

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

par

Cédric ATMANENE

Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire

Soutenue le 28 octobre 2009 devant la commission d'examen :

Dr. Alain VAN DORSSELAER

Directeur de thèse

Dr. Bernard MONSARRAT

Rapporteur

Pr. Jean-Marie SCHMITTER

Rapporteur

Dr. Alain BECK

Examineur

Dr. Jean-Paul RENAUD

Examineur

Dr. Sarah SANGLIER-CIANFERANI

Examineur

A mes parents, mes grands-parents,

A Audrey,

« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie. »

Confucius

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg (UMR 7178, CNRS-ULP).

Mes remerciements les plus sincères s'adressent en tout premier lieu à Alain Van Dorsselaer pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse dans un cadre de travail propice à l'épanouissement scientifique et personnel.

Je tiens ensuite à témoigner toute ma reconnaissance à Sarah Sanglier-Cianféron pour m'avoir « coaché » durant ces trois années avec enthousiasme et bonne humeur. Merci Sarah de ton soutien et de toute la confiance que tu m'as accordée.

Je remercie vivement Alain Beck, Bernard Monsarrat, Jean-Paul Renaud et Jean-Marie Schmitter pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

MERCI à Jean-Marc Strub et Cyril Colas pour toutes ces discussions durant lesquelles vous m'avez généreusement fait profiter de vos connaissances techniques en spectrométrie de masse.

MERCI évidemment à Fabrice Varrier pour avoir ressuscité mon ordinateur portable à l'heure où j'en avais sans doute le plus besoin...promis, je ne poserai plus de jus de fruits à côté du clavier !!!

MERCI à Hélène Diemer et Jennifer Jund, Christine Schaeffer-Reiss, Véronique Trimbou, Dimitri Heintz, Fabrice Bertile (l'ASMS 2011 aura lieu à Denver, ça te dit ?), Danièle Thiersé, François Delalande (désolé pour les petits ponts...) et Christine Carapito (merci d'avoir été mon chauffeur personnel durant ces dernières semaines).

MERCI à tous les étudiants du LSMBO, Audrey, Haiko, Sébastien (Allez l'OM !), Julien, Marie-Laure, Thierry, Nicolas, Daniel et Stéphanie (vive le « noncov »... et prenez soin du LCT), Agnès (la reine des trappes), Guillaume (camarade à l'ECPM, pendant la thèse, les congrès, la rédaction...serons-nous collègues plus tard ?), Véronique D, Laetitia, Chrystel, Antoine et Jean-Michel (merci d'avoir partagé ton expérience sur les ARN). Votre bonne humeur et votre humour ont fait que ces trois années passées à vos côtés ont été des plus agréables...merci !

MERCI à Dominique Roecklin et Valérie Vivat Hannah pour m'avoir fait profiter de leur expérience, de leurs conseils et pour toutes ces discussions constructives sur le thème de la spectrométrie de masse supramoléculaire.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma reconnaissance envers l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai eu l'occasion de travailler durant ces trois années.

Un immense MERCI finalement à mes parents, à Audrey (« ma » Audrey), ainsi qu'à mes proches (amis et famille) qui se reconnaîtront. Votre soutien tout au long de ce chemin a été inestimable, dans les moments heureux, comme dans les moments plus difficiles...MERCI à vous !

PLAN GENERAL

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE I : Introduction bibliographique.....	5
CHAPITRE I : Les Interactions Non-Covalentes en Biologie : Description et Caractérisation.....	7
CHAPITRE II : Théorie et Instrumentation en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire	15
CHAPITRE III : Stratégies Expérimentales en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire pour la Caractérisation de Complexes Biologiques.....	39
PARTIE II : Apport du nanospray sur puce microfluidique en spectrométrie de masse supramoléculaire	77
CHAPITRE I : Description et Evaluation des Performances du Robot Triversa Nanomate.....	79
CHAPITRE II : Automatisation des Analyses sur Puce Microfluidique en MS Supramoléculaire pour le Développement de Molécules à Visée Thérapeutique.....	93
CHAPITRE III : Etude de l'Etat d'Oligomérisation de la Protéine DAPK : Mise en Evidence d'une Relation Structure–Activité	107
PARTIE III : Caractérisation de complexes protéine / ARN par spectrométrie de masse supramoléculaire	131
CHAPITRE I : Introduction à l'Analyse de Complexes Protéine / ARN en MS Supramoléculaire	133
CHAPITRE II : Etude par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire de Complexes Protéine / ARN impliqués dans la Modification des ARN de Transfert.....	143
CHAPITRE III : Reconstitution <i>in vitro</i> de Complexes Ribonucléoprotéiques à Boîte H/ACA : Etude des Réseaux d'Interactions Protéine / ARN par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire	185
PARTIE IV : Nouvelles méthodes de caractérisation d'édifices supramoléculaires par couplage entre spectrométrie de mobilité ionique et spectrométrie de masse	201
CHAPITRE I : Synapt HDMS – Principe, Evaluation et Mise en Œuvre du Couplage Spectrométrie de Mobilité Ionique / Spectrométrie de Masse pour l'Etude de Protéines et de Complexes Intacts	203
CHAPITRE II : Caractérisation de Complexes Antigène / Anticorps : Apports de la MS Supramoléculaire pour le Développement de Biomolécules Thérapeutiques.....	225
CHAPITRE III : Etude de la Dynamique Structurale de CggR, un Régulateur Transcriptionnel Ligand-Dépendant	247
CONCLUSION GENERALE	273
PARTIE EXPERIMENTALE.....	279
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	285

PLAN DETAILLE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE I : Les Interactions Non-Covalentes en Biologie : Description et Caractérisation.....	7
1) Généralités concernant les interactions non-covalentes	8
1.1) Les interactions d'origine électrostatique	8
1.1.1) Les interactions ioniques.....	8
1.1.2) Les interactions de Van der Waals	8
1.1.3) La liaison hydrogène	9
1.2) L'effet hydrophobe	9
1.3) Interactions totales d'attraction et de répulsion.....	9
2) Techniques de caractérisation d'édifices supramoléculaires.....	9
2.1) La chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	10
2.2) La résonance plasmonique de surface (SPR).....	10
2.3) Les techniques de fluorescence	11
2.4) La microcalorimétrie	11
2.5) La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	12
2.6) La cristallographie	12
2.7) La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	12
3) Caractérisation d'édifices supramoléculaires par spectrométrie de masse.....	13
3.1) Détection de complexes non-covalents par MALDI-MS.....	13
3.2) Détection de complexes non-covalents par ESI-MS.....	13
CHAPITRE II : Théorie et Instrumentation en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire	15
1) Instrumentation en spectrométrie de masse supramoléculaire – Généralités.....	16
2) Les grands développements instrumentaux en MS supramoléculaire – Quelques éléments d'histoire	17
3) Instrumentation – Principes détaillés	19
3.1) La source d'ionisation électrospray (ESI).....	19
3.1.1) Principe de l'électrospray	19
a) La formation des gouttelettes chargées.....	19
b) La production de gouttelettes filles par explosions coulombiennes.....	20
c) L'émission des ions en phase gazeuse	20
3.1.2) Caractéristiques importantes de l'électrospray	21
a) L'ionisation des analytes – cas des protéines.....	21
b) L'efficacité d'ionisation des analytes.....	23
c) Effet de concentration lors de l'électrospray	23
3.1.3) Apports de la source nanospray (nanoESI)	24
3.1.4) Nanospray sur puces microfluidiques	25
3.2) L'interface	26
3.2.2) Les guides d'ions multipôlaire	26
3.2.3) Les guides d'ions de type <i>ion funnel</i> et <i>stacked ring ion guide</i> (SRIG)	27
3.2.4) Comparaison des différents guides d'ions	29
3.2.5) Collisions en phase gazeuse	30

a) Thermalisation des ions	30
b) Dissociation induite par collision	30
c) Spectrométrie de mobilité ionique.....	31
3.3) L'analyseur à temps de vol (TOF)	31
3.3.1) Principe de fonctionnement.....	31
3.3.2) Performances	32
3.3.3) Paramètres critiques et développements instrumentaux	33
3.4) Le détecteur.....	34
4) Présentation des instruments du laboratoire	35
4.1) Le LCT (Waters)	35
4.2) Le MicrOTOF-Q (Bruker Daltonics)	36
4.3) Le Synapt HDMS (Waters)	37

CHAPITRE III : Stratégies Expérimentales en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire pour la Caractérisation de Complexes Biologiques39

1) Détection de complexes biologiques intacts en phase gazeuse	40
1.1) La préparation des échantillons, une étape clé.....	40
1.1.1) Choix du tampon	40
1.1.2) Les techniques d'échange de tampon	41
1.2) Optimisation des paramètres instrumentaux.....	43
1.2.1) Désolvatation des ions et maintien des interactions faibles en phase gazeuse	43
a) Influence des tensions d'accélération et de la pression dans l'interface	44
b) Comparaison de l'interface des différents instruments	45
1.2.2) Transmission des ions de hauts rapports m/z	46
a) Influence des tensions d'accélération et de la pression dans l'interface	46
b) Optimisation des paramètres de transmission des guides d'ions.....	47
1.2.3) Conclusions concernant les optimisations instrumentales.....	48
2) Les informations en MS supramoléculaire : nature et validité	49
2.1) L'adéquation entre mesures en phase gazeuse et propriétés en solution.....	49
2.1.1) De la solution à la phase gazeuse : changements et conséquences	49
a) Energie des interactions non-covalentes	49
b) Conformation des protéines en phase gazeuse	50
2.1.2) Spécificité des complexes détectés en phase gazeuse.....	50
2.1.3) La quantification des espèces sur un spectre de masse	52
2.2) Nature des informations recueillies en MS supramoléculaire	53
2.2.1) Stœchiométries d'interaction et états d'oligomérisation.....	53
2.2.2) Evaluation de l'affinité des complexes	54
2.2.3) Cinétique de formation des complexes non-covalents	55
2.2.4) Etude de la dynamique structurale de protéines et de complexes non-covalents.....	56
a) Etude de la conformation des protéines en solution	56
b) Etude de la conformation des protéines en phase gazeuse	57
2.2.5) Expériences de dissociation en phase gazeuse	57
a) Dissociation des complexes protéine / ligand – Détermination du V_{c50}	57
b) Dissociation des complexes multiprotéiques	58
2.2.6) Architecture des complexes non-covalents	59
3) Valorisation.....	60
CONCLUSIONS.....	61

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
PARTIE II : APPORT DU NANOSPRAY SUR PUCE MICROFLUIDIQUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE SUPRAMOLECULAIRE.....	77
CHAPITRE I : Description et Evaluation des Performances du Robot Triversa Nanomate	79
1) Intérêt du nanospray sur puce microfluidique – Rappel.....	80
2) Description et principe de fonctionnement.....	81
2.1) Description générale du robot Triversa Nanomate.....	81
2.2) Description de la puce microfluidique.....	82
2.2.1) Procédé de fabrication	82
2.2.2) Caractéristiques géométriques de la puce microfluidique	82
2.2.3) Caractéristiques de fonctionnement.....	83
3) Paramètres d'optimisation.....	84
3.1) Préparation automatisée des mélanges.....	84
3.2) Optimisation du spray.....	85
4) Caractéristiques et performances du Triversa Nanomate	86
4.1) Reproductibilité des mélanges et des injections sur puce nanoESI.....	86
4.2) Sensibilité et stabilité	87
4.3) Distribution des états de charges	88
5) Limitations et perspectives d'amélioration	89
5.1) Limitations concernant le mélange des échantillons.....	89
5.2) Cas d'instabilité du signal	90
5.3) Perspectives d'amélioration de la puce microfluidique	90
6) Conclusions.....	91
CHAPITRE II : Automatisation des Analyses sur Puce Microfluidique en MS Supramoléculaire pour le Développement de Molécules à Visée Thérapeutique	93
1) Introduction au criblage de ligands par MS supramoléculaire	94
2) Etude des interactions moléculaires entre leucotoxines et calixarènes.....	95
2.1) Contexte de l'étude.....	95
2.2) Résultats de l'étude	97
2.2.1) Description de la stratégie expérimentale mise en œuvre.....	97
2.2.2) Résultats du criblage.....	98
2.2.3) Nature des interactions leucotoxine / calixarène	99
2.2.4) Evaluation de l'affinité des complexes leucotoxine / calixarène	101
a) Expériences de compétition - Affinité relative des complexes.....	101
b) Expériences de titrage - Affinité absolue des complexes	101
2.3) Bilan de l'étude des interactions leucotoxine / calixarène.....	103
3) Conclusions.....	104
4) Valorisation.....	105
CHAPITRE III : Etude de l'Etat d'Oligomérisation de la Protéine DAPK : Mise en Evidence d'une Relation Structure-Activité.....	107
1) Contexte de l'étude	108

2) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus.....	108
2.1) Détermination de l'état d'oligomérisation de DAPK – Importance de la boucle basique	108
2.2) Relation entre état d'oligomérisation et état de phosphorylation	109
2.3) Mise en évidence d'une relation structure-activité	109
3) Conclusion de l'étude	109
4) Valorisation.....	110
PUBLICATION : « Homodimerization of the Death-Associated Protein Kinase is Central to its Regulation »	111
CONCLUSIONS.....	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
PARTIE III : CARACTERISATION DE COMPLEXES PROTEINE / ARN PAR SPECTROMETRIE DE MASSE SUPRAMOLECULAIRE.....	131
CHAPITRE I : Introduction à l'Analyse de Complexes Protéine / ARN en MS Supramoléculaire.....	133
1) Introduction aux interactions protéine / ARN	134
1.1) Généralités sur les interactions protéine / ARN	134
1.2) Techniques de caractérisation.....	135
2) Spécificités de l'analyse de complexes protéine / ARN par MS supramoléculaire.....	137
2.1) Dessalage.....	137
2.2) L'ionisation des ARN	139
2.3) Production des ARN	140
2.4) Stabilité en phase gazeuse	140
2.5) Stabilité en solution – effet de la force ionique du tampon.....	141
3) Valorisation.....	142
CHAPITRE II : Etude par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire de Complexes Protéine / ARN impliqués dans la Modification des ARN de Transfert	143
1) Etude des interactions Trml / ARNt.....	144
1.1) Contexte de l'étude.....	144
1.2) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus	144
1.2.1) Détermination de l'état d'oligomérisation de Trml.....	144
1.2.2) Stœchiométrie d'interaction de l'ARNt	145
1.3) Conclusion de l'étude	145
1.4) Valorisation	145
2) Etude d'inhibiteurs de l'interaction entre Tgt et l'ARNt.....	146
2.1) Contexte de l'étude.....	146
2.2) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus	147
2.2.1) Détermination de l'état d'oligomérisation de Tgt.....	147
2.2.2) Stœchiométrie d'interaction de l'ARNt	147
2.2.3) Etude d'inhibiteurs de Tgt	147
2.3) Conclusion de l'étude	148
3) Valorisation.....	148

CHAPITRE III : Reconstitution <i>in vitro</i> de Complexes Ribonucléoprotéiques à Boîte H/ACA : Etude des Réseaux d'Interactions Protéine / ARN par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire.....	185
1) Contexte de l'étude	186
2) Résultats de l'étude.....	187
2.1) Description de la stratégie expérimentale mise en œuvre	187
2.2) Analyse des protéines individuelles	188
2.3) Analyse des ARN individuels.....	188
2.4) Reconstitution du complexe – étude du réseau d'interactions.....	189
2.4.1) Interactions entre l'ARN guide et les protéines individuelles	190
2.4.2) Interactions entre protéines.....	190
2.4.3) Interaction entre l'ARN guide et l'ARN cible.....	191
2.4.4) Reconstitution du complexe entier	192
2.5) Bilan et discussion des résultats	194
3) Conclusion de l'étude	195
4) Valorisation.....	196
CONCLUSIONS.....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	198

**PARTIE IV : NOUVELLES METHODES DE CARACTERISATION D'EDIFICES
SUPRAMOLECULAIRES PAR COUPLAGE ENTRE SPECTROMETRIE
DE MOBILITE IONIQUE ET SPECTROMETRIE DE MASSE.....201**

CHAPITRE I : Synapt HDMS – Principe, Evaluation et Mise en Œuvre du Couplage Spectrométrie de Mobilité Ionique / Spectrométrie de Masse pour l'Etude de Protéines et de Complexes Intacts	203
1) Introduction à la spectrométrie de mobilité ionique (IMS).....	204
2) Le Synapt HDMS - Fonctionnement détaillé	206
2.2) Principe de fonctionnement de la cellule <i>Triwave</i> TM	206
2.3) Le couplage mobilité ionique / spectrométrie de masse, une question de « timing ».....	208
2.4) Représentation des données.....	208
3) Mise en œuvre expérimentale en MS supramoléculaire.....	209
3.1) Optimisation des paramètres instrumentaux.....	209
3.1.1) Paramètres de séparation des ions dans la cellule IMS	209
3.1.2) Paramètres de désolvatation et de transmission des ions.....	211
3.2) Mesure de la section efficace des ions	213
3.2.1) Correction du <i>drift time</i>	213
3.2.2) Courbe d'étalonnage	214
3.2.3) Comparaison avec les données structurales de cristallographie et de RMN	216
4) Exemples d'applications en MS supramoléculaire.....	217
4.1) L'IMS en tant que technique séparative pour le « nettoyage » des spectres de masse.....	217
4.2) Le suivi des changements conformationnels en solution.....	218
4.3) Comparaison de la forme des protéines et des complexes non-covalents.....	220
4.4) Etude de la stabilité conformationnelle des biomolécules en phase gazeuse	222
5) Conclusions.....	223
6) Valorisation.....	224

CHAPITRE II : Caractérisation de Complexes Antigène / Anticorps : Apports de la MS Supramoléculaire pour le Développement de Biomolécules Thérapeutiques...	225
1) Introduction aux anticorps	226
1.1) Généralités concernant les anticorps	226
1.2) Structure et fonction des anticorps	226
1.3) Le rôle actuel de la MS dans le développement des anticorps à visée thérapeutique	227
2) Contexte de l'étude	228
3) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus.....	228
3.1) Mise en évidence d'une hétérogénéité structurale de l'antigène recombinant	228
3.2) Influence de l'hétérogénéité des ponts disulfures sur la conformation de la protéine JAM-A native	229
3.3) Stœchiométrie des complexes anticorps / antigène.....	229
3.4) Spécificité de reconnaissance de JAM-A	230
3.5) Affinité relative des anticorps mumAb et hzmAb pour JAM-A.....	230
4) Conclusion de l'étude	230
5) Valorisation.....	230
PUBLICATION : « Extending Mass Spectrometry Contribution to Therapeutic Monoclonal Antibody Lead Optimization: Characterization of Immune Complexes Using Noncovalent ESI-MS »	233
CHAPITRE III : Etude de la Dynamique Structurale de CggR, un Régulateur Transcriptionnel Ligand-Dépendant	247
1) Contexte de l'étude	248
2) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus.....	249
2.1) Effet de la fixation du FBP sur l'état d'oligomérisation de CggR.....	249
2.2) Effet de la fixation du FBP sur les interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN.....	249
2.3) Changement conformationnel du complexe CggR / ADN induit par la fixation du FBP.....	250
2.4) Résultats complémentaires : rôle spécifique du FBP.....	250
3) Conclusion de l'étude	252
4) Valorisation.....	252
PUBLICATION : « Combination of Noncovalent Mass Spectrometry and Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry Reveals Sugar-Induced Conformational Changes of CggR / DNA Complex »	253
CONCLUSIONS.....	267
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	269
CONCLUSION GENERALE	273
PARTIE EXPERIMENTALE.....	279
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	285

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

Ag	Antigène	MALDI	Désorption / ionisation laser assistée par matrice
ADN	Acide désoxyribonucléique	MCP	Multichannel plate
apo	Protéine non liée (sans ligand)	MS	Spectrométrie de masse
ARN	Acide ribonucléique	MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
ATP	Adénosine triphosphate	NH₄Ac	Acétate d'ammonium
bP	Pression dans la première zone de pompage du Synapt HDMS	NH₄HCO₃	Bicarbonate d'ammonium
CCS	Collision cross section	P_{ESI}	Contre-pression appliquée sur le liquide lors de l'ionisation nanoESI
CE	Collision energy - tension appliquée sur le MicrOTOF-Q	Pi	Pression dans la première zone de pompage du LCT
CggR	Central glycolytic genes repressor	Q	Quadrupôle
CID	Collision-induced dissociation	RF	Radiofréquence
DAPK	Death-associated protein kinase	RNP	Ribonucléoprotéique
ESI	Ionisation électrospray	SCn	Para-sulfonatocalix[n]arènes
Fab	Fragment antigen-binding	SRIG	Stacked ring ion guide
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate	TDC	Time-to-digital convertor
FWHM	Full width at half maximum	Tgt	tRNA-guanine transglycosylase
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	TOF	Time-of-flight
HlgA	γ-hémolysine A - Protéine de classe S	Transfer CE	Tension appliquée à l'entrée de la cellule de transfert du Synapt HDMS
HlgB	γ-hémolysine B - Protéine de classe F	Trap Bias	Tension appliquée entre la cellule de collision et la cellule de mobilité du Synapt HDMS
HlgC	γ-hémolysine C - Protéine de classe S	Trap CE	Tension appliquée à l'entrée de la cellule de collision du Synapt HDMS
holo	Protéine en interaction avec un ligand	Tris	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol
IE	Ion energy - tension appliquée sur le MicrOTOF-Q	Trml	m1A58 méthyltransférase
IMS	Ion mobility spectrometry	Vc	Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (LCT, Synapt HDMS)
ISCID	In-source collision induced dissociation - tension appliquée sur le MicrOTOF-Q	V_{ESI}	Tension appliquée sur le liquide pour générer le processus ESI
JAM-A	Junctional adhesion molecule A		
LukF-PV	Leucocidine de Panton et Valentine - Protéine de classe F		
LukS-PV	Leucocidine de Panton et Valentine - Protéine de classe S		
mAb	Anticorps monoclonal		

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Avec le développement des techniques d'ionisation dites « douces » telles que l'**électrospray**,¹ permettant l'analyse de biomolécules intactes, la spectrométrie de masse permet d'aborder l'étude d'un grand nombre de mécanismes biologiques fondamentaux impliquant des partenaires de différentes natures (protéines, oligonucléotides, peptides, ligands naturels ou de synthèse, etc.). C'est précisément **la manière dont ces partenaires interagissent entre eux qui permet de décrire le fonctionnement des machineries moléculaires impliquées dans ces processus.**

Alors que les approches protéomiques s'intéressent à l'identification et la quantification des protéines, ainsi qu'à la caractérisation fine de leur structure primaire, la **spectrométrie de masse « supramoléculaire »** a pour objectif d'étudier les interactions intervenant entre biomolécules. En effet, la possibilité d'ioniser et de transférer en phase gazeuse des complexes biologiques non-covalents intacts a été démontrée pour la première fois en 1991 à l'aide d'une source d'ionisation électrospray.^{2, 3} Durant les premières années qui ont suivi ces travaux précurseurs, les quelques laboratoires au monde qui se sont intéressés à cette technique et dont le nôtre fait partie,⁴⁻⁶ ont largement contribué au succès actuel de la spectrométrie de masse supramoléculaire. De nos jours, cette technique intervient à plusieurs niveaux dans la caractérisation des édifices non-covalents : elle permet entre autres de déterminer des stœchiométries d'interaction, d'étudier la spécificité de reconnaissance entre biomolécules, d'étudier leur conformation ou encore d'évaluer l'affinité et de suivre la dynamique de formation de complexes.⁷⁻⁹ Par ailleurs, il est important de mentionner que **l'histoire et le succès de la spectrométrie de masse supramoléculaire sont intimement liés aux**

développements instrumentaux réalisés durant toutes ces années et qui permettent aujourd'hui d'analyser des complexes de diverses natures allant de quelques centaines à plusieurs millions de Daltons.⁷⁻⁹

Dans ce contexte général, l'objectif de ce travail de thèse est de contribuer au développement de l'approche de spectrométrie de masse supramoléculaire, en procédant pour cela aux développements méthodologiques permettant d'exploiter le potentiel de technologies récentes, telles que le nanospray sur puce microfluidique, ainsi que le couplage entre la spectrométrie de mobilité ionique et la spectrométrie de masse. Plus particulièrement, il s'agit de développer les stratégies d'analyse et d'optimisation instrumentale et de les mettre en application dans différentes problématiques biologiques, allant de la caractérisation de complexes protéine / ligand jusqu'à l'étude d'édifices supramoléculaires de haute masse moléculaire faisant intervenir de multiples partenaires comme dans le cas des complexes protéine / oligonucléotide. Ce manuscrit s'articule ainsi en quatre parties qui toutes visent à étendre les applications de la spectrométrie de masse supramoléculaire à l'étude des interactions spécifiques en biologie :

- ▶ **La première partie** fait l'objet d'un rappel bibliographique destiné à placer ce travail de thèse dans le contexte actuel des connaissances et des compétences acquises en spectrométrie de masse supramoléculaire.
- ▶ **La deuxième partie** est consacrée aux développements méthodologiques liés à la mise en place de l'automatisation des analyses nanospray sur puce microfluidique. Deux exemples y sont présentés afin d'illustrer l'apport de cette technologie en spectrométrie de masse supramoléculaire : i) l'étude des interactions entre calixarènes et leucotoxines, des toxines protéiques intervenant dans les maladies nosocomiales, et ii) l'étude de l'état d'oligomérisation de DAPK, une protéine à activité kinase intervenant dans les processus menant à la mort cellulaire.
- ▶ **La troisième partie** se rapporte à l'étude de protéines intervenant dans la modification post-transcriptionnelle de l'ARN. Les stratégies analytiques mises en œuvre pour la détection directe de complexes protéine / ARN sont présentées et illustrées au travers de trois exemples portant respectivement sur les protéines Trml, Tgt et sur la reconstitution de complexes ribonucléoprotéiques à boîtes H/ACA.
- ▶ **La quatrième partie** est finalement consacrée au couplage entre spectrométrie de mobilité ionique et spectrométrie de masse. Le principe de fonctionnement du Synapt HDMS y est présenté et le potentiel qu'il offre pour l'étude de protéines intactes et de complexes non-covalents est illustré dans deux études portant premièrement sur la caractérisation de complexes anticorps / antigène, et deuxièmement sur l'étude des interactions ligand-dépendantes entre un facteur de transcription et son ADN cible.

PREMIERE PARTIE :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Les Interactions Non-Covalentes en Biologie : Description et Caractérisation

CHAPITRE II : Théorie et Instrumentation en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire

CHAPITRE III : Stratégies Expérimentales en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire pour la Caractérisation de Complexes Biologiques

CHAPITRE I

Les Interactions Non-Covalentes en Biologie : Description et Caractérisation

Ce premier chapitre consiste en un rappel introductif sur les interactions non-covalentes et les techniques biophysiques couramment mises en œuvre pour caractériser des édifices biologiques supramoléculaires.

1) GENERALITES CONCERNANT LES INTERACTIONS NON-COVALENTES

L'étude des mécanismes fondamentaux intervenant dans le fonctionnement cellulaire nécessite une compréhension détaillée de la manière dont les biomolécules (protéines, ARN, ADN, etc.) interagissent ensemble. En effet, il a été estimé que près de 80% des protéines ne fonctionnent pas seules mais en complexe.¹⁰ La formation de tels édifices supramoléculaires résulte d'une **complémentarité stérique et interactionnelle** entre les différents partenaires.¹¹ Ainsi, les interactions non-covalentes jouent un rôle prépondérant dans les processus de **reconnaissance moléculaire**, car elles régissent non seulement la **structure tridimensionnelle** des biomolécules, mais assurent également **l'intégrité des complexes non-covalents**. Ces interactions non-covalentes peuvent avoir différentes origines qui sont résumées ci-dessous.

1.1) Les interactions d'origine électrostatique

1.1.1) Les interactions ioniques

Ces interactions qui interviennent entre des ions peuvent être attractives (charges de signes opposés) ou répulsives (charges de mêmes signes). Leur énergie est inversement proportionnelle au carré de la distance séparant les charges, et il s'agit donc d'interactions ayant lieu à **longue distance**. Leur énergie est également **inversement proportionnelle à la permittivité électrique relative du milieu** (ϵ), expliquant ainsi le renforcement de ce type d'interactions lors du passage de la solution ($\epsilon = 80$) au vide ($\epsilon = 1$). L'énergie des interactions ioniques peut atteindre plusieurs centaines de kJ/mol.¹²

1.1.2) Les interactions de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals sont la résultante de trois contributions :¹²

- ▶ **Les interactions de Keesom** interviennent entre des molécules polaires. La présence d'atomes d'électronégativités différentes au sein d'une molécule provoque une déformation du nuage électronique et donc l'apparition d'un dipôle permanent. Les molécules polaires sont ainsi capables d'interagir ensemble via des interactions de type **dipôle-dipôle**.
- ▶ **Les interactions de Debye** apparaissent lorsqu'une molécule polaire provoque la polarisation du nuage électronique d'une molécule apolaire, résultant ainsi en une interaction de type **dipôle-dipôle induit**.
- ▶ **Les interactions de London** interviennent entre des molécules apolaires. En effet, à un instant donné, la dissymétrie du nuage électronique de l'une des molécules se traduit par la formation d'un dipôle instantané qui provoque une déformation du nuage électronique de l'autre molécule, résultant ainsi en la formation d'interactions de type **dipôle instantané-dipôle induit**. Bien que faibles, ces interactions sont particulièrement nombreuses car elles concernent toutes les molécules et représentent de ce fait la contribution la plus importante des forces de Van der Waals.

L'énergie des interactions de Van der Waals est de l'ordre du kJ/mol. Tout comme les interactions ioniques, l'énergie de ces interactions est **inversement proportionnelle à la permittivité électrique relative du milieu** et augmente donc lors du passage de la solution à la phase gazeuse.¹³ De plus, ces interactions ont lieu à **courte distance** car leur énergie est inversement proportionnelle à la distance puissance six qui sépare le centre des dipôles en interaction.¹²

1.1.3) La liaison hydrogène

La liaison hydrogène est **essentiellement d'origine électrostatique** et intervient lorsque dans une molécule, un atome d'hydrogène est porté par un atome de forte électronégativité (O, N, S et F typiquement).¹² L'atome d'hydrogène porte alors une charge partielle positive et peut ainsi interagir avec un autre atome portant un doublet électronique libre. L'énergie de ce type de liaison est généralement de 10-40 kJ/mol.¹²

1.2) L'effet hydrophobe

La présence de molécules apolaires en milieu aqueux se traduit par une réorganisation des molécules d'eau de sorte qu'elles puissent former un maximum de liaisons hydrogène entre elles, provoquant ainsi une diminution de l'entropie du système. Ainsi, l'association entre molécules apolaires est un processus énergétiquement favorable car il s'accompagne d'une **augmentation de l'entropie** du système liée à « l'éjection » des molécules d'eau situées à l'interface des molécules apolaires entrant en interaction.¹² En raison de l'absence de solvant, on assiste à une réduction considérable de l'énergie d'interaction liée à l'effet hydrophobe lors du passage d'un milieu aqueux à la phase gazeuse.

1.3) Interactions totales d'attraction et de répulsion

L'ensemble des forces d'attraction provoque le rapprochement des molécules jusqu'à atteindre une distance d'équilibre en raison de l'apparition de forces répulsives dues à l'impénétrabilité des nuages électroniques. Ainsi, l'équilibre entre interactions attractives et répulsives conduit à la formation des liaisons non-covalentes dont l'énergie varie de quelques kJ/mol à quelques centaines de kJ/mol, et sont ainsi considérées comme des liaisons faibles en comparaison aux liaisons covalentes dont l'énergie est de l'ordre de plusieurs centaines de kJ/mol.¹²

2) TECHNIQUES DE CARACTERISATION D'EDIFICES SUPRAMOLECULAIRES

La caractérisation de biomolécules et de complexes non-covalents fait appel à différentes techniques biophysiques, dont la complémentarité des informations fournies permet de décrire en détail les interactions entre partenaires de diverses natures. Dans les paragraphes suivants sont brièvement présentés les principes de techniques biophysiques couramment utilisées, en particulier celles ayant été mises en œuvre en complément de la spectrométrie de masse supramoléculaire au cours des travaux présentés dans la suite du manuscrit.

2.1) La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC – *size exclusion chromatography*) est une technique basée sur la séparation des molécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Les analytes contenus dans la phase mobile sont élués sur une colonne chromatographique contenant une phase stationnaire inerte de porosité bien définie. Tandis que les molécules de petites tailles parviennent à pénétrer dans le volume poreux, les molécules plus volumineuses en sont partiellement ou totalement exclues, résultant ainsi en un temps d'élution plus court.

Cette technique peut être utilisée à des fins préparatives (ex : échange de tampon – cf. Chapitre III, 1.1.2) ou analytiques. En effet, l'emploi d'un étalonnage adapté permet d'évaluer le volume hydrodynamique de biomolécules (rayon de Stokes) ou encore d'estimer des masses moléculaires.¹⁴ De plus, cette technique permet également d'accéder à des constantes d'affinité et de mettre en évidence des changements conformationnels.¹⁴ En raison de sa résolution relativement limitée, la chromatographie d'exclusion stérique reste essentiellement employée pour déterminer des états d'oligomérisation de protéines ou des stœchiométries d'interaction entre molécules de grandes tailles.

2.2) La résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface (SPR – *surface plasmon resonance*) est une technique permettant de suivre l'interaction entre un analyte récepteur greffé sur un biocapteur à la surface duquel circule l'analyte ligand en solution. Le biocapteur est constitué d'un substrat en verre sur lequel est déposée une fine couche de métal (ex : or), dont la fonctionnalisation permet ensuite de greffer le récepteur. En illuminant l'interface métal / liquide, il existe un angle d'incidence pour lequel l'onde lumineuse excite les plasmons de surface qui entrent alors en résonance et provoquent ainsi une chute d'intensité de l'onde réfléchi. Cet angle de résonance dépend de l'indice de réfraction de l'environnement proche de l'interface métal / liquide et varie donc en fonction des molécules adsorbées à la surface du biocapteur, permettant ainsi de mettre en évidence l'existence d'une interaction entre le récepteur greffé et le ligand circulant en flux continu.^{15, 16}

Le suivi en temps réel de l'étape d'association (flux de ligand dilué dans le tampon d'analyse), puis de l'étape de dissociation (flux de tampon seul) du complexe permet de déterminer à la fois des stœchiométries d'interaction, ainsi que des constantes cinétiques d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}). Ces informations permettent ainsi d'accéder à la constante d'affinité (K_a) de complexes non-covalents.

Finalement, notons qu'à la fin de chaque cycle intervient une phase de régénération du biocapteur permettant de le réutiliser à plusieurs reprises. En dehors des difficultés de régénération des biocapteurs après analyse d'un ligand de haute affinité, l'une des limitations de cette technique provient de la nécessité de greffer l'un des partenaires, une étape qui peut se révéler délicate et source d'artefacts (réduction de la flexibilité de la molécule immobilisée, greffe à proximité du site actif, etc.).

2.3) Les techniques de fluorescence

La fluorescence est le processus par lequel l'absorption d'un photon par une molécule est suivie par l'émission d'un photon de longueur d'onde plus grande par cette même molécule. Il existe différentes techniques basées sur ce phénomène parmi lesquelles on distingue notamment :

- ▶ **La polarisation ou anisotropie de fluorescence** : la rotation de petites molécules fluorescentes en solution est suffisamment rapide pour que l'émission de fluorescence se fasse de manière isotrope. Cependant, l'interaction de cette molécule avec un partenaire de grande taille (ex : protéine, oligonucléotide) provoque un ralentissement des rotations du fluorophore, et l'émission de fluorescence se fait alors de manière anisotrope. La mesure de l'anisotropie de fluorescence permet non seulement de mettre en évidence l'existence d'une interaction, mais également de déterminer des constantes d'affinité de complexes non-covalents via des expériences de titrages. De plus, la rapidité et la sensibilité de cette technique en font un outil de choix pour le criblage haut débit de banque de ligands capables d'interagir avec une protéine cible.¹⁷
- ▶ **Le FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)** : cette technique est basée sur le transfert d'énergie entre fluorophores situés à proximité l'un de l'autre (< 10 nm). Ce transfert d'énergie est possible lorsque la longueur d'onde d'émission du fluorophore donneur correspond à la longueur d'onde d'absorption du fluorophore accepteur. L'existence d'un transfert de fluorescence indique la proximité des deux fluorophores et permet ainsi de mettre en évidence l'interaction entre partenaires ou encore l'existence de changements conformationnels au sein d'une molécule.¹⁸

Ces techniques disposent d'une très bonne sensibilité mais présentent le désavantage de nécessiter le greffage de sondes fluorescentes aux molécules ne disposant pas de propriétés de fluorescence intrinsèques. Notons finalement que les techniques de fluorescence offrent un avantage particulier qui est celui de permettre l'étude des interactions protéine / protéine directement au sein de cellules vivantes.¹⁹

2.4) La microcalorimétrie

Le principe de la microcalorimétrie consiste à mesurer les échanges thermiques liés à une réaction de complexation lors du titrage d'un récepteur par un ligand. Cette technique permet de déterminer les paramètres thermodynamiques de réactions de complexation, tels que les différences d'enthalpie libre (ΔG), d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS) d'où sont déduites des constantes d'affinité.

Par ailleurs, l'ajustement de modèles théoriques aux résultats expérimentaux permet également de déterminer des stœchiométries d'interaction. Cette technique est donc particulièrement informative mais présente un débit d'analyses relativement réduit (10 échantillons / jour).¹⁷

2.5) La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS – *small angle X-ray scattering*) est une technique qui consiste à mesurer l'intensité des rayons X diffusés par un échantillon en solution en fonction de l'angle de diffusion.²⁰ Cette technique permet de déterminer le rayon de gyration de biomolécules, c'est-à-dire le rayon de la sphère présentant les mêmes propriétés rotationnelles que l'analyte. En plus de cette information concernant la taille globale de l'analyte, la modélisation des données de SAXS permet d'accéder à des informations de basse résolution sur la structure tridimensionnelle de biomolécules en solution.^{20, 21} Notons finalement que cette technique est bien adaptée à l'étude des complexes formés entre molécules de grandes tailles (protéine, ARN, ADN) mais ne permet pas d'étudier de manière directe la fixation de ligands de petites tailles sur des biomolécules cibles.

2.6) La cristallographie

La cristallographie est une technique permettant d'obtenir la structure tridimensionnelle de protéines, ADN ou ARN, ainsi que de complexes non-covalents, et se base pour cela sur le phénomène de diffraction des rayons X par l'échantillon cristallisé. Il s'agit donc d'une technique extrêmement informative qui renseigne sur la structure de biomolécules à l'échelle atomique, permettant ainsi de comprendre le détail des interactions non-covalentes inter- et intramoléculaires. De plus, la connaissance de la structure tridimensionnelle d'une protéine seule permet d'identifier d'éventuels sites de fixation, servant ainsi de base au travail de développement de ligands de synthèse. Cette technique peut cependant se heurter à certaines limitations, telles que l'obtention de cristaux ou la possibilité de produire les échantillons en quantités suffisamment élevées (de l'ordre du mg).¹⁷ La miniaturisation et l'automatisation des étapes de cristallisation permet désormais d'atteindre un débit d'une centaine d'analyses par jour dans le contexte du criblage de ligands d'une protéine cible.¹⁷

2.7) La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique dont le principe repose sur l'interaction entre un champ magnétique et les noyaux atomiques disposant d'un spin non nul, tels que ceux des atomes d'hydrogène. Tout comme la cristallographie des rayons X, cette technique permet de déterminer la structure tridimensionnelle de biomolécules et dispose de l'avantage supplémentaire de permettre une caractérisation de l'échantillon directement en solution, avec la possibilité de remonter à des informations de dynamique.

Longtemps limitée à des molécules de masses inférieures à 30 kDa, les développements actuels tendent à repousser cette limite qui se rapproche ainsi des possibilités offertes par la cristallographie.²² Concernant les interactions protéine / ligand, cette technique permet de vérifier l'existence d'une interaction sans avoir à résoudre la structure tridimensionnelle,²³ permettant ainsi d'atteindre des débits d'analyse compatibles avec le criblage de ligands potentiellement capables de se fixer à une protéine cible (10-1000 échantillons / jour).¹⁷ Finalement, il faut noter que cette technique nécessite des quantités relativement importantes d'échantillon (de l'ordre du mg) pouvant être une limitation dans certains cas.

3) CARACTERISATION D'EDIFICES SUPRAMOLECULAIRES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

L'avènement des techniques d'ionisation MALDI (*matrix assisted laser desorption / ionization*)^{24, 25} et ESI (*electrospray ionization*)²⁶ a révolutionné la spectrométrie de masse (MS) dans les années 90 en raison de leur capacité à ioniser et transférer en phase gazeuse des biomolécules intactes sans les fragmenter. La relative « douceur » de ces techniques d'ionisation a par ailleurs très tôt permis d'analyser des complexes non-covalents intacts en phase gazeuse.^{2, 3, 27-30}

3.1) Détection de complexes non-covalents par MALDI-MS

L'ionisation MALDI consiste à irradier un **échantillon co-cristallisé** au sein d'une matrice à l'aide **d'un bref tir laser**, permettant ainsi à l'analyte d'être désorbé et ionisé en phase gazeuse. Un certain nombre d'articles ont rapporté l'utilisation de cette technique d'ionisation pour l'analyse de complexes non-covalents intacts en phase gazeuse.²⁷⁻³³ Cependant, l'ionisation MALDI reste peu utilisée pour ce type d'applications en raison de la difficulté de préserver l'intégrité d'édifices biologiques maintenus par des liaisons faibles lors du processus de désorption / ionisation.

En effet, l'utilisation de matrices organiques acides, l'incorporation de l'analyte dans les cristaux de matrice ou encore l'énergie transmise par le tir laser sont autant d'étapes pouvant engendrer la **dissociation des complexes non-covalents**.³⁴ Par ailleurs, il a été noté dans certains cas que seul le premier tir laser sur une zone non irradiée située en surface du dépôt de matrice permet de préserver les associations non-covalentes lors du processus de désorption / ionisation, un phénomène connu sous le nom de « *first shot phenomenon* ».^{30, 35, 36}

Ce manque apparent de robustesse (concernant le maintien des interactions non-covalentes) est ainsi à l'origine du développement de stratégies alternatives. Par exemple, le pontage covalent des partenaires en interaction permet de stabiliser les complexes préalablement à l'analyse par ionisation MALDI,³⁷⁻³⁹ tandis que la méthode appelée « *intensity-fading MALDI* » permet de mettre en évidence l'existence d'une interaction récepteur / ligand de manière indirecte en détectant une diminution de l'intensité du ligand libre suite à l'ajout du récepteur.^{40, 41}

3.2) Détection de complexes non-covalents par ESI-MS

L'ionisation électrospray consiste à ioniser et transférer les analytes en phase gazeuse en appliquant une **forte différence de potentiel entre le liquide contenant l'échantillon et une contre-électrode**.²⁶ Il s'agit d'une technique d'ionisation plus « douce » encore que l'ionisation MALDI, et le fait de pouvoir conserver des conditions plus proches du milieu **physiologique** (échantillon dilué dans une solution aqueuse à pH neutre) a très tôt permis de détecter des complexes non-covalents en phase gazeuse par ESI-MS.^{2, 3} Les nombreuses études fondamentales qui ont suivi ont ainsi permis de mieux comprendre et de mieux maîtriser cette technique d'ionisation. Les caractéristiques de la source ESI qui seront détaillées dans le chapitre II expliquent qu'il s'agit aujourd'hui de **la technique d'ionisation par excellence pour l'étude de complexes non-covalents**.

CHAPITRE II

Théorie et Instrumentation en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire

Ce chapitre est consacré à la description des instruments utilisés en spectrométrie de masse supramoléculaire. En incluant des éléments historiques et théoriques utiles à la compréhension des parties suivantes, il décrit la manière avec laquelle la nature des échantillons influence les choix instrumentaux.

1) INSTRUMENTATION EN SPECTROMETRIE DE MASSE SUPRAMOLECULAIRE – GENERALITES

De manière générale, un spectromètre de masse peut être divisé en quatre régions dont les rôles sont indiqués par la figure 1.

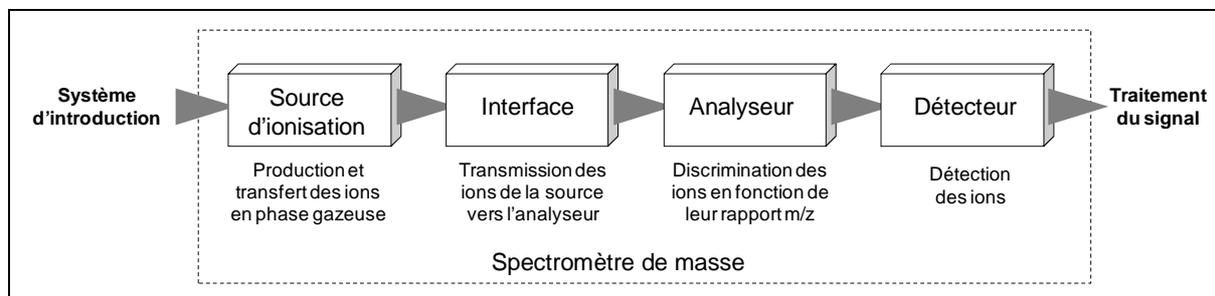


Figure 1 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse.

Les ions produits dans la source sont guidés dans l'interface de l'instrument à l'aide de gradients de pression et de champs électriques et arrivent finalement dans l'analyseur qui permet de mesurer leur rapport m/z. En MS supramoléculaire, le choix de la source et du type d'analyseur est guidé par deux contraintes principales liées aux caractéristiques des complexes non-covalents à étudier :

- ▶ **La nature labile des édifices supramoléculaires** impose l'utilisation d'une source d'ionisation « douce » capable d'ioniser et de transférer en phase gazeuse ces complexes tout en préservant leur intégrité. Pour cela, la désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI - *matrix assisted laser desorption / ionization*)^{24, 25} et l'ionisation électrospray (ESI)²⁶ sont deux techniques permettant d'ioniser des biomolécules sans les fragmenter. Cependant avec une source MALDI, la détection de complexes non-covalents intacts reste difficile, notamment en raison des conditions de préparation de l'échantillon imposées par la technique d'ionisation (matrice acide, solvant organique, cristallisation de l'échantillon, etc.).³⁴ De ce fait, les travaux actuellement publiés font quasi-exclusivement appel à la source ESI.
- ▶ **La masse de ces complexes pouvant aller de quelques milliers à plusieurs millions de Daltons (Da)**, il est nécessaire de disposer d'un analyseur capable de couvrir une gamme de rapports m/z allant de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers de m/z. De ce fait, la grande majorité des travaux réalisés aujourd'hui en MS supramoléculaire fait appel à l'analyseur à temps de vol (TOF : *Time Of Flight*) qui allie rapidité, résolution, sensibilité et gamme de rapports m/z étendue.

Compte tenu de ces contraintes, l'ensemble de ce travail de thèse a été effectué à l'aide d'instruments de type ESI-TOF. Il faut par ailleurs noter que l'analyse d'édifices non-covalents intacts en phase gazeuse nécessite une optimisation fine des paramètres instrumentaux, et donc une connaissance détaillée du fonctionnement de ces spectromètres de masse. La suite de ce chapitre sera donc consacrée à la description des instruments utilisés au laboratoire, en mettant un accent particulier sur le principe et les caractéristiques de la source ESI, de l'analyseur TOF, ainsi que de l'interface de ces spectromètres de masse.

