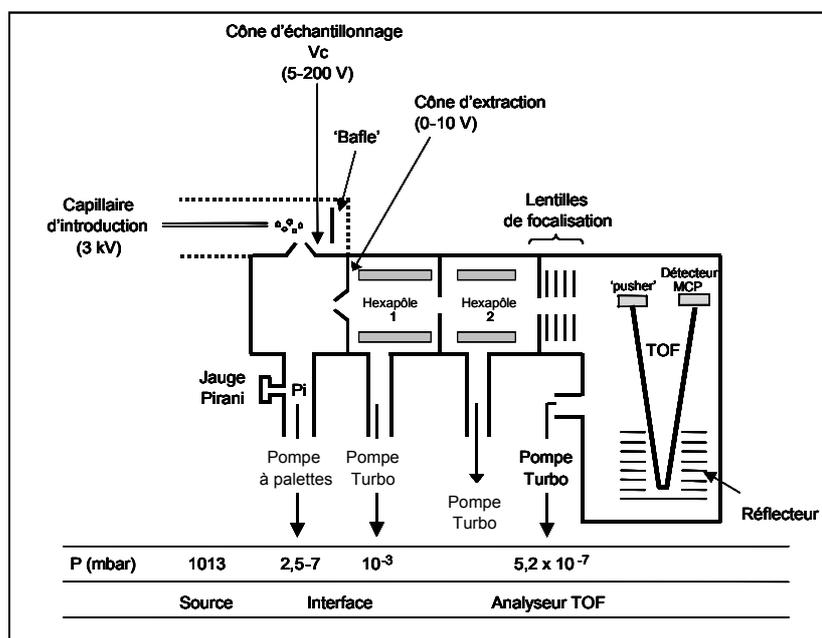
II. Les appareils utilisés au laboratoire

Le laboratoire de spectrométrie de masse de Strasbourg est équipé de différents types d'appareils permettant de s'adapter aux conditions d'analyses requises. L'analyse de complexes non-covalents requiert une méthode d'ionisation douce et un analyseur de bonne résolution permettant de mesurer des rapports m/z élevés. Le choix d'appareils de type ESI-TOF s'est donc imposé. Nous présenterons ci-dessous les trois types de spectromètres de masse utilisés durant ce travail de thèse. Le fonctionnement de chaque appareil ainsi que les différents paramètres d'analyse sont décrits dans la partie expérimentale.

1. Le LCT (Micromass, Manchester, UK)

Le LCT est un appareil équipé d'une source « Z spray » : ce terme provient du fait que les ions sont injectés dans l'appareil en suivant une trajectoire en Z. La transition entre la pression atmosphérique et le vide poussé du spectromètre de masse (zone d'interface) est assurée par une série de lentilles en forme de cônes présentant une petite ouverture ($DI = 0.6 \text{ mm}$). Ce type de source présente l'avantage d'être très robuste et relativement tolérante vis à vis des sels et molécules peu volatils. Après la zone d'interface, une série de guides d'ions (hexapôles) et de lentilles assurent la transmission des ions jusqu'à l'analyseur (cf. Figure 14). Le LCT est spécifié pour avoir une résolution FWHM de 5000.

Figure 14 : Représentation schématique du LCT.

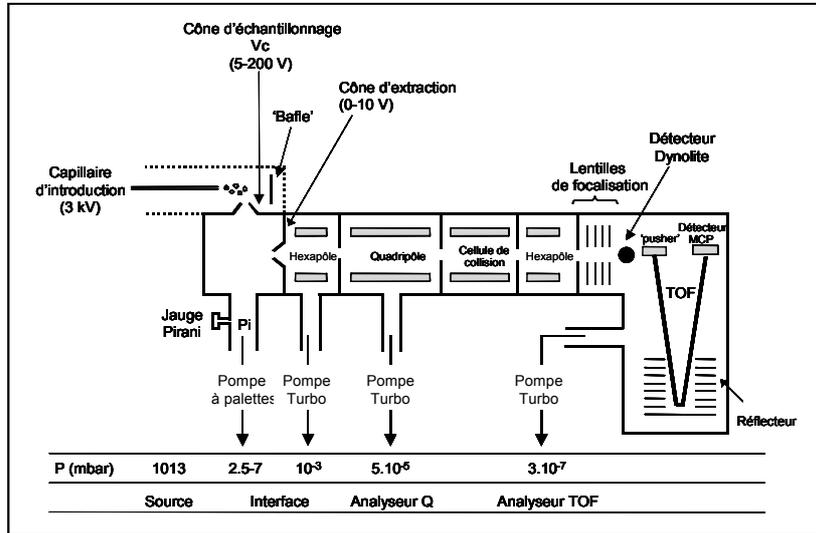


2. Le Q-TOF (Micromass, Manchester, UK)

Le Q-TOF est un appareil de construction identique au LCT, la modification majeure étant l'ajout d'un quadripôle permettant des analyses de SM en tandem (cf. Figure 15). Le quadripôle de notre spectromètre de

masse hybride possède une gamme d'analyse étendue à 8000 m/z permettant des expériences de MSMS sur des complexes de hauts poids moléculaires. L'analyseur (TOF) est spécifié pour avoir une résolution FWHM de 10000.

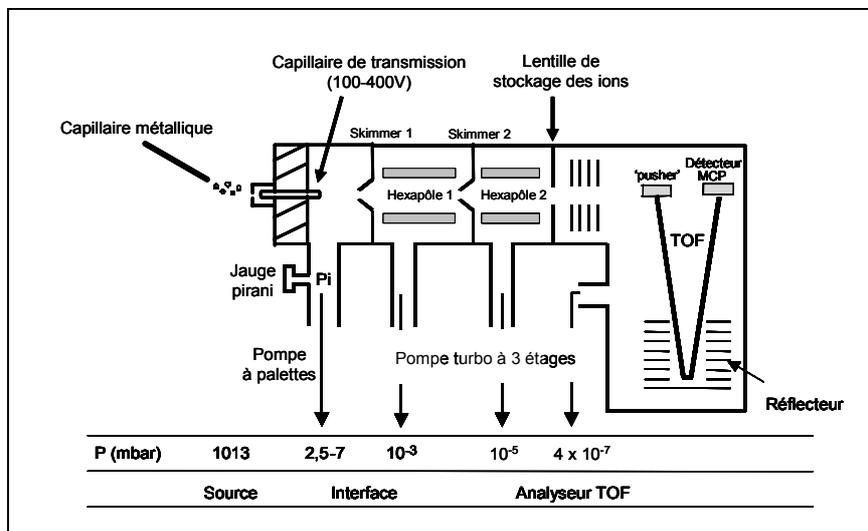
Figure 15 : Représentation schématique du Q-TOF.



3. Le microTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

Le microTOF est un appareil équipé d'une source d'injection des ions orthogonale (cf. Figure 16). La transition entre la pression atmosphérique et le vide poussé du spectromètre de masse (zone d'interface) est assurée par un capillaire de transmission (capillaire en verre, l = 18 cm, DI = 0.8 mm). Le microTOF présente l'originalité de pouvoir stocker les ions dans l'hexapôle 2 afin de les envoyer par paquet dans l'analyseur. Ce mode d'injection pulsé permet d'augmenter considérablement la sensibilité. L'appareil est spécifié pour avoir une résolution FWHM de 10000.

Figure 16 : Représentation schématique du microTOF.



CHAPITRE III

Mise en œuvre expérimentale et méthodologie

I. Deux types de spectrométrie de masse : la spectrométrie de masse moléculaire et supramoléculaire

Classiquement, la SM permet de mesurer la masse précise d'une molécule, l'analyte est pour cela dissout dans un solvant volatil, typiquement un mélange eau-acétonitrile-acide. Ces conditions dénaturantes dans le cas de matériel biologique limitent les interactions moléculaires en solution et permettent d'obtenir une grande sensibilité durant l'analyse. Des applications basées sur la mesure précise d'une masse se sont rapidement développées dans le domaine de la biologie, citons par exemple la vérification de l'homogénéité de séquence ou de la pureté d'une protéine recombinante, la détection de modifications covalentes telles que les modifications post-traductionnelles [Pandey et coll. **2000**], l'identification et le séquençage de protéines [Aebersold et coll. **2003**]. Cette approche « classique » d'utilisation de la SM en biologie est maintenant utilisée en routine dans de nombreux laboratoires.

Une autre approche consiste à se placer dans des conditions adéquates d'analyse pour pouvoir observer des interactions non-covalentes spécifiques entre molécules. Dans le domaine de la biologie, cela consiste à se placer dans un tampon non-dénaturant à pH physiologique. Dans ces conditions, les interactions spécifiques entre molécules sont préservées en solution et tout l'enjeu est de pouvoir transférer ces complexes intacts en phase gazeuse jusqu'au détecteur. Ce type d'approche est souvent appelé « spectrométrie de masse supramoléculaire ».

II. Mise au point et instrumentation en spectrométrie de masse supramoléculaire

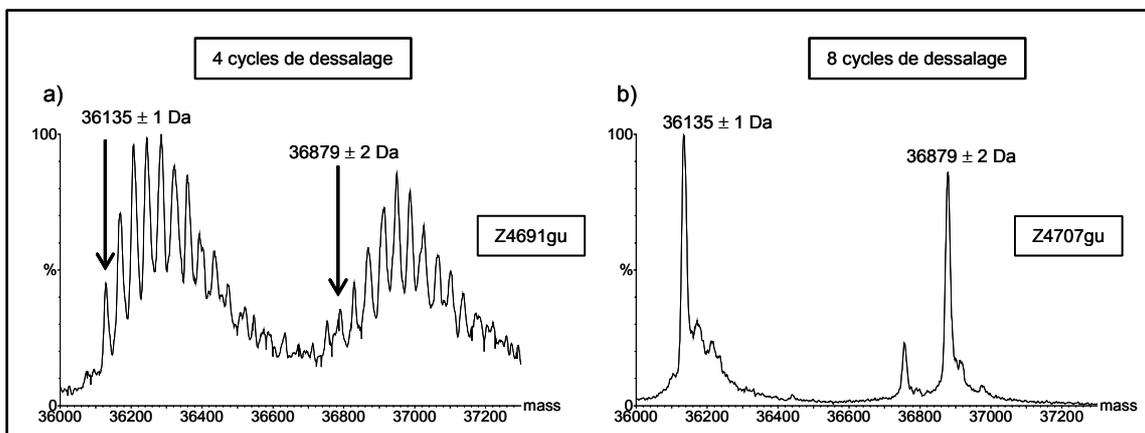
1. Importance de la préparation de l'échantillon

1.1. Les tampons compatibles avec l'analyse de masse

La SM non-dénaturante ou supramoléculaire consiste à analyser des édifices moléculaires maintenus par des interactions non-covalentes spécifiques. Dans le cas des biomolécules, la spécificité est liée aux structures tertiaire et quaternaire adoptées dans des conditions physiologiques. Observer des interactions spécifiques revient donc à se placer dans les conditions d'analyse les plus proches des conditions physiologiques. En solution, de nombreux tampons et détergents sont couramment utilisés afin de stabiliser une protéine dans sa conformation native (Tris, Hepes, etc.). Le plus souvent, ces tampons sont faiblement volatils et peu compatibles avec l'analyse électrospray. En effet, ces molécules présentes en forte concentration auront tendance à interagir de manière aléatoire avec la protéine pendant le processus

d'évaporation et rendront l'analyse de masse impossible du fait d'une trop grande hétérogénéité des masses mesurées (cf. Figure 1).

Figure 1 : Illustration de l'effet des sels non-volatils sur la qualité d'un spectre de masse électrospray. a) Spectre en échelle de masse de l'Aldose Réductase (AR) après 4 cycles de dessalage dans AcNH_4 50 mM ; b) Spectre en échelle de masse de l'Aldose Réductase (AR) après 8 cycles de dessalage dans AcNH_4 50 mM. Les adduits observés proviennent de la fixation d'ions K^+ .



Pour limiter ce problème, il est donc nécessaire de travailler 1) dans un solvant volatil, 2) qui préserve la structure des biomolécules. Ces deux conditions restreignent fortement les choix possibles. Les premières expériences dans ce domaine furent réalisées dans l'eau [Chowdhury et coll. **1990b**]. Dans ces conditions, le pH était cependant difficilement contrôlable et la force ionique faible, ce qui n'était pas toujours idéal pour préserver l'intégrité de certaines protéines natives.

Peu de temps après, des sels d'ammonium furent utilisés [Ganem et coll. **1991a**]. Ces sels relativement volatils sont moins défavorables à l'analyse de masse et permettent de disposer plus facilement de protéines non-dénaturées à des concentrations relativement élevées. Plusieurs sels d'ammonium sont utilisables et permettent de tamponner à des pH différents, les plus courants sont les suivants : acétate d'ammonium (pH 6.8) et carbonate d'ammonium (pH 7.5). Il est intéressant de remarquer que l'acidité en phase gazeuse de la base conjuguée du sel peut influencer sur l'état de protonation de la protéine nébulisée [Lemaire et coll. **2001**, Udo et coll. **2003**]. Ces sels d'ammonium sont couramment utilisés au laboratoire dans des concentrations de l'ordre de 10 à 50 mM mais il est possible de travailler à des concentrations plus élevées de l'ordre de 100 à 300 mM.

Curieusement, il s'avère que les sels d'ammonium, qui sont actuellement les seuls compatibles avec la SM supramoléculaire, permettent de préserver intactes un grand nombre de protéines. Il faut cependant rester prudent, il a notamment été vérifié que la plupart des enzymes analysées au laboratoire conservent leur activité dans ces tampons.

1.2. Les différentes techniques d'échange de tampon

Différentes techniques permettent d'échanger le tampon d'une protéine contre un autre. Ces techniques sont souvent déterminantes pour l'analyse par SM, car la qualité de préparation de l'échantillon conditionne la qualité du spectre de masse. Les modes opératoires de dessalage utilisés durant ce travail de thèse sont décrits plus précisément dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

- Les techniques d'ultracentrifugation sont les plus couramment utilisées au laboratoire (*centricon*, Millipore ; *vivaspin*, Vivascience), différentes membranes sont disponibles pour une perte minimum d'échantillon (polyéthèresulfone, triacétate de cellulose, cellulose régénérée, fournies par Vivascience). En général, une succession de 6 à 8 cycles de concentration/dilution sont nécessaires pour échanger convenablement le tampon biologique avec le tampon d'analyse.

- Les techniques de dialyse simple sur membrane reposent sur le même principe mais sont généralement plus longues et donnent de moins bons résultats. Cependant, elles peuvent être utilisées à profit lorsqu'une protéine ne résiste pas à l'ultracentrifugation et a tendance à colmater les membranes.

- Une dernière technique utilisée est la filtration sur gel. Des colonnes de tailles variables sont commercialisées et permettent l'échange de tampon à partir de quantités plus ou moins importantes de protéine (*PD 10*, *NAP 5-10*, Amersham Biosciences ; *biospin*, Biorad). Les inconvénients de cette technique sont la dilution entraînée lors de l'élution de la protéine et la perte de matériel sur colonne, qui est variable et quelquefois non négligeable voire complète.

Le choix de la technique de dessalage revient à l'expérimentateur et est à adapter suivant les cas, par exemple, l'ultracentrifugation sur *Vivaspin* est très rapide et efficace mais toutes les protéines ne résistent pas de la même manière aux cycles d'ultracentrifugation. De même, la filtration sur gel se révèle adaptée à certaines protéines alors que 90 à 100 % de perte de matériel peut être attendue avec d'autres.

2. Optimisation des paramètres d'analyse du spectromètre de masse

2.1. Les paramètres importants pour la conservation des interactions non-covalentes en phase gazeuse

Après avoir été transférés en phase gazeuse, les ions sont acheminés vers l'analyseur puis le détecteur du spectromètre de masse. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la zone du spectromètre de masse appelée « interface » est d'une importance capitale à ce stade. L'interface sépare la source à pression atmosphérique de l'analyseur où règne un vide poussé. A pression atmosphérique, le milieu gazeux est relativement visqueux et ne permet pas aux ions d'acquérir une énergie interne élevée. Au contraire, à un vide poussé, le libre parcours moyen des ions est trop grand et ceux-ci acquièrent préférentiellement une énergie cinétique. Enfin, dans la zone d'interface à pression intermédiaire, l'énergie interne des ions peut être augmentée par collision inélastique avec des molécules de gaz [Schneider et coll. **2000**]. L'énergie interne d'un

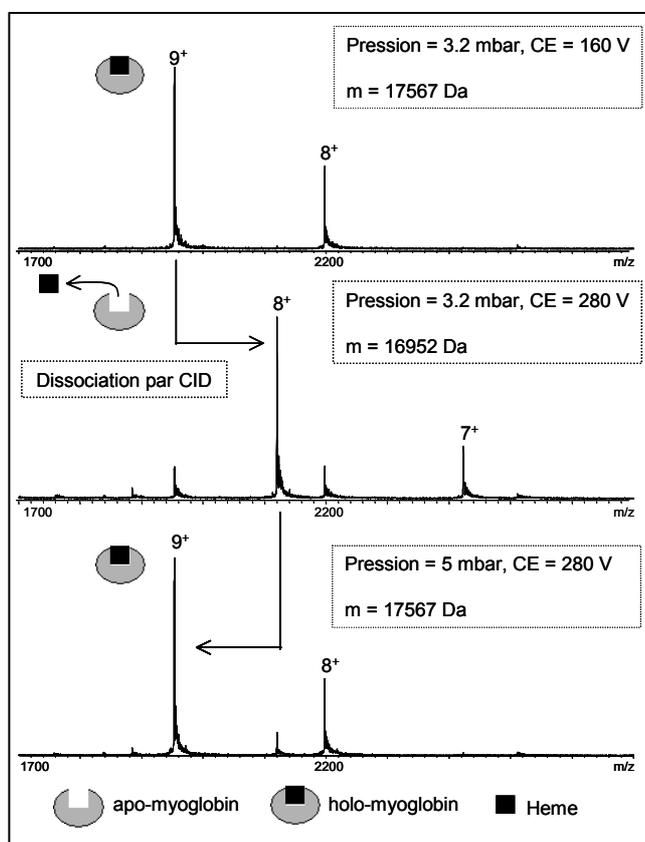
complexe peut alors devenir suffisamment élevée pour permettre la dissociation des interactions les plus faibles et induire la dissociation du complexe. Il est donc nécessaire de contrôler finement l'énergie interne communiquée aux ions dans cette zone afin de désolvater suffisamment les ions tout en préservant les interactions d'intérêt.

En pratique, pour un appareil donné, plusieurs paramètres permettent de moduler l'énergie interne des ions :

- La température des gaz de nébulisation ou de séchage ainsi que la température de la source communique naturellement de l'énergie aux ions. La température est souvent ajustée suivant le type de solvant ou tampon utilisé et est généralement gardée constante pendant les expériences.
- Le champ électrique dans l'interface (modifié par la tension de cône ou de capillaire de transmission suivant l'appareil utilisé) permet d'accélérer les ions et augmente l'énergie des collisions avec les molécules résiduelles de gaz (azote).
- La pression dans l'interface conditionne la fréquence des collisions.

Figure 2 : Illustration des effets de la pression dans l'interface (P) et de la tension de capillaire (CE) sur la stabilité d'un complexe non-covalent myoglobine-hème ; expérience réalisée à une concentration en protéine de 10 μM sur l'appareil de type micrOTOF.

- Pour une tension de 160 V et une pression de 3.2 mbar, le complexe est préservé en phase gazeuse.
- Après une augmentation de tension à la valeur de 280 V, l'augmentation de l'énergie communiquée aux ions provoque la dissociation du complexe.
- Après une augmentation de pression à la valeur de 5 mbar et pour une même tension de 280 V, le complexe est à nouveau transmis intact en phase gazeuse : l'augmentation de pression diminue la fragmentation dans l'interface.

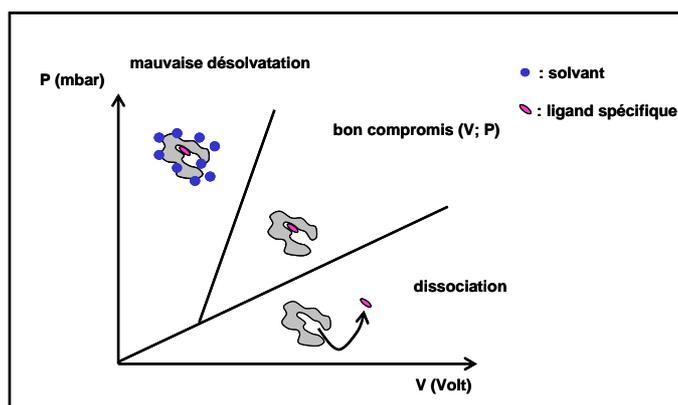


La Figure 2 montre l'influence du champ électrique et de la pression dans l'interface sur l'observation d'un complexe constitué de la myoglobine et de son groupement prosthétique (l'hème). Pour une pression de 3 mbar, l'augmentation de la tension du capillaire provoque la dissociation de l'hème. Au contraire, l'augmentation simultanée de la pression et de la tension du capillaire n'induit pas la dissociation du complexe. Dans ce cas, l'énergie communiquée au complexe est plus faible et les conditions d'analyse sont plus douces.

L'effet de la pression dans cette zone est un peu ambigu. Le libre parcours moyen des ions est diminué lorsque la pression augmente, cela veut dire que les ions en accélération vont subir beaucoup de collisions faiblement énergétiques. Il faut bien distinguer l'effet de la pression dans l'interface, qui tend à diminuer l'énergie interne communiquée aux ions, de l'effet de la pression dans une cellule de collision, qui est complètement opposé étant donné que les ions entrent dans la cellule avec une vitesse constante. L'énergie interne de l'ion sera dans ce cas, directement proportionnelle au nombre de collisions et donc augmentera pour une pression plus élevée.

Il existe donc un compromis à trouver entre les valeurs de pression et de tension de cône dans l'interface pour chaque système étudié (cf. Figure 3). Une forte pression accompagnée d'une faible tension de cône aboutira à une mauvaise désolvatation des ions. Le contraire consiste à fournir trop d'énergie au complexe et à le dissocier en phase gazeuse, cette situation engendre de fausses interprétations des données, puisque les espèces en interaction en solution sont dissociées en phase gazeuse. Le cas idéal se trouve donc à une situation intermédiaire où la désolvatation est suffisante pour réaliser une analyse de qualité et où les interactions d'intérêt sont préservées.

Figure 3 : Illustration de l'importance du couple (P, V) sur la transmission des complexes non-covalents par analogie avec un diagramme de phases (P, T). Un compromis entre la pression et la tension appliquées dans la zone d'interface est à trouver afin de désolvater suffisamment les ions tout en préservant les interactions spécifiques d'intérêts.



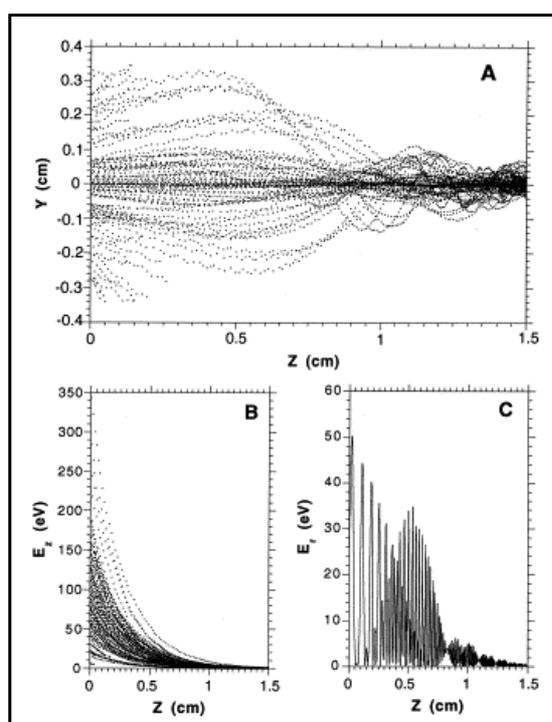
En raison de son importance, le contrôle de l'énergie interne des ions dans l'interface a fait l'objet de nombreuses études [Gabelica et coll. **2004**]. Le contrôle du couple (P, V) permet d'ajuster plus finement les conditions d'analyses afin d'obtenir un spectre avec un meilleur rapport signal/bruit et reflétant les espèces présentes en solution.

2.2. Les paramètres importants pour la transmission des ions en phase gazeuse

Un problème majeur rencontré en SM concerne la transmission et la détection d'ions de rapport m/z très élevé. En phase gazeuse, les ions sont transmis dans le spectromètre de masse grâce à un subtil équilibre de forces impliquant des gradients de pression et de champs électriques.

En particulier, les spectromètres de masse sont munis de multipôles (quadripôles, hexapôles ou octapôles) qui permettent de refocaliser le faisceau d'ions qui tend à diverger (cf. Figure 4). Ces guides d'ions ont pour rôle de refocaliser et de thermaliser les ions par collisions avec des molécules de gaz résiduelles, ce processus est appelé « collisional cooling and focusing » [Krutchinsky et coll. 1998]. Les guides d'ions ont ainsi été introduits pour augmenter la transmission des ions et également afin d'améliorer la résolution des appareils à temps de vol avec injection orthogonale des ions.

Figure 4 : Simulation de la mobilité des ions de la myoglobine dans un quadripôle : A) simulation de la trajectoire des ions dans le plan (YZ); B) simulation de l'énergie des ions le long de l'axe Z ; C) simulation de l'énergie radiale des ions. Dans un guide d'ions, les ions sont refocalisés dans l'espace et thermalisés. D'après [Krutchinsky et coll. 1998].

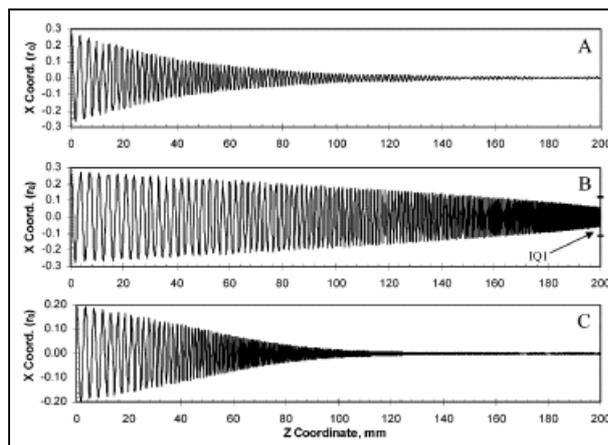


Suivant leur conception, tous les spectromètres de masse n'ont pas la même efficacité pour transmettre les ions « lourds » ($> 4000 m/z$). Il a notamment été décrit dans la littérature qu'une augmentation de la pression dans l'interface de certains appareils favorisait la transmission des ions lourds [Schmidt et coll. 2001, Tahallah et coll. 2001].

Les ions lourds sont effectivement des ions ayant une énergie cinétique importante et une forte inertie du fait de leur rapport m/z élevé. Leur transmission nécessite une thermalisation, ainsi qu'un pouvoir de focalisation plus important. Pour favoriser la transmission des ions lourds, il est possible d'augmenter l'amplitude du voltage appliqué sur les guides d'ions afin d'améliorer le pouvoir de focalisation, cela aura cependant comme effet négatif, de dégrader la transmission des ions légers.

Il a par ailleurs été démontré qu'une meilleure thermalisation des ions pouvait être obtenue en augmentant la pression dans les guides d'ions [Chernushevich et coll. **2004b**]. La transmission d'ions lourds a pu être améliorée de cette manière (cf. Figure 5). Les auteurs évoquent aussi d'autres moyens comme celui d'augmenter le temps de séjour dans le guide d'ions afin d'augmenter encore plus la thermalisation avec leur appareil.

Figure 5 : Simulation de la trajectoire d'ions dans le plan XZ d'un quadripôle : A) ion de myoglobine ($M = 16951$ Da, $\sigma = 2.520 \text{ \AA}^2$) à 8 mTorr; B) ion de protéasome 20S ($M = 692$ kDa, $\sigma = 19400 \text{ \AA}^2$) à 8 mTorr ; C) ion de protéasome 20S ($M = 692$ kDa, $\sigma = 19400 \text{ \AA}^2$) à 30 mTorr. D'après [Chernushevich et coll. **2004b**].



Sur les appareils de type Q-TOF ou LCT présents au laboratoire, il a aussi été remarqué qu'une augmentation de pression dans l'interface favorisait la transmission des ions lourds [Sanglier et coll. **2002** et **2003**].

III. Les informations obtenues et leur validité

La SM supramoléculaire a connu un essor considérable depuis ses débuts dans les années 1990, le nombre d'études publiées est maintenant devenu considérable. Plusieurs revues dans ce domaine résument, de manière non-exhaustive, l'étendue des applications et développements de la SM supramoléculaire. Ces revues constituent une base bibliographique solide permettant d'aborder le sujet de manière complète et développée [Loo **1997** et **2000**, Hernandez et coll. **2001**, Cole **2003**, Ganem et coll. **2003**, Heck et coll. **2004a**, Van den Heuvel et coll. **2004**].

1. Les informations déduites de la spectrométrie de masse

1.1. Détermination de la stœchiométrie des espèces formées en solution

L'information la plus directe obtenue en SM par comparaison des masses obtenues en conditions dénaturantes et non-dénaturantes, est l'information de stœchiométrie des complexes préformés en solution. Cette information permet par exemple de déduire l'état d'oligomérisation ou les partenaires en interaction d'une protéine [Fitzgerald et coll. **1996**, Zhang et coll. **1999**, Sanglier et coll. **2002**, Pinkse et coll. **2003**].

Contrairement à d'autres techniques qui donnent une vue globale et moyenne d'un échantillon, la SM a l'avantage unique de détecter toutes les espèces présentes en solution et permet notamment de démontrer l'existence de complexes de stœchiométries différentes dans le cas de systèmes à interaction multiple. La SM peut, dans ces cas-là, être utilisée avantageusement afin de suivre la saturation des sites en fonction des conditions expérimentales et/ou de distinguer la fixation préférentielle d'une molécule par rapport aux autres. Cette approche permet directement de mettre en évidence des effets de coopérativité négatifs ou positifs [Hu et coll. **1995**, Chazin et coll. **1999**, Rogniaux et coll. **2001**]. Ces points seront traités plus en détail dans la partie résultats et notamment au travers de l'étude de la myosine VI et de la E-Cadherine.

Par ailleurs, un des points forts de la SM réside dans sa grande résolution, qui permet de voir la fixation de petites molécules sur un complexe par rapport à des techniques de mesure de masse plus approximatives comme la sédimentation. Les limites en masse et en résolution de la technique sont, par ailleurs, sans cesse repoussées, permettant ainsi d'étudier des systèmes de plus en plus délicats, comme par exemple le cas de complexes de très hauts poids moléculaires [Douglas et coll. **2001**, Rostom et coll. **1999**, Sanglier et coll. **2003**, Van Berkel et coll. **2000**, Tito et coll. **2000**, Green et coll. **2001**]. Pour l'instant, ces systèmes ont été uniquement étudiés avec des appareils de type ESI-TOF. L'analyseur TOF est à ce jour le seul à pouvoir analyser avec suffisamment de résolution des complexes de l'ordre du MDa. De telles études requièrent un contrôle fin de l'énergie communiquée aux ions dans le spectromètre de masse ainsi que de la pression dans les différents étages du spectromètre de masse.

1.2. La spécificité des interactions détectées

La SM est donc une méthode capable de mettre en évidence des interactions entre molécules et biomolécules. Cependant, la simple mesure d'une masse ne permet pas, contrairement à des méthodes comme la cristallographie et la RMN, de savoir à quels endroits les molécules interagissent. En effet, la masse du complexe détecté par SM ne dépend pas de l'endroit où une molécule interagit. Ainsi, il convient de mettre en place des expériences de contrôle permettant de valider la spécificité des interactions observées par SM, par rapport aux données connues du système étudié.

La spécificité correspond à une fixation préférentielle d'une molécule dans un site donné. Cette fixation préférentielle doit donc aboutir à une stœchiométrie préférentielle observée sur le spectre de masse. Ainsi, une

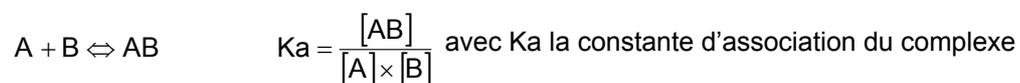
stœchiométrie multiple et aléatoire observée pour un complexe donné, sera un bon indice de fixation non-spécifique en solution. Par ailleurs, lorsqu'une protéine possède un site actif et des ligands naturels ou de référence connus, il est possible de vérifier la spécificité d'interaction de la molécule testée par des expériences de compétition. Si la molécule à tester entre en compétition avec les ligands de références, cela indique qu'elle interagit bien dans le site actif et qu'elle remplira bien son rôle de compétition avec le ligand naturel. La compétition en solution avec une molécule connue constitue donc un moyen efficace de cibler le lieu d'interaction.

Etant donné que la SM supramoléculaire constitue encore une méthodologie en cours de développement, une grosse partie de ce travail de thèse a consisté à démontrer dans chaque cas la spécificité des interactions observées. Ce fut particulièrement le cas dans le cadre de la validation des molécules sélectionnées après criblage sur des protéines cibles, où le but est de sélectionner sans ambiguïté les molécules d'intérêt pour une analyse cristallographique.

1.3. Evaluation de l'affinité en solution

La mesure de l'affinité en solution pour une interaction donnée est une information obtenue par comparaison de l'intensité des espèces libres et complexées déduite du spectre de masse [Daniel et coll. **2003**, Jorgensen et coll. **1998**].

Prenons l'exemple de la réaction suivante :



Dans des conditions adéquates de concentration, la mesure des stœchiométries par SM nous donne la valeur d'un rapport R :

$$R = \frac{[AB]}{[A]}$$

Si toutes les concentrations initiales sont connues alors la valeur de K peut être facilement obtenue en résolvant une équation d'ordre 2 dépendante de R. Cette approche est basée sur l'approximation que les intensités déduites du spectre de masse sont proportionnelles aux concentrations en solution.

Plusieurs hypothèses doivent alors être vérifiées :

- A et AB doivent avoir le même rendement d'ionisation.
- Le complexe AB ne doit pas être dissocié par CID en phase gazeuse.
- La transmission et la détection de A et AB dans le spectromètre de masse doivent être identiques.

Ces conditions sont souvent remplies dans le cas de systèmes protéine-ligand [Li et coll. **1994**, Zhang et coll. **2003**]. En effet, on considère généralement que la fixation d'un ligand de petite taille n'influence pas le rendement d'ionisation de la protéine et que la différence de masse engendrée n'est pas suffisante pour induire une transmission et une détection différente. Par ailleurs, les conditions d'analyses sont optimisées pour éviter la fragmentation des complexes en phase gazeuse. En général, une modification de l'énergie cinétique des ions dans l'interface permet de repérer rapidement si les conditions retenues pour l'étude génèrent ou non une telle fragmentation. Il est admis que ce sont les interactions où l'effet hydrophobe en solution est prédominant, qui peuvent se révéler difficile à préserver en phase gazeuse, c'est par exemple le cas des systèmes « Leucine Zipper » [Li et coll. **1993**]. Dans le cas des systèmes protéine/ligand décrits dans ce manuscrit, ces hypothèses se trouvent vérifiées. Néanmoins, par mesure de précaution, nous avons préféré classer les ligands par ordre d'affinité relative à partir d'expériences de compétition.

Plusieurs études se sont penchées sur des cas beaucoup moins favorables, où ces hypothèses ne se trouvaient plus validées. C'est, par exemple, le cas d'une étude concernant des complexes d'inclusion de cyclodextrines, où les stœchiométries déterminées par SM sont faussées essentiellement à cause du rendement d'ionisation [Cunniff et coll. **1995**]. Dans d'autres cas, il a été possible de tenir compte de ces rendements d'ionisation et d'accéder à des valeurs corrigées des constantes de dissociation [Ayed et coll. **1998**, Kempen et coll. **2000**, Gabelica et coll. **2003**, Chitta et coll. **2005**].

Il est aussi intéressant de signaler une étude qui reporte la mesure de constantes de dissociation par SM, avec un système permettant de modifier la température de l'échantillon. Un tel système a permis d'accéder avec succès aux paramètres thermodynamiques (ΔH et ΔS) d'association de différents ligands sur un anticorps monoclonal [Daneshfar et coll. **2004**].

Si plusieurs hypothèses sont vérifiées, la SM permet donc d'obtenir des données quantitatives sur des interactions moléculaires, mais l'information n'est accessible que pour des constantes de dissociation de l'ordre du μM , qui correspondent généralement aux gammes de concentrations utilisées durant l'analyse. Il faut se rappeler que la mesure de l'affinité n'est possible que si l'on peut mesurer précisément le rapport R : les espèces libres et liées doivent coexister dans les conditions d'analyse.

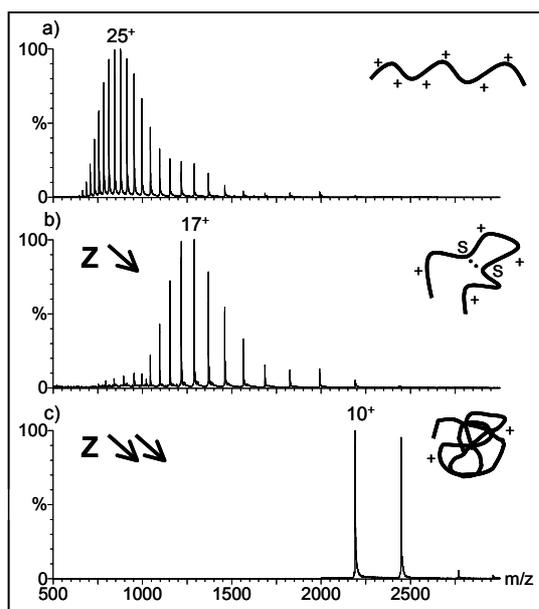
1.4. Suivi de la conformation des biomolécules

La SM peut aussi être utilisée pour étudier la conformation d'une protéine. Dans ce cas, il existe différentes manières d'aborder le problème telles que l'échange hydrogène/deutérium en solution [Katta et coll. **1991c**, Nemirovskiy et coll. **1999**] ou le marquage chimique [Kaltashov et coll. **2002**], qui permettent de mettre en évidence les domaines d'une protéine exposés en surface.

Une autre manière plus originale de suivre l'état de conformation d'une biomolécule a été introduite pour la première fois par Chowdhury et coll. [Chowdhury et coll. **1990b**]. Le principe est basé sur l'observation de la distribution des états de charge d'une protéine obtenue par électrospray dans des conditions non-

dénaturantes. En électrospray, la protonation d'une biomolécule a lieu par attachement d'un proton sur les sites basiques accessibles. Pour une biomolécule de structure globulaire, une grande partie des acides aminés potentiellement protonables sera enfouie au cœur de la structure et sera inaccessible au solvant, une différence d'états de charge est donc attendue pour une structure globulaire par rapport à une structure plus linéaire ou dénaturée (cf. Figure 6).

Figure 6 : Influence de la conformation de la protéine sur la distribution en états de charge obtenue par électrospray. La protéine utilisée est la MsrA de *N. meningitidis* ; a) protéine réduite en conditions dénaturantes ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{H}^+$, pH = 1) ; b) protéine avec un pont disulfure en conditions dénaturantes ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{H}^+$, pH = 1) ; c) protéine oxydée en conditions non-dénaturantes (AcNH_4 50 mM, pH = 7).



La corrélation entre la structure et la distribution en états de charge obtenue en SM supramoléculaire a d'ailleurs été l'objet de plusieurs études théoriques [De la Mora et coll. **2000**, Felitsyn et coll. **2002a**, Hautreux et coll. **2004**]. L'utilisation de ce principe pour suivre la conformation d'une protéine dans différentes conditions peut alors se révéler très intéressant : citons par exemple, le cas d'une modification de pH [Konermann et coll. **1998**, Simmons et coll. **2004**] ou d'une modification de température [Benesch et coll. **2003**]. Cette corrélation permettrait de disposer d'un outil pour suivre les changements de conformation induits par un phénomène de coopérativité lors de la fixation multiple de molécules. Si le changement de conformation est suffisant, on peut par exemple, s'attendre à une modification de l'état de charge après fixation coopérative de ligands [Venters et coll. **2003**].

1.5. Evaluation de la nature des interactions (électrostatique ou effet hydrophobe) par dissociation en phase gazeuse

Nous avons décrit précédemment que la SM supramoléculaire nécessitait un contrôle fin des paramètres d'interface du spectromètre de masse afin d'éviter toute dissociation des complexes en phase gazeuse. Le comportement des ions en phase gazeuse a néanmoins fait l'objet de nombreuses études, où cette fois, la dissociation du complexe non-covalent est volontairement provoquée. De telles expériences visent à apporter des informations supplémentaires sur la nature des interactions.

1.5.1. Les interactions moléculaires sont modifiées en phase gazeuse

Il est maintenant bien établi que le transfert des ions de la phase condensée vers la phase gazeuse modifie les interactions moléculaires, au moins d'un point de vue énergétique [Robinson et coll. **1996**, Wu et coll. **1997**, Nesatyy et coll. **2002**]. En effet, nous avons vu dans le premier chapitre quelles étaient les expressions des principales interactions moléculaires et que le terme ϵ (permittivité d'un milieu) se trouvait au dénominateur de chaque équation. La valeur de ϵ passe de 80 à 1 lors du passage de la phase condensée à la phase gazeuse, et au sein d'une protéine, la valeur ϵ est généralement considérée comme proche de 4 ou 5 : les interactions électrostatiques sont donc renforcées en phase gazeuse. Par contre, l'effet hydrophobe, qui est lié à la présence de l'eau, sera considérablement affaibli en phase gazeuse. Ainsi, l'association de deux molécules en solution, dont la force motrice est l'effet hydrophobe (valeur d'entropie positive) présentera une interaction très limitée en phase gazeuse.

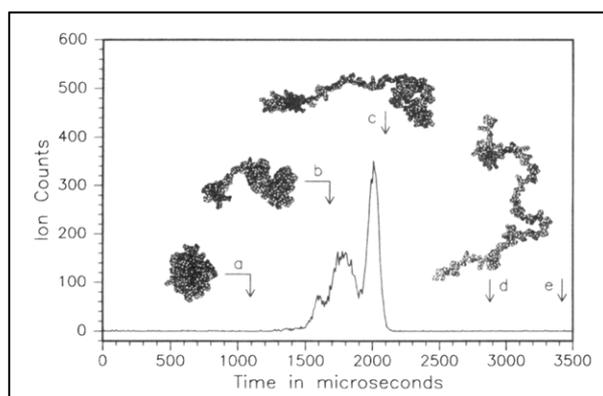
1.5.2. La conformation native d'une protéine est-elle maintenue en phase gazeuse ?

La conformation d'une protéine en solution est déterminée par un subtil équilibre des interactions moléculaires. Le transfert d'une protéine en phase gazeuse modifie l'équilibre de ses interactions moléculaires et donc modifie aussi sa conformation. Il a été décrit dans la littérature que le processus progressif d'évaporation des molécules d'eau « refroidirait » l'ion moléculaire et causerait un « gel » de la structure tridimensionnelle en phase gazeuse [Lee et coll. **1998**].

Il est difficile de savoir en pratique si une protéine a maintenu sa conformation en phase gazeuse. Des expériences telles que l'échange hydrogène/deutérium en phase gazeuse, ont permis de démontrer que l'échange isotopique était moins rapide pour des ions produits à partir de solutions aqueuses à pH contrôlé que dans des solutions décrites comme dénaturantes. Ces expériences montrent qu'au moins une partie de la structure tridimensionnelle de la protéine en solution est préservée en phase gazeuse [Suckau et coll. **1993**, Hoaglung-Hyzer et coll. **1999**, Valentine et coll. **2002**].

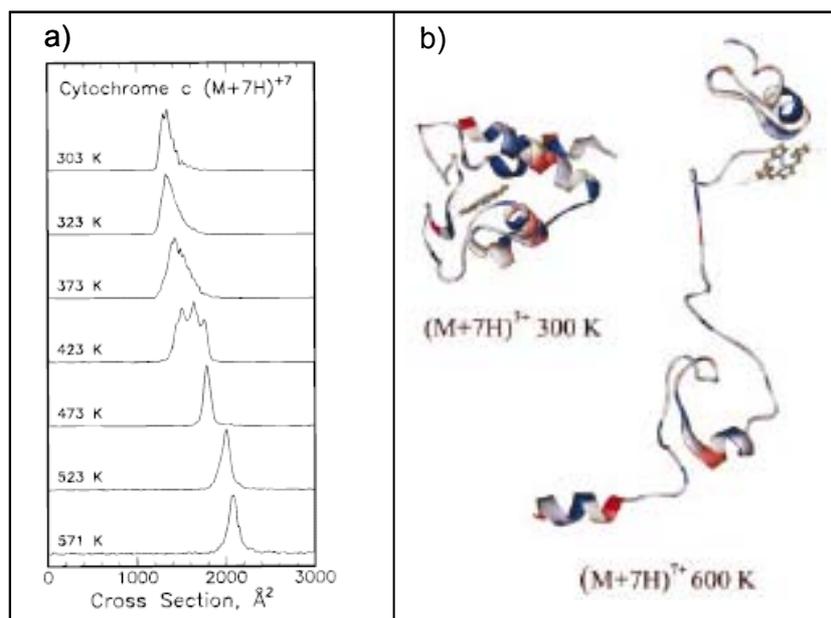
D'autres expériences basées sur la mobilité d'ions en phase gazeuse permettent de décrire la forme dépliée ou globulaire d'une protéine [Covey et coll. **1993**, Green et coll. **1997**, Hudgins et coll. **1997**, Loo et coll. **2005**]. En mesurant le temps de dérive d'ions au travers d'un bain de gaz à pression constante, il est possible d'évaluer leur section efficace de collision et donc d'avoir une idée sur la conformation générale des ions en phase gazeuse (cf. Figure 7). Il a notamment été démontré que la section efficace de collision augmente avec l'état de charge de l'ion sélectionné.

Figure 7 : Distribution des temps de dérive pour l'état de charge 7^+ d'ions de cytochrome c bovin. Les flèches montrent les temps de dérive attendus pour différentes conformations de cytochrome c. a) la structure native (1100 μs) ; b) et c) deux structures partiellement dépliées (1680 μs et 2070 μs) ; d) un enroulement aléatoire avec aucune structure secondaire ou tertiaire (2880 μs) ; e) Une chaîne linéaire (3425 μs). D'après [Clemmer et coll. 1995].



Des calculs de modélisation moléculaire ont aussi permis de mettre en évidence que des structures en hélice α et en feuillet β étaient stables en phase gazeuse, ce résultat fut aussi confirmé de manière expérimentale [Kaltashov et coll. 1997]. En général, il apparaît de toutes ces études que la structure des protéines en phase gazeuse retient un effet de mémoire de la structure en solution. En outre, il apparaît que la structure initiale est métastable et qu'un apport d'énergie en phase gazeuse peut mener à de nouvelles conformations (cf. Figure 8).

Figure 8 : a) Distribution de sections efficaces de l'état de charge 7^+ du cytochrome c pour différentes températures du tube de dérive : l'augmentation de température provoque l'apparition de structures plus dépliées ; b) Simulation de dynamique moléculaire de l'état de charge 7^+ du cytochrome c à 300 K et 600 K : à 600 K la protéine est proche d'une conformation à chaîne linéaire en phase gazeuse. D'après [Jarrold et coll. 1999].



Enfin, pour certains systèmes protéiques, la corrélation entre des études de dissociation en phase gazeuse et des données connues en solution a permis de démontrer que des interactions spécifiques protéine-ligand étaient conservées en phase gazeuse [Gao et coll. **1999**, Hunter et coll. **1997**]. Ces résultats suggèrent que, dans certain cas, la conformation d'une protéine en phase gazeuse retient des éléments de conformation spécifique de la solution. Cependant, ces études ne sont pas généralisables et il n'est pas exclu que des distorsions importantes de structures puissent avoir lieu et ainsi aboutissent à une perte des interactions spécifiques à la phase condensée [Heck et coll. **2004b**].

1.5.3. Intérêt de la dissociation en phase gazeuse

Dans le cas de figure où la conformation d'une protéine en phase gazeuse retient des éléments spécifiques de la conformation native en solution, on peut envisager d'obtenir des informations supplémentaires à partir d'expériences de dissociation en phase gazeuse.

Par exemple, la suppression de l'effet hydrophobe en phase gazeuse et le renforcement des interactions électrostatiques peuvent être utilisés pour classer des ligands de protéine suivant la nature de leurs interactions. Ce principe a été utilisé par Rogniaux et coll. en introduisant la méthode du VC₅₀ (voltage de cône nécessaire à la dissociation de 50 % d'un complexe). Une bonne corrélation a été trouvée entre la valeur du VC₅₀ et le calcul de l'énergie électrostatique d'interaction à partir de structures cristallographiques [Rogniaux et coll. **1999**]. Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle le VC₅₀ permettrait de sonder la contribution des interactions électrostatiques dans un complexe, il est cependant nécessaire d'évaluer l'approche sur d'autres systèmes. L'objectif serait d'utiliser ce principe dans un contexte de développement de nouveaux ligands. Les effets liés à l'ajout ou à la suppression de certains groupements chimiques sur le squelette d'une molécule, pourraient être mis en évidence par cette technique.

Un autre phénomène intéressant a été soulevé et largement débattu : il a été observé que dans certains cas, la dissociation de complexes multi-protéiques était asymétrique, c'est-à-dire que le nombre de charges était inégalement réparties entre les espèces dissociées [Schwartz et coll. **1995**, Felitsyn et coll. **2001** et **2002b**]. Versluis apporta un exemple où, le profil de dissociation (symétrique ou asymétrique) de dimères spécifiques et non-spécifiques n'était pas relié à la stabilité des espèces en solution [Versluis et coll. **2001**]. Mais, il a aussi été démontré que le processus de partition de charge était lié à la manière dont sont formés les ions (à partir d'un échantillon en solution ou artificiellement par réaction en phase gazeuse) [Jurchen et coll. **2003** et **2004**]. Ces expériences suggèrent que des informations structurales propres à la phase condensée pourraient être obtenues à partir du profil de dissociation.

Bien entendu, de telles expériences soulèvent beaucoup de questions auxquelles des réponses pourront être apportées, en multipliant les applications dans le domaine de la dissociation en phase gazeuse de complexes multi-protéiques, et en interprétant les données avec prudence.

2. Validité de l'approche

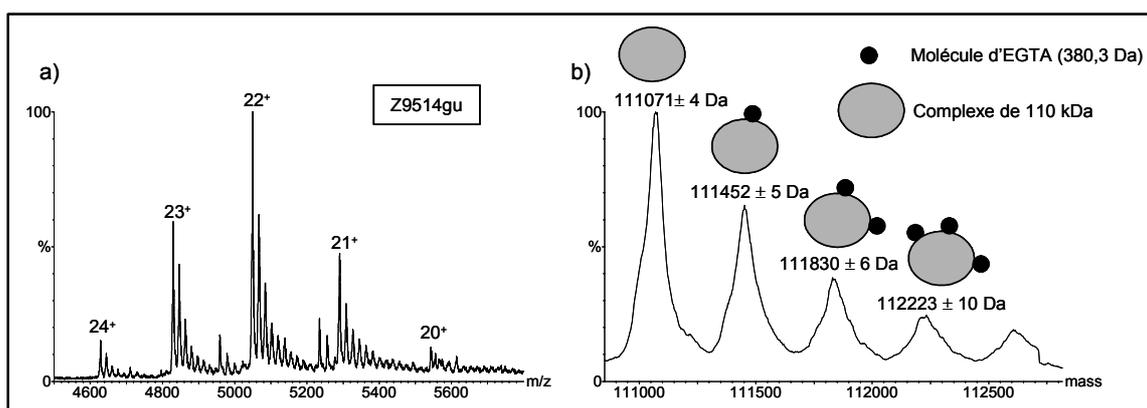
Tous les résultats décrits précédemment ne peuvent être validés que si le mode d'ionisation électrospray induit le transfert sans distorsion de molécules de la phase condensée vers la phase gazeuse. La question principale la plus débattue reste toujours la suivante : le mode d'ionisation électrospray n'induit-il pas des mesures « artefactuelles » ? En d'autres termes, l'analyse par SM ne doit ni détruire ni générer d'espèces.

2.1. Les molécules non-volatiles peuvent s'agréger non-spécifiquement sur les biomolécules

La formation par électrospray d'interactions non-spécifiques entre une biomolécule et des molécules non-volatiles est un phénomène assez courant. Prenons l'exemple des sels non-volatils : durant le processus d'ionisation, ces sels auront tendance à s'agréger de manière aléatoire sur la biomolécule d'intérêt pendant le processus d'évaporation, ce qui engendrera d'ailleurs une perte énorme en sensibilité.

L'observation de tels agrégats non-spécifiques a lieu de façon générale avec des molécules peu volatiles (cf. Figure 9), ce qui justifie les étapes préliminaires de préparation de l'échantillon dans un tampon d'acétate d'ammonium. De la même manière, ces agrégats pourraient être observés dans le cas d'un ligand non-volatil s'il était ajouté dans de fortes concentrations. En pratique, il est donc judicieux de toujours travailler dans des concentrations diluées en échantillon (de l'ordre de 1 à 100 μM) afin de se prémunir de ce phénomène « artefactuel ».