2) LES GRANDS DEVELOPPEMENTS INSTRUMENTAUX EN MS SUPRAMOLECULAIRE – QUELQUES ELEMENTS D'HISTORIQUE

Depuis la fin du XIX^e siècle marquant les débuts de la MS, les progrès techniques qui ont été réalisés notamment dans les domaines de l'électronique et de l'informatique, ont engendré d'importants développements instrumentaux en MS.^{42, 43} Ci-dessous sont résumées les grandes étapes ayant conduit aux instruments actuellement utilisés en MS supramoléculaire (figure 2) :

- ▶ **1946** : Stephens énonce le principe de fonctionnement de l'analyseur **TOF** en proposant pour la première fois de mesurer le temps de vol des ions afin de déterminer leur rapport m/z.⁴⁴
- ▶ **1948** : Cameron et Eggers assemblent le premier spectromètre de masse incluant une source d'ions couplée à un analyseur **TOF**.⁴⁵
- ▶ **1953** : Paul (Prix Nobel 1989) décrit le principe du **filtre de masse quadrupolaire**.⁴⁶
- ▶ **1968** : Dole propose l'utilisation de l'**ESI** comme source d'ionisation de macromolécules en MS.⁴⁷
- ▶ **1969** : Les travaux du groupe de Gerlich conduisent à l'élaboration d'un **guide d'ions** constitué de lentilles annulaires à l'origine des guides d'ions de type *ion funnels* et *stacked ring ion guides*.⁴⁸
- ▶ **1973** : Le groupe de Mamyrin décrit le principe de fonctionnement du réflecteur électrostatique permettant d'améliorer la résolution des analyseurs **TOF**.⁴⁹
- ▶ **1984** : Fenn (Prix Nobel 2002) rapporte pour la première fois le couplage entre une **source ESI** et un spectromètre de masse muni d'un analyseur quadrupolaire. Il démontre ainsi qu'il est possible d'obtenir des ions en phase gazeuse à partir de molécules non volatiles sans les fragmenter.¹
- ▶ **1984** : Glish et Goeringer décrivent le premier spectromètre masse **ESI-Q-TOF** incluant un filtre de masse quadrupolaire, une cellule de collision et un analyseur TOF, permettant successivement d'isoler un ion, de le fragmenter et d'en analyser les fragments.⁵⁰
- ▶ **1985** : Le groupe de Karas et Hillenkamp introduisent l'ionisation **MALDI**,⁵¹ dont la capacité d'ioniser des protéines intactes est illustrée dès les années suivantes par le même groupe ainsi que par Tanaka (Prix Nobel 2002).^{25, 52}
- ▶ **1987** : Le groupe de Dodonov élabore un système d'**accélération orthogonale** des ions dans le **TOF** (oaTOF), permettant son couplage avec une source d'ions continue telle que l'ESI.⁵³

- ▶ **1991** : Les travaux des groupes de Chait et Henion révèlent que des édifices maintenus en solution par des liaisons non-covalentes peuvent être ionisés et transférés en phase gazeuse grâce à l'ESI, et cela tout en conservant leur intégrité structurale : cette découverte marque les débuts de la **MS supramoléculaire**.^{2,3}
- ▶ **1994** : Le groupe de Standing assemble le premier spectromètre de masse équipé d'une source **ESI** et d'un analyseur **TOF** muni à la fois d'un système d'**accélération orthogonale** des ions et d'un **réflecteur électrostatique**.⁵⁴
- ▶ **1996** : Mann décrit la mise en œuvre et les avantages du **nanospray** (nanoESI) qui autorise notamment une réduction significative de la consommation d'échantillon.⁵⁵
- ▶ **1997** : Les groupes de Karger et de Ramsey décrivent les premières **puces microfluidiques pour l'ionisation nanospray** en spectrométrie de masse.^{56, 57}
- ▶ **2000** : Les travaux de Zhang, Henion et de leurs collaborateurs aboutissent à l'élaboration d'un système **nanoESI sur puce microfluidique** qui sera intégré deux ans plus tard dans un robot permettant l'**injection automatisée** des échantillons déposés dans une plaque 96 puits (Nanomate 100, Advion Biosciences).^{58, 59}
- ▶ **2004** : Giles et Bateman rapportent les premiers résultats obtenus à l'aide d'un prototype du premier instrument commercial **couplant la MS à la spectrométrie de mobilité ionique** (Synapt HDMS, Waters).⁶⁰

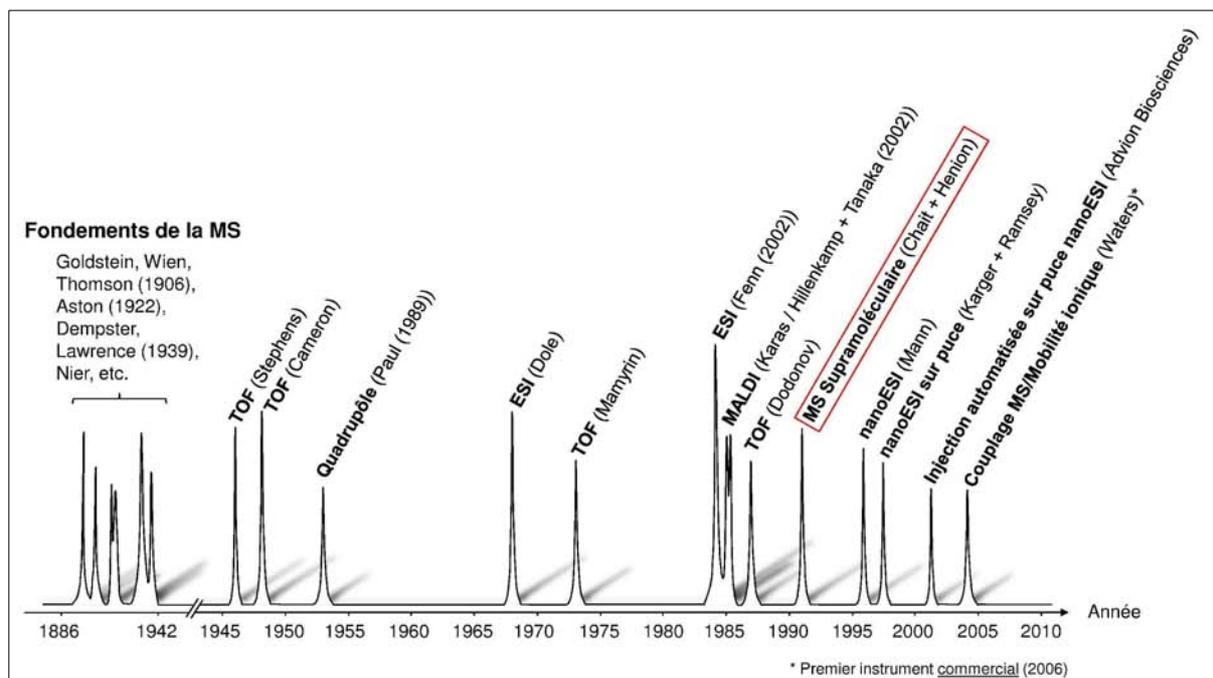


Figure 2 : Résumé des principaux développements instrumentaux ayant contribué à l'élaboration des spectromètres de masse actuellement utilisés en MS supramoléculaire. Les années entre parenthèses correspondent à l'année d'attribution du Prix Nobel.

3) INSTRUMENTATION – PRINCIPES DÉTAILLÉS

3.1) La source d'ionisation électrospray (ESI)

3.1.1) Principe de l'électrospray

Le processus électrospray, par lequel des molécules présentes en solution sont ionisées et transférées en phase gazeuse, peut être décomposé en trois étapes :

- ▶ La formation de gouttelettes chargées à partir de la solution d'analyte
- ▶ La production de gouttelettes filles par explosions coulombiennes
- ▶ La production des ions en phase gazeuse

a) La formation des gouttelettes chargées

Le processus d'ionisation électrospray (ESI) se produit à pression atmosphérique par application d'une importante différence de potentiel entre un capillaire métallique contenant la solution d'analyte et une contre-électrode. Sous l'influence du champ électrique intense (10^6 V/m) qui en résulte, a lieu une séparation électrophorétique des charges au sein du liquide : en mode d'ionisation positif, les ions chargés positivement se concentrent alors en surface du liquide tandis que les ions portant une charge négative se localisent davantage au cœur du liquide. Cette polarisation engendre une déstabilisation du liquide à la pointe du capillaire qui adopte une forme conique appelée « cône de Taylor » (figure 3).⁶¹ Au-delà d'une valeur seuil du champ électrique, les forces répulsives entre charges de même signe dépassent la tension de surface du liquide et conduisent ainsi à l'élongation du cône de Taylor et à l'émission de fines gouttelettes chargées dont la polarité est fixée par le mode d'ionisation.⁶²⁻⁶⁴

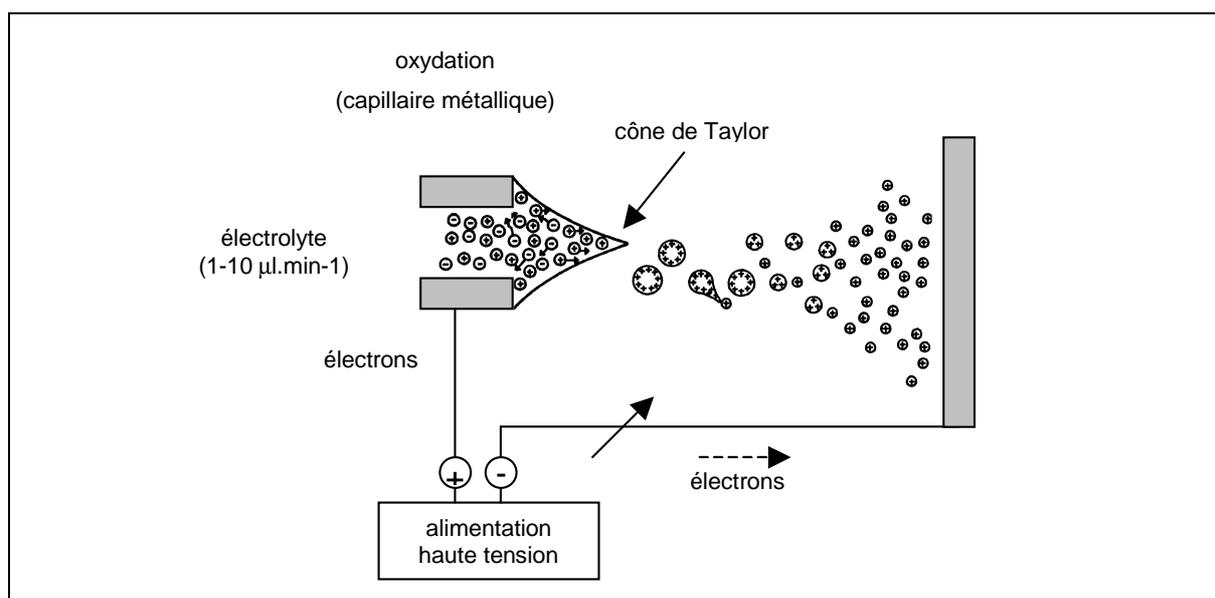


Figure 3 : Représentation schématique du processus électrospray : production de gouttelettes chargées et fissions coulombiennes en mode d'ionisation positif, adapté d'après ⁶².

En mode d'ionisation positif, les gouttelettes émises sont chargées positivement provoquant un excès de charges négatives au sein du liquide restant dans le capillaire. Afin de maintenir l'équilibre des charges, l'interface liquide / capillaire métallique devient alors le siège de réactions d'oxydo-réduction. En effet, en mode positif, l'oxydation du métal de l'électrode, du solvant, de l'analyte ou de l'électrolyte compense l'excès de charges négatives et fournit les électrons assurant le fonctionnement de la source ESI qui s'apparente de cette manière à celui d'une cellule électrolytique.⁶⁵⁻⁶⁷

b) La production de gouttelettes filles par explosions coulombiennes

Après émission à l'extrémité du cône de Taylor, l'évaporation du solvant a pour conséquence d'augmenter la densité de charge au sein de la goutte. Cette évaporation se poursuit jusqu'à ce que la goutte atteigne le rayon critique de Rayleigh, limite à laquelle les forces de répulsions entre charges de même signe égalent la tension de surface du liquide.⁶⁸ Cet équilibre s'exprime mathématiquement par la formule (1).

$$Q = 8\pi\sqrt{\epsilon_0 \gamma R_R^3} \quad (1)$$

Q : charge de la gouttelette

ϵ_0 : permittivité du vide

γ : tension de surface du liquide

R_R : rayon critique de Rayleigh

Au-delà de cette limite, la goutte instable subit une explosion coulombienne créant ainsi des gouttelettes filles de plus petite taille qui emportent au total 2% de la masse et 15% de la charge de la goutte mère.⁶⁹ Ces cycles d'évaporations / explosions coulombiennes se reproduisent ensuite avec les gouttelettes filles générant de cette manière des gouttelettes de plus en plus fines (figure 4).

c) L'émission des ions en phase gazeuse

Le mécanisme exact d'émission des ions en phase gazeuse à partir des gouttelettes chargées n'est pas complètement élucidé mais deux modèles ont cependant été proposés :

- ▶ **Le modèle de Dole ou mécanisme de la charge résiduelle** : selon ce modèle, les cycles d'évaporations / explosions coulombiennes se succèdent jusqu'à l'obtention de gouttelettes chargées ne contenant qu'une seule molécule d'analyte qui, après évaporation du solvant, conduisent à la production d'ions désolvatés en phase gazeuse (figure 4a).⁴⁷
- ▶ **Le modèle d'Iribarne et Thomson ou modèle de l'évaporation ionique** : selon ce modèle, lorsque le rayon de la goutte est inférieur à 10 nm, le champ électrique à la surface du liquide est suffisant pour que des ions soient directement désorbés à partir de la surface de la gouttelette (figure 4b).^{70, 71}

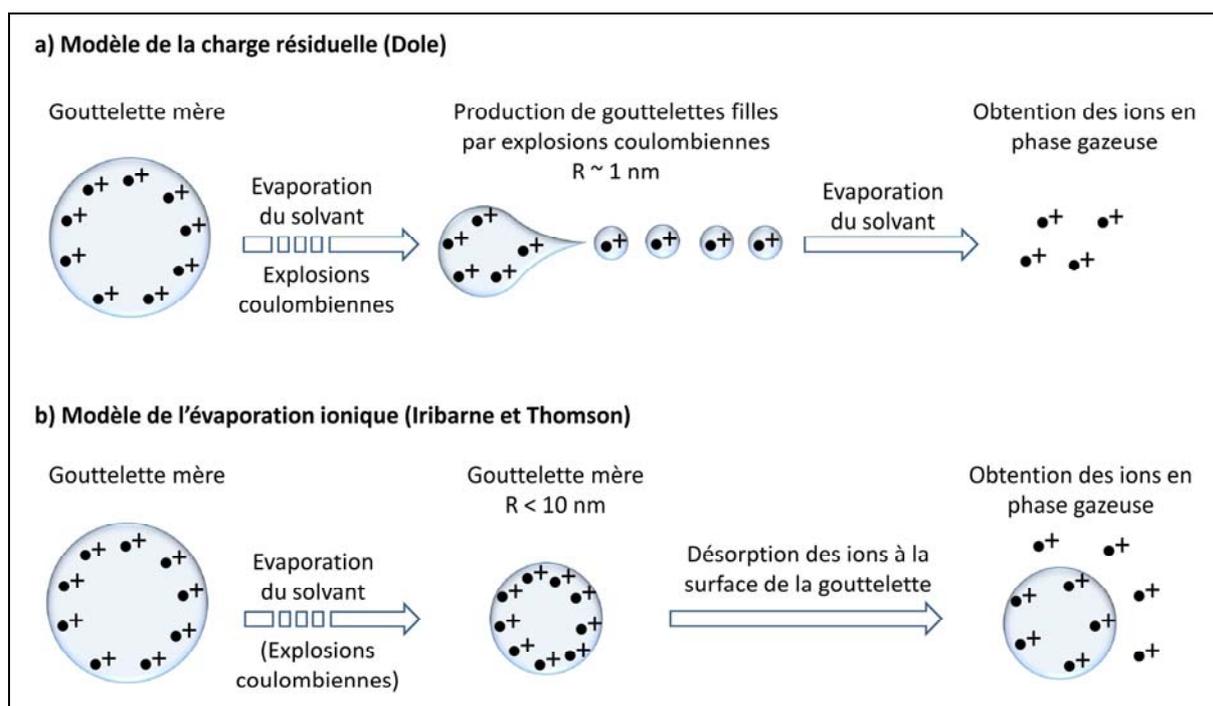


Figure 4 : Emission des ions en phase gazeuse selon (a) le mécanisme de la charge résiduelle et (b) le mécanisme de l'évaporation ionique.

Alors que la plupart des observations expérimentales peuvent être expliquées par l'un et / ou l'autre de ces modèles⁷²⁻⁷⁴, il semble que le modèle de l'évaporation ionique intervienne préférentiellement dans le cas des ions de petite taille,^{64, 75, 76} tandis que le modèle de la charge résiduelle s'applique plutôt dans le cas des biomolécules et donc des complexes non-covalents.⁷⁷⁻⁸⁰

3.1.2) Caractéristiques importantes de l'électrospray

L'ensemble des mécanismes impliqués dans le processus ESI engendre un certain nombre de caractéristiques dont il faut tenir compte lors de l'analyse des résultats.⁷⁸ Il convient à ce stade du manuscrit de décrire celles qui interviennent directement dans l'interprétation des résultats obtenus en MS supramoléculaire.

a) L'ionisation des analytes – cas des protéines

L'une des principales caractéristiques de l'ESI consiste en sa capacité à produire des ions multichargés en phase gazeuse et d'étendre de ce fait la gamme de masse accessible par les spectromètres de masse.⁸¹ Dans le cas d'une protéine, les différents états de charge observés sur un spectre de masse ESI peuvent avoir plusieurs origines qui sont notamment i) la charge nette que la protéine possède lorsque le pH de la solution est différent de son point isoélectrique et ii) l'ionisation des résidus provoquée par le processus ESI.

Le mécanisme d'ionisation des protéines analysées dans des solvants aqueux non-dénaturants a ainsi fait l'objet de plusieurs études menées par le groupe de Kebarle.^{79, 82-84} En se basant sur le mécanisme de la charge résiduelle, et en considérant plus particulièrement le cas de l'acétate

d'ammonium en tant qu'électrolyte, ces travaux ont mis en évidence l'existence de réactions de transfert de proton entre ions ammonium et acides aminés des protéines. En effet, l'évaporation continue du solvant au sein des gouttelettes chargées conduit à la formation d'adduits entre ions ammonium et acides aminés de la protéine (figure 5, étape ①). Dans le cas des résidus dont la basicité en phase gazeuse est supérieure à celle de l'ammoniac (ex : lysine, arginine), le passage en phase gazeuse provoque la dissociation de ces adduits avec production d'ammoniac suite au transfert de proton de l'ion ammonium vers l'acide aminé (figure 5, étape ②). De cette manière, les résidus chargés négativement peuvent être neutralisés et les résidus neutres peuvent être chargés positivement.^{79, 82-84}

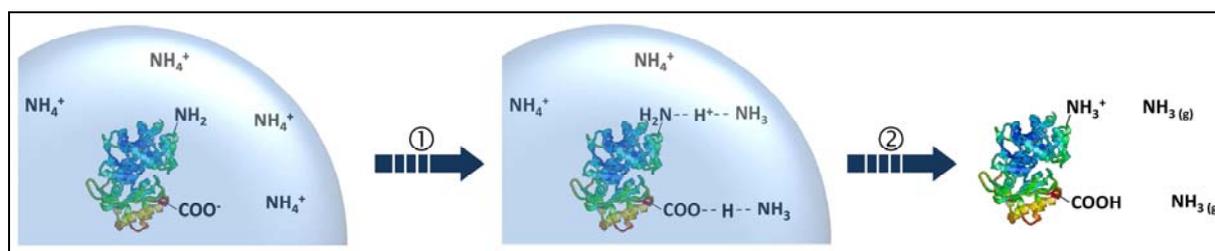


Figure 5 : Illustration du mécanisme de protonation de la chaîne latérale d'acides aminés portant une fonction amine ou acide carboxylique dans un tampon ammonium, adapté d'après⁷⁹. (g) signifie que l'espèce concernée est en phase gazeuse.

Par ailleurs, il faut noter que la probabilité qu'un acide aminé particulier soit protoné de cette manière pendant le processus ESI dépend i) de son exposition en surface de la protéine^{85, 86} et ii) de sa basicité apparente en phase gazeuse, qui elle-même est fonction :

- ▶ De la basicité intrinsèque de l'acide aminé en phase gazeuse.⁸³
- ▶ De la présence d'autres résidus dans l'environnement proche capables de stabiliser la fixation du proton par liaison hydrogène.⁸³
- ▶ Du nombre de charges positives environnantes déjà présentes qui engendrent une répulsion coulombienne responsable d'une diminution de la basicité apparente du résidu concerné en phase gazeuse.^{79, 82, 83, 86}
- ▶ De l'implication du résidu dans des liaisons intramoléculaires défavorisant l'ajout d'un proton supplémentaire.⁸⁷

Il apparaît ainsi clairement que la distribution des états de charge d'une protéine sur un spectre de masse ESI est influencée par sa structure tridimensionnelle. Il s'agit donc là d'un outil particulièrement intéressant pour suivre l'influence de différents paramètres (mutations, sauts de pH, présence de ponts disulfures, présence de ligands structurants, etc.) sur l'état de repliement des protéines en solution.⁸⁵

b) L'efficacité d'ionisation des analytes

L'efficacité d'ionisation d'une molécule peut être définie comme la quantité d'analyte donnant lieu à un ion en phase gazeuse rapportée à la quantité totale d'analyte initialement présente en solution. L'efficacité d'ionisation d'une molécule dépend donc premièrement de la présence de groupements polaires ionisables, qui est une condition *sine qua non* pour qu'une espèce puisse être détectée en MS. Dans un deuxième temps, l'efficacité d'ionisation d'un analyte est fonction de son activité de surface qui est la conséquence première de son hydrophobicité. En effet, un analyte disposant de groupements apolaires se localisera davantage à l'interface air / liquide des gouttelettes chargées augmentant ainsi son efficacité d'ionisation de plusieurs manières :

- ▶ Premièrement, selon le modèle proposé par Enke,⁸⁸ pendant le processus ESI, l'excès de charge au sein d'une gouttelette se situe en surface du liquide, minimisant ainsi les répulsions entre charges de même signe. Par conséquent, les analytes présents en surface de la goutte auront une plus grande probabilité d'acquiescer les charges nécessaires à leur détection.⁸⁹⁻⁹¹
- ▶ Deuxièmement, lors de l'explosion coulombienne, ce sont préférentiellement les analytes situés en surface de la gouttelette mère qui se retrouvent dans les gouttelettes filles, donnant au final les ions en phase gazeuse.^{69, 92}
- ▶ Finalement, l'enthalpie libre de solvation des ions hydrophobes étant généralement plus faible (en valeur absolue) que celle des ions hydrophiles, la présence de groupements apolaires favorisent encore leur transfert en phase gazeuse.⁸⁹

Suivant ces considérations, il apparaît clairement que l'intensité d'une espèce sur un spectre de masse ESI ne peut être directement reliée à son abondance en solution. En effet, différentes études ont permis de corréler l'efficacité d'ionisation de peptides et de protéines à leur hydrophobicité.^{90, 91, 93, 94} Plus subtil encore, il a également été montré que pour une même protéine, la forme dénaturée présente une meilleure efficacité d'ionisation que la forme repliée en raison de l'exposition des résidus hydrophobes en surface de la protéine déstructurée.⁹¹ La prise en compte de ces caractéristiques du processus ESI est donc primordiale dans l'interprétation des résultats, et plus précisément dans l'évaluation de la proportion de chaque espèce en solution.

c) Effet de concentration lors de l'électrospray

Lors du processus ESI, l'évaporation continue du solvant conduit à un effet de concentration des analytes au sein des gouttelettes, pouvant potentiellement induire i) une modification des équilibres de complexation en solution et/ou ii) la formation d'adduits non-spécifiques entre les différents analytes présents en solution. Une description théorique du processus ESI dans le cas de gouttelettes mères de petites tailles (produites par ionisation nanospray) a été proposée par le groupe de Kebarle, démontrant par le calcul que la proportion de complexe protéine / ligand formé de manière artefactuelle est négligeable en raison des faibles concentrations d'analytes utilisées (de l'ordre de la dizaine de μM) et de la rapidité du processus ESI devant la diffusion des analytes au sein du liquide.⁹⁵

En combinant des mesures de fluorescence et d'anémométrie phase Doppler, le groupe de Zenobi a par la suite confirmé ces résultats de manière expérimentale dans le cas d'une source ESI, en suivant l'évolution de la concentration d'analyte et de la proportion de complexe à différents stades de la vie des gouttelettes chargées.⁹⁶ D'après ces travaux, il apparaît donc, que dans des concentrations usuelles, le processus ESI ne provoque pas de distorsion significative des équilibres chimiques en solution.

3.1.3) Apports de la source nanospray (nanoESI)

Les modèles de Dole et d'Iribarne / Thomson s'accordent pour faire apparaître l'intérêt d'obtenir des gouttelettes initiales de petite taille, puisque dans les deux cas en effet, l'émission des ions en phase gazeuse se produit lorsque la gouttelette a atteint un rayon suffisamment petit ($R < 10$ nm). Les travaux qui ont été réalisés dans ce contexte ont mis en évidence l'influence du débit de liquide sur la formation des gouttelettes chargées.⁹⁷⁻⁹⁹ De ces études, il ressort une relation de proportionnalité indiquant que de faibles débits de liquide permettent d'obtenir des gouttelettes de faible rayon (cf. formule (2)).

$$R \propto V_f^n \quad (2)$$

R : rayon de la gouttelette initiale

V_f : Débit volumique de la solution

$n = 2/7$ selon⁹⁸ ; $n = 1/3$ selon⁹⁷ ; $n = 2/3$ selon⁹⁹

La source ESI conventionnelle nécessite généralement des débits situés entre 1 et 100 $\mu\text{L} / \text{min}$, impliquant l'utilisation d'un gaz de nébulisation pour assister la formation des gouttelettes chargées à la sortie du capillaire. En comparaison, la source nanoESI,⁵⁵ qui utilise des capillaires en verre de diamètres de sortie inférieurs (de l'ordre du micron), permet de travailler avec des débits de l'ordre de quelques dizaines de nL / min sans l'assistance d'un gaz de nébulisation, produisant ainsi des gouttelettes d'un rayon d'environ 100 nm, soit 10 fois plus petites que les gouttes produites par une source ESI conventionnelle (1-2 μm).^{55, 99}

La MS étant une technique sensible à la concentration des analytes (et non pas à leur quantité), la source nanospray permet non seulement une réduction significative de la consommation d'échantillon, liée à la diminution du débit de liquide, mais également un gain de sensibilité d'un facteur 2 à 3.⁵⁵ D'autre part, l'obtention de gouttelettes initiales ayant un grand rapport surface / volume engendre un gain de sensibilité significatif lors de l'analyse de molécules polaires, telles que des sucres ou des protéines glycosylées qui ne présentent qu'une faible activité de surface.¹⁰⁰⁻¹⁰² Finalement, la production de gouttelettes mères plus petites permet également de diminuer le nombre de cycles d'évaporations / explosions coulombiennes et donc de limiter l'effet de concentration lors du processus nanospray. Il en résulte ainsi une limitation du risque de déplacement des équilibres chimiques en solution,⁹⁵ mais également une plus grande tolérance aux sels non-volatils.^{55, 101} Ces

avantages ont très tôt suscité un intérêt particulier du nanospray pour les études menées en MS supramoléculaire comme le démontrent les travaux pionniers du groupe de Robinson.¹⁰³⁻¹⁰⁸

3.1.4) Nanospray sur puces microfluidiques

Alors que les avantages du nanospray sont incontestables, ils se trouvent quelque peu contrastés par l'élaboration manuelle des capillaires en verre qui demande une certaine technicité sans laquelle des soucis de reproductibilité peuvent être rencontrés.^{109, 110} De manière intéressante cependant, les progrès réalisés dans le domaine des microtechnologies ont permis de développer des émetteurs nanospray intégrés dans des puces microfluidiques. Ces puces peuvent être constituées de différents matériaux (polymères, verre, silicium, etc.) et faire appel à différents procédés de fabrication (ablation laser, techniques de décapage (*etching*), photolithographie, etc.).¹¹¹⁻¹¹³

D'autre part, les puces microfluidiques peuvent également intégrer des systèmes de préparation des échantillons (digestion enzymatique, dessalage, etc.), ainsi que des systèmes de séparation (chromatographie, électrophorèse capillaire, etc.), illustrant ainsi le concept de « *lab-on-a-chip* » (figure 6).¹¹¹⁻¹¹³ L'intérêt de ces puces provient non seulement des avantages du nanospray mais également des propriétés intrinsèques de la microfluidique (faible consommation d'échantillon, capacités de séparation améliorées, etc.), ainsi que de la régularité de l'usinage qui permet d'assurer une certaine reproductibilité. Parmi les quelques systèmes commercialisés, le robot Triversa Nanomate (Advion Biosciences) permet d'automatiser le mélange des échantillons, leur incubation et leur analyse nanoESI sur puce microfluidique (figure 6a).^{58, 59} Son fonctionnement détaillé ainsi que son potentiel en MS supramoléculaire seront décrits dans la suite du manuscrit (cf. Partie II).

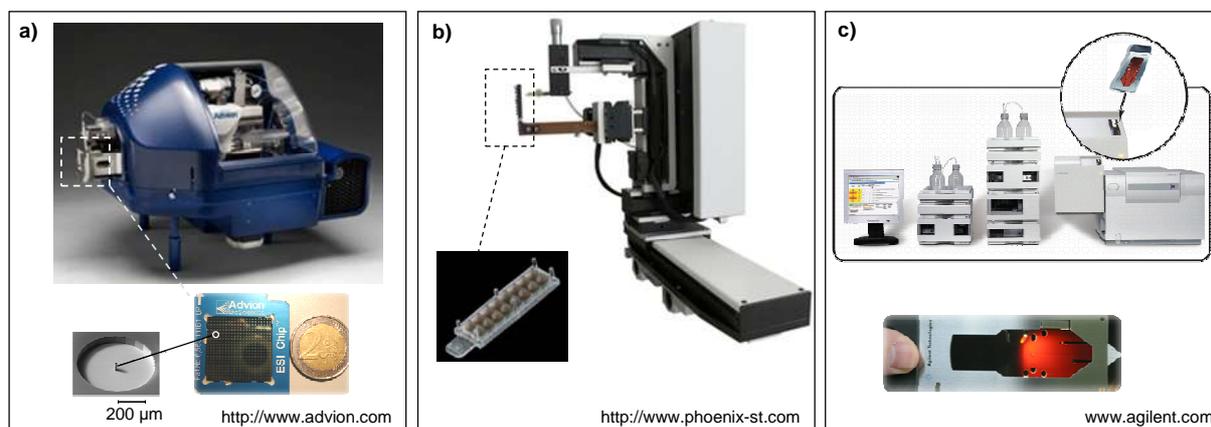


Figure 6 : Exemples d'instruments commerciaux intégrant une source nanoESI sur puce microfluidique. (a) Robot d'infusion nanoESI Triversa Nanomate (Advion Biosciences) utilisant des puces en silicium contenant 400 émetteurs nanospray. (b) Robot d'infusion nanoESI AutoNano Di (Phoenix S&T) utilisant des puces en polypropylène contenant 16 émetteurs nanospray. (c) Système de chromatographie Chip Cube (Agilent) utilisant des puces en polyimide contenant une colonne d'enrichissement, une colonne chromatographique, ainsi qu'une aiguille nanospray.

3.2) L'interface

L'interface d'un spectromètre de masse a pour rôle de transmettre les ions de la source d'ionisation vers l'analyseur (figure 1) sous l'effet de champs électriques et de gradients de pression. Les interfaces sont développées de sorte à maximiser les rendements de transmission des ions et parmi les différentes géométries disponibles au laboratoire, on distingue :

- ▶ Les **multipôles** constitués de barreaux disposés parallèlement à l'axe de déplacement des ions (figure 7a).
- ▶ Les « **stacked ring ion guides** » et « **ion funnels** » composés de lentilles de géométrie annulaire et alignées perpendiculairement à l'axe de déplacement des ions (figure 7b).

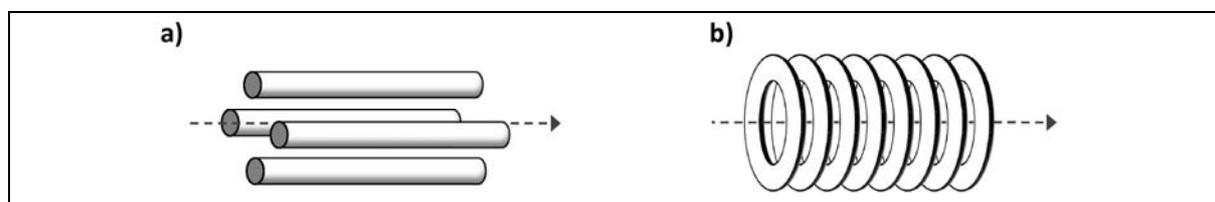


Figure 7 : Représentation schématique des guides d'ions de type (a) quadripôle et (b) *stacked ring ion guide*. Les flèches représentent l'axe de déplacement des ions.

Le champ électrique résultant de l'application de tensions continues et de tensions alternatives sur les barreaux ou lentilles de ces guides d'ions permet de focaliser les ions et de les transmettre au sein de l'instrument, avec en plus la possibilité de les accumuler ou encore de les sélectionner en fonction de leur rapport m/z .

3.2.2) Les guides d'ions multipôlares

En spectrométrie de masse, les multipôles sont généralement constitués de deux à quatre paires de barreaux parallèles (quadripôles et octopôles, respectivement) qui sont connectés entre eux de façon à pouvoir appliquer un potentiel radiofréquence en opposition de phase entre 2 barreaux adjacents (figure 8). Le champ électrique ainsi créé confère aux ions un mouvement oscillatoire entre les barreaux du multipôle.¹¹⁴

Le fonctionnement détaillé du quadripôle a été rapporté par Campana.¹¹⁵ Le potentiel appliqué sur les barreaux est la résultante d'une tension continue U superposée à une tension alternative d'amplitude V et de fréquence angulaire ω (figure 8a). La trajectoire des ions dans un quadripôle est décrite par les équations établies par le physicien Mathieu en 1866 et dont la solution se traduit graphiquement par un diagramme de stabilité représentant les valeurs de U et V pour lesquelles un ion de rapport m/z donné aura une trajectoire stable et pourra être transmis dans le quadripôle (figure 8b). On distingue ainsi deux modes de fonctionnement du quadripôle en fonction de l'application ou non de la tension continue U :

- ▶ Pour $U \neq 0$, le quadropôle fonctionne en tant qu'**analyseur** : dans ce mode de fonctionnement, le balayage des tensions U et V est réalisé tout en conservant le rapport U/V constant (figure 8b - droite $U = kV$) et il est alors possible de ne laisser passer que les ions ayant un rapport m/z donné.
- ▶ Pour $U = 0$, le quadropôle fonctionne en tant que « **guide d'ions** » : dans ce mode de fonctionnement appelé « **mode RF-only** » où seule la radiofréquence est appliquée (figure 8b - axe des abscisses), le quadropôle transmet les ions et ne permet plus de les filtrer en fonction du rapport m/z .

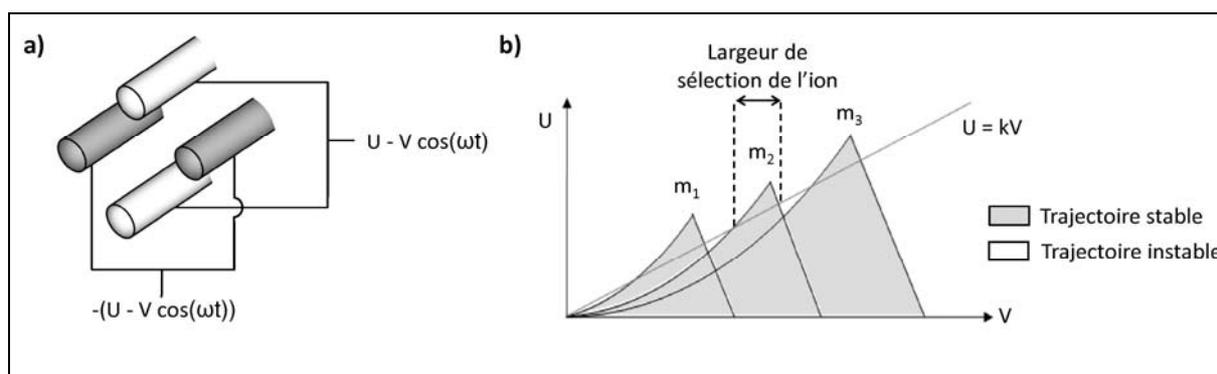


Figure 8 : Fonctionnement d'un analyseur quadropolaire. (a) Schéma des tensions appliquées sur le quadropôle. (b) Diagramme de stabilité des ions $m_3 > m_2 > m_1$ en fonction des tensions U et V .

Alors que le quadropôle est le seul parmi les guides d'ions multipôlaires à pouvoir fonctionner en tant qu'analyseur, il faut souligner qu'en mode *RF-only* il ne permet de transmettre efficacement les ions que sur une gamme réduite de rapports m/z pour une tension V donnée.¹¹⁶ Ainsi, il est possible sur certains instruments de balayer plusieurs valeurs de V afin de limiter ce biais dans la transmission des ions. Une autre amélioration consiste à diminuer la fréquence de la tension alternative, permettant ainsi d'isoler des ions jusqu'à 32000 m/z et de les transmettre jusqu'à 90000 m/z , cela se faisant cependant au détriment de la résolution du quadropôle, c'est-à-dire sa capacité à isoler des fenêtres de rapports m/z étroites.¹¹⁷⁻¹¹⁹

3.2.3) Les guides d'ions de type *ion funnel* et *stacked ring ion guide (SRIG)*

La géométrie de type SRIG a été introduite par le groupe de Gehrlich en 1969,⁴⁸ qui a poursuivi son développement dans les années suivantes.^{114, 120} Ce guide d'ions est constitué d'une juxtaposition de lentilles annulaires de même diamètre interne formant un tunnel coaxial à la trajectoire des ions (figure 9a). Une géométrie différente a également été proposée par le groupe de Smith,^{121, 122} pour laquelle le diamètre interne des lentilles diminue progressivement dans le sens de progression des ions, formant de cette manière un entonnoir, d'où le nom de *ion funnel* qui lui a été attribué (figure 9b).

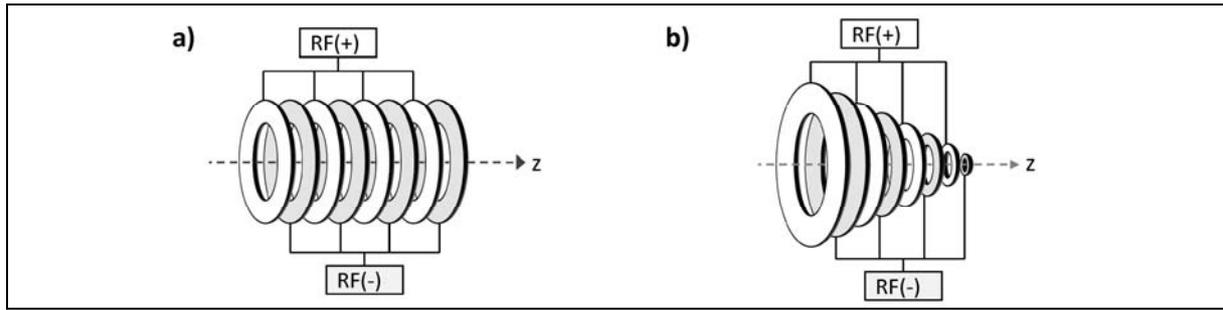


Figure 9 : Représentation schématique des guides d'ions de type (a) *stacked ring ion guide* et (b) *ion funnel*. Les flèches représentent l'axe de déplacement des ions.

Le principe de fonctionnement du SRIG et de l'*ion funnel* est basé sur l'application de potentiels radiofréquences en opposition de phase sur les différentes lentilles de sorte à obtenir une alternance de lentilles positivement et négativement chargées (figure 9). La radiofréquence est choisie de manière à obtenir un champ inhomogène qui oscille plus rapidement que le temps mis par les ions pour se déplacer entre les électrodes.¹²³ Il en résulte ainsi un potentiel effectif, ou pseudo-potentiel,¹¹⁴ caractérisé par une zone essentiellement libre de champ au centre du guide d'ions et délimitée par des barrières de potentiel augmentant de manière exponentielle à proximité des lentilles (figure 10a).¹²⁴ Les ions entrant dans le guide d'ions sont ainsi repoussés en son centre et cela de manière indépendante de la polarité de l'ion.¹²⁴

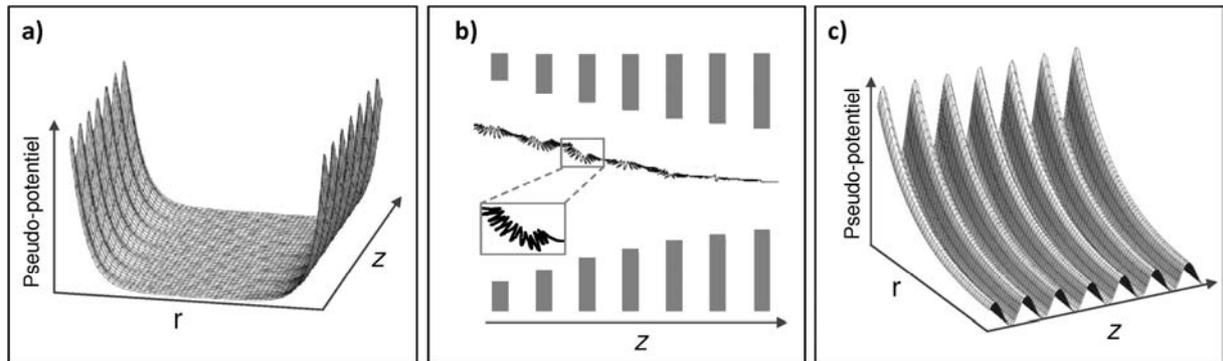


Figure 10 : Transmission des ions dans les guides d'ions de type *stacked ring ion guide* et *ion funnel*. (a) Profil du pseudo-potentiel dans un SRIG, adapté d'après¹²⁵. (b) Simulation du mouvement des ions dans un *ion funnel* (information transmise par Bruker Daltonics). (c) Agrandissement du pseudo-potentiel dans un SRIG, adapté d'après¹²⁵.

Le mouvement des ions dans ce type de guide d'ions a été décrit comme étant la résultante d'une dérive lente et d'oscillations rapides.¹¹⁴ La figure 10b correspond à une simulation de la trajectoire des ions dans un *ion funnel* révélant des déplacements axiaux (avant et arrière) et radiaux (haut et bas). D'autre part, en examinant en détail le profil du champ électrique dans un SRIG, des puits de potentiel transversaux sont observables à proximité des lentilles (figure 10c). Ces puits de potentiel, dont la profondeur dépend notamment du diamètre interne des lentilles ainsi que de leur espacement,¹²⁶ sont capables de piéger les ions et d'empêcher ainsi leur progression dans le guide d'ions. Afin de limiter ce piégeage, une différence de potentiel peut être appliquée entre l'entrée et la sortie du guide d'ions de sorte à fournir l'énergie cinétique nécessaire aux ions pour être transmis de

manière optimale (cas du MicroTOF-Q, Bruker Daltonics).^{121, 122, 126} Une autre alternative consiste à superposer à la radiofréquence, une tension continue brève se déplaçant de lentille à lentille, créant ainsi une vague de potentiel capable de « drainer » les ions vers la sortie du guide d'ions : il s'agit de la technologie *T-Wave*TM dont est équipé le Synapt HDMS (Waters) et qui sera décrite de manière détaillée dans la suite du manuscrit (cf. Partie IV).^{125, 127}

3.2.4) Comparaison des différents guides d'ions

La qualité essentielle d'un guide d'ion réside en sa capacité à **transmettre les ions de la source vers l'analyseur** avec le meilleur rendement possible. Ainsi, l'objectif premier est de pouvoir collecter les ions de manière efficace. Sur ce point, l'*ion funnel* possède l'avantage de disposer d'une large ouverture permettant de collecter un maximum d'ions issus de sources diffuses afin de les focaliser ensuite en un mince faisceau.^{121, 128}

Un autre point essentiel à considérer dans la comparaison des différents guides d'ions est le **profil radial du pseudo-potentiel** créée par la radiofréquence (figure 11). Alors que dans le cas du quadrupôle le profil du pseudo-potentiel est quadratique, l'octopôle et ensuite le SRIG et l'*ion funnel* affichent des profils plus plats au centre du guide d'ions avec des gradients de potentiel plus raides à proximité des lentilles (figure 11). Ces puits de potentiel plus larges ont pour conséquence directe de conférer à ces guides d'ions la capacité de focaliser une quantité d'ions plus importante. Ainsi, l'utilisation de multipôles d'ordres supérieurs (octopôles), de SRIG ou d'*ion funnels* permet d'atteindre de meilleurs rendements de transmission.^{124, 129} La comparaison d'un SRIG et d'un hexapôle opérant tous deux à une pression d'environ 3 mbar a en effet révélé un gain de transmission significatif en faveur du SRIG.⁶⁰ La comparaison entre un SRIG et un *ion funnel* a, quant à elle, montré des performances comparables pour ces deux guides d'ions.¹³⁰

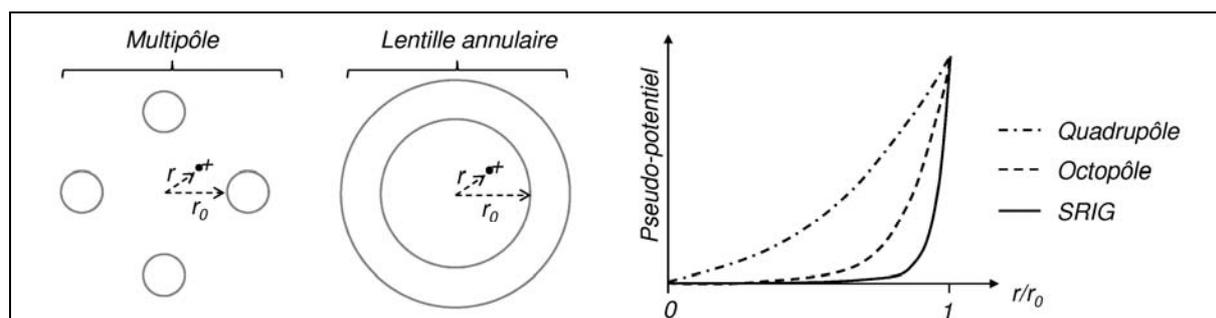


Figure 11 : Profil radial du pseudo-potentiel dans un quadrupôle, un octopôle et un SRIG, adapté d'après ¹²⁴. r correspond à la distance séparant l'ion de l'axe du guide d'ion et r_0 se rapporte à la distance entre l'axe du guide d'ion et la paroi interne du barreau ou de la lentille.

Parmi les points de comparaison rapportés dans la littérature, il est encore intéressant de mentionner la capacité des **multipôles d'ordres supérieurs (hexapôle, octopôle), du SRIG et de l'*ion funnel* à transmettre les ions tout en favorisant leur thermalisation** (cf. 3.2.5).^{131, 132} Cette caractéristique est particulièrement importante en MS supramoléculaire où l'intégrité des complexes non-covalents doit être préservée en limitant l'activation des ions par des collisions « douces » avec le gaz tampon.

Finalement, pour conclure cette comparaison, il faut rappeler que le quadropôle est le seul guide d'ions mentionné dans ce chapitre qui est **capable d'isoler finement un ion en fonction de son rapport m/z**. Il reste de ce fait indispensable pour les expériences de MS en tandem (MS/MS) faisant intervenir des spectromètres de masse hybride électrospray / quadropôle / temps de vol (ESI-Q-TOF). C'est donc en combinant judicieusement les spécificités de ces différents guides d'ions, que les instruments actuels bénéficient de la possibilité d'isoler les ions tout en conservant des niveaux de sensibilité particulièrement intéressants.