Figure 9 : Exemple de fixation multiple et non-spécifique de molécules d'EGTA (380,3 Da) sur un complexe de 110 kDa observé sur un spectre électrospray. L'EGTA initialement présent à une concentration de 500 mM n'a pas été suffisamment éliminé après 6 cycles de dilution/concentration dans l'acétate d'ammonium, a) spectre électrospray en échelle m/z , b) spectre en échelle de masse.



2.2. L'équilibre chimique en solution est-il déplacé durant le processus électrospray ?

Un des problèmes majeur lié au processus électrospray, serait l'observation d'une stœchiométrie d'interaction faussée, du fait de l'effet de concentration de l'échantillon lors du processus de désolvatation des gouttelettes [Daniel et coll. 2002]. Il est assez délicat de résoudre un tel problème théoriquement puisqu'il combine des effets cinétique et thermodynamique. En pratique, de nombreuses données expérimentales

tendent à confirmer que la SM donne une image non biaisée des interactions spécifiques en solution (cf. **CHAP III. III. 1.3.**). Le groupe de Kebarle a décrit théoriquement ces phénomènes dans le cas du nanospray, c'est-à-dire en prenant une taille initiale des gouttelettes de l'ordre de 0.25 μM [Peschke et coll. **2004**]. Ces calculs ont permis de conclure que la désolvatation des biomolécules a lieu dans une échelle de temps trop courte, qui ne permet généralement pas aux réactions d'échanges entre biomolécules d'avoir lieu, c'est-à-dire que **l'équilibre chimique en solution n'est pas modifié par le processus nanospray**. Ces calculs iraient donc dans le sens où la SM peut être utilisée comme un outil fiable d'études des interactions moléculaires. Cependant, aucune théorie n'a pour l'instant été développée dans le cas de l'électrospray. Ainsi, l'apport d'exemples expérimentaux permettant de valider le mécanisme électrospray est encore nécessaire.

2.3. Réactions d'association ou de dissociation des molécules en phase gazeuse

Lorsque les ions ont été transférés en phase gazeuse, les réactions de dissociation ou d'association des molécules peuvent modifier la stœchiométrie des complexes.

D'après les travaux de Smith et Light-Wahl, la probabilité d'association de molécules en phase gazeuse est largement négligeable dans des conditions d'analyse classique, où les ions sont directement acheminés vers le détecteur [Smith et Light-Wahl **1993**]. Pour étudier les réactions entre molécules en phase gazeuse, il faut en effet utiliser des appareils équipés d'analyseurs de type trappe ionique ou à résonance cyclotronique, dans les cas suivants, les ions sont stockés durant un temps suffisamment long pour provoquer des réactions entre molécules.

Les réactions de dissociation en phase gazeuse peuvent effectivement être provoquées en communiquant de l'énergie aux ions dans l'interface. Comme nous l'avons déjà largement mentionné (cf. **CHAP III. III. 2.1.**), un important travail d'optimisation est nécessaire pour préserver les interactions faibles en phase gazeuse et notamment dans la zone d'interface du spectromètre de masse. Dans de nombreux cas, l'expérimentateur est en mesure de vérifier qu'il ne provoque aucune réaction de dissociation des complexes durant l'analyse.

IV. Conclusion de cette étude bibliographique et perspectives d'études

Les données actuelles montrent qu'avec un certain nombre de précautions expérimentales, la SM supramoléculaire permet d'obtenir des **informations sur les interactions moléculaires en solution**. En particulier, la **stœchiométrie** d'interaction est l'information clé qui peut être déduite par SM.

Cependant, **des questions demeurent**, notamment concernant la **spécificité** et la **validité** des interactions détectées par SM. En effet, l'information de masse seule ne nous renseigne pas sur la localisation de l'interaction, des expériences adaptées doivent être mises en place afin de valider la spécificité des interactions détectées. Un autre domaine à explorer concerne le **comportement des ions en phase gazeuse**. Pour l'instant, certains groupes utilisent de manière ponctuelle la dissociation en phase gazeuse afin d'obtenir des

informations structurales supplémentaires, une meilleure compréhension de ce phénomène permettra d'en augmenter la pertinence et d'étendre son champ d'application.

Durant ce travail de thèse, nous avons été amené à travailler sur différents systèmes permettant, 1) d'apporter de nouveaux éléments à ces questions, 2) de développer/appliquer de nouvelles approches expérimentales, 3) de répondre à des questions biologiques. Trois types d'applications ont été abordés :

- **La découverte et le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique** : nous avons développé des méthodologies pour sélectionner des « hits » ou aider au développement de molécules « leads » dans le cadre de plusieurs projets de développement de médicaments.

- **La compréhension de mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires** : nous avons étudié des systèmes protéiques variés faisant intervenir plusieurs partenaires dans le but de mieux comprendre leur rôle au sein de mécanismes biologiques.

- **Le suivi de la dynamique d'échange dans le temps de complexes biologiques non-covalents** : nous avons mis au point des conditions expérimentales permettant l'observation de la dynamique de complexes non-covalents en vue d'élargir le champ d'application actuel de la SM supramoléculaire.

Références bibliographiques

A

Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. **2003**, 422, 198-207.

Ayed, A.; Krutchinsky, A. N.; Ens, W.; Standing, K. G.; Duckworth, H. W. Quantitative Evaluation of Protein–Protein and Ligand–Protein Equilibria of a Large Allosteric Enzyme by Electrospray Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **1998**, 12, 339-44.

B

Benesch, J. L.; Sobott, F.; Robinson, C. V. Thermal dissociation of multimeric protein complexes by using nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem*. **2003**, 75, 2208-14.

Blades, A. T.; Ikonomou, M. G.; Kebarle, P. Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. Electrospray as an Electrolysis Cell. *Anal Chem*. **1991**, 63, 2109.

C

Chazin, W.; Veenstra, T. D. Determination of the Metal-binding Cooperativity of Wild-type and Mutant Calbindin D9K by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **1999**, 13, 548-55.

Chernushevich, I. V.; Loboda, A. V.; Thomson, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*. **2001**, 36, 849-65.

Chernushevich, I. V.; Bahr, U.; Karas, M. Nanospray 'taxation' and how to avoid it. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **2004a**, 18, 2479-85.

Chernushevich, I. V.; Thomson, B. A. Collisional cooling of large ions in electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*. **2004b**, 76, 1754-60.

Chitta, R. K.; Rempel, D. L.; Gross, M. L. Determination of affinity constants and response factors of the noncovalent dimer of gramicidin by electrospray ionization mass spectrometry and mathematical modeling. *J Am Soc Mass Spectrom*. **2005**, 16, 1031-8.

Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. An electrospray-ionization mass spectrometer with new features. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **1990a**, 4, 81-7.

Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. Probing Conformational Changes in Proteins by Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1990b**, 112, 9012-3.

Clarkson, J.; Campbell, I. D. Studies of protein-ligand interactions by NMR. *Biochem Soc Trans.* **2003**, 31, 1006-9.

Cleg, G. ; Dole, M. Molecular beams of macroions. III. *Biopolymers*, **1971**, 10, 821-6.

Clemmer, D. E.; Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase. *J Am Chem Soc.* **1995**, 40, 10141-2.

Cole, R. B. Focus on noncovalent interactions. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2003**, 14, 417-8.

Cole, R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2000**, 35, 763-72.

Cooper, M. A.; Williams, D. H. Kinetic analysis of antibody-antigen interactions at a supported lipid monolayer. *Anal Biochem.* **1999**, 276, 36-47.

Covey, T.; Douglas, D. J. Collision cross sections for protein ions. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1993**, 4, 616.

Cunniff, J. B.; Vouros, P. false positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1995**, 6, 437-47.

D

Daneshfar, R.; Kitova, E. N.; Klassen, J. S. Determination of protein-ligand association thermochemistry using variable-temperature nanoelectrospray mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* **2004**, 126, 4786-7.

Daniel, J. M.; Friess, S. D.; Rajagopalan, S.; Wendt, S.; Zenobi, R. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2002**, 216, 1-27.

De la Mora, J. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal Chim Acta.* **2000**, 93-104.

Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular Beams of Macroions. *J Chem Phys.* **1968**, 49, 2240-9.

Douglas, D. J.; Collings, B. A.; Numao, S.; Nesatyy, V. J. Detection of noncovalent complex between alpha-amylase and its microbial inhibitor tendamistat by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2001**, 15, 89-96.

E

Edwards, P. R.; Maule, C. H.; Leatherbarrow, R. J.; Winzor, D. J. Second-order kinetic analysis of IAsys biosensor data: its use and applicability. *Anal Biochem.* **1998**, 263, 1-12.

F

Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2002a**, 219, 39-62.

Felitsyn, N.; Kitova, E. N.; Klassen, J. S. Thermal dissociation of the protein homodimer ecotin in the gas phase. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2002b**, 13, 1432-42.

Felitsyn, N.; Kitova, E. N.; Klassen, J. S. Thermal decomposition of a gaseous multiprotein complex studied by blackbody infrared radiative dissociation. Investigating the origin of the asymmetric dissociation behavior. *Anal Chem.* **2001**, 73, 4647-61.

Fernandez de la Mora, J.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez, M.; Fenn, J. B. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2000**, 35, 939-52.

Fenn, J. B. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1993**, 4, 524-35.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* **1989**, 246, 64-71.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, 9, 37-70.

Fenn, J. B.; Rosell, J. In Electrospray Ionization, How Much Pull Does an Ion Need to Escape Its Droplet Prison. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1997**, 8, 1147-57.

Fielding, L. Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data. *Tetrahedron.* **2000**, 56, 6151-70.

Fitzgerald, M. C.; Chernushevich, I. V.; Standing, K. G.; Whitman, C. P.; Kent, S. B. H. Probing the oligomeric structure of an enzyme by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. **1996**, 93, 6851-6.

Friedman, M. H.; Yergey, A. L.; Campana, J. E. Fundamentals of ion motion in electric radio-frequency multipole fields. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **1982**, 15, 53-6.

G

Gabelica, V.; Galic, N.; Rosu, F.; Houssier, C.; De Pauw, E. Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2003**, 38, 491-501.

Gabelica, V.; Pauw, E. D. Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources. *Mass Spectrom Rev.* **2004**, 12, 12.

Gallagher, R.T; Chapman, J.R. Design and performance of an electrospray ionization source for a doubly-focusing magnetic sector mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1990**, 4, 369.

Gamero-Castano, M.; Fernandez de la Mora, J. Kinetics of small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays. *J Mass Spectrom.* **2000a**, 35, 790-803.

Gamero-Castano, M.; Fernandez de la Mora, J. Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Anal Chim Acta.* **2000b**, 406, 67-91.

Ganem, B.; Li, Y.; Henion, J. D. Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1991a**, 113, 6294-96.

Ganem, B.; Li, Y.; Henion, J. D. Observation of noncovalent enzyme-substrate and enzyme-product complexes by ion-spray mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1991b**, 113, 7818-19.

Ganem, B.; Henion, J. D. Going gently into flight: analyzing noncovalent interactions by mass spectrometry. *Bioorg Med Chem.* **2003**, 11, 311-4.

Gao, J.; Wu, Q.; Carbeck, J.; Lei, P. Q.; Smith, R. D.; Whitesides, G. M. Probing the Energetics of Dissociation of Carbonic Anhydrase-Ligand Complexes in the Gas Phase. *Biophys J.* **1999**, 76, 3253-60.

Green, M. K.; Lebrilla, C. B. Ion-molecule reactions as probes of gas-phase structures of peptides and proteins. *Mass Spectrom Rev.* **1997**, 16, 53-71.

Green, B. N.; Gotoh, T.; Suzuki, T.; Zal, F.; Lallier, F. H.; Toulmond, A. A.; Vinogradov, S. N. Observation of Large, Non-covalent Globin Subassemblies in the ϕ 3600 kDa Hexagonal Bilayer Hemoglobins by Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Mol Biol.* **2001**, 309, 553-60.

Gomez, A.; Tang, K. Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Phys Fluids.* **1994**, 6, 404-14.

H

Hall, D. Use of optical biosensors for the study of mechanistically concerted surface adsorption processes. *Anal Biochem.* **2001**, 288, 109-25.

Hautreux, M.; Hue, N.; Laprevote, O. Under non-denaturing solvent conditions, the mean charge state of a multiply charged protein ion formed by electrospray is linearly correlated with the macromolecular surface. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, 131-7.

Heck, A. J.; Jorgensen, T. J. D. Vancomycin in vacuo. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2004b**, 236, 11-23.

Heck, A. J.; Van Den Heuvel, R. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* **2004a**, 23, 368-89.

Heeren, R. M.; Kleinnijenhuis, A. J.; McDonnell, L. A.; Mize, T. H. A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Anal Bioanal Chem.* **2004**, 378, 1048-58.

Henion, J.; Li, Y. T.; Hsieh, Y. L.; Ganem, B. Mass spectrometric investigations of drug-receptor interactions. *Ther Drug Monit.* **1993**, 15, 563-9.

Henry, K. D.; Williams, E. R.; Wang, B. H.; McLafferty, F. W.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1989**, 86, 9075-8.

Hernandez, H.; Robinson, C. V. Dynamic protein complexes: insights from mass spectrometry. *J Biol Chem.* **2001**, 276, 46685-8.

Hoaglund-Hyzer, C. S.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. Anhydrous protein ions. *Chem Rev.* **1999**, 99, 3037-80.

Hu, P.; Loo, J. A. Determining calcium-binding stoichiometry and cooperativity of parvalbumin and calmodulin by mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **1995**, 30, 1076-82.

Hudgins, R. R.; Woenckhaus, J.; Jarrold, M. F. High resolution ion mobility measurements for gas phase proteins: correlation between solution conformations phase and gas phase conformations. *International Journal of Mass Spectrometry*. **1997**, 165/166, 497.

Hunter, C. L.; Mauk, A. G.; Douglas, D. J. Dissociation of Heme from Myoglobin and Cytochrome b5: Comparison of Behavior in Solution and the Gas Phase. *Biochemistry*. **1997**, 36, 1018-25.

I

Ikonomou, M. G.; Blades, A. T.; Kebarle, P. Electrospray-IonSpray : a comparison of mechanism and performance. *Anal Chem*. **1991**, 63,1989-98.

Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys*. **1976**, 76, 2287-94.

Iribarne, J. V.; Dziedzic, P. J.; Thomson, B. A. Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Phys*. **1983**, 50, 331-47.

J

Jaquinod, M.; Potier, N.; Klarskov, K.; Reymann, J. M.; Sorokine, O.; Kieffer, S.; Barth, P.; Andriantomanga, V.; Biellmann, J. F.; Van Dorsselaer, A. Sequence of pig lens aldose reductase and electrospray mass spectrometry of non-covalent and covalent complexes. *Eur J Biochem*. **1993**, 218, 893-903.

Jorgensen, T. J. D.; Roepstorff, P. Direct Determination of Solution Binding Constants for Noncovalent Complexes between Bacterial Cell Wall Peptide Analogues and Vancomycin Group Antibiotics by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*. **1998**, 70, 4427-32.

Jurchen, J. C.; Garcia, D. E.; Williams, E. R. Further studies on the origins of asymmetric charge partitioning in protein homodimers. *J Am Soc Mass Spectrom*. **2004**, 15, 1408-15.

Jurchen, J. C.; Williams, E. R. Origin of asymmetric charge partitioning in the dissociation of gas-phase protein homodimers. *J Am Chem Soc*. **2003**, 125, 2817-26.

K

Kaltashov, I. A.; Eyles, S. J. Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. **2002**, 21, 37-71.

Kaltashov, I. A.; Fenselau, C. Stability of Secondary Structural Elements in a Solvent-Free Environment: The α Helix. *Structure, Function, and Genetics*. **1997**, *27*, 165-70.

Katta, V.; Chait, B. T. Observation of the Heme-Globin Complex in Native Myoglobin by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc*. **1991a**, *113*, 8534-35

Katta, V.; Chait, B. T. Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **1991c**, *5*, 214-7.

Katta, V.; Chowdhury, S. K.; Chait, B. T. Use of a single-quadrupole mass spectrometer for collision-induced dissociation studies of multiply charged peptide ions produced by electrospray ionization. *Anal Chem*. **1991b**, *63*, 174-8.

Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. **2000**, *35*, 804-17.

Kebarle, P.; Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal Chem*. **1993**, *65*, 972A-86A.

Kempen, E. C.; Brodbelt, J. S. A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. **2000**, *72*, 5411-6.

Konermann, L.; Douglas, D. J. Equilibrium unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: distinguishing two-state from multi-state transitions. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **1998**, *12*, 435-42.

Krutchinsky, A. N.; Chernushevich, I. V.; Spicer, V. L.; Ens, W.; Standing, K. G. Collisional Damping Interface for an Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*. **1998**, *9*, 569-79.

L

Larsen, B.S.; McEwen, C.N. An Electrospray Ion Source for Magnetic Sector Mass Spectrometers *J Am Soc Mass Spectrom*. **1991**, *2*, 205-11.

Lee, S. W.; Freivogel, P.; Schindler, T.; Beauchamp, J. L. Freeze-Dried Biomolecules: FT-ICR Studies of the Specific Solvation of Functional Groups and Clathrate Formation Observed by the Slow Evaporation of Water from Hydrated Peptides and Model Compounds in the Gas Phase. *J Am Chem Soc*. **1998**, *120*, 11758-65.

Lemaire, D.; Marie, G.; Serani, L.; Laprevote, O. Stabilization of Gas-Phase Noncovalent Macromolecular Complexes in Electrospray Mass Spectrometry Using Aqueous Triethylammonium Bicarbonate Buffer. *Anal Chem*. **2001**, *73*, 1699-706.

Li, Y. T.; Hsieh, Y. L.; Henion, J. D.; Senko, M. W.; McLafferty, F. W.; Ganem, B. Mass spectrometric studies on noncovalent dimers of leucine zipper peptides. *J Am Chem Soc.* **1993**, 115, 8409-13.

Loscertales, I. G.; Fernandez de la Mora, J. Experiments on the kinetics of field evaporation of small ions from droplets. *J Chem Phys.* **1995**, 103, 5041-60.

Loo, J. A.; Berhane, B.; Kaddis, C. S.; Wooding, K. M.; Xie, Y.; Kaufman, S. L.; Chernushevich, I. V. Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Ion Mobility Analysis of the 20S Proteasome Complex. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2005**, 16, 998-1008.

Loo, J. A.; Loo, R. R.; Udseth, H. R.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D. Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1991**, 5, 101-5.

Loo, J. A.; Loo, R. R.; Light, K. J.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D. Multiply charged negative ions by electrospray ionization of polypeptides and proteins. *Anal Chem.* **1992**, 64, 81-8.

Loo, J. A.; Udseth, H.R.; Smith, R.D. Collisional effects on the charge distribution of ions from large molecules formed by electrospray-ionization mass spectrometry of large molecules. *Rapid Commun Mass spectrom.* **1988**, 2, 207-10.

Loo, J. A. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* **1997**, 16, 1-23.

Loo, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2000**, 200, 175-86.

M

Mack, L. L.; Kralik, P.; Rheude, A.; Dole, M. Molecular Beams of Macroions. II. *J Chem Phys.* **1970**, 52, 4977-86.

Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. Mass reflectron. New nonmagnetic time-of-flight high-resolution mass spectrometer. *Sov Phys JETP.* **1973**, 64, 82-9.

Meyer, B.; Peters, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2003**, 42, 864-90.

Mirgorodskaya, O. A.; Shevchenko, A. A.; Chernushevich, I. V.; Dodonov, A. F.; Miroshnikov, A. I. Electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry in protein chemistry. *Anal Chem.* **1994**, 66, 99-107.

Mirza, U. A.; Cohen, S. L.; Chait, B. T. Heat-induced conformational changes in proteins studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* **1993**, 65, 1-6.

Mirza, U. A.; Chait, B. T. Effects of anions on the positive ion electrospray ionization mass spectra of peptides and proteins. *Anal Chem.* **1994**, 66, 2898-904.

N

Nemirovskiy, O.; Giblin, D. E.; Gross, M. L. Electrospray ionization mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange for probing the interaction of calmodulin with calcium. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1999**, 10, 711-8.

Nesatyy, V. J. Mass spectrometry evaluation of the solution and gas-phase binding properties of noncovalent protein complexes. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2002**, 221, 147-61.

O

Ogorzalek Loo, R. R.; Goodlett, D. R.; Smith, R. D.; Loo, J. A. Observation of a noncovalent ribonuclease S-protein/S-peptide complex by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1993**, 115, 4391-2.

P

Pandey, A.; Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* **2000**, 405, 837-46.

Peschke, M.; Verkerk, U. H.; Kebarle, P. Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2004**, 15, 1424-34.

Pinkse, M. W.; Maier, C. S.; Kim, J. I.; Oh, B. H.; Heck, A. J. Macromolecular assembly of *Helicobacter pylori* urease investigated by mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2003**, 38, 315-20.

Pratt, L. R.; Pohorille, A. Hydrophobic effects and modeling of biophysical aqueous solution interfaces. *Chem Rev.* **2002**, 102, 2671-92.

R

Rayleigh, L. *Phil Mag.* **1882**, 14, 184.

Rich, R. L.; Myszka, D. G. BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J Mol Recognit.* **2001**, 14, 223-8.

Robinson, C. V.; Chung, E. W.; Kragelund, B. B.; Knudsen, J.; Aplin, R. T.; Poulsen, F. M.; Dobson, C. M. Probing the Nature of Noncovalent Interactions by Mass Spectrometry. A Study of Protein-CoA Ligand Binding and Assembly. *J Am Chem Soc.* **1996**, 118, 8646-53.

Rogniaux, H. Etude d'interactions faibles intra- et inter-moléculaires de biomolécules par spectrométrie de masse. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.* **2000**.

Rogniaux, H.; Sanglier, S.; Strupat, K.; Azza, S.; Roitel, O.; Ball, V.; Tritsch, D.; Branlant, G.; Van Dorsselaer, A. Mass spectrometry as a novel approach to probe cooperativity in multimeric enzymatic systems. *Anal Biochem.* **2001**, 291, 48-61.

Rogniaux, H.; Van Dorsselaer, A.; Barth, P.; Biellmann, J. F.; Barbanton, J.; van Zandt, M.; Chevrier, B.; Howard, E.; Mitschler, A.; Potier, N.; Urzhumtseva, L.; Moras, D.; Podjarny, A. Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1999**, 10, 635-47.

Rostom, A.; Robinson, C. V. Detection of the Intact GroEL Chaperonin Assembly by Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1999**, 121, 4718-9.

S

Sakairi, M.; Yergey, A. L.; Siu, K. W.; Le Blanc, J. C.; Guevremont, R.; Berman, S. S. Electrospray mass spectrometry: application of ion evaporation theory to amino acids. *Anal Chem.* **1991**, 63, 1488-90.

Sanglier, S. La spectrométrie de masse : un nouvel outil pour l'étude des interactions faibles en biologie. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.* **2002**.

Sanglier, S.; Ramstrom, H.; Haiech, J.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A. Electrospray ionization mass spectrometry analysis revealed a 310 kDa noncovalent hexamer of HPr kinase/phosphatase from *Bacillus subtilis*. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2002**, 219, 681-96.

Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F. Comparative ESI-MS study of approximately 2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: from protein oligomeric state to biotope. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2003**, 14, 419-29.

Schneider, B. B.; Chen, D. D. Y. Collision-Induced Dissociation of Ions within the Orifice-Skimmer Region of an Electrospray Mass Spectrometer. *Anal Chem.* **2000**, 72, 791-9.

Schmidt, A.; Bahr, U.; Karas, M. Influence of Pressure in the First Pumping Stage on Analyte Desolvation and Fragmentation in Nano-ESI MS. *Anal Chem.* **2001**, 73, 6040-6.

Schwartz, B. L.; Bruce, J. E.; Anderson, G. A.; Hofstadler, S. A.; Rockwood, A. L.; Smith, R. D. Dissociation of Tetrameric Ions of Noncovalent Streptavidin Complexes Formed by Electrospray Ionisation. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1995**, 6, 459-65.

Searcy, J. Q.; Fenn, J. B. Clustering of water on hydrated protons in a supersonic free jet expansion. *J Chem Phys.* **1974**, 61, 12.

Simmons, D. A.; Wilson, D. J.; Lajoie, G. A.; Doherty-Kirby, A.; Konermann, L. Subunit disassembly and unfolding kinetics of hemoglobin studied by time-resolved electrospray mass spectrometry. *Biochemistry.* **2004**, 43, 14792-801.

Smith, R. D.; Light-Wahl, K. J. The Observation of Non-covalent Interactions in Solution by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Promises, Pitfalls and Prognosis. *Biol Mass Spectrom.* **1993**, 22, 493-501.

Smith, R. D.; Loo, J. A.; Edmonds, C. G.; Barinaga, C. J.; Udseth, H. R. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal Chem.* **1990**, 62, 882-99.

Sobott, F.; Hernandez, H.; McCammon, M. G.; Tito, M. A.; Robinson, C. V. A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Anal Chem.* **2002**, 74, 1402-7.

Stafford, G. C.; Kelly, P. E.; Syka, J. E. P.; Reynolds, W. E.; Todd, J. F. J. Recent improvements and analytical applications of advanced ion trap technology. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* **1984**, 60, 85-98.

Standing, K. G. Timing the flight of biomolecules: a personal perspective. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2000**, 200, 597-610.

Suckau, D.; Shi, Y.; Beu, S. C.; Senko, M. W.; Quinn, J. P.; Wampler, F. M.; McLafferty, F. W. Coexisting stable conformations of gaseous protein ions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**, 90, 790-3.

T

Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science.* **2004**, 306, 471-3.

Tahallah, N.; Pinkse, M.; Maier, C. S.; Heck, A. J. The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2001**, 15, 596-601.

Tanford, C. How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Sci.* **1997**, 6, 1358-66.

Tang, L.; Kebarle, P. Effect of the Conductivity of the Electrosprayed Solution on the Electrospray Current. Factors Determining Analyte Sensitivity in Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem.* **1991**, 63, 2709-15.

Tang, L.; Kebarle, P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analyte in the Electrosprayed Solution. *Anal Chem.* **1993**, 65, 3654-68.

Taylor, G. I. *Proceedings of the Royal Society A*, **1964**, 280, 383.

Thomson, B. A.; Iribarne, J. V. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys.* **1979**, 71, 4451-63.

Tito, M. A.; Tars, K.; Valegard, K.; Hajdu, J.; Robinson, C. V. Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Intact MS2 Virus Capsid. *J Am Chem Soc.* **2000**, 122, 3550-1.

U

Udo, H.; Verkerk, M. P.; Kebarle, P. Effect of buffer cations and of H₃O⁺ on the charge states of native proteins. Significance to determinations of stability constants of protein complexes. *J Mass Spectrom.* **2003**, 38, 618-31.

V

Valentine, S. J.; Clemmer, D. E. Temperature-dependent H/D exchange of compact and elongated cytochrome c ions in the gas phase. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2002**, 13, 506-17.

Van Berkel, G. J.; McLuckey, S. A.; Glish, G. L. Electrochemical Origin of Radical Cations Observed in Electrospray Ionization Mass Spectra. *Anal Chem.* **1992**, 64, 1586-93.

Van Berkel, G. J.; Zhou, F. Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell. *Anal Chem.* **1995**, 67, 2916-23.

Van Berkel, W. J.; van den Heuvel, R. H.; Versluis, C.; Heck, A. J. Detection of intact megaDalton protein assemblies of vanillyl-alcohol oxidase by mass spectrometry. *Protein Sci.* **2000**, 9, 435-9.

Van den Heuvel, R. H.; Heck, A. J. Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries. *Curr Opin Chem Biol.* **2004**, 8, 519-26.

Venters, R. A.; Benson, L. M.; Craig, T. A.; Paul, K. H.; Kordys, D. R.; Thompson, R.; Naylor, S.; Kumar, R.; Cavanagh, J. The effects of Ca(2+) binding on the conformation of calbindin D(28K): a nuclear magnetic resonance and microelectrospray mass spectrometry study. *Anal Biochem.* **2003**, 317, 59-66.

Versluis, C.; van der Staaij, A.; Stokvis, E.; Heck, A. J.; de Craene, B. Metastable ion formation and disparate charge separation in the gas-phase dissection of protein assemblies studied by orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2001**, 12, 329-36.

W

Wang, G.; Cole, R. B. Effect of Solution Ionic Strength on Analyte Charge State Distributions in Positive and Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem.* **1994**, 66, 3702-8.

Wang, G.; Cole, R. B. Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide clusters in ESI. *Anal Chim Acta.* **2000**, 406, 53-65.

Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem.* **1985**, 57, 675-9.

Widom, B.; Bhimalapuram, P.; Koga, K. The hydrophobic effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 3085-93.

Wiley, W. C.; McLaren, I. H. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev Sci Instr.* **1955**, 16, 1150-7.

Wilm, M.; Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* **1996**, 68, 1-8.

Winger, B. E.; Light-Wahl, K. J.; Ogorzalek Loo, R. R.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. Observation and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1993**, 4, 536-45.

Wu, Q.; Gao, J.; Smith, R. D. Carbonic Anhydrase-Inhibitor Binding: From Solution to the Gas Phase. *J Am Chem Soc.* **1997**, 1157-8.

Y

Yamaguchi, K. Cold-spray ionization mass spectrometry: principle and applications. *J Mass Spectrom.* **2003**, 38, 473-90.

Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem.* **1984**, 88, 4451-9.

Z

Zeleny, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Physical Review*, **1914**, 3, 69.

Zhang, S.; Van Pelt, C. K.; Wilson, D. B. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem*. **2003**, 75, 3010-8.

Zhang, Z.; Krutchinsky, A.; Endicott, S.; Realini, C.; Rechsteiner, M.; Standing, K. G. Proteasome Activator 11S REG or PA28: Recombinant REGa/REGb Hetero-oligomers Are Heptamers. *Biochemistry*. **1999**, 38, 5651-8.

RESULTATS

CHAPITRE I : Utilisation de la SM pour découvrir et développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique

CHAPITRE II : Etude de mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires

CHAPITRE III : Suivi de la dynamique d'échange dans le temps de complexes non-covalents

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

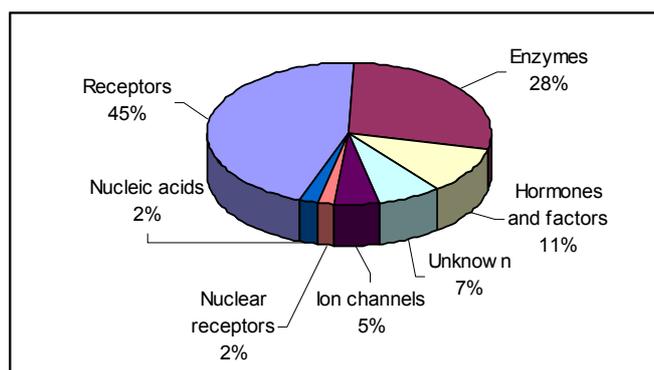
Utilisation de la SM pour découvrir et développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique

I. Recherche de ligands de protéines cibles par criblage « Cette étude a été menée en collaboration avec Michel Robin (Sanofi-Aventis, Vitry) »

1. L'utilité de la SM dans le cadre pharmaceutique

L'identification de petites molécules qui modulent la fonction de protéines cibles, et la conception de nouvelles molécules présentant des propriétés physico-chimiques appropriées à un médicament, sont les processus clés qui régissent la recherche moderne de nouvelles drogues. Actuellement, les drogues présentes sur le marché ciblent environ 500 biomolécules (cf. Figure 1). Le séquençage du génome humain et le développement de la bio-informatique ont apporté de nouveaux outils, permettant la compréhension des mécanismes moléculaires liés à des pathologies, et l'identification rapide de nouvelles cibles thérapeutiques. Face à ces nouvelles informations et au coût croissant des nouvelles technologies, la recherche pharmaceutique moderne se trouve en pleine mutation pour intégrer au mieux ces données dans leurs programmes de recherche.

Figure 1 : Représentation des principales classes de cibles thérapeutiques : les enzymes et les récepteurs sont les classes majoritaires. D'après [Bleicher et coll. 2003].

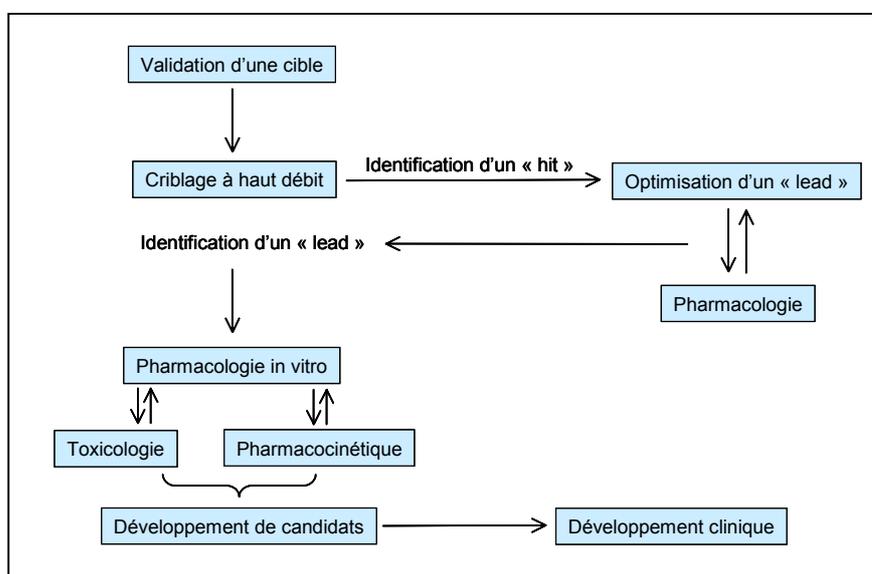


1.1. Stratégie générale de recherche de molécules actives

Le développement de nouvelles drogues est un processus long et coûteux qui se déroule en plusieurs étapes (cf. Figure 2). La première étape consiste à définir une cible dont on pense que l'activité est liée à une maladie : le but est alors de modifier de manière adéquate l'activité de la cible afin de lutter contre la maladie.

Une fois la cible définie, il s'agit de rechercher des molécules permettant de modifier son activité. Pour cela, plusieurs approches sont possibles suivant la quantité d'informations disponible au départ. Une des stratégies couramment employées consiste à réaliser un criblage de chimiothèques (HTS) : à ce stade des millions de molécules peuvent être analysées si l'on dispose d'un test adéquat, rapide et sensible. Ce test est ensuite suivi par une étape de validation utilisant différentes techniques analytiques, permettant de sélectionner un nombre restreint de molécules appelées « hits ». Les « hits » sont les molécules qui seront utilisées pour développer par chimie combinatoire, de nouvelles structures présentant une meilleure activité et des propriétés physico-chimiques plus adéquates à la conception d'un médicament (solubilité, perméabilité, stabilité métabolique, etc...). Quelques molécules sont ensuite sélectionnées pour être développées à partir de tests pharmacologiques *in vitro* et enfin aboutir aux tests cliniques, elles sont appelées « leads ».

Figure 2 : Illustration des différentes étapes intervenant dans un processus de recherche et développement de médicaments. D'après *Screening trends in drug discovery*, 6, May 2005.

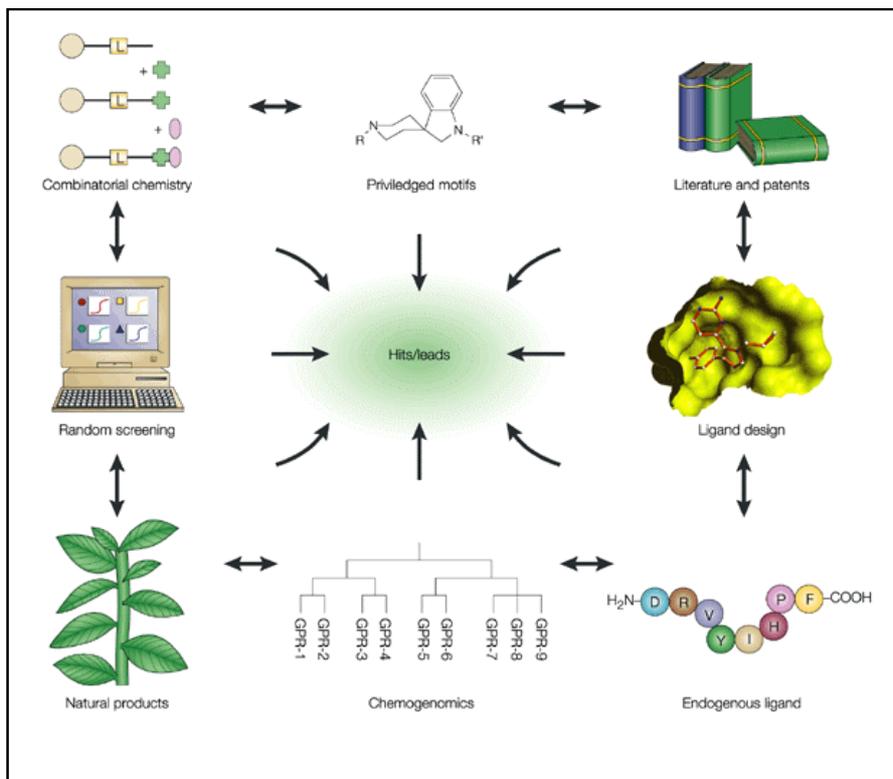


1.2. Intérêts et objectifs de la SM

La recherche de « hits » est un problème qui peut être abordé par une série de stratégies différentes (cf. Figure 3). Toutes ces stratégies font appel à des techniques analytiques variées, aux coûts de fonctionnements plus ou moins importants.

Si la structure cristallographique de la protéine est connue, il est possible de concevoir de manière rationnelle de nouvelles molécules spécifiques par modélisation moléculaire. Cependant, il faut garder à l'esprit que la conformation cristallisée de la protéine peut être différente de la conformation de la protéine *in vivo*. Par ailleurs, il est plus aisé de disposer de la structure cristalline de la protéine co-cristallisée avec une molécule spécifique, afin de définir de manière générale le site d'interaction et les acides aminés impliqués.

Figure 3 : Illustration des différentes stratégies de recherche de « hits », généralement une combinaison de plusieurs méthodes est utilisée. D'après [Bleicher et coll. 2003].



Le criblage à haut débit de millions de molécules nécessite des techniques rapides, robustes, peu consommatrices en échantillon, et permettant de discriminer les molécules présentant une interaction avec la cible. L'objectif est plutôt, à ce stade, de restreindre le nombre de molécules potentielles que de trouver avec certitude une seule molécule d'intérêt. En raison de la qualité des informations que fournit la SM (spécificité, affinité, etc...), il est plus avantageux d'utiliser cette technique pour un criblage secondaire (validation de « hits »). **Ainsi, sur une quantité réduite de molécules (jusqu'à quelques centaines), la SM peut être utilisée pour classer rapidement les ligands par ordre d'importance et déterminer les quelques molécules d'intérêt qui seront utilisées pour développer des « leads ».** En collaboration avec la société pharmaceutique Sanofi-Aventis, nous avons utilisé la SM avec pour objectif de valider les molécules sélectionnées à partir d'un criblage primaire sur deux protéines cibles (Hsp90 et une protéase X).

1.3. Description des projets étudiés

1.3.1. Etude de la protéine chaperone Hsp90 (Heat Shock Protein 90)

Hsp90 est une ATPase qui possède une activité « chaperonne » pour un grand nombre de protéines et qui régule leur stabilité, donc leur fonction. Il a été démontré que cette protéine était surabondante dans une large variété de cellules cancéreuses [Neckers et coll. 2002]. En effet, Hsp90 régule et stabilise beaucoup de protéines signalisatrices qui aident les cellules cancéreuses à échapper à un environnement toxique lié à la chimiothérapie ou à leur propre instabilité génétique. Ainsi, Hsp90 apparaît comme une cible

potentielle et des inhibiteurs spécifiques de cette protéine doivent présenter une forte activité antitumorale, ou en combinaison avec d'autres drogues, doivent augmenter leurs effets [Neckers et coll. **2002** et **2003**]. Dans notre cas, c'est le site à l'ATP qui se trouve sur le domaine N-terminal de la protéine, qui est la cible d'inhibiteurs.

1.3.2. Etude d'une protéase X

La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative du cerveau, qui affecte la mémoire, la pensée et le comportement des individus qui en sont atteints. La cause exacte de cette maladie complexe demeure inconnue. Même si la maladie n'est pas considérée comme un processus normal du vieillissement, les risques augmentent avec l'âge. L'hérédité pourrait aussi jouer un rôle dans la maladie. Les recherches actuelles explorent d'autres avenues, comme les facteurs génétiques, les facteurs environnementaux (pollution) et l'action de certains virus. Dans ce cadre, l'inhibition d'une protéase X serait une voie permettant de réduire les effets de la maladie.

2. Mise au point de protocoles à partir de ligands connus

2.1. Protocole de validation d'une interaction spécifique

Notre objectif est de valider l'interaction entre la protéine et les molécules sélectionnées après un criblage primaire. Pour cela, il faut être capable de détecter avec certitude l'interaction en solution entre le ligand et la protéine, même si cette interaction est de faible affinité et non-quantitative. Nous avons vu dans la partie bibliographique, qu'il fallait réunir différentes conditions pour que la SM puisse donner une image des espèces présentes en solution. La condition la plus importante étant de maintenir l'intégrité du complexe en phase gazeuse. Pour remplir ces conditions, il faut trouver les conditions expérimentales adéquates et, si possible, vérifier sur des données connues que les informations déduites par SM sont pertinentes. La protéine Hsp90 est un modèle particulièrement intéressant pour ce genre d'étude. En effet, plusieurs ligands étaient déjà largement décrits dans la littérature (cf. Figure 4), citons tout d'abord l'ADPMg, qui est un des ligands naturels du site actif de la protéine [Podromou et coll. **1997**], le radicicol et la geldanamycine, qui sont des inhibiteurs connus de la protéine, présentant des affinités très élevées [Roe et coll. **1999**].

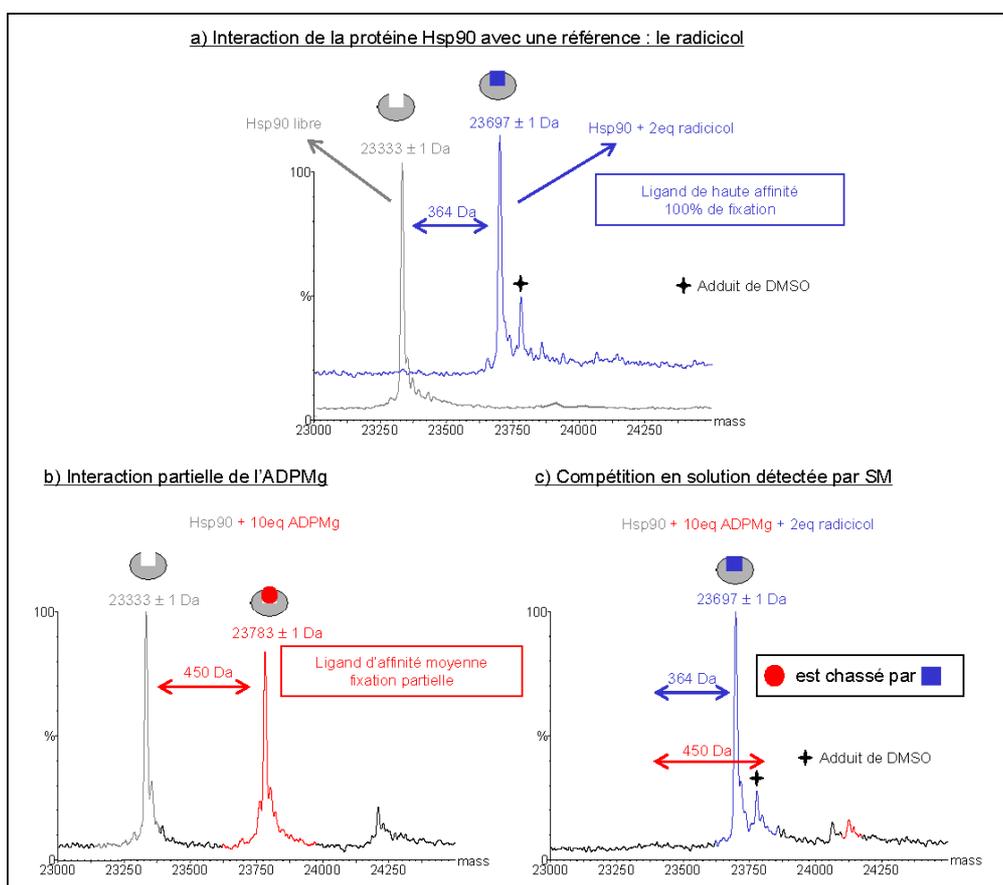
Figure 4 : Données thermodynamiques publiées pour l'interaction entre le site N-terminal de Hsp90 et 3 molécules spécifiques du site. D'après [Scheibel et coll. **1999**, Roe et coll. **1999**].

	Kd (μ M)	Δ G (kJ/mol)	Δ H (kJ/mol)	Δ S (J/mol/K)	masse (Da)
radicicol	0.0027	-48.9	-22.8	87.5	365
geldanamycine	0.775	-34.8	-44.9	-33.9	560
ADPMg	40	-25.3	-71.5	-153.3	450

Nous avons donc mis au point un protocole permettant à la fois, d'observer la stœchiométrie d'interaction entre les molécules (pour un certain équilibre dépendant des conditions de concentration et d'affinité), et de valider la spécificité de l'interaction. Le protocole de validation est basé sur un phénomène de compétition entre la molécule testée et une référence de haute affinité. Cette démarche permet, non seulement, de mettre en évidence la sensibilité de la SM vis à vis de l'équilibre des espèces en solution, mais aussi, de valider l'interaction du ligand ajouté dans le site d'intérêt. De telles expériences ont été réalisées avec la protéine Hsp90, l'ADPMg et le radicicol (cf. Figure 5). Remarquons que l'interaction avec l'ADPMg est observée sans problème par SM alors que ce ligand possède une constante de dissociation (K_d) médiocre de l'ordre de $40 \mu\text{M}$.

Figure 5 : Illustration du phénomène de compétition en solution suivi par SM. Toutes les expériences ont été réalisées à une concentration en protéine de $10 \mu\text{M}$ dans AcNH_4 50 mM sur l'appareil de type Q-TOF ($V_c = 40 \text{ V}$, $P_{\text{interface}} = 5 \text{ mbar}$).

a) Le radicicol est un inhibiteur de Hsp90 de haute affinité, qui se fixe quantitativement dans les conditions utilisées ; b) L'ADPMg est un ligand naturel de Hsp90 d'affinité moyenne, qui se fixe partiellement à la protéine ; c) Le complexe Hsp90-ADPMg disparaît après ajout du radicicol en solution : le radicicol entre en compétition avec l'ADPMg et le chasse du site actif de la protéine.

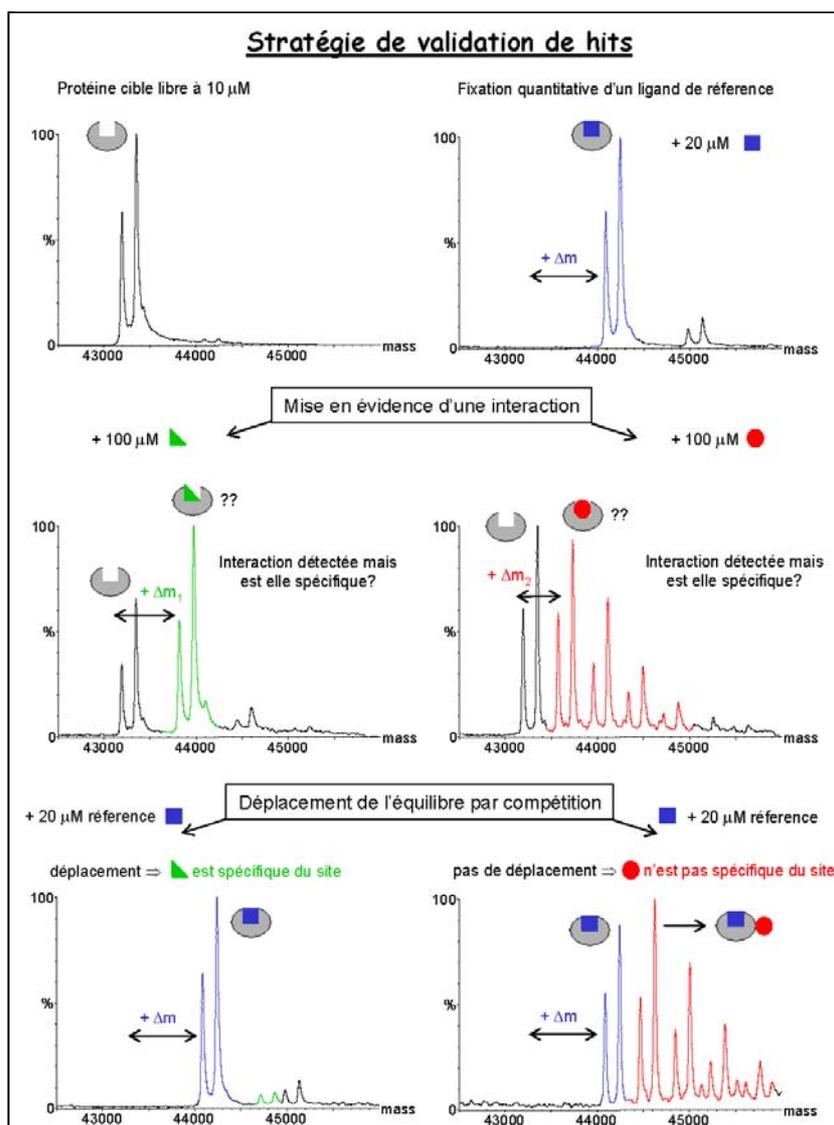


Dans le cas des deux projets que nous avons à mener, le but était de rechercher des molécules spécifiques, possédant un K_d inférieur à $50 \mu\text{M}$. Il faut donc être capable de détecter des molécules d'affinité moyenne, qui se fixeront partiellement à la protéine dans les gammes de concentrations utilisées, et vérifier leur spécificité. L'observation du phénomène de compétition en solution avec une molécule spécifique connue est un atout considérable pour valider la spécificité des molécules qui se fixent non-quantitativement sur une

protéine. Nous avons donc mis au point un test similaire pour la protéase X, étant donné qu'une référence de haute affinité était disponible (cf. Figure 6).

Figure 6 : Illustration de la stratégie de validation de « hits » adoptée sur la protéase X (présente sous 2 formes +/- une arginine). Toutes les expériences ont été réalisées à une concentration en protéine de 10 μM dans AcNH_4 50 mM sur l'appareil de type LCT ($V_c = 40$ V, $P_{\text{interface}} = 5$ mbar).

Une première analyse permet de déceler une interaction protéine-ligand pour deux molécules à tester (symbolisées par un triangle et un rond). Les expériences de compétition avec un inhibiteur de référence mettent en évidence la présence et l'absence de compétition en solution (respectivement pour la molécule « triangle » et la molécule « rond »). La molécule « triangle » est spécifique tandis que la molécule « rond » se fixe aléatoirement sur la protéine (pour des raisons de confidentialité, aucunes masses ne sont reportées sur la figure).



La molécule « triangle » et la molécule « rond » reflètent deux types de comportements susceptibles d'être rencontrés : le but de nos expériences est de valider ou de rejeter les molécules testées. Les spectres de masse de ces deux molécules indiquent une interaction avec la protéase X. A ce stade, la stœchiométrie d'interaction obtenue après ajout de 10 eq. en ligand nous donne déjà une idée concernant la spécificité d'interaction. L'interaction multiple observée pour la molécule « rond » laisse présager d'un manque de

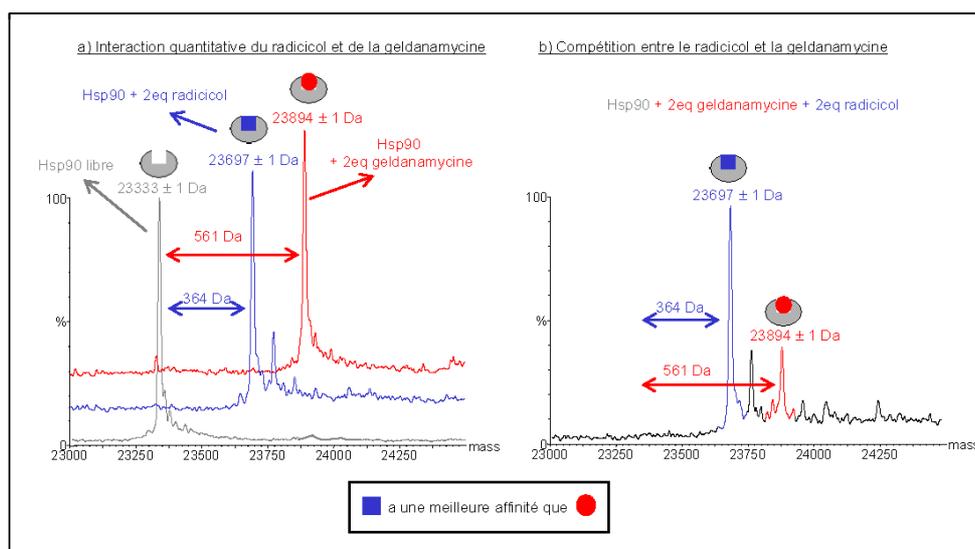
spécificité contrairement à la molécule « triangle », qui se fixe préférentiellement une seule fois. L'expérience de compétition en solution lève toute ambiguïté. En effet, la fixation de la molécule « rond » n'est pas du tout influencée par l'interaction quantitative de la molécule de référence sur la protéine. La molécule « rond » n'est pas spécifique et se fixe aléatoirement sur la protéine. Il est à noter, par ailleurs, qu'un grand nombre de molécules analogues à celle-ci ont été analysées par SM et ont présenté le même comportement non-spécifique vis-à-vis de la protéine. Ce type d'interaction non-spécifique, rencontrée pour une famille complète de molécules, est sûrement la cause de la sélection de cette famille lors du premier criblage : tout porte à croire que les interactions non-spécifiques détectées dans ce cas précis pré-existent en solution et ne sont pas le résultat d'une agrégation en phase gazeuse, qui aurait pu se produire durant le processus électrospray.

2.2. Protocoles de classement des molécules spécifiques

2.2.1. Selon leur affinité en solution

Lorsque la spécificité des molécules a été déterminée, les meilleurs candidats obtenus peuvent être classés par SM selon leur affinité en solution. Ce classement peut se réaliser selon l'abondance relative des complexes formés (lorsqu'elle n'est pas quantitative) ou alors par des expériences de compétition, dans le cas de molécules de haute affinité fixées quantitativement dans les conditions d'analyses utilisées (cf. Figure 7). Ainsi, la SM a permis de démontrer que le radicicol a, en solution, une meilleure affinité que la geldanamycine. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (cf. Figure 4).

Figure 7 : Evaluation de l'affinité relative de molécules de haute affinité par des expériences de compétition. Toutes les expériences ont été réalisées à une concentration en protéine de 10 μM dans AcNH_4 50 mM sur l'appareil de type Q-TOF ($V_c = 40$ V, $P_{\text{interface}} = 5$ mbar). a) mise en évidence de l'interaction quantitative du radicicol et de la geldanamycine ; b) par compétition en solution la SM montre que le radicicol a une meilleure affinité que la geldanamycine.



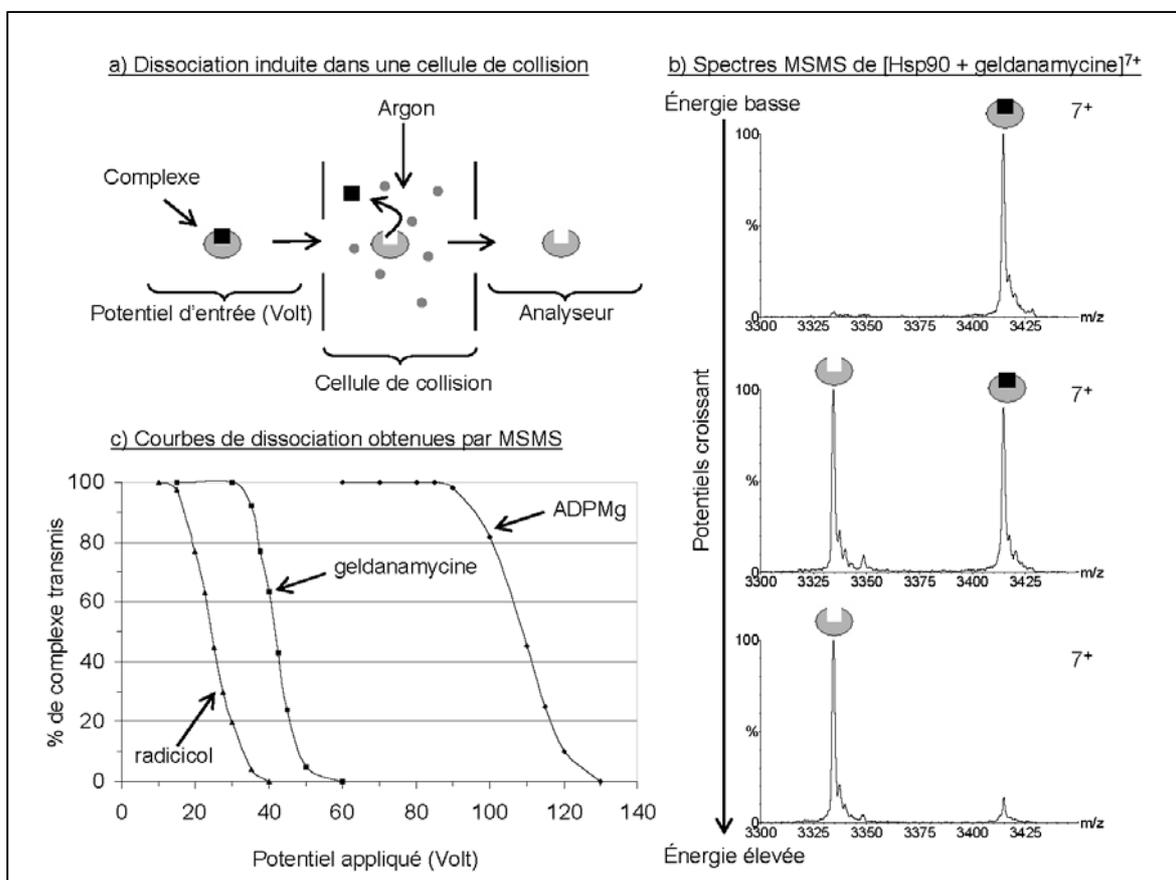
2.2.2. Selon leur stabilité en phase gazeuse

Une autre manière de classer les molécules par SM consiste à profiter du fait que les complexes sont transférés en phase gazeuse. La conformation d'une protéine en phase gazeuse peut conserver des éléments spécifiques de sa conformation en solution. Dans ce cas, la stabilité en phase gazeuse d'un complexe refléterait plutôt la contribution électrostatique des interactions spécifiques conservées [thèse Rogniaux 2000].

Nous avons ainsi exploré le comportement en phase gazeuse des complexes constitués de la protéine Hsp90 et de ces trois ligands connus à notre disposition (le radicicol, la geldanamycine et l'ADPMg). Les complexes sont pour cela isolés à l'aide d'un quadripôle. Leur fragmentation est induite dans une cellule de collision en appliquant à son entrée des potentiels de plus en plus élevés. De ces expériences, il est possible de tracer une courbe de dissociation où le pourcentage de complexe restant est reporté en fonction du potentiel appliqué. Le potentiel induisant la dissociation de 50 % du complexe sera pris comme valeur caractéristique de la stabilité en phase gazeuse (cf. Figure 8).

Figure 8 : Evaluation de la stabilité en phase gazeuse de complexes protéine-ligand. Toutes les expériences ont été réalisées à une concentration en protéine de 10 μM dans AcNH_4 50 mM sur l'appareil de type Q-TOF ($V_c = 40$ V, $P_{\text{interface}} = 5$ mbar, $P_{\text{argon}} = 14$ PSI).

a) stratégie générale de dissociation de complexes dans une cellule de collision ; b) exemple de spectres MSMS obtenus sur l'espèce $[\text{Hsp90} + \text{geldanamycine}]^{7+}$; c) courbes de dissociation obtenues par MSMS dans le cas de 3 ligands : le radicicol, la geldanamycine et l'ADPMg. Le complexe avec l'ADPMg est le plus stable en phase gazeuse contrairement à la phase condensée. Inversement, le complexe avec le radicicol est très fragile en phase gazeuse alors que son affinité en solution est très bonne.

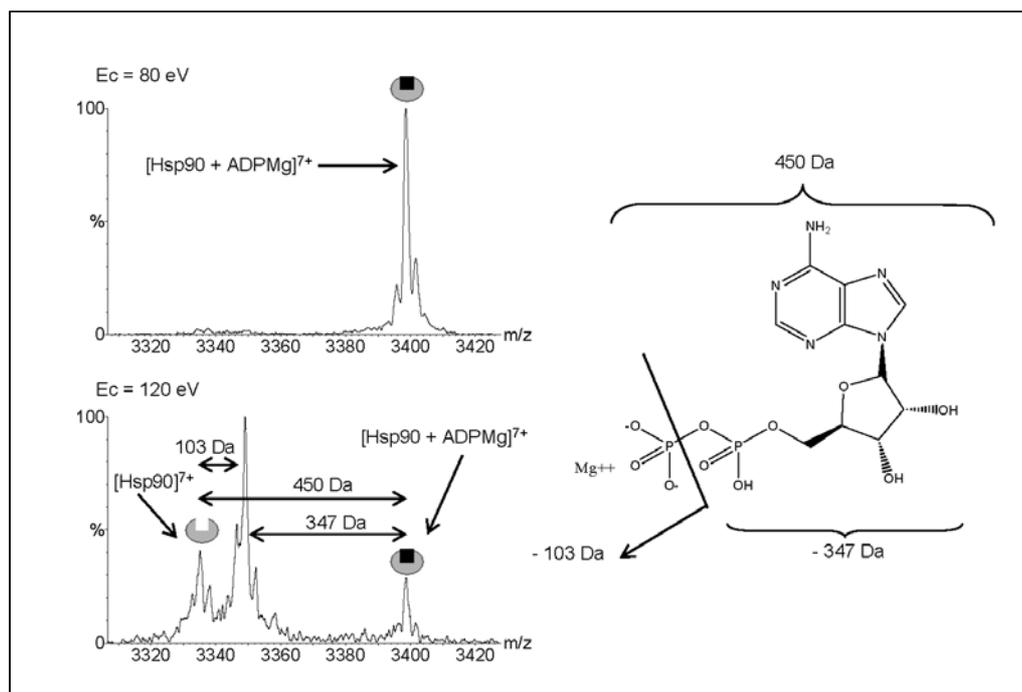


De manière intéressante, on observe que pour ces 3 molécules, la stabilité en phase gazeuse est complètement opposée à l'affinité en solution, précédemment évaluée à partir de la stœchiométrie d'interaction ou d'expériences de compétition. Pourtant, ce résultat peut s'expliquer facilement si l'on regarde les données thermodynamiques qui caractérisent l'interaction de ces 3 molécules (cf. Figure 4).

Ces données montrent dans le cas du radicicol (ligand de plus forte affinité en solution), que la force motrice en solution est essentiellement de contribution entropique. Cette contribution entropique n'existera plus en phase gazeuse et le nombre réduit d'interactions électrostatiques explique donc une relative fragilité du complexe en phase gazeuse.

Inversement, dans le cas de l'ADPMg, la force motrice en solution est essentiellement d'origine enthalpique, le complexe est par ailleurs défavorisé entropiquement. Ce type de complexe contenant beaucoup d'interactions électrostatiques sera très stable en phase gazeuse, car ce sont précisément ces interactions qui y sont renforcées. D'ailleurs, ce ligand se fixe sur la protéine par l'intermédiaire de l'ion Mg^{2+} en formant un pont salin très stable en phase gazeuse. L'ADPMg n'est dissocié de la protéine qu'après coupure d'une liaison covalente au niveau du phosphate (cf. Figure 9).

Figure 9 : Illustration de la dissociation en phase gazeuse de l'espèce $[Hsp90 + ADPMg]^{7+}$. La fragmentation du ligand au niveau du phosphate est le chemin préférentiel de dissociation.



Le cas de la geldanamycine est intermédiaire, les composantes enthalpique et entropique sont équilibrées, la dissociation en phase gazeuse de ce ligand sera donc provoquée à des potentiels intermédiaires. En résumé, le classement de ces molécules en phase gazeuse suit plutôt l'ordre donné par les valeurs d'enthalpie en solution : ADPMg (-71.5 kJ/mol) > geldanamycine (-44.9 kJ/mol) > radicicol (-22.8 kJ/mol).

La corrélation entre l'enthalpie et le potentiel de dissociation en phase gazeuse obtenue dans le cas de ces molécules suggère que la protéine Hsp90 a bien conservé en phase gazeuse des éléments spécifiques de sa structure native en solution. Dans des cas favorables comme celui-ci, il serait envisageable d'utiliser la dissociation en phase gazeuse par SM pour classer qualitativement et rapidement des inhibiteurs selon leur contribution thermodynamique (enthalpie vis-à-vis de l'entropie). Une telle approche pourrait être utile dans le cadre du développement de « leads ». Cependant, la validation de cette approche, sur un plus grand nombre de molécules, est encore nécessaire.

3. Les possibilités d'automatisation

Nous avons vu que l'intérêt de la SM réside dans la qualité des informations fournies sur une quantité réduite de molécules (de l'ordre de quelques centaines). Cependant, un point important au niveau industriel, reste l'automatisation de la technique qui doit être simple, robuste, rapide et fiable. Durant ce travail, nous avons analysé un total de 350 molécules sur les deux projets impliqués. Nous avons donc été amenés, à rencontrer les problèmes expérimentaux liés à la technique, et à évaluer la méthodologie la plus adéquate pour l'automatisation.

3.1. Mise en oeuvre expérimentale au laboratoire : difficultés rencontrées

3.1.1. Description des conditions expérimentales dans le cas de la SM supramoléculaire

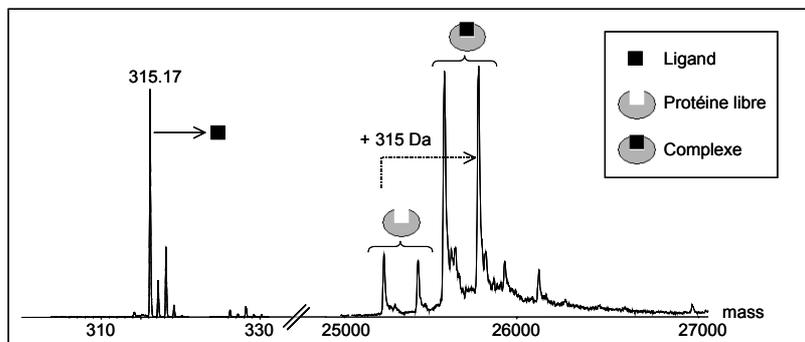
Nous avons décidé de réaliser toutes les expériences à une concentration en protéine de 10 μM et en ligand de 20 μM afin de favoriser la détection des interactions ayant un K_d inférieur à 50 μM . Les ligands sont fournis à une concentration de 10 mM dans du DMSO et stockés dans des plaques de 96 puits. Pour chaque analyse, un volume total de 60 μL de protéine est utilisé. Le ligand est préalablement dilué 10 fois dans l'éthanol puis ajouté à la protéine (+ 1.2 μL de ligand). La dilution des ligands dans l'éthanol se justifie par le fait que le DMSO entraîne une perte significative de la sensibilité ainsi que la formation d'adduits qui gêne l'interprétation des données [Thèse Sanglier **2002**]. La durée totale de l'analyse a été fixée à 15 minutes pour un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ce temps d'analyse est suffisant pour réaliser plusieurs acquisitions de spectres dans des conditions d'interface différentes. Enfin, une pression optimale de 5 mbar a été utilisée pour les deux projets et une rampe de tension de cône décroissante a été programmée sur le logiciel Mass Lynx. Après 15 minutes d'acquisition, les capillaires sont rincés à l'eau durant une période de 5 minutes. La durée totale de l'analyse est donc de 20 minutes, ce qui permet une incubation du même temps de chaque ligand avec la protéine.

L'exploitation des données est réalisée en regardant successivement les spectres enregistrés dans des conditions de plus en plus douces d'interface permettant de préserver les interactions protéine-ligand. Le spectre acquis dans les meilleures conditions de désolvatation et de transmission du complexe non-covalent est finalement choisi pour l'interprétation. Deux types de données sont ainsi accessibles : d'une part la stoechiométrie d'interaction du ligand avec la protéine et d'autre part l'homogénéité du ligand lorsque celui-ci

est ionisé par le processus électrospray (cf. Figure 10). La spécificité des « hits » positifs par SM est ensuite vérifiée par compétition.

Figure 10 : Mise en évidence simultanée de l'interaction du ligand et de son homogénéité. Expérience réalisée sur la protéine Hsp90, à une concentration de 10 μ M dans AcNH₄ 50 mM et 20 μ M ligand, sur un appareil de type LCT ($V_c = 40$ V, $P_{\text{interface}} = 5$ mbar).

NB : la protéine apparaît sous forme de doublet à cause d'une gluconoylation sur le tag histidine.



Le problème expérimental majeur rencontré concerne les contaminations de ligands d'une analyse à l'autre. En effet, il a été observé que des ligands de faible solubilité précipitent et ont tendance à colmater les capillaires et à s'agréger sur la protéine injectée lors de l'analyse suivante. De même, un ligand de très haute affinité peut quelquefois interférer avec l'analyse suivante puisqu'il a été ajouté en excès et qu'il peut rester dans la ligne de capillaires. Ces contaminations interfèrent inévitablement avec la qualité et la rapidité de l'analyse puisqu'il faut à chaque fois recommencer les expériences. Lorsque l'expérimentateur observe le problème, il peut rapidement corriger l'erreur, cependant si l'on imagine une automatisation de la technique, il faut absolument s'affranchir de ces contaminations.

3.1.2. Description du système commercialisé par la société Advion Biosciences

Il existe maintenant une solution commerciale permettant l'automatisation de la SM supramoléculaire. La société Advion commercialise un robot permettant l'automatisation d'un système nanospray. Cette technologie consiste en une plaque (chip) contenant 96 puits percés (cf. Figure 11). Le robot prélève l'échantillon à l'aide d'une pipette conductrice et dépose l'échantillon dans un puits. Au même moment, un haut voltage est appliqué sur la pipette. Ce système permet de former un spray à l'orifice du trou percé au fond du puits. Un tel système présente de multiples avantages : le premier est de changer à chaque fois tout le système d'injection (puits et pipette) évitant ainsi toute contamination (« one compound one well »), le second est de consommer très peu de matériel biologique grâce aux très faibles volumes d'échantillons requis par le système nanospray (≈ 100 nL/min), enfin, le système permet un gain en sensibilité et en temps.

Le système Advion peut être couplé à différents spectromètres de masse (Waters, Applied Biosystems, Thermofinnigan). Le robot peut contenir une plaque réfrigérée et faire les mélanges protéine-ligand lui-même. Des concentrations en sels assez élevées peuvent être utilisées sans provoquer de « bouchages » par précipitation (jusqu'à 200 mM environ). Cette technologie est donc parfaitement adaptée à l'étude des complexes non-covalents par SM et a été installée, à la fin de ce travail, chez Sanofi-Aventis.

Figure 11 : Représentation du robot « nanomate » (Advion Biosciences) ainsi que de la plaque appelée « chip » qui consiste en une plaque pourvue de puits percés. L'échantillon est déposé par une pipette conductrice qui va se plaquer contre le puits.



3.2. Investigation des approches indirectes telles que la SEC-MS (Size Exclusion Chromatography)

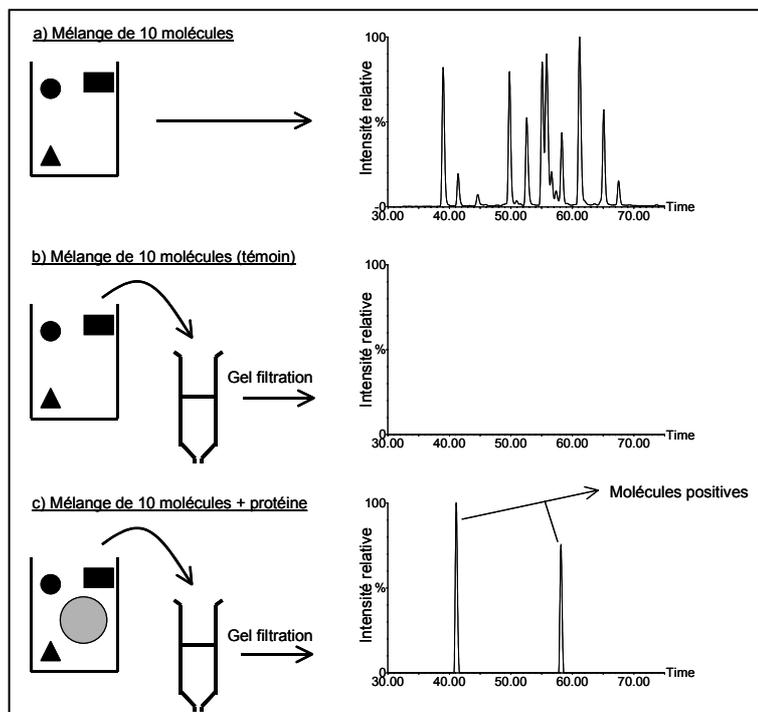
Une toute autre approche consiste à utiliser la SM comme un simple détecteur tandis que la discrimination des complexes repose sur d'autres principes (affinité, ultracentrifugation, exclusion de taille). Ces différentes approches ont déjà largement été développées et décrites dans la littérature [Geoghegan et coll. **2004**, Siegel et coll. **1998** et **2002**, Wabnitz et coll. **2002**]. Nous avons décidé d'utiliser la SEC-MS sur des séries d'échantillons déjà analysés par SM supramoléculaire, afin de comparer les résultats des deux techniques, et d'évaluer la mise au point de l'automatisation de l'analyse par SEC-MS. Pour ces expériences, plusieurs molécules sont analysées en même temps et non plus une par une.

Le principe de la SEC-MS est assez simple : le but est de séparer les molécules ayant une affinité pour la protéine d'un mélange complexe de molécules par une chromatographie d'exclusion. Les molécules de forte affinité seront éluées avec la protéine tandis que les autres seront retenues. Les molécules d'intérêt sont ensuite analysées par MS ou LC-MS dans le cas de mélanges de ligands.

En pratique, nous avons testé cette méthodologie sur un mélange de 10 ligands potentiels de Hsp90. Les ligands sont incubés avec la protéine pendant 20 minutes, puis le mélange est injecté sur une colonne de chromatographie (phase Sephadex G25 medium, Amersham Biosciences, fabrication des colonnes en interne). Les ligands élués avec la protéine sont ensuite analysés par LC-MS. Il existe un système de plaques sandwichs commercialisé (Amersham Biosciences) qui permet d'automatiser les étapes de chromatographie d'exclusion. Le reste de l'analyse par LC-MS est de manière générale facile à mettre en œuvre automatiquement. La SEC-MS est donc une technique complètement automatisable.

Sur le mélange testé (cf. Figure 12), 2 molécules positives ont été trouvées par SEC-MS, ces molécules s'étaient aussi révélées positives par SM supramoléculaire.

Figure 12 : Illustration du principe de la SEC-MS. Les ligands sont analysés par série de 10 molécules en mélange. 3 expériences sont réalisées par série : a) les molécules sont tout d'abord analysées par LC-MS ; b) le mélange est analysé après passage sur colonne pour vérifier la rétention des ligands (témoin) ; c) le mélange incubé avec la protéine est analysé après passage sur colonne, les ligands ayant traversé la colonne sont les ligands positifs.



Plusieurs points sont cependant à mentionner :

- L'analyse de plusieurs ligands en même temps peut entraîner des phénomènes de compétition : cette technique ne permet donc pas ou difficilement une analyse quantitative.
- L'analyse des ligands par électrospray n'est pas simple, certains ligands ont un rendement d'ionisation très faible, voire nul, il est donc important de multiplier les détecteurs afin d'augmenter les chances de l'analyse (ajout d'un détecteur UV par exemple). Il est important de noter que, dans le cas de la SM supramoléculaire, le rendement d'ionisation des ligands n'intervient pas puisque c'est le signal relatif à la protéine qui est la quantité mesurée. Le rendement d'ionisation de la protéine dépend généralement très peu du ligand qui est en interaction.
- L'analyse est indirecte, on ne peut pas vérifier la spécificité : des ligands peu solubles auront tendance à donner des faux positifs puisqu'ils précipitent et peuvent former des micro-cristaux qui ne seront pas complètement retenus sur la colonne de filtration sur gel. Le passage en conditions dénaturantes peut ensuite les resolubiliser.
- La séparation sur la colonne de filtration sur gel doit être rapide car l'équilibre est déplacé. Pour une même affinité, des ligands ayant des k_{off} , k_{on} différents sont susceptibles de se comporter différemment vis-à-vis de l'étape de séparation sur la colonne.

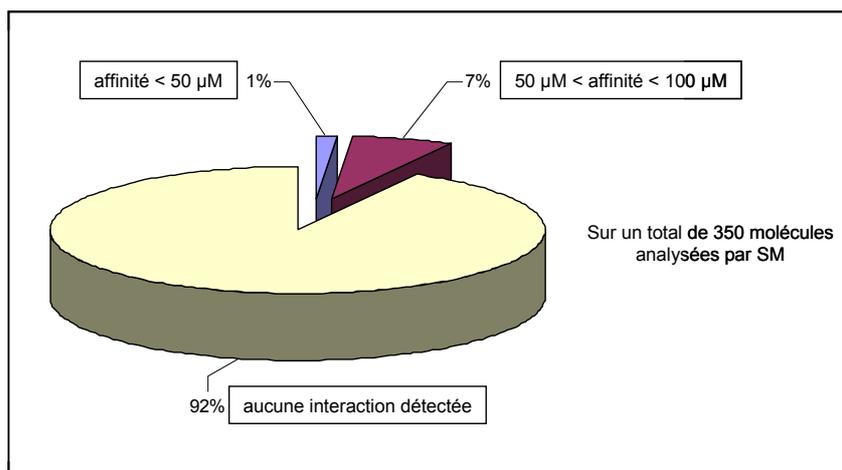
A nos yeux, la SM supramoléculaire permet de donner plus d'informations et plus de confiance sur la sélection des molécules positives que la SEC-MS. Cependant, la SEC-MS ou d'autres techniques d'analyses indirectes ne doivent pas être exclues et peuvent constituer l'unique alternative dans le cas de systèmes plus complexes où la SM supramoléculaire n'est pas applicable : citons par exemple le cas d'une protéine non homogène (glycosylations), d'une protéine peu soluble dans un tampon d'acétate d'ammonium ou enfin d'une protéine à caractère très hydrophobe.

4. Présentation des résultats

Durant ce travail, nous avons donc mis au point les conditions expérimentales et les expériences adéquates, pour sélectionner et valider les ligands spécifiques du site actif d'une enzyme. Nous avons évalué les possibilités d'automatisation et ensuite appliqué cette méthodologie sur un total de plus de 350 ligands, sur deux projets concernant les protéines Hsp90 et la protéase X. Plusieurs ligands spécifiques d'intérêt ont été sélectionnés par SM et sont maintenant utilisés dans les étapes d'optimisation de « leads ». Les résultats détaillés obtenus durant cette étude ne peuvent être exposés pour des raisons de confidentialité.

En conclusion, la SM a permis de sélectionner quelques ligands (3 ou 4) sur un total de 350 testés (cf. Figure 13). Ces ligands sont spécifiques du site actif de l'enzyme et présentent une affinité de l'ordre du micromolaire. La forte proportion de ligands ne présentant aucune interaction (92%) témoigne de la nécessité d'un criblage secondaire rapide et fiable, qui permet un gain de temps et d'argent en diminuant d'un facteur 100 le nombre de molécules pour lesquelles des études analytiques plus coûteuses seront réalisées. Dans ce contexte, la SM s'est révélée tout à fait adaptée pour répondre à ce genre de problématique.

Figure 13 : Diagramme statistique représentant l'ensemble des résultats obtenus sur les deux projets. Environ 1% des ligands testés par SM présentent une affinité d'intérêt.



Ce travail permet donc de poursuivre des études cristallographiques sur un nombre restreint de molécules présentant déjà des propriétés physiques adéquates vis-à-vis de la cible. Ainsi, de nouveaux inhibiteurs vont pouvoir être conçus de manière rationnelle. L'enjeu est d'une part d'améliorer les propriétés physico-chimiques de ces molécules et d'autre part d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques.

II. Utilisation de la SM pour le développement de nouveaux inhibiteurs : le cas de l'aldose réductase

(AR) « Cette étude a été menée en collaboration avec Alberto Podjarny (IGBMC, Illkirch) »

1. Contexte biologique

L'AR (EC 1.1.1.21) est la première enzyme de la voie des polyols, qui convertit le glucose en sorbitol en utilisant le NADPH comme co-facteur [thèse Potier **1997**, thèse Rogniaux **2000**]. Cette enzyme est impliquée dans le développement de complications liées au diabète (cataractes, neuropathies, néphropathies, etc...). En effet, chez les sujets diabétiques, l'excès de glucose dans les cellules provoque la mise en marche d'une voie métabolique secondaire d'élimination du glucose : la voie des polyols. Le sorbitol ainsi généré ne peut pas traverser la membrane plasmique cellulaire. Il s'ensuit donc une accumulation du sorbitol dans la cellule et une augmentation de la pression osmotique jusqu'à éclatement et mort de la cellule [Kinoshita et coll. **1988**, Chung et coll. **2003**].

L'AR est donc une cible dont l'inhibition permettrait de réduire les complications diabétiques [Yabe-Nishimura et coll. **1998**]. Pour l'instant, deux classes principales d'inhibiteurs sont connues : les dérivés d'acides carboxyliques et les imides cycliques. Ces deux classes d'inhibiteurs présentent des activités *in vitro* similaires alors que leurs activités *in vivo* sont largement différentes. La classe des dérivés d'acides carboxyliques avec un pKa généralement plus bas, traverse plus difficilement les membranes à pH neutre de par leur forte polarité, expliquant leur baisse d'activité *in vivo*. Le but de ce travail consiste à aider au développement de nouveaux inhibiteurs, plus spécifiques et présentant moins d'effets secondaires que ceux actuellement sur le marché, en utilisant la dissociation en phase gazeuse par SM. En combinaison avec la modélisation moléculaire à partir de structures cristallographiques, il est possible de développer de manière rationnelle de nouveaux ligands plus spécifiques et présentant une meilleure affinité. Les nouvelles molécules ainsi déduites pourront, par la suite, être analysées par SM pour en déduire leurs propriétés en solution et ainsi valider les améliorations attendues. Parallèlement, nous avons choisi d'utiliser ce modèle bien connu dans notre laboratoire pour mener des études plus fondamentales, afin d'apporter des exemples qui valident les données relatives à la phase condensée obtenues par SM.

2. Spécificité des interactions détectées

L'AR est un système protéique qui a déjà été l'objet de plusieurs études au laboratoire [thèse Potier **1996**, thèse Rogniaux **2000**]. Plusieurs exemples ont montré clairement que les conditions d'analyses par SM, établies au laboratoire, permettaient de transférer intacts, des complexes AR-inhibiteurs spécifiques de la phase condensée. Par exemple, l'interaction AR-tolréstat a été uniquement détectée par SM, en présence du co-facteur fixé sur la protéine [thèse Potier **1996**]. Il est effectivement connu que le co-facteur est requis pour la formation du site actif de la protéine, donc indispensable pour la fixation spécifique de l'inhibiteur. Néanmoins, afin de pouvoir interpréter avec confiance les données des spectres de masse, il reste nécessaire de contrôler pour chaque étude la légitimité des interactions observées dans des conditions d'analyse données. Cela a été réalisé dans ce cas de deux manières différentes :

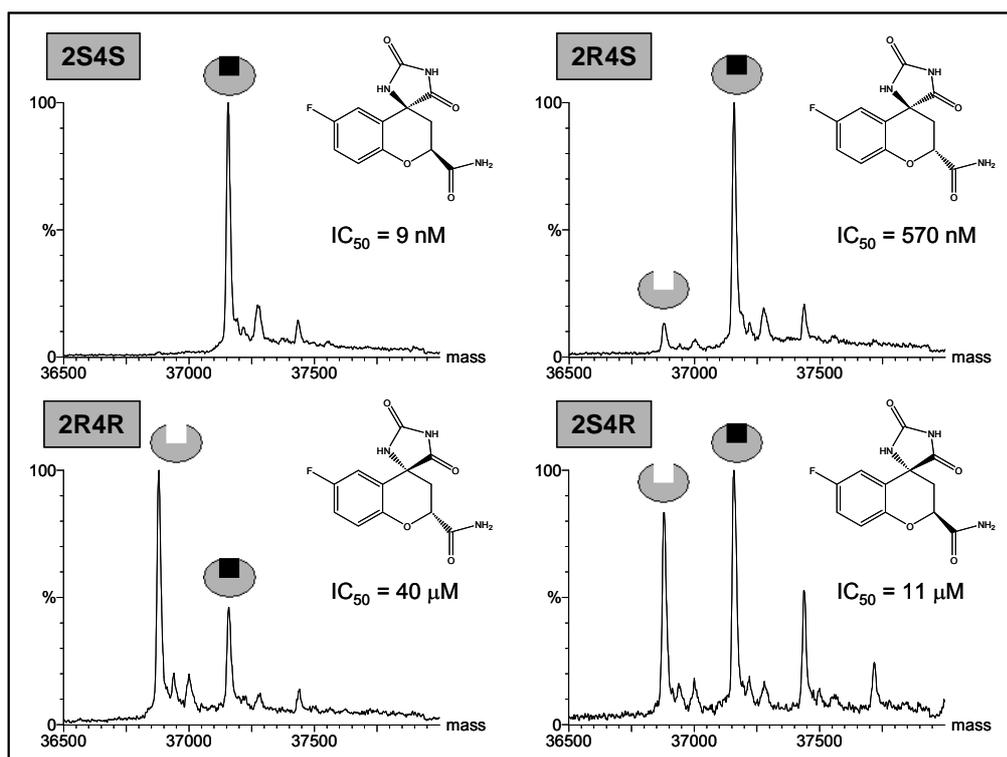
- à partir de ligands de structures proches et dont l'analyse par SM dans des conditions données, doit rendre compte des variations de la nature des interactions.
- à partir d'expériences de compétition avec un ligand spécifique.

2.1. La SM distingue des interactions stéréospécifiques en solution

Dans le cadre de cette étude, nous avons été amenés à évaluer l'interaction entre l'AR et plusieurs inhibiteurs dérivés du sorbinil, une molécule actuellement utilisée comme médicament, mais qui présente une affinité modeste. En particulier, nous avons travaillé sur des analogues du sorbinil présentant 2 carbones asymétriques. Ce type de molécule présente donc 4 isomères (énantiomère et diastéréoisomère) dont les interactions avec l'AR ont été analysées par SM, l'objectif étant de discriminer ces molécules suivant leur affinité et donc de comprendre quelle stéréochimie est la plus adéquate.

Les molécules 2R4R/2S4S et 2R4S/2S4R sont des énantiomères, ce sont donc des molécules qui possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques. Dans les mêmes conditions d'analyse par SM, la différence de stœchiométrie d'interaction observée entre ces molécules ne peut être due qu'à une différence d'affinité en solution avec la protéine cible (cf. Figure 14). Cette différence d'affinité en solution est évidemment attribuée aux interactions stéréospécifiques des ligands dans le site actif. Dans notre cas, l'isomère 2S4S présente la structure la plus favorable pour interagir avec la protéine. La comparaison de la stœchiométrie de chaque inhibiteur nous permet enfin de déduire que la conformation 4S est de la plus haute importance concernant la spécificité de l'interaction (les inhibiteurs 4R présentant les interactions les plus faibles). Ces résultats sont en parfait accord avec les valeurs d' IC_{50} déduites en solution.

Figure 14 : Spectres électrospray de l'AR à 10 μ M et à 20 μ M en inhibiteur dans AcNH₄ 50 mM obtenus sur le LCT, Vc = 40 V, P = 5 mbar.

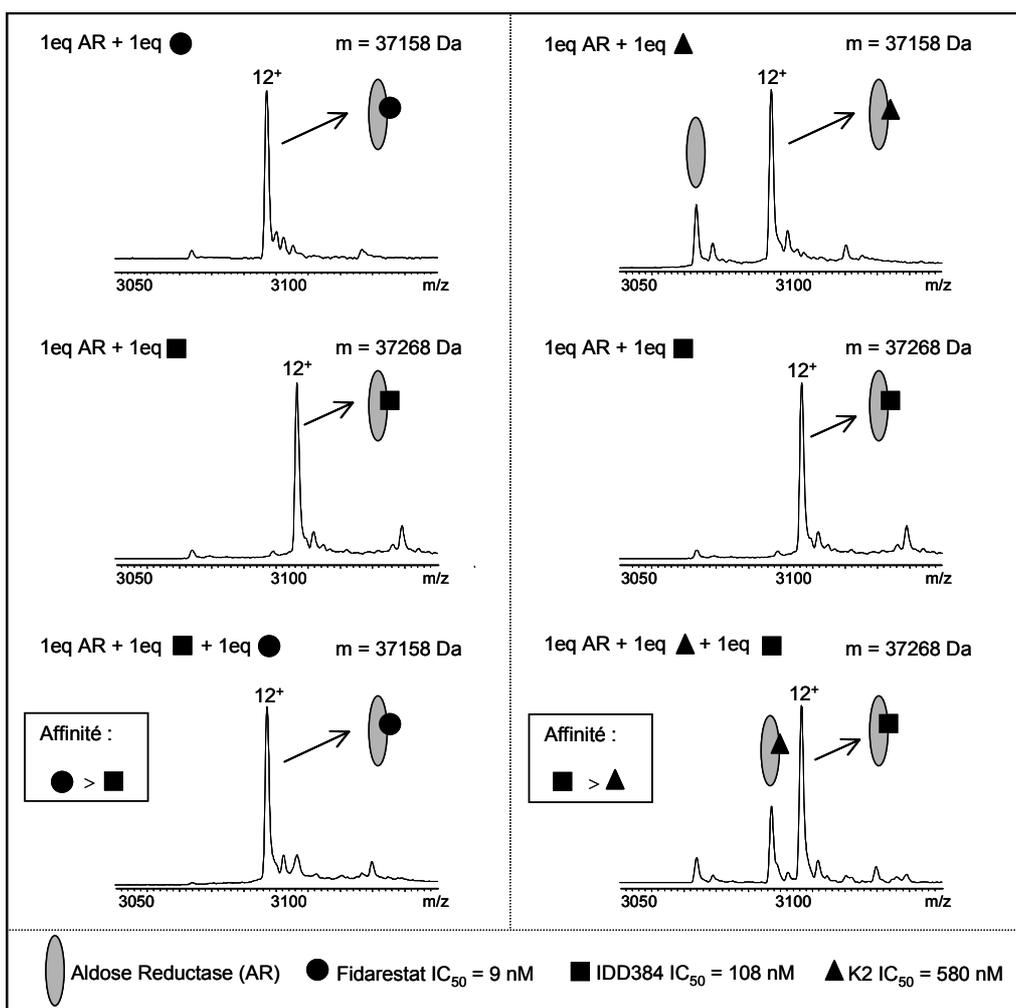


Cet exemple démontre bien que la SM rend compte du comportement en solution : les 4 ligands possèdent la même masse, ne diffèrent que par la stéréochimie d'un ou deux carbones asymétriques et pourtant donnent des spectres de masse très différents.

2.2. Déplacement de l'équilibre en solution

Comme il a déjà été mentionné dans le paragraphe précédent (cf. **CHAP I. I. 2.1.**), des expériences où l'équilibre chimique en solution est modifié et où les modifications qui en résultent sont suivies par SM, démontrent la capacité de la technique à observer des interactions en solution. Nous avons utilisé des expériences de compétition pour classer les inhibiteurs selon leur ordre d'affinité (cf. Figure 15). Les résultats obtenus par SM montrent qu'un inhibiteur en solution peut être chassé de son site par un autre inhibiteur d'affinité plus élevée. La SM a enfin permis de classer les molécules dans le même ordre de classement obtenu à partir de données d'inhibition (IC_{50}). Ce type d'expérience a tout de même pour limite de devoir disposer de molécules de masses suffisamment différentes.

Figure 15 : Spectres électrospray de l'AR à 10 μ M et 10 μ M en inhibiteur dans $AcNH_4$ 50 mM obtenus sur le microTOF, CE = 120 V, P = 3 mbar. L'équilibre d'un complexe en solution est déplacé par ajout d'un ligand de plus haute affinité : les interactions observées sont spécifiques à la phase condensée. Ces expériences permettent de classer les ligands selon leur ordre d'affinité.



Ainsi, nous avons montré à travers deux exemples que dans le cas de l'AR, les conditions d'analyse établies au laboratoire, permettent d'observer des stœchiométries d'interaction spécifiques à la phase condensée et non-modifiées par le transfert des ions en phase gazeuse.

3. Application de la CID au développement de nouvelles molécules

Afin de développer de manière rationnelle des inhibiteurs présentant une meilleure spécificité et affinité, nous avons décidé d'utiliser la dissociation en phase gazeuse des complexes afin de tenter d'obtenir des informations supplémentaires sur le type d'interactions mises en jeu [Rogniaux et coll. **2000**] et sur l'influence de différents groupements chimiques sur le squelette d'un pharmacophore.

3.1. Mesure des stabilités relatives des complexes AR-inhibiteurs en phase gazeuse : comparaison entre la dissociation dans l'interface et la cellule de collision

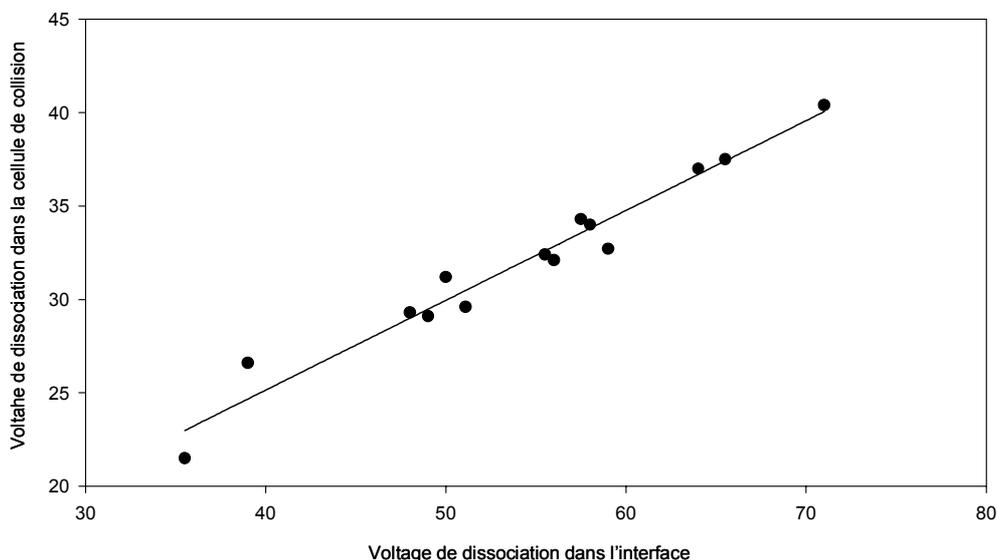
La stabilité des complexes en phase gazeuse est un critère unique que peut fournir la SM de par son mode de fonctionnement. Longtemps, le transfert des complexes en phase gazeuse a été vu comme un désavantage de la technique, car les interactions moléculaires sont modifiées lors du transfert. Cependant, nous avons vu que dans certains cas (cf. **CHAP I. I. 2.2.**), il était possible de tirer partie de ce transfert des ions lors de l'analyse. Il existe deux endroits où la dissociation des complexes par CID peut être utilisée dans le spectromètre de masse : l'interface et la cellule de collision. Sur une série d'inhibiteurs de l'AR, nous avons évalué le paramètre de dissociation en phase gazeuse dans les deux régions du spectromètre de masse (cf. Figure 16).

Un point important à noter, est la corrélation obtenue entre la stabilité des complexes obtenue à partir d'expériences dans l'interface et dans la cellule de collision. Dans l'interface, il est possible que les ions ne soient pas encore totalement désolvatés et qu'une partie de l'énergie donnée par collision avec des molécules de gaz serve précisément à la désolvatation. A l'inverse, dans la cellule de collision, les molécules de solvant sont généralement très peu nombreuses dans le cas de protéines de taille modeste. Il a cependant été démontré que pour des complexes de taille importante, des molécules de solvant pouvaient facilement rester en interaction avec la protéine jusqu'au détecteur, ce qui provoque notamment un élargissement des pics sur le spectre [Sobott et coll. **2004**].

La forte corrélation obtenue dans notre cas suggère que ces phénomènes de désolvatation dans l'interface (s'ils existent encore dans cette zone) ne perturbent pas le classement obtenu par dissociation en phase gazeuse. Ces résultats suggèrent aussi que les interactions spécifiques protéine-ligand sont dans ce cas conservées durant le transfert des ions de l'interface vers la cellule de collision du spectromètre de masse.

Figure 16 : Illustration sur une série de ligands de la stabilité en phase gazeuse de complexes AR-inhibiteur, dans l'interface et dans la cellule de collision d'un spectromètre de masse. Une forte corrélation est obtenue entre les données provenant de la stabilité dans l'interface et celles provenant de la stabilité dans la cellule de collision. Les expériences ont été réalisées sur l'appareil de type Q-TOF.

Ligand	Voltage de dissociation dans l'interface	Voltage de dissociation dans la cellule de collision
HD04	48.0	29.3
HD03	39.0	26.6
Sorbinil	35.5	21.5
Fidarestat	56.0	32.1
K2	59.0	32.7
Minalrestat	49.0	29.1
Statil	50.0	31.2
Tolrestat	55.5	32.4
594	57.5	34.3
393	65.5	37.5
552	64.0	37.0
676	58.0	34.0
LCB3071	51.1	29.6
IDD384	71.0	40.4



Par ailleurs, la présence de molécules d'eau en interaction avec la protéine, dans le cas de l'AR comme dans le cas de nombreuses protéines, n'a pas été observée. Ce point est assez surprenant car de nombreuses molécules d'eau structurales sont généralement observées par RMN ou DRX, ces molécules d'eau sont susceptibles d'être observées par SM. Quelques arguments permettraient néanmoins d'expliquer leur absence sur un spectre de masse.

Les molécules d'eau présentent peu d'interactions avec la protéine et sont donc facilement dissociées. Leur dissociation est d'ailleurs recherchée afin d'obtenir un spectre avec un bon rapport signal/bruit car leur spécificité n'est peut-être pas suffisante pour observer uniquement l'interaction d'un nombre précis de molécules d'eau. En général, dans des conditions très faibles en énergie, la largeur des pics augmente jusqu'à l'obtention d'un signal trop dispersé et nul. Cette dispersion du signal doit sûrement être due à la fixation aléatoire de molécules de solvant. Cependant, le groupe de Robinson a occasionnellement réussi à mettre en

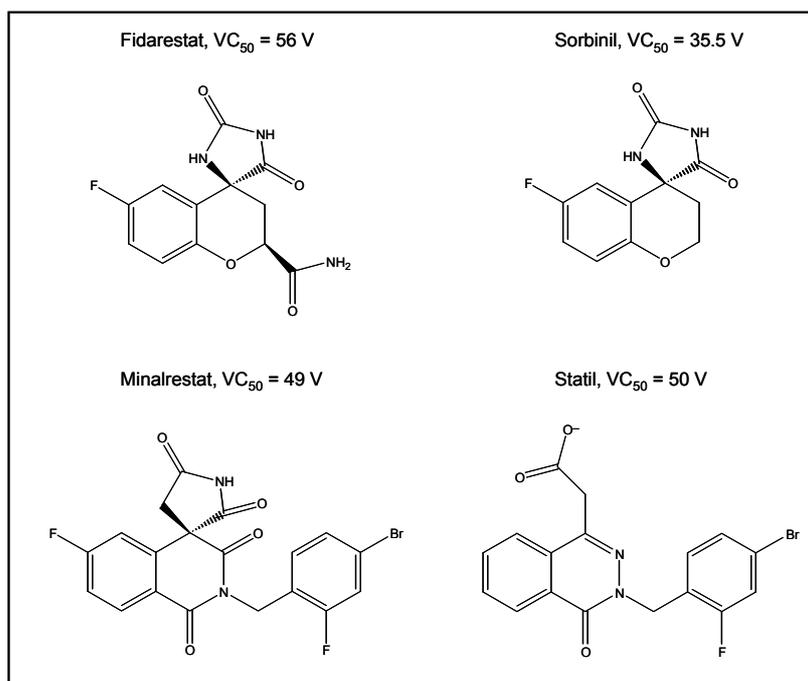
évidence par SM, l'interaction spécifique de molécules d'eau sur un complexe protéine-ligand [Chung et coll. 1998].

3.2. Influence de différents groupements chimiques sur la dissociation en phase gazeuse

La comparaison des énergies de dissociation en phase gazeuse peut se révéler intéressante afin d'évaluer l'influence de différents groupements chimiques ajoutés sur le « corps » d'un pharmacophore (cf. Figure 17). Ainsi, il est possible d'émettre des hypothèses sur l'influence des interactions fournies par les différents groupements chimiques.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce cadre a fait l'objet d'une publication dans *Biorganic & Medicinal Chemistry* : « Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modelling and noncovalent mass spectrometry ».

Figure 17 : Illustration représentant différents ligands de structure proche et leurs valeurs de VC_{50} déduites d'expériences de dissociation en phase gazeuse par SM.

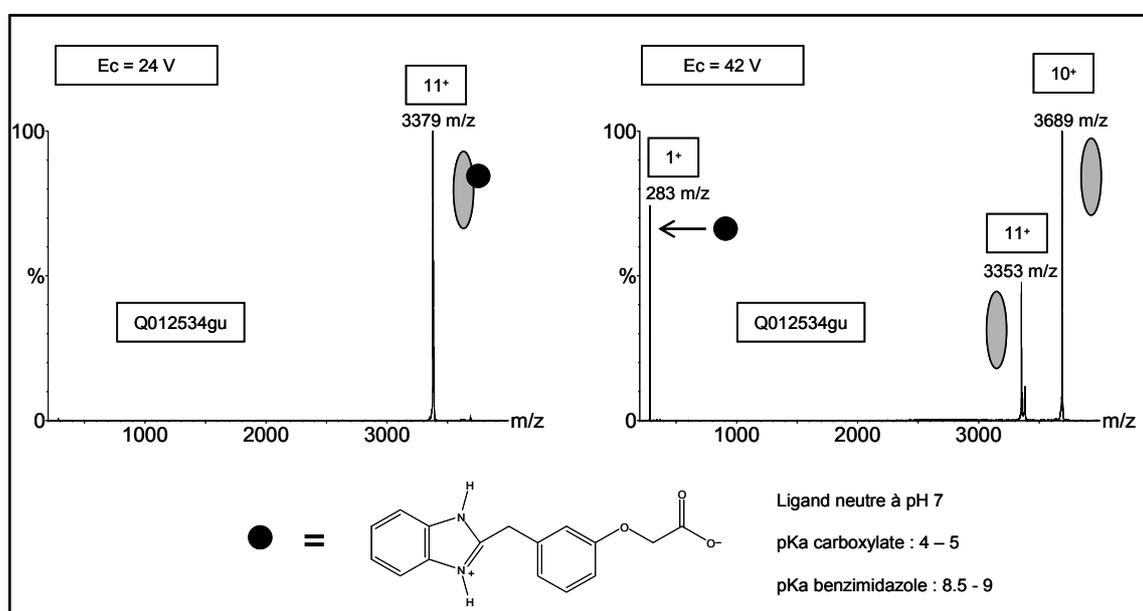


La combinaison des données de cristallographie, de SM et d'inhibition a permis de déduire que l'interaction supplémentaire du groupement amide du fidarestat par rapport au sorbinil, est responsable d'une amélioration de la stabilité du complexe en phase gazeuse et en solution (interaction électrostatique orientée supplémentaire). De manière analogue, les valeurs identiques de VC_{50} obtenues dans le cas du minalrestat et du statil, reflètent la conservation des interactions entre la boucle C-terminale de la protéine et les groupements imide et carboxylate des deux ligands. Ces informations structurales ont permis de déduire de nouvelles structures de ligands susceptibles de présenter de meilleures affinité et spécificité en solution. La suite du travail consistera à évaluer le potentiel de ces nouveaux inhibiteurs par SM à partir des méthodes décrites précédemment et notamment par compétition avec le fidarestat.

3.3. La SM en tandem peut elle fournir des informations supplémentaires ?

La SM en tandem permet de sélectionner une espèce chargée unique, dans le but de la faire réagir dans une cellule de collision par activation avec des molécules de gaz. D'un point de vue plus fondamental, la répartition des charges après la dissociation d'un complexe peut, dans certains cas, s'avérer intéressante. Souvent, dans le cas de complexes protéine-ligand, la protéine porte l'ensemble des charges et le ligand est neutre. Dans certains cas cependant, le ligand en interaction avec la protéine peut être chargé, la charge du ligand pourra être détectée en regardant la répartition des états de charge des espèces dissociées (cf. Figure 18). La différence entre l'état de charge du ligand, en solution et en interaction avec la protéine, peut fournir une information supplémentaire sur la nature des interactions protéine-ligand.