3.2.5) Collisions en phase gazeuse

a) Thermalisation des ions

Durant le transfert des ions dans l'interface de l'instrument où règne une pression résiduelle de gaz de l'ordre de 10^{-5} mbar, une fraction de l'énergie translationnelle des ions est convertie en énergie interne suite aux multiples collisions avec les molécules de gaz.¹³³ Lorsqu'elles sont de basse énergie, ces collisions engendrent une diminution et une focalisation des composantes axiale et radiale de l'énergie cinétique des ions (figure 12a et 12b, respectivement), favorisant ainsi leur focalisation spatiale sous l'effet combiné du pseudo-potential créé par les guides d'ions (figure 12c) : on parle de « thermalisation » des ions, ou « *collisional cooling* ». ¹³³⁻¹³⁵ Ce processus de thermalisation permet d'augmenter l'efficacité de transmission des ions dans l'interface,¹³⁴⁻¹³⁸ d'améliorer la résolution des analyseurs à temps de vol sur une large gamme de rapports m/z,^{135, 139} et favorise également le maintien de l'intégrité des complexes non-covalents en phase gazeuse.^{136, 140, 141}

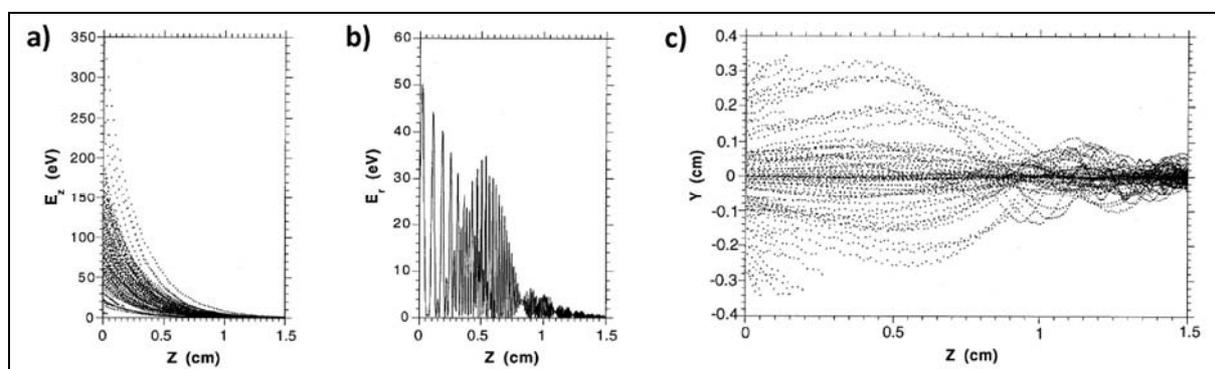


Figure 12 : Simulation de l'énergie et de la trajectoire des ions dans un quadropôle. (a) Focalisation de l'énergie cinétique axiale des ions (E_z). (b) Focalisation de l'énergie cinétique radiale des ions (E_r). (c) Focalisation spatiale des ions sur l'axe du guide d'ions. D'après ¹³⁵.

b) Dissociation induite par collision

Au cours du transfert des ions dans l'interface, l'augmentation de leur énergie interne par conversion de leur énergie translationnelle permet également de dissocier les adduits non-spécifiques de solvant encore présents sur les ions, améliorant ainsi leur désolvatation.¹⁴¹ De plus, lorsque l'énergie interne atteint un seuil suffisamment élevé, les collisions conduisent également à la dissociation des interactions non-covalentes spécifiques ainsi que des liaisons covalentes. Ce processus de

dissociation induite par collision (CID) peut se produire dans les premières zones de pompage de l'interface et/ou dans une cellule de collision prévue à cet effet. La CID est mise à profit dans les expériences de MS/MS pour fragmenter les analytes et remonter ainsi à des informations structurales (séquence en acides aminés, modifications post-traductionnelles, etc.).¹⁴²

c) Spectrométrie de mobilité ionique

Durant le transfert dans l'interface, les collisions avec les molécules de gaz ont pour effet de diminuer l'énergie cinétique des ions (figure 12a, b) : il s'agit là du phénomène qui est à la base de la spectrométrie de mobilité ionique (IMS). En effet, cette technique est basée sur la séparation des ions en fonction de leur vitesse de progression à travers un gaz inerte (He, N₂, etc) lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique : on parle de mobilité ionique. A masse et à charge égales, plus un ion aura une conformation étendue, plus il subira de collisions en phase gazeuse, et plus il sera ralenti (figure 13).

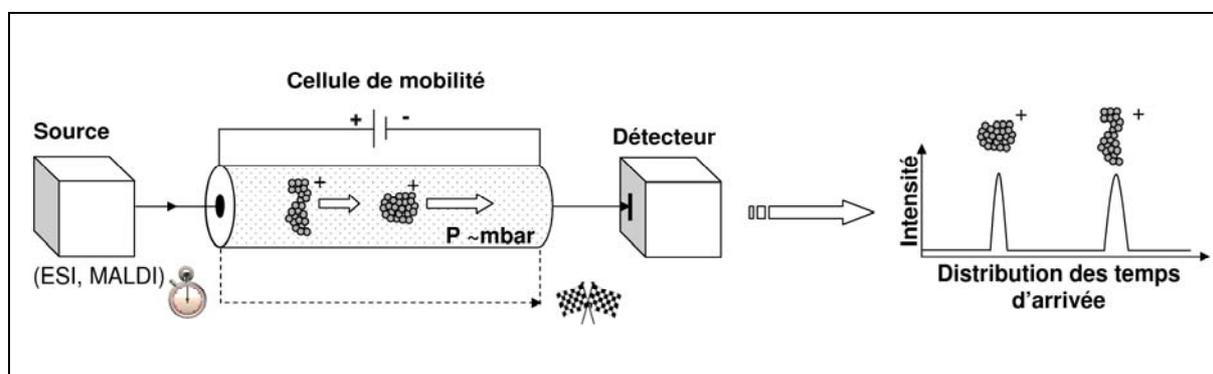


Figure 13 : Principe d'un spectromètre de mobilité ionique.

Ainsi, à partir de la mesure de la vitesse de l'ion dans le « bain de gaz », il est possible de déterminer sa section efficace (Ω), et d'obtenir de cette manière des informations sur sa conformation en phase gazeuse.¹⁴³ Le potentiel de l'IMS en couplage avec la MS pour l'analyse de protéines et de complexes intacts sera décrit dans la suite du manuscrit (cf. Partie IV).

3.3) L'analyseur à temps de vol (TOF)

3.3.1) Principe de fonctionnement

Les analyseurs ont pour rôle de discriminer les ions en fonction de leur rapport m/z . Dans un analyseur à temps de vol (TOF – *time of flight*), les ions sont accélérés dans une première zone sous l'effet d'une importante différence de potentiel, puis traversent ensuite une seconde zone libre de champ où règne un vide poussé de 10^{-6} à 10^{-7} mbar (figure 14). La mesure du temps mis pour traverser le tube de vol permet alors de déterminer le rapport m/z des ions, les deux grandeurs étant reliées par l'équation (3). D'après cette équation, il apparaît que plus le rapport m/z d'un ion est élevé, plus il mettra de temps à traverser le tube de vol (figure 14).

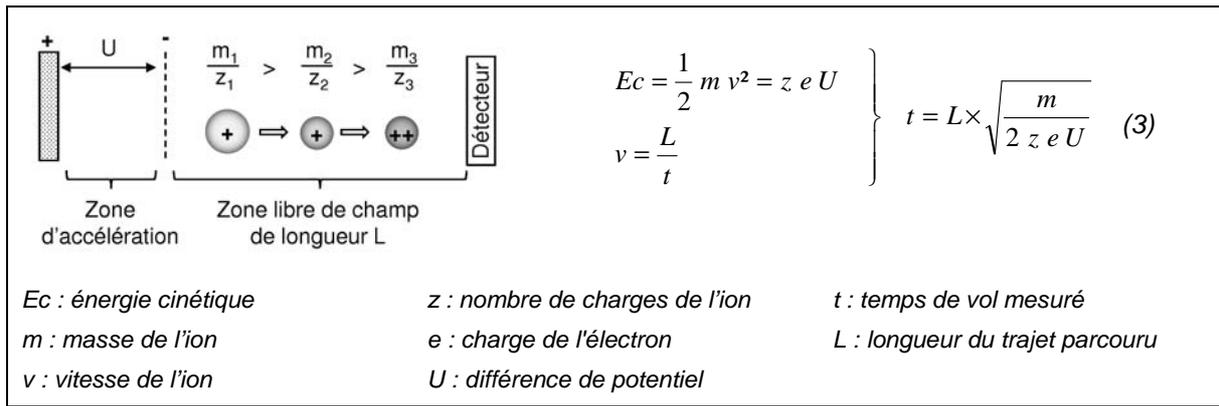


Figure 14 : Principe de fonctionnement de l'analyseur à temps de vol.

3.3.2) Performances

Les performances des analyseurs sont premièrement représentées par la **résolution à mi-hauteur** des pics ou « *full width at half maximum* » (FWHM - figure 15), qui traduit la capacité de l'analyseur à différencier des ions ayant une faible différence de masse. Dans le cas du TOF, la résolution se situe généralement entre 5000 à 15000 mais peut atteindre des valeurs de 40000-60000 pour des instruments de dernière génération (Synapt™ G2, Waters ; MaXis™, Bruker Daltonics ; Agilent UHD Q-TOF série 6500, Agilent). Notons cependant qu'une résolution FWHM de 5000 est bien souvent suffisante pour l'analyse de complexes non-covalents pour lesquels la finesse des pics est avant tout dictée par la qualité de la désolvatation ayant lieu dans la source et dans l'interface de l'instrument (cf. Chapitre III).

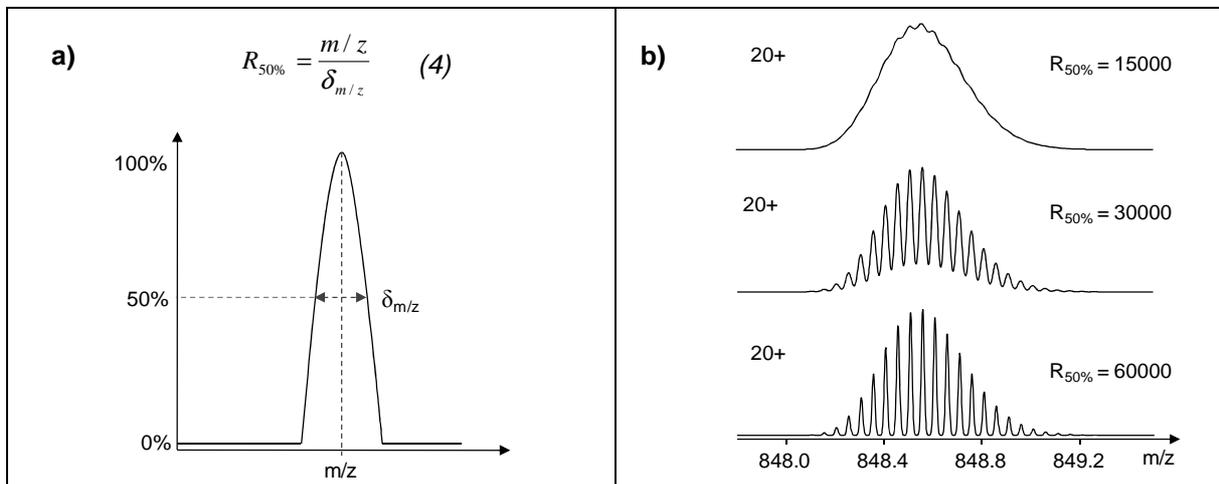


Figure 15 : Résolution à mi-hauteur d'un analyseur. (a) Calcul de la résolution à mi-hauteur (FWHM). (b) Simulation de l'état de charge 20+ de la myoglobine de cœur de cheval (C₇₆₉H₁₂₁₂N₂₁₀O₂₁₈S₂, M = 16951,5 Da) à différentes résolutions. L'augmentation de la résolution permet d'observer le massif isotopique de l'état de charge 20+ pour lequel l'écart entre chaque pic est de 1/20 = 0.05 m/z.

La seconde caractéristique importante des analyseurs est la **gamme de masse** analysable, qui, dans le cas du TOF, est en théorie infinie. En pratique, des ions de plusieurs dizaines de milliers de m/z ont été détectés,¹¹⁸ correspondant à des complexes biologiques de plusieurs millions de Daltons.^{137, 144, 145}

En plus de la rapidité et de la sensibilité du TOF, cette caractéristique en fait l'analyseur par excellence en MS supramoléculaire pour l'étude de complexes biologiques de haute masse.

3.3.3) Paramètres critiques et développements instrumentaux

La détermination du rapport m/z des ions nécessite une mesure précise de leur temps de vol. Pour cela, il convient de s'assurer i) que les ions soient focalisés sur la « ligne de départ » dans la zone d'accélération du TOF et ii) que leur vitesse initiale soit nulle.¹⁴⁶ Deux développements instrumentaux majeurs ont ainsi été apportés afin de se rapprocher de ces conditions idéales.^{139, 147-149}

Premièrement, le couplage entre le TOF et une source d'ions continue comme l'ESI a nécessité la mise en place d'un système d'**injection orthogonale** des ions.^{53, 150} En effet, les ions arrivant en flux continu parallèlement à l'axe de l'interface, une accélération perpendiculaire permet d'échantillonner les ions pour chaque cycle d'analyse du TOF et de définir précisément le « top départ » des ions (figure 16a). De plus, la composante orthogonale de la vitesse des ions en sortie de l'interface étant idéalement nulle, la vitesse d'un ion de rapport m/z donné dans le tube de vol dépendra uniquement de l'énergie cinétique acquise dans la zone d'accélération du TOF et non pas de son énergie cinétique initiale.¹³⁵ Notons au passage que la focalisation spatiale et le ralentissement des ions thermalisés dans l'interface permet de faciliter leur regroupement sur la « ligne de départ » du TOF et de réduire l'influence de leur énergie cinétique initiale sur leur trajectoire dans le tube de vol, rationalisant ainsi l'amélioration des performances du TOF constatée lors d'une augmentation de la pression dans l'interface (cf 3.2.5).

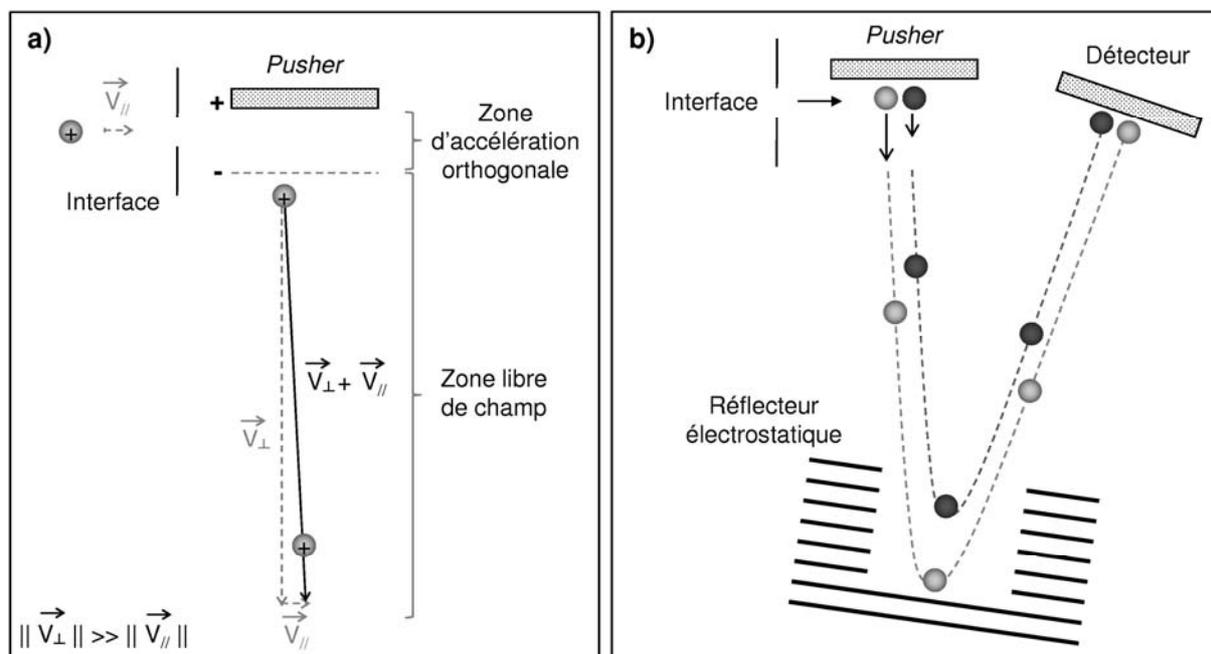


Figure 16 : Principaux développements instrumentaux de l'analyseur à temps de vol. (a) Accélération orthogonale des ions dans le tube de vol. La vitesse de l'ion dans le tube de vol est la résultante de la vitesse initiale de l'ion ($\vec{V}_{//}$) et de la vitesse acquise dans la zone d'accélération orthogonale (\vec{V}_{\perp}).¹³⁵ (b) Correction de la dispersion en énergie cinétique de deux ions de même rapport m/z par le réflecteur électrostatique.

Deuxièmement, la mise en place d'un **réflecteur électrostatique** a également permis d'améliorer les performances du TOF.⁴⁹ Un réflecteur électrostatique est constitué d'une série d'anneaux ou de grilles sur lesquels sont appliqués des potentiels croissants de même polarité que les ions analysés. Lorsque les ions pénètrent dans le champ électrique du réflecteur, ils sont d'abord ralentis puis ré-accélérés en direction opposée vers le détecteur (figure 16b). Le trajet parcouru au sein du réflecteur augmente avec l'énergie cinétique des ions. Ainsi, des ions de même rapport m/z ayant une énergie cinétique différente en sortie de la zone d'accélération, seront refocalisés temporellement de façon à atteindre le détecteur au même moment. La correction de cette dispersion en énergie cinétique permet d'augmenter de manière significative la résolution des TOF.

3.4) Le détecteur

Les spectromètres de masse ESI-TOF et ESI-Q-TOF disponibles au laboratoire sont équipés d'un détecteur de type MCP pour « *multichannel plate* ». Il s'agit plus précisément d'un disque d'une épaisseur de l'ordre du millimètre et perforé de part en part par des canaux parallèles ayant un diamètre de l'ordre du micron (figure 17a).¹⁵¹ L'impact d'un ion à l'intérieur de l'un de ces canaux va provoquer l'arrachement d'électrons secondaires qui par collisions successives vont permettre d'amplifier le signal qui sera finalement collecté par une anode (figure 17a). L'acquisition du signal est ensuite assurée par un convertisseur de type TDC pour « *time-to-digital convertor* » qui enregistre le temps d'arrivée des ions sous forme d'histogramme permettant de générer finalement le spectre de masse (figure 17b).

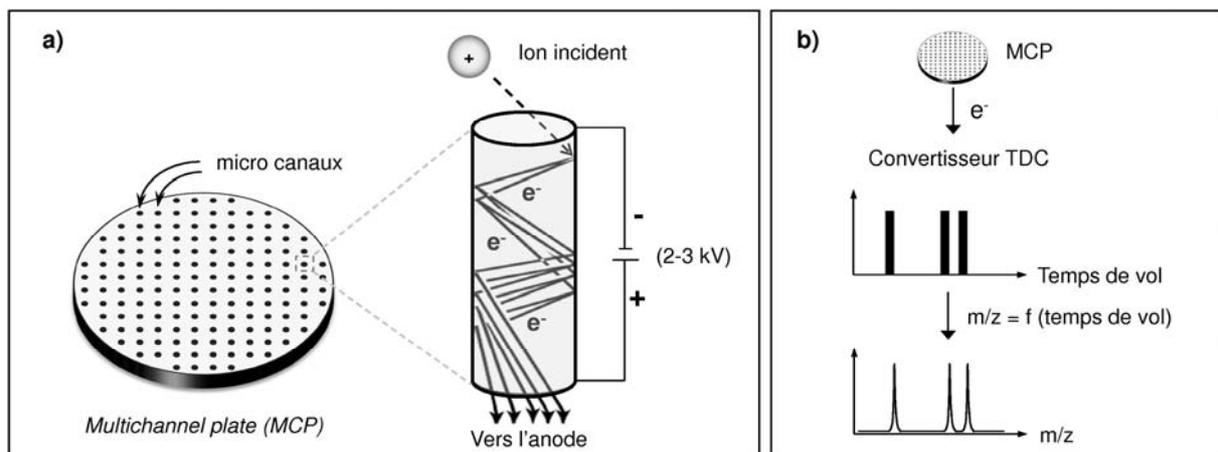


Figure 17 : Détection et traitement du signal par un détecteur de type *multichannel plate*. (a) Représentation schématique d'un détecteur MCP avec illustration du phénomène d'amplification des électrons secondaires.(b) Etapes de détection et de traitement du signal.

Il est par ailleurs important de mentionner que la probabilité qu'un ion incident donne lieu à l'émission d'électrons secondaires augmente non pas avec l'énergie cinétique de l'ion mais avec sa vitesse. La réponse du détecteur diminue donc lorsque la vitesse d'un ion diminue, c'est-à-dire lorsque sa masse augmente et sa charge diminue.¹⁴⁸ Cette caractéristique du MCP est également à prendre en compte dans l'interprétation des spectres de masse acquis en conditions natives pour des complexes biologiques de haute masse moléculaire.

4) PRESENTATION DES INSTRUMENTS DU LABORATOIRE

Les travaux réalisés durant ce travail de thèse ont exclusivement été réalisés sur des instruments de type ESI-TOF et ESI-Q-TOF dont une description sommaire est donnée ci-dessous. La stratégie générale d'optimisation des paramètres instrumentaux pour la détection de complexes biologiques fragiles et de haute masse moléculaire sera détaillée dans le chapitre suivant (cf. Chapitre III).

4.1) Le LCT (Waters)

Le LCT est un spectromètre de masse équipé d'une source ESI de type *Z-Spray*TM : les ions produits dans la source suivent une trajectoire en « Z » avant d'entrer dans l'interface. Avec cette configuration, les agrégats et les molécules neutres sont éliminés avant l'entrée dans le spectromètre de masse, conférant ainsi à cette source une plus grande tolérance aux sels non volatils. La présence d'une arrivée de gaz de désolvatation chauffé en source (azote) permet d'assister l'évaporation du solvant. L'interface de l'instrument est constituée de deux hexapôles, puis d'une série de lentilles électrostatiques dont le rôle est de focaliser les ions avant leur entrée dans l'analyseur TOF, permettant ainsi d'atteindre une résolution FWHM spécifiée à 5000. Le pompage est assuré par une pompe primaire ainsi que par trois pompes turbomoléculaires qui permettent de passer progressivement de la pression atmosphérique au vide poussé de l'analyseur ($5 \cdot 10^{-7}$ mbar). Une vanne a également été installée de sorte à pouvoir ajuster plus finement la pression dans l'interface (Pi), un paramètre clé pour l'analyse des complexes non-covalents au même titre que la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (Vc) (cf. Chapitre III).

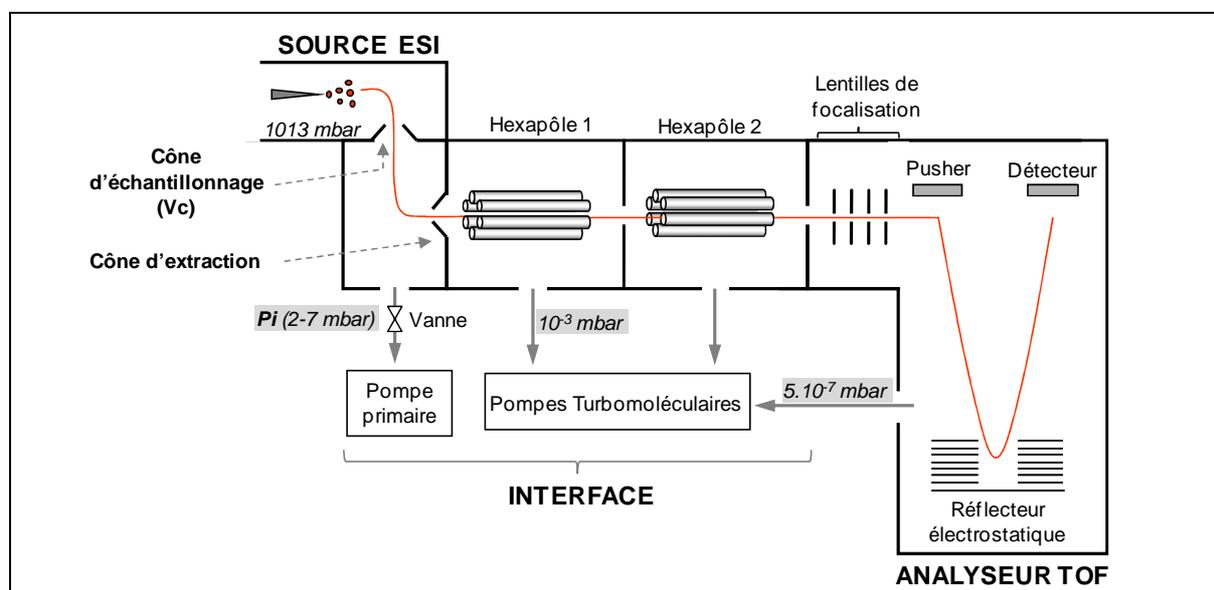


Figure 18 : Représentation schématique du LCT (Waters).

Dans le cadre de ce travail de thèse, le LCT a été couplé à un robot d'injection nanospray sur puce microfluidique (Triversa Nanomate, Advion Biosciences). La mise en place, l'évaluation et les développements méthodologiques liés à ce couplage seront détaillés dans la suite de ce manuscrit (cf. Partie II, Chapitre I).

4.2) Le MicroTOF-Q (Bruker Daltonics)

Le microTOF-Q est un spectromètre de masse de type ESI-Q-TOF. Les ions initialement produits dans une source inclinée à environ 75° , entrent dans l'interface via un capillaire de transmission en verre de faible diamètre interne. A la sortie de ce capillaire, les ions sont focalisés à l'aide de deux *ion funnels* puis d'un hexapôle, avant d'atteindre un quadropôle analytique qui peut fonctionner soit en mode *RF-only* pour les analyses MS, soit en tant que filtre de masse pour les analyses MS/MS. Dans le cas de la MS/MS, les ions sélectionnés dans le quadropôle sont ensuite fragmentés dans une cellule de collision, elle-même constituée d'un quadropôle confiné dans une enceinte afin de maintenir une pression suffisamment élevée de gaz de collision (argon dans le cas présent). Finalement, la mesure du rapport m/z est réalisée dans l'analyseur TOF avec une résolution FWHM spécifiée à 15000. La diminution progressive de la pression dans l'interface est assurée par une pompe primaire ainsi qu'une pompe turbomoléculaire à 3 étages. Une pompe turbomoléculaire supplémentaire permet finalement d'atteindre une pression de l'ordre de $5 \cdot 10^{-7}$ mbar dans le TOF.

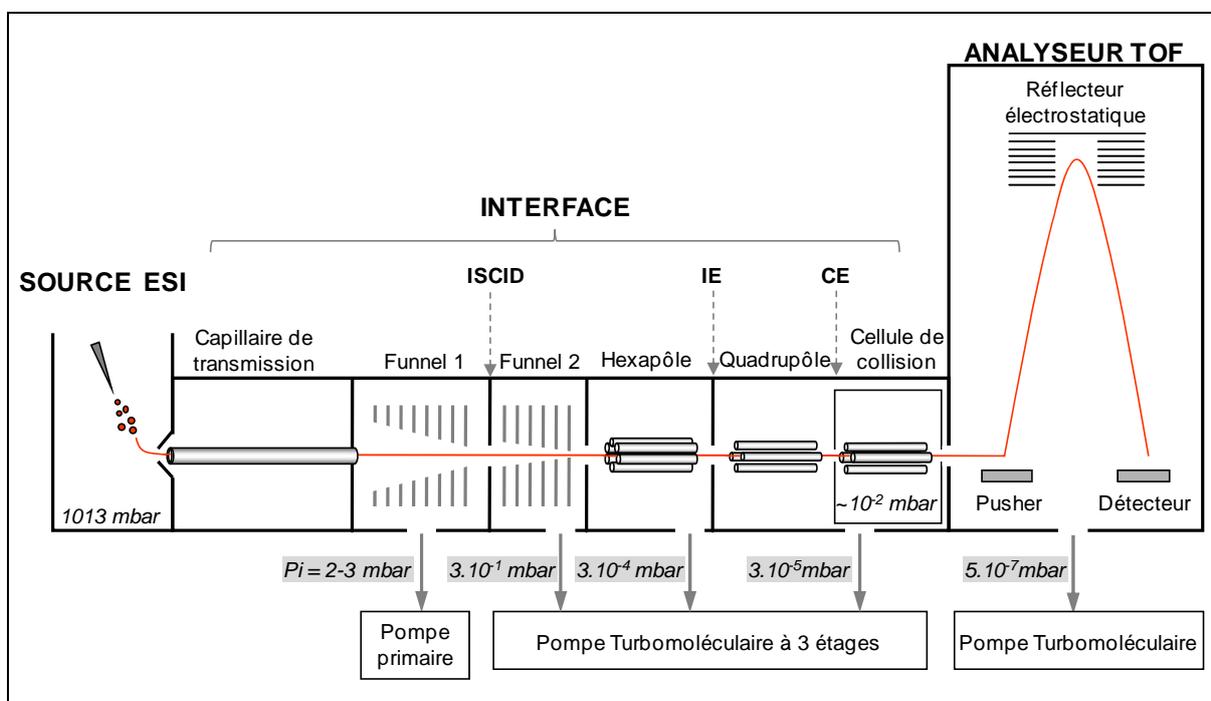


Figure 19 : Représentation schématique du microTOF-Q (Bruker Daltonics). ISCID : *In Source Collision Induced Dissociation*, IE : *Ion Energy*, CE : *Collision Energy*.

Lors du transfert des ions dans l'interface, leur énergie cinétique peut être modulée grâce à trois jeux de lentilles électrostatiques situés respectivement entre les deux *ion funnels* (ISCID : *In Source Collision Induced Dissociation*), à l'entrée du quadropôle (IE : *Ion Energy*) et à l'entrée de la cellule de collision (CE : *Collision Energy*). L'importance de ces lentilles pour l'analyse de complexes non-covalents sera décrite dans le chapitre suivant (cf. Introduction, Chapitre III).

4.3 Le Synapt HDMS (Waters)

Le Synapt HDMS (*High Definition Mass Spectrometry*) est un instrument de type ESI-Q-TOF offrant la possibilité de réaliser des expériences de mobilité ionique (IMS). Tout comme le LCT, il est pourvu d'une source ESI de type *Z-Spray*TM mais se distingue notamment par la présence de guides d'ions dotés de la technologie *T-Wave*TM (cf. 3.2.3). Les ions pénétrant dans l'interface sont focalisés dans un premier guide d'ions avant d'atteindre un quadrupôle pouvant fonctionner comme un filtre en masse pour les expériences de MS/MS. Les ions parviennent ensuite dans le compartiment de l'interface appelé *Triwave*TM contenant trois guides d'ions *T-Wave*, respectivement nommés « *Trap* », « *IMS* » et « *Transfer* ». Parmi eux, les guides d'ions *Trap* et *Transfer* sont alimentés en argon afin de servir de cellules de collision. Quant au *T-Wave* intermédiaire (*IMS*), il peut, soit fonctionner à une pression résiduelle d'argon de 5.10^{-4} mbar et agir comme un guide d'ions, soit être alimenté en azote à une pression d'environ 0,5 mbar et servir ainsi de cellule de mobilité ionique. Les détails concernant ce second mode de fonctionnement seront explicités dans la suite du manuscrit au même titre que l'importance de la pression dans la première zone de pompage de l'interface (*backing pressure* : bP) et des tensions d'accélération *Vc*, *Trap CE*, *Trap Bias* et *Transfer CE* pour l'analyse de complexes non-covalents (cf. Partie IV). Le pompage au sein de l'instrument est assuré par une pompe primaire et cinq pompes turbomoléculaires.

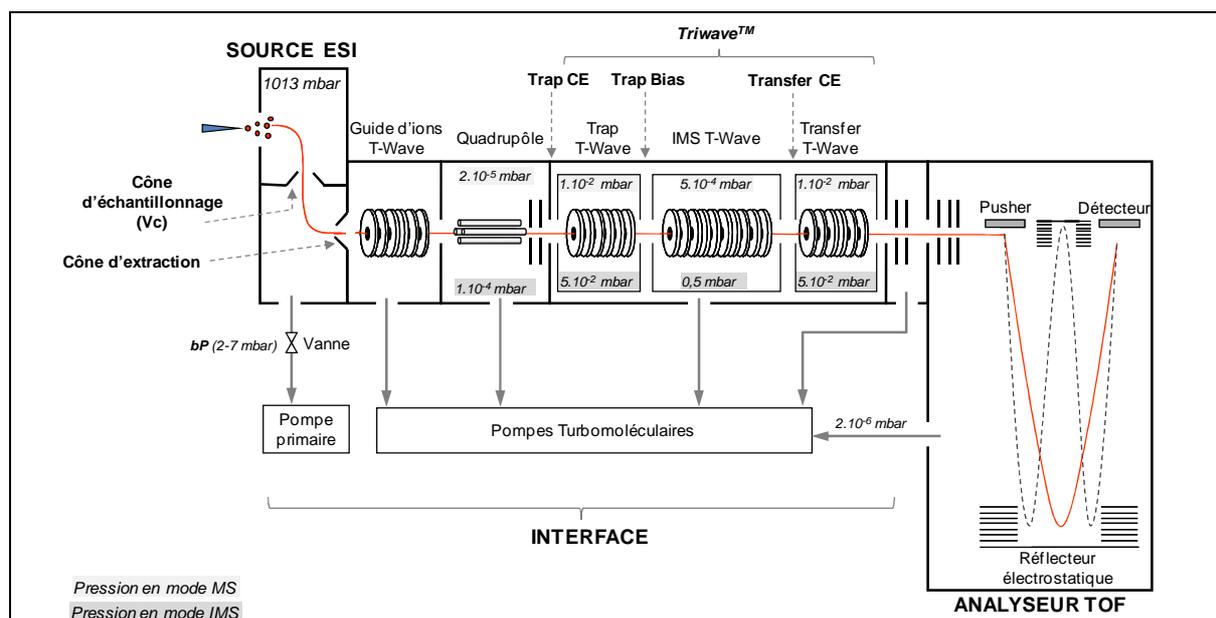


Figure 20 : Représentation schématique du Synapt HDMS (Waters).

Finalement, une dernière caractéristique de cet instrument concerne l'analyseur TOF pouvant fonctionner soit de manière conventionnelle en mode « *V* » (figure 20, trajectoire en trait plein), soit en mode « *W* » (figure 20, trajectoire en pointillés) grâce à la présence d'un deuxième réflecteur électrostatique. Le passage du mode « *V* » au mode « *W* » permet de doubler la distance de vol et d'augmenter de ce fait la résolution de l'instrument, dont la spécification passe de 10000 à 17500 (FWHM), au détriment cependant de la sensibilité qui diminue d'un facteur 3 environ. Les analyses en MS supramoléculaire sont donc réalisées en mode « *V* » qui offre une résolution suffisante.

CHAPITRE III

Stratégies Expérimentales en Spectrométrie de Masse Supramoléculaire pour la Caractérisation de Complexes Biologiques

Ce chapitre se focalise sur la description des stratégies mises en œuvre pour la détection en phase gazeuse de complexes non-covalents spécifiquement formés en solution. Les points clés concernant l'optimisation des conditions expérimentales et instrumentales y sont détaillés ainsi que les informations pouvant être recueillies en MS supramoléculaire.

1) DETECTION DE COMPLEXES BIOLOGIQUES INTACTS EN PHASE GAZEUSE

1.1) La préparation des échantillons, une étape clé

La préservation de l'intégrité structurale des complexes en solution est une condition préalable à leur détection en phase gazeuse. Les tampons couramment utilisés pour solubiliser et stabiliser les protéines et les complexes biologiques dans leur état natif, se révèlent cependant incompatibles avec l'ionisation ESI. Il convient donc de procéder à un échange de tampon (également appelé « dessalage ») préalablement aux expériences de MS supramoléculaire. **Cette étape essentielle conditionne la qualité des résultats et doit par conséquent faire l'objet d'une optimisation soignée et adaptée à chaque échantillon.** Elle consiste plus particulièrement à sélectionner le **tampon d'échange** ainsi que la **technique d'échange** de tampon.

1.1.1) Choix du tampon

L'incompatibilité entre l'ESI et les tampons utilisés lors de la purification de protéines provient de la présence d'importantes concentrations (> 1 mM) de sels, de détergents ou autres molécules non volatiles. En effet, ces molécules forment non seulement des **adduits non-spécifiques** sur les protéines lors du processus ESI (figures 1a et 1b), mais engendrent également une **diminution, voire une suppression complète du signal de la protéine** (figure 1d). Ainsi, la sélection du tampon d'échange concerne :

- ▶ **La nature du tampon**, qui est limitée par la nécessité d'utiliser des solutions aqueuses salines permettant de stabiliser les protéines, tout en évitant cependant d'employer des sels non-volatils (compatibilité avec l'ESI). Le choix se restreint alors à des solutions de **sels d'ammonium**, parmi lesquels le bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et surtout l'acétate d'ammonium (NH_4Ac) sont de loin les plus utilisés en MS supramoléculaire (figure 1). La concentration en sels d'ammonium de ces tampons non-dénaturants peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de mM.
- ▶ **Le pH du tampon d'échange**, qui est généralement fixé à des valeurs physiologiques proches de la neutralité afin de préserver la conformation native des protéines. Le pH peut cependant être ajusté à l'aide d'ammoniaque et d'acide acétique ou formique, en fonction notamment de l'expérience du biologiste concernant la stabilité de l'échantillon en solution.
- ▶ **La force ionique du tampon d'échange**, qui est ajustée en modulant la concentration des sels d'ammonium et qui peut influencer la stabilité des protéines, mais également l'affinité des complexes, particulièrement ceux maintenus par des liaisons électrostatiques (ex : complexes protéine / oligonucléotide).¹⁵²

Dans la mesure du possible, il convient d'adapter la composition du tampon dès l'étape de purification des protéines afin de faciliter la mesure de masse en MS supramoléculaire. Selon notre expérience, parmi les réducteurs couramment utilisés, le DTT perturbe moins les analyses ESI-MS en conditions

non-dénaturantes (figure 1c) que le TCEP (figure 1d) ou encore le β -mercaptoéthanol (figure 1b). De la même manière, les tampons à base de Tris sont plus facilement échangeables que ceux à base d'HEPES ; cette observation a récemment été confirmée par le groupe de Robinson.¹⁰⁹

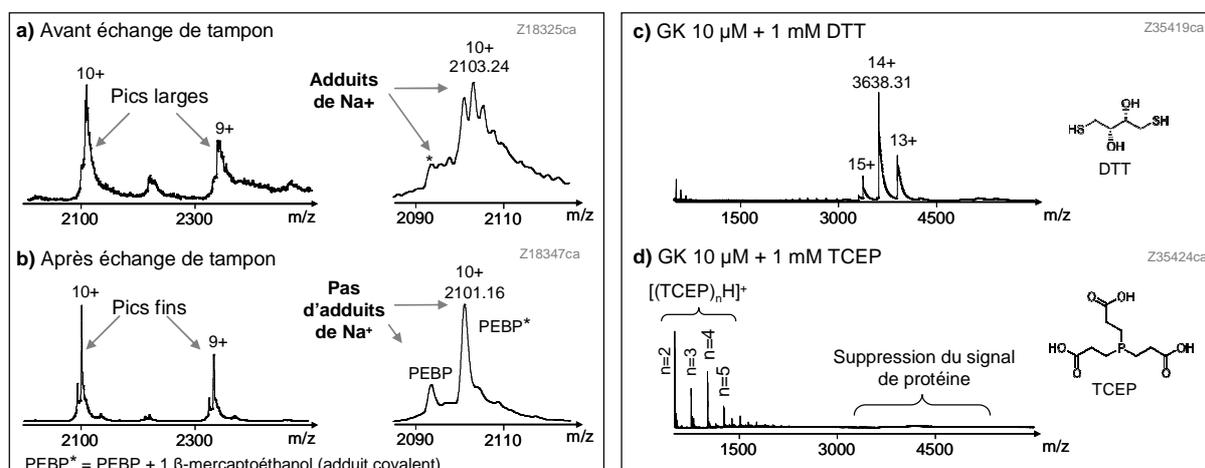


Figure 1 : Influence de la présence de solutés non-volatils pour l'analyse ESI-MS de protéines en conditions non-dénaturantes. (a, b) Analyse de PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) à 15 μ M (a) avant et (b) après échange contre un tampon NH_4Ac 50 mM pH 6,8. $V_c = 100$ V ; $P_i = 6,1$ mbar. (c, d) Analyse de GK (glucokinase) à 10 μ M dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5 en présence de (c) 1 mM DTT et (d) 1 mM TCEP. $V_c = 50$ V ; $P_i = 5,0$ mbar.

NB : Les solutions d'acétate d'ammonium et de bicarbonate d'ammonium ont un pH de 6,8 et 8,0, respectivement. Cependant, la dénomination de « tampon » qui leur est attribuée dans la littérature n'est pas justifiée car ces sels n'ont qu'un très faible effet stabilisateur du pH.

1.1.2) Les techniques d'échange de tampon

Différentes techniques sont disponibles au laboratoire afin d'échanger le tampon initial des échantillons contre une solution compatible avec l'analyse d'édifices supramoléculaires par ESI-MS :

- ▶ **La dialyse** est une technique d'échange de tampon basée sur le principe de l'osmose inverse. L'échantillon et le tampon d'échange sont placés de part et d'autre d'une membrane, dont le seuil de coupure ($MWCO$: *molecular weight cut-off*) permet de ne laisser passer que les électrolytes de petite taille. Sous l'effet de la pression osmotique, ces électrolytes s'échangent au travers de la membrane jusqu'à atteindre, pour chacun d'entre eux, une concentration égale de part et d'autre de la membrane.
- ▶ **La filtration sur gel** repose sur le principe de la chromatographie d'exclusion stérique. L'échantillon est déposé sur une colonne chromatographique et élué soit par gravité, soit par centrifugation. Au cours de l'éluion, la porosité de la phase stationnaire permet de séparer les molécules selon leur volume hydrodynamique : les molécules de grande taille sont exclues des pores de la phase stationnaire et sont donc éluées plus rapidement que les petites

molécules capables de pénétrer dans les pores. En équilibrant au préalable la colonne avec le tampon d'échange, il est ainsi possible de remplacer le tampon des échantillons.

- ▶ **L'ultracentrifugation** fait également appel à la différence de taille entre sels et biomolécules afin de les séparer. Pour cela, la solution d'analyte est déposée sur une membrane dont le seuil de coupure permet de retenir les biomolécules et de laisser passer le solvant ainsi que les petits solutés sous l'effet de la centrifugation. L'échange de tampon est effectué en réalisant des cycles successifs de concentration / dilution avec le tampon d'échange. Cette technique a l'avantage de permettre également de concentrer les échantillons.

Le choix de la technique de dessalage peut être guidé par les différents critères énumérés dans le tableau 1. Cependant, il est important de noter que l'efficacité de chacune de ces techniques est dépendante de l'échantillon traité. A titre d'exemple, la figure 2 illustre les résultats obtenus pour deux échantillons différents. Dans le cas du complexe CggR / ADN, les techniques d'échange de tampon par filtration sur gel (figures 2a et 2b) se révèlent inefficaces en comparaison à l'ultracentrifugation pour laquelle les différents états de charge du complexe apparaissent sans adduit, permettant ainsi une mesure de masse précise (figure 2c).

Dans le cas de l'anticorps 6F4 humanisé, lorsque l'échange de tampon est réalisé à l'aide d'une colonne de filtration sur gel de type Zeba, la biomolécule est détectée avec un faible nombre de charges et une distribution étroite des états de charge (figure 2d). Par contre, le nombre de charges augmente et leur distribution s'élargit dans le cas de la filtration sur gel à l'aide d'une colonne NAP-5 (figure 2e) ainsi que pour un échange réalisé par ultracentrifugation (figure 2f), témoignant ainsi d'une dénaturation partielle de la biomolécule provoquée par l'échange de tampon.

Ces exemples illustrent la nécessité de procéder à un réel travail d'optimisation de l'étape d'échange du tampon, en ajustant pour cela la **composition du tampon** et en adaptant la **technique d'échange** au cas par cas.

Technique	Dialyse	Filtration sur gel (gravité)	Filtration sur gel (centrifugation)	Ultracentrifugation
Référence commerciale	Slide-A-Lyzer (Thermo)	NAP-5 (GE Healthcare)	Zeba (Thermo)	Vivaspin (Vivascience Sartorius)
Volume	10-100 µL	100-500 µL	2-750 µL	25-2000 µL
Rapidité	-- (4-12h)	+	++	-
		(30 min)	(15 min)	(1-2 h)
Facteur de dilution	/	2-5	/	/ (possibilité de concentration)
Taux de recouvrement *	+	+	++	-
	(60-80% / cycle de 12h)	(60-80% / cycle)	(>90% / cycle)	(< 60% / 8 cycles)

Tableau 1 : Tableau comparatif des différentes techniques d'échange de tampon utilisées au laboratoire. (*) Le taux de recouvrement et le nombre de cycles d'échange à effectuer dépend fortement des échantillons et il ne s'agit là que d'une appréciation basée sur l'expérience du laboratoire.

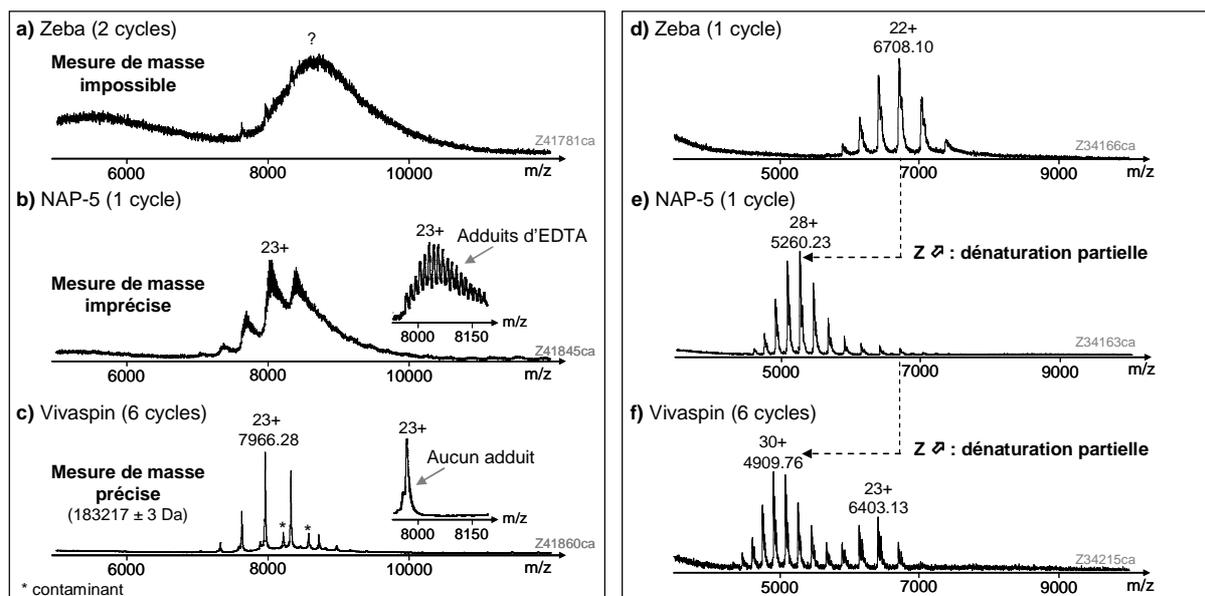


Figure 2 : Efficacité de l'échange de tampon en fonction de la technique utilisée. (a-c) Analyse de CggR (Central glycolytic genes Repressor) en complexe avec son ADN cible à 10 μ M dans un tampon NH_4Ac 150 mM pH 8,0 ($V_c = 200$ V ; $P_i = 6$ mbar). (d-f) Analyse de l'anticorps monoclonal 6F4 humanisé dilué à 10 μ M dans un tampon NH_4HCO_3 150 mM pH 7,2 ($V_c = 200$ V ; $P_i = 6$ mbar). L'échange de tampon a été réalisé par (a, d) filtration sur gel par centrifugation (Zeba), (b, e) filtration sur gel par gravité (NAP-5) et (c, f) par ultracentrifugation (Vivaspin, 30 kDa MWCO).

1.2) Optimisation des paramètres instrumentaux

1.2.1) Désolvatation des ions et maintien des interactions faibles en phase gazeuse

L'objectif premier de l'optimisation des paramètres instrumentaux est de contrôler finement l'**énergie interne** communiquée aux ions lors de l'analyse. En effet, si cette énergie est trop importante, elle entraîne la dissociation des complexes non-covalents en phase gazeuse et donc une perte de l'information recherchée (figure 3a). A l'opposé, si elle est trop faible, les ions seront mal désolvatés, et la présence de nombreux adduits sur le complexe empêchera une mesure de masse précise (figure 3c). Il s'agit donc de trouver le bon **compromis** qui permette à la fois de **conserver l'intégrité** des complexes en phase gazeuse tout en assurant une **désolvatation** suffisante (figure 3b).

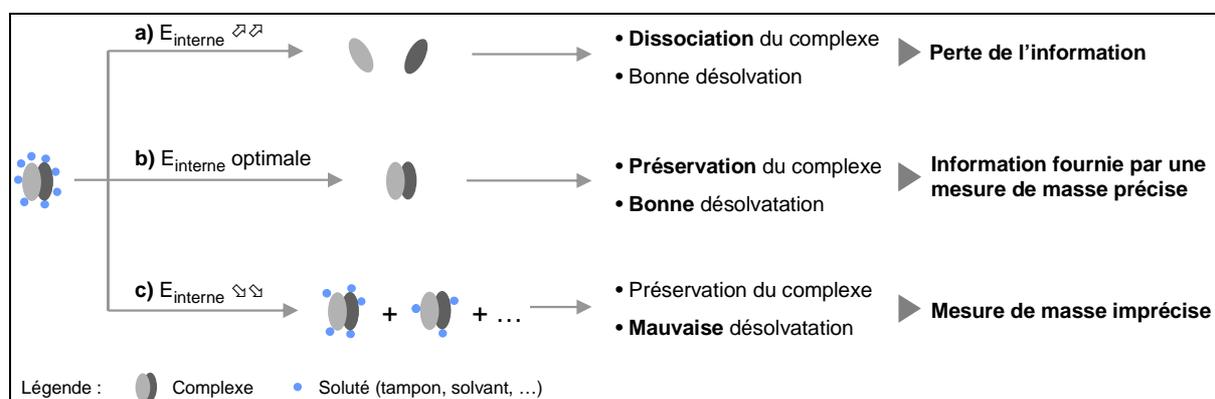


Figure 3 : Influence de l'énergie interne communiquée aux ions dans le spectromètre de masse.

a) Influence des tensions d'accélération et de la pression dans l'interface

Dans un spectromètre de masse de type ESI-TOF ou ESI-Q-TOF, les paramètres qui permettent de moduler l'énergie interne communiquée aux ions sont principalement les **tensions d'accélération** et la **pression de gaz dans l'interface** de l'instrument (cf Chapitre II, 4) :

- ▶ Les **tensions d'accélération** permettent d'augmenter l'énergie cinétique des ions, qui, lors des collisions avec les molécules de gaz, est convertie en énergie interne. Ainsi, en augmentant les tensions d'accélération, les ions subissent des collisions plus énergétiques contribuant à augmenter leur énergie interne et favorisant ainsi la désolvatation puis la dissociation des complexes non-covalents (figure 4a).
- ▶ La **pression dans l'interface** permet de moduler le libre parcours moyen des ions. Ainsi, une augmentation de la pression entraîne une diminution de la distance d'accélération et donc de l'énergie cinétique acquise entre deux chocs consécutifs. Par conséquent, à pression élevée, les ions subissent des collisions, certes plus fréquentes, mais d'énergie suffisamment basse pour maintenir l'intégrité des complexes non-covalents (figure 4b).^{136, 140, 141}

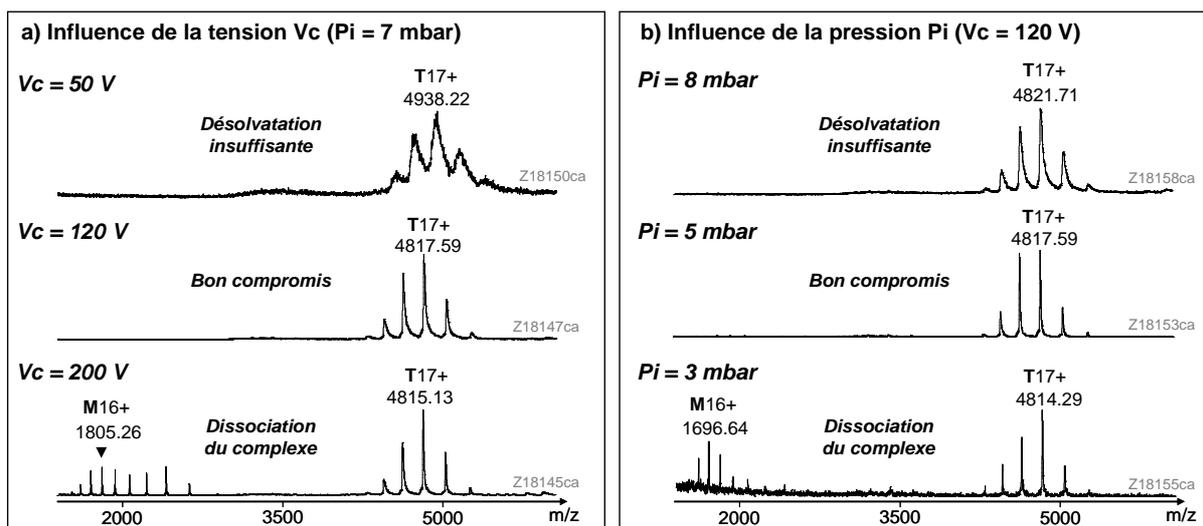


Figure 4 : Influence de la tension V_c et de la pression P_i (LCT). Analyse de Trml (tRNA(m1A58)-methyltransferase) à 20 μ M en tétramère (NH_4HCO_3 200 mM pH 8). T = tétramère (115512 ± 10 Da) ; M = monomère (28868 ± 1 Da).

A titre d'exemple dans le cas du LCT, la figure 4a illustre l'effet de la tension d'accélération V_c et de la pression dans l'interface P_i pour la détection d'un complexe protéique. A pression fixe, l'augmentation de la tension V_c favorise la désolvatation des ions comme en témoigne l'affinement des pics. Cependant, pour une valeur suffisamment élevée ($V_c = 200$ V), le spectre de masse laisse apparaître le monomère de protéine provenant de la dissociation du tétramère. A tension d'accélération fixe (figure 4b), une diminution de la pression P_i permet d'améliorer la désolvatation des pics mais provoque une dissociation partielle du tétramère en monomère lorsque la pression est suffisamment basse (3 mbar). Des valeurs intermédiaires de pression et de tension permettent alors d'obtenir des spectres de masse de qualité sans pour autant provoquer la dissociation de l'édifice supramoléculaire.

b) Comparaison de l'interface des différents instruments

En MS supramoléculaire, des expériences de CID des complexes peuvent être mises en œuvre pour accéder à des informations sur la nature des interactions non-covalentes, ou encore sur la topologie d'édifices non-covalents (cf. 2.2). Pour cela, la dissociation des complexes peut être provoquée en ajustant la tension V_c et la pression P_i dans le cas du LCT (cf. page 35), les tensions ISCID, IE et CE dans le cas du MicrOTOF-Q (cf. page 36) et la pression bP et les tensions V_c , Trap Bias, Trap CE et Transfer CE dans le cas du Synapt HDMS (cf. page 37).

Dans l'objectif de comparer l'interface de ces instruments, des expériences de CID ont été réalisées sur un système protéine / ligand, en évaluant pour cela le pourcentage de dissociation du complexe en fonction de la pression et de la tension d'accélération dans la première zone de pompage de l'interface. La figure 5 met premièrement en évidence que pour un instrument donné, la **dissociation du complexe intervient pour des valeurs de tension plus élevées lorsque la pression dans l'interface augmente**, illustrant ainsi les explications précédentes (cf. 1.2.1 a)).

En comparant ensuite les résultats obtenus d'un instrument à l'autre, il apparaît clairement que pour une pression donnée, **l'interface du Synapt HDMS est plus « douce » que celle du LCT**. En effet, en particulier à une pression de 6,5 mbar, la dissociation du complexe protéine / ligand intervient pour des valeurs de tension V_c plus élevées dans le cas du Synapt HDMS. En ce qui concerne le MicrOTOF-Q, il se positionne au niveau du LCT fonctionnant à 6,5 mbar. L'ajout d'une vanne de régulation permettant de moduler la pression dans la première zone de pompage du MicrOTOF-Q contribuerait potentiellement à rendre cette interface particulièrement « douce ». En conclusion, ces résultats montrent que **les interfaces de ces différents instruments ne sont pas identiques d'un point de vue énergétique**. Les résultats de cette comparaison sont bien évidemment à prendre en considération dans le choix de l'instrument, en particulier lorsque des complexes peu stables en phase gazeuse sont à étudier.

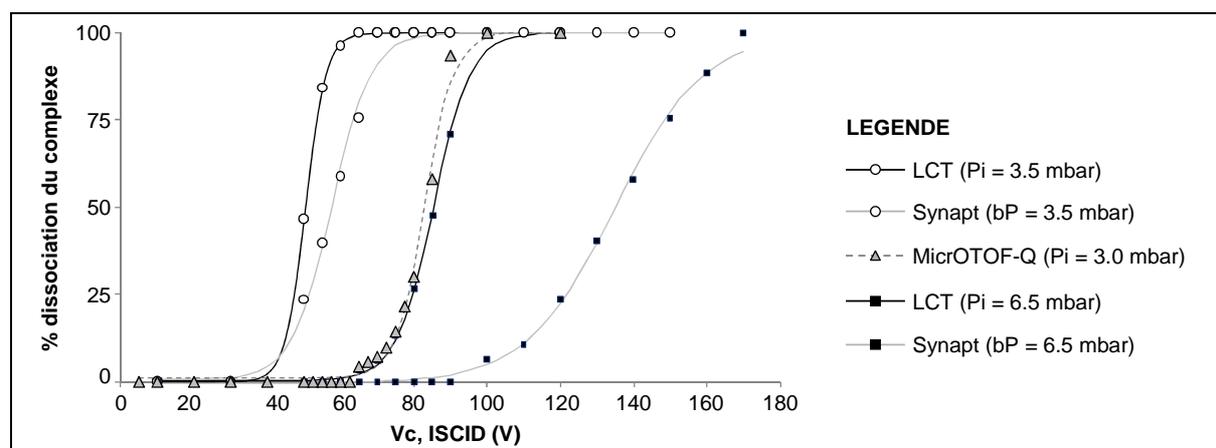


Figure 5 : Comparaison de la dissociation d'un complexe protéine / ligand dans l'interface du LCT, du MicrOTOF-Q et du Synapt HDMS. Evolution du pourcentage de dissociation du complexe 1:1 Aldose réductase : IDD 388 (état de charge 11+) en fonction de la tension d'accélération et de la pression dans la première zone de pompage des différents instruments du laboratoire.

1.2.2) Transmission des ions de hauts rapports m/z

a) Influence des tensions d'accélération et de la pression dans l'interface

Les tensions d'accélération et les pressions dans l'interface jouent également un rôle crucial en MS supramoléculaire pour la transmission des ions au sein de l'instrument. En effet, les ions de hauts rapports m/z nécessitent l'application de **tensions d'accélération suffisamment importantes** pour leur communiquer **l'énergie cinétique nécessaire à leur transmission** dans la direction souhaitée. La figure 6a montre en effet qu'une augmentation de la tension V_c du LCT permet d'améliorer la transmission des ions correspondant à un complexe de plus de 100 kDa. Pour des échantillons de masse plus faible (< 20-30 kDa), la transmission des ions passe généralement par un maximum avant de décroître pour les hautes valeurs de la tension V_c qui est ajustable entre 0-200 V.

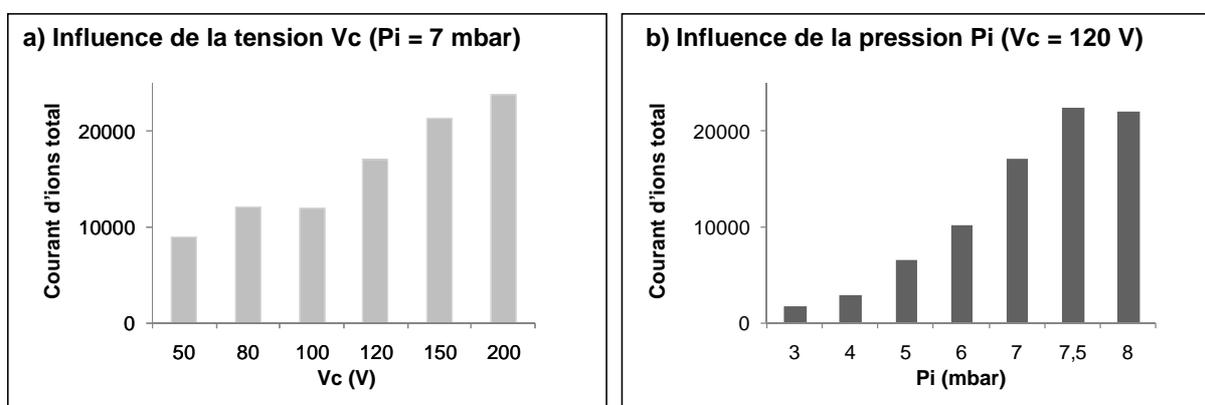


Figure 6 : Influence de la tension V_c et de la pression P_i sur la transmission des ions de hauts rapports m/z. Analyse de Trml à 20 μ M en tétramère dans un tampon NH_4HCO_3 200 mM pH 8,0. Le courant d'ions total a été moyenné sur 10 scans de 4 s.

La pression dans l'interface est, quant à elle, très importante également. En plus de favoriser le maintien des interactions non-covalentes en phase gazeuse (cf. 1.2.1), une **augmentation de la pression permet également d'améliorer la transmission des ions de hauts rapports m/z** (figure 6b). En effet, lors du passage de la source à l'interface, les ions acquièrent des vitesses de plusieurs centaines de m/s sous l'effet du phénomène de succion généré par la différence de pression entre les deux zones.¹³⁸ Les ions de hautes masses acquièrent ainsi des énergies cinétiques particulièrement importantes et il devient ainsi nécessaire de les **thermaliser** par augmentation de la pression dans l'interface (cf. Chapitre II, 3.2.5) afin de faciliter leur focalisation dans les guides d'ions et d'améliorer donc leur transmission dans l'instrument. L'importance de la pression pour la focalisation des ions dans un quadrupôle est illustrée par la figure 7. Il apparaît effectivement que la focalisation d'ions de hauts rapports m/z nécessite l'utilisation de pressions plus élevées.

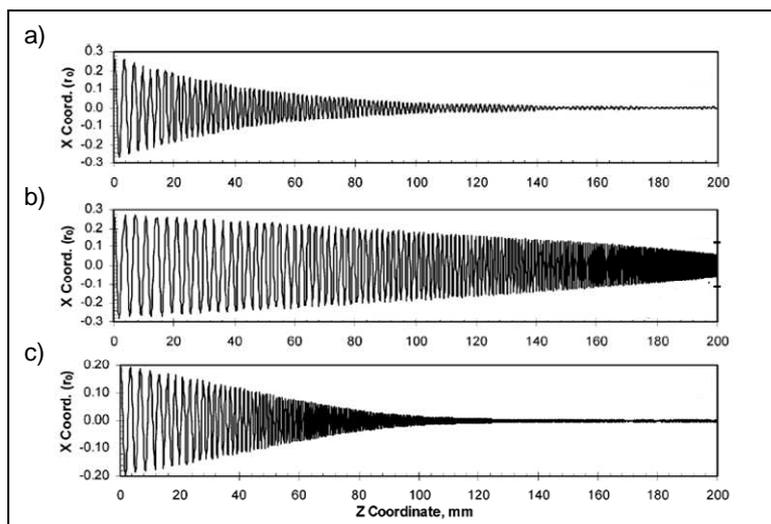


Figure 7 : Influence de la pression sur la trajectoire simulée d'ions de différents rapports m/z dans un quadrupôle. (a) Ion de myoglobine (16951 Da, $\Omega = 2520 \text{ \AA}^2$) à une pression de $1,1 \cdot 10^{-2}$ mbar. (b) Ion de protéasome 20S (692 kDa, $\Omega = 19400 \text{ \AA}^2$) à une pression de $1,1 \cdot 10^{-2}$ mbar. (c) Ion de protéasome 20S (692 kDa, $\Omega = 19400 \text{ \AA}^2$) à une pression de $3,9 \cdot 10^{-2}$ mbar. D'après ¹³⁸.

b) Optimisation des paramètres de transmission des guides d'ions

Dans le précédent chapitre, il a été mentionné qu'un quadrupôle fonctionnant en mode *RF-only* ne permet pas de transmettre les ions avec la même efficacité sur une large gamme de rapports m/z (cf. Chapitre II, 3.2.2). En effet, à une **radiofréquence d'amplitude V** appliquée sur le quadrupôle, correspond un **optimum de transmission** à un rapport m/z noté R : vers les faibles rapports m/z , la transmission chute brutalement pour des ions de rapports m/z inférieurs à $0,8 \times R$, tandis que vers les hauts rapports m/z , elle diminue de manière progressive permettant de conserver une transmission efficace pour des ions de rapports m/z allant jusqu'à 3 à $4 \times R$ (figure 8a).¹⁵³ Cette fenêtre de transmission peut être déplacée vers les hauts rapports m/z en augmentant la valeur de tension V, au détriment cependant de la transmission des ions de faibles rapports m/z . Ainsi, en balayant plusieurs valeurs de tension V, il est possible d'obtenir une transmission homogène des ions sur une large gamme de rapports m/z (figure 8b).

Dans le cas du Synapt HDMS par exemple, on distingue ainsi les modes de fonctionnement où une valeur fixe de la tension V est appliquée (modes « Auto Fixed » et « Manual Fixed » - figure 8a), de ceux où une rampe de tension V est balayée en continu (modes « Auto Profile » et « MS Profile » - figure 8b). Afin d'illustrer l'influence des réglages du quadrupôle dans le cas de cet instrument, la figure 8 représente l'analyse en conditions non-dénaturantes d'un mélange équimolaire de deux protéines, la myoglobine (17,5 kDa) dont les ions multichargés sont détectés entre 1500 et 3000 m/z , et l'ADH dont le tétramère (148 kDa) est détecté entre 5000 et 7000 m/z . Dans le cas de la figure 8c, une radiofréquence d'amplitude fixe correspondant à une transmission optimale d'un ion de 5000 m/z a été utilisée. Il en résulte ainsi un spectre de masse où les ions de l'ADH sont détectés contrairement à ceux de la myoglobine attendus en-dessous du seuil de coupure situé à environ $0,8 \times 5000 = 4000$ m/z . En utilisant par contre une rampe de tension V, la fenêtre de transmission est ainsi élargie et les

deux protéines peuvent être détectées avec des intensités équivalentes (figure 8d). Des observations similaires peuvent être réalisées dans le cas du MicroTOF-Q. L'existence potentielle d'une telle discrimination nécessite d'être prise en compte lorsqu'il s'agit d'évaluer l'abondance relative de protéines en solution. En particulier, cela nécessite de travailler dans des **conditions instrumentales rigoureusement identiques** de sorte à pouvoir comparer des échantillons entre eux et remonter à des informations semi-quantitatives.

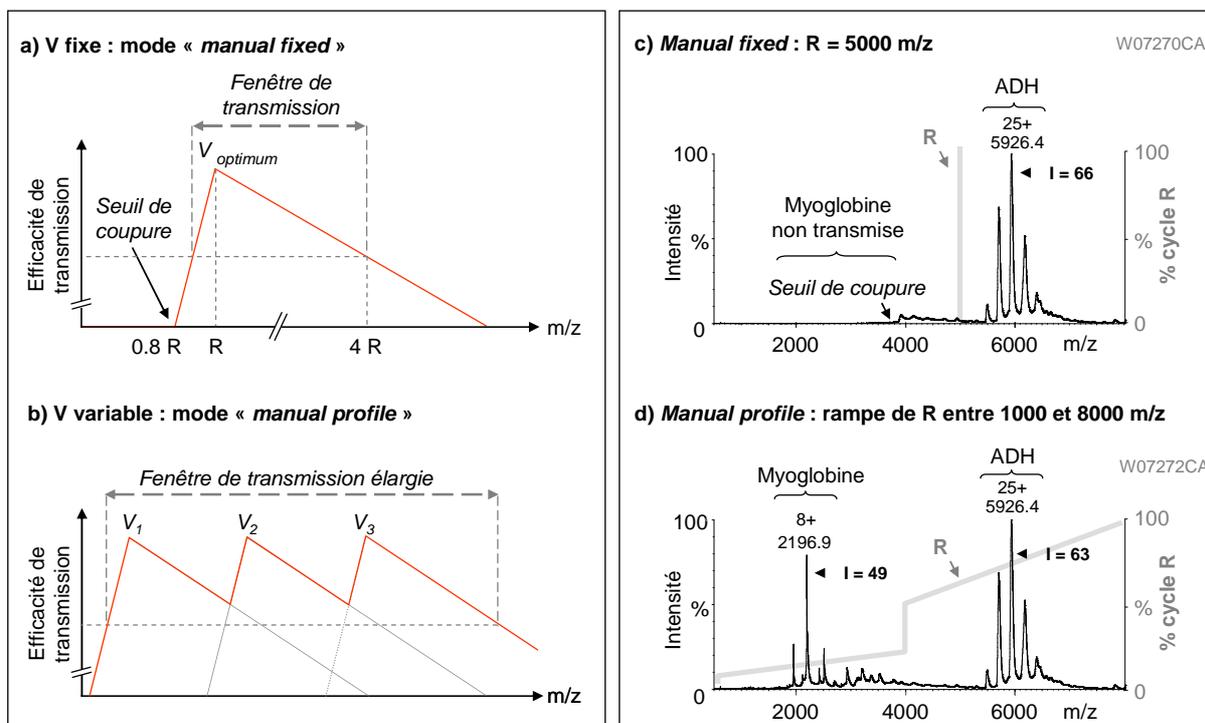


Figure 8 : Transmission des ions au sein d'un quadropôle en mode *RF-only* dans le cas du Synapt HDMS. (a, b) Evolution de la fenêtre de transmission en fonction d'une radiofréquence d'amplitude V (a) fixe ou (b) variable. (c, d) Influence de la tension V sur le spectre de masse d'un mélange de myoglobine de cœur de cheval (3 μ M, 17568 Da) et d'alcool déshydrogénase (ADH) de *S. cerevisiae* (3 μ M, 147800 Da) dans un tampon NH_4Ac 150 mM pH 6,8. Superposée aux spectres de masse, figure l'évolution de l'optimum de transmission R, qui est soit (c) fixé à 5000 m/z, soit (d) variable selon une rampe allant de 1000 à 8000 m/z.

NB : Concernant les multipôles d'ordre supérieur ainsi que les guides d'ions de type *SRIG* ou *ion funnel*, il a été constaté durant ce travail de thèse que l'amplitude de la radiofréquence a une influence nettement moins marquée que dans le cas des quadropôles, et que l'augmentation de cette valeur n'entraîne qu'une amélioration sensible de la transmission des ions de hauts rapports m/z.

1.2.3) Conclusions concernant les optimisations instrumentales

La conclusion qui découle des explications fournies ci-dessus est que l'analyse de complexes non-covalents nécessite une optimisation visant à trouver le meilleur compromis entre la **désolvatation** des ions en phase gazeuse, leur **transmission** au sein de l'instrument et le **maintien de l'intégrité structurale** des édifices supramoléculaires. Pour atteindre cet objectif, les paramètres instrumentaux qu'il convient d'ajuster finement sont principalement la **pression** dans la première zone de pompage

de l'interface des spectromètres de masse, ainsi que les **tensions d'accélération** des ions appliquées sur leur trajet de la source à l'analyseur (figure 9).

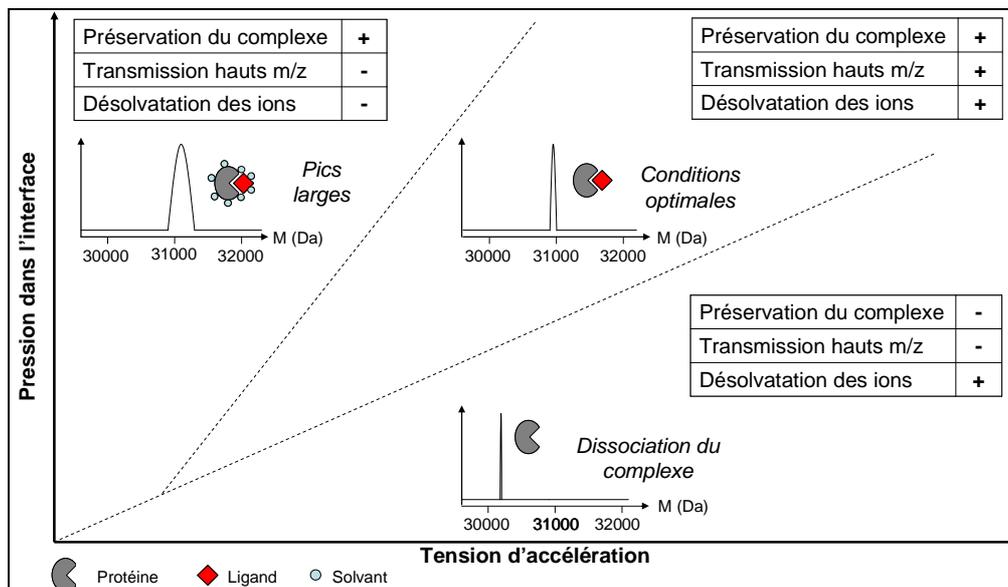


Figure 9 : Optimisation des paramètres instrumentaux en MS supramoléculaire. Adapté d'après¹⁵⁴.

2) LES INFORMATIONS EN MS SUPRAMOLECULAIRE : NATURE ET VALIDITE

De manière schématique, les données brutes disponibles sur un spectre de masse sont (i) le **rapport m/z** des pics correspondant à une information d'**identité** ainsi que (ii) l'intensité des pics représentant une information de **quantité**. Dans le contexte de la MS supramoléculaire, l'interprétation de ces données basiques nécessite d'avoir **conscience du potentiel et des limitations de la technique** liés aux changements qui s'opèrent lors de la transition de la solution à la phase gazeuse. En effet, le transfert d'un complexe biologique vers un milieu sans solvant n'est pas une étape anodine et justifie de s'interroger en tout premier lieu sur l'**adéquation entre mesures en phase gazeuse et propriétés en solution**. Cette étape préliminaire est essentielle pour réaliser une interprétation juste et approfondie des spectres de masse.

2.1) L'adéquation entre mesures en phase gazeuse et propriétés en solution

2.1.1) De la solution à la phase gazeuse : changements et conséquences

a) Energie des interactions non-covalentes

La nécessité de maintenir les édifices supramoléculaires intacts lors de l'analyse ESI-MS en conditions non-dénaturantes soulève premièrement la question de la stabilité des interactions non-covalentes en phase gazeuse. En effet, le passage de la solution vers un milieu sans solvant s'accompagne d'une modification de l'énergie de certaines interactions. En particulier, les interactions de **nature électrostatique (ioniques, Van der Waals, hydrogène) sont renforcées** en absence de solvant, en raison notamment de la permittivité relative du milieu qui passe de 80 dans l'eau à 1 dans

le vide.^{12, 13, 155} Par contre, en raison de l'absence d'eau, **l'effet hydrophobe** est quant à lui **inexistant en phase gazeuse**.¹⁰⁵ Par conséquent, **la stabilité en phase gazeuse d'un complexe non-covalent n'est pas directement liée à sa stabilité en solution**. D'autre part, ces modifications impliquent que des conditions instrumentales particulièrement douces soient appliquées pour l'analyse de partenaires dont l'association en solution résulte principalement de l'effet hydrophobe.¹⁴⁰

b) Conformation des protéines en phase gazeuse

Le rôle essentiel du solvant dans le repliement des protéines mène naturellement à la question du devenir de la conformation des biomolécules lors du passage en phase gazeuse. Différentes techniques telles que l'échange hydrogène / deutérium en phase gazeuse,^{156, 157} ou bien encore la mobilité ionique,^{158, 159} ont été mises en œuvre pour aborder cette question qui fait aujourd'hui encore l'objet de nombreuses investigations.

De manière intéressante, il a été montré expérimentalement que des éléments de structures secondaires (hélice α) peuvent être préservés en phase gazeuse.¹⁶⁰ Plus surprenant encore, les travaux du groupe de Siuzdak ont démontré que des virus transférés en phase gazeuse via une source ESI peuvent conserver une conformation compacte en phase gazeuse, et qu'une fois collectés puis remis en suspension, ils conservent également leur activité.^{161, 162} Le groupe de Clemmer a, quant à lui, illustré dans le cas d'une protéine (cytochrome C), la possibilité de conserver une structure compacte en phase gazeuse pendant une durée de 30 ms avant d'entamer une série de changements conformationnels.¹⁶³ L'évolution en fonction du temps de la structure native d'une protéine en phase gazeuse a été décrite récemment par Breuker et McLafferty dans une revue reprenant une série de résultats expérimentaux et de simulations de dynamique moléculaire.¹⁶⁴ Il apparaît ainsi que des changements structuraux mineurs interviennent quelques picosecondes après la désolvatation de la biomolécule et sont suivis de modifications plus importantes ayant lieu plusieurs millisecondes plus tard.

Ces études indiquent ainsi que des protéines transférées en phase gazeuse dans des **conditions relativement douces**, sont capables de **conserver au moins une partie de leur structure tridimensionnelle** pendant plusieurs millisecondes, une échelle de temps du même ordre de grandeur que celle correspondant au transit des ions de la source au détecteur du spectromètre de masse.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Il apparaît donc possible de remonter à des informations sur la conformation des protéines en solution à partir de mesures en phase gazeuse.

2.1.2) Spécificité des complexes détectés en phase gazeuse

La question de la spécificité des complexes détectés en phase gazeuse est un point crucial sur lequel repose toute la confiance pouvant être accordée aux résultats de MS supramoléculaire. Il s'agit par conséquent de s'assurer que :

- ▶ **Les complexes présents en solution soient détectés** : il s'agit là de l'objectif de tout le travail d'optimisation des conditions expérimentales et instrumentales décrit précédemment dans ce chapitre et visant à préserver l'intégrité des édifices non-covalents pendant l'analyse en phase gazeuse (cf. 1).
- ▶ **Les complexes détectés soient présents en solution** : il convient pour cela de procéder de manière systématique à des **expériences de contrôle** visant à s'assurer que les complexes présents sur le spectre de masse résultent bel et bien d'une association spécifique en solution et non pas d'un artefact quelconque de la technique.

Concernant ce second point, la simple mesure de masse d'un complexe ne permet pas en effet d'exclure la possibilité qu'il provienne d'une agrégation non-spécifique en solution et/ou durant le processus ESI.^{167, 168} Différentes stratégies peuvent cependant être mises en œuvre pour distinguer une interaction spécifique d'une interaction non-spécifique :^{168, 169}

- ▶ La détection d'un complexe avec une **stœchiométrie unique** constitue une première indication de la spécificité d'une interaction en opposition à une interaction non-spécifique pour laquelle une fixation aléatoire d'un ligand conduit à une **distribution statistique** des complexes.^{168, 170}
- ▶ Dans le cas d'une interaction spécifique, une **modification des conditions en solution est sensée être reflétée sur le spectre de masse**. Par exemple, la spécificité d'une interaction peut être confirmée en vérifiant qu'une modification du pH ou de la force ionique du tampon influence l'intensité relative et/ou la stœchiométrie du complexe.¹⁶⁸
- ▶ Lorsque qu'un **ligand de référence** est disponible, il est possible de réaliser des expériences de **compétition** avec d'autres ligands supposés cibler le même site de fixation de la protéine cible. L'absence de complexes mixtes incluant la protéine et les deux ligands, prouve la capacité du ligand de référence à chasser le ligand à tester du site de fixation de la protéine (ou vice-versa) et constitue ainsi un moyen efficace de prouver la spécificité d'un complexe. Dans le cas contraire, la non-spécificité de l'interaction est à envisager mais l'existence d'un autre site de fixation n'est pas pour autant à exclure.
- ▶ L'utilisation de **partenaires modifiés chimiquement** est également possible. En effet, une petite modification de l'un des partenaires (protéine mutée, ligand isomère, ...) entraînant un changement radical de la stœchiométrie ou de l'intensité relative du complexe est un puissant moyen pour démontrer la spécificité d'un complexe.¹⁶⁸

En résumé, l'utilisation de **paramètres expérimentaux et instrumentaux soigneusement sélectionnés**, ainsi que la réalisation d'**expériences de contrôle** sont des étapes clés pour déterminer de manière fiable les caractéristiques d'un complexe en solution à partir de mesures en phase gazeuse.

2.1.3) La quantification des espèces sur un spectre de masse

Le problème de la quantification des espèces détectées sur un spectre de masse ESI se pose tout particulièrement en MS supramoléculaire lorsqu'il s'agit d'évaluer l'affinité d'un complexe non-covalent. En effet, les différentes étapes de l'analyse ESI-MS (ionisation, transmission, analyse, détection) sont susceptibles d'introduire un biais et il est donc légitime de se poser la question de savoir si l'intensité relative de deux espèces sur un spectre de masse est égale à leur abondance relative en solution. Cette question induit cinq autres questions sous-jacentes :

- ▶ **L'équilibre en solution est-il maintenu lors du processus ESI ?** Il s'agit là d'une question fondamentale à laquelle une réponse négative entraînerait une quasi-impossibilité de déduire des informations quantitatives sur les équilibres en solution. Les travaux des groupes de Kebarle et de Zenobi évoqués au chapitre précédent indiquent cependant que le processus ESI ne provoque pas de distorsions des équilibres en solution (cf. Chapitre II, 3.1.2).
- ▶ **Les différentes espèces sont-elles ionisées avec la même efficacité ?** Les caractéristiques du processus ESI implique une ionisation préférentielle des analytes portant des charges permanentes et des groupements ionisables (ex : groupement amine). L'efficacité d'ionisation augmente également pour les analytes présentant une importante activité de surface grâce à la présence de groupements hydrophobes (cf. Chapitre II, 3.1.2).
- ▶ **Les complexes sont-ils maintenus intacts en phase gazeuse ?** Pour respecter cette condition, il convient d'utiliser des paramètres instrumentaux suffisamment « doux » pour qu'aucune dissociation du complexe ne se produise en phase gazeuse (cf. Chapitre III, 1.2.1).
- ▶ **Les différentes espèces sont-elles transmises avec la même efficacité ?** Les réglages instrumentaux (pressions, tensions d'accélération, radiofréquences) jouent clairement un rôle discriminant dans la transmission des ions de masses et de charges très différentes (cf. Chapitre III, 1.2.2).
- ▶ **Les différentes espèces sont-elles détectées avec la même efficacité ?** Les caractéristiques du détecteur MCP introduisent potentiellement une discrimination supplémentaire en raison d'une détection préférentielle des ions de faibles rapports m/z (cf. Chapitre II, 3.4).

Ainsi, lors de l'évaluation de l'abondance des espèces en solution, il est important de prendre en considération l'existence de ces sources de discrimination potentielles qui sont capables de modifier le **facteur réponse** des analytes, en particulier lorsque les espèces à comparer ont des **masses et des charges différentes**.¹⁷¹ De manière pratique, il est généralement admis que la fixation d'un ligand de faible masse sur une protéine de masse élevée n'altère ni son rendement d'ionisation, ni son efficacité de transmission et de détection : les intensités relatives du complexe et de la protéine libre sont ainsi considérées comme égales à leurs abondances relatives en solution.⁹⁵ Alternativement, il a été proposé dans certains travaux d'évaluer et de tenir compte du facteur réponse des espèces en équilibre afin de les quantifier plus justement.¹⁷¹⁻¹⁷⁴

2.2) Nature des informations recueillies en MS supramoléculaire

2.2.1) Stœchiométries d'interaction et états d'oligomérisation

La stœchiométrie d'interaction entre les différents partenaires d'un complexe est une information cruciale pour la caractérisation d'édifices biologiques non-covalents. En MS supramoléculaire, la détermination d'une stœchiométrie d'interaction fait appel à une stratégie en deux étapes :

- ▶ Une première mesure de masse du complexe est réalisée en **conditions dénaturantes**, c'est-à-dire dans un solvant organique, acide, provoquant la rupture des interactions non-covalentes. Cette première étape permet ainsi de mesurer la masse des partenaires du complexe pris individuellement (figure 10, étape ①).
- ▶ Dans la deuxième étape, la masse du complexe entier est mesurée en **conditions non-dénaturantes** (figure 10, étape ②), permettant ainsi de déterminer l'état d'oligomérisation de la protéine ou la stœchiométrie de chaque partenaire dans le complexe (figure 10, étape ③).

Finalement, en plus de l'information de stœchiométrie, ces deux expériences permettent également de vérifier que les interactions entre les partenaires d'un complexe sont bel et bien non-covalentes, car uniquement détectées en conditions non-dénaturantes.

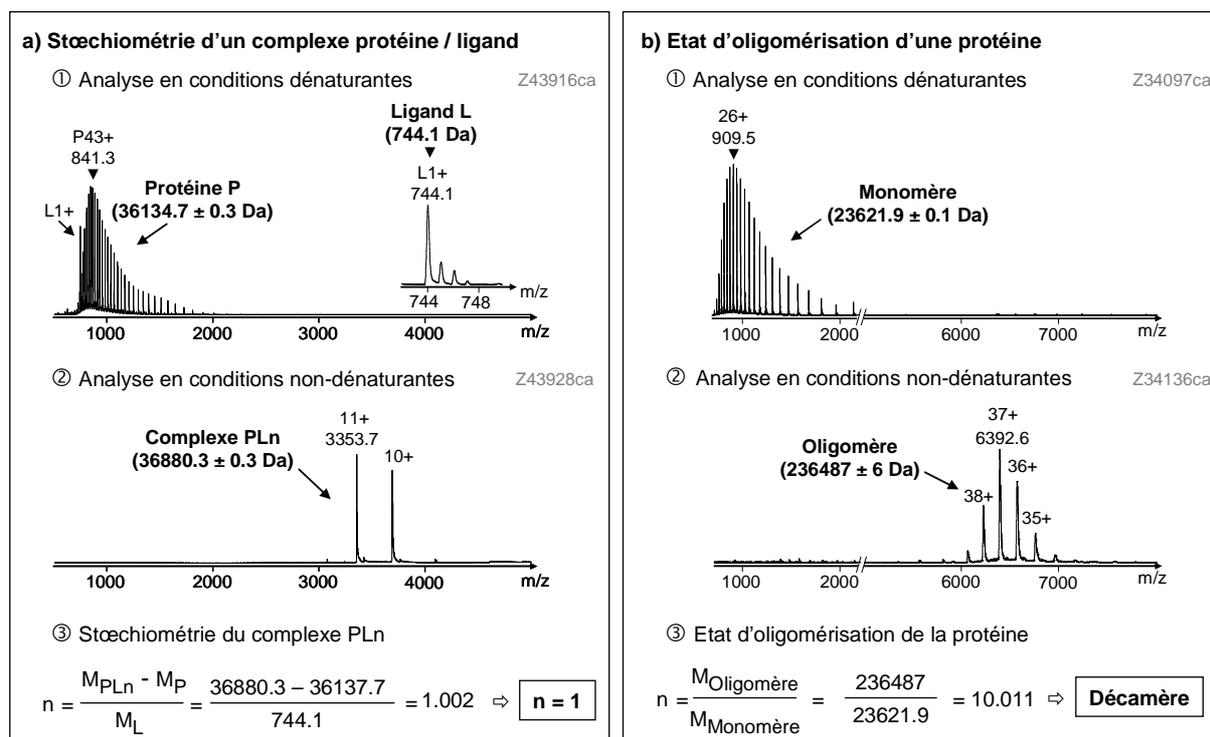


Figure 10 : Détermination de la stœchiométrie d'interaction d'un complexe protéine / ligand et de l'état d'oligomérisation d'une protéine. (a) Analyse du complexe formé entre l'AR et son co-facteur (NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) dilué à 3 µM soit dans un mélange eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1 (①), soit dans un tampon NH₄Ac 10 mM pH 6,8 (②). (b) Analyse de Prx (peroxirédoxine) à 10 µM en monomère soit dans un mélange eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1 (①), soit dans un tampon NH₄Ac 150 mM pH 6,8 (②).

La MS supramoléculaire dispose de plusieurs avantages en comparaison à d'autres techniques biophysiques permettant de remonter à ce type d'information. En effet, la **précision** sur la mesure de masse des complexes est généralement inférieure à 0,01% permettant ainsi de déterminer les **stœchiométries sans ambiguïté**. De plus, la MS supramoléculaire offre la possibilité de **visualiser** toutes les espèces ionisables présentes en solution de manière **directe** et **simultanée**, et représente donc un outil particulièrement bien adaptée dans les cas où **plusieurs espèces en équilibre** sont présentes en solution.

2.2.2) Evaluation de l'affinité des complexes

En MS supramoléculaire, deux stratégies sont généralement mises en œuvre pour évaluer l'affinité des complexes non-covalents :^{175, 176}

- ▶ **Les expériences de titrage** consistent à augmenter progressivement la concentration de l'un des partenaires du complexe tout en conservant la concentration de l'autre partenaire constante. En suivant ainsi l'évolution de la concentration de complexe, il est possible de remonter aux constantes d'affinité (K_a) et de dissociation (K_d) à partir de la loi d'action des masses (figure 11).
- ▶ **Les expériences de compétition** consistent à incuber la protéine en présence de plusieurs ligands en compétition pour le même site de fixation. L'abondance de chaque complexe permet alors d'établir un classement des ligands par ordre d'affinité. Cette approche est également utilisée dans certains cas pour déterminer des constantes de dissociation.^{177, 178}

A noter cependant que la validité de ces deux approches repose sur la possibilité de quantifier des espèces en solution à partir de l'intensité des pics sur le spectre de masse (cf. 2.1.3). Un autre point important à considérer concerne la **gamme de constantes de dissociation accessibles** en MS supramoléculaire. Dans le cas de l'analyse de complexes biologiques de hautes masses moléculaires, la sensibilité actuelle des instruments ESI-TOF et ESI-Q-TOF permet généralement de travailler avec des concentrations de protéines de l'ordre de 1 à 100 μM et des concentrations de ligands généralement inférieures à 1000 μM . De ce fait, la MS supramoléculaire est une technique généralement bien adaptée à l'évaluation de l'affinité de complexes dont les constantes de dissociation s'étendent de 10^{-7} à 10^{-3} M (figure 11).^{179, 180} En dessous de 10^{-7} M, la gamme de concentrations imposées par la technique ne permet plus d'évaluer de manière suffisamment précise les proportions de partenaires libres et complexés, tandis que pour des constantes de dissociation supérieures à 10^{-3} M, la proportion de complexe formé devient trop faible.

Finalement, en comparaison à d'autres techniques également basées sur la mesure de masse et/ou de taille (ex : chromatographie d'exclusion stérique, retard sur gel), la MS supramoléculaire affiche une **résolution en masse nettement supérieure** permettant de distinguer des espèces de masses très proches. Associée à la gamme de constantes de dissociation accessibles, cette caractéristique de la technique fait de la MS supramoléculaire un outil en plein essor pour assister l'élaboration de

ligands par **criblage de fragments moléculaires** de faibles masses et de faibles affinités (cf. Partie II, Chapitre II).^{17, 181, 182}

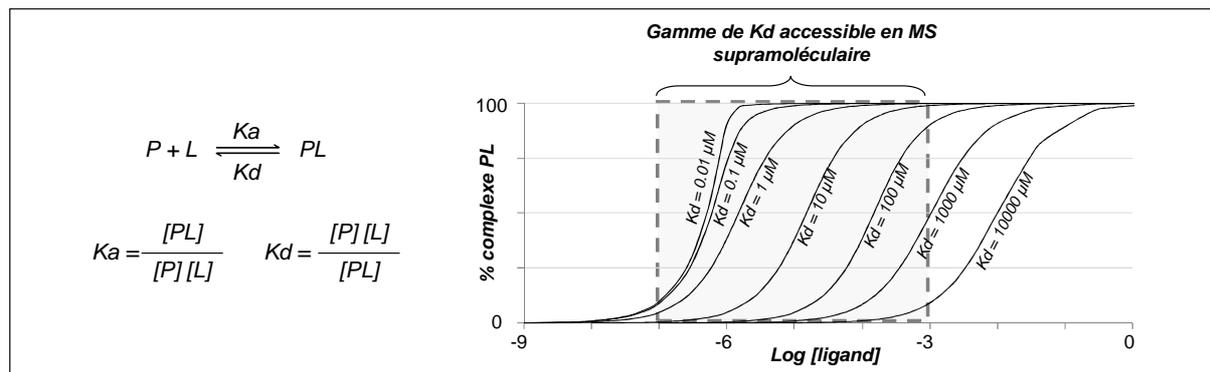


Figure 11 : Gamme de constantes de dissociation accessibles en MS supramoléculaire. Evaluation du pourcentage de complexe formé lors d'un titrage d'une protéine P par un ligand L pour différentes constantes de dissociation K_d . La concentration en protéine a été fixée à la valeur du K_d lorsque celle-ci est comprise entre 1 et 100 μM . En dehors de ces limites, la concentration en protéine a été fixée soit à 1 μM ($K_d = 0,01 \mu\text{M}$ et $K_d = 0,1 \mu\text{M}$) ou à 100 μM ($K_d = 1000 \mu\text{M}$ et $K_d = 10000 \mu\text{M}$). L'axe des abscisses représente le logarithme décimal de la concentration en ligand exprimée en mol/l.