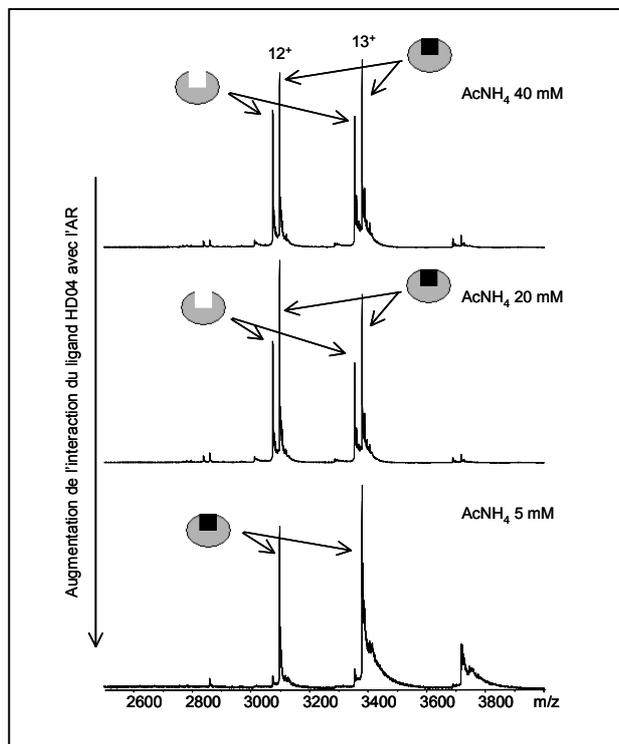
Figure 18 : Expérience de dissociation en phase gazeuse en tandem de l'espèce $[AR + HD04]^{11+}$ réalisée sur l'appareil de type Q-TOF. Pour un potentiel appliqué de 42 V dans la cellule de collision, on observe une dissociation du ligand sous deux formes : une forme chargée et une forme neutre. A pH 7, le ligand est neutre, ce qui suggère que le site actif de la protéine provoque la protonation du ligand.



Le ligand HD04 est un exemple de molécule qui se dissocie de manière non-homogène. Une fraction de ce ligand est dissociée en étant chargée une fois, tandis qu'une autre fraction est dissociée en restant neutre. Ces expériences suggèrent que ce ligand, qui est neutre à pH 7 en solution, doit se charger dans le site actif de la protéine, par interaction de la fonction carboxylate du ligand avec un acide aminé de la protéine. Par ailleurs, il a été observé que ce ligand entrait en compétition avec les ions acétate présents dans le tampon (cf. Figure 19). Les stœchiométries d'interaction observées pour HD04 sont en effet dépendantes des concentrations en tampon.

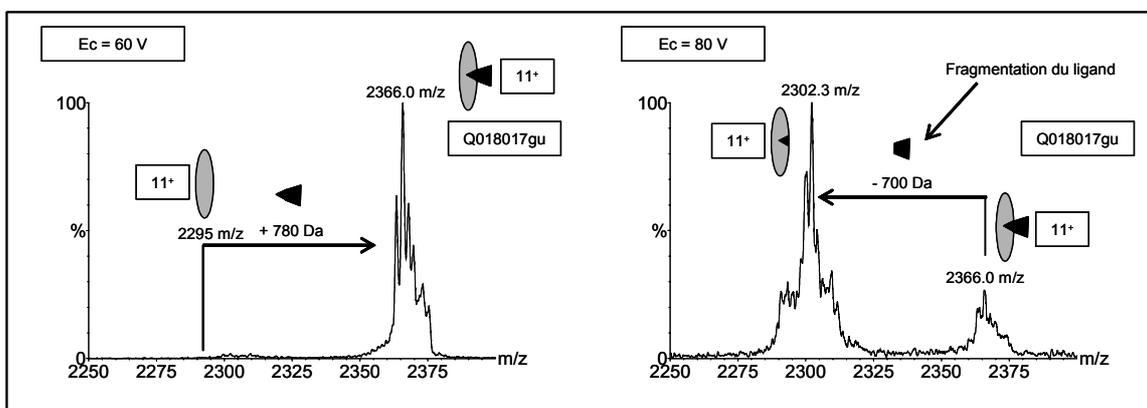
Ces résultats laissent supposer que la fonction carboxylate de ce ligand joue un rôle majeur dans l'interaction avec la protéine et, plus précisément, la fonction carboxylate du ligand doit réaliser une liaison hydrogène avec un acide aminé de la protéine donneur de proton. Cette interaction est cependant déplacée par de fortes concentrations en ions acétate présents dans le tampon.

Figure 19 : Mise en évidence de l'interaction du ligand HD04 avec l'AR en fonction de la concentration en AcNH_4 . Les expériences ont été réalisées pour une concentration en protéine de $10 \mu\text{M}$ et en ligand de $20 \mu\text{M}$. En diminuant la concentration en AcNH_4 , on observe le passage d'une interaction partielle à une interaction quantitative. Ce ligand doit entrer en compétition avec les ions acétate du tampon.



Enfin, dans certains cas, la stabilité des complexes en phase gazeuse ne peut être précisément déterminée, car la dissociation en phase gazeuse d'un complexe protéine-ligand peut provoquer la rupture d'une liaison covalente. Un tel effet suggère que ce ligand établit un pont salin avec la protéine plus stable en phase gazeuse qu'une liaison covalente. La seule manière de dissocier le ligand est donc de casser une interaction covalente forte en apportant beaucoup d'énergie au complexe dans la cellule de collision (cf. Figure 20). Ce résultat est analogue à celui obtenu dans le cas de Hsp90 et du ligand ADPMg (cf. **CHAP I. I. 2.2.**).

Figure 20 : Illustration de la dissociation en phase gazeuse d'un ligand de la protéine Grb2. Ces expériences ont été réalisées sur l'appareil de type Q-TOF à une concentration en protéine de $3 \mu\text{M}$ dans AcNH_4 50 mM en présence de $6 \mu\text{M}$ d'un ligand. La dissociation du ligand est provoquée par rupture d'une liaison covalente au niveau d'un groupement phosphate appartenant au ligand ($\Delta m = 80 \text{ Da}$).



PUBLICATION

**« Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with
molecular modelling and noncovalent mass spectrometry »**

Darmanin, C.; Chevreux, G.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Hazemann, I.; Podjarny, A.; El-Kabbani, O.

Bioorg Med Chem. **2004**, 12, 3797-806.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Connie Darmanin, **Guillaume Chevreux**, Noelle Potier, Alain Van Dorsselaer, Isabelle Hazemann, Alberto Podjarny and Ossama El-Kabbani

Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modelling and noncovalent mass spectrometry.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 3797-3806 (2004)

Pages 3797-3806 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.05.014>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

III. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exploré le potentiel de la SM pour caractériser des interactions protéine-ligand.

Nous avons évalué l'affinité, relative ou absolue dans certains cas, de ligands de protéines cibles et mis au point un protocole pour valider la spécificité des interactions détectées. Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour valider des « hits » sur Hsp90 et une protéase X. Sur l'ensemble des 350 molécules testées, quelques molécules d'intérêt (3 ou 4) ont été sélectionnées pour la poursuite d'études plus approfondies (notamment par cristallographie) et donc plus coûteuses en temps et en argent. Ainsi, nous avons mis en évidence, l'intérêt capital de la SM dans le cadre d'un criblage secondaire de molécules. Cette technique a par la suite été développée et automatisée au sein de Sanofi-Aventis.

Dans les cas de Hsp90 et de l'AR, nous avons mis en évidence la possibilité d'évaluer le type d'interactions impliquées dans un complexe (électrostatique ou hydrophobe) à partir d'expériences de dissociation en phase gazeuse. Ce principe a été utilisé pour développer de nouveaux inhibiteurs plus spécifiques de l'AR.

Enfin, de manière plus fondamentale, nous avons abordé certains aspects de la spécificité des espèces détectées par SM (observation d'interactions stéréospécifiques, compétition en solution). Nous avons aussi montré que des informations supplémentaires étaient accessibles à partir d'expériences de dissociation en phase gazeuse de complexes (mise en évidence de ponts salins, de l'état de charge d'un ligand au sein du site actif d'une protéine).

CHAPITRE II

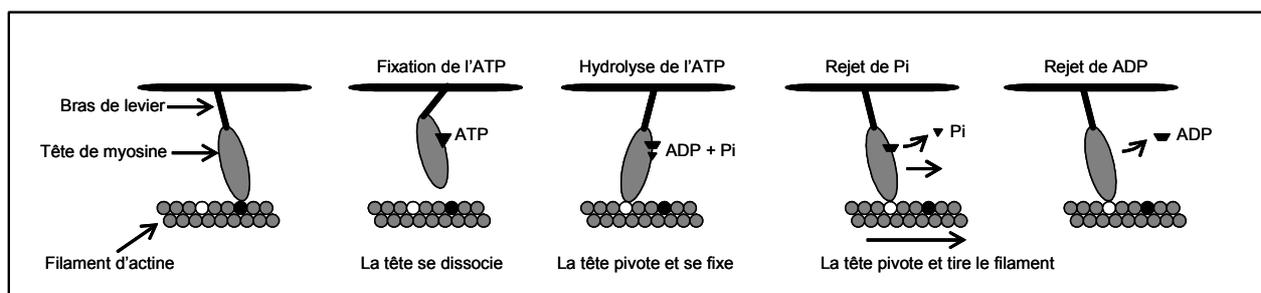
Etude de mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires

I. La myosine VI est un moteur moléculaire dit non-conventionnel « Cette étude a été menée en collaboration avec Anne Houdusse et Amel Bahloul (Institut Curie, Paris) »

1. Contexte biologique

Les myosines sont des moteurs protéiques qui assurent la fonction de motilité en convertissant l'énergie chimique d'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique pour se déplacer le long des filaments d'actine du cytosquelette [Baker et coll. 1998, Mermall et coll. 1998]. Les myosines sont impliquées dans plusieurs processus biologiques importants tels que la motilité cellulaire, la cytokynèse, l'endocytose et la contraction musculaire [Mooseker et Cheney 1995].

Figure 1 : Illustration du mécanisme de mouvement d'une myosine le long d'un filament d'actine. La fixation de l'ATP sur le domaine moteur de la myosine induit son détachement du filament d'actine, puis l'énergie chimique de l'hydrolyse de l'ATP (en ADP + Pi) est transformée en énergie mécanique par rotation de la tête de la myosine.

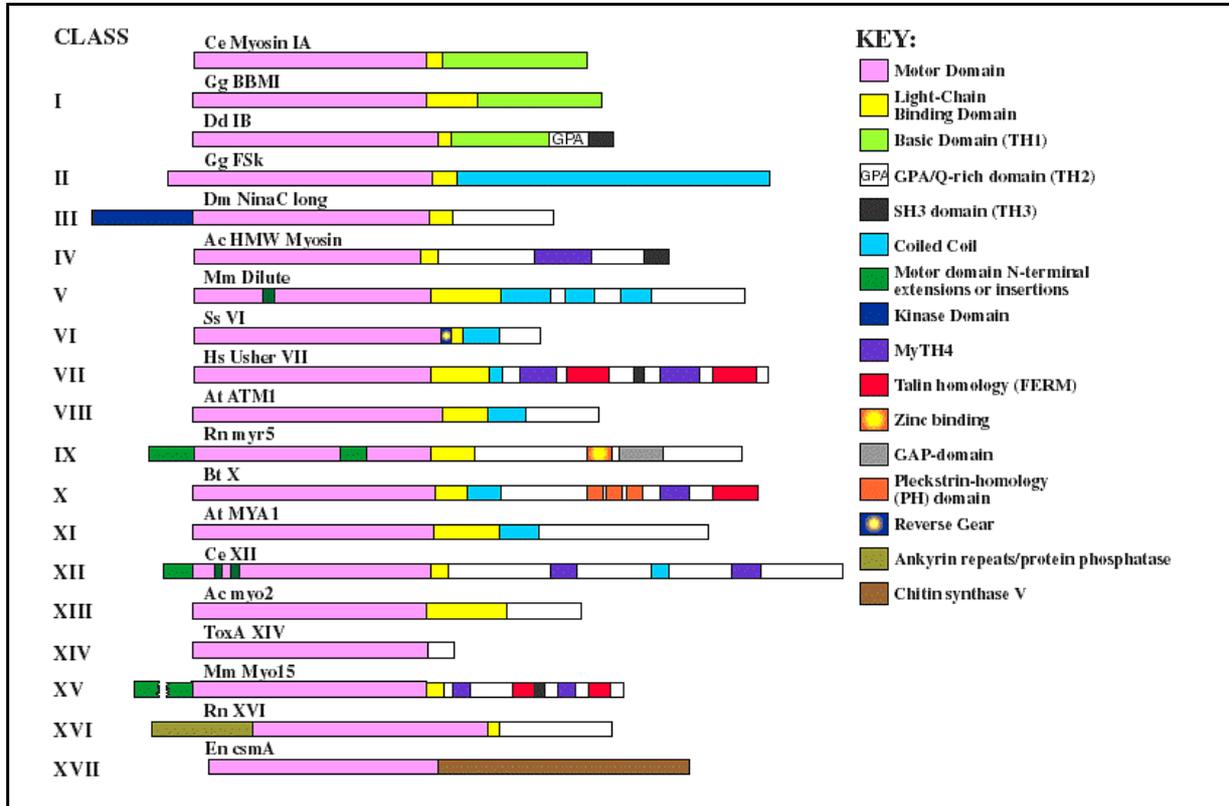


La superfamille des myosines comprend 18 classes de moteurs moléculaires présentant une forte homologie de séquence en acides aminés (cf. Figure 2). Ces protéines sont composées de domaines distincts tels que le domaine moteur, le convertisseur, le bras de levier etc... qui jouent un rôle central dans la motilité. Il a notamment été démontré que des changements conformationnels du domaine moteur, liés à l'hydrolyse de l'ATP, se trouvent amplifiés par la rotation du sous-domaine appelé convertisseur, changeant ainsi l'orientation du bras de levier de la tête de myosine.

Pour les myosines II et V, la taille des pas engendrés sur le filament d'actine est proportionnelle à la longueur du bras de levier [Purcell et coll. 2002, Sakamoto et coll. 2003, Ruff et coll. 2001]. Le bras de levier est

lui-même constitué d'un nombre variable de motifs « IQ » (avec une séquence consensus conservée IQXXRGXXXR) [Houdusse et coll. **1996**], qui fixent spécifiquement la calmoduline, une protéine Ca^{2+} -dépendante.

Figure 2 : Illustration représentant la structure et l'homologie des différentes classes de myosines. D'après « The Myosin Home Page » : <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html>



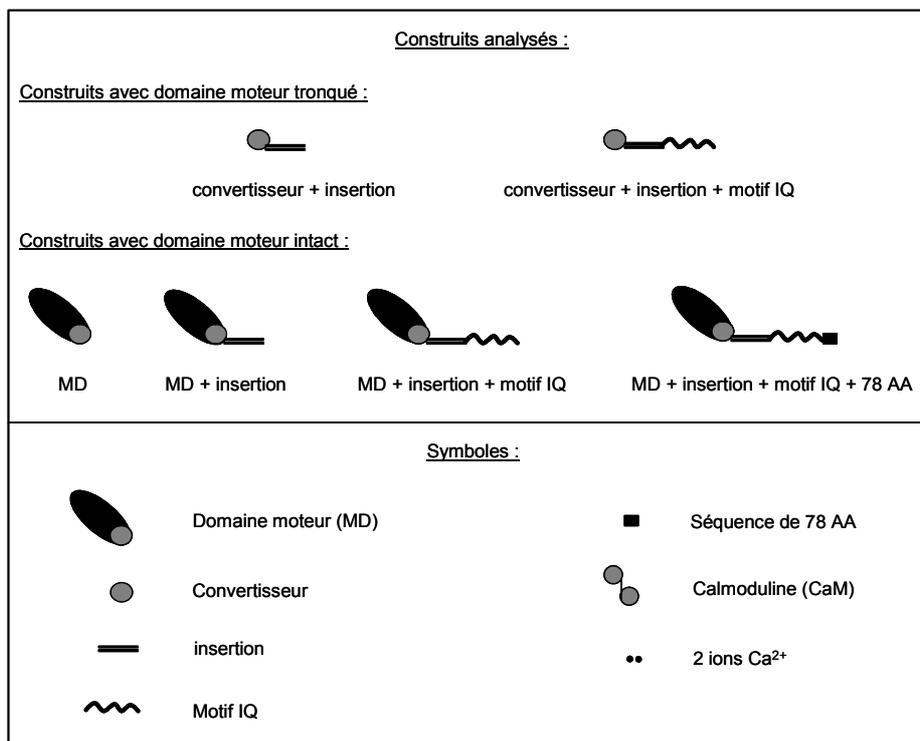
Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la myosine VI, une myosine dite « non conventionnelle ». A l'opposé des autres myosines, celle-ci se déplace, d'une part, dans le sens (-) des filaments d'actine [Wells et coll. 1999], et d'autre part, avec une taille de pas beaucoup plus importante que ce qui serait attendu d'après la théorie du bras de levier [Rock et coll. **2001**]. En effet, la myosine VI ne contient qu'un motif IQ et est susceptible de ne recruter qu'une seule calmoduline, en conséquence, son bras de levier est supposé être très petit. Par ailleurs, cette myosine contient une séquence unique et inconnue entre le motif IQ et le domaine moteur (insertion ou « reverse gear » cf. Figure 2), qui pourrait jouer un rôle déterminant dans sa directionnalité, elle aussi unique [Wells et coll. **1999**].

Afin de mieux comprendre le mécanisme de motilité de la myosine VI et répondre aux questions concernant la directionnalité et la grande taille de ses pas, il a fallu caractériser finement la structure quaternaire de cette protéine et notamment mieux comprendre le rôle de ses partenaires.

Pour cela, plusieurs construits de myosine VI, tronqués à des endroits ciblés, ont été produits et purifiés dans des conditions non-dénaturantes (cf. Figure 3). Plus précisément, les myosines sont constituées de différents domaines homologues bien définis et aux fonctions souvent connues de manière générale. Les construits ont donc été tronqués de manière à séparer ces différents domaines afin d'évaluer plus précisément leurs rôles : en particulier, il était intéressant d'isoler la séquence inconnue de la myosine VI.

Les complexes obtenus ont ensuite été analysés par SM. Disposer de ces différents construits nous a permis, de déterminer directement, l'influence de chaque séquence tronquée sur la nature des interactions qu'établit la myosine avec la calmoduline (motif IQ, insertion, séquence additionnelle, domaine moteur). Nous avons commencé l'étude avec des construits de bas poids moléculaires qui étaient donc plus facile à analyser, mais qui présentaient l'inconvénient de représenter un modèle imparfait de la myosine VI. Nous avons ensuite travaillé sur des complexes de plus hauts poids moléculaires et donc plus représentatifs de la myosine VI physiologique.

Figure 3 : Illustration des différents construits produits et ensuite analysés par SM.



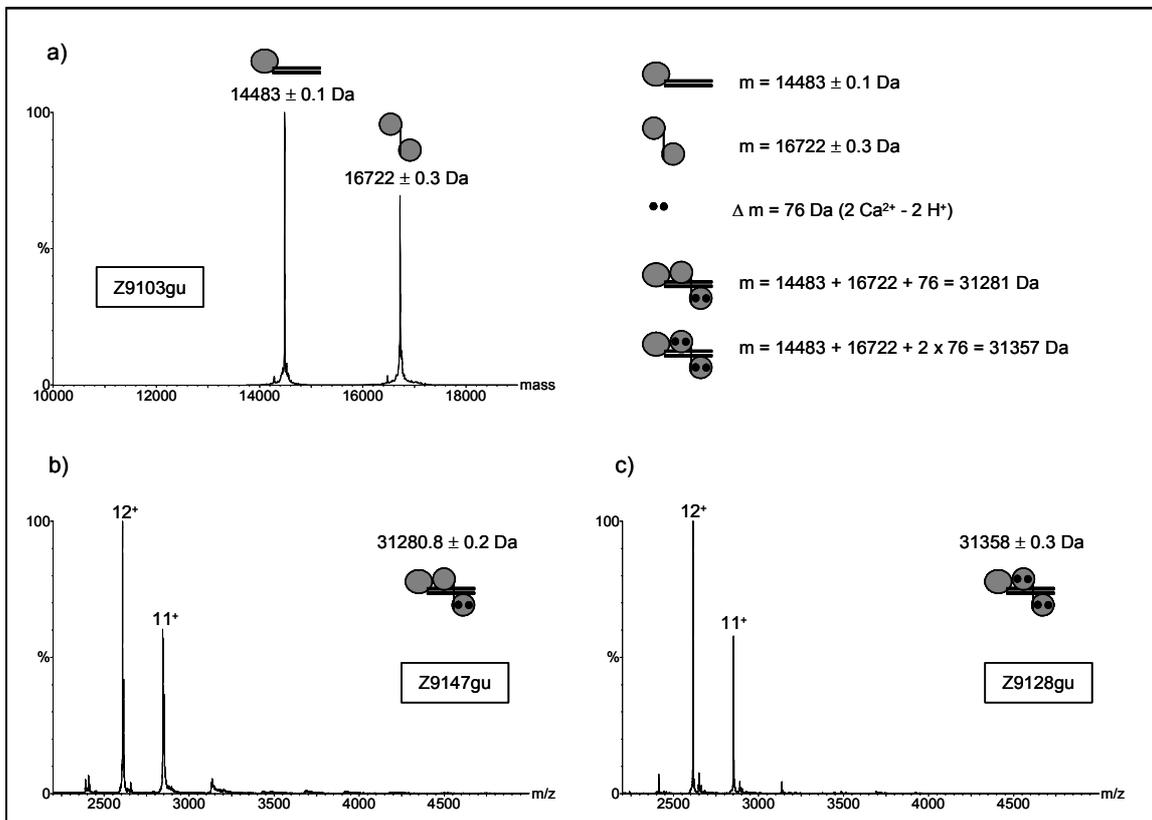
2. Mesure des stœchiométries de chaque construit

Pour déterminer la stœchiométrie de chaque construit, nous avons successivement réalisé une analyse en condition dénaturante (espèces dissociée) et une analyse en condition non dénaturante (espèces associées). Les différences de masses déduites dans ces deux conditions ont permis de déduire les espèces en interaction.

2.1. Analyse des construits de bas poids moléculaires avec un domaine moteur tronqué

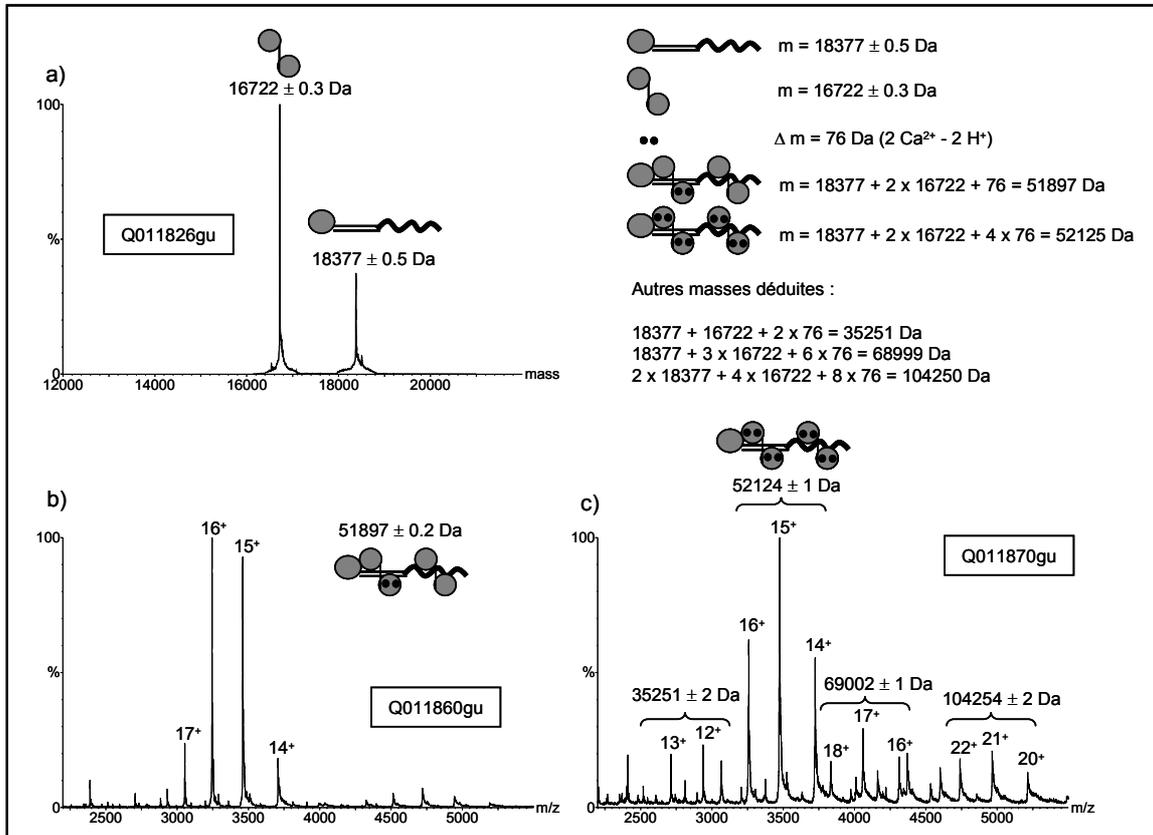
2.1.1. Analyse du construit « convertisseur + insertion »

Figure 4 : Illustration des stœchiométries obtenues par SM sur le construit « convertisseur + insertion » sur l'appareil de type LCT, a) spectre en échelle de masse obtenu en condition dénaturante ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}^+$), b) spectre en échelle m/z obtenu directement après dessalage dans AcNH_4 50mM, c) spectre en échelle m/z obtenu après dessalage dans AcNH_4 50mM et ajout de $100 \mu\text{M}$ en Ca^{2+} .



2.1.2. Analyse du construit « convertisseur + insertion + motif IQ »

Figure 5 : Illustration des stœchiométries obtenues par SM sur le construit « convertisseur + insertion + motif IQ » sur l'appareil de type Q-TOF, a) spectre en échelle de masse obtenu en condition dénaturante ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}^+$), b) spectre en échelle m/z obtenu directement après dessalage dans AcNH_4 50mM, c) spectre en échelle m/z obtenu après dessalage dans AcNH_4 50mM et ajout de $100 \mu\text{M}$ en Ca^{2+} .



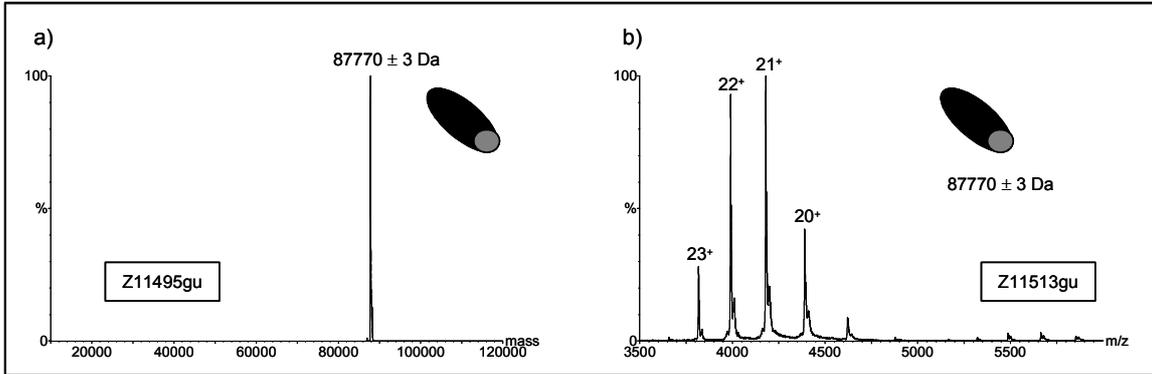
L'analyse des construits de bas poids moléculaires avec un domaine moteur tronqué (cf. Figure 4 et 5) a permis de mettre en évidence l'interaction d'une nouvelle calmoduline sur la séquence « insérée » de la myosine VI qui jusqu'à maintenant avait une fonction inconnue. Cette calmoduline retient au moins 2 Ca^{2+} après purification dans un tampon sans ajout de Ca^{2+} et peut être facilement saturée lorsque ces ions sont ajoutés en excès. Conformément à ce qui est décrit dans la littérature, nous avons aussi observé l'interaction d'une calmoduline sur le motif IQ du construit de myosine VI (cf. Figure 5b). Cependant, des phénomènes de multimérisation en présence d'ions Ca^{2+} ont également été observés sur ce construit (cf. Figure 5c).

Ainsi, l'information de stœchiométrie fournie par SM a, dans une première partie, apportée des éléments importants sur les partenaires impliqués dans le mécanisme de motilité de la myosine VI. Nous avons ensuite poursuivi ces études sur des complexes plus proches des conditions physiologiques, c'est-à-dire possédant un domaine moteur non tronqué. Ces construits nous ont permis d'aborder la problématique en limitant des résultats artefactuels liés à des modèles trop simples. Cependant, cette approche nécessite de travailler sur des construits de plus hauts poids moléculaires, et donc plus difficile à analyser.

2.2. Analyse des construits de hauts poids moléculaires avec un domaine moteur non tronqué

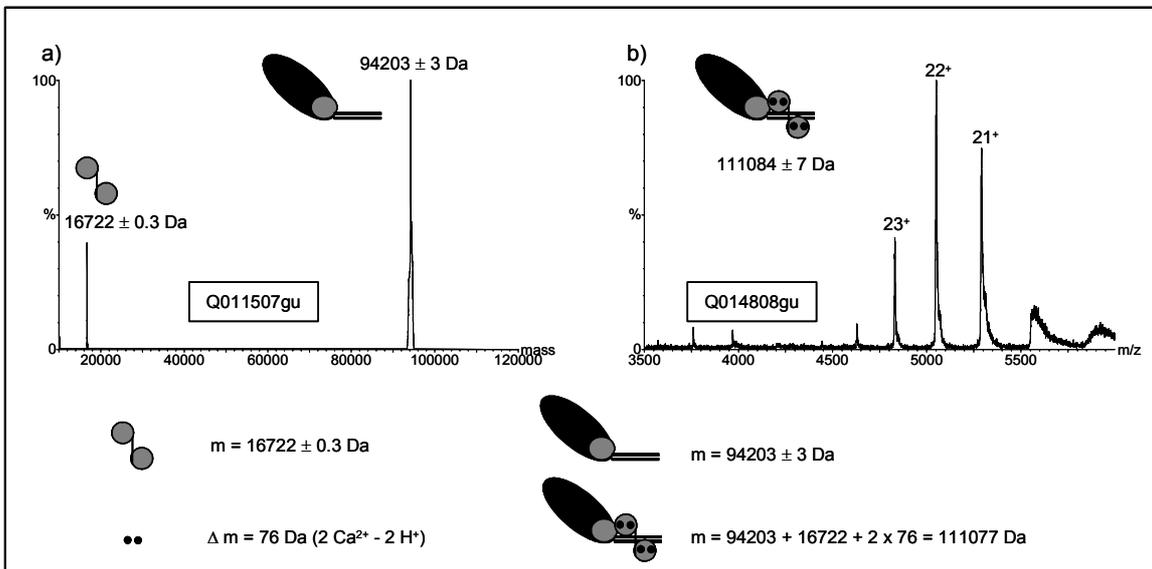
2.2.1. Analyse du construit « MD »

Figure 6 : Illustration des stœchiométries obtenues par SM sur le construit « MD » sur l'appareil de type LCT, a) spectre en échelle de masse obtenu en condition dénaturante ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}^+$), b) spectre en échelle m/z obtenu directement après dessalage dans AcNH_4 50mM.



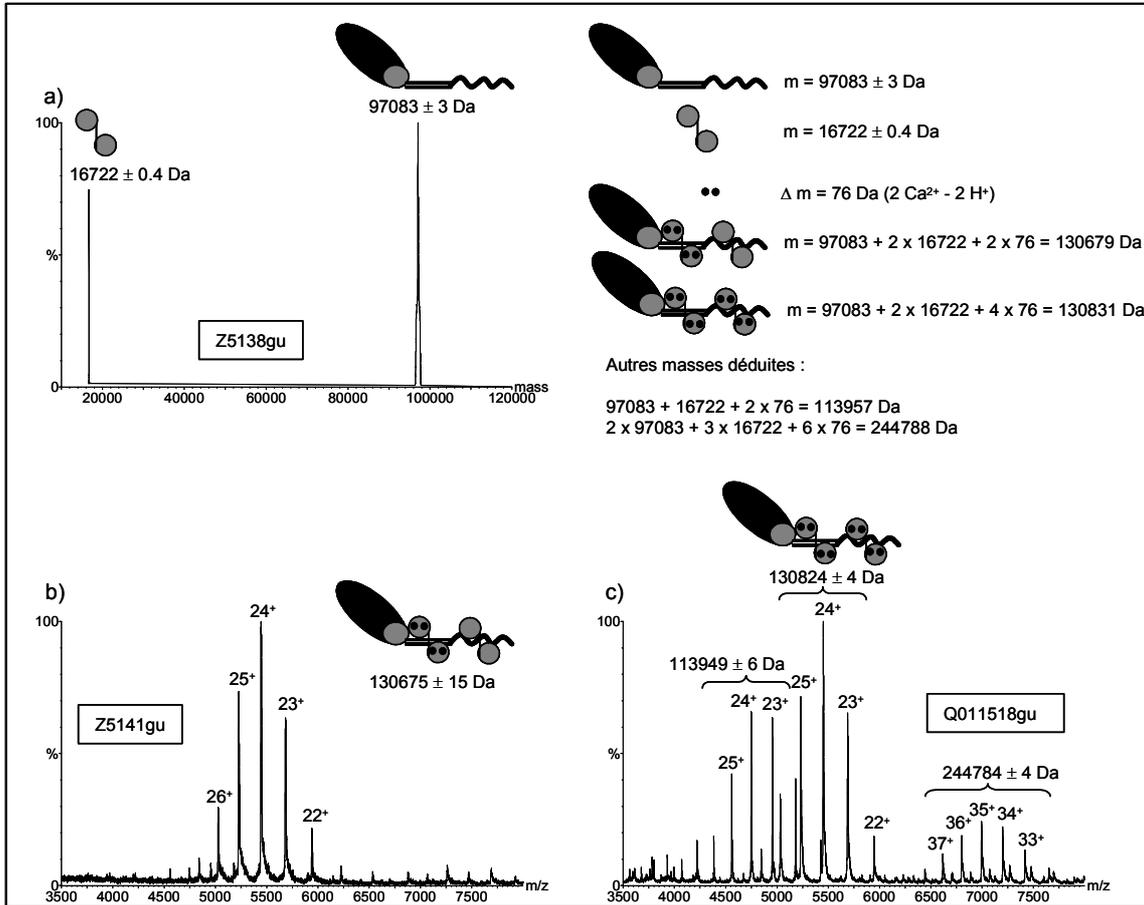
2.2.2. Analyse du construit « MD + insertion »

Figure 7 : Illustration des stœchiométries obtenues par SM sur le construit « MD + insertion » sur l'appareil de type Q-TOF, a) spectre en échelle de masse obtenu en condition dénaturante ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}^+$), b) spectre en échelle m/z obtenu directement après dessalage dans AcNH_4 50mM.



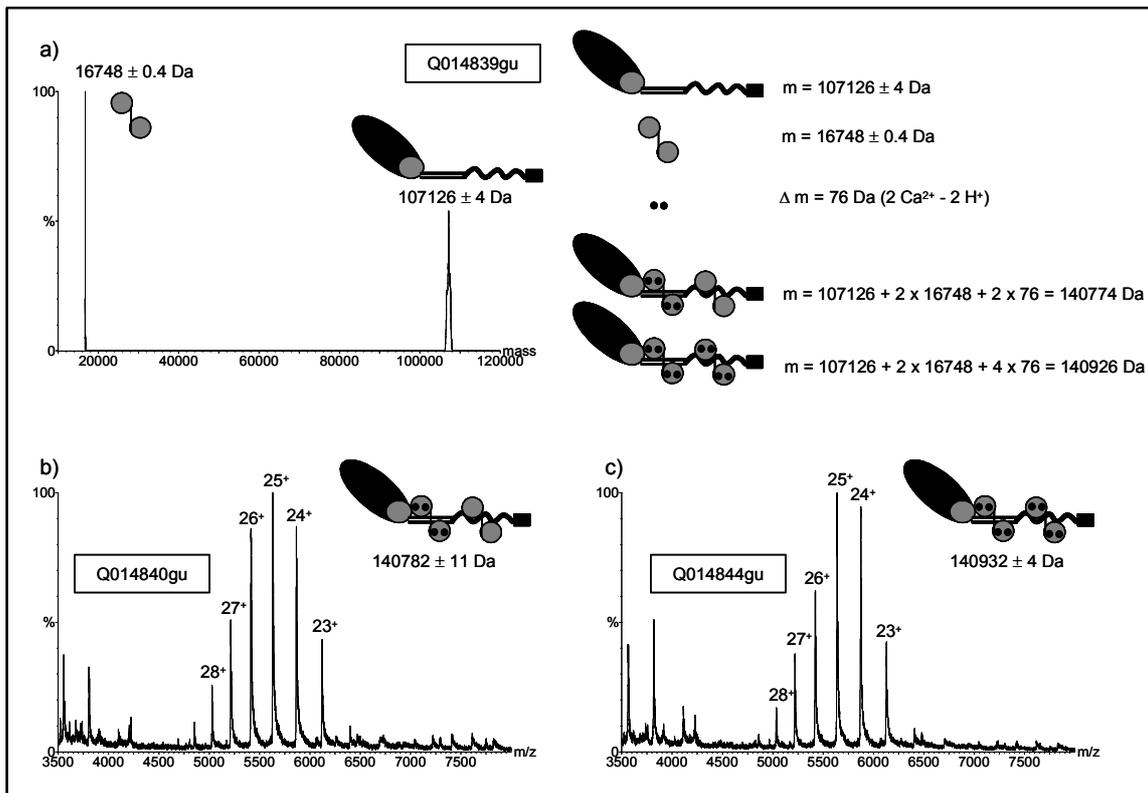
2.2.3. Analyse du construit « MD + insertion + motif IQ »

Figure 8 : Illustration des stœchiométries obtenues par SM sur le construit « MD + insertion + motif IQ » sur l'appareil de type Q-TOF, a) spectre en échelle de masse obtenu en condition dénaturante ($H_2O/CH_3CN/H^+$), b) spectre en échelle m/z obtenu directement après dessalage dans $AcNH_4$ 50mM, c) spectre en échelle m/z obtenu après dessalage dans $AcNH_4$ 50mM et ajout de $100 \mu M$ en Ca^{2+} .



2.2.4. Analyse du construit « MD + insertion + motif IQ + 78 AA »

Figure 9 : Illustration des stœchiométries obtenues par SM sur le construit « convertisseur + insertion + motif IQ + 78 AA » sur l'appareil de type Q-TOF, a) spectre en échelle de masse obtenu en condition dénaturante ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}^+$), b) spectre en échelle m/z obtenu directement après dessalage dans AcNH_4 50mM, c) spectre en échelle m/z obtenu après dessalage dans AcNH_4 50mM et ajout de $100 \mu\text{M}$ en Ca^{2+} .



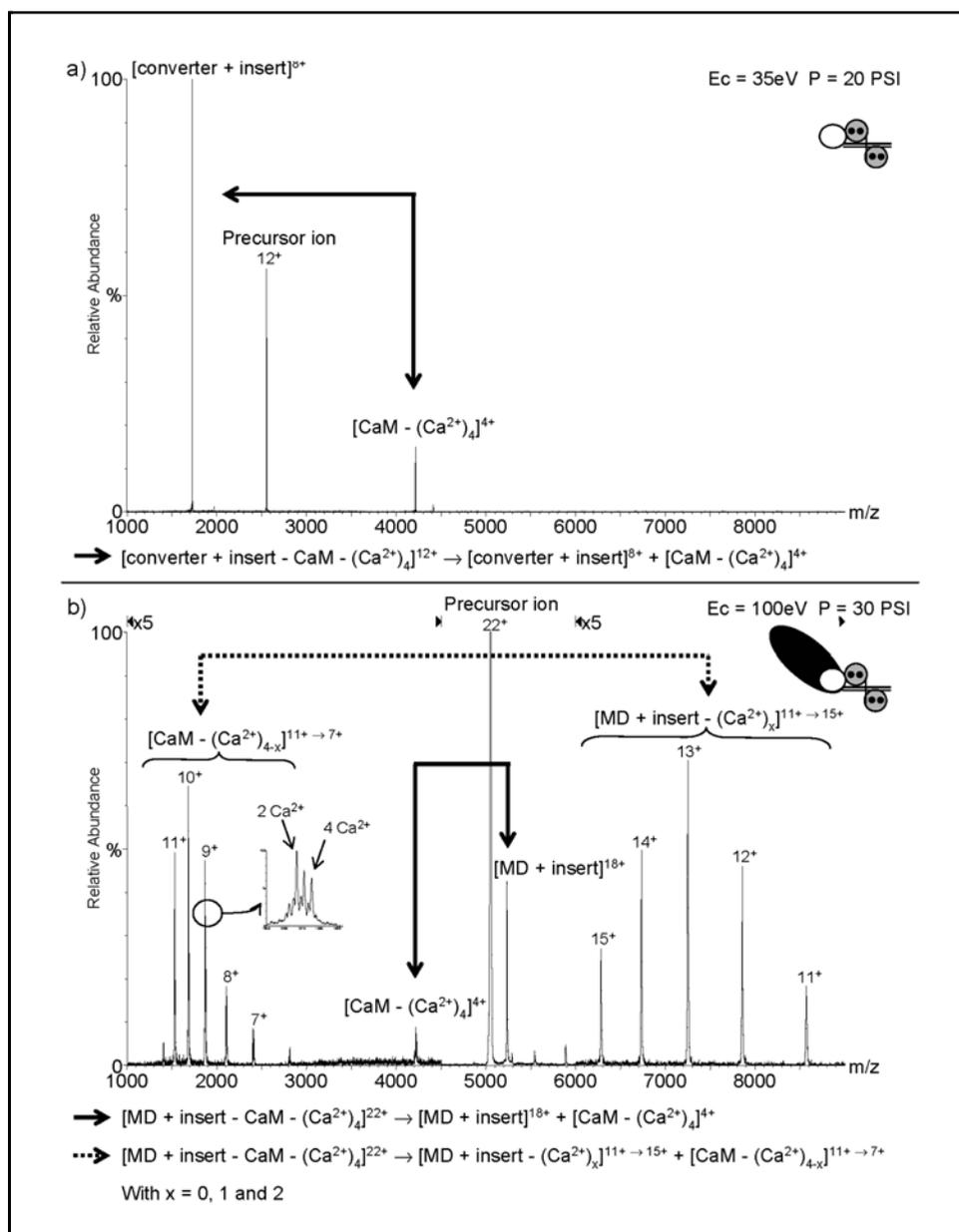
L'étude des construits de hauts poids moléculaires a, d'une part, validé la présence d'une nouvelle calmoduline sur la séquence « insérée », et d'autre part, confirmé nos craintes concernant l'utilisation de modèles trop simples. En effet, lorsque le domaine moteur est intact, la calmoduline de la séquence « insérée » a uniquement été observée avec 4 ions Ca^{2+} , même après dessalage dans un tampon sans ajout de Ca^{2+} . Le domaine moteur doit donc stabiliser l'interaction des ions Ca^{2+} avec un lobe de la calmoduline. D'autre part, des phénomènes de multimérisation sont également observés dans des conditions d'excès de Ca^{2+} avec le construit « MD + insertion + motif IQ » (cf. Figure 8c) mais pas avec le construit « MD + insertion + motif IQ + 78 AA » (cf. Figure 9c). Ce résultat suggère que la séquence additionnelle de 78 AA stabilise la calmoduline du motif IQ. De manière globale, ces résultats ont été la base d'une grande avancée sur la compréhension de la motilité particulière de la myosine VI.

L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet d'une publication dans *Proceedings of the National Academy of Sciences* : « The myosin VI insert is a new calmodulin binding site ».

3. Quelles informations peut-on obtenir par dissociation en phase gazeuse ?

Durant cette étude, nous avons tenté d'apporter des informations structurales supplémentaires à partir d'expériences de dissociation en phase gazeuse (cf. Figure 10).

Figure 10 : Spectres MSMS obtenus sur les construits « convertisseur + insertion » et « MD + insertion » à partir de l'appareil de type Q-TOF. Dans chaque cas, un ion précurseur est sélectionné dans un premier analyseur quadripolaire, puis est soumis à des collisions énergétiques dans une cellule de collision. Les espèces dissociées sont ensuite analysées dans le second analyseur à temps de vol.



La dissociation de complexes en phase gazeuse est une méthodologie qui a fait l'objet de plusieurs études, le plus souvent sur des multimères de protéines. Il a souvent été observé que la dissociation en phase gazeuse d'un complexe est effectuée par départ d'une petite sous-unité, possédant un nombre disproportionné de charges, c'est-à-dire qu'un transfert de protons entre sous-unités a lieu durant le processus de dissociation.

L'hypothèse a été émise que le transfert de charge se passe via le dépliement d'une sous-unité dans l'état de transition [Heck et coll. **2004**].

Dans notre cas, la dissociation des complexes [convertisseur + insertion – calmoduline – (Ca²⁺)₄] et [MD + insertion – calmoduline – (Ca²⁺)₄] a lieu suivant des processus différents. Plus particulièrement, nous avons observé un échange non seulement de protons mais aussi d'ions Ca²⁺, dans le cas du construit avec un domaine moteur intact. Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que le domaine moteur est en interaction avec un lobe de la calmoduline. Cette hypothèse a été validée à partir des stœchiométries obtenues par SM sur les différents construits et à partir de données cristallographiques. Ainsi, des méthodologies basées sur la dissociation en phase gazeuse de complexes non-covalents représentent une approche intéressante à exploiter et à développer. Dans ce cadre, nous pensons développer cette voie au laboratoire et plus particulièrement expérimenter une nouvelle technique permettant de dissocier des molécules en phase gazeuse. Cette technique appelée ETD (Electron Transfer Dissociation) est basée sur la fragmentation des molécules par apport d'électrons et non plus par collision avec un gaz ambiant (CID). Cette différence dans le mécanisme de fragmentation permettrait d'obtenir des dissociations de complexes plus efficaces et avec moins de modifications structurales des molécules durant le processus de dissociation. La comparaison des fragmentations obtenues par CID et par ETD sur des complexes non-covalents constituera un axe de recherche intéressant à développer.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans *Journal of American Society of Mass Spectrometry* : « Electrospray ionization mass spectrometry studies of noncovalent myosin VI complexes reveal a new specific calmoduline binding site ».

4. Une meilleure compréhension du mécanisme de motilité de la myosine VI

Ces études ont prouvé la présence d'une nouvelle séquence de fixation de la calmoduline (insertion). La calmoduline se fixe sur cette séquence avec 4 Ca²⁺ uniquement, un rôle de régulation par le Ca²⁺ sur cette protéine est donc exclu. Au contraire, cette calmoduline jouerait plutôt un rôle structural permettant à la myosine de se déplacer du côté (-) d'un filament d'actine. En caractérisant finement la stœchiométrie des complexes, la SM a permis de cibler les construits et les conditions adaptés à la cristallographie. Les études cristallographiques résultantes ont enfin permis de proposer un nouveau modèle expliquant la motilité particulière de la myosine VI [Menetrey et coll. **2005**]

PUBLICATION

« The myosin VI insert is a new calmodulin binding site »

Bahloul, A.; Chevreux, G.; Wells, A. L.; Martin, D.; Nolt, J.; Yang, Z.; Chen, L. Q.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Rosenfeld, S.; Houdusse, A.; Sweeney, H. L.

Proc Natl Acad Sci U S A. **2004**, 101, 4787-92.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Amel Bahloul, **Guillaume Chevreux**, Amber L. Wells, Davy Martin, Jocelyn Nolt, Zhaohui Yang, Li-Qiong Chen, Noëlle Potier, Alain Van Dorsselaer, Steve Rosenfeld, Anne Houdusse, and H. Lee Sweeney

The unique insert in myosin VI is a structural calcium-calmodulin binding site.

PNAS 101, 4787-4792 (2004)

Pages 4787-4792 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://intl.pnas.org/cgi/reprint/101/14/4787>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

PUBLICATION

« Electrospray ionization mass spectrometry studies of noncovalent myosin VI complexes reveal a new specific calmodulin binding site »

Chevreux, G.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Bahloul, A.; Houdusse, A.; Wells, A.; Sweeney, H. L.

J Am Soc Mass Spectrom. **2005**, 16, 1367-76

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Guillaume Chevreux, Noëlle Potier, Alain Van Dorsselaer, Amel Bahloul, Anne Houdusse, Amber Wells and H. Lee Sweeney

Electrospray ionization mass spectroscopy studies of noncovalent myosin VI complexes reveal a new specific calmodulin binding site.

Journal of the American Society for Mass Spectrometry 16, 1367-1376 (2005)

Pages 1367-1376 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2005.03.023>

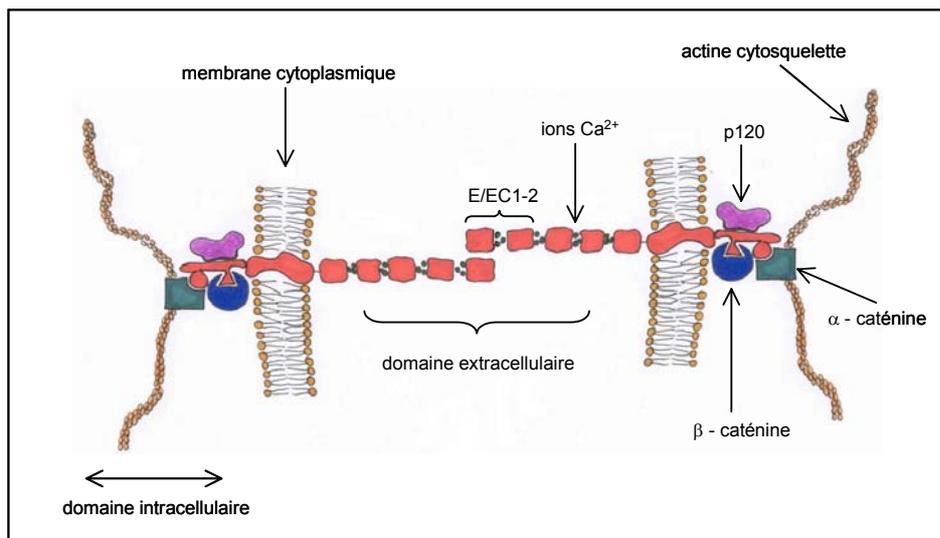
Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

II. Le mécanisme d'adhésion moléculaire impliquant les E-cadhérines « Cette étude a été menée en collaboration avec Hélène Feracci et Olivier Courjean (Institut Curie, Paris) »

1. Contexte biologique

Les interactions cellule-cellule jouent un rôle crucial dans la différenciation des cellules, la morphogenèse des tissus, le développement neuronal, ainsi que dans la transduction du signal [Takeichi **1995**]. Ces interactions sont modulées par des contacts entre molécules au niveau de la membrane cellulaire. La E-cadhérine appartient à une famille importante de molécules adhésives [Takeichi **1991**]. Cette protéine est transmembranaire (cf. Figure 11), la partie extracellulaire est organisée en 5 domaines similaires appelés modules et la partie cytoplasmique est constituée d'un unique domaine lié aux filaments d'actine du cytosquelette [Nollet et coll. **2000**].

Figure 11 : Illustration des différents domaines de la E-cadhérine. La E-cadhérine est une protéine transmembranaire, dont le domaine extracellulaire est constitué de 5 modules interagissant avec les ions Ca^{2+} (3 ions Ca^{2+} à l'interface de chaque module), d'après [Pecina-Slaus **2003**].



L'activité adhésive est régulée au niveau cellulaire, par plusieurs mécanismes incluant différents taux d'expression de protéines au niveau de la membrane plasmique, l'interaction avec les ions Ca^{2+} et l'interaction des cadhérines avec le réseau du cytosquelette [Steinberg et coll. **1999**]. Ces mécanismes complexes de régulation des propriétés adhésives permettent aux cadhérines d'être impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Peu d'éléments, concernant la régulation de l'adhésion cellulaire au niveau des E-cadhérines, sont parfaitement clairs à l'heure actuelle. En particulier, les ions Ca^{2+} sont depuis très longtemps connus pour intervenir dans les mécanismes d'adhésion [Inaba **2002**], cependant la manière dont ceux-ci interviennent au niveau des cadhérines est très discutée.