2.2.3) Cinétique de formation des complexes non-covalents

En plus de fournir des données thermodynamiques, la MS supramoléculaire permet également de suivre dans le temps la formation de complexes non-covalents, et d'étudier ainsi la cinétique d'équilibres chimiques en solution. La plupart des études cinétiques réalisées par MS supramoléculaire concerne la formation d'édifices multiprotéiques,^{108, 183, 184} ainsi que la dynamique d'échange des sous-unités protéiques constituant de tels complexes.^{8, 185} Deux conditions doivent être respectées pour rendre de telles études faisables :

- ▶ **Les masses des produits, réactifs et intermédiaires** impliqués dans l'équilibre réactionnel doivent être **suffisamment différentes** pour être distingués sur le spectre de masse. Pour respecter cette condition dans le cas particulier de la dynamique d'échange de sous-unités, les différentes stratégies pouvant être mises en œuvre sont l'utilisation de protéines homologues,¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ de formes variantes (mutées, tronquées, etc.) d'une même protéine,^{188, 189} ou encore de protéines modifiées par un marquage isotopique.^{188, 190}
- ▶ **L'échelle de temps de la réaction doit être compatible avec la technique.** Concernant ce second point, des temps de plusieurs dizaines de secondes, voire de plusieurs minutes permettent de travailler confortablement avec des systèmes d'infusion conventionnels. Cependant, l'utilisation de chambres de mélange rapide permet d'atteindre des temps réactionnels de l'ordre de la milliseconde.^{183, 191}

A noter par ailleurs que les études visant à déterminer des constantes cinétiques reposent également sur la possibilité de quantifier les espèces à partir des spectres de masse (cf. 2.1.3). Dans le cas de

l'étude de la dynamique d'échange des sous-unités d'un oligomère protéique, les protéines échangées ayant des séquences en acides aminés similaires (en particulier lorsqu'elles ne diffèrent que par le marquage isotopique), il est généralement admis que les complexes formés disposent d'un facteur réponse identique.¹⁸⁵⁻¹⁸⁹ Alternativement, une méthode permettant de déterminer des facteurs réponses pour l'évaluation corrigée de constantes cinétiques a été rapportée et illustrée récemment par la suivi de la formation d'un duplex d'ADN.¹⁷⁴

2.2.4) Etude de la dynamique structurale de protéines et de complexes non-covalents

L'étude de la dynamique structurale d'édifices supramoléculaires par MS consiste à suivre les **changements intervenant au niveau de la structure tertiaire et quaternaire des protéines sous l'effet de différents stimuli**, tels qu'un changement de pH, de température ou encore lors de la fixation de petits ligands (métaux, cofacteurs, etc.).^{8, 192}

Concernant premièrement les **changements de structure quaternaire qui s'accompagnent d'une modification de la stœchiométrie des complexes**, ils peuvent être mis en évidence en suivant l'évolution de la masse du complexe en réponse au stimulus. Cette approche a par exemple permis d'étudier l'effet de ligands agonistes ou antagonistes sur la stabilité de complexes de récepteurs nucléaires.^{193, 194} Dans une autre étude menée au laboratoire, il a été montré de cette manière que sous l'effet d'un changement de pH, le passage de l'activité kinase à l'activité phosphatase de l'enzyme HPrK/P s'accompagne d'un changement d'état d'oligomérisation de la protéine.¹⁹⁵ D'autres exemples seront également décrits dans la suite du manuscrit dans le cas d'interactions protéine / protéine (cf. Partie II, Chapitre III et Partie IV, Chapitre III), ainsi que protéine / oligonucléotide (cf. Partie III, Chapitre II et Partie IV, Chapitre III).

Concernant l'étude des **changements structuraux qui affectent la conformation des protéines et des complexes non-covalents sans en changer la masse**, les stratégies couramment utilisées sont présentées ci-dessous.

a) Etude de la conformation des protéines en solution

La formation d'un complexe non-covalent en solution est le résultat d'une complémentarité **stérique et interactionnelle** entre les différents partenaires.¹¹ La structure tridimensionnelle d'une protéine joue donc un rôle essentiel dans le processus de reconnaissance moléculaire conduisant à la formation d'édifices biologiques supramoléculaires. Différentes techniques faisant appel à la MS peuvent être mises en œuvre pour étudier la conformation des protéines en solution.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

Parmi ces techniques, l'analyse de la **distribution des états de charge** constitue le moyen le plus direct.⁸⁵ En effet, selon le mécanisme de protonation évoqué au chapitre précédent (cf. Chapitre II, 3.1.2), l'ionisation des protéines se fait par attachement de protons sur les résidus « protonables » accessibles. Or, l'accessibilité d'un résidu dépend de l'état de repliement de la protéine : une protéine **dénaturée** ayant une structure dépliée sera détectée avec une **distribution des états de charge large** et avec un **nombre élevé de charges** (figure 10a, étape ①), alors qu'une protéine **native** ayant

une conformation compacte sera détectée avec une **distribution des états de charge étroite** et centrée sur de **faibles valeurs de charge** (figure 10a, étape ②). La distribution des états de charge observée en ESI-MS permet donc de sonder la conformation globale de protéines en solution, et bien que la résolution structurale soit nettement inférieure à celles des structures cristallographiques, cette méthode présente l'avantage de pouvoir étudier facilement des mélanges hétérogènes où différentes conformations sont en équilibre.^{85, 200, 201}

Afin d'obtenir des informations plus détaillées concernant la conformation des protéines en solution, il est possible de faire appel à des **techniques de marquage**, telles que l'échange hydrogène / deutérium,^{202, 203} ou le marquage par oxydation radicalaire.²⁰⁴⁻²⁰⁷ Le principe de ces approches consiste à modifier chimiquement les résidus réactifs situés en surface de la protéine, puis de procéder à une digestion enzymatique suivie de l'identification des résidus marqués par MS. Ces stratégies permettent d'étudier non seulement la structure secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines, mais permettent également de suivre la dynamique conformationnelle d'édifices protéiques en solution.

b) Etude de la conformation des protéines en phase gazeuse

La conformation des protéines en phase gazeuse a déjà fait l'objet d'une discussion dans ce chapitre (cf. 2.1.1)b)) et, de manière intéressante, il a été mentionné qu'au moins une partie de la structure tridimensionnelle des biomolécules peut être préservée lors de l'analyse en phase gazeuse. Ainsi, la **spectrométrie de mobilité ionique (IMS)**, qui permet de mesurer la **section efficace des ions en phase gazeuse** (cf. Chapitre II, 3.2.5), est capable de fournir des informations cruciales sur la **conformation des protéines et des complexes en solution**,²⁰⁸⁻²¹¹ et plus particulièrement sur les changements conformationnels induits par des variations de pH,²¹² par des mutations au sein des protéines,²¹² par la présence de ponts disulfures,^{213, 214} ou encore par la fixation de différents partenaires d'interaction.^{208, 215} Le potentiel du couplage IMS-MS pour l'étude de complexes non-covalents sera abordé plus en détail dans la dernière partie de ce manuscrit (cf. Partie IV).

2.2.5) Expériences de dissociation en phase gazeuse

Alors que la caractérisation d'édifices supramoléculaires requiert dans un premier temps le maintien des interactions non-covalentes en phase gazeuse, les expériences de CID visant à dissocier les complexes dans la source et/ou dans la cellule de collision du spectromètre de masse présentent également un intérêt particulier pour l'étude des complexes protéine / ligand ainsi que pour les complexes multiprotéiques.

a) Dissociation des complexes protéine / ligand – Détermination du V_{c50}

Dans le cas de complexes protéine / ligand, les expériences de CID permettent d'étudier leur stabilité en phase gazeuse. La dissociation progressive du complexe est généralement provoquée dans la source de l'instrument en augmentant pas-à-pas la tension d'accélération V_c (ou ISCID dans le cas du

MicrOTOF-Q) ; on définit alors le V_{C50} comme la valeur de tension permettant de dissocier 50% du complexe (figure 12).²¹⁶ De manière intéressante, les travaux menés par Rogniaux et coll. ont montré que les valeurs de V_{C50} permettent d'évaluer la **contribution des interactions électrostatiques** intervenant dans les complexes protéine / ligand.²¹⁶ En effet, étant donné que les interactions électrostatiques sont renforcées et l'effet hydrophobe absent dans le vide, la stabilité en phase gazeuse renseigne sur la **nature des interactions** intervenant dans le complexe : plus un complexe sera stabilisé en solution par des interactions électrostatiques (ionique, liaison hydrogène, Van der Waals), plus la valeur de V_{C50} sera élevée.²¹⁷⁻²¹⁹ A titre d'exemple, sur la figure 12, les valeurs de V_{C50} révèlent que la stabilité en phase gazeuse du complexe aldose réductase / inhibiteur est supérieure dans le cas du ligand IDD 393, indiquant une contribution des interactions électrostatiques plus importante que dans le cas du ligand IDD 388. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par microcalorimétrie ainsi que par cristallographie montrant l'implication du groupement nitro du ligand IDD 393 dans une liaison hydrogène avec la protéine.²²⁰

Il s'agit là d'un outil présentant un fort potentiel pour **assister la chimie médicinale dans l'élaboration de ligands ciblant des protéines d'intérêt thérapeutique.**

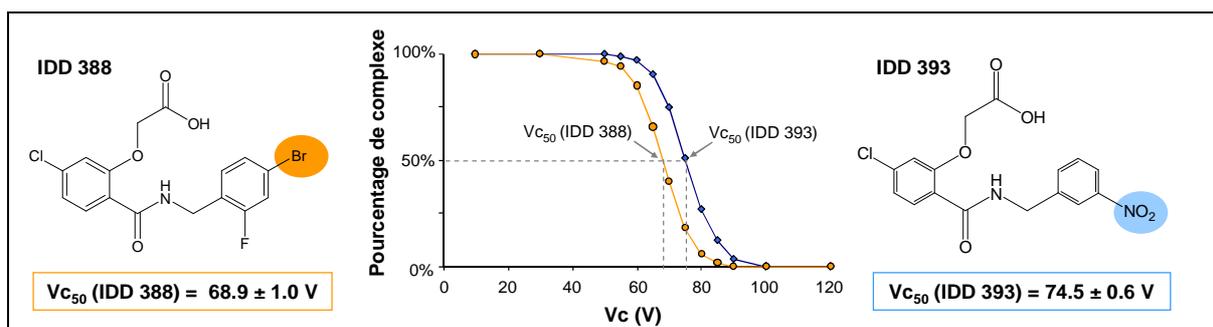


Figure 12 : Exemple de dissociation par CID de complexes protéine / ligand : détermination du V_{C50} des complexes formés entre l'aldose réductase et les inhibiteurs IDD 388 et IDD 393. L'erreur sur la détermination des valeurs de V_{C50} correspond à l'écart-type calculé sur trois mesures indépendantes du V_{C50} .

b) Dissociation des complexes multiprotéiques

Dans le cas d'édifices multiprotéiques, les expériences de CID sont généralement réalisées dans une cellule de collision afin de pouvoir atteindre les niveaux d'énergie interne nécessaires à leur dissociation. La dissociation de tels complexes se produit généralement de manière **asymétrique** : alors que le nombre total de charges reste constant, une sous-unité monomérique portant un nombre de charges élevé est éjectée, tandis que l'oligomère restant conserve un faible nombre de charges (figure 13).²²¹⁻²²⁵

En effet, dans le cas des figures 13a et 13b, la dissociation du tétramère de Trml produit un monomère et un trimère bien que la structure cristallographique corresponde à un « dimère de dimère ». ¹⁵² De même, dans le cas de Prx (figures 13c et 13d), la dissociation du décimère en phase gazeuse produit un monomère et un nonamère alors que la structure tridimensionnelle décrit cet

oligomère comme un « pentamère de dimère ».²²⁶ Il apparaît donc clairement que les produits de dissociation ne reflètent pas nécessairement la symétrie du complexe en solution.²²⁵

Cependant, dans la mesure où le mécanisme de dissociation des complexes multiprotéiques par CID implique l'éjection préférentielle des sous-unités situées en périphérie (surface) des complexes, les expériences de CID peuvent renseigner sur la **topologie** des complexes multiprotéiques.^{8, 108, 227-229} De plus, elles peuvent également être mises en œuvre pour étudier le **rôle stabilisateur** (ou déstabilisateur) que peuvent avoir des mutations, des modifications post-traductionnelles ou encore des ligands sur des édifices multiprotéiques.²³⁰⁻²³²

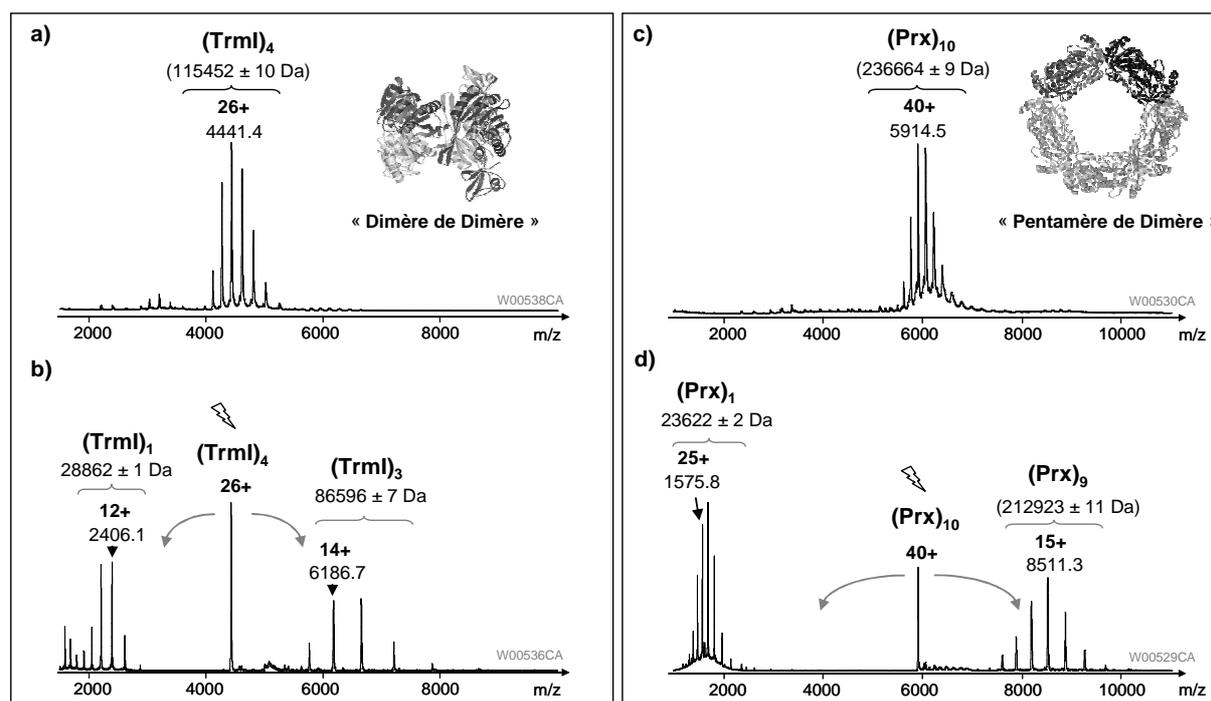


Figure 13 : Exemples de dissociation par CID de complexes multiprotéiques dans la partie *Trap* du Synapt HDMS. (a, b) Analyse de Trml (PDB : 2PWY)¹⁵² à 10 μ M en tétramère dans un tampon NH_4HCO_3 200 mM pH 8,0. (a) Analyse en mode *RF-only* sans provoquer de dissociation (*Trap* CE = 10 V). (b) Isolation de l'état de charge +26 du tétramère dans le quadropôle et fragmentation dans la partie *Trap* (*Trap* CE = 50 V). (c, d) Analyse de Prx (PDB : 1QMV)²²⁶ à 6 μ M en décimère dans un tampon NH_4Ac 150 mM pH 6,8. (c) Analyse en mode *RF-only* sans provoquer de dissociation (*Trap* CE = 6 V). (d) Isolation de l'état de charge +40 du décimère dans le quadropôle et fragmentation dans la partie *Trap* (*Trap* CE = 110 V).

2.2.6) Architecture des complexes non-covalents

Dans le cas de complexes multiprotéiques, l'information de stœchiométrie de chaque partenaire peut être complétée par des informations concernant l'**architecture** du complexe en procédant pour cela à des expériences de dissociation **des complexes en solution et en phase gazeuse**.²²⁹ La dissociation des complexes non-covalents en solution consiste à générer des sous-complexes par modification du pH, de la force ionique ou encore par ajout de solvants organiques (ex : méthanol).^{229,}

²³³⁻²³⁵ L'identité et la stœchiométrie des partenaires protéiques composant chaque sous-complexe est

ensuite déterminée par mesure de masse du complexe intact et des sous-unités générées par CID (cf. 2.2.5). Les protéines impliquées simultanément au sein de plusieurs sous-complexes constituent les « nœuds » du réseau d'interactions du complexe de départ. En croisant ainsi ces données avec les **informations topologiques** fournies par les expériences de CID, il est possible de remonter au **réseau d'interaction**, et de manière générale, à **l'architecture de l'édifice supramoléculaire**. Avec les progrès réalisés dans les stratégies de purification des biomolécules (ex : *Tandem Affinity Purification*),²³⁶⁻²³⁸ cette approche permet désormais d'étudier par **MS supramoléculaire des complexes multiprotéiques endogènes** atteignant des masses de plusieurs centaines de kDa.^{229, 233-235}

3) VALORISATION

La stratégie expérimentale présentée dans ce chapitre a fait l'objet de la publication suivante (cf. Travaux annexes) :

- ▶ **Publication** : Sanglier S, Atmanene C, Chevreux G, Van Dorsselaer A. Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. *Methods in Molecular Biology*, **2008**, 484, 217-243.

CONCLUSIONS

Au travers de cette étude bibliographique, nous avons souhaité présenter une vue d'ensemble de l'approche de MS supramoléculaire, en introduisant plus particulièrement des éléments théoriques, techniques et stratégiques utiles à la compréhension des résultats présentés dans la suite du manuscrit. Les quelques lignes qui suivent constituent un résumé succinct des principaux aspects abordés dans cette introduction.

Le potentiel actuel de la MS supramoléculaire pour l'analyse de complexes non-covalents représente tout d'abord le fruit des nombreux **développements instrumentaux et méthodologiques** qui ont permis d'accéder à la mesure de masse de complexes biologiques intacts en phase gazeuse (ESI, TOF, etc.). De plus, l'amélioration continue de la résolution et de la sensibilité des instruments a permis d'accroître la complexité des systèmes biologiques étudiés, tout en réduisant en parallèle les quantités d'échantillons requises, faisant ainsi de la MS supramoléculaire une technique biophysique tout à fait complémentaire à d'autres techniques de caractérisation plus conventionnelles (cristallographie, RMN, etc.).

En renseignant ainsi sur l'existence, la stœchiométrie, l'affinité ou encore la dynamique de complexes non-covalents, la MS supramoléculaire peut jouer un rôle essentiel dans la caractérisation structurale d'édifices biologiques, ainsi que pour l'étude thermodynamique et cinétique d'équilibres de complexation en solution. Il est toutefois important de rappeler que le succès de l'approche de MS supramoléculaire dépend de trois points essentiels qui sont :

- ▶ **Une préparation des échantillons adaptée** qui nécessite l'emploi de tampons à la fois compatibles avec l'analyse par ESI-MS et permettant de préserver l'intégrité des complexes biologiques en solution (solutions de sels d'ammonium à pH physiologique).
- ▶ **Une optimisation rigoureuse et systématique des paramètres instrumentaux** qui vise à trouver le meilleur compromis entre désolvatation, transmission et préservation des complexes non-covalents en phase gazeuse, nécessitant pour cela une connaissance détaillée du fonctionnement des spectromètres de masse.
- ▶ **La réalisation d'expériences de contrôle** ayant pour but de valider les résultats et de s'assurer de l'adéquation entre mesures en phase gazeuse et propriétés des complexes en solution.

Quelles que soient les informations recherchées et quelles que soient les stratégies mises en œuvre, le respect de ces trois points clés permet d'assurer un maximum de fiabilité des résultats obtenus en MS supramoléculaire. C'est d'ailleurs ce que nous nous attacherons à décrire dans la suite de ce manuscrit, en particulier pour le développement de méthodologies nouvelles au sein du laboratoire (automatisation et mobilité ionique) qui ont fait l'objet d'une partie de ce travail de thèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Yamashita M, Fenn JB.**
Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, *88*, 4451-4459.
2. **Ganem B, Li YT, Henion JD.**
Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, *113*, 6294-6296.
3. **Katta V, Chait BT.**
Observation of the heme-globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, *113*, 8534-8535.
4. **Bitsch F.**
Analyses structurales de protéines et de complexes de coordination par spectrométrie de masse. *Thèse de l'Université Louis Pasteur*, Strasbourg, **1991**.
5. **Leize E.**
Caractérisation d'édifices supramoléculaires par spectrométrie de masse avec ionisation électrospray. *Thèse de l'Université Louis Pasteur*, Strasbourg, **1994**.
6. **Potier N.**
Caractérisation de complexes biologiques non covalents par spectrométrie de masse avec ionisation électrospray. *Thèse de l'Université Louis Pasteur*, Strasbourg, **1996**.
7. **Heck AJ, Van Den Heuvel RH.**
Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2004**, *23*, 368-389.
8. **Sharon M, Robinson CV.**
The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes. *Annual Review of Biochemistry*, **2007**, *76*, 167-193.
9. **Heck AJ.**
Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nature Methods*, **2008**, *5*, 927-933.
10. **Berggard T, Linse S, James P.**
Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*, **2007**, *7*, 2833-2842.
11. **Lehn J-M.**
Supramolecular Chemistry - Concepts and Perspectives. Wiley-VCH, New York, **1995**.
12. **Israelachvili J.**
Intermolecular and surface forces, Second Edition. Academic Press, London, **1992**.
13. **Myers D.**
Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, Second Edition. Wiley-VCH, New York, **1999**.
14. **Winzor DJ.**
Analytical exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2003**, *56*, 15-52.
15. **Homola J.**
Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2003**, *377*, 528-539.
16. **Torreri P, Ceccarini M, Macioce P, Petrucci TC.**
Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann Ist Super Sanita*, **2005**, *41*, 437-441.
17. **Renaud J-P, Delsuc M-A.**
Biophysical techniques for ligand screening and drug design. *Current Opinion in Pharmacology*, **2009**, *9*, 1-7.

18. **Yan Y, Marriott G.**
Analysis of protein interactions using fluorescence technologies. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2003**, 7, 635-640.
19. **Ciruela F.**
Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, **2008**, 19, 338-343.
20. **Lipfert J, Doniach S.**
Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **2007**, 36, 307-327.
21. **Svergun DI, Koch MHJ.**
Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Current Opinion in Structural Biology*, **2002**, 12, 654-660.
22. **Foster MP, McElroy CA, Amero CD.**
Solution NMR of large molecules and assemblies. *Biochemistry*, **2007**, 46, 331-340.
23. **Meyer B, Peters T.**
NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **2003**, 42, 864-890.
24. **Karas M, Hillenkamp F.**
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 2299-2301.
25. **Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T.**
Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1988**, 2, 151-153.
26. **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM.**
Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, 246, 64-71.
27. **Moniatte M, van der Goot FG, Buckley JT, Pattus F, Van Dorsselaer A.**
Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Letters*, **1996**, 384, 269-272.
28. **Glocker MO, Bauer SH, Kast J, Volz J, Przybylski M.**
Characterization of specific noncovalent protein complexes by UV matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **1996**, 31, 1221-1227.
29. **Gruic-Sovulj I, Ludemann HC, Hillenkamp F, Kucan I, Peter-Katalinic J.**
Detection of noncovalent tRNA.aminoacyl-tRNA synthetase complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272, 32084-32091.
30. **Cohen LRH, Strupat K, Hillenkamp F.**
Analysis of Quaternary Protein Ensembles by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1997**, 8, 1046-1052.
31. **Kiselar JG, Downard KM.**
Preservation and detection of specific antibody-peptide complexes by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2000**, 11, 746-750.
32. **Woods AS, Huestis MA.**
A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2001**, 12, 88-96.
33. **Luo SZ, Li YM, Qiang W, Zhao YF, Abe H, Nemoto T, Qin XR, et al.**
Detection of specific noncovalent interaction of peptide with DNA by MALDI-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, 15, 28-31.
34. **Hillenkamp F, Karas M.**
The MALDI Process and Method. In *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Hillenkamp F, Peter-Katalinic J, Ed. John Wiley & sons, **2007**.

35. **Rosinke B, Strupat K, Hillenkamp F, Rosenbusch J, Dencher N, Krüger U, Galla H-J.**
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) of membrane proteins and non-covalent complexes. *Journal of Mass Spectrometry*, **1995**, *30*, 1462-1468.
36. **Wortmann A, Pimenova T, Alves S, Zenobi R.**
Investigation of the first shot phenomenon in MALDI mass spectrometry of protein complexes. *Analyst*, **2007**, *132*, 199-207.
37. **Farmer TB, Caprioli RM.**
Assessing the multimeric states of proteins: studies using laser desorption mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, **1991**, *20*, 796-800.
38. **Jensen ON, Barofsky DF, Young MC, von Hippel PH, Swenson S, Seifried SE.**
Direct observation of UV-crosslinked protein-nucleic acid complexes by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1993**, *7*, 496-501.
39. **Nazabal A, Wenzel RJ, Zenobi R.**
Immunoassays with direct mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry*, **2006**, *78*, 3562-3570.
40. **Villanueva J, Yanes O, Querol E, Serrano L, Aviles FX.**
Identification of protein ligands in complex biological samples using intensity-fading MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2003**, *75*, 3385-3395.
41. **Yanes O, Aviles FX, Roepstorff P, Jorgensen TJ.**
Exploring the "intensity fading" phenomenon in the study of noncovalent interactions by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, *18*, 359-367.
42. **Laprévôte O.**
Eléments d'une histoire de la spectrométrie de masse. *XI^{èmes} rencontres du Club des Jeunes Spectrométristes de Masse*, **2007**, Saint-Dié-des-Vosges, France - <http://www.sfsm.info/ftp/pdf/cours/OLC2007.pdf>.
43. **Griffiths J.**
A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2008**, *80*, 5678-5683.
44. **Stephens WE.**
A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Bulletin of the American Physical Society*, **1946**, *21*, 22.
45. **Cameron AE, Eggers JDF.**
An Ion "Velocitron". *Review of Scientific Instruments*, **1948**, *19*, 605-607.
46. **Paul W, Steinwedel H.**
Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift Naturforschung Teil A*, **1953**, *8*, 448.
47. **Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB.**
Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, **1968**, *49*, 2240-2249.
48. **Bahr R, Gerlich D, Teloy E.**
E. Verhandl. DPG (VI), **1969**, *4*, 343.
49. **Mamyrin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA.**
The mass reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Soviet Physics - Journal of Experimental and Theoretical Physics*, **1973**, *37*, 45.
50. **Glish GL, Goeringer DE.**
A tandem quadrupole/time-of-flight instrument for mass spectrometry/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1984**, *56*, 2291-2295.
51. **Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F.**
Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, **1985**, *57*, 2935-2939.
52. **Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Hillenkamp F.**
Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Proteins of Mass 100,000 to 250,000 Dalton. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1989**, *28*, 760-761.

53. **Dodonov AF, Chernushevich IV, Dodonova TF, Raznikov VV, Talrose VL.**
USSR Patent 1681340A1. **1987**, February 25.
54. **Verentchikov AN, Ens W, Standing KG.**
Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction. *Analytical Chemistry*, **1994**, 66, 126-133.
55. **Wilm M, Mann M.**
Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 1-8.
56. **Xue Q, Foret F, Dunayevskiy YM, Zavracky PM, McGruer NE, Karger BL.**
Multichannel microchip electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 426-430.
57. **Ramsey RS, Ramsey JM.**
Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping. *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 1174-1178.
58. **Schultz GA, Corso TN, Prosser SJ, Zhang S.**
A Fully Integrated Monolithic Microchip Electrospray Device for Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 4058.
59. **Van Pelt C, Zhang S, Henion J.**
Characterization of a fully automated nanoelectrospray system with mass spectrometric detection for proteomic analyses. *J Biomol Tech*, **2002**, 13, 72-84.
60. **Giles K, Bateman R.**
Evaluation of a Stacked-Ring Radio Frequency Ion transmission Device at Intermediate Pressures. *Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **2001**, Chicago, IL.
61. **Taylor G.**
Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, **1964**, 280, 383-397.
62. **Kebarle P, Tang L.**
From ions in solution to ions in the gas phase. The mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1993**, 65, 972A-986A.
63. **Kebarle P.**
A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35, 804-817.
64. **Kebarle P, Peschke M.**
On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 406, 11-35.
65. **Blades AT, Ikonomou MG, Kebarle P.**
Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63, 2109-2114.
66. **Van Berkel GJ, McLuckey SA, Glish GL.**
Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra. *Analytical Chemistry*, **1992**, 64, 1586-1593.
67. **Van Berkel GJ, Zhou F.**
Electrospray as a Controlled-Current Electrolytic Cell: Electrochemical Ionization of Neutral Analytes for Detection by Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1995**, 67, 3958 - 3964.
68. **Rayleigh L.**
On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine*, **1882**, 5, 184.
69. **Gomez A, Tang K.**
Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids*, **1994**, 6, 404-414.
70. **Iribarne JV, Thomson BA.**
On the evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics*, **1976**, 64, 2287-2294.

71. **Thomson BA, Iribarne JV.**
Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *Journal of Chemical Physics*, **1979**, 71, 4451-4463.
72. **Gamero-Castaño M, Fernández de la Mora J.**
Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 406, 67-91.
73. **Gamero-Castaño M, Fernandez de la Mora J.**
Modulations in the Abundance of Salt Clusters in Electrosprays. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 1426-1429.
74. **Hogan CJ, Jr., Carroll JA, Rohrs HW, Biswas P, Gross ML.**
Charge carrier field emission determines the number of charges on native state proteins in electrospray ionization. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, 130, 6926-6927.
75. **Sakairi M, Yergey AL, Siu KWM, Le Blanc JCY, Guevremont R, Berman SS.**
Electrospray mass spectrometry: application of ion evaporation theory to amino acids. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63, 1488-1490.
76. **Gamero-Castaño M, Fernández de la Mora J.**
Kinetics of small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35, 790-803.
77. **Fernández de la Mora J.**
Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 406, 93-104.
78. **Cole RB.**
Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35, 763-772.
79. **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*, **2002**, 219, 39-62.
80. **Iavarone AT, Williams ER.**
Mechanism of Charging and Supercharging Molecules in Electrospray Ionization. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, 2319-2327.
81. **Wong SF, Meng CK, Fenn JB.**
Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). *Journal of Physical Chemistry*, **1988**, 92, 546-550.
82. **Peschke M, Blades A, Kebarle P.**
Charged States of Proteins. Reactions of Doubly Protonated Alkyldiamines with NH₃: Solvation or Deprotonation. Extension of Two Proton Cases to Multiply Protonated Globular Proteins Observed in the Gas Phase. *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, 124, 11519-11530.
83. **Verkerk UH, Peschke M, 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. *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, 38, 618-631.
84. **Verkerk UH, Kebarle P.**
Ion-Ion and Ion-Molecule Reactions at the Surface of Proteins Produced by Nanospray. Information on the Number of Acidic Residues and Control of the Number of Ionized Acidic and Basic Residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2005**, 16, 1325-1341.
85. **Chowdhury SK, Katta V, Chait BT.**
Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9012 - 9013.
86. **Konermann L.**
A minimalist model for exploring conformational effects on the electrospray charge state distribution of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, **2007**, 111, 6534-6543.

87. **Grandori R.**
Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, 38, 11-15.
88. **Enke CG.**
A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes. *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 4885-4893.
89. **Null AP, Nepomuceno AI, Muddiman DC.**
Implications of Hydrophobicity and Free Energy of Solvation for Characterization of Nucleic Acids by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75, 1331-1339.
90. **Kuprowski MC, Boys BL, Konermann L.**
Analysis of protein mixtures by electrospray mass spectrometry: effects of conformation and desolvation behavior on the signal intensities of hemoglobin subunits. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, 18, 1279-1285.
91. **Kuprowski MC, Konermann L.**
Signal response of coexisting protein conformers in electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 2499-2506.
92. **Tang K, Smith RD.**
Physical/chemical separations in the break-up of highly charged droplets from electrosprays. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2001**, 12, 343-347.
93. **Cech NB, Enke CG.**
Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 2717-2723.
94. **Cech NB, Enke CG.**
Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, **2001**, 20, 362-387.
95. **Peschke M, Verkerk UH, 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. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, 15, 1424-1434.
96. **Wortmann A, Kistler-Momotova A, Zenobi R, Heine MC, Wilhelm O, Pratsinis SE.**
Shrinking droplets in electrospray ionization and their influence on chemical equilibria. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, 18, 385-393.
97. **Fernández de la Mora J, Loscertales IG.**
The current emitted by highly conducting Taylor cones. *Journal of Fluid Mechanics Digital Archive*, **1994**, 260, 155-184.
98. **Pfeifer RJ, Hendricks CD.**
Parametric studies of electrohydrodynamic spraying. *AIAA Journal*, **1968**, 6, 496-502.
99. **Wilm M, Mann M.**
Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? . *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1994**, 136, 167-180.
100. **Bahr U, Pfenninger A, Karas M, Stahl B.**
High-Sensitivity Analysis of Neutral Underivatized Oligosaccharides by Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 4530-4535.
101. **Juraschek R, Dülcks T, Karas M.**
Nanoelectrospray—more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1999**, 10, 300-308.
102. **Karas M, Bahr U, Dulcks T.**
Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **2000**, 366, 669-676.
103. **Nettleton EJ, Sunde M, Lai Z, Kelly JW, Dobson CM, Robinson CV.**

- Protein subunit interactions and structural integrity of amyloidogenic transthyretins: evidence from electrospray mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, **1998**, 281, 553-564.
104. **Rostom AA, Sunde M, Richardson SJ, Schreiber G, Jarvis S, Bateman R, Dobson CM, et al.** Dissection of multi-protein complexes using mass spectrometry: subunit interactions in transthyretin and retinol-binding protein complexes. *Proteins*, **1998**, Suppl 2, 3-11.
105. **Chung EW, Henriques DA, Renzoni D, Morton CJ, Mulhern TD, Pitkeathly MC, Ladbury JE, et al.** Probing the nature of interactions in SH2 binding interfaces-Evidence from electrospray ionization mass spectrometry. *Protein Science*, **1999**, 8, 1962-1970.
106. **Rostom AA, Robinson CV.** Detection of the Intact GroEL Chaperonin Assembly by Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121, 4718-4719.
107. **Rostom AA, Robinson CV.** Disassembly of intact multiprotein complexes in the gas phase. *Current Opinion in Structural Biology*, **1999**, 9, 135-141.
108. **Fandrich M, Tito MA, Leroux MR, Rostom AA, Hartl FU, Dobson CM, Robinson CV.** Observation of the noncovalent assembly and disassembly pathways of the chaperone complex MtGimC by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2000**, 97, 14151-14155.
109. **Hernandez H, Robinson CV.** Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry. *Nature Protocols*, **2007**, 2, 715-726.
110. **Gabelica V, Vreuls C, Filee P, Duval V, Joris B, Pauw ED.** Advantages and drawbacks of nanospray for studying noncovalent protein-DNA complexes by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2002**, 16, 1723-1728.
111. **Sung W-C, Makamba H, Chen S-H.** Chip-based microfluidic devices coupled with electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **2005**, 26, 1783-1791.
112. **Koster S, Verpoorte E.** A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: an overview. *Lab on a Chip*, **2007**, 7, 1394-1412.
113. **Lazar IM, Grym J, Foret F.** Microfabricated devices: A new sample introduction approach to mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2006**, 25, 573-594.
114. **Gerlich D.** Inhomogeneous RF fields: a versatile tool for the study of processes with slow ions. In *State-selected and state-to-state ion molecule reaction dynamics part 1*. Ng CY, Baer M, Ed. John Wiley, **1992**; Vol. 82, 1-176.
115. **Campana JE.** Elementary theory of the quadrupole mass filter. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **1980**, 33, 101-117.
116. **He J, Yu Q, Li L, Hang W, Huang B.** Characteristics and comparison of different radiofrequency-only multipole cooling cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2008**, 22, 3327-3333.
117. **Lorenzen K, Versluis C, van Duijn E, van den Heuvel RHH, Heck AJR.** Optimizing macromolecular tandem mass spectrometry of large non-covalent complexes using heavy collision gases. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2007**, 268, 198-206.
118. **Sobott F, Hernandez H, McCammon MG, Tito MA, Robinson CV.** A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 1402-1407.
119. **van den Heuvel RHH, van Duijn E, Mazon H, Synowsky SA, Lorenzen K, Versluis C, Brouns SJJ, et al.**

- Improving the Performance of a Quadrupole Time-of-Flight Instrument for Macromolecular Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, 7473-7483.
120. **Luca A, Schlemmer S, Cermak I, Gerlich D.**
On the combination of a linear field free trap with a time-of-flight mass spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, **2001**, 72, 2900-2908.
121. **Shaffer SA, Tang K, Anderson G, Prior DC, Udseth HR, Smith RD.**
A novel ion funnel for focusing ions at elevated pressure using electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1997**, 11, 1813-1817.
122. **Shaffer SA, Tolmachev A, Prior DC, Anderson GA, Udseth HR, Smith RD.**
Characterization of an improved electrodynamic ion funnel interface for electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 2957-2964.
123. **Landau LD, Lifshitz EM.**
Mechanics, Third Edition. New York, **1976**.
124. **Guan S, Marshall AG.**
Stacked-Ring Electrostatic Ion Guide. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1996**, 7, 101-106.
125. **Giles K, Pringle SD, Worthington KR, Little D, Wildgoose JL, Bateman RH.**
Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2004**, 18, 2401-2414.
126. **Tolmachev AV, Kim T, Udseth HR, Smith RD, Bailey TH, Futrell JH.**
Simulation-based optimization of the electrodynamic ion funnel for high sensitivity electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 203, 31-47.
127. **Kirchner NJ.**
Ion processing: control and analysis. *US Patent 5206506*, **1993**.
128. **Kelly RT, Tolmachev AV, Page JS, Tang K, Smith RD.**
The ion funnel: Theory, implementations, and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, **2009**.
129. **Koppelaar DW, Eiden GC, Barinaga CJ.**
Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2004**, 19, 561-570.
130. **Udseth HR, Tang K, Hoyes J, Giles K, Bateman R, Smith RD.**
Performance Evaluations of a Q-TOF Ultima™ with the Addition of an Electrodynamic Ion Funnel. *Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **2003**, Montreal, Canada.
131. **Gerlich D.**
Applications of rf fields and collision dynamics in atomic mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2004**, 19, 561-711.
132. **Tolmachev AV, Udseth HR, Smith RD.**
Charge capacity limitations of radio frequency ion guides in their use for improved ion accumulation and trapping in mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 970-978.
133. **Douglas DJ.**
Applications of Collision Dynamics in Quadrupole Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1998**, 9, 101-113.
134. **Douglas DJ, French JB.**
Collisional focusing effects in radio frequency quadrupoles. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1992**, 3, 398-408.
135. **Krutchinsky AN, Chernushevich IV, Spicer VL, Ens W, Standing KG.**
Collisional Damping Interface for an Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1998**, 9, 569-579.
136. **Tahallah N, Pinkse M, Maier CS, Heck AJ.**

- 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 Communications in Mass Spectrometry*, **2001**, 15, 596-601.
137. **Sanglier S, Leize E, Van Dorselaer 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. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2003**, 14, 419-429.
138. **Chernushevich IV, Thomson BA.**
Collisional cooling of large ions in electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, 1754-1760.
139. **Standing KG.**
Timing the flight of biomolecules: a personal perspective. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 200, 597-610.
140. **Sanglier S.**
La spectrométrie de masse : Un nouvel outil pour l'étude des interactions faibles en biologie. *Thèse de l'Université Louis Pasteur*, Strasbourg, **2002**.
141. **Schmidt A, Bahr U, Karas M.**
Influence of pressure in the first pumping stage on analyte desolvation and fragmentation in nano-ESI MS. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 6040-6046.
142. **Benesch JL.**
Collisional Activation of Protein Complexes: Picking Up the Pieces. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2008**.
143. **Eiceman GA, Karpas Z.**
Ion Mobility Spectrometry, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**.
144. **Uetrecht C, Versluis C, Watts NR, Roos WH, Wuite GJ, Wingfield PT, Steven AC, et al.**
High-resolution mass spectrometry of viral assemblies: molecular composition and stability of dimorphic hepatitis B virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105, 9216-9220.
145. **Uetrecht C, Versluis C, Watts NR, Wingfield PT, Steven AC, Heck AJ.**
Stability and Shape of Hepatitis B Virus Capsids In Vacuo. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **2008**.
146. **Wiley WC, McLaren IH.**
Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments*, **1955**, 26, 1150-1157.
147. **Guilhaus M, Mlynski V, Selby D.**
Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1997**, 11, 951-962.
148. **Guilhaus M, Selby D, Mlynski V.**
Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2000**, 19, 65-107.
149. **Mamyrin BA.**
Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, **2001**, 206, 251-266.
150. **Dawson JHJ, Guilhaus M.**
Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1989**, 3, 155-159.
151. **Wiza JL.**
Microchannel plate detectors. *Nuclear Instruments and Methods*, **1979**, 162, 587-601.
152. **Barraud P, Golinelli-Pimpaneau B, Atmanene C, Sanglier S, Van Dorselaer A, Droogmans L, Dardel F, et al.**

- Crystal structure of *Thermus thermophilus* tRNA m1A58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA. *Journal of Molecular Biology*, **2008**, *377*, 535-550.
153. **Waters.**
Q-ToF Premier Operator's Guide. **2005**.
154. **Sanglier S, Atmanene C, Chevreux G, Van Dorsselaer A.**
Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. *Methods in Molecular Biology*, **2008**, *484*, 217-243.
155. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.**
Biologie moléculaire de la cellule, troisième édition. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, **1994**.
156. **Suckau D, Shi Y, Beu SC, Senko MW, Quinn JP, Wampler FM, McLafferty FW.**
Coexisting stable conformations of gaseous protein ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1993**, *90*, 790-793.
157. **Wood TD, Chorush RA, Wampler FM, Little DP, O'Connor PB, McLafferty FW.**
Gas-phase folding and unfolding of cytochrome c cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1995**, *92*, 2451-2454.
158. **Covey T, Douglas DJ.**
Collision cross sections for protein ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1993**, *4*, 616-623.
159. **Clemmer DE, Hudgins RR, Jarrold MF.**
Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, *117*, 10141-10142.
160. **Kaltashov IA, Fenselau CC.**
Stability of secondary structural elements in a solvent-free environment: the α helix. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **1997**, *27*, 165-170.
161. **Siuzdak G, Bothner B, Yeager M, Brugidou C, Fauquet CM, Hoey K, Change C-M.**
Mass spectrometry and viral analysis. *Chemistry & Biology*, **1996**, *3*, 45-48.
162. **Thomas JJ, Bothner B, Traina J, Benner WH, Siuzdak G.**
Electrospray ion mobility spectrometry of intact viruses. *Spectroscopy* **2004**, *Volume 18*, 31-36.
163. **Badman ER, Myung S, Clemmer DE.**
Evidence for unfolding and refolding of gas-phase cytochrome C ions in a Paul trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2005**, *16*, 1493-1497.
164. **Breuker K, McLafferty FW.**
Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase, 10^{-12} to 10^2 s. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, *105*, 18145-18152.
165. **Mirza UA, Chait BT.**
Do proteins denature during droplet evolution in electrospray ionization? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1997**, *162*, 173-181.
166. **Bohrer BC, Merenbloom SI, Koeniger SL, Hilderbrand AE, Clemmer DE.**
Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2008**, *1*, 293-327.
167. **Cunniff JB, Vouros P.**
False positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes by electrospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1995**, *6*, 437-447.
168. **Smith RD, Light-Wahl KJ.**
The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biological Mass Spectrometry*, **1993**, *22*, 493-501.
169. **Smith RD, Bruce JE, Wu Q, Lei QP.**

- New mass spectrometric methods for the study of non-covalent associations of biopolymers. *Chemical Society Reviews*, **1997**, 26, 191-202.
170. **Sun N, Sun J, Kitova EN, Klassen JS.**
Identifying Nonspecific Ligand Binding in Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using the Reporter Molecule Method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2009**, 20, 1242-1250.
171. **Ayed A, Krutchinsky AN, Ens W, Standing KG, Duckworth HW.**
Quantitative evaluation of protein-protein and ligand-protein equilibria of a large allosteric enzyme by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1998**, 12, 339-344.
172. **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. *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, 38, 491-501.
173. **Chitta RK, Rempel DL, Gross ML.**
Determination of affinity constants and response factors of the noncovalent dimer of gramicidin by electrospray ionization mass spectrometry and mathematical modeling. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2005**, 16, 1031-1038.
174. **Gabelica Vr, Rosu Fdr, De Pauw E.**
A Simple Method to Determine Electrospray Response Factors of Noncovalent Complexes. *Analytical Chemistry*, **2009**.
175. **Daniel JM, Friess SD, 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.
176. **Nesatyy VJ.**
Mass spectrometry evaluation of the solution and gas-phase binding properties of noncovalent protein complexes. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2002**, 221, 147-161.
177. **Jorgensen TJD, Roepstorff P, Heck AJR.**
Direct Determination of Solution Binding Constants for Noncovalent Complexes between Bacterial Cell Wall Peptide Analogues and Vancomycin Group Antibiotics by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 4427-4432.
178. **Kempen EC, Brodbelt JS.**
A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 5411-5416.
179. **Griffey RH, Sannes-Lowery KA, Drader JJ, Mohan V, Swayze EE, Hofstadler SA.**
Characterization of Low-Affinity Complexes between RNA and Small Molecules Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **2000**, 122, 9933-9938.
180. **Sannes-Lowery KA, Griffey RH, Hofstadler SA.**
Measuring dissociation constants of RNA and aminoglycoside antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **2000**, 280, 264-271.
181. **Swayze EE, Jefferson EA, Sannes-Lowery KA, Blyn LB, Risen LM, Arakawa S, Osgood SA, et al.**
SAR by MS: a ligand based technique for drug lead discovery against structured RNA targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45, 3816-3819.
182. **Ockey DA, Dotson JL, Struble ME, Stults JT, Bourell JH, Clark KR, Gadek TR.**
Structure-activity relationships by mass spectrometry: identification of novel MMP-3 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, 12, 37-44.
183. **Pan J, Rintala-Dempsey AC, Li Y, Shaw GS, Konermann L.**
Folding kinetics of the S100A11 protein dimer studied by time-resolved electrospray mass spectrometry and pulsed hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry*, **2006**, 45, 3005-3013.
184. **Sharon M, Witt S, Glasmacher E, Baumeister W, Robinson CV.**
Mass spectrometry reveals the missing links in the assembly pathway of the bacterial 20 S proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, 282, 18448-18457.

- 185. Vis H, Dobson CM, Robinson CV.**
Selective association of protein molecules followed by mass spectrometry. *Protein Science*, **1999**, *8*, 1368-1370.
- 186. Sobott F, Benesch JL, Vierling E, Robinson CV.**
Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, *277*, 38921-38929.
- 187. Painter AJ, Jaya N, Basha E, Vierling E, Robinson CV, Benesch JLP.**
Real-Time Monitoring of Protein Complexes Reveals their Quaternary Organization and Dynamics. *Chemistry & Biology*, **2008**, *15*, 246-253.
- 188. Keetch CA, Bromley EH, McCammon MG, Wang N, Christodoulou J, Robinson CV.**
L55P transthyretin accelerates subunit exchange and leads to rapid formation of hybrid tetramers. *J Biol Chem.*, **2005**, *280*, 41667-41674.
- 189. Aquilina JA, Benesch JL, Ding LL, Yaron O, Horwitz J, Robinson CV.**
Subunit exchange of polydisperse proteins: Mass spectrometry reveals consequences of alpha A-crystallin truncation. *J Biol Chem.*, **2005**, *7*, 7.
- 190. Chevreux G.**
Etude des interactions moléculaires spécifiques par spectrométrie de masse : application à la chimie du vivant. *Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg*, **2005**.
- 191. Simmons DA, Wilson DJ, Lajoie GA, Doherty-Kirby A, Konermann L.**
Subunit disassembly and unfolding kinetics of hemoglobin studied by time-resolved electrospray mass spectrometry. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 14792-14801.
- 192. Hernandez H, Robinson CV.**
Dynamic protein complexes: insights from mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 46685-46688.
- 193. Sanglier S, Bourguet W, Germain P, Chavant V, Moras D, Gronemeyer H, Potier N, et al.**
Monitoring ligand-mediated nuclear receptor-coregulator interactions by noncovalent mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry*, **2004**, *271*, 4958-4967.
- 194. Bovet C, Ruff M, Eiler S, Granger F, Wenzel R, Nazabal A, Moras D, et al.**
Monitoring Ligand Modulation of Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry: Estrogen Receptor alpha-SRC1. *Analytical Chemistry*, **2008**.
- 195. Sanglier S, Ramstrom H, Haiech J, Leize E, Dorselaer AV.**
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*, 681-696.
- 196. Kaltashov IA, Eyles SJ.**
Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2002**, *21*, 37-71.
- 197. Konermann L, Simmons DA.**
Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2003**, *22*, 1-26.
- 198. Eyles SJ, Kaltashov IA.**
Methods to study protein dynamics and folding by mass spectrometry. *Methods*, **2004**, *34*, 88-99.
- 199. Konermann L, Tong X, Pan Y.**
Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches. *Journal of Mass Spectrometry*, **2008**, *43*, 1021-1036.
- 200. Kaltashov IA, Abzalimov RR.**
Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2008**, *19*, 1239-1246.
- 201. Konermann L, Douglas DJ.**

- Acid-induced unfolding of cytochrome c at different methanol concentrations: electrospray ionization mass spectrometry specifically monitors changes in the tertiary structure. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 12296-12302.
- 202. Katta V, Chait BT.**
Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1991**, *5*, 214-217.
- 203. Wales TE, Engen JR.**
Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrometry Reviews*, **2006**, *25*, 158-170.
- 204. Maleknia SD, Chance MR, Downard KM.**
Electrospray-assisted modification of proteins: a radical probe of protein structure. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1999**, *13*, 2352-2358.
- 205. Maleknia SD, Downard K.**
Radical approaches to probe protein structure, folding, and interactions by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2001**, *20*, 388-401.
- 206. Maleknia SD, Wong JW, Downard KM.**
Photochemical and electrophysical production of radicals on millisecond timescales to probe the structure, dynamics and interactions of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2004**, *3*, 741-748.
- 207. Takamoto K, Chance MR.**
Radiolytic protein footprinting with mass spectrometry to probe the structure of macromolecular complexes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **2006**, *35*, 251-276.
- 208. Ruotolo BT, Giles K, Campuzano I, Sandercock AM, Bateman RH, Robinson CV.**
Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science*, **2005**, *310*, 1658-1661.
- 209. Kaddis CS, Lomeli SH, Yin S, Berhane B, Apostol MI, Kickhoefer VA, Rome LH, et al.**
Sizing large proteins and protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry and ion mobility. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, *18*, 1206-1216.
- 210. Ruotolo BT, Benesch JLP, Sandercock AM, Hyung S, Robinson CV.**
Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nature Protocols*, **2008**, *3*, 1139 - 1152.
- 211. Scarff CA, Thalassinos K, Hilton GR, Scrivens JH.**
Travelling wave ion mobility mass spectrometry studies of protein structure: biological significance and comparison with X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2008**, *22*, 3297-3304.
- 212. Smith DP, Giles K, Bateman RH, Radford SE, Ashcroft AE.**
Monitoring Copopulated Conformational States During Protein Folding Events Using Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, *18*, 2180-2190.
- 213. Valentine SJ, Anderson JG, Ellington AD, Clemmer DE.**
Disulfide-Intact and -Reduced Lysozyme in the Gas Phase: Conformations and Pathways of Folding and Unfolding. *Journal of Physical Chemistry B*, **1997**, *101*, 3891-3900.
- 214. Atmanene C, Wagner-Rousset E, Malissard M, Chol B, Robert A, Corvaia N, Dorsselaer AV, et al.**
Extending Mass Spectrometry Contribution to Therapeutic Monoclonal Antibody Lead Optimization: Characterization of Immune Complexes Using Noncovalent ESI-MS. *Analytical Chemistry*, **2009**, *81*, 6364-6373.
- 215. Lorenzen K, Olia AS, Uetrecht C, Cingolani G, Heck AJ.**
Determination of stoichiometry and conformational changes in the first step of the P22 tail assembly. *Journal of Molecular Biology*, **2008**, *379*, 385-396.
- 216. Rogniaux H, Van Dorsselaer A, Barth P, Biellmann JF, Barbanton J, van Zandt M, Chevrier B, et al.**

- Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies - A System for X-ray Crystallography and NMR. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1999**, *10*, 635-647.
- 217. Robinson CV, Chung EW, Kragelund BB, Knudsen J, Aplin RT, Poulsen FM, Dobson CM.**
Probing the Nature of Noncovalent Interactions by Mass Spectrometry. A Study of Protein-CoA Ligand Binding and Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, *118*, 8646-8653.
- 218. Wu Q, Gao J, Joseph-McCarthy D, Sigal GB, Bruce JE, Whitesides GM, Smith RD.**
Carbonic Anhydrase-Inhibitor Binding: From Solution to the Gas Phase. *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, *119*, 1157-1158.
- 219. Gao J, Wu Q, Carbeck J, Lei QP, Smith RD, Whitesides GM.**
Probing the energetics of dissociation of carbonic anhydrase-ligand complexes in the gas phase. *Biophysical Journal*, **1999**, *76*, 3253-3260.
- 220. Steuber H, Heine A, Klebe G.**
Structural and thermodynamic study on aldose reductase: nitro-substituted inhibitors with strong enthalpic binding contribution. *Journal of Molecular Biology*, **2007**, *368*, 618-638.
- 221. Light-Wahl KJ, Schwartz BL, Smith RD.**
Observation of the Noncovalent Quaternary Associations of Proteins by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **1994**, *116*, 5271-5278.
- 222. Felitsyn N, Kitova EN, Klassen JS.**
Thermal Decomposition of a Gaseous Multiprotein Complex Studied by Blackbody Infrared Radiative Dissociation. Investigating the Origin of the Asymmetric Dissociation Behavior. *Analytical Chemistry*, **2001**, *73*, 4647-4661.
- 223. Jurchen JC, Williams ER.**
Origin of asymmetric charge partitioning in the dissociation of gas-phase protein homodimers. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, *125*, 2817-2826.
- 224. Jurchen JC, Garcia DE, Williams ER.**
Further studies on the origins of asymmetric charge partitioning in protein homodimers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, *15*, 1408-1415.
- 225. Benesch JL, Aquilina JA, Ruotolo BT, Sobott F, Robinson CV.**
Tandem mass spectrometry reveals the quaternary organization of macromolecular assemblies. *Chemistry & Biology*, **2006**, *13*, 597-605.
- 226. Schroder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN.**
Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure*, **2000**, *8*, 605-615.
- 227. Rostom AA, Fucini P, Benjamin DR, Juenemann R, Nierhaus KH, Hartl FU, Dobson CM, et al.**
Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2000**, *97*, 5185-5190.
- 228. Loo JA, Berhane B, Kaddis CS, Wooding KM, Xie Y, Kaufman SL, Chernushevich IV.**
Electrospray ionization mass spectrometry and ion mobility analysis of the 20S proteasome complex. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2005**, *16*, 998-1008.
- 229. Taverner T, Hernandez H, Sharon M, Ruotolo BT, Matak-Vinković D, Devos D, Russell RB, et al.**
Subunit Architecture of Intact Protein Complexes from Mass Spectrometry and Homology Modeling *Accounts of Chemical Research*, **2008**, *41*, 617-627.
- 230. Ilag LL, Videler H, McKay AR, Sobott F, Fucini P, Nierhaus KH, Robinson CV.**
Heptameric (L12)₆/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2005**, *102*, 8192-8197.
- 231. Hyung SJ, Robinson CV, Ruotolo BT.**
Gas-phase unfolding and disassembly reveals stability differences in ligand-bound multiprotein complexes. *Chemistry & Biology*, **2009**, *16*, 382-390.
- 232. Schenauer MR, Leary JA.**

- An ion mobility–mass spectrometry investigation of monocyte chemoattractant protein-1. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2009**, Article in Press.
- 233. Lorenzen K, Vannini A, Cramer P, Heck AJ.**
Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure*, **2007**, *15*, 1237-1245.
- 234. Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, Schenauer MR, Yokoi-Fong T, et al.**
Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**.
- 235. Sharon M, Mao H, Boeri Erba E, Stephens E, Zheng N, Robinson CV.**
Symmetrical Modularity of the COP9 Signalosome Complex Suggests its Multifunctionality. *Structure*, **2009**, *17*, 31-40.
- 236. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B.**
A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, **1999**, *17*, 1030-1032.
- 237. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, et al.**
The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods*, **2001**, *24*, 218-229.
- 238. Damasceno CMB, Rose JKC.**
Tandem-affinity purification (TAP) tags. *Encyclopedia of Life Sciences*, **2007**.

DEUXIÈME PARTIE :

APPORT DU NANOSPRAY SUR PUCE MICROFLUIDIQUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE SUPRAMOLECULAIRE

CHAPITRE I : Description et Evaluation des Performances du Robot Triversa Nanomate

CHAPITRE II : Automatisation des Analyses sur Puce Microfluidique en MS Supramoléculaire pour le Développement de Molécules à Visée Thérapeutique

CHAPITRE III : Etude de l'Etat d'Oligomérisation de la Protéine DAPK : Mise en Evidence d'une Relation Structure–Activité

CHAPITRE I

Description et Evaluation des Performances du Robot Triversa Nanomate

Ce chapitre est consacré à la description du robot d'infusion nanospray sur puce microfluidique Triversa Nanomate (Advion Biosciences). Après avoir décrit son principe de fonctionnement, nous nous concentrerons sur les paramètres critiques devant faire l'objet d'une optimisation particulière dans le contexte de l'automatisation des expériences de MS supramoléculaire.

1) INTERET DU NANOSPRAY SUR PUCE MICROFLUIDIQUE – RAPPEL

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons évoqué les nombreux avantages de la source nanospray en comparaison à la source ESI conventionnelle (cf. Partie I, Chapitre II, 3.1.3). En effet, la réduction de la consommation d'échantillon, l'amélioration de l'efficacité d'ionisation des analytes ou encore la plus grande tolérance aux sels du nanospray expliquent en grande partie le remplacement des sources ESI conventionnelles par ces sources miniaturisées dans la plupart des applications en MS.

En MS supramoléculaire également, la grande majorité des études actuellement publiées fait état de l'utilisation d'aiguilles nanospray en verre (borosilicate). Ces aiguilles présentent cependant quelques inconvénients majeurs qui sont notamment la **difficulté de les fabriquer manuellement de manière reproductible**, la **difficulté de les manipuler** en raison de leur **fragilité**, ainsi que le **faible débit d'analyse** que cela engendre. Pour pouvoir bénéficier des avantages du nanospray sans ses inconvénients, des efforts considérables ont été réalisés dans l'objectif de concevoir des puces microfluidiques intégrant des aiguilles ou émetteurs nanospray.

Parmi les différentes puces qui ont été proposées, celle issue des travaux de Zhang et coll.¹ a été intégrée dans un système robotisé permettant de réaliser un prélèvement automatique des échantillons, de les mélanger puis de les ioniser à l'aide d'un émetteur nanospray intégré. Ce système commercialisé par la société Advion Biosciences sous le nom de **Triversa Nanomate™** a été couplé au LCT (ESI-TOF, Waters) dans notre laboratoire. La prise en main de ce système, l'évaluation de ses performances, ainsi que le développement de l'automatisation des expériences de MS supramoléculaire a fait l'objet du travail de thèse exposé dans cette partie.

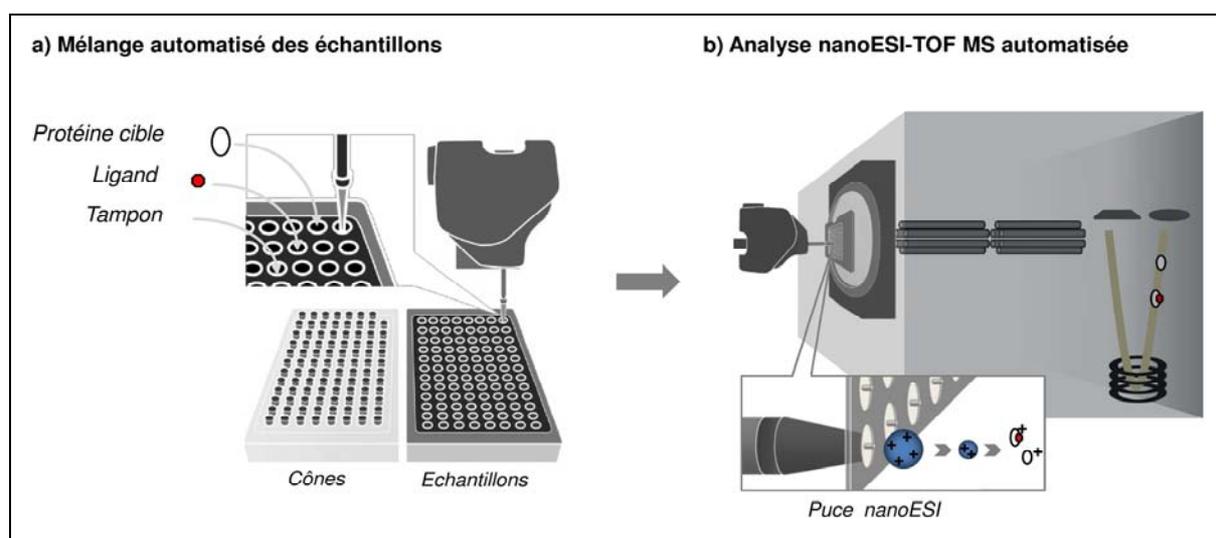


Figure 1 : Représentation du couplage Triversa Nanomate-LCT. (a) Automatisation du prélèvement et du mélange des échantillons. (b) Automatisation de l'infusion sur puce nanospray et de l'acquisition du spectre de masse.

2) DESCRIPTION ET PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

2.1) Description générale du robot Triversa Nanomate

Des photographies du Triversa Nanomate sont représentées sur la figure 2. On y distingue premièrement un compartiment dans lequel peut être placée une plaque de 96 ou de 384 puits contenant les échantillons (figure 2a). La température de la plaque peut être maintenue entre 4 et 20°C à l'aide d'un système réfrigérant à effet Peltier situé en-dessous du compartiment. Un mandrin capable de se déplacer dans les trois directions de l'espace assure le prélèvement, le mélange et l'infusion des échantillons (figure 2a). Pour cela, il est relié à une seringue montée sur un moteur pas à pas permettant d'aspirer des volumes allant jusqu'à 15 μ L. Le prélèvement est réalisé à l'aide de cônes conducteurs en graphite recouverts d'un revêtement chimiquement inerte (figure 2b). Ces cônes sont adaptables sur l'extrémité du mandrin et leur usage unique permet d'éliminer le risque de contamination. Le mélange une fois effectué, le cône conducteur contenant l'échantillon est placé contre la puce microfluidique (figure 2b), et l'infusion nanospray est initiée en appliquant sur le liquide une tension allant jusqu'à 2,5 kV, ainsi qu'une légère contre-pression allant jusqu'à 3 psi. Comme pour les cônes conducteurs, chaque émetteur nanospray de la puce est à usage unique, supprimant de ce fait le risque de contamination d'un échantillon à l'autre. Le Triversa Nanomate est positionné de telle sorte que la puce microfluidique soit placée face à l'entrée de l'interface du spectromètre de masse (cône d'échantillonnage dans le cas du LCT – figure 2). Le pilotage du robot est réalisé indépendamment du spectromètre de masse à l'aide d'un logiciel spécifique permettant de gérer le déplacement du mandrin, ainsi que les paramètres de prélèvement et d'infusion. De plus, le robot et le spectromètre de masse étant connectés ensemble, l'acquisition du spectre de masse peut être réalisée de manière automatique selon les paramètres instrumentaux préalablement définis.

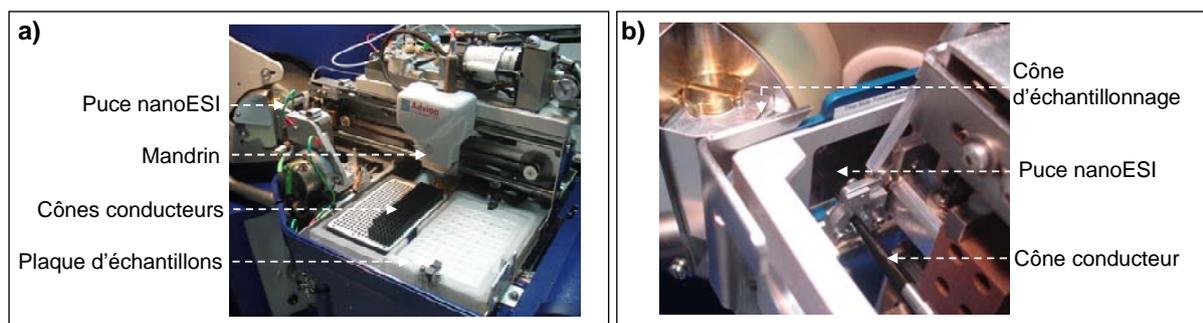


Figure 2 : Photographies du Triversa Nanomate. (a) Vue générale du système adapté devant le cône d'échantillonnage du LCT. (b) Contact entre le cône conducteur et la puce microfluidique pendant l'infusion.

NB : En plus de permettre l'infusion directe des échantillons, le robot Triversa Nanomate peut également être couplé entre un système chromatographique et un spectromètre de masse, permettant d'une part de bénéficier des avantages du nanospray sur puce microfluidique et d'autre part de la possibilité de collecter les produits élués de la colonne. Cette option qui est très intéressante pour certaines applications, n'a cependant pas été exploitée dans le cadre de ce travail de thèse portant sur l'analyse de complexes non-covalents en conditions non-dénaturantes.

2.2) Description de la puce microfluidique

2.2.1) Procédé de fabrication

La puce microfluidique nanoESI constitue l'élément clé du système Triversa Nanomate. Sa conception répond à des critères essentiels tels qu'une bonne résistance chimique (acides, bases, solvants organiques, etc.), ainsi qu'une reproductibilité du procédé de fabrication. La puce est ainsi conçue à partir d'un substrat en **silicium dopé** (pour le rendre conducteur), recouvert d'une couche protectrice de silice et d'un revêtement photosensible. Un motif prédéfini est alors gravé sur le substrat en retirant **sélectivement** ces différents matériaux à l'aide de procédés utilisés en microélectronique.^{1,2}

En quelques détails, un marquage par rayonnement ultraviolet (**lithographie**) est tout d'abord réalisé sur le film photosensible afin de définir les motifs de la gravure. Les parties exposées du revêtement photosensible sont ensuite retirées en milieu alcalin, exposant ainsi la couche intermédiaire de silice qui est à son tour **décapée sous l'action d'un plasma**. L'étape suivante consiste à graver le motif sur le substrat de silicium en utilisant pour cela une technique de **gravure ionique réactive** (DRIE – *Deep Reactive Ion Etching*). Finalement, après avoir retiré les couches de revêtements protecteurs résiduelles, un film est déposé sur la puce afin d'en contrôler la **chimie de surface**. Des informations supplémentaires sur ces procédés peuvent être trouvées dans les références³ et ⁴.

2.2.2) Caractéristiques géométriques de la puce microfluidique

Dans le cas du Triversa Nanomate, les différentes étapes de gravure aboutissent à l'obtention d'une puce microfluidique contenant 400 émetteurs nanospray, encore appelées « *nozzles* », sur une surface d'environ 6 cm² (figure 3a). Les caractéristiques géométriques de ces émetteurs sont :

- ▶ La présence sur l'une des faces de la puce d'un **réservoir** destiné à accueillir la pointe de cône contenant l'échantillon, assurant ainsi l'**étanchéité** du contact cône-puce (figure 3b et c).
- ▶ La présence sur la face opposée du **nozzle** ayant un diamètre interne de 10 µm et qui joue le rôle d'une aiguille *nanospray* (figure 3b et c). Notons que les puces de dernière génération utilisées durant ce travail de thèse sont équipées de *nozzles* d'un diamètre interne de 5 µm.

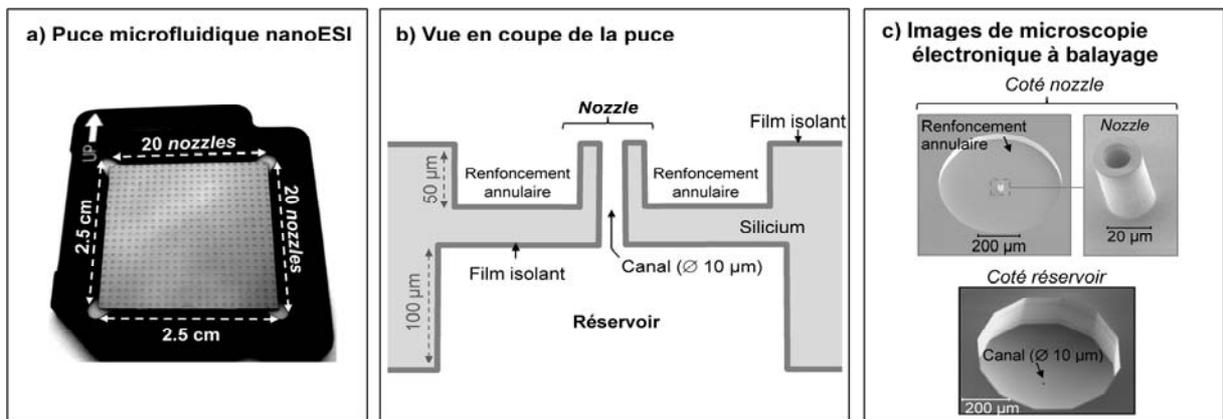


Figure 3 : Puce microfluidique nanoESI du Triversa Nanomate. (b, c) Source : Advion Biosciences

2.2.3) Caractéristiques de fonctionnement

La manière dont la puce a été conçue implique une caractéristique particulièrement importante concernant le **champ électrique** à la sortie du *nozzle*. En effet, dans le cas des sources ESI conventionnelles et des aiguilles nanoESI, la différence de potentiel à l'origine de la formation des gouttelettes chargées est appliquée entre le **liquide dans le capillaire**, et une contre-électrode matérialisée par l'entrée de l'interface du spectromètre de masse (**cône d'échantillonnage** dans le cas du LCT – figure 4a). Dans cette configuration, le champ électrique est inversement proportionnel à la distance séparant la pointe du capillaire de la contre-électrode. Cette distance est généralement de l'ordre de plusieurs mm et doit être optimisée pour assurer la stabilité du spray, ainsi qu'un taux d'échantillonnage maximal des ions vers l'interface du spectromètre de masse.

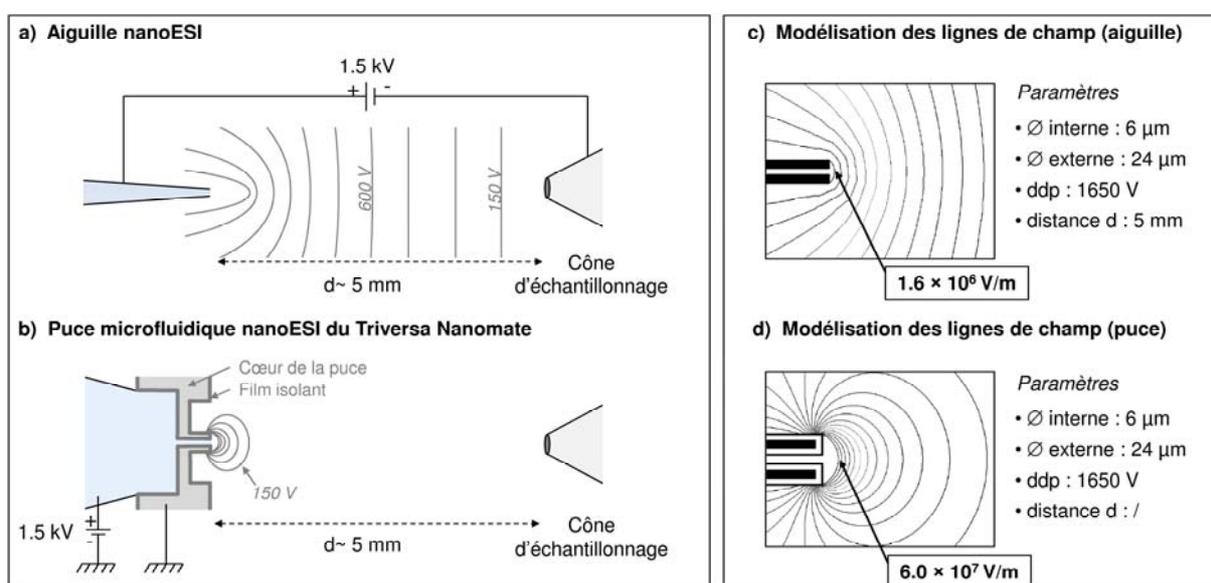


Figure 4 : Illustration des caractéristiques du champ électrique obtenu sur la puce nanoESI du Triversa Nanomate. (a, b) Comparaison entre le champ électrique obtenu dans le cas (a) d'une aiguille nanoESI et (b) d'un *nozzle* de la puce microfluidique, adapté d'après ⁵. (c, d) Modélisation des lignes de champ obtenues dans le cas (c) d'une aiguille nanoESI et (d) d'un *nozzle* de la puce microfluidique, adapté d'après ⁶.

Dans le cas du Triversa Nanomate, la différence de potentiel est appliquée entre le **liquide** et la **puce** elle-même. Pour cela, le liquide est mis sous tension par contact avec le cône conducteur, tandis que le cœur de la puce reste connecté à la terre (figure 4b). Notons que cela est rendu possible par la présence d'un film isolant situé entre le liquide et le cœur de la puce (figures 3b et 4b). L'épaisseur de ce film isolant est suffisamment faible pour permettre au champ électrique de le traverser, et donc au processus ESI d'avoir lieu.⁶ Cette configuration particulière entraîne deux conséquences majeures :

- ▶ Le liquide à l'extrémité du *nozzle* et le cœur de la puce ne sont séparés que de quelques microns. Par conséquent, le **champ électrique** à l'extrémité du *nozzle* est nettement plus **intense et concentré** qu'il ne l'est à l'extrémité d'une **aiguille nanoESI**, favorisant ainsi le processus ESI dans le cas de la puce microfluidique (figure 4c et d).^{5, 6}

- ▶ **La stabilité du spray** dépend des **dimensions de la puce** et non pas de sa **position** par rapport au spectromètre de masse, cela contrairement aux aiguilles nanoESI dont la position doit être redéfinie à chaque nouvelle aiguille.⁵ De plus, la bonne reproductibilité dans l'élaboration des puces se répercute nécessairement sur la **reproductibilité** du spray d'un *nozzle* à l'autre et d'une puce à l'autre.^{1,7,8}

3) PARAMETRES D'OPTIMISATION

3.1) Préparation automatisée des mélanges

Lors du développement d'une méthode d'analyse automatisée en MS supramoléculaire, une part importante de la phase d'optimisation du Triversa Nanomate est consacrée au paramétrage du logiciel de pilotage qui permet de définir les volumes et hauteurs de prélèvement / dépôt des échantillons. Cette étape nécessite une attention particulière en raison notamment de la manipulation de faibles volumes (2-15 μL). En effet, une goutte supplémentaire restant suspendue au cône après prélèvement ou encore une goutte déposée sur les parois d'un puits lors du dépôt de liquide, sont autant de risques d'erreurs relevées durant les phases de mise au point et qu'il convient d'éviter à l'aide d'un positionnement adapté du mandrin lors des étapes de préparation des mélanges. Ainsi, la stratégie mise au point et adoptée lors de ce travail de thèse consiste à :

- ▶ **Prélever** l'échantillon en réduisant **au minimum la hauteur de cône plongeant dans le liquide**. Typiquement, la hauteur de prélèvement est ajustée de sorte que l'extrémité du cône se situe 0,6 mm **en-dessous** de la surface du liquide restant dans le puits après prélèvement. Cela permet de réduire le volume de liquide déposé à l'extérieur du cône.
- ▶ **Déposer** l'échantillon dans un puits **contenant déjà du liquide** (ex : tampon) et en positionnant l'extrémité du cône à 0,2 mm **au-dessus** de sa surface. Cette façon de faire évite de plonger le cône dans le liquide déjà présent et limite donc le risque qu'une goutte ne reste accrochée sur le cône au moment de son retrait. De plus, cela permet à la goutte naissante d'être absorbée par le liquide déjà présent (coalescence), évitant ainsi qu'elle ne reste accrochée sur la paroi latérale du puits sans être mélangée au reste de la solution.

Notons par ailleurs que ces réglages pouvant varier en fonction des volumes à manipuler, il convient, dans la mesure du possible, **d'adapter les concentrations** de départ des produits pour que des **volumes similaires** puissent être prélevés tout au long de l'expérience, minimisant ainsi les risques d'écart d'un échantillon à l'autre.

Finalement, un dernier point qu'il est important de mentionner concerne l'option « **air gap** » qui permet d'aspirer un faible volume d'air (typiquement 2 μL) juste avant de placer le cône contre la puce microfluidique. Cette astuce permet d'éviter que le liquide arrivant à ras du cône ne se répande sur la puce au moment du contact et nuise ainsi à l'étanchéité de la jonction cône-puce.

3.2) Optimisation du spray

La stabilité du spray émanant du *nozzle* dépend essentiellement de deux paramètres devant être soigneusement ajustés : la **différence de potentiel** et la **contre-pression** appliquées sur le liquide. La mise sous tension du liquide se fait via le cône conducteur qui est relié à l'alimentation électrique du robot, tandis que la contre-pression comprimant le liquide contre la puce est amenée par une ligne d'azote traversant le mandrin. L'optimisation de ces deux paramètres dépend fortement de la **composition du solvant** et ils doivent généralement être ajustés de paire : de manière générale, il convient d'augmenter les valeurs de la tension (V_{ESI}) et de la contre-pression (P_{ESI}) lorsque la viscosité du solvant augmente. Des valeurs de tensions de l'ordre de 1,5 à 2 kV et des valeurs de contre-pressions comprises entre 0,5 et 1 psi sont utilisées au laboratoire pour des solvants allant du mélange eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1 à des tampons 100% aqueux.

De manière intéressante également, le robot Triversa Nanomate est muni d'un dispositif permettant de mesurer en continu l'intensité du courant d'ions émis à partir du *nozzle* (I_{ESI} - figures 5 et 6), offrant ainsi la possibilité de suivre la **stabilité du spray** pendant l'infusion et de réajuster les valeurs de V_{ESI} et P_{ESI} en cas de besoin. De plus, le logiciel de pilotage dispose d'une option nommée « **spray sensing** » permettant de changer automatiquement de *nozzle* lorsque l'intensité du courant franchit les limites définies par l'utilisateur. Cette option trouve toute son utilité pour l'analyse en mode automatique d'échantillons provoquant ponctuellement un colmatage des *nozzles* qui se traduit par une chute du courant I_{ESI} .

Finalement, il a été noté durant ce travail de thèse que le réglage des valeurs de V_{ESI} et P_{ESI} peut également, dans certains cas, influencer la **finesse des pics** sur les spectres de masse. A titre d'exemple, la figure 5 représente les spectres de masse acquis pour un complexe protéine / ligand obtenus à deux tensions V_{ESI} différentes : la diminution de V_{ESI} permet de réduire de moitié l'intensité du courant et modifie considérablement l'allure du spectre de masse avec un affinement significatif des pics. Cette observation difficile à expliquer se produit parfois également lors du colmatage des *nozzles* (figure 6). Des observations similaires ont également été réalisées dans le cas des aiguilles nanoESI, contrairement cependant à la source ESI conventionnelle.

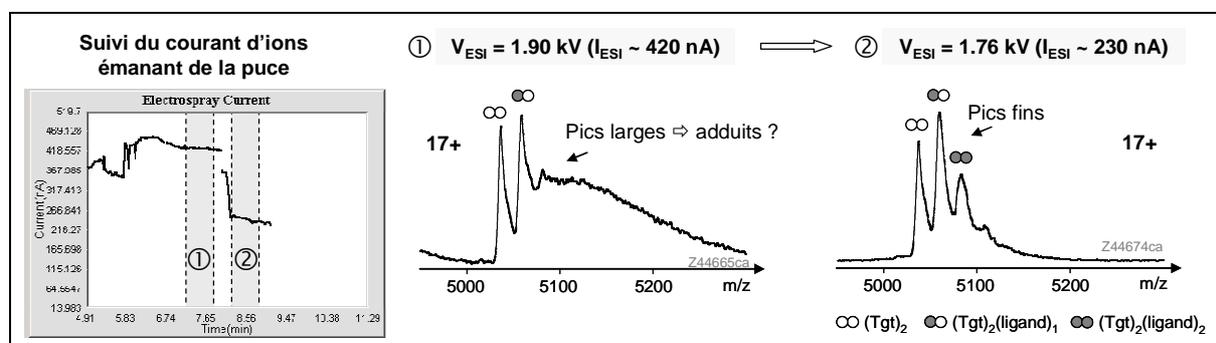


Figure 5 : Influence de la tension V_{ESI} sur la finesse des pics obtenus lors de l'analyse de Tgt (tRNA-guanine transglycosylase) à 10 μ M en présence de 50 μ M de ligand PK460 (500 mM NH_4Ac ; P_{ESI} = 0.9 psi ; V_c = 100 V, P_i = 6 mbar).

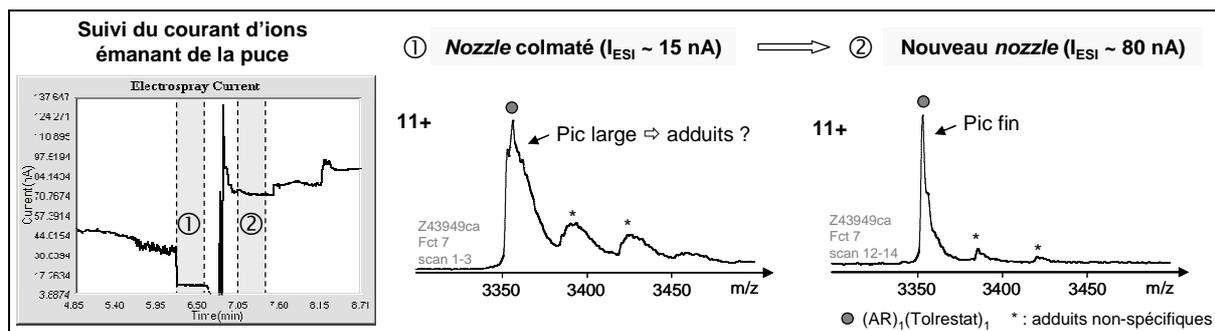


Figure 6 : Elargissement des pics engendré par le colmatage du *nozzle* (diminution de l'intensité du courant) lors de l'analyse du complexe protéine ligand Aldose réductase (AR) / Tolrestat (à 5 μM dans 10 mM NH_4Ac pH 6,8 ; $V_{\text{ESI}} = 1,75$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,75$ psi ; $V_c = 70$ V ; $P_i = 5$ mbar).

En résumé, pour chaque échantillon analysé sur le couplage Triversa Nanomate–LCT, l'optimisation instrumentale commence par la mise au point des volumes et hauteurs de prélèvement / dépôt des échantillons, suivi par l'ajustement de la **tension V_{ESI}** et de la **contre-pression P_{ESI}** .

4) CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DU TRIVERSA NANOMATE

4.1) Reproductibilité des mélanges et des injections sur puce nanoESI

A côté des avantages qu'apporte la source nanoESI en MS supramoléculaire, la préparation et l'utilisation d'aiguilles en verre peut être à l'origine de problèmes de reproductibilité.^{9, 10} Dans le cas du Triversa Nanomate, la reproductibilité des mesures dépend non seulement de la **reproductibilité du procédé de fabrication des puces nanoESI**, mais aussi de la **reproductibilité des étapes de mélange des échantillons** effectuées par le robot. Le test décrit par la figure 7 a ainsi été réalisé afin d'évaluer le critère de reproductibilité des mélanges et des injections sur puce nanoESI.

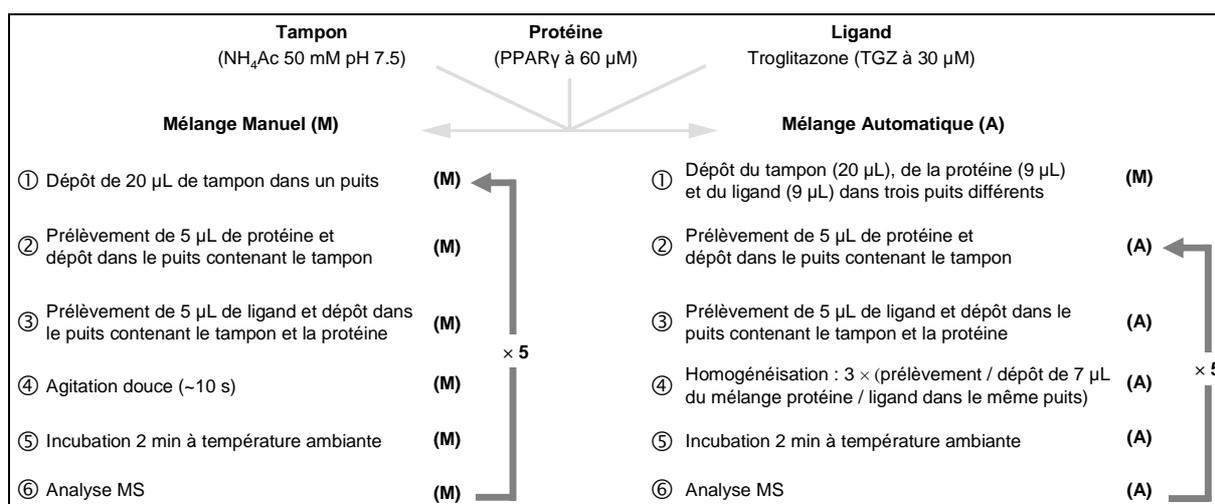


Figure 7 : Description du test mis en œuvre pour évaluer la capacité du Triversa Nanomate à fournir des résultats reproductibles en MS supramoléculaire. Le paramétrage du LCT est identique pour l'ensemble des expériences. PPAR γ : peroxysome proliferators activating receptor γ . (M) : Etape manuelle. (A) : Etape automatisée.

Les résultats de ce test de reproductibilité sont illustrés sur la figure 8. Premièrement, l'histogramme de la figure 8c illustre la capacité du robot à effectuer le **mélange des échantillons** d'une manière tout aussi **reproductible** que les mélanges effectués manuellement (écart-types similaires). De plus, la comparaison des intensités relatives de complexe mesurées dans le cas des mélanges manuels et automatisés, permet de s'assurer de la **justesse des volumes prélevés par le robot**.

Finalement, le coefficient de variation de 7,3% mesuré sur l'intensité du signal obtenu pour une même solution analysée à l'aide de cinq ($n = 5$) différents *nozzles* illustre la **reproductibilité du spray obtenu d'un nozzle à l'autre** (figure 8d). Cette valeur de 7,3% est en accord avec les résultats précédemment rapportés dans la littérature allant de 5,3% ($n = 5$) à 12,1% ($n = 10$).^{1, 7} La reproductibilité des résultats obtenus d'une puce à l'autre a, quant à elle, été estimée comme étant inférieure à 12% ($n = 5$).⁸

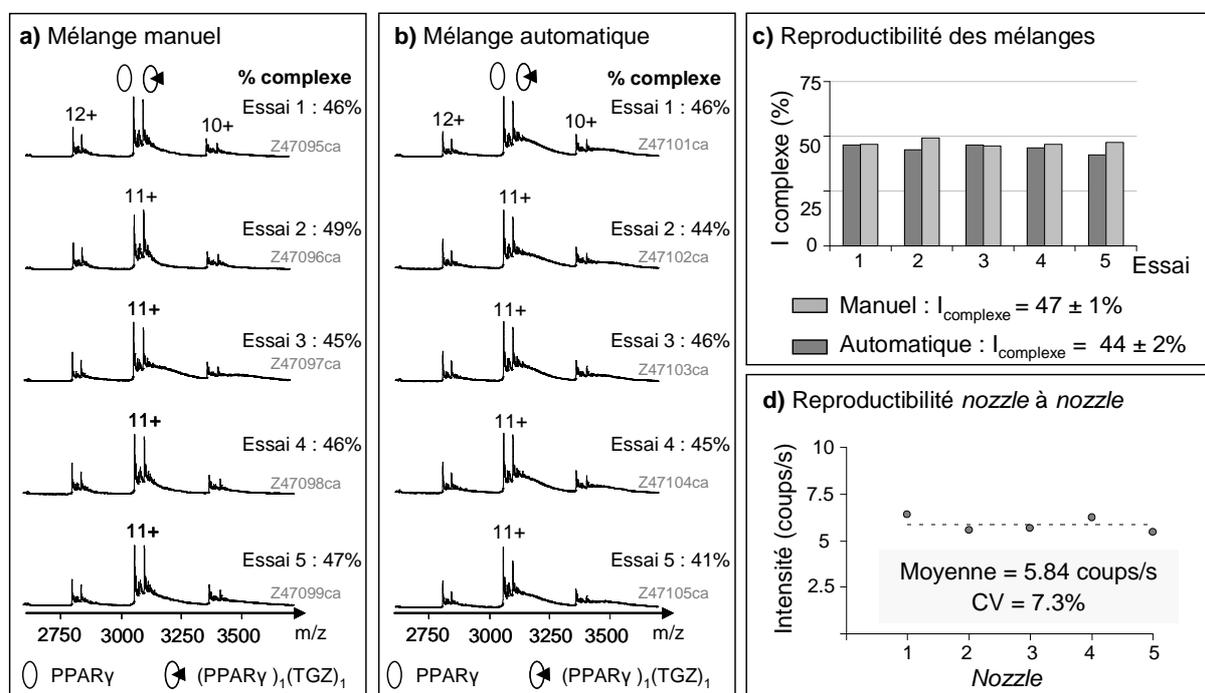


Figure 8 : Résultats du test de reproductibilité des mesures effectuées à l'aide du Triversa Nanomate. (a, b) Spectres de masse obtenus à partir de mélanges (a) manuels et (b) automatisés. (c) Reproductibilité des mélanges : l'intensité relative du complexe a été calculée à partir de la hauteur des pics des états de charge 10+ à 12+ de la protéine libre et du complexe. (d) Reproductibilité du signal de *nozzle* à *nozzle* : l'axe des ordonnées représente la somme des intensités des états de charge 10+ à 12+ de la protéine libre et du complexe. $V_{\text{ESI}} = 1,75 \text{ kV}$; $P_{\text{ESI}} = 0,75 \text{ psi}$; $V_c = 20 \text{ V}$; $P_i = 5 \text{ mbar}$.

4.2) Sensibilité et stabilité

La comparaison en termes de sensibilité entre la puce microfluidique et les aiguilles nanoESI en verre a été rapportée dans la littérature. Les données publiées sont cependant contradictoires, décrivant tantôt une perte de sensibilité d'un facteur 2,⁷ tantôt un gain de sensibilité d'un facteur 1,5-3.¹ Dans notre cas par contre, le passage de la source ESI conventionnelle à la source nanoESI sur puce microfluidique a été accompagné d'un net **gain de sensibilité**, et cela plus particulièrement dans le

cas des analyses réalisées en conditions non-dénaturantes, permettant ainsi de réduire les concentrations usuelles en protéine de 10-20 μM à 1-10 μM .

D'autre part, avec la mise en place du Triversa Nanomate, le **débit d'infusion** des échantillons est passé de 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ à environ 100 nL/min, offrant ainsi des temps d'acquisition de plusieurs dizaines de minutes à partir de quelques μL d'échantillon (figure 9a). De plus, il faut encore noter la **bonne stabilité** du signal obtenu dans le cas de la puce nanoESI, une caractéristique précédemment mentionnée dans la littérature et illustrée ici par la figure 9.^{1, 7}

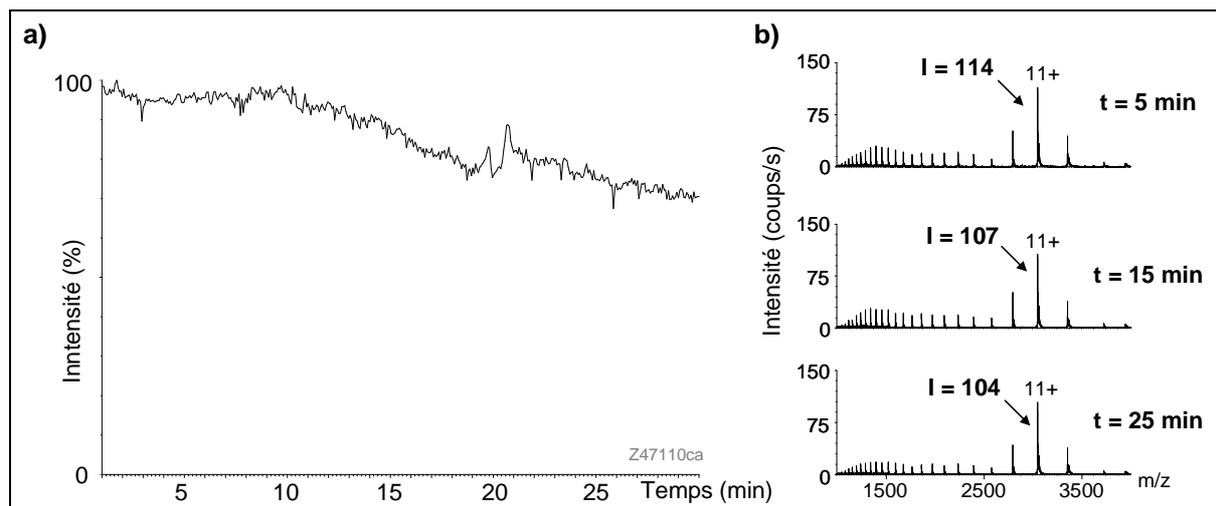


Figure 9 : Stabilité du signal produit par la puce nanoESI du Triversa Nanomate. (a) Evolution dans le temps du courant d'ion total obtenu pour l'analyse de PPAR γ à 10 μM dans un tampon NH_4Ac 50 mM pH 7,5. (b) Spectres de masse obtenus à différents temps d'acquisition montrant une intensité quasi-constante de l'état de charge 11+ de la protéine. $V_{\text{ESI}} = 1,75$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,75$ psi ; $V_c = 100$ V ; $P_i = 5$ mbar.

Le **gain de sensibilité**, la **réduction du débit d'infusion** ainsi que la **stabilité du signal** qu'offre le Triversa Nanomate ont permis dans notre cas de **réduire la consommation d'échantillon d'un facteur 10 à 100** en fonction des systèmes étudiés.

4.3) Distribution des états de charges

En MS supramoléculaire, l'analyse de la distribution des états de charge permet de remonter à des informations concernant la conformation des protéines en solution. Dans ce contexte, il a été observé que le **nombre moyen de charges** portées par les protéines analysées en conditions non-dénaturantes diminue lorsque l'on passe successivement de la source ESI conventionnelle, aux aiguilles nanoESI puis aux puces nanoESI (figure 10). Ce décalage de la distribution des états de charge a précédemment été mentionné dans la littérature,¹¹ et a probablement pour origine les différences de débit et de taille des gouttelettes chargées produites par ces différentes sources d'ionisation.