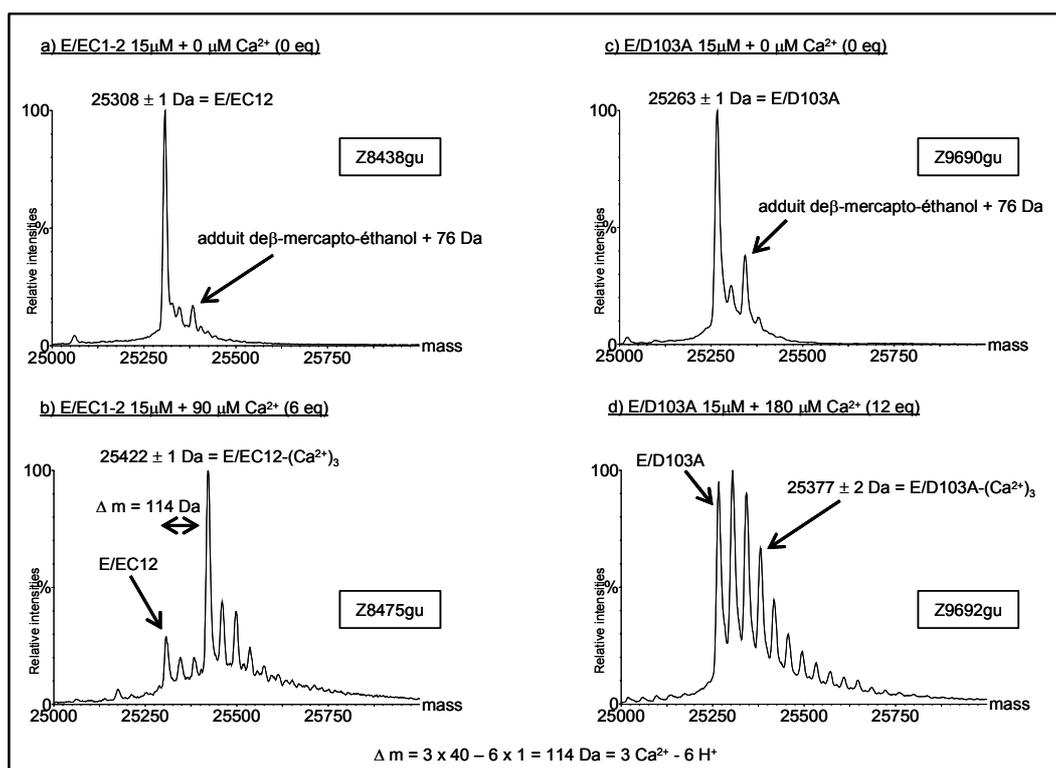
Certaines données laissent suggérer que les ions Ca^{2+} qui interagissent sur les modules extracellulaires des cadhérines, pourraient induire une régulation des propriétés adhésives. En particulier, les deux premiers

modules du segment N-terminal extracellulaire (E/EC1-2) joueraient un rôle important, puisqu'ils interviendraient dans l'interaction cadhérine-cadhérine [Pertz et coll. **1999**, Boggon et coll. **2002**, Perret et coll. **2002**]. Des efforts importants ont été réalisés pour caractériser l'interaction des ions Ca^{2+} avec ces deux premiers modules [Pokutta et coll. **1994**, Koch et coll. **1997**, Allatia et coll. **1997**]. Les différentes techniques utilisées ont permis de déduire l'interaction de 3 ions Ca^{2+} , cependant, les résultats concernant leur affinité sont de nature différente. Dans ce contexte, nous avons utilisé la SM afin de caractériser l'interaction entre les deux premiers modules extracellulaires de la E-cadhérine (noté E/EC12) et les ions Ca^{2+} . Par ailleurs, nous disposons d'un construit comportant une mutation (noté E/D103A), connue pour abolir les propriétés adhésives de la E-cadhérine. Ce mutant a été utilisé comme témoin durant nos expériences.

2. Titration suivie par SM : mise en évidence d'un phénomène de coopérativité

Dans les conditions adéquates d'analyse, la SM permet de visualiser des stœchiométries d'interaction en solution. Dans le cas particulier d'interactions multiples d'une même molécule sur une autre, il est possible de mettre en évidence par SM des stœchiométries d'interactions préférentielles et donc des phénomènes de coopérativité. Dans ce travail, nous avons mesuré la stœchiométrie d'interaction des ions Ca^{2+} pour différentes concentrations en protéine et en ions Ca^{2+} . Il apparaît de ces premières expériences que le construit E/EC1-2 fixe majoritairement 3 ions Ca^{2+} de manière spécifique alors que les ions Ca^{2+} se fixent de manière plus statistique et de manière moins prononcée sur le construit E/D103A (cf. Figure 12). Ces premières données obtenues par SM concordent avec les données décrites dans la littérature : à savoir, 3 ions Ca^{2+} interagissent avec le construit et la mutation D103A modifie l'interaction des ions Ca^{2+} .

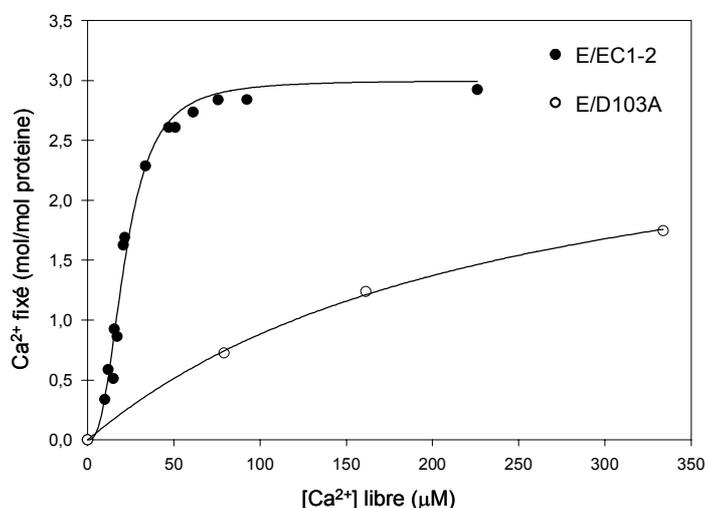
Figure 12 : Spectres en échelle de masse obtenus en condition non dénaturante sur les construits E/EC1-2 et ED103A. Les expériences ont été réalisées sur l'appareil de type LCT.



Nous avons par la suite, utilisé l'information de stœchiométrie fournie par la SM pour réaliser des courbes de titration par les ions Ca^{2+} dans le cas des construits E/EC1-2 et E/D102A (cf. Figure 13). Contrairement à d'autres techniques plus globales (dichroïsme circulaire, fluorescence, dialyse à l'équilibre), le point fort de la SM est de distinguer la présence de chacune des espèces en solution. Les différentes stœchiométries ainsi mesurées ont pu être directement exploitées pour déduire le taux de saturation des construits en fonction de la concentration en Ca^{2+} libre.

En particulier, nous avons calculé la proportion de l'espèce liée à 3 Ca^{2+} par rapport à l'espèce non liée, en considérant uniquement ces deux stœchiométries, afin d'exprimer le degré de saturation de la protéine en fonction de la concentration en ions Ca^{2+} libre (définition de la représentation de Hill selon Donald Voet and Judith G. Voet, Biochemistry, second edition, 1995). Ce calcul est réalisé à partir de l'intensité des espèces détectées sur le spectre de masse, avec comme approximation que l'espèce non liée a le même facteur réponse que l'espèce saturée. Nous avons ensuite reporté sur un graphique le nombre de Ca^{2+} fixés sur la protéine en fonction de la concentration en Ca^{2+} libre (cf. Figure 13). Cette représentation appelée « représentation de Hill » permet de caractériser une interaction coopérative de manière empirique à partir du coefficient de Hill et de la constante de dissociation moyenne. Le coefficient de Hill traduit de manière empirique le phénomène de coopérativité. Si la valeur du coefficient de Hill est 1 alors la fixation de n molécules est indépendante. Au contraire, si sa valeur est proche de n alors la coopérativité est dite infinie.

Figure 13 : Courbes de titration obtenues par SM d'après la représentation de « Hill ».



A partir d'une régression non-linéaire (cf. Figure 14) des courbes, nous avons déduit une constante de dissociation moyenne des ions Ca^{2+} , ainsi que la valeur du coefficient de Hill pour les deux types de construits.

Figure 14 : Modèle mathématique traduisant la représentation de Hill (régression réalisée à partir du logiciel Sigma Plot).

$y = \frac{n \times [x]^h}{K + [x]^h}$	<p>avec :</p> <p>n : le nombre de molécules en interaction à saturation (ici 3)</p> <p>K : la constante de dissociation moyenne</p> <p>h : la constante de Hill</p> <p>$[x]$: la concentration en Ca^{2+} libre</p>
--	--

Il apparaît de cette étude que le construit E/EC12 fixe 3 ions Ca^{2+} de manière coopérative (coefficient de Hill de 2.3) avec une constante de dissociation moyenne de 23 μM . En ce qui concerne le mutant E/D103A, les données obtenues diffèrent beaucoup : un coefficient de Hill de 1 et une constante de dissociation moyenne des ions Ca^{2+} de 230 μM ont été trouvés. La mutation D103A ainsi que la mutation d'autres acides aminés impliqués dans la fixation des ions Ca^{2+} sont connues pour abolir les propriétés adhésives des E-cadhérines [Handschuh et coll. **2001**]. L'observation par SM de la perte du phénomène de coopérativité ainsi que de la diminution de l'affinité moyenne des ions Ca^{2+} pour le mutant est un bon moyen pour vérifier la cohérence des données obtenues par notre approche. Pour conclure, la constante de dissociation moyenne des ions Ca^{2+} pour le construit E/EC1-2, déterminée par SM, exclut un mécanisme de régulation direct par les ions Ca^{2+} extracellulaires (concentration de l'ordre de 1 mM). De manière générale, ce travail apporte un exemple supplémentaire, renforçant l'idée que la SM est une technique de choix pour étudier des phénomènes de coopérativité au sein de systèmes biologiques.

Une publication sur l'ensemble de ces résultats est en préparation : « Folding maturation of the cadherin monomer modulated by cooperative binding of Ca^{2+} ions ».

PUBLICATION

**« Folding maturation of the cadherin monomer modulated by
cooperative binding of Ca^{2+} ions »**

Olivier Courjean, Guillaume Chevreux, Anne Morel, Sarah Sanglier, Noelle Potier, Juergen. Engel,
Alain van Dorsselaer, Hélène Feracci

Article en préparation

Folding maturation of the cadherin monomer modulated by cooperative binding of Ca²⁺ ions

*Olivier Courjean, ‡Guillaume Chevreux, *Anne Morel, ‡Sarah Sanglier, ‡Noëlle Potier, ¶Juergen Engel, ‡Alain Van Dorsselaer, *Hélène Feracci

*Morphogenèse cellulaire et progression tumorale, Institut Curie Section de Recherche, CNRS UMR 144, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 5, France

‡Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, ECPM - Université Louis Pasteur - UMR CNRS 7512, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg Cedex 2, France

¶Department Biophysical ChemistryBiozentrum Universitaet BaselKlingelbergstrasse 70CH 4056 Basel, Switzerland

Corresponding author: Dr.Hélène Feracci

Abstract

E-Cadherin belong to an important family of cell adhesions molecules. The architecture of E-Cadherin consists in an extracellular segment organized in five repeated E-Cadherin modules (EC), a single transmembrane region and a single intracellular domain linked to the actin filaments of the cytoskeleton. The N-terminal extracellular segment is supposed to mediate cell-cell adhesion via a Ca²⁺ regulation mechanism. Important efforts have been made in order to understand the role of Ca²⁺ ions, some studies established that the N-terminal first two modules (EC12) were specially involved in a Ca²⁺ regulation mechanism. As a consequence, studying the Ca²⁺ dependence and the behaviour of these two modules is of particular interest. But, only indirect analysis method such as fluorescence, circular dichroism or flow dialysis were used, giving controversial data. We used Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) as a powerful technique to characterize the interaction between Ca²⁺ ions and the EC12 construct. In this study, we evidenced the binding of 3 Ca²⁺ ions with a high cooperativity. The apparent dissociation constant of 23 μM found for this construct argue against a simple Ca²⁺ regulation mechanism at the extracellular level where Ca²⁺ concentration is about 1mM.

Abbreviations

Ca²⁺, calcium; EC12, E-cadherin module 1 and 2; ESI-MS, Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Introduction

Cell-cell interactions play crucial roles in cell differentiation, tissue morphogenesis, neuronal development as well as signal transduction [1]. These interactions appear to be mediated by the specific contacts of adhesion receptors on opposing cell membranes [2]. These receptors comprise different classes of molecules that are responsible for various mechanisms of adhesion between cells. Cadherins are unique in that they are responsible for Ca^{2+} -dependent adhesion between cells [3-5]. Classical cadherins include about twenty single-pass transmembrane glycoproteins that have been identified as major receptors involved in homophilic intercellular adhesion. Their extracellular segment is made of five similar tandemly arranged cadherin domains (EC) named EC1 to EC5 from the N-terminal end. These domains share sequence homologies and exhibit an Ig-like structure consisting of seven antiparallel β -strands organized in two opposing sheets [6]. Their cytoplasmic part interacts to the actin network via soluble proteins that could be involved in different signaling pathways. The adhesive activity of cadherins is regulated at the cellular level by several mechanisms including levels of protein expression at the plasma membrane, recruitment to cell contact zones, internalization, Ca^{2+} binding and cadherin interactions with the cytoskeletal network [7, 8].

Questions underlying most, if not all, attempts in understanding cadherin-mediated adhesion at a molecular level are related to determinants of cadherin specificity and to the role of Ca^{2+} in cadherin-mediated interactions [9, 10]. Historically, the study of Ca^{2+} -dependent cell adhesion allowed the discovery and characterization of the first cadherin, namely the E(epithelial)-cadherin formerly known as uvomorulin. These early studies show the essential involvement of E-cadherin during compaction of embryonic cells, together with Ca^{2+} ions. From cell aggregation studies, it has been confirmed that Ca^{2+} is essential for E-cadherin-mediated adhesion, which is reversibly inactivated by EDTA [11]. All the members of the classical cadherins share a number of conserved features, namely a very similar domain organization and certain key residues, many of them involved in Ca^{2+} binding [12]. Mutations in these Ca^{2+} binding sites abolish adhesive function of E-cadherin.

It is currently accepted that cadherin-mediated cell adhesion is dependent on the presence of millimolar Ca^{2+} ion concentrations [13] as are found in the extracellular milieu, and this binding is thought to be a putative regulator of cadherin adhesive efficiency [14]. EM studies suggested that cadherins have first to undergo cis-interactions in order to be able to subsequently form trans-interactions and Ca^{2+} concentration seems to regulate this two-step process [15].

Ca^{2+} is indeed required for cadherin structure and, in the presence of 2 mM Ca^{2+} ions the extracellular E-cadherin segment (E/EC15) adopts a 22-nm long protease-resistant rod-like shape

[16, 17]. Depletion of these ions results in the globular collapse of this elongated structure. The high-resolution structure of the two-domain fragment of E- and N-cadherin (EC12) and of the EC15 extracellular fragment of C-cadherin revealed that each binding pocket has a similar organization and that twelve Ca^{2+} ions are bound in the complete structure [18]. Each Ca^{2+} binding pocket is made of structural elements from two successive domains and the amino acids involved in this binding have thus been identified. In the presence of Ca^{2+} , the secondary structure of a cadherin module exhibits a large fraction of β -barrel structure, as revealed by circular dichroism spectroscopy. In EDTA, changes in spectra indicated modifications in the secondary structure toward a random coil conformation.

Ca^{2+} binding properties to the extracellular E-cadherin domain has been evaluated by using different methodologies. The mean K_D values to the whole extracellular domain (E/EC15) comprising four Ca^{2+} binding pockets were 30 μM , 45 μM and 150 μM [13, 16] depending on the methodology. Ca^{2+} binding affinities to E/EC12 displayed an average K_D of about 25 μM for the three Ca^{2+} binding sites [19], which is in contrast to an average K_D of 460 μM obtained for the same E-cadherin fragment [13]. This latter study pointed out that a low affinity Ca^{2+} -binding site (K_D of 2 mM) could provide a possible physiological regulation of adhesive function by external Ca^{2+} [14].

These controversial data about Ca^{2+} -cadherin binding affinities led us to investigate precise mechanisms of this Ca^{2+} -induced regulation. In the present work, we chose to focus on the outermost binding pocket where a low affinity binding site is thought to be the key regulation site of E-cadherin adhesive activity. We used electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) as a powerful approach to study non-covalent interactions formed in solution between Ca^{2+} and cadherin fragments, and followed the structural rearrangements as a consequence of the binding of these ions [20]. Numerous studies convincingly showed that under carefully controlled conditions, non-covalent complexes can survive the ionization/desorption process and the technique has proved an evident ability to provide precious information concerning stability and stoichiometry of the associations formed in solution [21-23]. Because of its unique advantage to detect all species co-existing in solution, ESI-MS has been often used to follow protein/protein association/dissociation pattern upon ligand addition or to probe cooperativity effects [24-26]. Moreover, structural changes upon ions binding were evaluated by trypsin sensitivity and circular dichroism. Our findings demonstrated that three Ca^{2+} ions exhibit a mean high binding affinity, arguing against a physiological regulative role of extracellular Ca^{2+} in cadherin-mediated cell interactions. We also investigated the consequences of a point mutation in this Ca^{2+} -binding pocket (E/D103A) and revealed that the Asp 103 plays an essential role in this binding. Our data indicated for the first time that this binding occurs cooperatively on the E/EC12 cadherin fragment in its monomeric

state, then inducing specific changes in its structural arrangement. These data complement structural and biochemical studies [13, 16, 27] and provide a new perspective in our understanding of Ca^{2+} -dependant adhesion mediated by cadherins.

Experimental Procedures

Plasmid constructions. The cDNA of full length mouse E-cadherin (kindly provided by L. Larue, Institut Curie, Orsay, France, Larue et al., 1996) was used as a template for PCR amplification of DNA coding for the first two extracellular domains E/EC1-2 fused with a hexahistidine tag in C-terminal position. The following primers were used: 5'-CCC CAT ATG GAC TGG GTC ATC CCT C-3' and 5'-CCG CTC GAG GAA GAC AGG AGC GTT GT-3'. The obtained fragments were cloned in the pET24a expression vector (Novagen) using the XhoI / NdeI site.

The mutant E/D103A of the E/EC1-2 fragment was generated by using the QuickChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the following primers: D103A5'-GTG ACA GAT CAG AAT GCC AAC AGG CCA-3' and 5'-TGG CCT GTT GGC ATT CTG ATC TGT CAC-3'. Prior to proteins expression, the cDNA constructs were sequenced to verify that undesirable mutations had not arisen during PCR.

Protein expression and purification. For E/EC1-2 and E/D103A chimeric proteins purification, Terrific Broth cultures media of 500 ml containing 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin were inoculated with transformed colonies picked up from agar plates. Cultures were grown at 37°C until an optical density at 600 nm of 0.6-0.8 was reached. Expression was induced by the addition of 1.7 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). After 2h, cells were harvested and stored at -80°C. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (4 M urea; 50 mM Na_2HPO_4 pH 7.8; 20 mM imidazole and 20 mM β -mercaptoethanol). The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 20 minutes and the supernatant incubated for 2 hours with Ni-NTA agarose resin beads (Quiagen). The beads were extensively washed with lysis buffer and then subjected to stepwise dialysis against PBS. Cadherin fragments were eluted with 0.25 M imidazole.

Protein concentration was determined spectrophotometrically by absorbance measurements at 280 nm, after dialysis against PBS in order to remove imidazole. The molecular mass as well as the absorbance coefficient of each protein were evaluated on the basis of amino acid composition using ProtParam tool, provided by ExPaSy web site (<http://expasy.ch>): MW = 25308.2 Da ($\epsilon = 0.804 \text{ mg/ml/cm}$), MW = 25264.2 Da ($\epsilon = 0.805 \text{ mg/ml/cm}$), for E/EC1-2 and E/D103A respectively.

SDS PAGE and Western Blot. After elution from Ni-NTA beads, the E-cadherin fragments E/EC1-2 and E/D103A were first

analyzed by 15% SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. Moreover, these proteins were characterized by western blot, after transfer onto a PVDF membrane (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) using a tank system. Two different primary antibodies were used: one directed against the EC1 module of E-cadherin (ECCD2, Takara), one against the C-terminus histidine tag (His Probe H15, Santa Cruz Biotechnology). The respective secondary antibodies were HRP-linked whole antibodies (Amersham Biosciences), allowing a photochemical revelation using the ECL system (Amersham Biosciences).

Mass spectrometry. Prior to mass spectrometry experiments, non volatile salts were removed by exchanging the purification buffer of samples against ammonium acetate buffer (Merck, Darmstadt, Germany) 50 mM (pH 6.8). Ammonium acetate enables native structure of proteins to be preserved and is compatible with ESI-MS analysis [28]. Two successive series of five dilution/concentration steps were performed at 4°C and 10,000 rpm using 10 kDa PES Vivaspinn microconcentrator (Vivascience, Hannover, Germany), with a concentration factor of 5/step. Deionized water (18.2 M Ω) was generated from a water filtering device (Millipore, Bedford, USA).

Mass analyses were performed using an ESI-TOF mass spectrometer (LCT, Micromass, Manchester, UK) calibrated with horse heart myoglobin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Samples were continuously infused into the ESI ion source at a flow rate of 3 $\mu\text{l/min}$. Both gas and source temperature were set at 353 K.

For analysis in denaturing conditions, samples were diluted to 2 pmol/ μl in a 1:1 water-acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% formic acid and standard interface parameters were used to obtain best mass accuracy.

For analysis in non-denaturing conditions, samples were directly infused in AcNH_4 50 mM, interface parameters were optimized to obtain the best sensitivity and spectrum quality without affecting the non-covalent complexes stability. The accelerating voltage applied on the sample cone (Vc) ranged from 30 to 80 V and pressure in the interface was set at 5 mbar. Pressure and Vc are parameters controlling the energy given to ions in the interface of the mass spectrometer and must be optimized in each cases.

Ca²⁺ titration monitored by mass spectrometry: the E/EC1-2 and E/D103A samples were incubated with several Ca^{2+} concentrations (added in solution from a 10 mM $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ solution) and stoichiometry deduced using mass spectrometry in non-denaturing conditions. These experiments were performed at two different protein concentrations (5 μM and 15 μM) and at a Ca^{2+} concentration ranging from 0 to 300 μM . For each measurement, the protein was previously incubated 20 minutes with the corresponding metal ions.

The saturation rate of the protein was plotted versus free Ca^{2+} concentration considering a saturating stoichiometry of 3 Ca^{2+} ions

per protein molecule. The saturation rate was calculated by looking at Ca^{2+} binding stoichiometries and by assuming that free Cadh and Ca^{2+} -saturated Cadh display the same response factor. The free Ca^{2+} concentration in solution was calculated by subtraction of bound Ca^{2+} ions to the total amount of Ca^{2+} ions in solution.

Mass monitoring of the specificity versus several metal ions: the E/EC1-2 (protein concentration of 15 μM) was incubated with several divalent metal ions (135 μM , 9 eq) and the binding stoichiometries were deduced using mass spectrometry in non-denaturing conditions. The divalent metal ions used were the following: Ca^{2+} (calcium acetate, >99%, Sigma), Cd^{2+} (cadmium acetate-2-hydrate, >99%, Riedel-de Haën), Mn^{2+} (manganese (II) acetate tetrahydrate, >99%, Fluka Chemica) and Mg^{2+} (magnesium acetate tetrahydrate, >99%, Fluka Chemica). For each measurement, the protein was previously incubated 20 minutes with the corresponding metal ions.

Trypsin sensitivity. About 5 μg of E/EC1-2 and E/D103A fragments still bound to Ni-NTA beads were incubated with 10 mM Tris, pH 8.0 with CaCl_2 concentrations varying from 0.02mM to 20 mM, or with 5 mM EDTA. After each washing, beads were pelleted by centrifugation (10 minutes, 3000 g, 4°C) in order to efficiently change the buffer. The proteins were then eluted in the same buffer, supplemented by 250 mM imidazole. The protein solutions were then recovered after beads removal by centrifugation (10 minutes, 3000 g, 4°C) and incubated with 90 U of trypsin-agarose beads (Sigma Aldrich), during 1 hour, at 37°C, under shaking (400 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf). Proteolysis was stopped by adding an inhibitor (leupeptin hemisulfate, ICN Biomedicals Inc). Samples were then analysed by 15% SDS-PAGE gel and Coomassie blue staining.

CD measurements. CD measurements were performed with an Aviv 62A DS spectropolarimeter. Spectra were recorded at 22°C in a quartz cell with a path length of 1 mm at protein concentration of 24.5 μM E/EC1-2, and 23.4 μM E/D103A in 20 mM Hepes, 0,15 M NaCl, (pH 7.0). Protein concentrations obtained from absorbance measurements at 280 nm were used to calculate the mean molar residue ellipticity (expressed in $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$). Spectroscopic studies of structural modifications were performed by adding aliquots of Ca^{2+} stock solutions to the Ca^{2+} depleted protein, up to 1mM final Ca^{2+} concentration. The reversibility of the Ca^{2+} -induced modifications was studied by measuring CD signal after addition of EDTA in the previous protein solution, up to 2 mM final EDTA concentration. The spectra were determined by subtracting the background due to the buffer signal.

Results

Expression and characterization of recombinant E-cadherin fragments. In order to study Ca^{2+} binding properties of the outermost E-cadherin interdomain pocket, we used a pair domain fragment E/EC1-2 consisting of the two outermost E-cadherin modules that comprised the first Ca^{2+} binding pocket (Fig 1A). Structural data have identified the amino acids involved in Ca^{2+} binding (Fig 1B). We knew from structural studies that Asp103 is involved in the coordination of the two outermost Ca^{2+} ions [27,29]. One specific point mutation, Asp103 changed in Ala, was introduced with the goal of precisely addressing the influence of Ca^{2+} binding (E/D103A). This fragment was designed in the present work to be used as a negative control for Ca^{2+} binding (see below).

In order to obtain relevant quantitative results on Ca^{2+} binding and to evaluate the structural consequences of this binding, we needed sufficient amounts of cadherin fragments with a high level of purity. These recombinant proteins were overexpressed in *E. coli* as they do not contain glycosylation motifs, then extracted from inclusion bodies and affinity purified by on nickel-NTA-Sepharose beads (Quiagen) using a hexahistidine tag.

Furthermore, we used SDS-PAGE, Western blotting and ESI-MS to characterize these cadherin fragments and assess their purity.

As shown in Fig 2a-c, only one protein band was detected by protein staining, as well as by western blot using ECCD2 (Takara) and H-15 (Santa Cruz) specific antibodies respectively for an epitope on the EC1 domain and for the C-terminal histidine tag on EC2. The apparent molecular masses on SDS-PAGE were about 30 kDa (Fig. 2, Fig. 7), which is higher than the theoretical masses calculated from their primary structures (about 25 kDa). This discrepancy, currently observed with cadherin fragments, is most probably due to the very low pI value (i.e. 4.7) of both proteins.

The homogeneity of the constructs was also checked using ESI-MS. Fig.2 shows typical multiply-charged ESI-mass spectra obtained in both denaturing and non-denaturing conditions. The masses found for the E/EC1-2 and the E/D103A were respectively 25308.7 ± 1.0 Da and 25263.3 ± 1.0 Da, in accordance with theoretical masses (25308.2 and 25264.2 Da). A very small fraction of our protein samples exhibited an adduct of 76 Da corresponding to the formation of a disulfide bridge with the β -mercaptoethanol group present in the lysis buffer. This modification, localized on the Cys9 of both fragments, does not interfere with Ca^{2+} binding [27, 29]. Thus these cadherin fragments were relevant for quantitative Ca^{2+} binding studies.

Charge state distributions observed under denaturing and non-denaturing conditions are completely different and related to the conformation adopted by the protein [30]. Indeed, it has been described that unfolded proteins display more solvent exposed amino-acids available for protonation than folded protein ones, yielding ESI-ions displaying a higher number of charge (low m/z). Such a variation in charge state distribution may be exploited to

reveal conformational changes occurring upon experimental modification [31, 32]

Study of the interaction between Cadherin fragments and Ca^{2+} using ESI-MS.

Ca^{2+} binding occurs with cooperativity: series of experiments consisting in stepwise Ca^{2+} additions to Cadherin constructs were carried out. The Ca^{2+} binding stoichiometries were determined by using mass spectrometry in non-denaturing conditions (see **experimental procedures**). To guarantee that the observed Ca^{2+} stoichiometries reveal the different populations of complexes in solution, several acceleration voltages (Vc) have been checked. The Vc has been gradually changed from 30 to 80 V and the Ca^{2+} stoichiometries determined in each case (data not shown). The measured Ca^{2+} stoichiometries appeared to be insensitive to the accelerating voltage, indicating that the relative abundance of the species deduced from ESI mass spectra effectively reflects relative abundance in solution and that dissociation of Ca^{2+} ions in the gas phase of the mass spectrometer can be ruled out.

Fig. 3 shows typical mass spectra obtained for both E/EC1-2 and E/D103A with several Ca^{2+} addition (0, 3, 6 and 0, 6, 12 eq. respectively) at a protein concentration of 15 μM . Considering the fact that the binding of one eq. of Ca^{2+} increases the mass of the protein by 38 Da as two H^+ are removed, all distinct ligation states as well as the free state of the cadherin fragments are easily visualized by ESI-MS. The measured molecular weights reveal that both constructs are Ca^{2+} -free in the desalting buffer without further add of Ca^{2+} . However with slight increase of Ca^{2+} concentration it appears that the wild type and the mutant constructs behave differently versus Ca^{2+} binding.

Mass spectra of the wild type E/EC1-2 construct show the binding of Ca^{2+} at relative low Ca^{2+} concentration. Indeed, for a total Ca^{2+} concentration of 45 μM (3 eq.), the mass spectrum obtained shows two main peaks, displaying a mass of 25308 ± 1.0 Da corresponding to the Ca^{2+} -free protein and a mass of 25422 ± 2.0 Da corresponding to the [E/EC1-2 - (Ca^{2+})₃] complex. A striking observation is that during the titration, the [E/EC1-2 - (Ca^{2+})₁] and [E/EC1-2 - (Ca^{2+})₂] species are under represented comparing to the Ca^{2+} -free construct and the [E/EC1-2 - (Ca^{2+})₃] complex, strongly suggesting a cooperative binding effect [25, 33]. Mass spectra of the E/D103A construct indicate a totally different behaviour versus Ca^{2+} binding. For this construct, the binding of Ca^{2+} occurs statistically upon Ca^{2+} titration and with a lower affinity than for the wild type fragment. Stoichiometries greater than three were observed for both E/EC1-2 and E/D103A fragments, revealing the presence of other Ca^{2+} binding sites of lower affinities which could correspond to the half binding pocket at the C-terminal side of the EC2 domain.

These data suggest a cooperative binding of three Ca^{2+} ions on the wild type construct whereas this cooperativity effect seems to have been suppressed for the mutant E/D103A.

This cooperativity effect can be pointed out by plotting the saturation rate of both constructs against the free Ca^{2+} concentration (see Fig. 4). It is then possible to calculate the Hill constants (from a non-linear fit) and the apparent dissociation constants (Ca^{2+} free concentration at half saturation).

The sigmoidal curve obtained for the E/EC1-2 construct demonstrates a high cooperativity effect as well as the Hill constant of 2.3 calculated from a non-linear fit of the data (the value of 3 would represent an infinite cooperativity). The free Ca^{2+} concentration at half saturation gives an apparent dissociation constant of 23 μM . On the contrary, the mutant E/D103A exhibits an hyperbolic binding curve with a Hill constant of 1.0, thus testifying the non-cooperative binding with a half saturation at a free Ca^{2+} concentration of 230 μM .

Charge state modification upon Ca^{2+} binding is observed: two information can be deduced from an ESI-mass spectrum: the molecular weight of the various species co-existing in solution and the charge state distribution of the corresponding ions. As the molecular weight directly yields the binding stoichiometries, the charge state distribution is often interpreted as being related to the protein conformation [34-36]. As already described in Fig. 2, the number of charges of the observed ions would depend on the number of basic sites available for protonation and so, on the protein folding. In our case, while both E/EC1-2 and E/D103A exhibit similar charge state distribution in Ca^{2+} free conditions (Fig. 5 a-b), a different charge state distribution is observed for the wild type protein consecutive to 3 Ca^{2+} binding compared to the E/D103A fragment (Fig. 5 c-d).

Under identical experimental conditions (in particular pH and interface voltages), the main charge state of the wild type cadherin fragment shifts from 11^+ to 12^+ after Ca^{2+} binding whereas the main peak of the mutant remains unchanged.

These data would suggest that the observed shift for E/EC1-2 charge state distribution is rather related to a conformational change than to the number of Ca^{2+} ions bound to the protein. However, no detailed regarding this structural change can be deduced from MS data alone.

Ca^{2+} binding is highly specific. The binding of several divalent ions (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+}) on the wild type construct was checked by following the formation of the corresponding Cadh-X_n complexes in non-denaturing conditions. For this, a large excess of these ions was added (9 eq.).

While cadherin is almost saturated in excess of Ca^{2+} (Fig.6a), a very low binding was observed for Cd^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} (Fig. 6b-d). More precisely, no fixation of Cd^{2+} and only a small amount of

metal bound protein was observed for Mn^{2+} and Mg^{2+} (10 and 30 % respectively).

The divalent metal ions tested have the closest reactivity to Ca^{2+} ions but do not bind efficiently to the construct; these data show a high binding specificity of the wild type fragment versus Ca^{2+} ions and demonstrate that no artefactual binding occurred during the ionization process.

Study of structural modification upon Ca^{2+} binding. One of the hallmark features of cadherins is their resistance to proteolytic degradation in the presence of Ca^{2+} [37]. Indeed, although many trypsin cleavage sites are present on the primary structure, cadherins extracellular segments are known to resist to proteolysis in the presence of Ca^{2+} but not in the presence of EDTA: trypsin cleavage sites must be buried only in the fully folded protein. To determine whether the recombinant fragments were correctly folded, and moreover to evaluate how Ca^{2+} modulates both their folding and trypsin sensitivity, E/EC1-2 and E/D103A were submitted to trypsin digestion in different Ca^{2+} conditions. It is important to point out that the protease resistance of these fragments rely not only on Ca^{2+} concentrations but also on trypsin specific activity and protease-cadherin ratios. These data should thus be considered only by comparing two protein fragments under the same experimental conditions without any significance for Ca^{2+} concentrations. As shown in Fig. 7, E/EC1-2 was totally protected from trypsin proteolysis with 2 mM Ca^{2+} and down to 0.2 mM. This protection diminished when Ca^{2+} concentration decreased down to 5 mM EDTA. Within the same experimental conditions, E/D103A was sensitive to proteolysis, even in the presence of 20 mM Ca^{2+} . These observations indicated that Ca^{2+} binding is not sufficient to protect cadherin fragments from proteolysis, and underlined the importance of ions specifically and cooperatively bound.

Circular dichroism was also used to further investigate structural modifications of E/EC1-2 and E/D103A as a function of Ca^{2+} concentration (Fig. 8). We observed that the mean molar residue ellipticity of E/EC1-2 changed when Ca^{2+} (1 mM) was added to the protein solution. Similar spectra were observed with only 0.1 mM Ca^{2+} [27]. The spectrum obtained after addition of 2 mM EDTA evidenced that this structural modification was reversible. Besides, we observed that the E/D103A circular dichroism signal was not modified following neither Ca^{2+} nor EDTA addition. Indeed, E/D103A spectra were similar to the Ca^{2+} -depleted E/EC1-2 solution or E/EC1-2 + EDTA. Once more, these observations suggested that both Ca^{2+} depleted E/EC1-2 and E/D103A structures were similar. The point mutation localized on E/D103A did not modify the basal structure of our cadherin fragments. Nevertheless, this mutation impaired the native conformation allowed by cooperative Ca^{2+} binding.

Discussion

Three Ca^{2+} ions bind cooperatively to the outermost binding pocket of the cadherin monomer. In the present study we have used two different cadherin fragments E/EC12 and E/D103A to investigate Ca^{2+} binding in relation to the folding of the two outermost domains of E-cadherin. By ESI-MS analysis, we have observed the specific binding of three Ca^{2+} ions to the E/EC12 fragment. These measurements agreed with X-ray crystallographic studies [27, 29], which visualized the binding of three Ca^{2+} ions at the interface between E/EC1 and E/EC2 domains.

Ca^{2+} -Cadherin interactions have been previously studied via different methodologies that gave rise to controversial information. By fluorescence spectroscopy and flow dialysis, an apparent K_D of about 25 μ M was obtained for Ca^{2+} binding to E/EC12 [19], in contrast to 460 μ M estimated from circular dichroism measurements [13]. On the other hand, two Ca^{2+} binding sites with a K_D of 330 μ M and a third binding site with a much higher K_D of 2 mM were calculated from equilibrium dialysis of the same E-cadherin fragment [13]. All these different methodologies rely on indirect or global/overall measurements which could therefore explain this discrepancy. On the contrary, ESI-MS provide direct visualization of all distinct species that are in equilibrium in solution. In particular, the detection of different stoichiometries coexisting in solution clearly showed that the binding of three Ca^{2+} ions occurred with cooperativity. This cooperativity, suggested by structural data [27, 29], was thought to be conditioned by cadherin dimeric organization [19]. In addition, by directly visualizing molecular complexes, our ESI-MS data showed that this binding takes place on the E/EC12 in its monomeric state.

In the present study the mean K_D value measured for the outermost binding pocket (\sim 23 μ M) agrees with fluorescence spectroscopy and flow dialysis measurements [19] and strongly suggests that in physiological conditions this binding pocket is saturated, arguing against a physiological regulation of cadherin activity by Ca^{2+} binding in this pocket.

Mutations of any amino acids involved in Ca^{2+} binding profoundly modify the properties of the whole binding pocket. We chose to perform site-directed mutagenesis in changing Asp103 to Ala, an amino acid involved in the binding of Ca^{2+}_1 and Ca^{2+}_2 [29] and which has, in cell aggregation assays, a major role in the adhesive function of the full-length E-cadherin [38]. This mutation not only diminished the mean binding affinity (K_D from 25 μ M for E/EC12 to about 230 μ M for E/D103A) but also abrogated the cooperative properties of Ca^{2+} fixation (Hill coefficient from 2.3 for E/EC12 to 1.0 for E/D103A). This strongly suggests that these binding parameters participate to cadherin conservation, possibly by exerting a selective pressure through evolution.

How does this cooperative binding influence the structural properties. Ca²⁺ binding participates to the cadherin structure. At the interdomain zones, Ca²⁺ ions, complexed at the interface between two consecutive domains, stabilize the otherwise flexible hinge region between domains [29]. It then imposes a shape to the molecule, favoring an elongated, rigid rod-like configuration, which turns into a collapse structure below 50 μM Ca²⁺ [16, 27]. These structural modifications provide one of the hallmark features of cadherins, that is their resistance to proteolytic degradation in the presence of Ca²⁺ [37].

As expected, Ca²⁺ binding to E/EC12 stabilized the functional cadherin structure, which is then protected from proteolytic degradation in a Ca²⁺ dependent manner. Interestingly Ca²⁺ ions also bind to the E/D103A fragment. Thus, at millimolar Ca²⁺ concentrations, a consequent fraction of both protein populations has three or more ions bound. However no effective Ca²⁺ protection of E/D103A from proteolysis was observed, (even though many Ca²⁺ ions are bound). These data showed that Ca²⁺ binding is not sufficient to protect cadherin from trypsin degradation, indicating that ions have to be bound in a specific manner, i.e. cooperatively, to induce a very precise protein configuration.

Both apo-proteins have similar structural properties, still displaying a β-barrel structure for individual cadherin domains, as indicated by the analysis of E/EC12 and E/D103A secondary structure by circular dichroism spectroscopy. Reversible Ca²⁺ binding markedly affected only E/EC12, while E/D103A was not significantly modified. These changes were recently localized to the interdomain region of E-cadherin domains [39].

Together with previous structural data, this cooperative Ca²⁺ binding and folding modifications could be easily explained. In absence of Ca²⁺, it has been shown that the hinge region between EC1 and EC2 is highly flexible. Therefore, the binding of Ca²⁺ ions probably begins on an "open site", on the surface of one module. The complementary surface of the Ca²⁺ binding site brought by the adjacent module, owing to the flexibility of the hinge region, could complete this Ca²⁺ binding. Then, the fixation of a first Ca²⁺ ion, by reducing the relative mobility of the two modules (with respect to one another), could facilitate the formation of more efficient second and third Ca²⁺ binding sites, allowing a mean cooperative binding. Indeed, by analyzing the establishment of this folding with time, we observed that E/EC12 needs about 20 min to be fully folded following Ca²⁺ addition (circular dichroism, data not shown)

Altogether, these data clearly showed that only the wild type cadherin which binds Ca²⁺ ions in a cooperative manner is able to induce the "mature" structural arrangement, characterized by trypsin resistance, with a specific spatial organization of its modules, active on the full-length protein.

Does the calcium binding regulate cadherin fonction ?
Numerous studies have addressed this important physiologically

question of how Ca²⁺ binding contributes to the cadherin-mediated control of cell adhesion. Ca²⁺ binding is of crucial importance for the functioning of E-cadherin and its depletion from the extracellular medium gives rise to a rapid dissociation of cell-cell contacts. It was then proposed a two-step based on electron microscopy studies model in which lateral (or cis-) dimers form first and are a prerequisite for adhesive (or trans-) dimers. Low Ca²⁺ concentrations were sufficient to preserve the global rod-like shape of the E-cadherin ectodomain (>0.05 mM), but higher concentrations were required for cis-interactions (> 0.5 mM) and trans-interactions (> 1 mM).

The rigidification of the cadherin multimodular extracellular segment most probably provides a better exposure of binding active sites at the cell surface, thus favouring trans interactions between cadherins. Such a phenomenon has already been observed for other adhesive molecules such as selectins. We have recently revealed that four interactions of very distinct stability take place along the E-cadherin extracellular segment. These interactions involve the different cadherin modules, and their adjustment most probably requires a very fine and precise geometry of this segment which could be mediated by Ca²⁺ fixation.

It is known that different single amino acid substitutions in the Ca²⁺ binding sites are known to inactivate the adhesive properties of E-cadherin. The Asp103 is essential for the functioning of the entire molecule, as other amino acids part of this Ca²⁺ binding pocket such as Asp134, and related sites of comparable importance in the repeating domains of the molecule [38]. Surprisingly, these substitutions created a much stronger effect on the adhesive function compared with the rather moderate effect on protein structure. The mean Ca²⁺ binding parameter measured in the present study for the EC12 binding pocket is similar to the global value obtained by Koch et al. for the four binding pockets of the full-length E-cadherin extracellular segment. Since the amino acids involved in Ca²⁺ binding are sequence features of the cadherin motif [12], our findings might be relevant to other members of the cadherin gene family.

Different studies showed that Ca²⁺ binding is implicated in the activation of the adhesive interface. More precisely Ca²⁺ ions have been implicated in cadherin dimerization as well as in the docking of Trp2 leading to the adhesive interface via cis- dimer formation [9, 14]. Two distinct dimeric E-cadherin complexes formed by either cis- or trans- interactions have been identified. Cis- dimers have been observed on EC12 crystals, with Ca²⁺ ions promoting the lateral interaction of cadherin fragments by dimerization [15, 29] and reticulation leading to the lattice assembly of adhesive plaques [19]. Lateral Ca²⁺-dependent interactions were underscored by experiments with recombinant E-cadherin fragments, which could be dimerized at high protein concentration in solution [13] and by experiments with E-cadherin COMP chimeras [27]. Takeda used chemical cross-linking studies to show

that calcium ions promote cis dimer formation of E-cadherin molecules in vivo [40]. Finally, a recent detailed NMR spectroscopy based study also demonstrated an effect of Ca^{2+} on dimerization, and possibly on higher-order oligomerization, and stressed the requirement of both high Ca^{2+} and high protein concentrations for cadherin interactions beyond dimer formation [39]. These results conflict with the study of Chitaev and Troyanovski suggesting that cis- dimer formation does not depend on Ca^{2+} whereas trans-dimer formation required Ca^{2+} [41]. Moreover removal of Ca^{2+} ions from the growth medium caused immediate disappearance of the adhesive dimers at 37°C, whereas the same treatments did not affect these dimers in solution or in living cells at 4°C. Ca^{2+} ions are thus of major importance in the molecular mechanism of adhesion and could be a regulatory factor in the homophilic interaction of cadherins. Local changes in Ca^{2+} concentrations could influence the cadherins adhesive properties. The present study showed that physiological conditions are more than sufficient to saturate the EC12 Ca^{2+} binding pocket. Alternatively, Ca^{2+} may in fact be directly involved in the interaction between molecules from neighbouring cells [42]. Obviously an interaction of this type would also be abolished by a mutation that abolished Ca^{2+} binding. This does not exclude the possibility that there are other sites involving Ca^{2+} regulation of comparable importance in the scaffolding of adhesive plaques. Indeed most functional studies have been performed at millimolar Ca^{2+} concentrations. Strikingly, a large number of trans interactions in ECAD-COMP could be only observed at physiological (or higher) Ca^{2+} concentrations. Hence, small changes in Ca^{2+} concentration might be able to regulate cadherin interactions. Notably, transient decrease in the extracellular Ca^{2+} concentration in the synaptic cleft weakened cadherin interactions [43]. Altogether, these observations support the assumption that the Ca^{2+} sensitivity of cadherin-dependent adhesion is based on mechanisms other than simple dissociation of the adhesion cadherin complexes in the absence of Ca^{2+} [6]. Cell adhesion is based on protein-protein recognition. A detailed knowledge of how Ca^{2+} is involved in cadherin adhesive interaction at the unimolecular level will be of major interest.

References

- [1] Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* **1995**, 7, 619-27.
- [2] Brieher, W. M.; Yap, A. S.; Gumbiner, B. M. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol.* **1996**, 135, 487-96.
- [3] Kemler, R. Classical cadherins. *Semin Cell Biol.* **1992**, 3, 149-55.
- [4] Steinberg, M. S.; McNutt, P. M. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* **1999**, 11, 554-60.
- [5] Nagafuchi, A. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol.* **2001**, 13, 600-3.
- [6] Shapiro, L.; Fannon, A. M.; Kwong, P. D.; Thompson, A.; Lehmann, M. S.; Grubel, G.; Legrand, J. F.; Als-Nielsen, J.; Colman, D. R.; Hendrickson, W. A. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* **1995**, 374, 327-37.
- [7] Steinberg, M. S.; McNutt, P. M. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* **1999**, 11, 554-60.
- [8] Stewart, D. B.; Barth, A. I.; Nelson, W. J. Differential regulation of endogenous cadherin expression in Madin-Darby canine kidney cells by cell-cell adhesion and activation of beta -catenin signaling. *J Biol Chem.* **2000**, 275, 20707-16.
- [9] Koch, A. W.; Bozic, D.; Pertz, O.; Engel, J. Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol.* **1999**, 9, 275-81.
- [10] Overduin, M.; Harvey, T. S.; Bagby, S.; Tong, K. I.; Yau, P.; Takeichi, M.; Ikura, M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science.* **1995**, 267, 386-9.
- [11] Nose, A.; Nagafuchi, A.; Takeichi, M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell.* **1988**, 54, 993-1001.
- [12] Nollet, F.; Kools, P.; van Roy, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* **2000**, 299, 551-72.
- [13] Koch, A. W.; Pokutta, S.; Lustig, A.; Engel, J. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry.* **1997**, 36, 7697-705.
- [14] Pertz, O.; Hahn, K. M. Designing biosensors for Rho family proteins--deciphering the dynamics of Rho family GTPase activation in living cells. *J Cell Sci.* **2004**, 117, 1313-8.
- [15] Tomschy, A.; Fauser, C.; Landwehr, R.; Engel, J. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *Embo J.* **1996**, 15, 3507-14.
- [16] Pokutta, S.; Herrenknecht, K.; Kemler, R.; Engel, J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem.* **1994**, 223, 1019-26.
- [17] Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* **1991**, 251, 1451-5.
- [18] Boggon, T. J.; Murray, J.; Chappuis-Flament, S.; Wong, E.; Gumbiner, B. M.; Shapiro, L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science.* **2002**, 296, 1308-13.
- [19] Alattia, J. R.; Ames, J. B.; Porumb, T.; Tong, K. I.; Heng, Y. M.; Ottensmeyer, P.; Kay, C. M.; Ikura, M. Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding. *FEBS Lett.* **1997**, 417, 405-8.
- [20] Doherty-Kirby, A. L.; Lajoie, G. A. Investigation of calcium-binding proteins using electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* **2002**, 173, 161-74.

- [21] Loo, J. A. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **16**, 1-23. (1997).
- [22] Loo, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International journal of mass spectrometry* **200**, 175-186 (2000).
- [23] Heck, A. J. & Van Den Heuvel, R. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **23**, 368-89. (2004).
- [24] Hu, P.; Ye, Q. Z.; Loo, J. A. Calcium stoichiometry determination for calcium binding proteins by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* **1994**, 66, 4190-4.
- [25] Rogniaux, H.; Sanglier, S.; Strupat, K.; Azza, S.; Roitel, O.; Ball, V.; Tritsch, D.; Branlant, G.; Van Dorsselaer, A. Mass spectrometry as a novel approach to probe cooperativity in multimeric enzymatic systems. *Anal Biochem.* **2001**, 291, 48-61.
- [26] Chevreux, G.; Potier, N.; Van Dorsselaer, A.; Bahloul, A.; Houdusse, A.; Wells, A.; Sweeney, H. L. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Studies of Noncovalent Myosin VI Complexes Reveal a New Specific Calmodulin Binding Site. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2005**, 23, 23.
- [27] Pertz, O.; Bozic, D.; Koch, A. W.; Fauser, C.; Brancaccio, A.; Engel, J. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J.* **1999**, 18, 1738-47.
- [28] Ganem, B.; Li, Y.; Henion, J. D. Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1991**, 113, 6294-6296.
- [29] Nagar, B.; Overduin, M.; Ikura, M.; Rini, J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature.* **1996**, 380, 360-4.
- [30] Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, 219, 39-62.
- [31] Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. Probing Conformational Changes in Proteins by Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc.* **1990**, 112, 9012-9013.
- [32] Konermann, L.; Douglas, D. J. Unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: a comparison of positive and negative ion modes. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1998**, 9, 1248-54.
- [33] Chazin, W.; Veenstra, T. D. Determination of the Metal-binding Cooperativity of Wild-type and Mutant Calbindin D9K by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1999**, 13, 548-555.
- [34] Venters, R. A.; Benson, L. M.; Craig, T. A.; Paul, K. H.; Kordys, D. R.; Thompson, R.; Naylor, S.; Kumar, R.; Cavanagh, J. The effects of Ca(2+) binding on the conformation of calbindin D(28K): a nuclear magnetic resonance and microelectrospray mass spectrometry study. *Anal Biochem.* **2003**, 317, 59-66.
- [35] Veenstra, T. D.; Johnson, K. L.; Tomlinson, A. J.; Kumar, R.; Naylor, S. Correlation of Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy with Electrospray Ionization Mass Spectrometry in the Determination of Tertiary Conformational Changes in Calcium-binding Proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1998**, 613-619.
- [36] Craig, T. A.; Veenstra, T. D.; Naylor, S.; Tomlinson, A. J.; Johnson, K. L.; Macura, S.; Juranic, N.; Kumar, R. Zinc binding properties of the DNA binding domain of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor. *Biochemistry.* **1997**, 36, 10482-91.
- [37] Nose, A.; Tsuji, K.; Takeichi, M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell.* **1990**, 61, 147-55.
- [38] Handschuh, G.; Luber, B.; Hutzler, P.; Hofler, H.; Becker, K. F. Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J Mol Biol.* **2001**, 314, 445-54.
- [39] Haussinger, D.; Ahrens, T.; Sass, H. J.; Pertz, O.; Engel, J.; Grzesiek, S. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *J Mol Biol.* **2002**, 324, 823-39.
- [40] Takeda, H.; Shimoyama, Y.; Nagafuchi, A.; Hirohashi, S. E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat Struct Biol.* **1999**, 6, 310-2.
- [41] Chitaev, N. A.; Troyanovsky, S. M. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol.* **1998**, 142, 837-46.
- [42] Ringwald, M.; Schuh, R.; Vestweber, D.; Eistetter, H.; Lottspeich, F.; Engel, J.; Dolz, R.; Jahng, F.; Epplen, J.; Mayer, S.; et al. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *Embo J.* **1987**, 6, 3647-53.
- [43] Tanaka, H.; Shan, W.; Phillips, G. R.; Arndt, K.; Bozdagi, O.; Shapiro, L.; Huntley, G. W.; Benson, D. L.; Colman, D. R. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron.* **2000**, 25, 93-107.

Legends

Figure 1: Structure of the E-cadherin outermost Ca^{2+} binding site, inclosed between E/EC1 and E/EC2, PDB 1EDH [29]. The EC modules are represented in blue ribbons, Ca^{2+} ions in green and binding residues in red balls and sticks. The enlargement of the binding site helped to visualize the different amino acids involved in calcium binding and the Asp103 is colored in yellow.