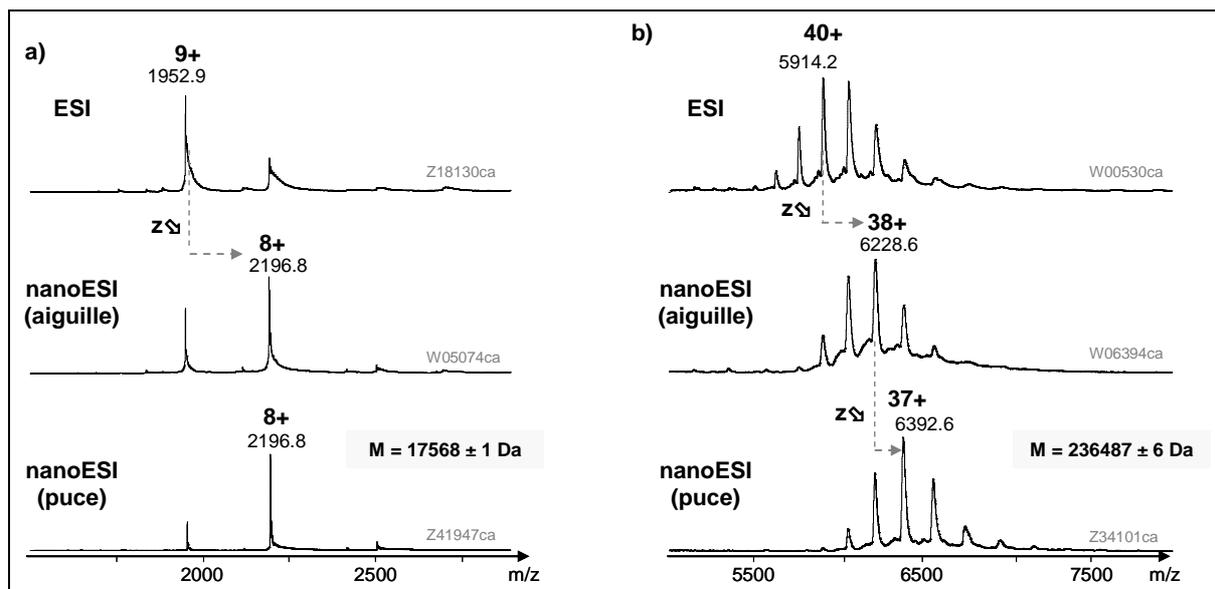


Figure 10 : Comparaison de la distribution des états de charge de protéines analysées en conditions non-dénaturantes à l'aide d'une source ESI, d'aiguilles nanoESI et de la puce microfluidique du Triversa Nanomate. (a) Analyse de la myoglobine de cœur de cheval à 5 μ M dans un tampon NH_4Ac 50 mM pH 6.8. (b) Analyse de Prx à 10 μ M en monomère dans un tampon NH_4Ac 150 mM pH 6.8. Diamètre interne des aiguilles nanoESI = 4 ± 1 μ m (PicoTip EmitterTM, New Objectives). Diamètre interne du nozzle = 5 μ m.

5) LIMITATIONS ET PERSPECTIVES D'AMÉLIORATION

5.1) Limitations concernant le mélange des échantillons

Concernant le système de mélange des échantillons, l'impossibilité de conserver les échantillons à une **température différente de celle requise pour les incubations** représente le principal inconvénient. Cette limitation pourrait être contournée en effectuant les mélanges dans une plaque différente de celle contenant les échantillons de départ, permettant ainsi d'intégrer deux systèmes réfrigérants indépendants.

Toujours dans cette voie d'amélioration, le système à effet Peltier actuellement en place ne permet que de réfrigérer les échantillons entre **4 et 20°C** et il pourrait donc être intéressant d'adapter le système pour atteindre des **températures plus élevées**, parfois nécessaires pendant l'incubation des échantillons.

Finalement, il faut encore noter que la partie du logiciel permettant d'automatiser les mélanges fait appel à des commandes basiques (aspirer, déposer, mélanger, etc.) qui nécessitent chacune **d'entrer manuellement un certain nombre de paramètres** (volumes, hauteurs de prélèvement et de dépôt, vitesse de prélèvement, etc). Bien qu'offrant certes une très grande flexibilité, cette interface logicielle pourrait être rendue plus **conviviale**, tout simplement par exemple en autorisant l'import de fichiers provenant de tableurs permettant de calculer automatiquement les différents volumes et autres paramètres de réglage.

5.2) Cas d'instabilité du signal

Bien que la stabilité du signal fourni par la puce microfluidique du Triversa Nanomate a été démontrée dans la littérature et illustrée dans ce chapitre (cf. 4.2), il faut noter que des **fluctuations du signal** peuvent être rencontrées dans certains cas, en particulier lorsque des **protéines peu stables** dans les tampons à base de sels d'ammonium sont à étudier.

En présence de tels échantillons, l'instabilité du courant d'ions émis par la puce est généralement suivie d'une perte définitive du signal, en raison probablement d'un colmatage du *nozzle* dû à la précipitation de la protéine. Alors que le changement automatique de *nozzle* (« *spray sensing* » - cf. 3.2) offre une solution viable dans le cas de colmatages ponctuels, il ne permet que de déplacer le problème de *nozzle* en *nozzle* lorsqu'une protéine instable est en cours d'analyse.

De manière intéressante cependant, il a été constaté durant ce travail de thèse qu'un ajustement des paramètres V_{ESI} et P_{ESI} au cours de l'analyse permet de prolonger la stabilité du spray obtenu dans le cas de protéines instables. Cependant dans l'état actuel du système, cet ajustement ne peut se faire que manuellement, limitant ainsi la possibilité d'automatiser les expériences aux cas de protéines suffisamment stables. Une amélioration potentielle du système pourrait donc consister à intégrer au logiciel de pilotage du Triversa Nanomate, une option qui, au lieu de changer de *nozzle* lorsque le courant franchit une certaine limite (cas de l'option *spray sensing* actuelle), permette de **réguler automatiquement les valeurs de V_{ESI} et P_{ESI} de sorte à maintenir le courant d'ions dans les limites définies par l'utilisateur.**

5.3) Perspectives d'amélioration de la puce microfluidique

Alors que la puce microfluidique intégrée au Triversa Nanomate présente déjà des performances remarquables, des améliorations potentielles sont à envisager. En effet, parmi les évolutions des puces nanoESI qui sont actuellement en cours de développement, figure la conception de puces capables d'ioniser les échantillons à l'aide de **nozzles multiples**.^{12, 13}

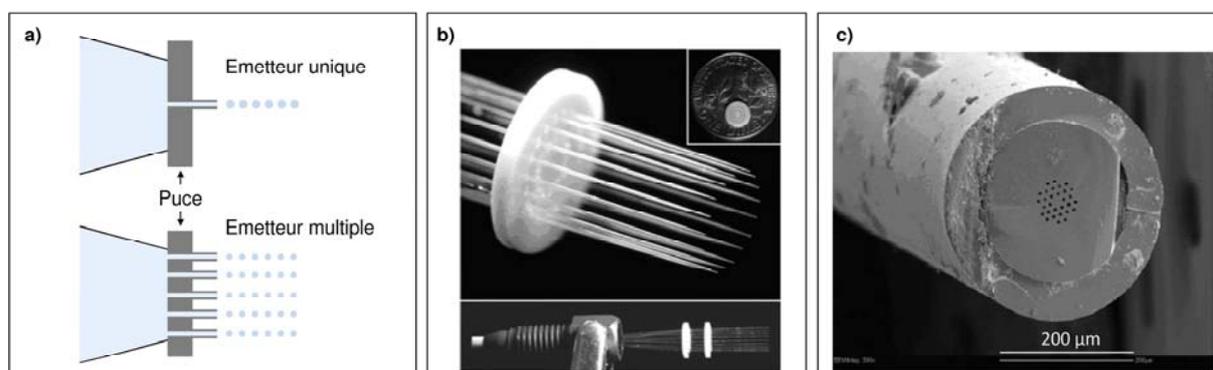


Figure 11 (a) Représentation schématique du principe des émetteurs nanoESI multiples. (b) Exemple d'un émetteur multiple produit par décapage chimique, d'après¹⁴. (c) Image de microscopie électronique à balayage d'une fibre microstructurée produisant 30 émetteurs d'un diamètre interne de 4-5 μm , d'après¹³.

En obtenant ainsi plusieurs sprays pour un même échantillon, la quantité d'ions simultanément produits est augmentée, **améliorant par conséquent la sensibilité générale** des spectromètres de masse. Le modèle décrit par le groupe de Smith indique en effet qu'à débit total constant, le courant d'ions total augmente proportionnellement à la racine carrée du nombre de *nozzles*.¹² Par ailleurs, la répartition du débit de liquide entre plusieurs *nozzles* permet de **réduire les problèmes de colmatage**,¹³ rendant cette piste d'amélioration particulièrement attractive dans le contexte de la MS supramoléculaire.

6) CONCLUSIONS

En intégrant un **système de mélange des échantillons et d'infusion nanoESI sur puce microfluidique**, le Triversa Nanomate présente de nombreux avantages en MS supramoléculaire en comparaison aux sources ESI conventionnelles et aux capillaires nanoESI en verre (tableau 1). En effet, la **facilité de mise en œuvre**, la **réduction de la consommation d'échantillon**, ainsi que la **reproductibilité** des mesures en font un outil idéal pour l'analyse de complexes non-covalents comme cela sera illustré dans la suite de ce manuscrit. De plus, les possibilités d'**automatisation** des expériences permettent désormais d'intégrer la MS supramoléculaire dans des programmes de **criblage** de ligands ciblant des protéines d'intérêt thérapeutique.^{7, 15-17} Finalement, dans ce contexte de haut débit d'analyses, il faut noter que l'investissement de départ ainsi que le coût des consommables du Triversa Nanomate peuvent être rapidement compensés par le gain de temps et l'économie d'échantillon que cet instrument apporte en comparaison à la source ESI conventionnelle et aux aiguilles nanoESI.

	Source ESI conventionnelle	Aiguilles nanoESI	Triversa Nanomate
Préparation des échantillons	Manuelle	Manuelle	Automatique
Temps de rinçage	5-10 min / analyse	/	/
Débit d'analyse	15-20 analyses / jour	15-20 analyses / jour	50-100 analyses / 8h (Analyse 24h/24h possible)
Risque de contamination	Oui	Non	Non
Reproductibilité	+	-	+
Consommation de protéine	0.8-1.5 nmol / analyse	0.01-0.1 nmol / analyse	0.01-0.1 nmol / analyse
Facilité de mise en œuvre	-	--	+
Rentabilité (moyen/long terme)	--	-	+

Tableau 1 : Tableau comparatif des caractéristiques des différentes sources ESI disponibles au laboratoire. Le débit d'analyse représente le débit maximum accessible pour des expériences de criblage.

CHAPITRE II

Automatisation des Analyses sur Puce Microfluidique en MS Supramoléculaire pour le Développement de Molécules à Visée Thérapeutique

Dans ce chapitre sont présentés les résultats d'un cas d'étude illustrant les possibilités offertes par le Triversa Nanomate pour la recherche et la caractérisation de ligands ciblant des protéines d'intérêt thérapeutique. Après avoir introduit le concept du criblage de ligands par spectrométrie de masse supramoléculaire, nous présenterons les résultats obtenus dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'équipe du Dr Gilles Prévost (Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg) portant sur l'étude des interactions entre des molécules de la famille des calixarènes et des toxines protéiques impliquées dans les maladies nosocomiales.

1) INTRODUCTION AU CRIBLAGE DE LIGANDS PAR MS SUPRAMOLECULAIRE

Dans le processus de développement de molécules à visée thérapeutique, la phase première d'identification d'une protéine cible impliquée dans une pathologie est suivie par la recherche de ligands capables de **moduler son activité**. L'une des stratégies alors mise en œuvre consiste à cribler des banques pouvant contenir plusieurs centaines de milliers de molécules dont la taille moyenne peut varier de 200 Da (criblage de fragments),¹⁷⁻¹⁹ à plusieurs centaines de Da dans le cas de banques de molécules plus élaborées.

Pour cela, un **criblage primaire** de haut débit est tout d'abord réalisé afin de sélectionner une première série de quelques dizaines ou centaines de molécules appelées « touches » ou « *hits* » (figure 1). Dans l'étape suivante, ces molécules sont soumises à un **criblage secondaire** permettant de sélectionner les molécules « *leads* », qui seront ensuite modifiées chimiquement pour optimiser leurs propriétés avant de passer au stade de développement clinique.

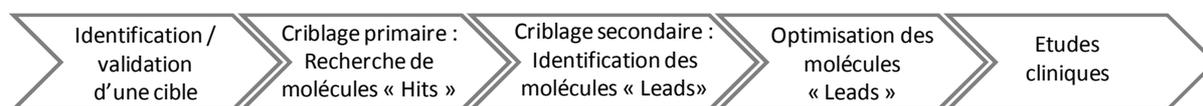


Figure 1 : Différentes étapes impliquées dans le processus de développement de molécules à visée thérapeutique, adapté d'après^{20, 21}.

Ces différentes étapes de sélection et d'optimisation font appel à des techniques analytiques complémentaires. En effet, lors du criblage primaire, les techniques de **haut débit** sont privilégiées (ex : techniques de fluorescence), alors que lors des étapes d'optimisation des *leads*, il convient de faire appel à des techniques fournissant un **important contenu informatif** afin de caractériser en détail les complexes protéine / ligand (ex : cristallographie).¹⁶ De manière générale, la MS peut intervenir dans la plupart de ces étapes, en allant de l'identification de la cible par des approches protéomiques jusqu'au contrôle qualité des produits finaux.^{21, 22}

En ce qui concerne plus particulièrement les phases de criblage primaire et secondaire, les approches faisant appel à la MS peuvent être classées en deux groupes : les **méthodes directes** et les **méthodes indirectes**.^{23, 24} Le principe des méthodes **indirectes** consiste à suivre **l'intensité du signal de ligands** en présence de protéine cible (figure 2a). Pour cela, la protéine est tout d'abord incubée en présence de ligands. Le mélange est ensuite séparé à l'aide de différentes techniques (SEC, ultrafiltration, immobilisation de la cible, etc.) pour recueillir d'un côté les complexes protéine / ligand, et de l'autre côté les ligands libres n'ayant pas été complexés par la protéine. Finalement, l'information de fixation du ligand est obtenue, soit en détectant une diminution de la concentration de ligand restant dans la solution de départ (figure 2a, étape ①), soit en dénaturant le complexe afin de détecter individuellement les ligands fixés à la protéine (figure 2a, étape ②).^{21, 24, 25} Les méthodes indirectes bénéficient généralement d'un haut débit d'analyse (plusieurs milliers de composés par jour) idéal pour l'étape de criblage primaire.^{23, 24} Par contre, l'obtention d'informations telles que la stœchiométrie d'interaction des ligands est plus difficile voire impossible à obtenir.²³

En comparaison, la **détection directe** par MS supramoléculaire de complexes non-covalents maintenus intacts en phase gazeuse (figure 2b), permet d'accéder à des informations cruciales concernant les complexes protéine / ligand (existence, stœchiométrie, spécificité, affinité, etc.), et peut donc apporter une contribution importante dans les étapes de validation des « hits » et d'optimisation des « leads ».^{26, 27} De plus, avec les possibilités d'automatisation récentes, la MS supramoléculaire représente désormais une alternative intéressante pour les criblages primaires de moyen débit.^{7, 15, 28}

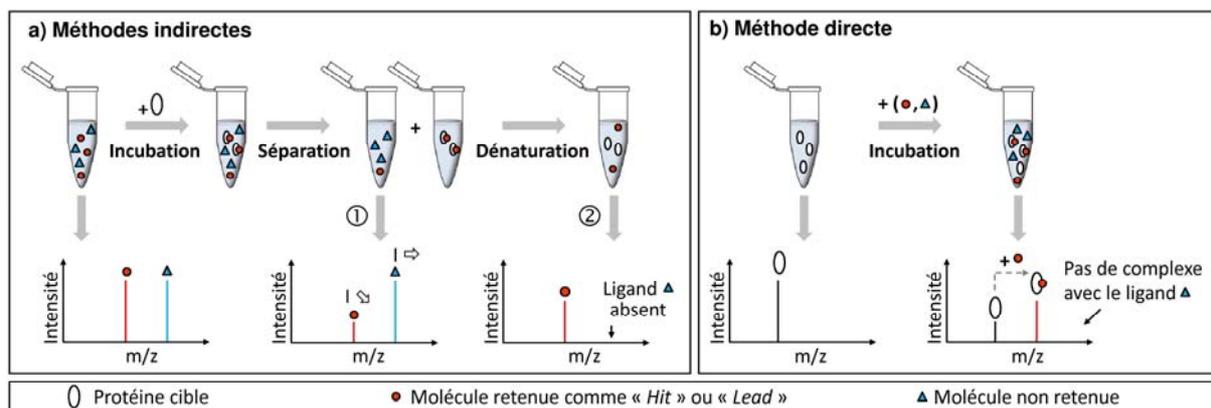


Figure 2 : Représentation schématique des méthodes de criblages (a) indirectes et (b) directe en MS.

Dans ce contexte de développement de molécules à visée thérapeutique, nous avons souhaité présenter dans la suite de ce chapitre les résultats d'une étude menée sur des complexes leucotoxine / calixarène. Cette étude a fait l'objet d'un développement méthodologique mettant à profit le potentiel offert par le robot Triversa Nanomate pour l'automatisation des expériences en MS supramoléculaire.

2) ETUDE DES INTERACTIONS MOLECULAIRES ENTRE LEUCOTOXINES ET CALIXARENES

2.1) Contexte de l'étude

Le développement d'une infection chez un patient lors de son hospitalisation (infection nosocomiale) est directement responsable de plusieurs milliers de décès par an en France.²⁹ Alors qu'une diminution de ces infections a été constatée en France entre 2001 et 2006, la prévalence reste encore de 5,4%, soit 1 patient infecté sur 20.^{30, 31} La gravité de ces infections est liée à l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques, parmi lesquelles on trouve notamment *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), également appelé staphylocoque doré et qui, à lui seul, est responsable de près de 19% des infections nosocomiales.³¹

En plus de la résistance aux antibiotiques qu'ont développée certaines souches, cette bactérie dispose d'un arsenal de facteurs de virulence qui la rendent également résistante au système immunitaire de l'hôte.³² Parmi ces facteurs de virulence figurent des toxines protéiques qui provoquent la lyse de leucocytes (cellules de la défense immunitaire de l'hôte), leur assignant le nom de « **leucotoxines** » ou « **leucocidines** ».³³ Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes plus

particulièrement intéressés à une sous-famille des leucotoxines : les **toxines à deux composés formant des pores** (figure 3).

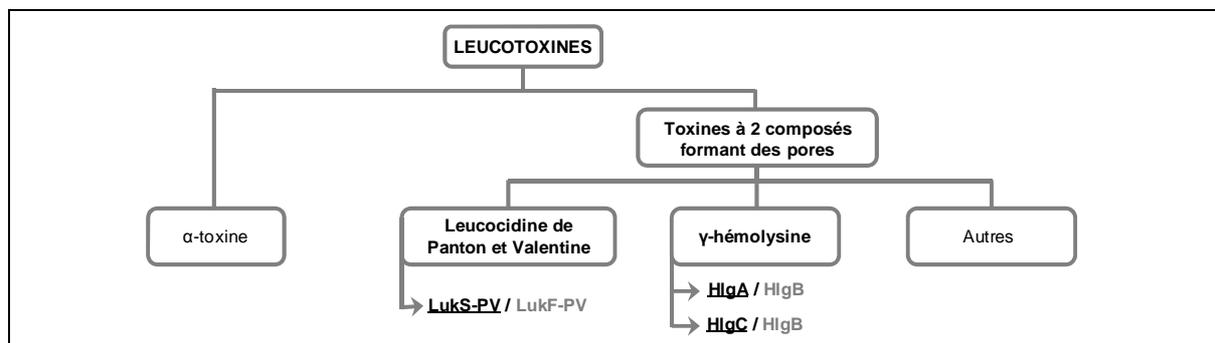


Figure 3 : Composition de la famille des leucotoxines sécrétées par le staphylocoque doré. Les protéines de classe S sont soulignées et les protéines de classe F sont notées en gris.

L'étude du mécanisme d'action de ces toxines fait apparaître l'implication de deux sous-unités, une protéine de **classe S** (31-32 kDa) et une protéine de **classe F** (34-35 kDa), dont la fixation sur la membrane des leucocytes permet la formation d'un oligomère S/F qui, après changement conformationnel, conduit à la formation d'un pore transmembranaire responsable de la lyse cellulaire (figure 4).³³⁻³⁷

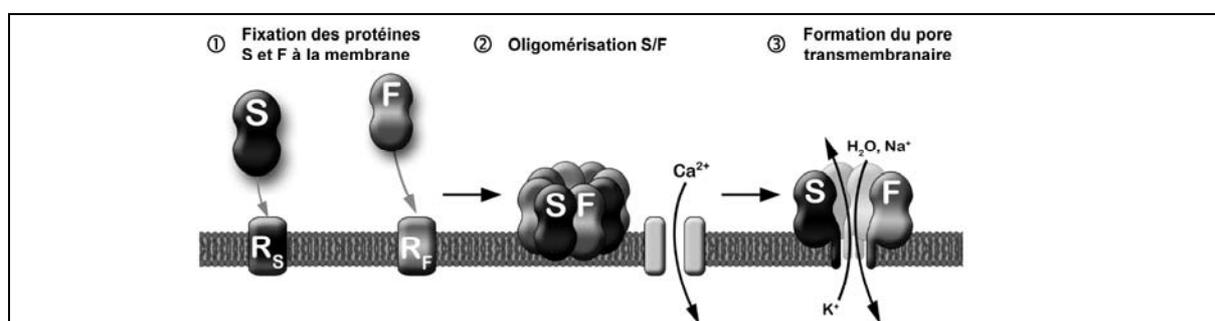


Figure 4 : Modèle représentant le mode d'action des toxines à deux composés formant des pores. Après fixation sur d'éventuels récepteurs membranaires (R_S et R_F - étape ①), l'oligomérisation des protéines de classe S et F est suivie de l'ouverture de canaux calciques (étape ②), puis en changeant de conformation, l'oligomère S/F engendre la formation d'un pore transmembranaire (étape ③).

En neutralisant ainsi les leucocytes, les toxines à deux composés formant des pores participent à la propagation de l'infection chez l'hôte et constituent de ce fait des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement des infections par le staphylocoque doré. Dans l'objectif de développer des stratégies thérapeutiques adjuvantes à l'antibiothérapie, l'équipe du Dr Gilles Prévost a pu démontrer par des tests *in vitro* et *in vivo* que des molécules chimiques de la famille des para-sulfonatocalix[n]arènes (SC_n - figure 5) sont capables d'inhiber l'activité de ces toxines de façon tout à fait prometteuse.³³ De plus, d'après des expériences de cytométrie en flux réalisées durant ces travaux préliminaires, l'hypothèse de mécanisme d'inhibition qui a été proposée consiste en une interaction directe entre calixarènes et protéines de classe S, empêchant leur fixation sur la

membrane des leucocytes et bloquant de ce fait le mécanisme de formation des pores transmembranaires. La MS supramoléculaire a ainsi été impliquée dans ce projet pour vérifier cette hypothèse et contribuer à la caractérisation d'éventuels complexes leucotoxine / calixarène.

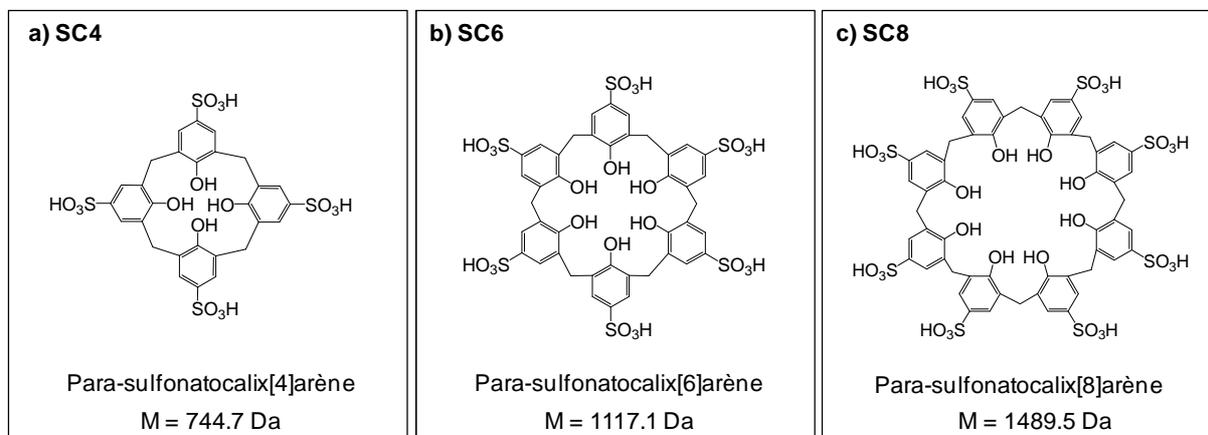


Figure 5 : Formule des para-sulfonatocalix[n]arènes étudiés.

2.2) Résultats de l'étude

2.2.1) Description de la stratégie expérimentale mise en œuvre

En partant de l'hypothèse de mécanisme issue des résultats préliminaires de cytométrie en flux, trois protéines de classe S (LukS-PV, HlgA et HlgC), une protéine de classe F (LukF-PV) et trois calixarènes (SC4, SC6 et SC8) ont été sélectionnés pour être étudiés par MS supramoléculaire afin de vérifier l'**existence** de complexes leucotoxine / calixarène et de caractériser les éventuels complexes en termes de **stœchiométrie**, de **nature des interactions** mises en jeu, de **spécificité** et d'**affinité**. La stratégie expérimentale exposée sur la figure 6 a ainsi été mise en œuvre pour répondre à ces différentes questions.

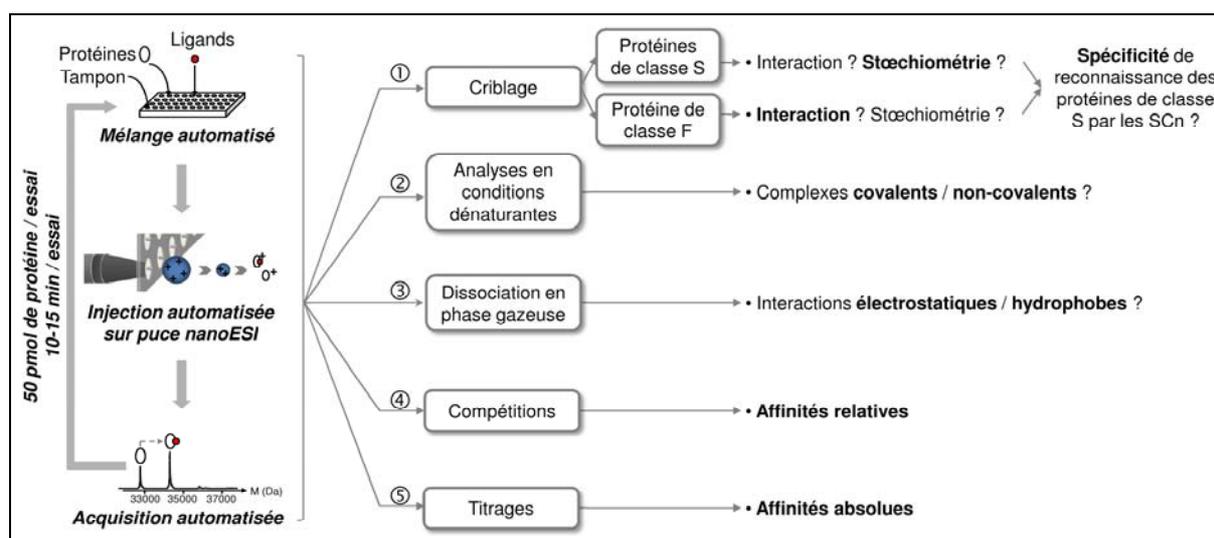


Figure 6 : Description de la stratégie expérimentale mise en œuvre pour la caractérisation des interactions leucotoxine / para-sulfonatocalix[n]arène.

2.2.2) Résultats du criblage

Dans un premier temps, un criblage a été réalisé afin de vérifier l'existence de complexes entre les trois ligands et les quatre protéines, soit douze combinaisons possibles. Pour cela, les protéines (5 μM) ont été incubées pendant 5 minutes à température ambiante en présence d'un excès de ligand (10 μM) afin de favoriser la formation d'éventuels complexes. Pour chaque analyse une rampe de tension d'accélération V_c a été appliquée au cours de l'acquisition, de sorte à passer progressivement de conditions douces permettant de maximiser les chances de détecter des complexes fragiles en phase gazeuse, à des conditions plus énergétiques favorisant la désolvatation et la transmission des ions. Ainsi, en cumulant la préparation du mélange, son incubation ainsi que la durée de l'acquisition, la durée totale d'une analyse a été portée à 15 minutes par échantillon.

La figure 7 représente les résultats de l'expérience de criblage dont les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- ▶ La détection de complexes protéine / ligand indique que les **para-sulfonatocalix[n]arènes sont bel et bien capables d'interagir directement avec les leucotoxines**, ce qui vient confirmer l'hypothèse émise suite aux expériences préliminaires de cytométrie en flux.³³
- ▶ D'après les différences de masse mesurées, les complexes protéine / ligand détectés sont tous de **stœchiométrie 1:1**.
- ▶ Alors que dans le cas des protéines de classe S, l'intensité relative des pics de complexes oscille entre 10 et 95% en fonction des couples protéine / ligand (figure 7a, b et c), elle ne dépasse jamais 10% dans le cas de la protéine de classe F (figure 7d). Le fait que de telles différences apparaissent sur les spectres de masse lors du passage des protéines de classe S aux protéines de classe F, permet de confirmer que les complexes détectés résultent bien d'une reconnaissance **spécifique en solution** et non pas d'un artefact de la technique.³⁸ De plus, au-delà de confirmer la fiabilité des résultats de MS supramoléculaire, cette observation est particulièrement importante car elle démontre que les **para-sulfonatocalix[n]arènes sont capables de reconnaître spécifiquement les protéines de classe S par rapport aux protéines de classe F**, venant ainsi corroborer les observations réalisées lors des expériences de cytométrie en flux.³³
- ▶ Finalement, parmi les protéines de classe S, des variations significatives apparaissent dans l'intensité relative des complexes, suggérant ainsi des **différences d'affinité** d'un calixarène à l'autre. Les affinités relatives et absolues de ces complexes seront étudiées dans la suite du chapitre.

NB : Les résultats obtenus dans le cas de LukF-PV ont été reproduits avec HlgB, la protéine de classe F de la toxine γ -hémolysine, confirmant ainsi la spécificité de reconnaissance des protéines de classe S par les para-sulfonatocalix[n]arènes.

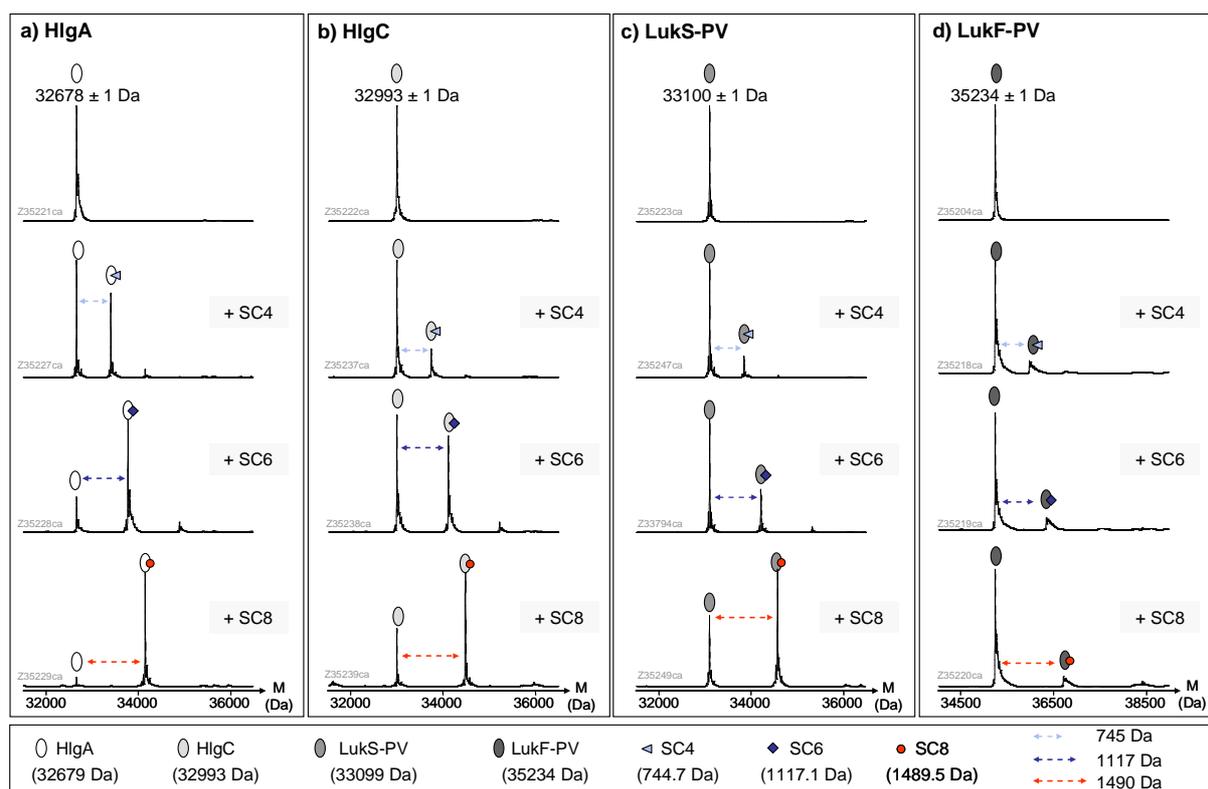


Figure 7 : Résultats du criblage des leucotoxines par les para-sulfonatocalix[n]arènes. (a-c) Les 3 protéines de classe S et (d) la protéine de classe F ont été incubées à 5 μ M dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5, soit seules (1^{ère} ligne), soit en présence de 10 μ M de ligand SC4 (2^{ème} ligne), SC6 (3^{ème} ligne) ou SC8 (4^{ème} ligne). Spectres de masse déconvolués à l'aide de MaxEnt I (MassLynx 4.1, Waters). $V_{\text{ESI}} = 1,85$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,90$ psi ; $V_c = 120$ V ; $P_i = 3,5$ mbar.

En résumé, cette étape de criblage a nécessité 4 h d'analyse et 200 pmol de chaque protéine au total, soit moins de 10 μ g, pour aboutir à la conclusion d'une **reconnaissance spécifique entre protéines de classe S et para-sulfonatocalix[n]arènes**, permettant ainsi la formation de complexes protéine / ligand de **stœchiométrie 1:1**.

2.2.3) Nature des interactions leucotoxine / calixarène

Afin d'accéder à des informations concernant le type d'interactions mises en jeu au sein des complexes protéine de classe S / para-sulfonatocalix[n]arène, une première série d'expériences de **dissociation des complexes en solution** a été réalisée afin de vérifier le **caractère non-covalent** de ces édifices. Pour cela, après incubation du mélange protéine / ligand, la formation du complexe a premièrement été vérifiée en conditions non-dénaturantes, puis, la solution a été ré-analysée après ajout d'acétonitrile et d'acide formique de sorte à dénaturer la protéine et à rompre les interactions non-covalentes. La figure 8 représente les résultats obtenus dans le cas du complexe LukS-PV / SC8 : le complexe préalablement détecté en conditions non-dénaturantes (figure 8a) est complètement dissocié après passage en milieu dénaturant (figure 8b), démontrant ainsi le caractère non-covalent des interactions intervenant dans le complexe LukS-PV / SC8. Des résultats identiques ont été obtenus pour les autres couples protéine / ligand.

Ensuite, des expériences de **dissociation en phase gazeuse** ont été menées afin de préciser la **nature de ces interactions**. Pour cela, les complexes analysés en conditions non-dénaturantes ont été soumis à des tensions d'accélération (V_c) croissantes afin de provoquer leur dissociation dans le spectromètre de masse. Cependant, à l'image du complexe LukS-PV / SC8 (figure 8c), aucun des édifices protéine / ligand n'a pu être dissocié dans les limites de tension V_c et de pression P_i accessibles sur le LCT. Les essais de dissociation menés dans la cellule de collision du MicrOTOF-Q ont abouti aux mêmes observations. Cette stabilité en phase gazeuse indique l'existence d'une **importante contribution des interactions électrostatiques** au sein du complexe,²⁶ impliquant fort probablement les groupements sulfonates du calixarène et les groupements ammonium des acides aminés tels que les lysines ou les arginines, comme cela a été décrit dans la littérature pour des systèmes biologiques comparables.^{39, 40}

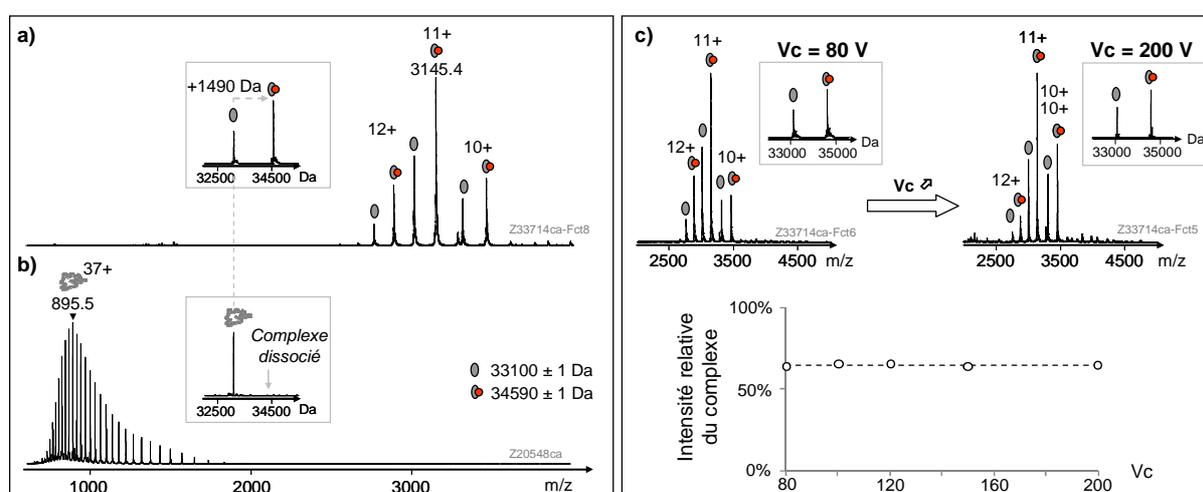


Figure 8 : Nature des interactions mises en jeu dans les complexes leucotoxine / calixarène – illustration dans le cas du complexe LukS-PV / SC8. Le complexe a été formé en incubant LukS-PV (5 μ M) en présence de SC8 (10 μ M) dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5. (a, b) Vérification du caractère non-covalent des interactions : analyse du complexe soit (a) en conditions non-dénaturantes (NH_4Ac 300 mM pH 7,5), soit (b) en conditions dénaturantes (eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1). (c) Stabilité du complexe en phase gazeuse : analyse du complexe en conditions non-dénaturantes (NH_4Ac 300 mM pH 7,5) à pression P_i fixe ($P_i = 3,5$ mbar) et à tension V_c variable. L'intensité relative du complexe a été évaluée en tenant compte de la hauteur des pics correspondant aux états de charge 10+ à 12+ de la protéine libre et de sa forme complexée. Dans les encadrés figurent les spectres de masse déconvolués à l'aide de MaxEnt1 (MassLynx, Waters).

Finalement, d'un point de vue pratique, il faut noter que ces expériences de dissociation en solution et en phase gazeuse peuvent être **combinées judicieusement** avec les expériences de criblage pour réduire la durée des analyses et ne pas consommer davantage d'échantillon. En effet, les expériences de dissociation en solution peuvent directement être réalisées à partir de la fraction de solution protéine / ligand inutilisée durant le criblage. De plus, en adaptant la rampe de tensions V_c utilisée lors du criblage comme c'est le cas ici, il est possible d'acquérir simultanément les données de CID nécessaires à l'étude de la stabilité des complexes en phase gazeuse. En procédant de cette manière, le bilan des expériences présentées dans ce paragraphe se résume à une durée d'analyse de 30 minutes et une consommation nulle d'échantillon.

2.2.4) Evaluation de l'affinité des complexes leucotoxine / calixarène

a) Expériences de compétition - Affinité relative des complexes

Lors des expériences préliminaires de criblage, des variations significatives ont été observées d'un couple protéine / ligand à l'autre concernant l'intensité relative des complexes formés, suggérant ainsi des différences d'affinité notables (cf. 2.2.2). Ainsi, des expériences de compétition ont été réalisées afin de classer les différents calixarènes en fonction de leur affinité relative pour les protéines de classe S. Les résultats de la figure 9 indiquent que quelle que soit la protéine de classe S considérée, l'affinité du complexe augmente avec la taille du calixarène, faisant du ligand SC8 le meilleur candidat. Ces différences d'affinité sont potentiellement à relier au nombre de groupements sulfonates disponibles, mais également à la plus grande flexibilité du ligand SC8, lui permettant hypothétiquement d'adopter la conformation nécessaire pour que les interactions non-covalentes avec la protéine puissent s'établir. Par ailleurs, il est intéressant de préciser que les tests d'activité réalisés par cytométrie en flux ont également montré un pouvoir inhibiteur accru dans le cas du calixarène SC8 (résultats en cours de publication). Pour terminer, notons finalement que ces expériences de compétition ont nécessité 50 pmol de chaque protéine pour une durée totale d'analyse de 30 minutes.

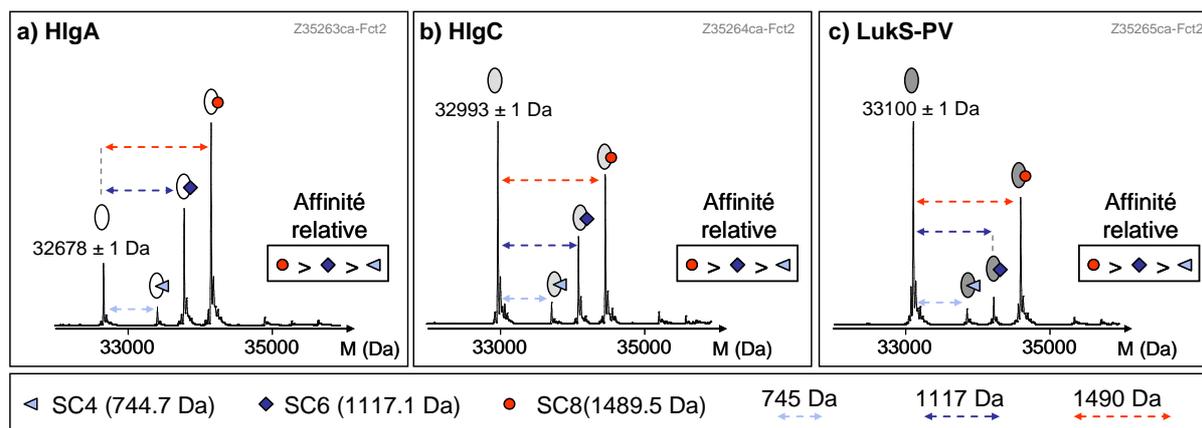


Figure 9 : Expériences de compétition entre les trois para-sulfonatocalix[n]arènes pour la fixation des protéines de classe S. (a) HlgA, (b) HlgC et (c) LukS-PV ont été incubées à 5 μ M dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5 contenant les ligands SC4, SC6 et SC8 en proportions équimolaires (5 μ M chacun). Spectres de masse déconvolués à l'aide de MaxEnt I (MassLynx 4.1, Waters). $V_{\text{ESI}} = 1,85$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,90$ psi ; $V_c = 120$ V ; $P_i = 3,5$ mbar.

b) Expériences de titrage - Affinité absolue des complexes

Dans la mesure où le ligand SC8 apparaît comme le meilleur candidat parmi les trois para-sulfonatocalix[n]arènes, ce ligand a été sélectionné pour réaliser des expériences de titrage visant à déterminer la constante de dissociation (K_d) des complexes formés avec les protéines de classe S. Pour cela, les protéines dont la concentration a été fixée à 5 μ M, ont été incubées en présence de concentrations croissantes de ligand SC8. La quantification des différentes espèces sur les spectres de masse a été réalisée en considérant l'intensité des pics correspondant aux trois états de charge principaux de la protéine libre et de sa forme complexée (10+, 11+ et 12+). De plus, la détermination

du K_d a été réalisée en tenant compte de différences éventuelles dans le facteur réponse de la protéine libre et du complexe. En effet, deux raisons principales peuvent expliquer ce choix :

- ▶ Premièrement, en considérant la masse (1489,5 Da) et la structure cyclique du ligand SC8, il est fort probable qu'il se fixe non pas dans une poche enfouie au sein de la protéine mais plutôt en **surface**, là où il risque davantage de modifier les **propriétés de la protéine au moment de l'ionisation**.
- ▶ Deuxièmement, en se fixant sur la protéine, il est très probable que le ligand SC8 **modifie sa charge nette en solution** en raison des huit groupements sulfonates qu'il porte, ce qui risque également de modifier l'**efficacité d'ionisation** de la protéine.

Ainsi, en raison de ces risques potentiels de discrimination entre le facteur réponse de la protéine libre et de sa forme liée au ligand SC8, la détermination du K_d a été effectuée à l'aide du modèle mathématique suivant (équation (7)) qui est dérivé de travaux disponibles dans la littérature :⁴¹

Pour l'équilibre de complexation : $P + L \rightleftharpoons PL$

On écrit :

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (5)$$

On pose :

$$\frac{[PL]}{[P]} = t \times \frac{I_{PL}}{I_P} \quad (6)$$

D'où :

$$\frac{I_{PL}}{I_P + I_{PL}} = \frac{C_L - K_d - C_P + \sqrt{C_L^2 + (K_d + C_P)^2 + 2 \cdot C_L \cdot (K_d - C_P)}}{2 \times K_d \cdot t + C_L - K_d - C_P + \sqrt{C_L^2 + (K_d + C_P)^2 + 2 \cdot C_L \cdot (K_d - C_P)}} \quad (7)$$

Avec : P : Protéine

L : Ligand

PL : complexe 1:1 protéine : ligand

$[Z]$: concentration molaire de l'espèce Z

t : facteur réponse relatif

I_{PL} : somme des intensités des pics de complexe PL

I_P : somme des intensités des pics de protéine libre P

C_P : concentration molaire totale de protéine ($C_P = [P] + [PL]$)

C_L : concentration molaire totale de ligand ($C_L = [L] + [PL]$)

Dans l'équation (7), les intensités I_P et I_{PL} sont évaluées sur les spectres de masse, les concentrations C_P et C_L sont connues et il ne reste donc que les valeurs de t et de K_d qui peuvent être déterminées par ajustement de ce modèle mathématique aux données expérimentales. Notons toutefois que l'hypothèse sous-jacente à ce modèle est que le paramètre t reste constant sur la gamme de titrage.⁴¹

Les courbes de titrages de la figure 10 font apparaître que les trois protéines de classe S présentent des valeurs **similaires de K_d qui sont de l'ordre de $1 \mu\text{M}$** . De manière intéressante, les résultats des expériences de cytométrie en flux indiquent également un pouvoir inhibiteur similaire du ligand SC8 sur la leucocidine de Panton et Valentine et sur les γ -hémolysines A et C (résultats en cours de publication).

D'autre part, pour les trois protéines étudiées, les valeurs du facteur réponse t sont supérieures à 1, ce qui d'après l'équation (6) signifie qu'à concentrations égales en solution, le signal de protéine libre sur le spectre de masse sera plus intense que celui du complexe. Cet écart par rapport au cas idéal où la protéine et le complexe répondent de la même manière ($t = 1$) engendre une erreur sur la détermination du K_d environ proportionnelle au facteur t , soulignant ainsi **l'importance de tenir compte du facteur réponse des différentes espèces** pour la détermination des constantes de dissociation.