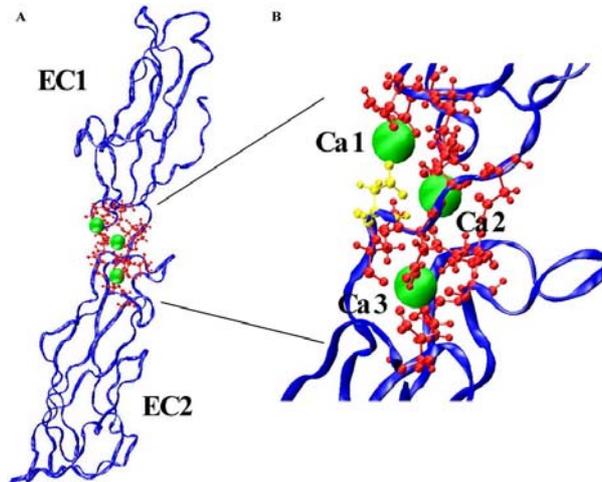


Figure 2 : Characterization of the purified cadherin fragments. The purity of the following cadherin fragments E/EC1-2 and E/D103A was analyzed by migration on 15% SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining (a). These protein fragments were then characterized by Western Blotting using (b) a monoclonal antibody specific for the E-cadherin EC1 domain (ECCD2), and (c) a polyclonal antibody against the histidine tag present at the C-terminal end (H15, Santa Cruz Biotechnology).

ESI mass spectra of E/EC1-2 and E/D103A in both denaturing and non-denaturing conditions (respectively (d) and (e)). The spectra revealed (d) a unique and homogeneous compound of 25308.7 ± 1.0 Da which corresponded to of the E/EC1-2 construct ($MW_{\text{theo}} = 25308.2$ Da); (e) a unique compound of 25263.3 ± 1.0 Da which corresponded to the E/D103A construct ($MW_{\text{theo}} = 25264.2$ Da). A small peak corresponding to one β -mercaptoethanol adduct was also visible ($\Delta m = 76$ Da).

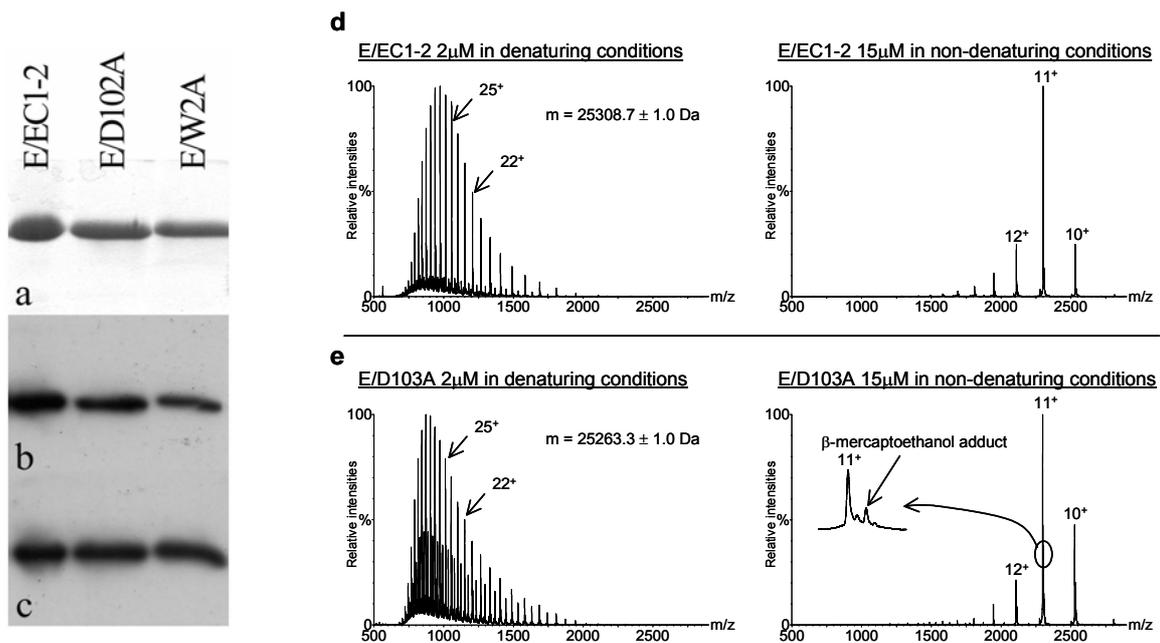


Figure 3: Ca^{2+} binding stoichiometries for E/EC1-2 and E/D103A using ESI-MS in non-denaturing conditions. Spectra shown were deconvoluted using the “transform” function provided by the MassLynx software. The experiments presented in this panel were performed at 15 μM protein incubated with 0, 45, 90 μM Ca^{2+} for E/EC1-2 and 0, 90, 180 μM Ca^{2+} for E/D103A respectively. Three Ca^{2+} ions bind preferentially to E/EC1-2, this preferential Ca^{2+} binding stoichiometry suggests a cooperative binding. Contrary to E/EC1-2, Ca^{2+} binding is completely statistical for E/D103A, suggesting a suppression of the cooperativity effect by mutation.

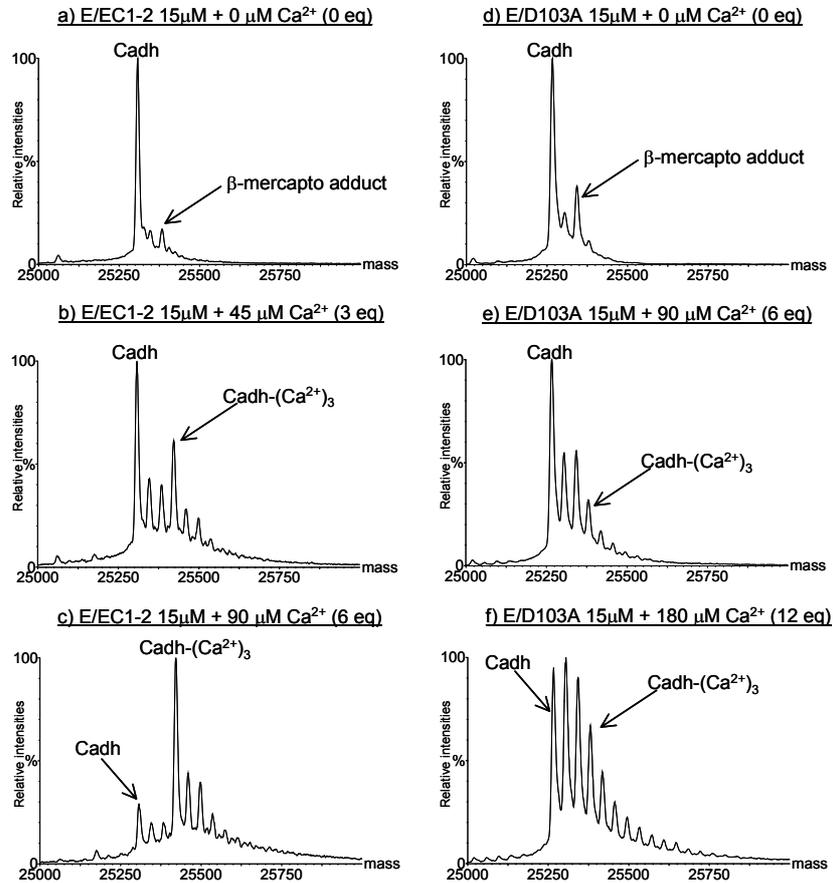


Figure 4: Graphic representation of the saturation rate of both constructs against the free Ca^{2+} concentration. Ca^{2+} titrations were monitored by ESI-MS in non-denaturing conditions. In each case, we calculated the Hill constant (from a non-linear fit) and the apparent dissociation constant (Ca^{2+} free concentration at half saturation).

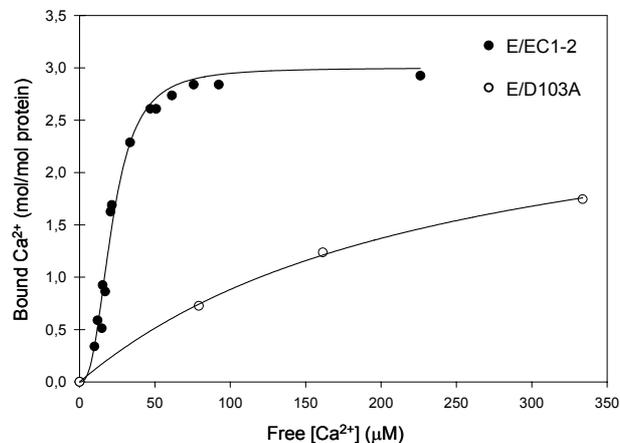


Figure 5: ESI mass spectra of E/EC1-2 and E/D103A in non-denaturing conditions. The experiments were performed in AcNH₄ 50 mM at 15 μM protein. a) E/EC1-2 without add of Ca²⁺, b) E/EC1-2 + 90 μM Ca²⁺ (6eq.), c) E/D103A without add of Ca²⁺, d) E/D103A + 360 μM Ca²⁺ (24 eq.). Ca²⁺ depleted E/EC1-2 and E/D103A fragments (a and c) exhibited the same charge state distribution (main peak charged 11⁺): the point mutation did not disturb the protein charge state distribution compared to the wild type protein. The charge state distribution of [E/EC1-2-(Ca²⁺)₃] species shifted by one charge (12⁺) whereas no change was observed for [E/D103A-(Ca²⁺)₃] (b and d).

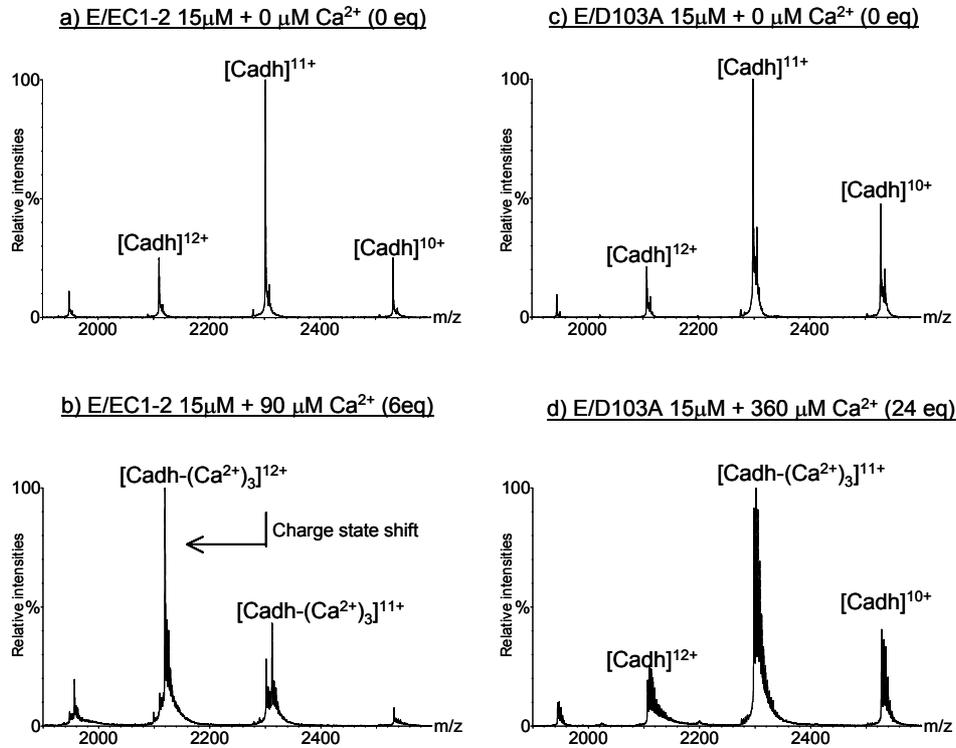


Figure 6: Binding specificity of divalent ions on E/EC1-2 evidenced by ESI-MS in non-denaturing conditions. Spectra shown were deconvoluted using the “transform” function provided by MassLynx software. Several divalent ions (Ca²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺) were tested at a concentration of 135 μM (9eq.) and for a protein concentration of 15 μM. In these conditions, only Ca²⁺ binding occurred, the main species corresponding to the [E/EC1-2-(Ca²⁺)₃] complex. No binding of Cd²⁺ (MW = 110 Da) and negligible adducts of Mg²⁺ (MW = 22 Da) and Mn²⁺ (MW = 53 Da) were observed.

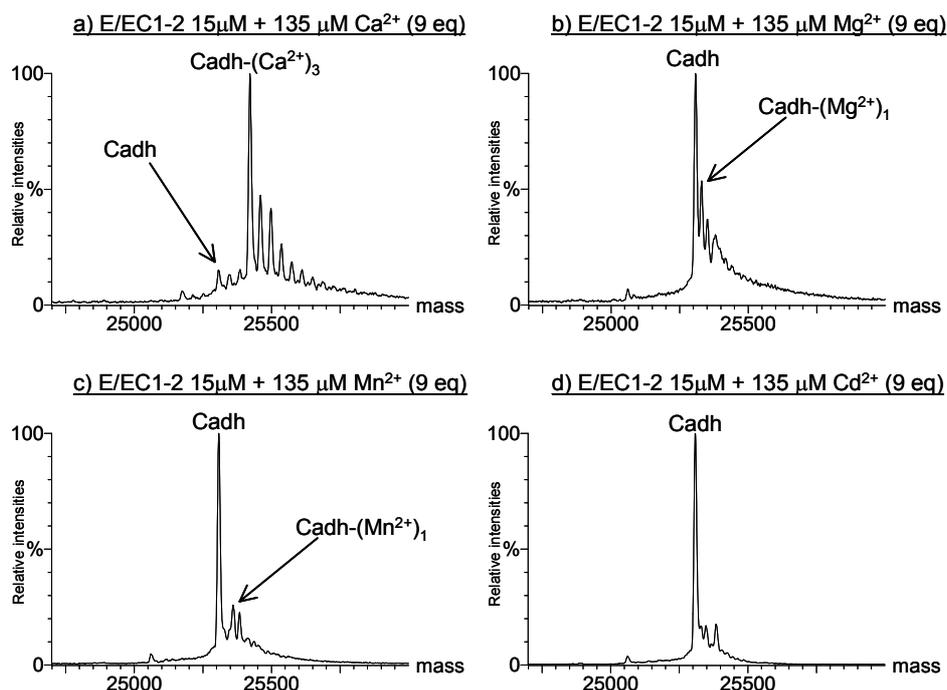


Figure 7: Influence of Ca^{2+} on biochemical properties of E/EC1-2 (A), and E/D103A (B) measured by trypsin resistance. Proteins, were incubated with different Ca^{2+} concentrations, 1 hour at 37°C , in presence of trypsin, and then analyzed by 15% SDS-PAGE. Lane (T) corresponded to the protein incubated without trypsin addition. Ca^{2+} concentrations used in the incubation are mentioned under each following lane. The positive control of trypsin digestion corresponded to condition where proteins were digested in presence of EDTA (E). E/EC1-2 was protected from proteolysis when calcium concentration was higher than 0.2 mM, while E/D103A was never protected, even in presence of 20 mM Ca^{2+} .

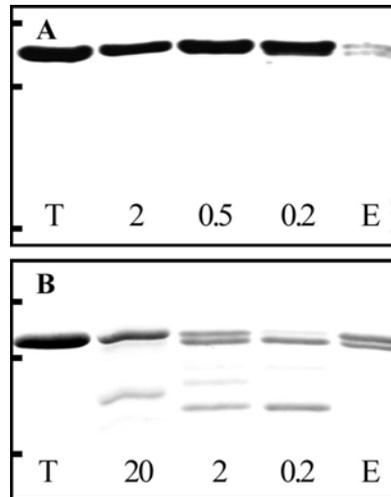
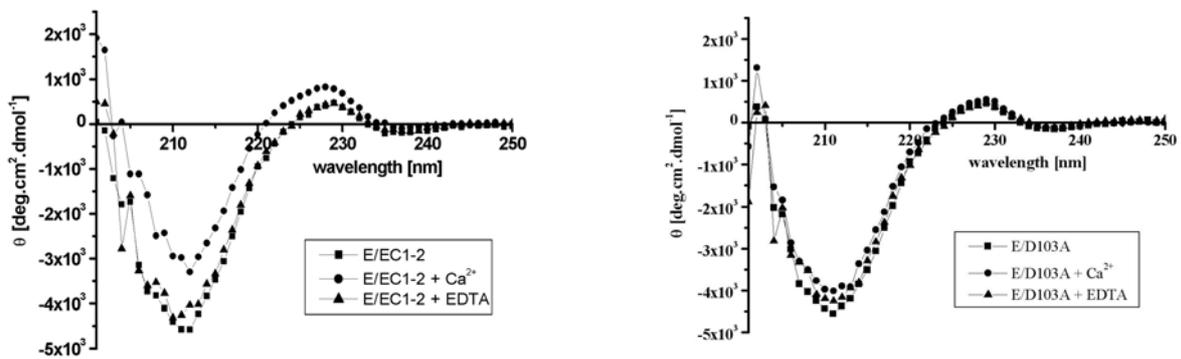


Figure 8: Influence of Ca^{2+} on the folding of E/EC1-2 (a) and E/D103A (b) probed by circular dichroism. The mean molar residue ellipticity spectra were plotted for each following conditions: Ca^{2+} depleted solution, after addition of 1 mM Ca^{2+} solution and after addition of 2 mM EDTA. E/EC1-2 structure was reversibly modulated by Ca^{2+} , while E/D103A structure was not influenced by Ca^{2+} .



III. Etude du mécanisme de réduction de plusieurs méthionine sulfoxyde réductases (msr) par la thiorédoxine « Cette étude a été menée en collaboration avec Mathias Antoine, Alexandre Olry et Guy Branlant (MAEM, Nancy) »

1. Contexte biologique

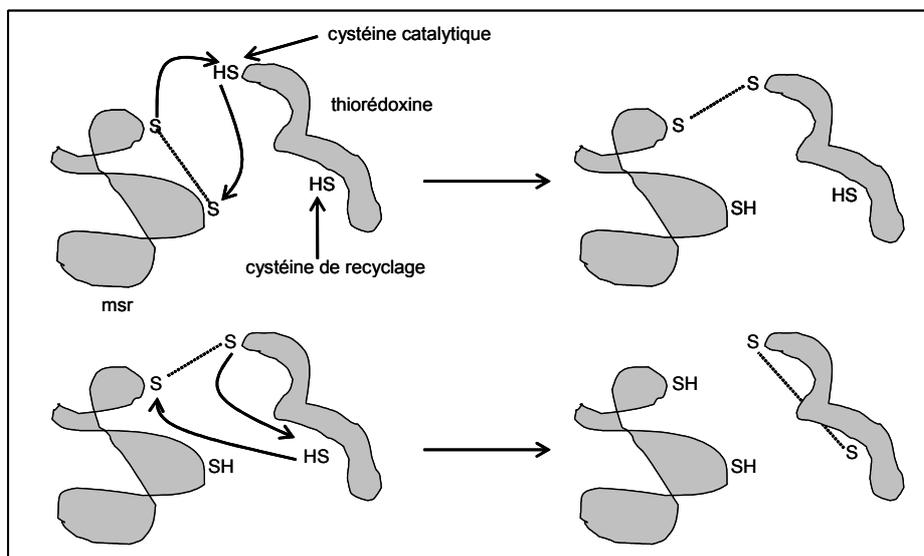
L'oxydation de la méthionine (met) en méthionine sulfoxyde (metSO) constitue un mécanisme de modification post-traductionnel non enzymatique des protéines. Cette modification est décrite comme étant impliquée dans l'étape de reconnaissance des protéines non fonctionnelles à dégrader (Hokenson et coll. **2004**) ou dans des mécanismes de régulation de la fonction de certaines protéines [Ciorba et coll. **1999**].

Les méthionine sulfoxyde réductases (msr) appartiennent à une famille de protéines, catalysant la réaction de réduction de protéines metSO en met [Brot et coll. **1981**]. Ces protéines sont étroitement liées au stress oxydant et contribuent à la régénération des protéines oxydées [Moskovitz **2005**]. Parmi la famille des msr, la msrA et la msrB partagent un mécanisme catalytique identique via la formation d'un acide sulfénique. Ce mécanisme se décompose en au moins trois étapes [Boschi-Muller et coll. **2000**, Olry et coll. **2002**] :

- La formation de l'acide sulfénique sur la cystéine catalytique.
- La formation d'un pont disulfure intra-moléculaire via l'attaque de la cystéine de recyclage sur l'intermédiaire sulfénique.
- La réduction du pont disulfure par la thiorédoxine (une petite protéine ubiquitaire).

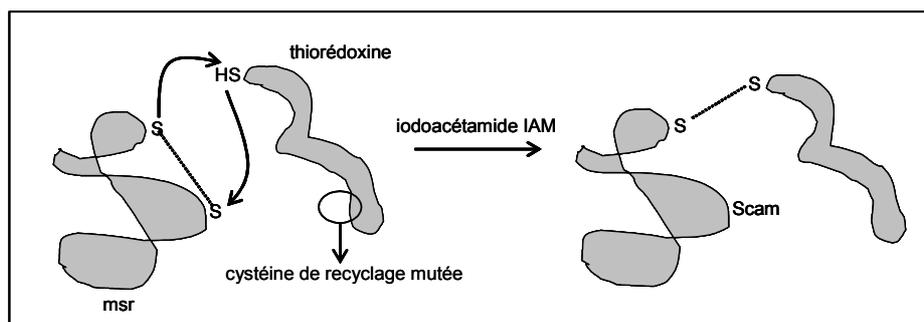
La réaction de réduction des msr par la thiorédoxine constitue toutefois une étape méconnue. En effet, cette réaction de réduction nécessite une étape de reconnaissance entre les deux protéines. Bien que la cystéine catalytique (qui réagit en premier) de la thiorédoxine soit connue, on ne connaît pas quelle est la cystéine de la msr attaquée en premier lors du mécanisme de réduction (cf. Figure 15).

Figure 15 : Illustration du mécanisme général de réduction d'une msr par la thiorédoxine.



Une manière de caractériser au niveau moléculaire, la reconnaissance et l'interaction de la thiorédoxine avec les msr, consiste à former un complexe covalent stable, représentatif de l'interaction intermédiaire entre la thiorédoxine et la msr. Pour cela, la cystéine de recyclage (qui réagit en second) de la thiorédoxine est substituée en sérine (cf. Figure 16).

Figure 16 : La mutation de la cystéine non réactive de la thiorédoxine permet d'obtenir un intermédiaire réactionnel. La synthèse de cet intermédiaire réactionnel demeure cependant compliquée du fait de la compétition avec la cystéine non réactive de la msr et la cystéine réactive de la thiorédoxine. Pour empêcher cette compétition, la cystéine de la msr doit être carbamidométhylée durant la synthèse.



L'objectif de ce travail est de définir, dans les cas des msr A et B, quelle est respectivement la cystéine impliquée dans le pont disulfure, à partir d'un complexe covalent purifié, représentatif de l'intermédiaire réactionnel.

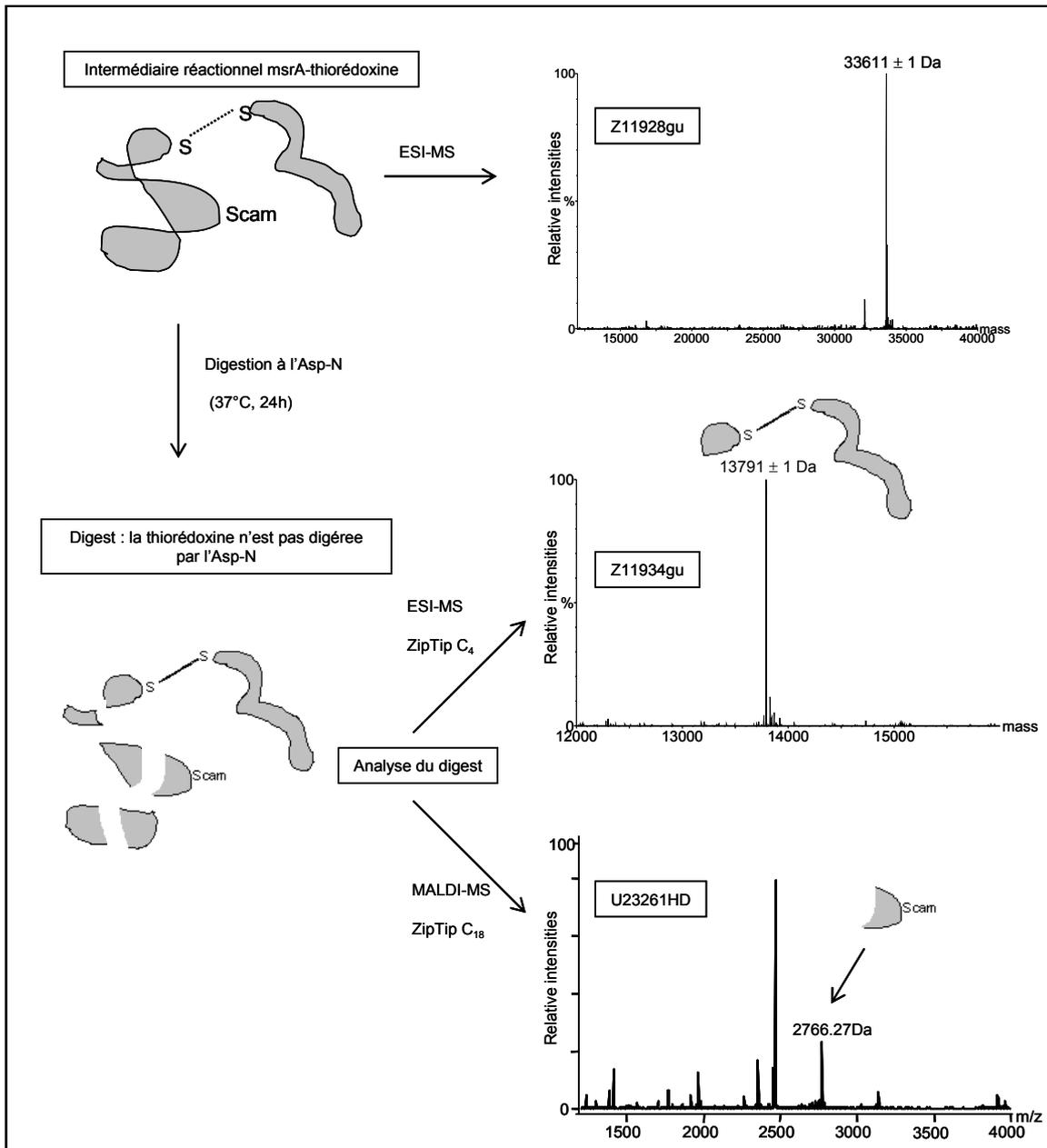
Lorsque la cystéine de la msr, qui n'est pas engagée dans le pont disulfure avec la thiorédoxine sera connue, il sera possible de la substituer en sérine, afin d'augmenter le rendement de production du complexe artificiel. La production en grande quantité de ce complexe intermédiaire permettra, à partir d'études cristallographiques, de déterminer le mécanisme de reconnaissance entre ces protéines.

2. Localisation de l'interaction msr-thioredoxine

Afin de caractériser l'interaction covalente msr-thioredoxine par SM, nous avons utilisé une approche par digestion enzymatique. L'identification par SM des résidus issus de la digestion permet de conclure sur la localisation de la cystéine impliquée dans le pont disulfure (cf. Figure 17).

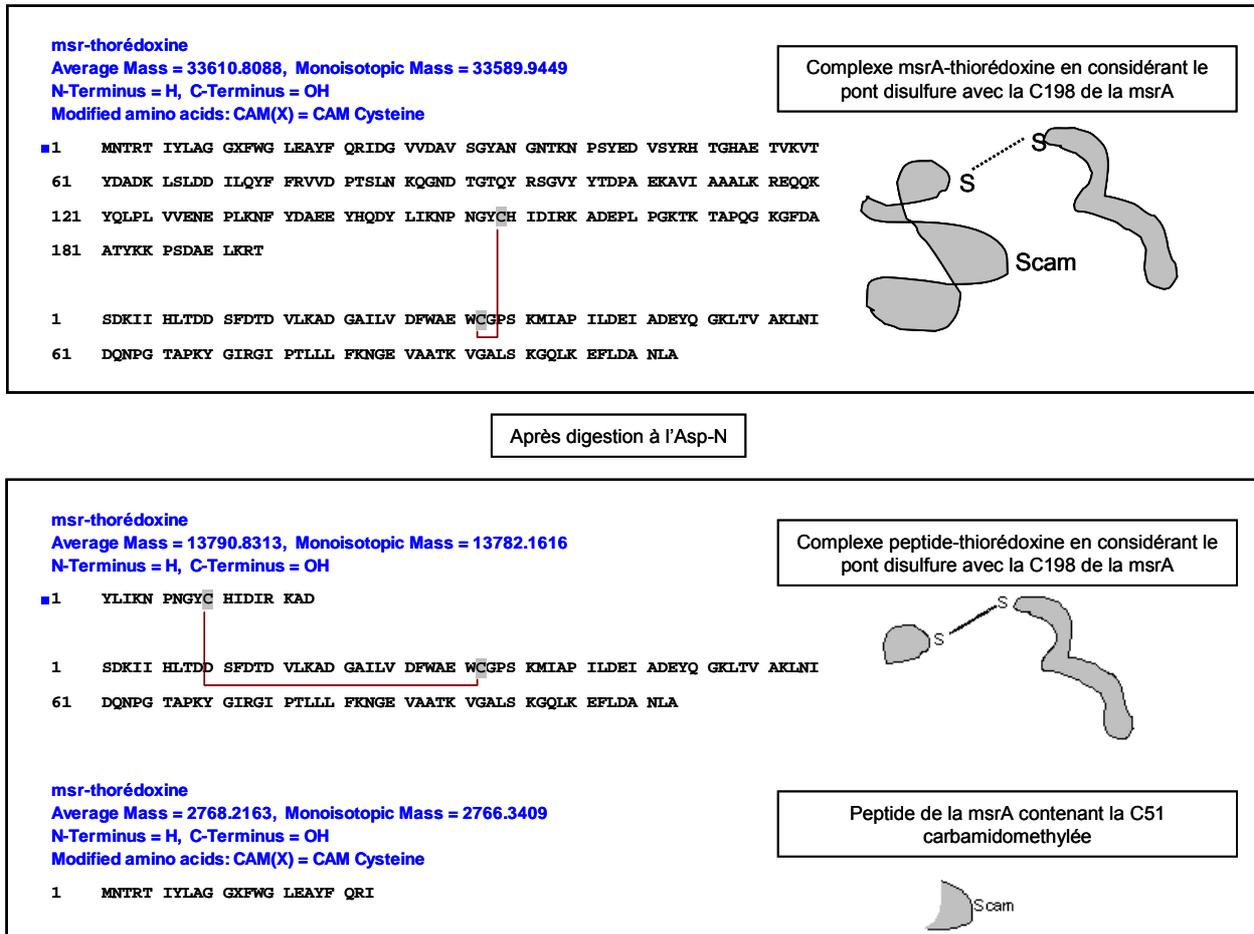
Figure 17 : Exemple de l'approche utilisée pour localiser le pont disulfure de l'intermédiaire réactionnel msrA-thiorédoxine. Le complexe est soumis à une digestion enzymatique par l'Asp-N, puis le digest est analysé successivement par MALDI-MS et ESI-MS. Expérimentalement, la thiorédoxine n'est pas digérée par l'Asp-N. Ainsi, il est possible de déduire la localisation du pont disulfure après digestion grâce à :

- 1) la masse du peptide contenant la carbamidométhylation (obtenue par MALDI-MS)
- 2) la masse du complexe peptide-thiorédoxine (obtenue par ESI-MS)



A partir des séquences en acide aminé des protéines, il est possible de simuler la digestion enzymatique par l'Asp-N et déduire théoriquement les masses obtenues. Suivant la localisation du pont disulfure, les masses théoriques calculées après digestion sont différentes. Il suffit ensuite de comparer ces masses théoriques avec les masses expérimentales afin de déduire la localisation du pont disulfure (cf. Figure 17 et 18).

Figure 18 : Illustration des masses théoriques obtenues dans le cas du complexe msrA-thiorédoxine en considérant le pont disulfure avec la C198 de la msrA. Les masses théoriques calculées correspondent aux masses déduites expérimentalement (cf. Figure 17) : la C198 de la msrA réalise le pont disulfure avec la thiorédoxine.



En appliquant cette méthode, nous avons localisé le pont disulfure des complexes impliquant la thiorédoxine et les msr A et B.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'une préparation de publication : « The recycling of methionine sulfoxide reductases A and B by thioredoxin differs in the nature of the transient intermolecular disulfide species ».

PUBLICATION

« The recycling of methionine sulfoxide reductases A and B by thioredoxin differs in the nature of the transient intermolecular disulfide species »

Mathias Antoine, Alexandre OLRY, Guillaume CHEVREUX, Sandrine BOSCHI-MULLER, Noelle POTIER, Alain
VAN DORSSELAER and Guy BRANLANT

Article en préparation

The recycling of methionine sulfoxide reductases A and B by thioredoxin differs in the nature of the transient intermolecular disulfide species.

Mathias Antoine¹, Alexandre OLRY¹, Guillaume CHEVREUX², Sandrine BOSCHI-MULLER¹, Noelle POTIER², Alain VAN DORSSELAER²
and Guy BRANLANT^{1*}

¹ UMR CNRS-UHP 7567 - Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire - Faculté des Sciences, Bld. des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

² UMR CNRS 7512, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, Cedex 2, France.

Running title: Msr-Trx transient disulfide species

* corresponding author: phone: (33) 3 83 68 43 04; fax: (33) 3 83 68 43 07; e-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr

Abstract

Oxidation of methionine into methionine sulfoxide is associated with many pathologies and is described to exert regulatory effects on protein functions. Two classes of methionine sulfoxide reductases, called MsrA and MsrB, have been described to reduce the S and the R isomers of the sulfoxide of methionine sulfoxide back to methionine, respectively. Although MsrAs and MsrBs display quite different x-ray structures, they share a similar, new catalytic mechanism that proceeds via the sulfenic acid chemistry and that includes at least three chemical steps with 1) the formation of a sulfenic acid intermediate and the concomitant release of methionine; 2) the formation of an intra-disulfide bond; and 3) the reduction of the disulfide bond by thioredoxin (Trx).

In the present study, in parallel to kinetic based-method, we used mass spectrometry (MS) to identify the cysteine of oxidized Msrs that forms a transient inter-disulfide bond with Cys32 of Trx. The MS analyses show that it is the recycling cysteine in MsrA which forms a transient inter-disulfide bond while it is the catalytic one which is involved in MsrB. These results, which do not correlated with those predicted from the alternative methods based on kinetic criteria, are discussed in relation with the three-dimensional structures of Msrs described so far.

Abbreviations

MetSO, methionine sulfoxide; Msr, MsrA, and MsrB, methionine sulfoxide reductase, methionine sulfoxide reductase A, methionine sulfoxide reductase B, respectively; Trx, thioredoxin; DTT, dithiothreitol; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; DTNB, dithionitrobenzoate; TNB-, thionitrobenzoate; IAM, iodoacetamide; MS, mass spectrometry; ESI-MS and ESI-TOF, electrospray ionization-mass spectrometry and electrospray ionization-time of flight, respectively; MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

Introduction

Oxidation of methionine into methionine sulfoxide (MetSO) is associated with many pathologies (Hokenson *et al.*, 2004) and is described to exert regulatory effects on protein functions (Ciorba *et al.*, 1999). Methionine sulfoxide reductases (Msr) are a family of enzymes that catalyses the reduction of protein-MetSO back to Met (Brot *et al.*, 1981). Two classes of Msrs, named MsrA and MsrB, are described so far that are specific for the S and the R-isomers at the sulfur of MetSO, respectively (Sharov *et al.*, 1999); (Moskovitz *et al.*, 2000); (Grimaud *et al.*, 2001); (Olry *et al.*, 2002). They share a similar catalytic mechanism that proceeds *via* the sulfenic acid chemistry and includes at least three chemical steps with 1) formation of a sulfenic acid intermediate on the "catalytic" Cys with a concomitant release of one mole of Met per mole of Msr, 2) formation of an intra disulfide bond *via* the attack of the "recycling" Cys on the sulfenic acid intermediate; and 3) reduction of the disulfide bond by thioredoxin (Trx), the rate of which is rate-limiting in the overall mechanism (Boschi-Muller *et al.*, 2000); (Olry *et al.*, 2002). The kinetic data of the Trx-recycling process are in favor of formation of a complex between oxidized MsrA/B under disulfide state and reduced Trx that therefore supports the existence of specific interactions between the two partners (Antoine *et al.*, 2003); (Olry *et al.*, 2004).

Inspection of the X-ray structures of the reduced forms of MsrA and MsrB shows that the two classes are structurally-unrelated. MsrAs are composed of a central core which can be described as a rolled mixed β sheets flanked by three α -helices (Lowther *et al.*, 2000); (Tete-Favier *et al.*, 2000); (Taylor *et al.*, 2003) while the fold of MsrBs consists of antiparallel β -strands organized in two sheets that face each other and form a barrel-like core (Lowther *et al.*, 2002). The active sites of the MsrA/B are occupied by molecules that can mimic either the transition state or the substrate. What is particularly striking is that although the active sites of the Msrs A/B are both solvent exposed, the catalytic C51 in MsrA is positioned at the N-terminus part of an α -helix whereas the catalytic C117 is located in the middle of a β -strand in MsrB. In contrast, the recycling cysteines, i.e. C198/C206 in MsrA and C63/C31 in MsrB, are both located in a loop that, by its potential flexibility, can favour an efficient formation of the intra-disulfide bond. It is these two disulfide bonds within their three-dimensional context that are specifically reduced by Trx.

Trx is a small ubiquitous protein which, by its involvement in many essential cellular processes, interacts with a large number of target proteins (Lemaire *et al.*, 2004). In most of its functions, Trx acts as a disulfide oxydo-reductase, thanks to the presence of the hyper-conserved motif WC₃₂GPC₃₅ (Arner et Holmgren, 2000) A striking feature is that the Trx targets present neither sequence and/or structural homologies nor conserved binding motifs.

One way to characterize, at the molecular level, the nature of the interactions between Trx and its targets is to form a stable covalent

complex representative of the transient inter-disulfide complex that occurs upon the Trx-recycling process and then to determine its three-dimensional structure. The method usually utilized consists of substituting a serine residue for one of the two cysteines in both partners- i.e. C35 in Trx and the one in the target which is not involved in the transient inter-disulfide bond- and then to form an inter disulfide bond between the non-substituted cysteines of the two partners *via* the activation of the cysteine of the target by DTNB. However, a prerequisite to apply this strategy is to know which of the two cysteines of the target forms the transient inter disulfide bond with C32 of Trx.

The criteria which is usually applied to many Trx targets assumes that the target cysteine which forms the transient interdisulfide bond with C32 of Trx corresponds to the one that displays the highest reactivity -under a TNB⁻ activating form- with C35S Trx. Such an assumption supposes that 1) the structure of the mutated target protein, activated by a TNB⁻ molecule, is representative of that of the oxidized form of the target, the form of which is the substrate of the reduced Trx and, 2) the value of the second order kinetic rate which includes a K_s contribution is indeed representative of the reactivity of the cysteine target and is not modified by the substitution of the second cysteine by a serine.

In the present study, two methods were applied for identifying the cysteine of the oxidized Msrs that forms the transient inter-disulfide bond with Cys32 of Trx. The first one uses the approach described above and based on kinetic criteria. The second one consists of forming a mixed inter-disulfide complex between the oxidized Msrs and C35S Trx and then of stabilizing the complex by alkylation of the Msr cysteine, the one which is not involved in the transient inter-disulfide bond. The resulting binary Msr/Trx complex is then subjected to purification, proteolytic digestion and analysis by MS.

The MS analyses support a Trx-recycling process in which the MsrA recycling cysteine forms the transient inter-disulfide bond with Trx in contrast to MsrB in which the catalytic one is involved. These results are compared to those obtained from the alternative method based on kinetic criteria which was not conclusive for MsrB and are discussed in relation to what is known on the structure of the active sites of the Msrs described so far.

Material and Methods

Site-directed mutagenesis, production and purification of wild-type and mutant *N. meningitidis* MsrA and MsrB and *E. coli* Trx.

The *E. coli* strain used for all *N. meningitidis* Msr productions was BE002 (MG1655 *msrA*::spec Ω , *msrB*:: α 3kana), transformed with the plasmidic construction pSKPILBMrA or pSKPILBMrB containing the coding sequence of *msrA* or *msrB* under the *lac* promoter. The BE002 strain was kindly provided by Dr F.Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli* and thus avoided any contamination of the activity of the *N. meningitidis* Msrs by the Msrs from *E. coli*. Site-directed mutageneses were

performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Purifications of MsrA and MsrB were realised as previously described by Antoine *et al.*, 2003 and Olry *et al.*, 2002, respectively. Wild type and mutated MsrAs and MsrBs were pure, as checked by electrophoresis on 12.5 % SDS-PAGE gel, followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by ESI-MS analyses.

Storage of the enzymes was done as previously described by Olry *et al.* The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using extinction coefficient at 280 nm of 26,200 M⁻¹ cm⁻¹ and 17330 M⁻¹ cm⁻¹ for wild type and mutated MsrAs and MsrBs, respectively. In this paper, *N. meningitidis* MsrA and MsrB amino acids numbering is based on the amino acids numbering of *E. coli* MsrA and MsrB, respectively (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Thureau *et al.*, 2004).

Trx site-directed mutagenese were performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Production and purification of wild-type and C35S Trxs were realised as previously described. Wild-type and mutated Trxs were pure, as checked by electrophoresis on 15 % SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using an extinction coefficient at 280 nm of 14,500 M⁻¹ cm⁻¹ for wild-type and C35S Trxs.

Cysteine content of MsrA, MsrB and Trx was determined using DTNB under native conditions in buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) as previously described.

DTNB activation of single Cys Msrs and oxidation of wild-type Msrs

Single Cys MsrA and MsrB (i.e. C51S and C198S MsrAs and C63S and C117S MsrBs) were chemically activated by formation of a covalent TNB-Cys adduct. Activation was carried out by mixing 100 μM mutated Msr with 500 μM DTNB in buffer A. After 30 min of incubation at room temperature, activated Msr were passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with buffer A, in order to remove TNB⁻ and excess DTNB.

Wild-type Msrs oxidation was achieved by mixing 100 μM Msr with 100 mM MetSO in buffer A. The MetSO used was DL-Met-*R,S*-SO of which only the *S* isomer is a substrate for MsrA and *R* isomer is a substrate for MsrB. After 10 min of incubation at room temperature, oxidized proteins were passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column equilibrated with buffer A. Oxidation of proteins in the disulfide state was checked by titration with DTNB.

Formation and purification of covalent Msr/Trx complexes

For the formation of Msr-Trx complexes *via* a TNB⁻ activation procedure, 50 μM of oxidized Msr and 150 μM of C35S Trx were incubated at 25°C for 30 min in buffer A. Then, 10 mM iodoacetamide (IAM) was added. For MsrB, the mixture was

incubated with 1 % SDS for 10 min prior IAM addition, in order to increase the final yield of complex obtained.

The Msr-Trx complexes obtained by the alkylation procedure were formed by mixing 50 μM DTNB activating Msr with 50 μM C35S Trx in buffer A. Formation of the complexes was checked by non-reducing 12.5 % SDS-PAGE, followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.

Purification of covalent complexes was carried out by analytical gel filtration, using a Superdex 75 column fitted on an ÄKTA explorer system (Amersham Bioscience). Flow rate was 0.4 ml/min and the column was equilibrated with buffer A containing 300 mM KCl. Protein elution was followed by UV absorbance at 280 and 260 nm.

Kinetics of formation of the Msr / Trx complexes obtained by the alkylation procedure

The rate of formation of the intermolecular disulfide bond between TNB⁻ activated Msr and C35S Trx was measured spectrophotometrically by monitoring the release of TNB⁻ at 412 nm, using extinction coefficient of 13,600 M⁻¹.cm⁻¹. Experiments were carried out at 25°C on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer for the MsrA C198S mutant. For the two MsrB mutants and the MsrA C51S mutant, the rate of the reaction was measured at 25°C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for absorbance. In all cases, kinetics were measured with 7.35 μM TNB-Msr and increasing concentration of C35S Trx (from 50 to 900 μM) in buffer A. Rate constants, k_{obs} , were obtained by fitting absorbance traces with the mono exponential equation (1) in which c represents the endpoint, a , the amplitude of the absorbance increase and k_{obs} the rate constant.

$$y = a e^{-k_{obs} t} + c \quad (1)$$

Data were fit to equation (2) using least squares analysis to determine $k_{obs \max}$ and K for C35S Trx. S represents the C35S Trx concentration and K the apparent affinity constant.

$$k_{obs} = k_{obs \max} S / (K_{Trx} + S) \quad (2)$$

Msr / Trx complexes digestion and mass spectrometry (MS) analyses

Digestion of the Msr-Trx complexes was performed in solution with Asp-N (Roche, Indianapolis, USA) in 25 mM Ammonium Carbonate (Sigma, St. Louis, USA) using an enzyme concentration ratio of 1/50 (overnight, 37°C).

ESI-MS measurements were performed on an ESI-TOF (LCT, Waters, Massachusetts, USA). Nitrogen gas was used for both nebulisation and desolvation gas. Samples were continuously infused into the ESI ion source at a flow rate of 3 μl/min. Both gas and source temperature were set to 353 K. External calibration of the spectra was achieved in the positive ion mode using multiply charge ions of horse heart myoglobin (Sigma Aldrich). Samples were desalted before ESI-MS analysis using Zip Tip C₄ (Millipore, Bedford, USA) in a 1:1 water-acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% formic acid.

MALDI-MS mass measurements were carried out on UltraflexTM TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). This instrument was used at a maximum accelerating potential of 25 kV in positive ion mode and was operated in reflectron mode allowing an accuracy better than 50 ppm. The samples were prepared by standard dried droplet preparation on stainless steel MALDI targets using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix. The external calibration of MALDI mass spectra was carried out using singly charged monoisotopic peaks of a mixture of bradykinin 1-7 ($m/z=757.400$), human angiotensin II ($m/z=1046.542$), human angiotensin I ($m/z=1296.685$), substance P ($m/z=1347.735$), bombesin ($m/z=1619.822$), renin ($m/z=1758.933$), ACTH 1-17 ($m/z=2093.087$) and ACTH 18-39 ($m/z=2465.199$). Monoisotopic peptide masses were automatically annotated using Flexanalysis 2.0. Peptides were desalted before MALDI-MS mass fingerprint using Zip Tip C₁₈ (Millipore, Bedford, USA) in a 1:1 water-acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% formic acid.

Results

Formation of covalent Msr/Trx complexes via the TNB⁻ activation procedure and kinetic characterisation

All the Msrs in which one of the two cysteines is substituted by a serine reacted with DTNB and led quantitatively to formation of a mixed disulfide, as verified by spectroscopic titration of released TNB⁻. Prior to kinetic characterization, formation of the Msr / C35S Trx mixed disulfide complexes was checked by SDS-PAGE analyses. All the TNB-activated Msrs treated with an excess of C35S Trx formed a covalent complex which can be reversed to Msrs and Trx by addition of DTT (Fig. 1.). This result confirmed the formation of a disulfide bond between the two partners.

Kinetics on the activated Msrs were determined by following the rate of TNB⁻ release at 412 nm under pseudo-first order conditions i.e. with an excess of C35S Trx relative to Msrs. All the curves fitted to the monoexponential equation 1 with k_{obs} values ranging from 10^{-2} to 160 s^{-1} . Increasing the C35S Trx concentration up to $900 \mu\text{M}$ led to a kinetic saturation effect for the activated MsrAs. From the curve, k_{obs} versus C35S Trx concentration, k_{obsmax} values of 510 and $2.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and K_{Trx} values of 1.7 and 1.0 mM corresponding to k_2 values of 3.10^5 and $21 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ were deduced for C198S and C51S MsrAs, respectively (Fig. 2, panel A). In the case of the C63-TNB and C117-TNB activated MsrBs, no kinetic saturation effect was observed up to $900 \mu\text{M}$ C35S Trx. From the slope of the curve of k_{obs} versus C35S Trx concentration, second order rate constant values (k_2) of 9.48 and $13.53 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ were determined for C63S and C117S MsrBs, respectively (Fig. 2, panel B).

Formation and purification of the Msr/Trx complexes obtained by the alkylation procedure

Prior to purification and MS analysis, native-like covalent complex formation was checked by SDS-PAGE analyses. For MsrA, a 3 fold

excess of C35S Trx was sufficient for formation of 100% of MsrA under covalent complex. Addition of DTT released MsrA and Trx as shown on SDS PAGE (Fig. 1). Addition of IAM after 10 minutes of incubation of the mixture MsrA/Trx did not modify the amount of complex formed. For MsrB, the same experimental conditions led to formation of a small amount of complex (1% of the MsrB). Addition of SDS prior to that of IAM allowed us to increase the quantity of covalent complex up to 3% of the MsrB quantity. Under non-denaturing conditions, it is possible that the reactivity of IAM towards Trx C32 is higher than that towards the Cys of MsrB -the one which is not engaged in the intermolecular complex-. The consequence would be an equilibrium displaced in favor of the non complexed form. Under denaturing conditions, the reactivity including the accessibility of all the cysteines in the reaction mixture is the same and thus would prevent the displacement of the equilibrium.

However, whatever the conditions used, the equilibrium is largely not displaced in favour of formation of the MsrB/Trx complex. This result was unexpected and remains to be explained. Thus, a mixture of MsrA/B and Trx in a ratio of 1/3, even if Trx is in that case C35S Trx, was expected to lead to 100 % of Msrs under Msr/Trx complex.

Gel-filtration chromatography was used to separate free Msr, free Trx, dimer of Trx and Msr/Trx complexes. Elution profile of the Msr/Trx complexes formed by the TNB⁻ activation process was used to identify the peak corresponding to Msr/Trx complexes. This was particularly useful in the case of MsrB/Trx complex which is formed in a small amount. Purity of the collected fractions containing the native-like complexes was then checked by 12.5 %SDS-PAGE analyses (Fig. 3).

AspN digestion, MS analysis and identification of the Msr's Cys involved in the mixed disulfide bridge with Trx

The molecular weights and homogeneity of the Msr-Trx complexes were first determined by ESI-MS. Then, Msr-Trx complexes were subjected to Asp-N digestion and digests were analysed by both MALDI and ESI-MS.

Fig. 4 shows typical experiments performed for each sample. Proteolytic cleavage was done with Asp-N enzyme which is described to cleave before aspartic acid, and the so-generated peptides were next analysed by MALDI-TOF. In each case, no peptide generated by the cleavage of Trx was detected indicating that Trx was resistant to Asp-N digestion. Such unexpected result remains to be explained. On the other side, very good sequence coverage was obtained for the Msr proteins. In particular, the peptide containing the alkylated Cys was detected in each case whereas the peptide containing the other Cys was not. The absence of peptide linked to a peptide of Trx *via* an intermolecular disulfide bond corroborated the fact that Trx was not digested by AspN and that the corresponding Msr peptide remained bound to it. To validate these assumptions, the digest was analysed by ESI-MS. The mass spectra confirmed that Trx was not digested at all by Asp-N and moreover

showed an increase of the Trx mass corresponding to the Msr peptide linked to Trx *via* a disulfide bond.

All the data are presented in table 1 and are in agreement with an alkylation of the C51 and C63 in MsrA and MsrB, respectively. Indeed, the peptide containing the alkylated Cys presents a molecular mass of 2766 and 2346 Da for MsrA and MsrB, respectively, compatible with the mass of the C51 and C63 alkylated containing peptide. On the other hand, the mass of 13791 and 14112 Da measured for the MsrA and MsrB peptide-Trx complexes obtained after Asp-N digestion, respectively, were compatible only with the presence of a MsrA peptide containing C198-Trx C32 and MsrB peptide containing C117-Trx C32 complexes, respectively. Together, the data show that under the experimental used is the C198 and C117 of MsrA and MsrB, respectively, which forms an intermolecular disulfide bond with Trx C32.

Discussion

In previous studies, it was shown that the recycling process of Msrs by Trx includes formation of a binary complex between Msrs ox and Trx red, followed by a two-electron chemical exchange and then dissociation of the Msrs red/ Trx ox complex the rate of which is rate-limiting in the overall Msr mechanism (Revue BBA). The fact that a Msr ox/ Trx red complex is formed which precedes the two-electron transfer indicated the existence of specific interactions between Msr ox A/B and Trx red. To characterize these interactions by a X-ray structural approach, it is first necessary to form a stable covalent complex because the apparent low affinity between both partners precludes to isolate a non covalent complex. In that context, a prerequisite is to know which cysteine in the Msrs A/B is involved in formation of the transient interdisulfide bond with Trx's C32.

Usually, prediction on the nature of the target cysteine which forms the transient interdisulfide bond with C32 of Trx is based on kinetic criteria. It consists of assuming that the target cysteine under TNB⁻ activated form is the most reactive one. For MsrA, the k_2 value is 300 fold-higher for the activated C198 in C51S mutant than for C51 in C198S mutant. In contrast, no significant difference on the k_2 value was observed between C63 in C117S MsrB mutant and C117 in C63S MsrB mutant. Therefore, while prediction on the nature of the target cysteine in MsrA was possible, that was not the case for MsrB.

Another method based on biochemical criteria and MS analyses was thus used as recently applied on tryparedoxin peroxidase / tryparedoxin (Budde H. *et al*, 2003). The approach consists of forming a covalent inter-disulfide complex between the Msr ox and the C35S Trx and to stabilize the complex by IAM alkylation. This approach has the advantage of using the Trx ox form which is the form recognized and reduced by Trx instead of using a Msr form activated by a TNB⁻ molecule and in which the second cysteine is substituted. The MS analyses of peptides and peptide-Trx complexes obtained after enzymatic digestion of native complex formed between oxidized Msrs and C35S Trx clearly indicate that,

under the experimental conditions used, only the C51 of MsrA and C63 of MsrB are alkylated by IAM. Therefore, these data support a Trx recycling mechanism in which the recycling C198 in MsrA is involved in formation of the transient interdisulfide bond with Trx, whereas it is the catalytic one, C117 in MsrB.

In the absence of available 3D structure of Msrox, it is not possible to simulate a Trx/Msrs complex by a docking approach. What we can however conclude from the kinetic studies carried out on the MsrA activated by DTNB is that a complex is formed between Trx and C198 S or C51S mutant as well. For both mutants, the apparent affinity values are in the mM range and are similar to those determined from previous kinetic studies carried out on MsrA ox. The first-order rate constant of the TNB⁻ release from the MsrA C198-Trx C32 complex is however 400 fold-higher than that in the MsrA C51-Trx C32 complex. Inspection of the active site of MsrA either with a dimethyl arsenate adduct or in complex with a met residue shows that the catalytic and recycling Cys are both solvent exposed, arguing for a similar accessibility of the two Cys in the disulfide bond. This is also supported by the fact that both cysteine in the reduced form of MsrA are highly reactive towards a second-order kinetic probe as 2PDS (unpublished data). Therefore, the choice of the Trx target Cys in MsrA ox is likely governed by the positioning of the Trx C32 relative to that of the disulfide bond within the binary complex, which favors kinetically the attack on only one of the two cysteines. The situation is likely the same for MsrB. But in this case, no saturating effect was observed when MsrB is activated by DTNB in contrast to that was shown from previous kinetic studies done on the MsrB ox form. This is an indication that the presence of a TNB⁻ molecule on MsrB, in contrast to that observed on MsrA, prevents an efficient formation of a binary complex with Trx. Thus, the MsrB TNB⁻ activated forms are likely not representative of the MsrB ox form which interacts with Trx. This can explain why the k_2 values measuring the rate of formation of the MsrB C117-Trx C32 and MsrB C63-Trx C32 complexes were at least three orders of magnitude smaller than those of MsrA complexes and moreover were not discriminating. This is reinforced by the fact that C63 and C117 are accessible in reduced MsrB as suggested from the inspection of the 3-D structure and from their high chemical reactivity towards a thiol second-order reagent like 2PDS (data not shown) and thus are expected to be also accessible within the oxidized form.

Conclusion

The present results show that the kinetic method based on TNB⁻ activation should be handled with caution. First, the kinetic k_2 value which is used as a probe of the reactivity includes a K_S contribution and therefore is not necessary representative of the reactivity of the target cysteine. Second, the presence of the TNB⁻ molecule covalently bound on the target can decrease the accessibility and perturb the positioning of the target relative to the C32 of Trx. This is probably what is occurring with MsrB. In that context, the method

used in this study appears to be more conclusive. Moreover, it has the advantage to form a Trx/target interdisulfide complex with the oxidized form of the target which is the form reduced by Trx.

The fact that it is the recycling Cys in MsrA which is involved in the intermolecular disulfide bond with Trx C32 whereas it is the catalytic one in MsrB, rules out any simplistic prediction of the Cys attacked by Trx C32. Indeed, the catalytic Cys of MsrA/B has to strongly decrease its pKa for forming a covalent intermediate with the sulfoxide of the substrate (data to be published). Thus, it is

reasonable to postulate that the catalytic cysteine is a better leaving group than the recycling one. The consequence is that the recycling cysteine would be the one involved in formation of the transient interdisulfide bond with Trx C32. This is not the case for MsrB. The three dimensional context within the binary complex, in particular the positioning of the Trx C32 relative to the disulfide bond of Msrs is likely an essential factor. In this context, determination of the 3-D structure of Msr/Trx complexes will be very instructive.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Programme "Protéomique et Génie des Protéines CNRS 2001", the Université Henri Poincaré, Nancy I, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant ARC N° 4393), the Ministère délégué à la Recherche (ACI BCMS047) and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie.

References

- Antoine, M., Boschi-Muller, S. et Branlant, G. (2003). Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45352-7.
- Arner, E. S. et Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* **267**, 6102-9.
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A. et Branlant, G. (2000). A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35908-13.
- Brot, N., Weissbach, L., Werth, J. et Weissbach, H. (1981). Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 2155-8.
- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. et Hoshi, T. (1999). Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett.*, **442**, 48-52.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J. et Barras, F. (2001). Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48915-20.
- Hokenson, M. J., Uversky, V. N., Goers, J., Yamin, G., Munishkina, L. A. et Fink, A. L. (2004). Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. *Biochemistry*, **43**, 4621-33.
- Lemaire, S. D., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M. et Decottignies, P. (2004). New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7475-80.
- Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H. et Matthews, B. W. (2000). Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry*, **39**, 13307-12.
- Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. et Matthews, B. W. (2002). The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 348-52.
- Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R. et Stadtman, E. R. (2000). Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14167-72.
- Olry, A., Boschi-Muller, S. et Branlant, G. (2004). Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry*, **43**, 11616-22.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A. et Branlant, G. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 12016-22.
- Sharov, V. S., Ferrington, D. A., Squier, T. C. et Schoneich, C. (1999). Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.*, **455**, 247-50.
- Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S. et Hart, P. J. (2003). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. *J. Bacteriol.*, **185**, 4119-26.
- Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. et Aubry, A. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure Fold. Des.*, **8**, 1167-78.

Fig. 1: SDS-PAGE analyses of MsrA/C35S Trx (A) and MsrB/C35S Trx (B) complexes.

Formation of Msr/Trx complexes was checked by non-reducing 12.5 % SDS-PAGE analysis.

Panel (A) : Formation of MsrA/Trx complexes. Lane 1 : MW ladder. Lane 2 : reduced MsrA. Lane 3 : oxidised MsrA. Lane 4 : reduced C35S Trx. Lane 5 : Native-like complex without alkylation. Lane 6 : Native-like complex after IAM alkylation. Lane 7 : Lane 6 + DTT. Lane 8 : C51S MsrA/C32S Trx artificial complex. Lane 9 : Lane 8 + DTT.

Panel (B) : Formation of MsrB/Trx complexes.

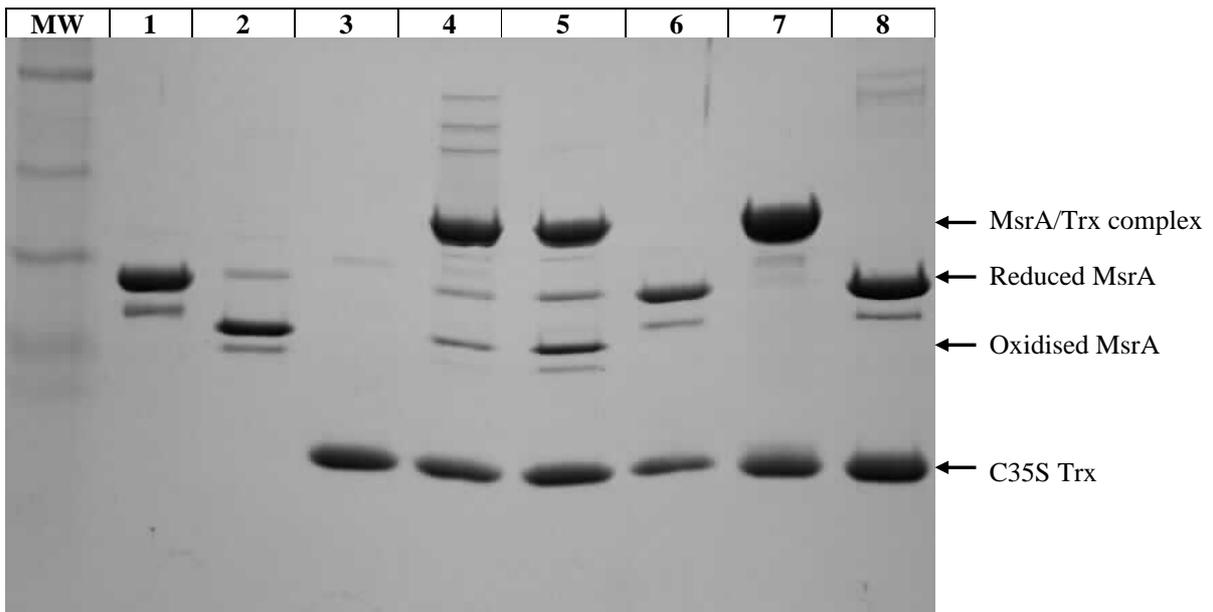


Fig. 2: Kinetics of the formation of MsrA/C35S Trx (A) and of MsrB/C35S Trx (B) complexes.

The release of the TNB^- anion from single Cys activated Msr upon complex formation was monitored spectrophotometrically at 412 nm. Kinetic of formation of C51S MsrA /C35S Trx complex was monitored with a spectrophotometer and that of C198S MsrA /C35S Trx and both MsrB/Trx complexes were measured on a stopped-flow apparatus.

Fig. 2A. Panel A : Formation of C51S MsrA /C35S Trx complex ; Panel B : Formation of C198S MsrA/C35S Trx complex. Data were fitted to the Michaeli-Menten relationship by least square regression, which gave k_{obsmax} and K_{Trx} constants of 510 and $2.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 1.7 and 1.0 mM for C51S MsrA/C35S Trx and C198S MsrA/C35S Trx complexes, respectively. Experimental data are shown as symbols (●), best fit is shown as solid line.

Fig. 2B. Panel A : Formation of C117S MsrB/C35S Trx complex ; Panel B : Formation of C63S MsrB/C35S Trx complex. Data were fitted to a linear relationship which gave k_2 constant of 13.3 and $8.8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for C117S MsrB/C35S Trx and C63S MsrB/C35S Trx complexes, respectively. Experimental data are shown as symbols (●), best fit is shown as solid line.

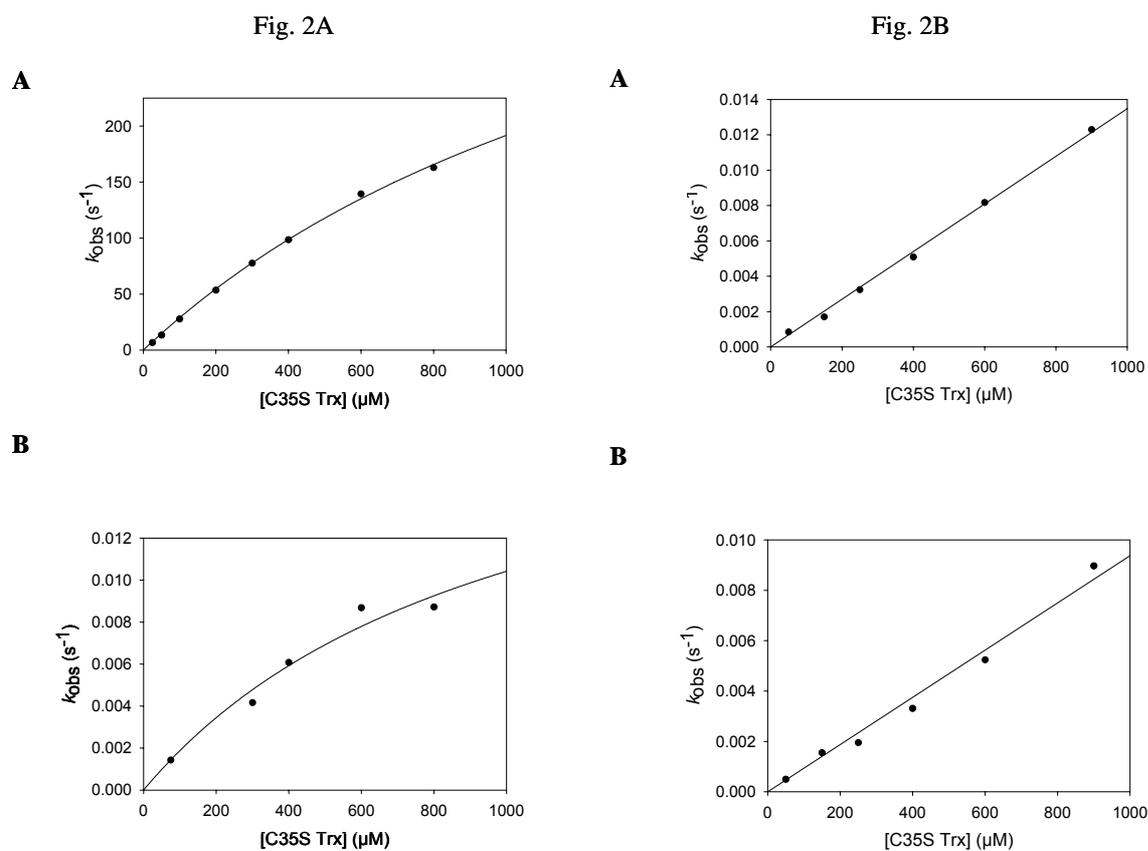


Fig. 3: Chromatographic elution profile at 280 nm of MsrA/C35S Trx (A) and MsrB/C35S Trx (B) complexes.

Msr/Trx complexes were purified from the reaction mixtures by gel-filtration on a Superdex 75 column. Oxidised Msr, reduced C35S Trx and artificial Msr/Trx complexes were used as references. Msr/Trx complexes are annotated as peak 1, oxidised Msrs as peak 2 and C35S Trx as peak 3.

Panel (A) : Bold solid line : alkylated MsrA/C35S Trx complex ; Thin solid line : C51S MsrA/C35S Trx complex ; Thin dashed line : oxidised MsrA ; Thin dashed dotted line : C35S Trx.

Panel (B) : Bold solid line : alkylated MsrB/C35S Trx complex ; Thin solid line : C63S MsrB/C35S Trx complex ; Thin dashed line : oxidised MsrB ; Thin dashed dotted line : C35S Trx.

Right scale refers to MsrB/Trx complex profile, left scale refers to the other profiles.

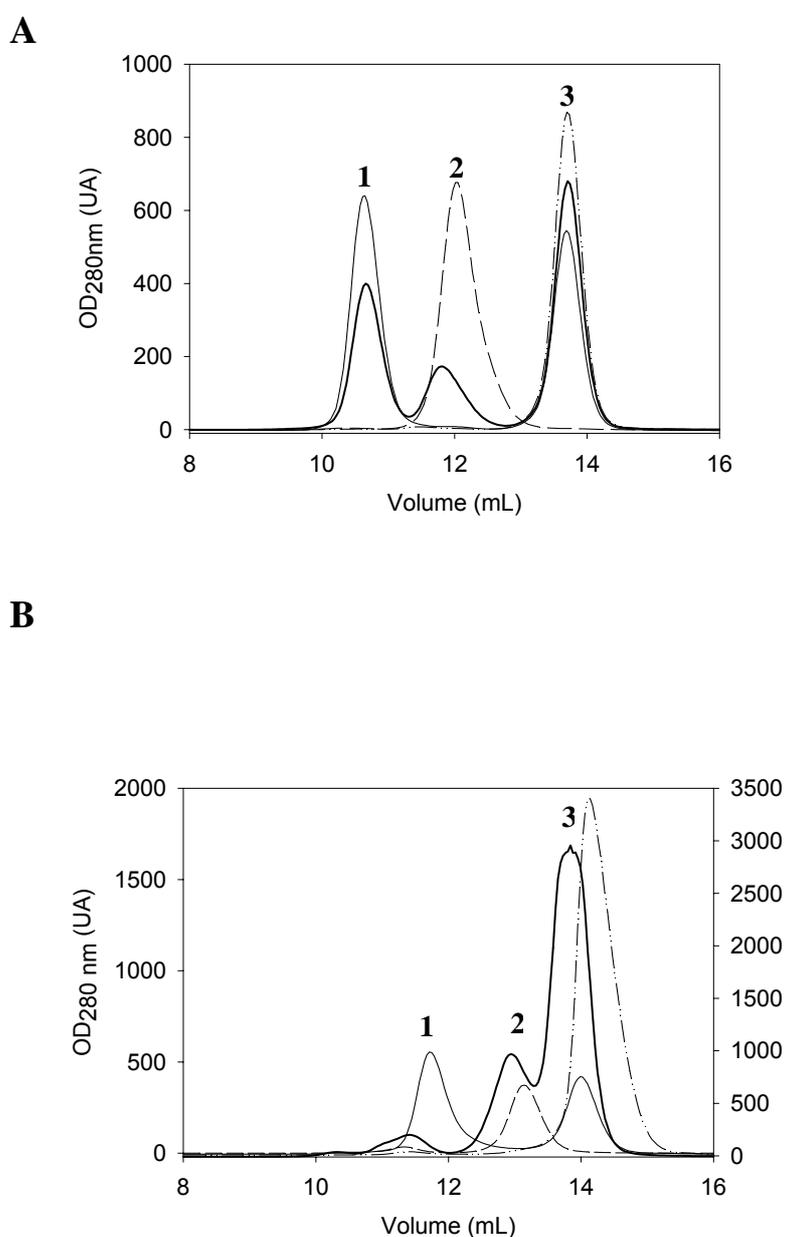


Fig. 4: Schematic representation of the mass spectrometry experiments.

Homogeneity of the complexes is first checked by ESI-MS. Then complexes are submitted to Asp-N digestion and digests are analysed using both MALDI and ESI-MS.

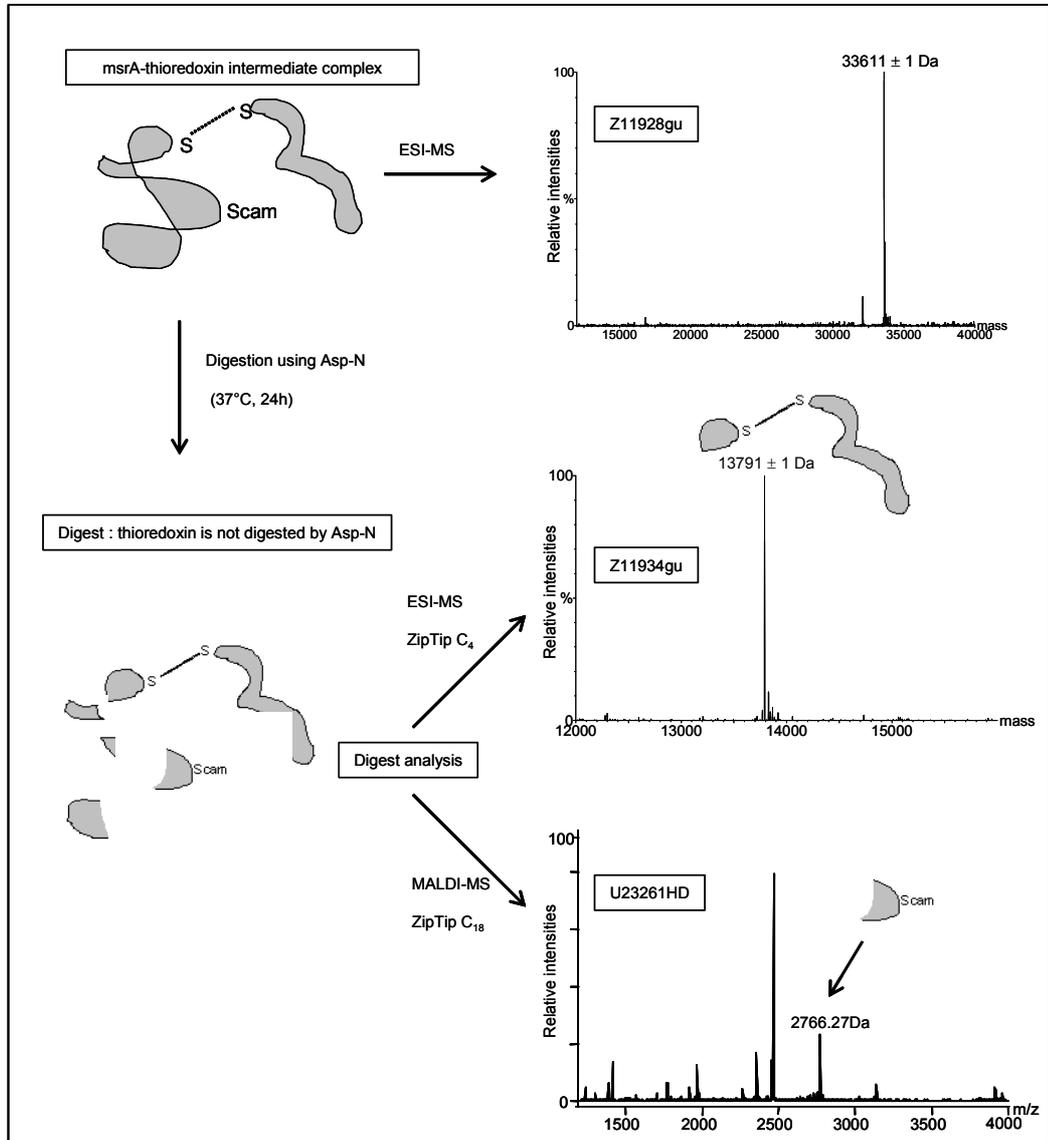


Table 1: Mass spectrometry analyses of Msr-Trx complexes before and after Asp-N digestion.

Complexes analyzed by MS	ESI-MS of complexes before digestion	ESI-MS of complexes after digestion	MALDI-MS of complexes after digestion
MsrB WT-thioredoxin	MW _{theo} = 28088.6Da	MW _{theo} = 14111.3Da	MW _{theo} = 2346.070Da
	MW _{exp} = 28089.4Da	MW _{exp} = 14111.8Da	MW _{exp} = 2346.092Da
MsrB C119S-thioredoxin	MW _{theo} = 28015.5Da	MW _{theo} = 13947.87Da	MW _{theo} = 2436.284Da
	MW _{exp} = 28015.7Da	MW _{exp} = 13948.15Da	MW _{exp} = 2436.245Da
MsrB C64S-thioredoxin	MW _{theo} = 28015.5Da	MW _{theo} = 14111.3Da	MW _{theo} = 2273.071Da
	MW _{exp} = 28015.6Da	MW _{exp} = 14111.6Da	MW _{exp} = 2273.087Da
MsrA WT-thioredoxin	MW _{theo} = 33610.7Da	MW _{theo} = 13790.8Da	MW _{theo} = 2766.341Da
	MW _{exp} = 33610.8Da	MW _{exp} = 13791.0Da	MW _{exp} = 2766.270Da
MsrA C198S-thioredoxin	MW _{theo} = 33537.7Da	MW _{theo} = 14368.5Da	MW _{theo} = 2132.084Da
	MW _{exp} = 33537.7Da	MW _{exp} = 14368.4Da	MW _{exp} = not identified
MsrA C51S-thioredoxin	MW _{theo} = 33537.7Da	MW _{theo} = 13790.8Da	MW _{theo} = 2693.342Da
	MW _{exp} = 33538.0Da	MW _{exp} = 13791.1Da	MW _{exp} = 2693.294Da

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons développé des approches pour aider à la compréhension de mécanismes biologiques variés.

Dans le cas de la myosine VI, l'étude de différents construits tronqués par SM a permis, d'une part, de définir et de localiser les différents partenaires de cette protéine, et d'autre part, de préciser le rôle des ions Ca^{2+} sur ces partenaires. Nous avons mis en évidence l'interaction d'une nouvelle calmoduline avec 4 ions Ca^{2+} sur la séquence « insérée » de la chaîne de myosine VI. Cette calmoduline ne peut pas se fixer sur la séquence « insérée » sans ions Ca^{2+} , suggérant donc un rôle structural plutôt qu'un rôle de régulation. Cette étude faisant intervenir des complexes de masses moléculaires élevées, a nécessité une optimisation des conditions expérimentales, afin d'être en mesure de détecter l'interaction spécifique de petites molécules telles que les ions Ca^{2+} . Nous avons enfin évalué le potentiel de la dissociation en phase gazeuse dans le spectromètre de masse, afin de préciser et/ou apporter de nouvelles informations structurales. Cette méthodologie s'est révélée sensible à l'interaction entre le domaine moteur de la myosine VI et un lobe de la calmoduline en interaction avec la séquence « insérée ».

Dans le cas de la E-cadhérine, l'information de stœchiométrie fournie par SM nous a permis de réaliser une titration complète de cette protéine par les ions Ca^{2+} . La SM est dans ce cas la seule technique capable de distinguer la proportion de chaque stœchiométrie d'interaction en solution. Cet avantage unique nous a permis de mettre en évidence l'interaction spécifique de 3 ions Ca^{2+} avec une forte coopérativité. L'approche utilisée a, par ailleurs, été validée à partir d'un mutant ayant un rôle d'échantillon témoin. L'affinité moyenne de ces ions Ca^{2+} déduite par SM permet d'exclure l'hypothèse d'un simple mécanisme de régulation de l'adhésion à partir de l'interaction des ions Ca^{2+} extracellulaire avec les modules EC12 de la E-cadhérine.

La réduction des msr par la thiorédoxine se passe à partir d'un mécanisme de reconnaissance intermédiaire. La cystéine « catalytique ou réactive » de la thiorédoxine crée un pont disulfure intermédiaire avec une des deux cystéines de la msr. Le choix de la cystéine de la msr impliquée dans le pont disulfure est lié au mécanisme de reconnaissance entre les deux protéines. La SM a été utilisée pour déterminer rapidement quelle était la cystéine de chaque msr impliquée dans ce pont disulfure. Ce résultat permet d'une part de mieux comprendre le mécanisme de reconnaissance entre les protéines au cours de la réaction de réduction des msr et d'autre part permet d'améliorer la synthèse du complexe intermédiaire afin de réaliser des études cristallographiques pour visualiser la reconnaissance des protéines impliquées.

CHAPITRE III

Suivi de la dynamique d'échange dans le temps de complexes non-covalents

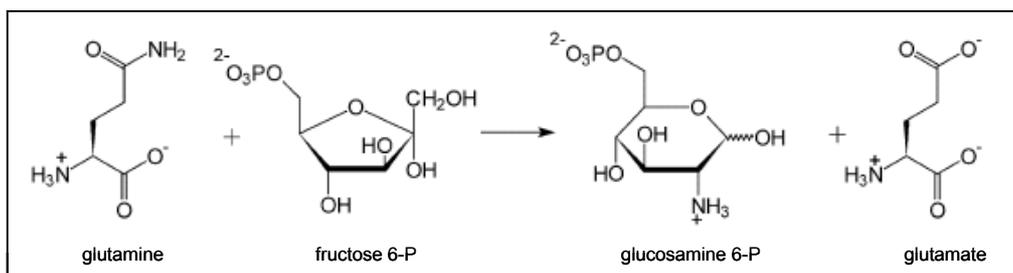
I. Dynamique d'échange des deux sous-unités du dimère de la glucosamine 6-phosphate synthétase (GlmS) « Cette étude a été menée en collaboration avec Marie-Ange Badet et Bernard Badet (ICSN, Paris) »

1. Contexte biologique

1.1. GlmS est une cible thérapeutique potentielle

GlmS (EC 2.6.1.16) est une protéine membre de la famille des amido-transférases. Ces protéines sont des enzymes qui catalysent le transfert de l'azote du groupement amide de la glutamine à un substrat accepteur, pour produire une molécule de glutamate et un produit aminé. Les membres de cette famille d'enzymes sont impliqués dans la biosynthèse de purines, de pyrimidines, de certains acides aminés et de la glucosamine 6-phosphate dans le cas de GlmS [Massiere et coll. 1998]. GlmS catalyse la première étape dans le métabolisme des hexosamines, en convertissant le fructose 6-phosphate en glucosamine 6-phosphate, en présence de glutamine (cf. Figure 1).

Figure 1 : Réaction catalysée par la glucosamine 6-phosphate synthétase (GlmS), d'après [Milewski 2002].



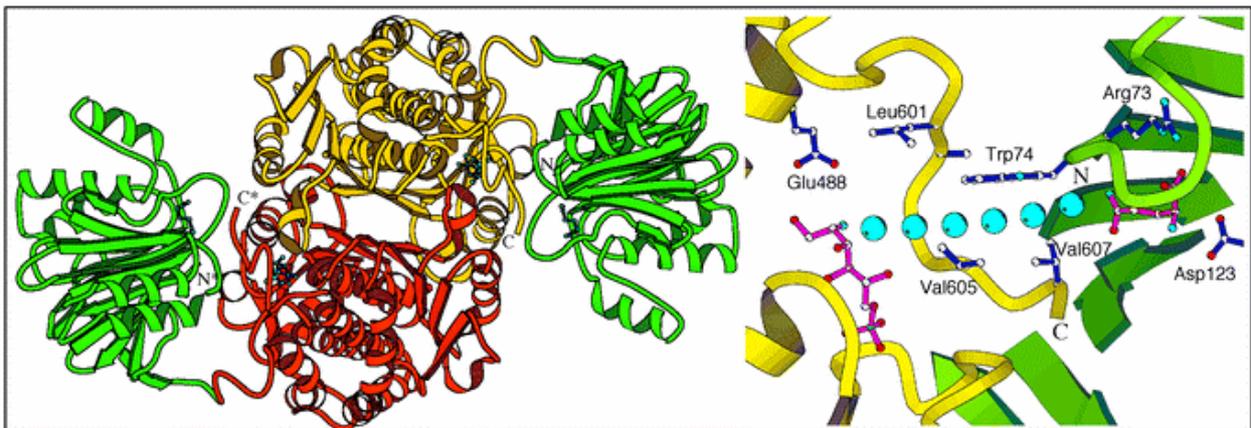
En jouant un rôle clé dans le métabolisme des hexosamines, GlmS est supposée intervenir dans plusieurs mécanismes biologiques, et en particulier, se révélerait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du diabète de type II [Milewski 2002]. Dans ce contexte, il est important de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme au niveau moléculaire.

1.2. La structure et le cycle catalytique de GlmS

GlmS native se présente sous la forme d'un homo-dimère qui, contrairement aux autres amido-transférases, ne peut pas utiliser l'ammoniac hexogène comme source d'azote. Le monomère est composé de deux domaines de fonctions et de structures distinctes, situés sur la même chaîne polypeptidique. Un domaine C-terminal est responsable de l'activité isomérase (il utilise l'ammoniac pour convertir le fructose 6-phosphate en glucosamine 6-phosphate), tandis que le domaine N-terminal est responsable de l'activité glutaminase (hydrolyse de la glutamine en glutamate et ammoniac).

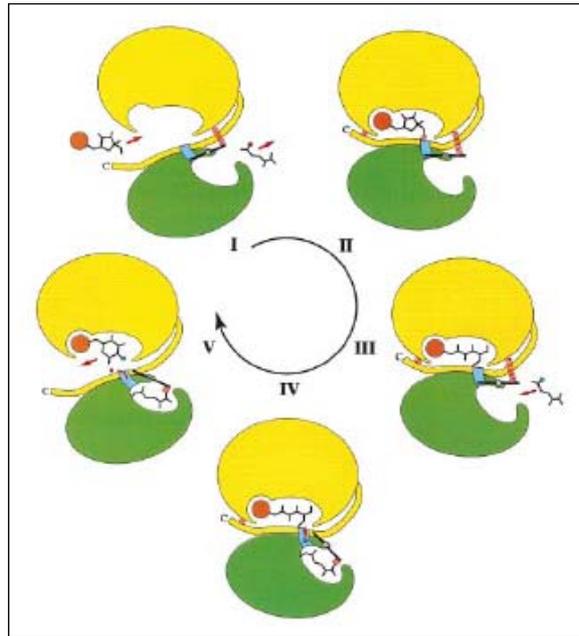
La structure cristallographique de GlmS (cf. Figure 2) révèle un complexe dimérique dont les régions en interaction correspondent essentiellement aux domaines C-terminaux à activité isomérase (rouge et orange). Les domaines N-terminaux à activité glutaminase (en vert) sont situés de part et d'autre des domaines C-terminaux en interaction.

Figure 2 : Structure cristallographique du dimère de la glucosamine 6-phosphate synthase (GlmS). Les domaines N-terminaux à activité glutaminase sont représentés en vert tandis que les domaines C-terminaux à activité isomérase sont représentés en rouge et orange (à gauche). Le canal à ammoniac suggéré par la structure cristallographique est représenté à droite (sphères bleues), d'après [Teplyakov et coll. **2002**].



A priori, la structure cristallographique de l'enzyme suggère que l'ammoniac généré dans un domaine à activité glutaminase est transféré au domaine à activité isomérase de la même chaîne polypeptidique par l'intermédiaire d'un « canal à ammoniac » (ammonia channeling). Ce canal est formé par l'interaction des substrats qui induisent des changements conformationnels de l'enzyme [Teplyakov et coll. **2001**]. Ce type de transfert au travers d'un tunnel hydrophobe permet d'augmenter le rendement catalytique de l'enzyme, en empêchant l'ammoniac généré de s'échapper de l'enzyme. Les mécanismes catalytiques détaillés de l'hydrolyse de la glutamine et de l'isomérisation du sucre ont été décrits précédemment [Isupov et coll. **1996**, Teplyakov et coll. **1999**] et ont été incorporés à un mécanisme général actuellement proposé, pour décrire le fonctionnement de l'enzyme (cf. Figure 3).

Figure 3 : Cycle catalytique proposé pour GImS (un seul monomère est représenté). L'interaction du fructose 6-P (II), puis de la glutamine (IV) engendrent des modifications conformationnelles de la protéine, d'après [Teplyakov et coll. 2001].



Ainsi, de réelles avancées ont été réalisées dans la compréhension du fonctionnement catalytique de l'enzyme, en particulier en ce qui concerne les changements conformationnels induits par l'interaction de l'enzyme avec ses substrats, permettant la formation du « canal à ammoniac ». La structure cristallographique est essentielle pour comprendre le fonctionnement de l'enzyme d'un point de vue structural, et est un atout considérable pour pouvoir aborder la synthèse rationnelle de nouveaux inhibiteurs. Néanmoins, des informations supplémentaires concernant les interactions non-covalentes impliquées dans ce système, constitué de plusieurs partenaires, permettraient d'orienter les études cristallographiques pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs.

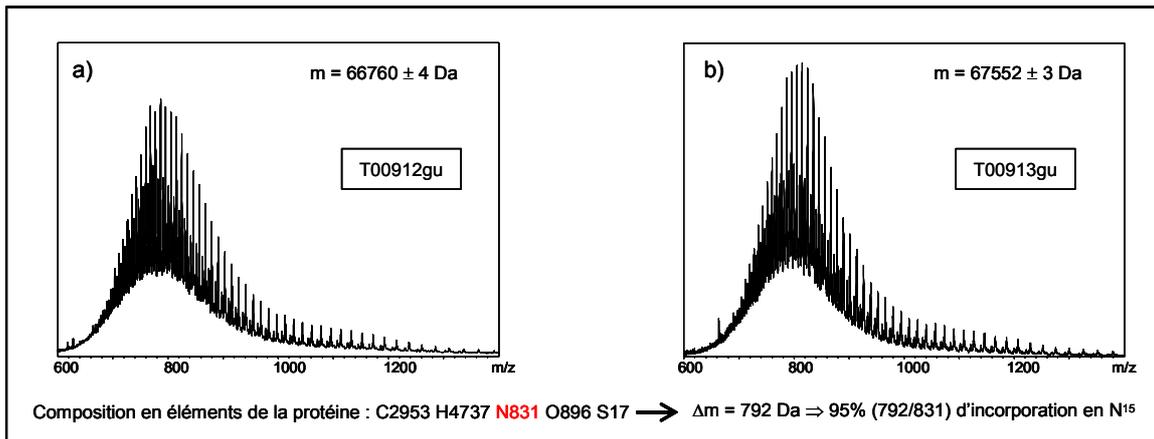
Etant donné les changements conformationnels mis en évidence dans le mécanisme enzymatique de cette protéine, et le potentiel important de la SM (récemment mis en évidence) pour explorer la dynamique de complexes non-covalents [Sobott et coll. 2002], nous avons tenté dans ce travail de compléter l'étude cristallographique du dimère de la GImS à partir de données cinétiques. Dans ce but, nous avons mis au point une stratégie d'analyse permettant de suivre dans le temps la dynamique d'échange des sous-unités du dimère de GImS dans des conditions contrôlées.

L'interaction avec un ligand ou la mutation d'un acide aminé de la protéine est susceptible de modifier les interactions entre monomères et donc, de modifier la cinétique d'échange des sous-unités. L'objectif est de pouvoir suivre rapidement l'influence d'un ligand ou d'une mutation sur la stabilité du dimère et ainsi de donner des éléments pour diriger les recherches sur cette protéine. Un autre but consiste à explorer des approches expérimentales permettant d'apporter des éléments nouveaux dans la caractérisation de complexes non-covalents.

2. Stratégie d'analyse et interprétation des données

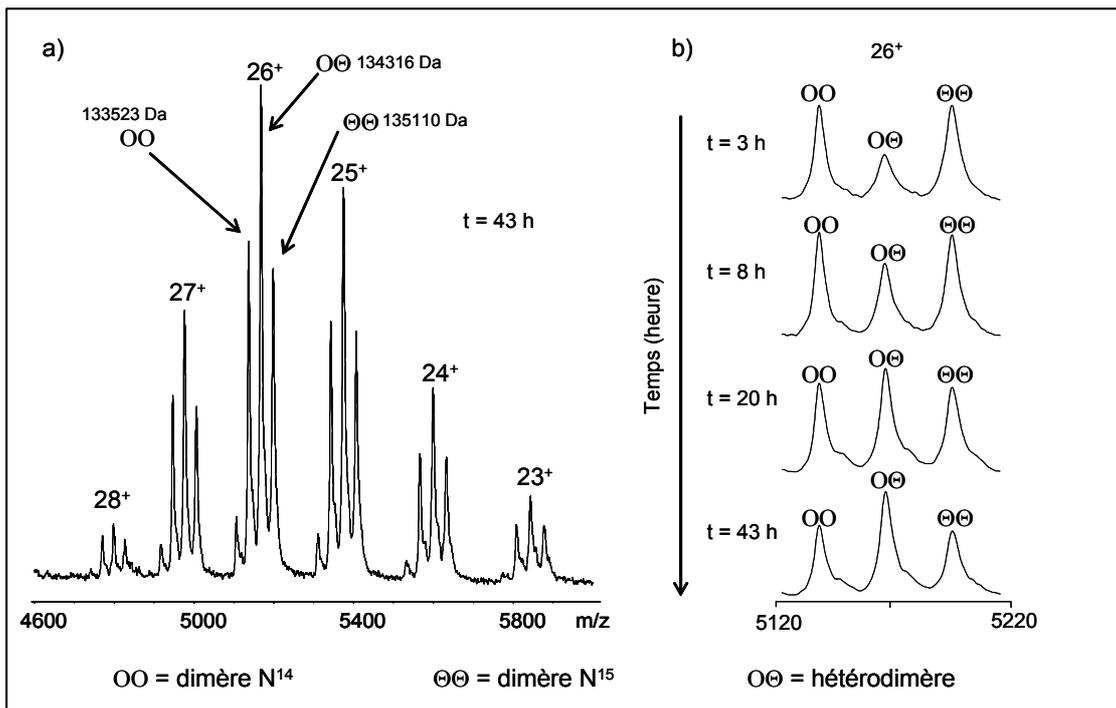
Afin de pouvoir suivre une dynamique d'échange entre sous-unités par SM, nous avons utilisé la protéine exprimée dans un milieu N^{14} et la protéine exprimée dans un milieu N^{15} (cf. Figure 4).

Figure 4 : Spectres en condition dénaturante réalisés sur l'appareil de type micrOTOF ; a) échantillon de GlmS purifié en milieu N^{14} ; b) échantillon de GlmS purifié en milieu N^{15} . La différence de masse entre les deux échantillons permet de déduire un taux d'incorporation en N^{15} d'environ 95 %.



La différence de masse entre les deux protéines, liée à l'incorporation de N^{15} , est suffisamment importante pour pouvoir suivre dans le temps, en condition non dénaturante, la formation d'un hétérodimère, lorsque les dimères lourd et léger sont mélangés en conditions stoechiométriques (cf. Figure 4).

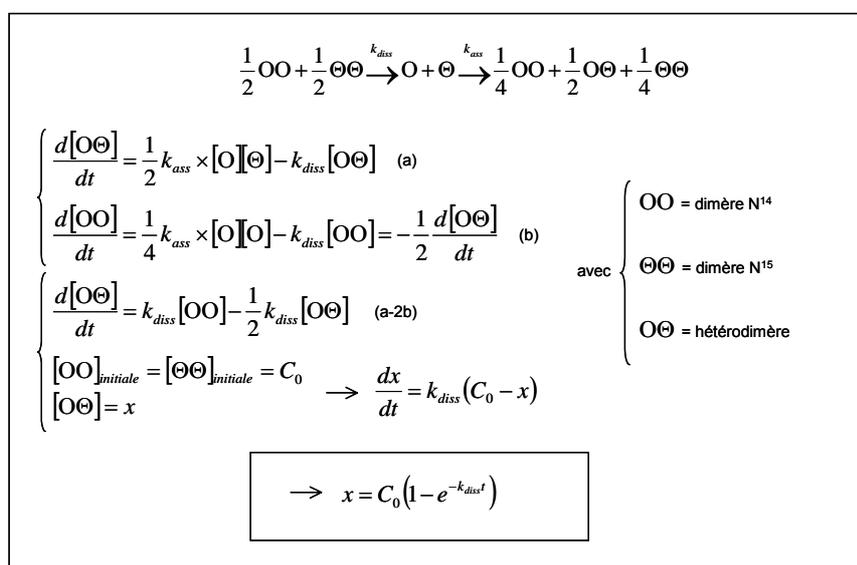
Figure 4 : Illustration de la formation d'un hétérodimère après mélange du dimère lourd et léger. a) spectre typique obtenu sur l'appareil de type micrOTOF après mélange de $2 \mu\text{M}$ GlmS N^{14} et $2 \mu\text{M}$ GlmS N^{15} , puis incubation à 40°C pendant 43 heures, b) zoom sur l'état de charge 26^+ pour différents temps d'incubation.



Au commencement de cette étude, nos craintes étaient de devoir faire face à un échange de sous-unités très rapide (de l'ordre de la seconde), qui serait difficilement observable, car trop rapide pour l'appareillage utilisé. En pratique, les premiers essais d'échange à température ambiante pendant quelques minutes d'incubation se sont révélés infructueux : il n'y avait pas formation d'hétérodimère. Nous avons finalement décidé de réaliser toutes les expériences à 40°C afin d'augmenter les vitesses de réaction, dans ce cas, l'échange fut observé mais de manière très lente (de l'ordre d'un ou deux jours).

En suivant dans le temps l'apparition de l'hétérodimère, il est possible de tracer une courbe d'échange en fonction du temps, qui suit théoriquement une loi cinétique du premier ordre, avec k la constante de dissociation du dimère (cf. Figure 5).

Figure 5 : Illustration du modèle mathématique qui décrit la cinétique d'échange des sous-unités du dimère de GImS. L'échange suit une cinétique du premier ordre.

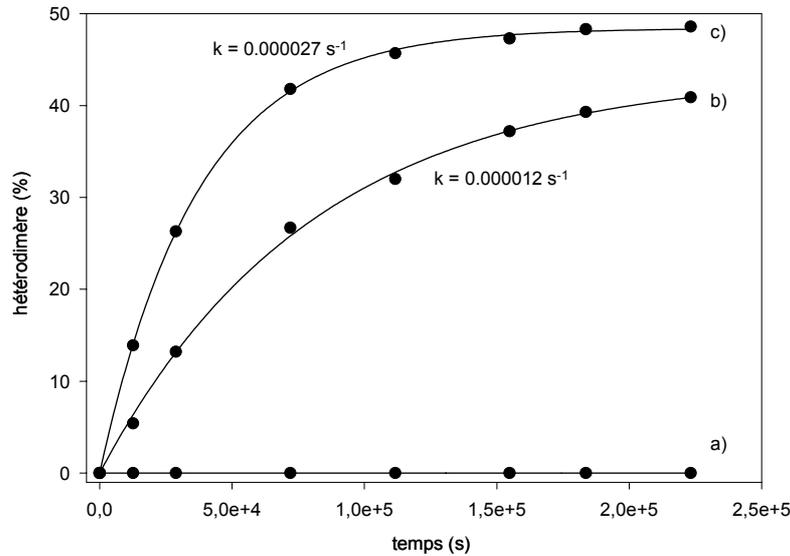


Quelques études d'échange de sous-unités de complexes multi-protéiques ont été reportées dans la littérature. Les cinétiques d'échange qui y sont décrites, suivent dans chaque cas une cinétique du premier ordre [Vis et coll. 1999, Aquilina et coll. 2005].

3. Influence des substrats et produits sur la cinétique d'échange des sous-unités du dimère de GImS

Dans une première série d'expériences, nous avons commencé par tester l'influence des substrats et produits de GImS sur la cinétique d'échange des monomères. Nous avons notamment réalisé les expériences en présence de glutamine, glutamate, fructose-6P et glucosamine-6P (cf. Figure 6).

Figure 6 : Illustration de la cinétique de formation de l'hétérodimère à 40 °C, 2 μM GlmS N¹⁵ + 2 μM GlmS N¹⁴ dans AcNH₄ 50 mM. a) en présence de 5 eq. fructose-6P ou glucosamine-6P, b) sans ajout, c) en présence de 50 eq. glutamine ou glutamate.



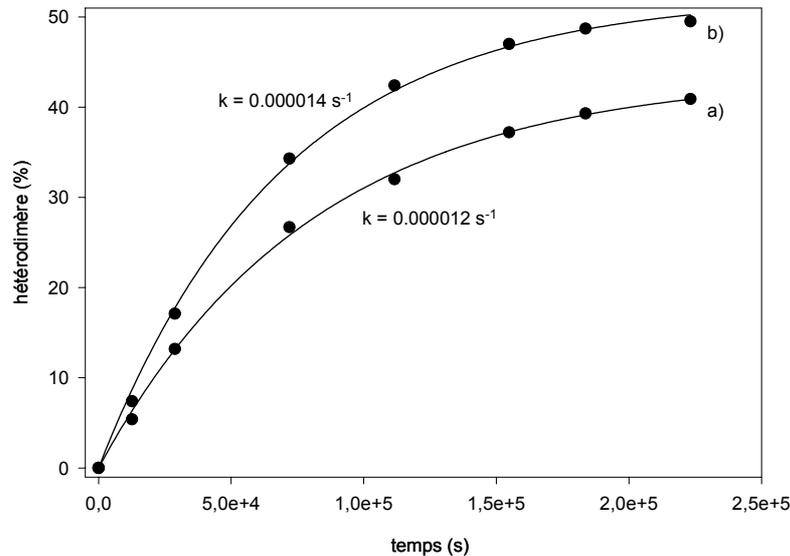
De manière intéressante, la cinétique d'échange des monomères de GlmS semble grandement influencée par la présence de ses substrats et produits. Lorsque la protéine est saturée en sucre (fixation d'un sucre sur chaque sous-unité), la cinétique d'échange semble complètement bloquée, du moins sur une échelle de temps de 0 à 70 heures. Ce résultat suggère que la stabilité du dimère pourrait être augmentée lorsque les sucres sont en interaction avec la protéine. La structure cristallographique de GlmS nous indique que la présence de sucres induit des changements conformationnels aboutissant à une structure plus compacte de GlmS. Des interactions supplémentaires entre sous-unités expliqueraient la modification de la dynamique d'échange. Au contraire, l'ajout de glutamine ou glutamate accélère le processus de dissociation des sous-unités, des changements conformationnels induits par l'interaction de ces molécules sont donc attendus. Il reste maintenant à comprendre, comment ces changements conformationnels sont liés au mécanisme général de catalyse, et s'il existe un mécanisme quelconque de régulation et de coordination des différents domaines, qui permet d'éviter l'hydrolyse et la consommation inutile de glutamine en absence de sucre dans le site correspondant.

De manière générale, il sera possible de suivre, par cette méthode, l'influence d'un inhibiteur sur la dynamique d'échange des sous-unités de GlmS, cette information pourrait permettre de classer les inhibiteurs suivant un critère supplémentaire.

4. Influence de la mutation d'un acide aminé sur la stabilité du dimère de GlmS

Dans le but de définir les zones de contact des monomères de GlmS, nous avons tiré avantage de la mutagenèse dirigée et de l'analyse de la dynamique d'échange des sous-unités du dimère. L'objectif est de comparer la modification de la cinétique d'échange pour une série de mutants et ainsi réaliser un classement de l'importance de certains acides aminés ou de certaines zones de contact sur la stabilité du dimère. Pour débiter, nous avons évalué l'approche avec le mutant K603A (cf. Figure 7).

Figure 7 : Illustration de la cinétique de formation de l'hétérodimère, a) $2\mu\text{M}$ GImS N¹⁵ + $2\mu\text{M}$ GImS N¹⁴ dans AcNH₄ 50 mM, b) $2\mu\text{M}$ GImS N¹⁵ + $2\mu\text{M}$ K603A dans AcNH₄ 50 mM.



Les valeurs de k déduites dans le cas du mutant et de la protéine sauvage indiquent que la mutation K603A a accéléré la vitesse de dissociation du dimère. Cette accélération de la vitesse d'échange en présence de la mutation, suggère que celle-ci a entraîné une déstabilisation du dimère par perte d'interactions privilégiées.

Ainsi, nous disposons d'une technique d'analyse efficace permettant de classer rapidement, par ordre d'importance, les effets de déstabilisation induits par la mutation d'un acide aminé. La recherche des zones de contact du dimère en présence ou en absence de ligands pourrait de cette manière être accélérée, permettant ainsi d'affiner les connaissances actuelles sur le fonctionnement de cette enzyme et de mettre en place des voies d'inhibition.

II. Cinétique d'association et de dissociation de complexes protéine-ligand

1. Objectifs

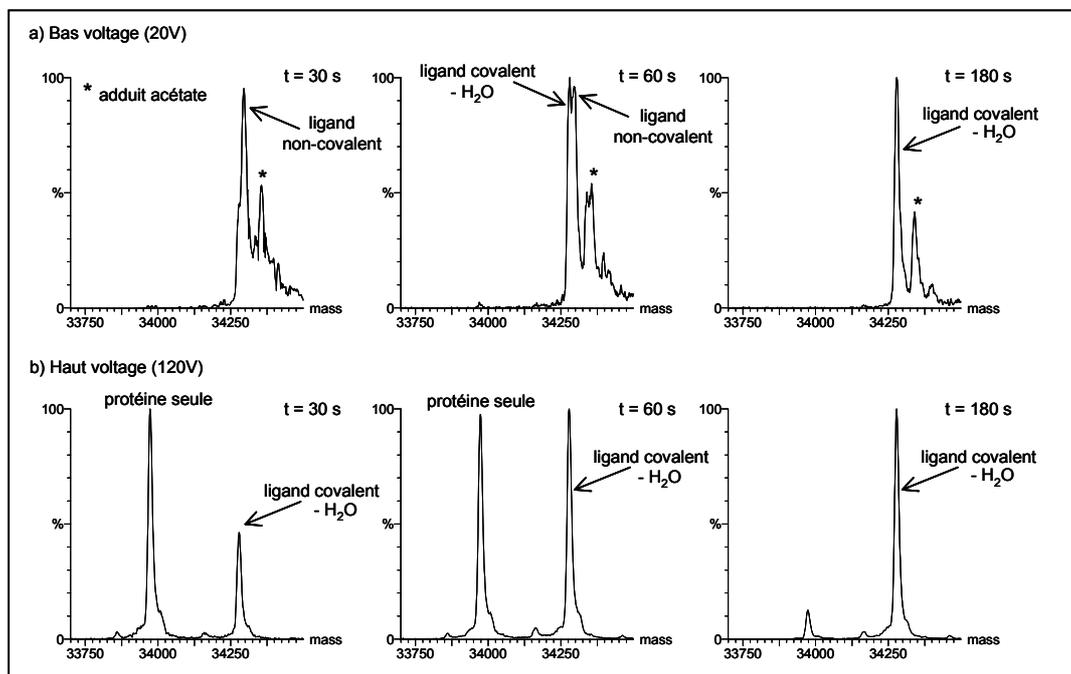
La SM est une technique permettant de donner une image des espèces en équilibre en solution. Il est alors intéressant d'utiliser cette technique afin d'observer dans le temps l'évolution des espèces en solution, mais cette fois-ci hors équilibre. Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel de la SM dans l'étude en temps réel de complexes non-covalents biologiques et, plus particulièrement, dans le cas de complexes protéine-ligand. Le principe consiste donc à disposer d'un système hors équilibre à un temps donné et d'analyser le retour à l'équilibre par SM, la contrainte de cette approche réside dans l'échelle de temps, typiquement l'analyse est optimale pour des temps de l'ordre de quelques minutes.

2. Exemple de la cinétique d'association d'un substrat suicide sur une kinase X « Cette étude a été menée en collaboration avec Michel Robin (Sanofi-Aventis, Vitry) »

La kinase X étudiée est une protéine impliquée dans le développement du cycle cellulaire et est une cible dont l'inhibition présenterait un intérêt thérapeutique. Nous décrivons dans ce paragraphe un exemple où la SM a permis de suivre la cinétique de réaction d'association d'un substrat suicide de la protéine qui se fixe de manière covalente.

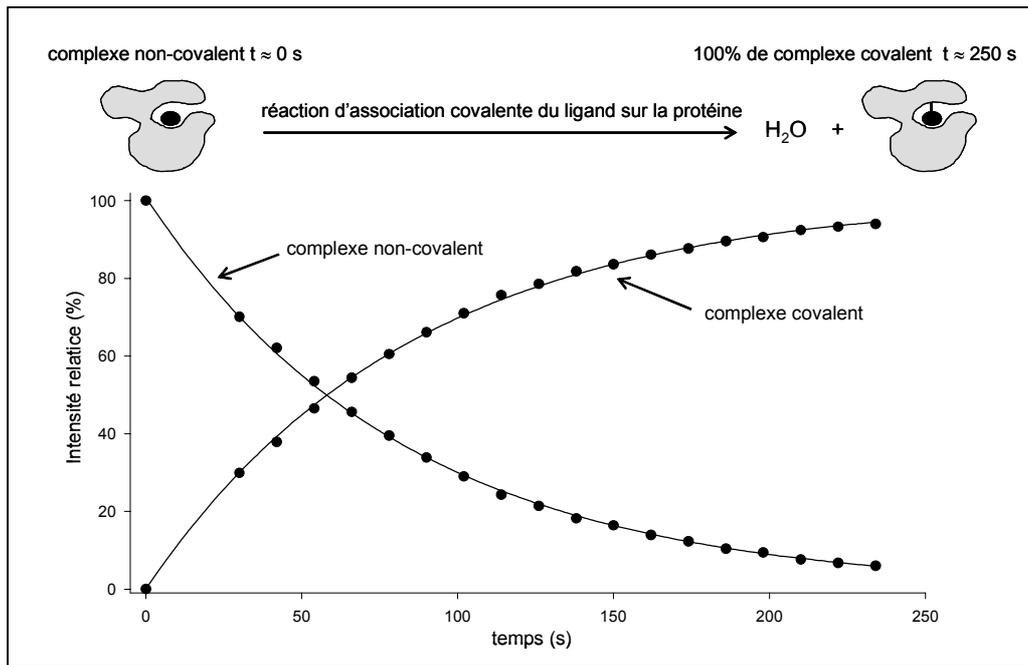
Expérimentalement, nous avons mélangé le ligand et la protéine puis immédiatement analysé, dans des conditions non-dénaturantes, l'évolution des stœchiométries, alternativement à bas et haut voltage dans l'interface, c'est-à-dire respectivement dans des conditions où généralement on préserve les interactions non-covalentes et où on les dissocie. De cette manière, nous avons pu mettre en évidence l'interaction non-covalente du ligand à bas voltage (pour des temps très courts), ainsi que l'interaction covalente du ligand à haut voltage après réaction du ligand sur la protéine (pour des temps plus longs). La résolution de la SM est dans ce cas largement suffisante pour détecter le départ d'une molécule d'eau durant l'analyse, ce qui confirme l'hypothèse de réaction d'association covalente entre le ligand et la protéine (cf. Figure 8).

Figure 8 : Illustration de la stratégie employée pour suivre l'association d'un substrat suicide sur une kinase X. a) à bas voltage, on observe la fixation non-covalente du ligand pour des temps courts. Le départ d'une molécule d'eau est observé de manière progressive. b) à haut voltage, l'interaction non-covalente avec le ligand est dissociée en phase gazeuse, on observe donc uniquement la protéine seule et la protéine liée de manière covalente avec le ligand. La réaction d'association covalente est observée progressivement dans le temps.



Nous avons de cette manière, mis en évidence l'association rapide et non-covalente du ligand, suivie de sa réaction d'association covalente avec la protéine et du départ d'une molécule d'eau. Ainsi, la cinétique de formation de la liaison covalente entre le ligand et la protéine a pu être suivie directement par SM (cf. Figure 9). Il est à noter que cette liaison covalente est réversible en conditions dénaturantes à pH acide (pH = 1).

Figure 9 : Illustration de la cinétique de réaction d'association d'un substrat suicide observée en temps réel par SM.

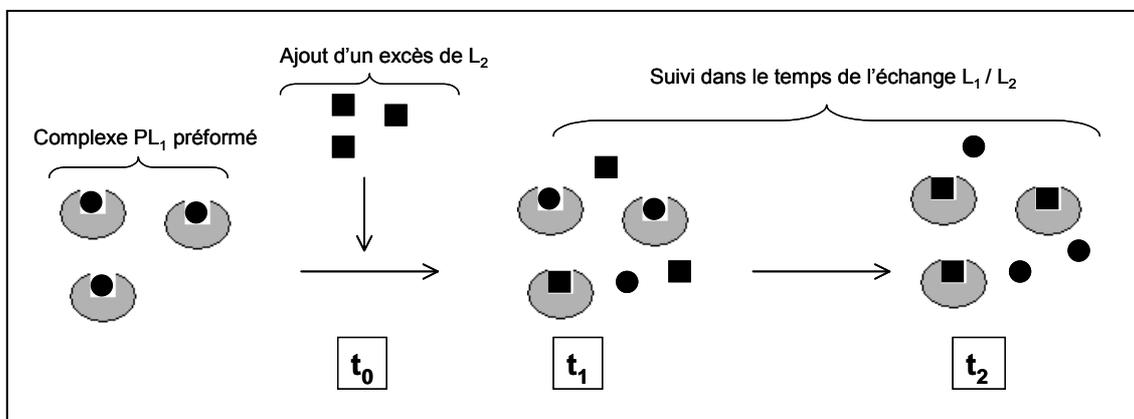


Cet exemple illustre le potentiel de la SM dans l'étude des systèmes hors équilibre. De manière générale, cette technique pourrait être utilisée pour suivre en temps réel et mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance et de fonctionnement de systèmes biologiques plus complexes. Une récente publication reportant le suivi avec succès du repliement d'une protéine par SM, assisté par le complexe GroEL/GroES semble conforter cette idée [van Duijn et coll. **2005**].

3. Exemple de la cinétique de dissociation de ligands de l'AR

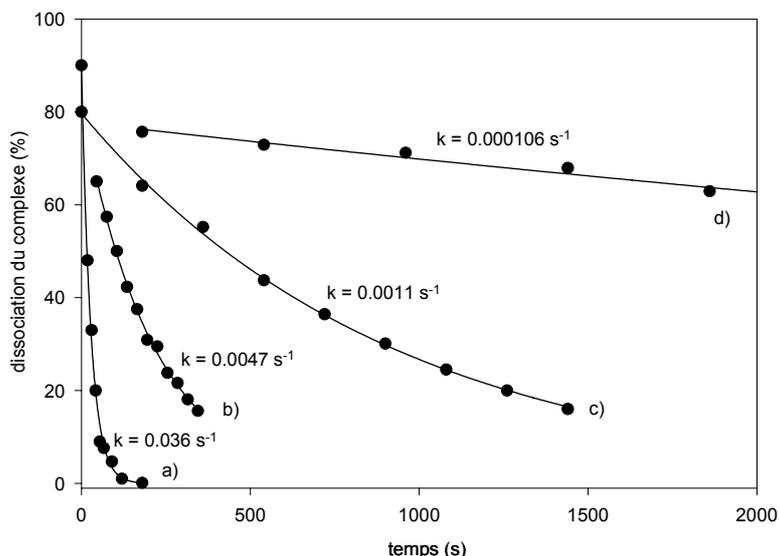
En appliquant la même approche, il est possible de suivre la cinétique de dissociation de complexes non-covalents protéine-ligand. Le déséquilibre en solution d'un complexe initialement préformé peut être provoqué par l'ajout d'un large excès d'un autre ligand de très bonne affinité, qui chassera le premier (cf. Figure 10).

Figure 10 : Illustration de la stratégie utilisée pour déterminer les constantes de dissociation de complexes protéine/ligand.



Si le ligand chassé à une faible probabilité de se réassocier à la protéine, alors la cinétique de dissociation du ligand suit une loi de dissociation du premier ordre, k (s^{-1}) étant la constante de dissociation cinétique du complexe (connu aussi sous le nom de k_{off}). Nous avons appliqué cette stratégie à plusieurs ligands de l'AR et déterminé leurs constantes de dissociation cinétique (cf. Figure 11).

Figure 11 : Suivi de la cinétique de dissociation de complexes AR-ligand, 10 μ M AR + 0.8 eq ligand (incubation 15 min) + 10 eq 552 à $t = 0$. a) AR-K2, b) AR-393, c) AR-fidarestat, d) AR-minalrestat.



Les différents ligands testés se dissocient de manière très différente, permettant un classement de chaque inhibiteur suivant sa constante de dissociation. Ce classement apporterait une donnée supplémentaire au classement basé sur l'affinité relative ou absolue (cf. **CHAP I. I. 2.2.1**) dans un contexte de développement de nouvelles drogues.

III. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons évalué le potentiel de la SM dans l'étude de systèmes hors équilibre. A la lumière de ces premiers résultats, il apparaît qu'il est possible de suivre, de manière originale, l'évolution d'une ou plusieurs espèces dans le temps.

Nous avons développé une approche expérimentale permettant d'évaluer la cinétique de dissociation des sous-unités du dimère de GlmS. Nous avons mis en évidence que cette cinétique est dépendante de mutations ou de molécules qui interagissent sur la protéine. L'approche développée permettra, 1) de mieux comprendre le fonctionnement de GlmS au niveau structural, 2) d'aider à la recherche de nouveaux inhibiteurs.

Dans le cas des complexes protéine-ligand, nous avons montré qu'il est possible d'accéder à des informations cinétiques intéressantes comme les constantes de dissociation de complexes (cas de l'AR). Ces données pourraient être considérées comme un moyen supplémentaire de classer et choisir des ligands d'intérêt dans le cadre d'un projet de développement de molécules « leads ». Nous avons aussi décrit un exemple où la SM a été utilisée pour suivre la cinétique d'association covalente d'un ligand sur une protéine.

Clairement, l'étude en temps réel de la dynamique de complexes non-covalents semble être une voie ouvrant vers un grand nombre d'applications, le potentiel de cette approche reste encore à développer, en particulier, pour le suivi en temps réel du fonctionnement de complexes supramoléculaires.

Références bibliographiques

A

Alattia, J. R.; Ames, J. B.; Porumb, T.; Tong, K. I.; Heng, Y. M.; Ottensmeyer, P.; Kay, C. M.; Ikura, M. Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding. *FEBS Lett.* **1997**, 417, 405-8.

Aquilina, J. A.; Benesch, J. L.; Ding, L. L.; Yaron, O.; Horwitz, J.; Robinson, C. V. Subunit exchange of polydisperse proteins: Mass spectrometry reveals consequences of alpha A-crystallin truncation. *J Biol Chem.* **2005**, 7, 7.

B

Baker, J. P.; Titus, M. A. Myosins: matching functions with motors. *Curr Opin Cell Biol.* **1998**, 10, 80-6.

Bleicher, K. H.; Bohm, H. J.; Muller, K.; Alanine, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov.* **2003**, 2, 369-78.

Boggon, T. J.; Murray, J.; Chappuis-Flament, S.; Wong, E.; Gumbiner, B. M.; Shapiro, L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science.* **2002**, 296, 1308-13.

Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Sanglier-Cianferani, S.; Talfournier, F.; Van Dorsselaar, A.; Branlant, G. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **2000**, 275, 35908-13.

Brot, N.; Weissbach, L.; Werth, J.; Weissbach, H. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1981**, 78, 2155-8.

C

Chung, S. S.; Ho, E. C.; Lam, K. S.; Chung, S. K. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* **2003**, 14, S233-6.

Chung, E.; Henriques, D.; Renzoni, D.; Zvelebil, M.; Bradshaw, J. M.; Waksman, G.; Robinson, C. V.; Ladbury, J. E. Mass spectrometric and thermodynamic studies reveal the role of water molecules in complexes formed between SH2 domains and tyrosyl phosphopeptides. *Structure.* **1998**, 6, 1141-51.

Ciorba, M. A.; Heinemann, S. H.; Weissbach, H.; Brot, N.; Hoshi, T. Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett.* **1999**, 442, 48-52.

G

Geoghegan, K. F.; Kelly, M. A. Biochemical applications of mass spectrometry in pharmaceutical drug discovery. *Mass Spectrom Rev.* **2004**, 2, 2.

H

Handschuh, G.; Lubber, B.; Hutzler, P.; Hofler, H.; Becker, K. F. Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J Mol Biol.* **2001**, 314, 445-54.

Hokenson, M. J.; Uversky, V. N.; Goers, J.; Yamin, G.; Munishkina, L. A.; Fink, A. L. Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. *Biochemistry.* **2004**, 43, 4621-33.

Houdusse, A.; Silver, M.; Cohen, C. A model of Ca²⁺-free calmodulin binding to unconventional myosins reveals how calmodulin acts as a regulatory switch. *Structure.* **1996**, 4, 1475-90.

I

Inaba, M. [Regulation of adhesion molecules by calcium]. *Clin Calcium.* **2002**, 12, 583-6.

Isupov, M. N.; Obmolova, G.; Butterworth, S.; Badet-Denisot, M. A.; Badet, B.; Polikarpov, I.; Littlechild, J. A.; Teplyakov, A. Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase. *Structure.* **1996**, 4, 801-10.

K

Kinoshita, J. H.; Nishimura, C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab Rev.* **1988**, 4, 323-37.

Koch, A. W.; Pokutta, S.; Lustig, A.; Engel, J. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry.* **1997**, 36, 7697-705.

M

Massiere, F.; Badet-Denisot, M. A. The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell Mol Life Sci.* **1998**, 54, 205-22.

Menetrey, J.; Bahloul, A.; Wells, A. L.; Yengo, C. M.; Morris, C. A.; Sweeney, H. L.; Houdusse, A. The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature*. **2005**, 435, 779-85.

Mermall, V.; Post, P. L.; Mooseker, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. **1998**, 279, 527-33.

Milewski, S. Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta*. **2002**, 1597, 173-92.

Mooseker, M. S.; Cheney, R. E. Unconventional myosins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **1995**, 11, 633-75.

Moskovitz, J. Roles of methionine sulfoxide reductases in antioxidant defense, protein regulation and survival. *Curr Pharm Des*. **2005**, 11, 1451-7.

N

Nagar, B.; Overduin, M.; Ikura, M.; Rini, J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*. **1996**, 380, 360-4.

Neckers, L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med*. **2002**, 8, S55-61.

Neckers, L.; Lee, Y. S. Cancer: the rules of attraction. *Nature*. **2003**, 425, 357-9.

Nollet, F.; Kools, P.; van Roy, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. **2000**, 299, 551-72.

O

Oly, A.; Boschi-Muller, S.; Marraud, M.; Sanglier-Cianferani, S.; Van Dorsselear, A.; Branlant, G. Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem*. **2002**, 277, 12016-22.

P

Pecina-Slaus, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*. **2003**, 3, 17.

Perret, E.; Benoliel, A. M.; Nassoy, P.; Pierres, A.; Delmas, V.; Thiery, J. P.; Bongrand, P.; Feracci, H. Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *Embo J*. **2002**, 21, 2537-46.

Pertz, O.; Bozic, D.; Koch, A. W.; Fauser, C.; Brancaccio, A.; Engel, J. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J.* **1999**, 18, 1738-47.

Pokutta, S.; Herrenknecht, K.; Kemler, R.; Engel, J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem.* **1994**, 223, 1019-26.

Potier, N. Caractérisation de complexes biologiques non-covalents par spectrométrie de masse avec ionisation électrospray. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.* **1996**.

Prodromou, C.; Roe, S. M.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell.* **1997**, 90, 65-75.

Purcell, T. J.; Morris, C.; Spudich, J. A.; Sweeney, H. L. Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 14159-64.

R

Rock, R. S.; Rice, S. E.; Wells, A. L.; Purcell, T. J.; Spudich, J. A.; Sweeney, H. L. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**, 98, 13655-9.

Roe, S. M.; Prodromou, C.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem.* **1999**, 42, 260-6.

Rogniaux, H. Etude d'interactions faibles intra- et inter-moléculaires de biomolécules par spectrométrie de masse. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.* **2000**.

S

Sakamoto, T.; Wang, F.; Schmitz, S.; Xu, Y.; Xu, Q.; Molloy, J. E.; Veigel, C.; Sellers, J. R. Neck length and processivity of myosin V. *J Biol Chem.* **2003**, 278, 29201-7.

Sanglier, S. La spectrométrie de masse : un nouvel outil pour l'étude des interactions faibles en biologie. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.* **2002**.

Scheibel, T.; Siegmund, H. I.; Jaenicke, R.; Ganz, P.; Lilie, H.; Buchner, J. The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**, 96, 1297-302.

Siegel, M. M. Early discovery drug screening using mass spectrometry. *Curr Top Med Chem.* **2002**, 2, 13-33.

Siegel, M. M.; Tabei, K.; Bebernitz, G. A.; Baum, E. Z. Rapid methods for screening low molecular mass compounds non-covalently bound to proteins using size exclusion and mass spectrometry applied to inhibitors of human cytomegalovirus protease. *J Mass Spectrom.* **1998**, 33, 264-73.

Sobott, F.; Benesch, J. L.; Vierling, E.; Robinson, C. V. Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem.* **2002**, 277, 38921-9.

Sobott, F.; Robinson, C. V. Characterising electrosprayed biomolecules using tandem-MS_ the noncovalent GroEL chaperonin assembly. *International Journal of Mass Spectrometry.* **2004**, 236, 25-32.

Steinberg, M. S.; McNutt, P. M. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* **1999**, 11, 554-60.

T

Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* **1995**, 7, 619-27.

Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* **1991**, 251, 1451-5.

Teplyakov, A.; Leriche, C.; Obmolova, G.; Badet, B.; Badet-Denisot, M. A. From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. *Nat Prod Rep.* **2002**, 19, 60-9.

Teplyakov, A.; Obmolova, G.; Badet, B.; Badet-Denisot, M. A. Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. *J Mol Biol.* **2001**, 313, 1093-102.

Teplyakov, A.; Obmolova, G.; Badet-Denisot, M. A.; Badet, B. The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Sci.* **1999**, 8, 596-602.

V

Van Duijn, E.; Bakkes, P. J.; Heeren, R. M.; van den Heuvel, R. H.; van Heerikhuizen, H.; van der Vies, S. M.; Heck, A. J. Monitoring macromolecular complexes involved in the chaperonin-assisted protein folding cycle by mass spectrometry. *Nat Methods.* **2005**, 2, 371-6.

Vis, H.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V. Selective association of protein molecules followed by mass spectrometry. *Protein Sci.* **1999**, 8, 1368-70.

W

Wabnitz, P. A.; Loo, J. A. Drug screening of pharmaceutical discovery compounds by micro-size exclusion chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2002**, 16, 85-91.

Wells, A. L.; Lin, A. W.; Chen, L. Q.; Safer, D.; Cain, S. M.; Hasson, T.; Carragher, B. O.; Milligan, R. A.; Sweeney, H. L. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature.* **1999**, 401, 505-8.

Y

Yabe-Nishimura, C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev.* **1998**, 50, 21-33.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons réalisé une étude bibliographique qui fait le point sur l'état d'avancement des connaissances dans le domaine de la SM supramoléculaire. Cette étude bibliographique, qui incluait les travaux de thèse déjà réalisés au laboratoire, a permis de dégager les objectifs de notre travail :

- Utiliser et améliorer les possibilités existantes de la méthode pour caractériser des complexes non-covalents préformés en solution et démontrer la validité des résultats obtenus par des expériences de contrôle.
- Développer des conditions expérimentales permettant d'étendre l'utilisation de la SM à des édifices toujours plus fragiles et de masses plus élevées. Cette problématique inclut aussi bien les aspects « traitements de l'échantillon » que les aspects purement instrumentaux.
- Déterminer s'il est possible d'obtenir d'autres informations que les stœchiométries, notamment en développant l'approche de dissociation des complexes non-covalents en phase gazeuse.
- Développer de nouvelles applications basées sur le potentiel de la SM.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous avons apporté des éléments de réponse à ces multiples questions. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus sur les différents systèmes biologiques étudiés ont permis de faire progresser la SM dans les directions suivantes : 1) repousser les limites de la SM supramoléculaire, 2) développer/appliquer de nouvelles approches expérimentales, 3) répondre à des questions biologiques. Tous les résultats ont été regroupés en trois types d'applications :

- Nous avons tout d'abord utilisé la SM pour découvrir et développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

- Dans ce contexte, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'évaluer la spécificité et l'affinité relative ou absolue d'inhibiteurs. Nous avons ensuite appliqué ces approches à des projets concrets de recherche de nouvelles molécules sur des protéines cibles (Hsp90 et une protéase X). Il est apparu de ce travail que la SM s'avère être un outil puissant dans la validation des molécules positives après un criblage à grande échelle. L'objectif réside à sélectionner rapidement par SM les quelques molécules d'intérêt qui permettront à la cristallographie de concevoir de nouvelles molécules de manière rationnelle. Enfin, nous avons participé au développement de l'automatisation de la technique afin de l'utiliser en routine dans des projets de recherche de nouveaux médicaments.

- Nous avons par ailleurs tiré profit du phénomène de dissociation en phase gazeuse pour évaluer la nature des interactions de molécules analogues de l'AR (électrostatique vs effet hydrophobe). Les résultats obtenus suggèrent que ce protocole d'analyse permettrait d'aider à la conception de nouvelles molécules « leads » et de valider par la suite l'amélioration de leurs propriétés physiques (affinité, spécificité). Nous avons aussi montré que, dans le cas de la protéine Hsp90, des éléments spécifiques de structure tridimensionnelle

sont probablement préservés en phase gazeuse. Ainsi, ce résultat suggère que le protocole de dissociation en phase gazeuse établi pour l'AR pourrait être appliqué dans le cadre du développement de « leads » de la protéine Hsp90.

Enfin, de manière générale, nous avons, à partir de ces systèmes protéiques, apporté de nouveaux exemples établissant que dans des conditions d'analyses requises, le processus électrospray n'influe pas sur les stoechiométries des espèces en interaction en solution.

- Nous avons ensuite tenté d'apporter des informations par SM sur différents mécanismes biologiques impliquant des interactions moléculaires.

- Nous avons caractérisé les partenaires d'un moteur cellulaire dit « non-conventionnel » (la myosine VI). Grâce au développement de conditions expérimentales adéquates, nous avons pu mettre en évidence l'interaction d'une calmoduline saturée par 4 Ca^{2+} sur la séquence « insérée » de la myosine VI. La présence inattendue de cette calmoduline structurale permet de mieux comprendre le comportement particulier de la myosine VI. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que des informations structurales pouvaient être déduites à partir d'expériences de dissociation en phase gazeuse. L'observation d'un transfert d'ions Ca^{2+} en phase gazeuse entre différents domaines protéiques, a permis d'émettre des hypothèses quant à l'interaction directe de ces domaines dans le complexe. Ces hypothèses ont été validées à partir de données obtenues par cristallographie. Ce résultat souligne que les phénomènes de dissociation en phase gazeuse par CID méritent d'être regardés de plus près, l'acquisition au laboratoire d'un appareil permettant la dissociation en phase gazeuse par ETD ouvre vers de nouvelles voies d'expérimentations.

De manière générale la SM a aussi permis d'évaluer l'homogénéité des différents construits analysés afin de sélectionner les conditions adéquates et les échantillons les mieux adaptés pour des études cristallographiques. La grande difficulté de ce travail a été de mettre au point les conditions expérimentales afin d'obtenir une sensibilité, une résolution et une précision en masse suffisantes pour pouvoir mettre en évidence l'interaction spécifique d'ions de petites masses avec un complexe multi-protéique de masse très élevée.

- Nous avons étudié le mécanisme d'adhésion cellulaire au travers du système constitué des E-cadhérines. Nous avons mis en évidence l'interaction coopérative de 3 Ca^{2+} sur le fragment E/EC1-2 avec une affinité moyenne de 23 μM . En raison des concentrations en Ca^{2+} extracellulaires (de l'ordre de 1 mM), ce résultat permet d'exclure l'hypothèse d'une régulation directe du mécanisme d'adhésion cellulaire par l'interaction des ions Ca^{2+} sur les deux modules E/EC1-2 de la E-cadhérine.

- Enfin, nous avons mis au point et utilisé des stratégies de protéolyse afin de localiser l'interaction par pont disulfure de la thiorédoxine avec les msr A et B. Ce travail permettra de continuer des études structurales sur les complexes msr-thiorédoxine, qui pourront être produits artificiellement en quantité importante.

- Nous avons enfin suivi les dynamiques d'échange de complexes non-covalents par SM.

▪ Nous avons mis au point des conditions expérimentales mettant en évidence l'influence de ligands sur la dynamique d'échange des sous-unités du dimère de GlmS. Nous avons aussi commencé l'étude concernant l'influence de mutations spécifiques, sur les dynamiques d'échanges de ce complexe multi-protéique. Les premiers résultats obtenus nous laissent penser que cette approche a un fort potentiel permettant d'évaluer, de manière originale, des zones d'interactions entre sous-unités ou bien l'influence d'inhibiteurs spécifiques de ce système protéique.

▪ Nous avons développé des études dynamiques de complexes protéine-ligand. Il apparaît de ces premiers résultats que la SM peut aussi fournir des constantes de dissociation cinétique de ligands, ce qui constituerait une donnée supplémentaire afin de classer des molécules dans le cadre de la validation de « leads » d'une protéine cible. Enfin, nous avons reporté le cas où la SM a permis de suivre la réaction d'association spécifique d'un substrat suicide dans le site d'une protéine. Cet exemple témoigne de la richesse des informations qui peuvent être accessibles par SM en utilisant des conditions expérimentales appropriées.

Perspectives ouvertes par notre travail.

Si l'amélioration des possibilités de la SM que nous avons obtenue était, d'une certaine façon attendue, certains résultats ont été plus surprenants et ouvrent des perspectives très innovantes.

Il s'agit de la possibilité de localiser des ions Ca^{2+} sur certaines sous-unités, de mettre en évidence l'interaction de certains domaines protéiques ou de déterminer la nature d'une interaction grâce à des spectres de fragmentation CID de complexes non-covalents.

Ces résultats, qui peuvent encore être discutés, ont néanmoins le mérite de montrer une possibilité d'obtenir, par exemple, des informations topologiques de complexes non-covalents. Il faudra donc continuer ce type d'études, potentiellement très intéressantes pour tous les complexes qui ne peuvent faire l'objet d'études structurales par des méthodes telles que la DRX et la RMN. Les fragmentations par CID ne sont probablement pas les mieux adaptées pour ce type d'étude, elles se font à une échelle de temps relativement lente, ce qui laisse craindre des réarrangements avant fragmentation. De ce point de vue, les fragmentations par ETD (Electron Transfer Dissociation) devront dès que possible être utilisées pour ce type d'études. La rapidité avec laquelle les fragmentations induites en ETD ont lieu, peut laisser espérer l'observation d'espèces ioniques qui auraient gardées davantage d'informations sur les interactions entre les sous-unités.

Il s'agit aussi de l'étude en temps réel de complexes non-covalents, qui apparaît être une approche originale, apportant une nouvelle dimension aux informations accessibles par SM. Nos premiers résultats indiquent que la SM tiendra un rôle important dans l'apport de données cinétiques de complexes non-covalents biologiques. Ce type d'étude sera donc à développer, notamment, afin d'être capable de suivre des cinétiques de réaction plus rapides.

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Conditions d'analyses

1. Analyse en conditions dénaturantes

L'analyse d'une protéine en conditions dénaturantes est réalisée par dilution de la protéine à une concentration de 2 μM , dans un mélange eau/acétonitrile 50/50 en volume, acidifié avec 1 % d'acide formique. L'échantillon est introduit en injection directe dans le spectromètre de masse à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Plusieurs tensions de cône peuvent être appliquées (20 à 60 V) afin de limiter la suppression du signal d'une protéine par une autre, dans le cas d'un mélange de protéines.

2. Analyse en conditions non-dénaturantes

L'analyse d'une protéine en conditions non-dénaturantes est réalisée par dilution de la protéine à une concentration d'environ 10 μM dans un tampon AcNH_4 (5 à 200 mM). L'échantillon est introduit en injection directe dans le spectromètre de masse à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. La force ionique du tampon est à adapter, suivant la solubilité de la protéine. Il faut cependant garder à l'esprit que, plus la concentration en tampon est importante, plus le signal SM sera faible. Les débits de gaz de nébulisation sont à augmenter fortement lorsque l'on travaille dans des tampons non-volatils par rapport aux conditions classiques dénaturantes. La pression et la tension de cône, qui sont des paramètres influant sur l'énergie communiquée aux ions dans l'interface, sont à optimiser dans chaque cas.

II. Fonctionnement et paramètres des différents spectromètres de masse utilisés

1. Le LCT (Micromass, Manchester, UK)

The screenshot displays the control interface for the LCT mass spectrometer, organized into several sections:

- (1) Source Parameters:**
 - Capillary (V): 10, 2900
 - Sample Cone (V): 0, 30
 - Extraction Cone (V): -10, 5
 - RF Lens: 750
- (2) Temperatures:**
 - Desolvation Temp (C): 23, 80
 - Source Temp (C): 48, 80
- (3) Gas Flows:**
 - Cone (L/hr): 121
 - Desolvation (L/hr): 316
- (4) Settings:**
 - Ion Energy: -1, 25
 - Tube Lens: -0, 0
 - Grid 2: -56, 55
 - TOF Flight Tube: -4605, 4520
 - Reflectron: 0, 1767
- (5) Additional Settings:**
 - RF DC Offset 1: 11, 10
 - RF DC Offset 2: -1, 2
 - Aperture: -5, 6
 - Acceleration: -201, 200
 - Focus: -8, 5
 - Steering: 1.5, 0.2
 - MCP Detector: 2791, 2800
 - Manual Pushed
 - Max. Flight Time: 120
- (6) Gauges:**
 - Pirani gauge: 1.91e0
 - Penning gauge: 7.38e-7
- (7) Max. Flight Time:** 120

(1) : Voltages appliqués dans la région « source » du spectromètre de masse. Pour un débit en soluté de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, le voltage appliqué sur le capillaire d'électronébulisation est généralement de l'ordre de 3000 V. La tension appliquée sur le cône d'échantillonnage est à optimiser à chaque analyse, cette tension conditionne l'énergie communiquée aux ions dans l'interface.

(2) : La « RF lens » correspond à l'amplitude du voltage alternatif appliqué sur les hexapôles de l'appareil. Ce voltage permet de modifier la transmission des ions légers vis-à-vis des ions lourds dans le spectromètre de masse. Pour transmettre des masses élevées ($> 2000 \text{ m/z}$), le voltage appliqué est typiquement de l'ordre de 750 V. Pour transmettre de petites masses ($< 200 \text{ m/z}$), une valeur de 75 V est plus appropriée.

(3) : Les températures appliquées sur le bloc source du spectromètre de masse et sur le gaz de desolvation dépendent du solvant utilisé. Pour un solvant possédant une température d'ébullition élevée comme l'eau, des températures de l'ordre de 80 à 100 °C permettront une bonne désolvation des ions. A l'inverse, avec un solvant de type dichlorométhane ($T_{\text{éb}} = 40 \text{ °C}$), il faudra choisir des températures plus basses, de l'ordre de 30 à 40 °C.

(4) : Les débits de gaz sont dépendant de la température d'ébullition du solvant utilisé, pour un solvant peu volatil, les débits en gaz doivent être augmentés. En particulier, ce paramètre est critique pour le gaz de nébulisation de ce type d'appareil.

(5) : Voltages appliqués sur différentes lentilles permettant la transmission des ions dans le spectromètre de masse. Ces voltages sont généralement optimisés pour obtenir un bon compromis résolution/sensibilité et ne sont généralement plus modifiés par la suite.

(6) : Pression lues dans l'interface (de l'ordre de 2 mbars) et dans le tube de vol (de l'ordre de 7×10^{-7} mbars). La pression dans l'interface peut être augmentée en réduisant le pompage de la pompe primaire. Cette augmentation de la pression permet de mieux transmettre les ions lourds ($> 2000 \text{ m/z}$).

(7) : Temps (en μs) séparant l'envoi de paquets d'ions dans l'analyseur. Ce temps conditionne la gamme de masse analysée et le nombre d'ions envoyés vers le détecteur. Ainsi, plus la gamme de masse choisie pour l'analyse est élevée moins la sensibilité sera bonne.

2. Le Q-TOF (Micromass, Manchester, UK)

The screenshot displays the control interface for a Micromass Q-TOF mass spectrometer. It features various control panels and a data table. The parameters are organized as follows:

- (1) Source Region Parameters:** Capillary (3486, 3500), Cone (46, 35), Extractor (10, 0).
- (2) Temperature Parameters:** Source Block Temp. (91, 90), Desolvation Temp. (1020, 90).
- (3) Resolution and Collision Parameters:** LM Res (5.0), HM Res (5.0), Collision (9.6, 10.0).
- (4) Ion Optics Parameters:** RF Lens (8.67, 0.87), Ion Energy (2.0), Steering (0.31, 0.00), Entrance (74.9, 75.0), Pre-Filter (4.8, 5.0).
- (5) Profile Table:**

	Mass	Dwell Time (% of scan time)	Ramp Time (% scan time)
1.	250	5	5
2.	350	20	70
3.	650		
- (6) Vacuum and Timing Parameters:** Transport (-6.7, 5.0), Aperture 2 (-11.1, 10.0), AccV (-151, 150), Focus (-1, 0), Tube Lens (-99, 100), Offset 1 (0.4, 0.4), Offset 2 (-0.6, 1.0), Pusher (863, 980), TOF (kV) (-9.25, 9.10), Reflectron (2.08, 35.28), Time (μs) (150).
- (7) Pressure Levels:** Analyser (3.0e-5 mBar), Backing (1.8e0 mBar), Source (2.1e0 mBar), TOF (4.4e-7 mBar).

(1) : Voltages appliqués dans la région « source » du spectromètre de masse, les voltages appliqués sont du même ordre de grandeur que ceux appliqués sur l'appareil de type LCT.

(2) : Les températures appliquées sur le bloc source du spectromètre de masse et sur le gaz de desolvatation sont à optimiser de la même manière que sur l'appareil de type LCT.

(3) : Différence de potentiel appliquée à l'entrée de la cellule de collision. Plus le voltage appliqué est élevé, plus l'énergie communiquée aux ions dans la cellule de collision sera grande.

(4) : Voltages appliqués sur différentes lentilles permettant la transmission des ions dans le spectromètre de masse. Ces voltages sont généralement optimisés pour obtenir un bon compromis résolution/sensibilité et ne sont généralement plus modifiés par la suite.

(5) : Paramètres liés au « MS profile ». Lorsque le quadripôle fonctionne comme guide d'ions, il transmet de manière différente les ions lourds et les ions légers suivant la valeur de l'amplitude de la tension alternative qui est appliquée. Le « MS profile » sert à modifier la valeur de cette tension alternative durant l'acquisition afin de transmettre plus justement tous les ions sur la gamme de masse utilisée. Les valeurs indiquées ici à titre d'exemple sont caractéristiques d'une gamme de masse correspondant à des ions légers < 1000 m/z.

(6) : Temps (en μs) séparant l'envoi de paquets d'ions dans l'analyseur. Ce temps conditionne la gamme de masse analysée et le nombre d'ions envoyés vers le détecteur.

(7) : Pression lues dans l'interface (de l'ordre de 2 mbars), dans l'étage contenant le quadripôle (3×10^{-5} mbars) et dans le tube de vol (de l'ordre de 7×10^{-7} mbars). La pression dans l'interface peut, comme dans le cas du LCT, être augmentée en réduisant le pompage de la pompe primaire. Il est à noter que le Q-TOF transmet mieux les ions lourds que le LCT, cette performance supplémentaire est attribuée au fait que le Q-TOF possède un étage de pompage supplémentaire par rapport au LCT [Thèse Sarah 2002].

3. Le micrOTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

3.

(1)	End Plate Offset	-400	V	113	nA
	Capillary	4400	V	3	nA
(2)	Nebulizer	0.20	Bar	0.20	Bar
	Dry Gas	4.0	l/min	4.0	l/min
	Dry Temp	200	°C	200	°C
(3)	Fore	2.76e+00	mbar		
	High	2.95e-07	mbar		
(4)	Capillary Exit	160.0	V	Skimmer 1	56.0 V
(5)	Hexapole 1	24.4	V	Skimmer 2	26.5 V
	Hexapole 2	20.2	V	Hexapole RF	400.0 Vpp
(6)	Transfer Time	35.0	μs	Pre Puls Storage	10.0 μs
	Lens 1 Storage	50.0	V	Lens 1 Extraction	17.0 V
	Lens 2	4.8	V	Lens 3	-37.1 V
	Lens 4	-4.8	V	Lens 5	-47.0 V
(7)	Detector	1400	V	1	nA
	Flight Tube	9000	V	9004	V
	Pulser			Reflector	
	Push	+ 378	V	379	V
	Pull	- 378	V	378	V
	Corrector			Detector	
	Fill	+ 35.1	V	34.0	V
	Extract	- 997	V	998	V
				Source	- 1400 V 1 V
				TOF	- 2050 V 598 V

(1) : Voltages appliqués dans la région « source » du spectromètre de masse. A l'inverse des appareils de type Micromass, le potentiel appliqué sur le capillaire métallique d'électronébullisation est nul. Une différence de potentiel d'environ 4000 V est obtenue en appliquant un potentiel négatif sur l'entrée du capillaire de transmission.

(2) : Le débit et la température des gaz est à optimiser suivant la nature du solvant utilisé. Il est à noter que la température à appliquer est beaucoup plus importante que sur les appareils de type Micromass.

(3) : Pression lues dans l'interface (de l'ordre de 2-3 mbars) et dans le tube de vol (de l'ordre de 3×10^{-7} mbars). La pression dans l'interface peut être augmentée en réduisant le pompage de la pompe primaire. Le micrOTOF possède aussi un étage de pompage supplémentaire par rapport au LCT.

(4) : Voltage appliqué à la sortie du capillaire de transmission. Ce voltage à le même rôle que celui appliqué sur le cône d'échantillonnage dans le cas des appareils Micromass : c'est-à-dire qu'il contrôle l'énergie communiquée aux ions dans l'interface.

(5) : Paramètres liés aux hexapôles du spectromètre de masse : Ces paramètres sont à optimiser pour transmettre plus ou moins bien les ions légers et lourds. Ici, une valeur de 400 pour la RF des hexapôles permet de transmettre efficacement les ions lourds.

(6) : Paramètres liés au stockage et à l'extraction des ions dans le deuxième hexapôle. En particulier, les temps de stockage et de transfert des ions sont particulièrement discriminants vis-à-vis des ions légers et lourds. En effet, après leur stockage, l'extraction des ions doit être désynchronisée d'un certain temps avec le pulse envoyant les ions orthogonalement dans l'analyseur. Ce temps de désynchronisation correspond au temps nécessaire aux ions pour parcourir la distance de l'hexapôle à l'analyseur. Ce temps dépend bien-entendu du rapport m/z des ions.

(7) : Voltages appliqués sur différentes lentilles permettant la transmission des ions dans le spectromètre de masse. Ces voltages sont généralement optimisés pour obtenir un bon compromis résolution/sensibilité et ne sont généralement plus modifiés par la suite.

III. Protocoles de dessalage des protéines

1. Dessalage par ultracentrifugation

Le dessalage par ultracentrifugation est basé sur la séparation sélective de petites molécules par rapport à des molécules de tailles plus importantes à partir d'une membrane poreuse. La taille des pores de la membrane utilisée conditionnera la taille des molécules qui seront susceptibles de la traverser : les molécules de taille supérieure aux pores seront concentrées sur la membrane tandis que les molécules plus petites pourront la traverser. Plusieurs cycles de concentration/dilution permettront d'échanger complètement un tampon initial dans un autre. Plusieurs paramètres conditionnent la rapidité de l'échange de tampon entre chaque cycle :

- La vitesse de centrifugation
- La température de l'échantillon

- La viscosité de l'échantillon (liée aussi à la quantité de matériel biologique chargée sur la membrane)
- La taille des pores de la membrane

En pratique, il convient de suivre initialement le protocole expérimental proposé par le fournisseur et d'adapter par la suite au cas par cas suivant la nature de l'échantillon. A titre indicatif, des conditions générales d'utilisation sont données par la suite pour chaque dispositif de dessalage utilisé durant ce travail.

1.1. Sur Vivaspin 500 (Vivascience)

Protocole utilisé :

Ajout de 100 μL protéine ($\approx 2\text{mg/ml}$) + 500 μL AcNH_4 50 mM (Merck), 8 cycles à 4°C, 11000 tr/min

Cut off 10 kDa : ≈ 5 min/cycle

Cut off 30 kDa : ≈ 3 min/cycle

Membrane utilisée : polyethersulfone

1.2. Sur Vivaspin 2 (Vivascience)

Protocole utilisé :

Ajout de 250 μL protéine ($\approx 2\text{mg/ml}$) + 600 μL AcNH_4 50 mM (Merck), 8 cycles à 4°C, 6000 tr/min

Cut off 10 kDa : ≈ 12 min/cycle

Cut off 30 kDa : ≈ 10 min/cycle

Membrane utilisée : polyethersulfone

1.3. Sur centricon (Millipore)

Protocole utilisé :

Ajout de 250 μL protéine ($\approx 2\text{mg/ml}$) + 600 μL AcNH_4 50 mM (Merck), 8 cycles à 4°C, 6000 tr/min

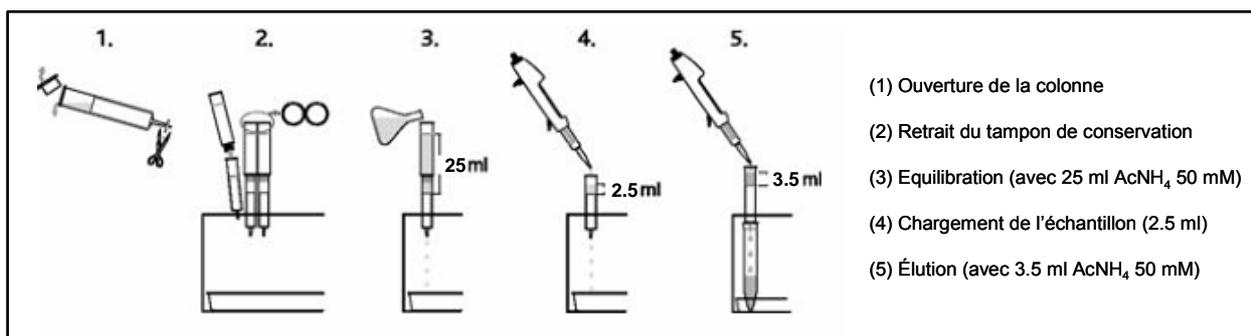
Cut off 10 kDa : ≈ 45 min/cycle

Cut off 30 kDa : ≈ 30 min/cycle

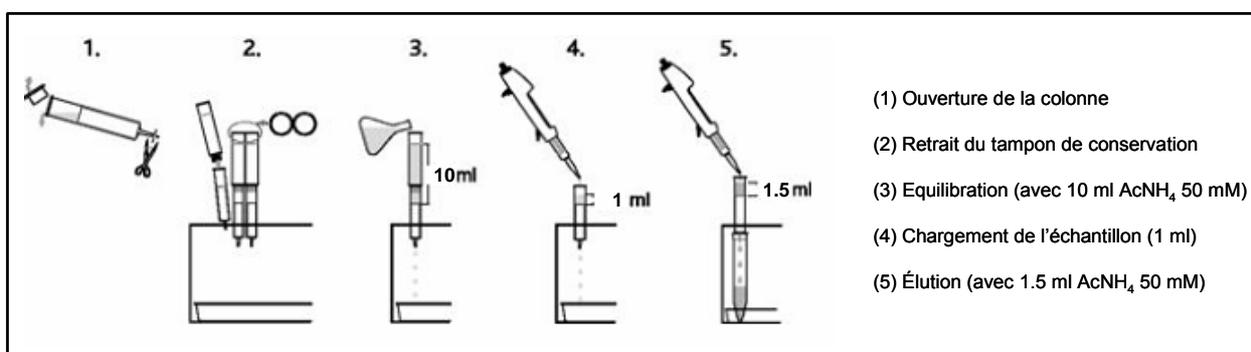
2. Dessalage par filtration sur gel

Le dessalage par filtration sur gel est basé sur la différence de temps de rétention des molécules traversant un gel poreux. Les molécules de tailles importantes auront un temps de séjour limité au sein du gel donc seront éluées très rapidement. Au contraire, les petites molécules étant capables de rentrer dans les pores du gel auront un temps de séjour plus grand et seront éluées lentement. De cette manière, il est possible d'éluier de manière sélective les molécules suivant leur taille. Différents dispositifs de filtration sur gel sont commercialement disponibles, le choix du dispositif dépend surtout de la quantité de matériel biologique utilisée. Plusieurs protocoles de dessalage sur colonne de gel filtration sont rappelés par la suite.

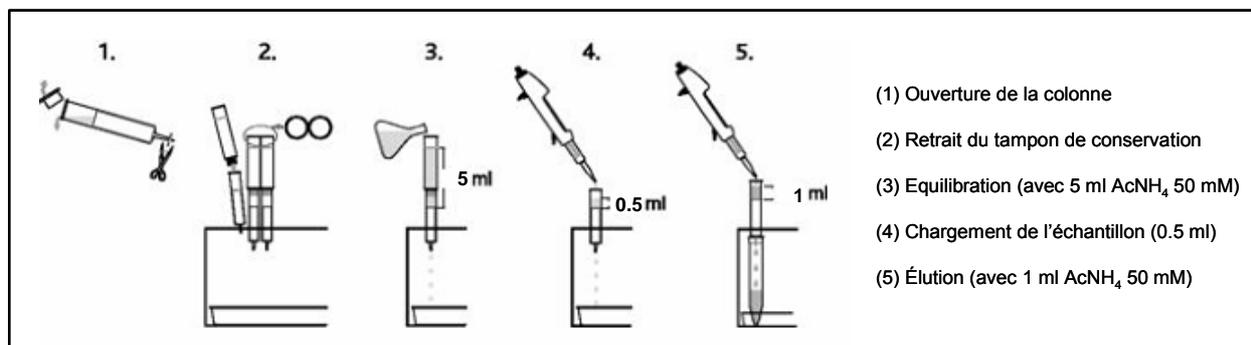
2.1. Sur colonne PD10 (Amersham Biosciences)



2.2. Sur colonne NAP10 (Amersham Biosciences)



2.3. Sur NAP5 (Amersham Biosciences)



3. Dessalage par ZipTip (C₄ ou C₁₈)

Protocole utilisé :

- Le ZipTip est tout d'abord équilibré avec 6 µL d'eau et 1% acide formique
- L'échantillon est chargé sur le ZipTip puis lavé 4 fois avec 6 µL d'eau et 1% acide formique
- L'échantillon est élué avec 6 µL d'un mélange eau/acétonitrile 50/50 et 1% acide formique

NB : ce type de dessalage dénature les protéines et convient pour une analyse en condition dénaturante

III. Séquences de quelques protéines étudiées

AR, m = 36134.7

GSHMASRLLLNNGAKMPILGLGTWKSPPGQVTEAVKVAIDVGYRHIDCAHVYQNEVEVGVAIQEKLRQVVKREELFIVSKLWCTYHEKGLV
KGACQKTLSDLKLDYLDLYLIHWPTGFKPGKEFFPLDESGNVVPSDNTILDTWAAMEELVDEGLVKAIGISNFNHLQVEMILNKPLKYKPAVN
QIECHPYLTQEKLQYQSKGIVVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSLLEDPRIKAIAAKHNKTTAQLIRFPMQRNLVVIPKSVTPERIAENFKVDFD
ELSSQDMTLLSYNRNWRVCALLSCTSHKDYPFHEEF

Myosine VI long S1, m = 107054 Da

MEDGKPVWAPHPTDGFQVGNIVDIGPDSLIEPLNQKGTFLALINQVFPAAEEDSKKDVEDNCSMLYNEATLLHNIKVRYSKDRIYTYVANILI
AVNPYFDIPKIYSSETIKSYQKSLGTMPPHVFAIADKAFRDMKVLKLSQSIIVSGESGAGKTENTKFLVRYLTSYGTGQDIDDRIVEANPLLEA
FGNAKTVRNNNSSRFKGFVEIHFNEKSSVGGFVSHYLLEKSRICVQKKEERNYHIFRYLCAGASEDIRERLHLSPPDNFRYLNRGCTRYFAN
KETDKQILQNRKSPEYLKAGSLKDPDLLDDHGDFIRMCTAMKKIGLDDEEKLDLFRVAVGLHLGNIDFEEAGSTSGGCNLKNKSTQALEYCAE
LLGLDQDDLRLVSLTTRVMLTTAGGAKGTVIKVPKVEQANNARDALAKTVYSHLFDHVNRVNVQCFFPETSSYFIGVLDIAGFEYFEHNSFEQ
FCINYCNEKLQQFFNERILKEEQELYQKEGLGVNEVHYVDNQDCIDLIEARLVGILDILDEENRPLQPSDQHFTSAVHQKHKDHFRLSIPRKS
AIHRNIRDDEGFIIRHFAGAVCYETTQFVEKNNDALHMSLES LICESRDKFIRELFESSTNNKDTKQKAGKLSFISVGNKFKTQLNLLLDKLRST
GASFIRCIPNLKMTSHHFEGAQILSQLQCSGMVSVLDLMQGGFSPRASHELYNMYKYMPPDKLARLDPRLFCALFKALGLNEIDYKFGLT
KVFFRPGKFAEFDQIMKSDPDHLAELVKRVNHWLICSRWKVKVQWCSLSVIKLNKIKYRAEACIKMQKTIRMWLCKRRHKPRIDGLVKVGT
KRLDKFNEVVSALKDQKQEMSKQVKDLEISIDALMAKIKSTMMTREIQIQKEYDALVKSSAVLLSALQKKKGEQKLISEEDLDGYKDDDDK

GlmS, m = 66763 Da

CGIVGAIQRDVAEILLEGLRRLLEYRGYDSAGLAVVDAEGHMTRLRRLGKVQMLAQAAEEHPLHGGTGIAHTRWATHGEPSEVNAHPHVSE
HIVVVHNGIENHEPLREELKARGYTFVSETDTEVIAHLVNWELKQGGTLREAVLRAIPQLRGAYGTVIMDSRHPDTLLAARSGSPLVIGLGMG
ENFIASDQLALLPVTRRFIFLEEGDIAEITRRSVNIFDKTGAEVKRDIESNLQYDAGDKGIYRHYMQKEIYEQPNAIKNTLGRISHGQVDLSEL
GPNADELLSKVEHIQILACGTSYNSGMVSRYWFESLAGIPCDVEIASEFRYRKSARRNSLMITLSQSGETADTLAAGLRLSKELGYLGLSLAICN
VPGSSLVRESLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAKLSRLKGLDASIEHDIVHGLQALPSRIEQMLSQDKRIEALAEFSDKHHALFL
GRGDQYPIALEGALKLKEISYIAEAYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNELLEKLKSNIEEVRARGGQLYVFADQDAGFVSSDNMHIEMP
HVEEVIAPIFYTVPLQLLAYHVALIKGTDVDQPRNLAKSVTVE

MsrA Meningitidis WT, m = 21765 Da

NTRTIYLAGGCFWGLEAYFQRIDGVDAVSGYANGNTKNPSYEDVSYRHTGHAETVKVTYDADKLSLDLQYFFRVVDPTSLNKQGNDTGT
QYRSGVYYTDPAEKAVIAALKREQQYQLPLVVENELKNFYDAEEYHQDYLIKPNNGYCHIDIRKADEPLPGKTKTAPQGGKGFDAATYKPK
SDAELKRT

MsrB Meningitidis WT, m = 16374 Da

TYKKPSDAELKRTLTEEYQVTQNSATEYAFSHEYDHLFKPGIYDVVSGEPLFSSADKYDSGCGWPSFTRPIDAKSVTEHDDFSYNMRRTE
VRSHAADSHLGHVFPDGRDKGLRYCINGASLKFIPLEQMDAAGYGALKSKVK

Thiorédoxine, m = 11659 Da

SDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPSKMIAPILDEIADEYQKGLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSK
GQLKEFLDANLA

Calmoduline, m = 16706

ADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFD
KDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK

NOTE D'APPLICATION

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Guillaume Chevreux, Emmanuelle Leize, Alain Van Dorsselaer, Noëlle Potier

Study of noncovalent protein/ligand complexes using micrOTOF Mass spectrometer.

Application Notes #ET-08 de Bruker

Il est possible de consulter ce document dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.