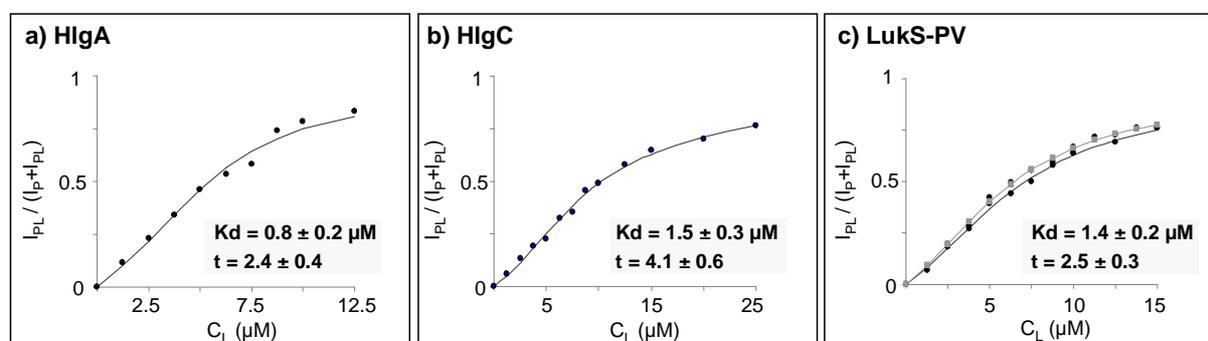


Figure 10 : Titration des protéines de classe S par le calixarène SC8. (a) HlgA, (b) HlgC et (c) LukS-PV ont été incubées à $5 \mu\text{M}$ dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH $7,5$ en présence de concentrations croissantes de ligands SC8 (C_L). (c) En gris est représenté le résultat d'un titrage réalisé à 2 mois d'intervalle (résultats : $K_d = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ et $t = 2,2 \pm 0,2$). L'ajustement du modèle mathématique aux données expérimentales a été réalisé à l'aide du logiciel SigmaPlot 2000. Les erreurs sur la détermination des valeurs de K_d et de t correspondent aux écart-types représentant la qualité de l'ajustement. $V_{\text{ESI}} = 1,85 \text{ kV}$; $P_{\text{ESI}} = 0,90 \text{ psi}$; $V_c = 120 \text{ V}$; $P_i = 3,5 \text{ mbar}$.

Finalement, le titrage de LukS-PV par le ligand SC8 a été reproduit à deux mois d'intervalle en travaillant pour cela dans des conditions expérimentales et instrumentales strictement identiques (figure 10c - courbe grise). Les valeurs obtenues pour le K_d et le facteur réponse t lors de ce second titrage ($K_d = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ et $t = 2,2 \pm 0,2$) sont en bon accord avec les résultats du premier titrage ($K_d = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ et $t = 2,5 \pm 0,3$), confirmant ainsi la reproductibilité de la technique pour l'évaluation de l'affinité de complexes protéine / ligand. Concernant la consommation d'échantillon et la durée des analyses, un titrage réalisé dans ces conditions de concentration et comportant en moyenne dix points de mesure nécessite 500 pmol de protéine et environ 90 minutes d'analyse.

2.3) Bilan de l'étude des interactions leucotoxine / calixarène

En réponse aux questions initialement posées (cf. 2.2.1), les résultats de cette étude ont permis de montrer que les para-sulfonatocalix[n]arènes reconnaissent de manière **spécifique les protéines de classe S** pour former des complexes **non-covalents** de **stœchiométrie 1:1**, dont la stabilité est

assurée par une **contribution importante des interactions électrostatiques**. De plus, ces expériences ont permis de montrer que **l'affinité des complexes formés avec les protéines de classe S augmente avec la taille du calixarène** pour atteindre finalement des **constantes de dissociation de l'ordre de 1 μ M dans le cas du ligand SC8**.

D'un point de vue pratique, les possibilités d'**automatisation des mélanges** et d'**analyse sur puce nanoESI** qui sont offertes par le Triversa Nanomate ont permis de recueillir ces informations en limitant la consommation totale de protéine à **2,5 nmol** (soit moins de 100 μ g) pour une durée d'analyse d'environ **10 h**. Il faut par ailleurs noter que les développements méthodologiques réalisés lors de cette étude pourront être mis à profit dans la suite du projet. En effet, le criblage de nouveaux ligands ou encore l'effet de mutations ponctuelles des protéines sur les propriétés de reconnaissance des calixarènes sont autant de cas où la MS supramoléculaire est susceptible d'intervenir en complément à d'autres techniques biophysiques.

3) CONCLUSIONS

Alors que l'exemple traité dans ce chapitre illustre essentiellement l'apport de l'automatisation des analyses en MS supramoléculaire pour la **caractérisation** de complexes protéine / ligand, les développements méthodologiques qui ont été réalisés durant ce travail de thèse permettent désormais de cribler près d'une centaine de molécules en 10 h. Ces développements ont récemment été mis en application lors d'un criblage d'une banque de 350 fragments moléculaires visant à identifier des ligands capables de se lier spécifiquement à la protéine HSP90 (*heat shock protein 90*). La sélection des fragments par MS supramoléculaire a été suivie d'une étude cristallographique ayant permis d'obtenir la structure tridimensionnelle de la protéine en complexe avec certains de ces fragments, constituant ainsi un point de départ pour la synthèse de ligands plus élaborés.¹⁷

Pour conclure, il est important de souligner que la MS supramoléculaire apparaît d'une part comme une **technique de criblage primaire de moyen débit**, compatible avec des banques contenant plusieurs centaines voire quelques milliers de molécules, et, d'autre part comme une **technique de caractérisation** pouvant intervenir lors de l'étape de criblage secondaire ainsi que lors de la phase d'optimisation des *leads*. Cette **versatilité** de la MS supramoléculaire en fait une technique de choix dans le contexte de la recherche de molécules à visée thérapeutique.

4) VALORISATION

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet a fait l'objet des communications suivantes :

- ▶ **Communication orale** : Atmanene C, Keller D, Prévost G, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Etude des interactions leucotoxines / calixarènes par spectrométrie de masse des complexes non-covalents. 12^{èmes} rencontres du club des jeunes de la société française de spectrométrie de masse, 19-23 mars 2007, Saint-Dié des Vosges.
- ▶ **Communication par affiche** : Atmanene C, Keller D, Prévost G, Dalla Serra M, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Noncovalent mass spectrometry for the study of leucotoxins / calixarenes interactions. Biophysics of ligand binding to drug targets, 14-16 mai 2007, Strasbourg.

De plus, l'apport de la MS supramoléculaire pour l'étude de complexes protéine / ligand a fait l'objet d'une revue soumise dans *Future Medicinal Chemistry* :

- ▶ **Publication** (cf. Travaux annexes): Vivat Hannah V, Atmanene C, Zeyer D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Native Mass Spectrometry: an "ESI" Way to Support Structure- and Fragment-Based Drug Discovery. *Future Medicinal Chemistry*, **sous presse**.

CHAPITRE III

Etude de l'Etat d'Oligomérisation de la Protéine DAPK : Mise en Evidence d'une Relation Structure–Activité

Les résultats présentés dans ce chapitre se rapportent à l'étude de l'état d'oligomérisation de la protéine DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*). Dans cette collaboration avec l'équipe du Pr Jacques Haiech (Faculté de Pharmacie, Strasbourg), les résultats croisés de spectrométrie de masse supramoléculaire et de spectroscopie de fluorescence ont permis de proposer un modèle reliant l'état d'oligomérisation à l'activité du domaine catalytique de DAPK.

1) CONTEXTE DE L'ETUDE

Les protéines intervenant dans le déclenchement des processus de mort cellulaire jouent un rôle essentiel dans des pathologies comme le cancer. Parmi elles, DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*) a fait l'objet de nombreux travaux qui ont démontré son implication dans différentes voies de signalisation conduisant au déclenchement des mécanismes de mort cellulaire, faisant ainsi de cette protéine une cible thérapeutique particulièrement intéressante.^{42, 43}

Parmi les différents domaines qui composent cette protéine de 160 kDa, figure un domaine catalytique à activité kinase localisé à l'extrémité N-terminale de la séquence en acides aminés et qui confère à DAPK son rôle spécifique dans la régulation de la mort des cellules.⁴² La résolution de la structure cristallographique de ce domaine kinase a révélé la présence à proximité du site catalytique d'une boucle basique caractéristique des protéines de la famille de DAPK.⁴⁴ De plus, il a été montré que cette boucle basique intervient directement dans l'interaction entre DAPK et ZIPK, une protéine de la même famille présentant une similarité de séquence de 80%.⁴⁵ En partant de cette observation, nous avons souhaité étudier l'hypothèse de formation d'un homodimère de DAPK, ainsi que l'implication d'une telle interaction sur l'activité du domaine catalytique de la protéine. Dans le cadre de ce projet, les résultats obtenus conjointement par MS supramoléculaire et par spectroscopie de fluorescence ont fait l'objet d'une publication soumise dans *PLoS ONE* (cf. page 111) dont un résumé des principaux résultats figure ci-dessous.

2) RESUME DE LA STRATEGIE MISE EN ŒUVRE ET DES RESULTATS OBTENUS

2.1) Détermination de l'état d'oligomérisation de DAPK – Importance de la boucle basique

La détermination de l'état d'oligomérisation du domaine catalytique de DAPK a été réalisée conformément à la stratégie présentée dans la première partie de ce manuscrit (Partie I, Chapitre III, 2.2.1). La comparaison entre les masses mesurées en conditions dénaturantes et non-dénaturantes a ainsi permis de mettre en évidence l'existence d'un **équilibre monomère / dimère** de la protéine.

De plus, lors de l'étape d'optimisation des conditions de tampon, il a été remarqué que l'augmentation de la concentration en acétate d'ammonium déplace cet équilibre vers la forme monomérique de la protéine. Le fait que cet équilibre soit sensible à la force ionique du tampon suggère l'existence au sein du complexe **d'interactions électrostatiques** provenant potentiellement de l'implication de la boucle basique dans la formation de l'homodimère (comme cela est le cas au sein du complexe DAPK / ZIPK).⁴⁵

Pour évaluer cette hypothèse, un mutant du domaine catalytique de DAPK a été produit par délétion d'une partie de la boucle basique. L'analyse de la protéine mutée par MS supramoléculaire a révélé la

présence exclusive de monomère, soulignant ainsi **l'importance de la boucle basique dans le processus de dimérisation de DAPK**.

2.2) Relation entre état d'oligomérisation et état de phosphorylation

Les spectres de masse nanoESI obtenus en conditions dénaturantes pour la protéine sauvage (DAPKwt) et sa forme mutée (DAPKdel) ont révélé l'existence de la protéine sous deux formes distinctes d'environ 80 Da, laissant supposer la présence d'une **phosphorylation**. L'étude réalisée simultanément au laboratoire par Laetitia Fouillen a permis de confirmer la présence d'une phosphorylation sur chacune des protéines et de montrer que le site de phosphorylation diffère entre la protéine sauvage et son mutant de délétion.

Pour comprendre l'origine de cette modification post-traductionnelle, nous avons souhaité tester la capacité du domaine kinase à s'autophosphoryler. Pour cela, après incubation en présence d'ATP (adénosine triphosphate) et de magnésium (Mg^{2+}), DAPKwt a été analysé en conditions dénaturantes, révélant ainsi une augmentation significative de l'intensité relative de la forme phosphorylée de la protéine et confirmant de ce fait la **capacité du domaine kinase à s'autophosphoryler**. De manière intéressante également, l'analyse en conditions non-dénaturantes de DAPKwt après autophosphorylation a mis en évidence une diminution significative de la proportion de dimère, suggérant ainsi l'existence d'un **lien entre état d'oligomérisation et état de phosphorylation**.

2.3) Mise en évidence d'une relation structure-activité

Les expériences de fluorescence et de MS supramoléculaire ont toutes les deux mis en évidence que la fixation d'ATP (substrat de la réaction de phosphorylation) induit la monomérisation de la protéine. De plus, les expériences de fluorescence ont également montré que l'affinité de DAPK pour l'ATP est supérieure dans des conditions de tampon favorisant la forme monomérique de la protéine. Ces résultats suggèrent ainsi que le **monomère correspond à la forme active de la kinase**.

3) CONCLUSION DE L'ETUDE

En plaçant l'ensemble de ces données dans le contexte actuel des connaissances accumulées dans la littérature sur DAPK,⁴³ nous avons proposé un modèle de **régulation de l'activité de la protéine sur la base d'une relation structure-activité**. Dans ce modèle, le passage du dimère au monomère de protéine permet de libérer **l'accès au site catalytique de la protéine**, résultant ainsi en une « **activation** » **des propriétés catalytiques de DAPK**. De plus, les résultats de MS supramoléculaire montrant un **lien entre état d'oligomérisation et état de phosphorylation** offrent une première piste d'étude pour comprendre les mécanismes qui provoquent le passage de la forme passive à la forme active de la protéine.

Finalement, il faut noter que le nanospray sur puce microfluidique a contribué de manière importante au succès de cette étude. En effet, la **faible consommation d'échantillon** et la **facilité de mise en œuvre du nanospray** permettent désormais de tester de nombreuses conditions de tampon lors de la phase d'optimisation des conditions expérimentales, ce qui dans le cas de la source ESI conventionnelle est souvent compromis par la consommation excessive de protéine. C'est ainsi qu'il a été possible dans la présente étude de mettre en évidence le rôle de la force ionique du tampon sur l'état d'oligomérisation de la protéine, ce qui a joué un rôle déterminant dans les expériences de spectroscopie de fluorescence (cf. article page 111).

4) VALORISATION

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont l'objet d'un article soumis dans *PLoS One* :

- ▶ **Publication** : Zimmermann M, Atmanene C, Xu Q, Fouillen L, Van Dorsselaer A, Bonnet D, Marsol C, Hibert M, Sanglier-Cianferani S, Pigault C, Watterson DM, Kilhoffer MC, Haiech J. Homodimerization of the Death-Associated Protein Kinase is Central to its Regulation. *PLoS One*, **soumis**.

PUBLICATION

« Homodimerization of the Death-Associated Protein Kinase is Central to its Regulation »

Michael Zimmermann, Cédric Atmanene, Qingyan Xu, Laetitia Fouillen, Alain Van Dorsselaer,
Dominique Bonnet, Claire Marsol, Marcel Hibert, Sarah Sanglier-Cianferani, Claire Pigault, D. Martin
Watterson, Marie-Claude Kilhoffer, Jacques Haiech

Article soumis pour publication dans *PLoS One*

Homodimerization of the Death Associated Protein Kinase is Central to its Regulation

Michael Zimmermann^{1,2}, Cédric Atmanene³, Qingyan Xu^{1,4}, Laetitia Fouillen³, Alain Van Dorsselaer³, Dominique Bonnet¹, Claire Marsol¹, Marcel Hibert¹, Sarah Sanglier-Cianferani³, Claire Pigault¹, D. Martin Watterson⁵, Marie-Claude Kilhoffer¹, Jacques Haiech^{1*}

¹ UMR CNRS 7200, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch

² current address: Harvard Medical School, 240 Longwood Avenue, Boston MA 02115

³ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, 67 087 Strasbourg, France

⁴ School of Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian Province 361005, China

⁵ Feinberg Chair, Northwestern University, Chicago

* Corresponding author: haiech@pharma.u-strasbg.fr

Abstract

Death-Associated Protein Kinase (DAPK) is a member of the Ca²⁺/calmodulin regulated serine/threonine protein kinases. Its biological function has been associated with induced cell death, which makes this protein an interesting biological target for research related to neuronal injuries and oncology. In the here presented in vitro study, we show the possibility of homodimerization of DAPK's catalytic domain and the crucial role of a specific basic loop in this process. Furthermore, two new auto-phosphorylation sites have been localized within the kinase domain and could be related to the oligomerization state of DAPK's catalytic domain. A chemical biological approach has been used to find fluorescent probe allowing DAPK's oligomerization state to be monitored.

Based on our experimental findings, structural analysis of the protein and previously reported characteristics of the DAPK-family proteins, a comprehensive model of the regulation and activation of DAPK's core domain is proposed in the present report. For the first time, we suggest a regulated monomer/dimer equilibrium process as being a part of the molecular switch between cellular survival and the different forms of induced cell death. The monomer is the most active form of the enzyme in this equilibrium.

Keywords: Death Associated Protein Kinase (DAPK); Homodimerization; Induced Cell Death; Fluorescence Anisotropy; Noncovalent mass spectrometry

Abbreviations: DAPK, Death Associated Protein Kinase; CaM, Calmodulin; HTS, High Throughput Screening; nanoESI-MS, Nanoelectrospray ionization mass spectrometry; huMLCK, Human Myosin Light Chain Kinase; NH₄Ac, Ammonium acetate; nanoLC-MS/MS, nanoliquid chromatography coupled tandem mass spectrometry; FP, Fluorescence polarization

Introduction

Death-Associated Protein Kinase (DAPK) was first identified in a functional screening assay that aimed at identifying genes involved in interferon- γ induced cell death [1]. Besides its N-terminal kinase domain the gene codes for a calmodulin(CaM)-binding sequence, ankyrin repeats, P-loops, a cytoskeleton binding region, and a death domain (for review see [1,2]). Various studies were performed to investigate the role and the activation mechanism mediated by the interplay of CaM and the auto-phosphorylatable binding region of DAPK, which directly follows its catalytic core [3,4]. The heterologous expression of the catalytic core of DAPK in *E. coli* results in a constitutively active kinase, whose structure has been resolved and which was earlier exploited for the

identification of a first synthetic substrate peptide, as well as for the discovery of inhibitory small molecules [5,6,7,8].

Even though the biological function of DAPK always centers on induced cell death, its observed implications in this process are diverse in terms of upstream and downstream occurring events. These eventually lead to different cellular outputs that might even be converse among themselves. In this way, a growing dataset describes DAPK as an anti-apoptotic factor [9] or even a growth factor [10] rather than a pro-apoptotic trigger under given conditions. Another decision, which at least partially seems to be taken on the DAPK level, is the nature of death a cell is undertaking after according induction. Recent evidence describes autophagy (type II cell death [11])

as a further cellular destiny procured by DAPK besides the well-established apoptotic pathways.

All these observations led to an understanding of DAPK's role as being a "molecular switch" or "integration point" guiding a cell's fate into one or the other direction depending on the prevailing environment [12]. The presence of a "death-associated multi-protein complex" is thought to be required for the determination of the downstream endpoint of the signaling cascade. Consequently, a lot of effort was put in deciphering various members of such putative protein complexes. Recent results from systematic studies, such as investigations on the proteomic level [13] or screening assays of peptide libraries [14,15,16], led to the identification of physical interacting partners of DAPK in addition to the known affiliated proteins [17].

The documented formation of functional heterodimers between the catalytic cores of DAPK and its close family member ZIPK [18], which share sequence identity of about 80% [17], let us hypothesize that DAPK could self-associate to form homodimers. Noncovalent nanoelectrospray ionization mass spectrometry (nanoESI-MS) revealed the possible formation of such homodimers as well as the previously delineated importance of the DAPK-family's specific basic loop in such a protein-protein interaction [18]. We furthermore evidenced a direct correlation between DAPK homodimerization propensity and the phosphorylation amount of two newly identified autophosphorylation sites within the catalytic domain.

We subsequently screened a fluorophor-labeled peptide-like library in order to identify traceable binding partners of DAPK's catalytic domain, which then served as a reporter of the protein's dimerization state. In the screening for such molecular tools we used a high throughput approach based on fluorescence anisotropy measurements. The same technique was also used in competitor assays that evidenced the spatial independency of the probe's binding site from the one of the peptide substrate as well as the one of ATP/ADP.

We finally propose a comprehensive model of the molecular mechanisms that might play an important role in DAPK's switch between various cellular pathways and its related fates.

Experimental Procedure

Protein expression and purification

The protein expression plasmids pASK-IBA3 (IBA Göttingen, Germany) carrying the cDNA of DAPK's catalytic core (residues 1-285), as well as the ones resulting in the described mutated protein DAPKdel (Δ S52-S57), were kindly provided by D. Martin Watterson (Northwestern University, Chicago, IL). The proteins were produced and purified in *Escherichia Coli* (DH5 α) as previously described [19], except for some modifications that resulted from various optimization steps. These contained

expression assays at 37 and 22°C for expression durations of 1 to 7 h after the induction with 0.2 or 0.4 μ g/mL anhydrotetracyclin (IBA Göttingen, Germany). Thereafter, the expression yield of each condition was analyzed by a colorimetric dot blot assay (material by Biorad, Hercules, CA; nitrocellulose membrane 0.2 mm by BDH, Poole, England) with the HRP-tagged anti-Streptag antibody (IBA Göttingen, Germany) and 4-chloro-1-naphthol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The intensities of the colored dots were quantified by the program ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov>) and the conditions, which resulted in the maximal intensity, were chosen. This led to the expression of the proteins at 22°C for 4 h in tryptone soy broth (Biorad, Hercules, CA). After lysis, sonication using Bioblock scientific vibracell (3 pulses of 15 s at 40% maximum power) and centrifugation, as described in [20], we applied the clarified lysate directly to a high capacity streptactin superflow resin (IBA Göttingen, Germany). In addition to the manufacturer's recommendations a salt wash of 3 Column Volumes (CV) of the high salt washing buffer (100 mM TrisHCl pH 8, 500 mM NaCl) and the subsequent regeneration by 2 CV of washing buffer (100 mM TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl) resulted in an increased purity of the proteins. Using a 10 kDa cut off concentrator (Satorius, Göttingen, Germany) the elution buffer (100 mM TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM desthiobiotin) was exchanged by the storing buffer (20 mM TrisHCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) and the volume was finally adjusted in order to achieve protein concentrations between 200 and 700 μ M. The concentrations were determined by a NanoDrop spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). Protein integrity was assayed by nanoESI-MS mass measurement under denaturing conditions as described below and its purity was analyzed by capillary electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent Technologies Santa Clara, CA). The homogeneity of the protein solutions was investigated by dynamic light scattering measurements (Dynapro Model 801, Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Germany).

NanoESI-MS for the study of noncovalent complexes

Prior to any mass spectrometry experiment, protein buffer was exchanged against a 10 mM ammonium acetate (NH₄Ac) solution at pH 8.8 using microcentrifuge gel filtration columns (Zeba 0.5 ml, Thermo Scientific, Rockford, IL). Protein concentration was determined spectrophotometrically (31400 M⁻¹ cm⁻¹ at 280 nm in water for DAPKwt and DAPKdel). ADP solution was desalted using a 1 ml anionic exchange column (HiTrap Q-Sepharose, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in order to exchange sodium counter-ions against volatile ammonium ions. The ADP concentration was then determined spectrophotometrically and magnesium acetate was subsequently added to this solution to reach a 1:1 ADP:Mg²⁺ molar ratio.

NanoESI-MS measurements were carried out on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT,

Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoESI source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY) operating in the positive ion mode. External calibration was performed with the multiple charged ions produced by a 2 μM horse heart myoglobin solution diluted in a 1:1 (v/v) water: acetonitrile mixture acidified with 1% (v/v) formic acid.

Purity and homogeneity of DAPKwt and DAPKdel were first assayed in denaturing conditions by diluting the proteins to 2 μM in a 1:1 (v/v) water/acetonitrile mixture acidified with 1% (v/v) formic acid. Analyses in non-denaturing conditions were then performed by diluting proteins to 5 μM in NH_4Ac buffer at pH 8.8 (adjusted with ammonia). Different NH_4Ac concentrations were used to test their influence on proteins' oligomerization state. DAPKwt autophosphorylation experiments were carried out by mixing the protein at 30 μM with 10 mM ATP and 10 mM MgCl_2 in 50 mM NH_4Ac pH 8.8. Following a 10 h incubation period at 37°C, the protein was buffer exchanged against 50 mM NH_4Ac (pH 8.8) using microcentrifuge gel filtration columns (Zeba micro, Thermo Scientific, Rockford, IL). In order to investigate the influence of ADP-Mg on DAPK's oligomerization state, titration experiments were performed using a fixed concentration of DAPKwt (5 μM) and increasing amounts of ADP-Mg. Experiments were realized after a careful optimization of instrumental parameters. Particularly, the pressure in the first pumping stage was raised up to 6 mbar using a throttling valve and the acceleration voltage applied on the sample cone was set to 100 V. Data analysis were performed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry

Enzymatic digestion and subsequent MS analysis for the identification of phosphopeptides were performed in the same manner for DAPKwt and DAPKdel. Briefly, proteins (60 pmol) were first denatured with 1 μl ACN during 1 h. Enzymatic digestion was performed at 25°C for 16 h after addition of either porcine trypsin (5 μl at 12.5 ng/ μl , Promega, Madison, WI) or bovine α -chymotrypsin (5 μl at 25 ng/ μl , Roche, Indianapolis, IN).

All nanoLC-MS/MS (nanoliquid chromatography coupled tandem mass spectrometry) analyses were performed using an Agilent 1100 series HPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled to an HCT plus ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The microfluidic chip consisted of a Zorbax 300SB-C18 enrichment column (40 nL, 5 μm) followed by a Zorbax 300SB-C18 analytical column (150 mm x 75 μm , with a 5 μm particle size). Details concerning the nanoLC gradient and MS settings are given in supplementary data SIII.

The MS and the MS/MS data were searched using a local Mascot server (version MASCOT 2.2.0,

MatrixScience, UK) against the Swiss-Prot database (v56.8, 410518 sequences). Searches were performed with a mass tolerance of 0.5 Da in MS mode and 0.5 Da in MS/MS mode and with the following parameters: trypsin specificity, one missed cleavage and chymotrypsin specificity, two missed cleavages, methionine oxidation, protein amino-terminal acetylation and phosphorylation (STY) as variable modifications, and without any taxonomic restriction.

Production and HTS of the fluorescent library

Designing and combinatorial synthesis of the fluorescent compound library followed the previously described procedures [[21] and supplementary data SI]. Fluorescence polarization assays were performed using a Victor 3 apparatus (Perkin-Elmer Waltham, MA). Lissamine-tagged compounds of the CHPO Compounds Library (UMR 7200 CNRS, Strasbourg, France) were diluted in the assay buffer (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7.5) to a working concentration of 0.2 μM . 15 μl of these dilutions were transferred to each well of the assay plate (Corning Costar 96-well black polystyrene plates, Model 3686, Corning, Acton, MA). All pipetting of the HTS was performed on a Biomek[®] 2000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). The fluorescent polarization degrees (mFP) were measured at an excitation and emission wavelength of 530 and 610nm respectively. 15 μl of the assay buffer with DAPK, at a concentration of 4 μM , were added to each of the wells. For each plate, background correction was performed with blank control wells containing no compounds.

ATP, ADP and substrate peptide titrations

All titration measurements were performed on a FlexStation 3 (Molecular Devices Union City, CA). The other experimental conditions were described in section "*HTS of the fluorescent library*". A twofold dilution cascade of the protein between 200 μM and 0.8 μM was prepared and 10 μl of these solutions were dispatched on 96-well assay plates. 10 μl of the probe solution (0.2 μM of CHPO 187-3-H11-para in assay buffer) were added to the wells and the fluorescent polarization was recorded as specified before. Subsequently, 1 μl of concentrated ATP, ADP or substrate peptide [6] (Tocris Bristol, UK) in assay buffer with 0.1 μM of the fluorescent probe were pipetted to the wells in order to subsequently obtain the following final concentrations of ATP, ADP or substrate peptide: 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50, and 1000 μM . The highest concentration was not performed for the peptide.

Titrations under monomeric and dimeric conditions

The performed titrations followed the same protocol as described under "*ATP, ADP and substrate peptide titrations*", but under buffer conditions analogous to the ones listed under "*nano-ESI-MS for the study of noncovalent complexes*". For investigations of the

monomer and the dimer the NH_4Ac concentrations were kept constant at 250 mM and 5 mM respectively. To induce gradual monomerization of DAPK's catalytic core, the NH_4Ac concentrations was stepwise augmented (5, 10, 25, 50, 100 and 250 mM) by the addition of a concentrated stock solution (1 M).

To determine the K_d -values of γ -[6-Aminohexyl]-ATP-Atto495 (Jena Bioscience, Jena, Germany) its concentration was set to 0.1 μM , while the rest of the conditions were chosen analogously to the ones described above. Fluorescent polarization was recorded at an excitation and emission wavelength of 493 nm and 520 nm respectively.

Results

Homodimerization of DAPK's catalytic core (named DAPK in the paper)

The question of catalytic core DAPK's oligomerization state was addressed using automated chip-based nanoESI-MS. DAPKwt was first analyzed under denaturing conditions, highlighting the presence of a first species (supplementary data figure SIIA), whose molecular weight (33751.1 ± 0.1 Da) is in agreement with the one calculated from the amino acid sequence without the N-terminal methionine (33750.4 Da). A second, less intense ion distribution is also observed with a molecular weight of 33830.7 ± 0.3 Da, displaying thus a mass increase of 79.6 Da relative to the first species. This can be attributed to a putative phosphorylation of DAPKwt. In a second step, DAPKwt was analyzed under non-denaturing conditions, revealing the detection of two ion distributions detected in the mass ranges m/z 3000-4000 and m/z 4000-5500 respectively (figure 1A). The former corresponds to the 10+ to 12+ charge states of monomeric DAPKwt (measured MW = 33750 ± 1 Da), while the latter is assigned to the 14+ to 16+ charge states of dimeric DAPKwt (measured MW = 67501 ± 1 Da). Hence, these results evidence a monomer to dimer equilibrium of DAPKwt.

Interestingly, this equilibrium was shown to be sensitive to the buffer ionic strength. In fact, DAPK's oligomerization state is progressively shifted towards the monomeric form of the protein, when the buffer concentration is increased from 10 to 250 mM (figures 1A to 1D). In a physiological-like buffer (assay buffer of fluorescent measurements, 50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7.5), the protein is in a homogeneous dimeric form as shown by dynamic light scattering (DLS, data not shown). The observed shift from dimeric to monomeric DAPKwt with increasing NH_4Ac concentrations suggests that this protein-protein association involves electrostatic interactions, which are sensitive to the ionic strength of the medium.

Involvement of DAPK's basic loop in the homodimerization process

The ionic strength dependent monomer to dimer equilibrium of DAPKwt prompted us to investigate the role in the dimerization process of a basic loop corresponding to the DAPK-family fingerprint region. This loop is located in close proximity to the ATP binding pocket and the putative binding site of the substrate peptide [19] and has been previously associated with the ability to form DAPK-ZIPK heterodimers [18].

In the present study a truncated catalytic core protein (DAPKdel) was produced by deleting residues S52 to S57 (-SRRGVS-), involved in this basic loop. The size of this deletion was based on DAPK's sequence alignment to the human myosin light chain kinase (huMLCK), whose catalytic domain shows a high degree of sequence identity [19]. Even though a dimerization process was earlier described for huMLCK [22], it was associated with the CaM-binding domain and not directly with the catalytic domain. Therefore, we assumed that the capacity to form homodimers lays in sequence differences of the two proteins. Hence, the deletion S52-S57, which corresponds to the part of the basic loop that is present in DAPK, but completely missing in huMLCK, was engineered in the sequence of DAPK's core domain. Even though, DAPK's basic loop is located in close proximity to the ATP pocket and the putative substrate peptide binding site, its absence does not lead to a significant change of the catalytic rate [19].

DAPKdel was first analyzed under denaturing conditions, evidencing the presence of two forms of the protein (supplementary data figure SIIB). The first species, which is the less intense one, has a molecular weight of 33108.8 ± 0.7 Da in agreement with the expected mass of the mutated protein after removal of its N-terminal methionine (33107.7 Da). The second species displays a molecular weight of 33188.7 ± 0.4 Da corresponding to a 79.9 Da mass increase that can putatively be attributed to the phosphorylated protein. In order to determine the oligomerization state of DAPKdel, noncovalent nanoESI-MS analyses were performed in strictly identical experimental and instrumental conditions as those applied to analyze DAPKwt. Interestingly, even in low ionic strength conditions that have shown to promote DAPKwt dimerization, DAPKdel is only detected as a monomer (MW = 33108 ± 1 Da; figures 1e to 1h). These results thus enlighten that this basic loop, which is a unique feature of the kinases belonging to the DAPK family, plays a crucial role in the formation of homodimers. These findings are well supported by the very first crystallographic work that was performed on DAPK's catalytic core by Tereshko et al [5]. In fact, two different crystal organizations were described and one of them is suggestive for a homodimer [5]. Furthermore, the resolved structure of the putative dimer also localizes the basic loop within the interface of the two catalytic cores.

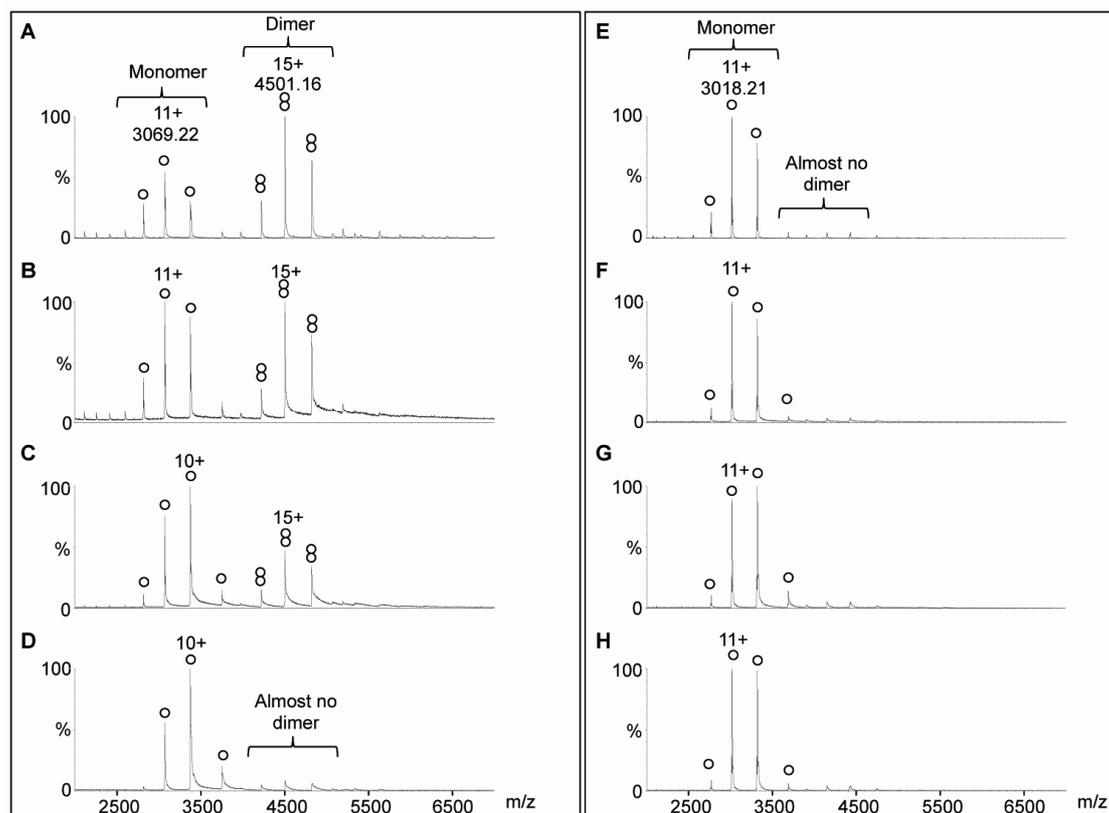


Fig. 1: Noncovalent mass spectrometry analysis of (A-D) DAPKwt and (E-H) DAPKdel. Proteins were diluted to 5 μM in NH_4Ac buffer at (A, E) 5 mM, (B, F) 50 mM, (C, G) 120 mM and (D, H) 250 mM. (o) and (8) are related to monomeric and dimeric DAPK, respectively.

Spatial and quantitative dependence of DAPK's autophosphorylation on its homodimerization process

Mass spectrometry analyses of DAPKwt and DAPKdel under denaturing conditions revealed that both proteins are present in two distinct forms, which differ by roughly 80 Da (supplementary data figure SII). This mass difference, together with the fact that DAPK displays a kinase activity, led us to consider the possibility for these proteins to be autophosphorylated. Interestingly, nanoESI mass spectra evidence a lower extent of phosphorylated protein for DAPKwt compared to DAPKdel (18% and 78% relative intensity respectively).

In order to confirm the presence of a phosphorylation and to unambiguously localize the phosphorylation site, both trypsin- and chymotrypsin-digested DAPKwt and DAPKdel were analyzed by nanoLC-MS/MS experiments. Combination of both enzymatic digestions led to 78% and 91% sequence coverage for DAPKwt and DAPKdel respectively. Among the identified tryptic peptides, S34-K42 from DAPKwt and R257-K272 from DAPKdel were found to be phosphorylated as evidenced from detailed interpretation of tandem mass spectrometry experimental results. The dominant loss of H_3PO_4 observed for each peptide (figure SIII) combined to the detection of specific signature of corresponding

phosphorylated amino acids (immonium ions and dehydroaminobutyric acid residues of phosphothreonine observed in MS/MS spectra [23]) allowed to precisely localize the phosphorylation sites to T35 for DAPKwt and T259 for DAPKdel (T265 in the DAPKwt) (figures SIIIA and SIIIB respectively). As there are no endogenous Ser/Thr-protein kinases known in *E. coli* and as the sequences around the mentioned sites show high identity to the ones of DAPK's known substrates, we suggest autophosphorylation as the underlying mechanism of the observed phosphorylations of the protein.

The hypothetical autophosphorylation ability of the catalytic core of DAPKwt was investigated by incubating the protein overnight at 37°C in presence of ATP and Mg^{2+} . Subsequent mass measurement under denaturing conditions revealed a significant increase of the phosphorylated form, whose relative intensity rose from 18% to 41% (figures 2A and 2B). Moreover, DAPKwt analyses in non-denaturing conditions clearly show that a higher phosphorylation amount is accompanied with a decrease of the dimer's relative abundance (figures 2C and 2D). These observations corroborate the autophosphorylation hypothesis of DAPK's catalytic core and suggest an inverse relationship between dimerization and autophosphorylation of those sites that are, to our knowledge, described for the first time.

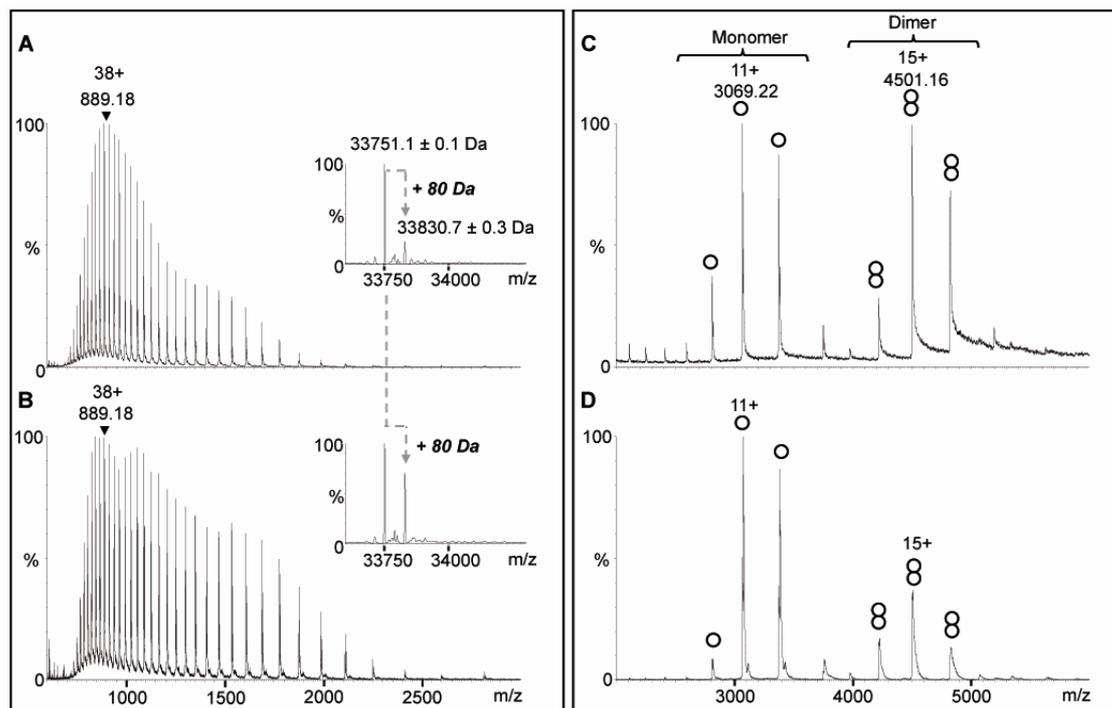


Fig. 2: DAPKwt autophosphorylation experiment. The protein was incubated overnight at 37°C in presence of a 333-fold molar excess of ATP-Mg. Analyses were performed (A, C) before and (B, D) after ATP-Mg treatment either (A, B) in denaturing conditions (2 μ M DAPKwt) or (C, D) in 50 mM NH_4Ac buffer at pH 8.8 (5 μ M DAPK). Inserts correspond to deconvoluted mass spectra obtained using the MaxEnt 1 algorithm of MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK). (O) and (Ø) are related to monomeric and dimeric DAPK respectively.

In general, homodimerization processes are difficult to follow as a function of time under experimental conditions. Fluorescence techniques may be applied if an internal or external reporter group is present. Sometimes, even a single tryptophan residue, that can be native or introduced, may be sufficient to sense such conformational changes [24]. As it is not a common feature of proteins, we have devised a general strategy to find a fluorescent probe that binds to the protein with binding properties relying on the conformation of the protein.

This strategy involves three steps:

- 1) Synthesis of a library of fluorescent compounds using known chemical scaffolds that exhibit low specificity (see supplemental data SI),
- 2) Screening such a library by fluorescence anisotropy measurements in order to successfully find one probe at least. This technique allows to set up a “mix and read” assay that readily pinpoints the probe that interacts with the protein,
- 3) Characterizing the binding properties of the probe in order to fulfill our requirements, i.e., at least a change in binding properties upon polymerization.

High Throughput Screening (HTS) of a fluorescent compound library

In order to identify molecular probes for further investigations of DAPK’s regulatory system, we have screened a chemical library of 1388 compounds

tagged with either the ortho or the para isomer of the fluorophor lissamine [21]. The library was screened for molecules that bind to DAPK’s catalytic domain by measurements of the fluorescence polarization. After bulk analysis, the 14 compounds (1% hit rate) showing the highest binding affinity were selected for the validation phase. Thereby, DAPK’s purified catalytic core was titrated with the identified hit molecules and the resulting fluorescence polarization was recorded at each concentration. These results subsequently allowed to fit binding curves and to calculate K_d -values for each of the molecules assayed. Based on the determined affinity for DAPK and on the compound’s convenience to be re-synthesized, the molecule CHPO 187-3-H11-para (further on called probe) was selected for all subsequent investigations (figure 3A).

Interaction of monomeric and dimeric DAPK with the selected probe

In order to assess the fluorescent probe’s binding affinity to DAPK, the secondary screening assay described above was repeated under buffer conditions favoring either dimeric or monomeric DAPKwt. Titration experiments were performed for both DAPKwt and DAPKdel at 5, 100 and 250 mM NH_4Ac . Monitoring fluorescence polarization evidences that the binding affinity of the probe for DAPKwt increases with higher NH_4Ac concentrations (figure 3B). In fact, K_d -values calculated from these binding curves are $16.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$ and $1.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$

under buffer conditions favoring the dimer (5 mM NH_4Ac) and the monomer (250 mM NH_4Ac) respectively. In contrast, DAPKdel, which was shown to be exclusively monomeric regardless of the NH_4Ac concentration, does not display such an ionic strength dependent binding affinity (figure 3C). Indeed, the K_d -value varies only from 3.4 μM at 5 mM NH_4Ac up to 5.5 at 250 mM NH_4Ac , suggesting ionic interactions between the probe and the protein that are weakened by increasing ionic strength. Altogether, these results clearly show a modified interaction between the probe and the protein depending on its oligomerization state. Therefore, the fluorescent probe appears to be a convenient tool to explore the dimerization state of DAPK's catalytic core.

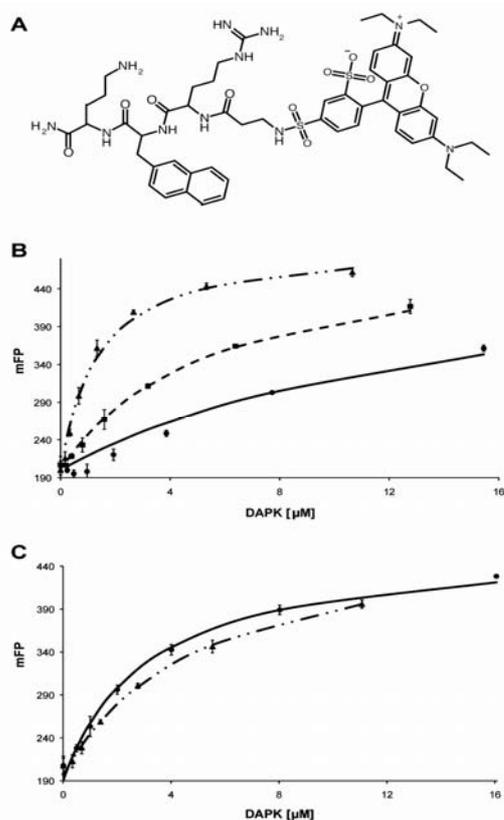


Fig. 3: Ability of the fluorescent molecular probe to monitor dimerization of DAPK's catalytic core. A) Chemical structure of CHPO 187-3 H11-para, which was selected as best hit in the primary and secondary screening assays. B) Binding of CHPO 187-3 H11-para (0.1 μM) to DAPKwt at different concentration of NH_4Ac (● 5 mM, ■ 100 mM and ▲ 250 mM). Fluorescence polarization (mFP) is plotted versus protein concentration. Error bars indicate the standard deviation of four independent titrations. C) Same than in B) but with DAPKdel.

In a more physiological buffer corresponding to the ionic strength of roughly 200 mM NH_4Ac (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7.5, see next section), the K_d value of the fluorescent probe for DAPKwt is $30.9 \pm 2.8 \mu\text{M}$. This corresponds to the

affinity of the probe for the monomer (16.5 μM), when the decreasing of the binding affinity due to the changed ionic strength is taken into account (5.5 μM instead of 3.4 μM at low ionic strength as seen with DAPKdel; $16.5 \times 5.5 / 3.4 = 26.7 \mu\text{M}$ comparable to the value of 30.9 μM). These results confirm the dimeric form of DAPKwt in a physiological-like medium.

Localization of the probe's binding site and modulation of probe binding affinity by ATP and ADP

In order to address the question about where the probe binds to the protein, competitive titrations were carried out to verify whether the probe shares the same binding pocket as known substrates or products of the kinase, i.e. ATP, ADP or the substrate peptide [6].

A sequential multilayered assay in the physiological-like buffer (see materials and methods), corresponding to a total of 960 different conditions per 96-well plate, was thus developed. For the assay's first layer, 0.1 μM of the probe were incubated with a geometrical concentration range (0 to 100 μM) of DAPK and the fluorescence polarization of lissamine was recorded. This titration experiment was then repeated in the presence of increasing amounts of ATP, ADP or substrate peptide (0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50 and 1000 μM). Figures 4A and 4B show the graphical representation of the procedure's output for the titrations of ATP and substrate peptide, respectively. The results clearly show that neither ATP nor the substrate peptide is able to chase the probe away from its binding site, as this would lead to a right shift of the titration curves with increasing concentrations of ATP or the substrate peptide. Identical results were obtained with ADP replacing ATP. Figure 4A shows that DAPKwt displays an improved binding affinity for the probe in the presence of ATP or ADP (respectively with peptide substrate), suggesting the existence of an ATP/ADP-induced allosteric mechanism that modulates the probe's affinity for DAPK.

In the attempt to represent the described data in a clear overview and to quantify the allosteric impact, we modeled the experimental data using the general framework described by Roehrl et al [25]. From our data points, we established binding curves corresponding to fluorescence polarization changes as a function of ATP/DAPK or ADP/DAPK concentration ratios. K_d values obtained from fitting of these curves were then plotted as a function of the stoichiometric ratio of either ATP or ADP to DAPK (fig 4C). The graphic clearly shows the similarity of the effects of ATP and ADP, as corresponding K_d -value of both titrations are comparable. This representation also allows visualizing the magnitude of the induced effect. In the absence of either ATP or ADP, the probe's K_d -value was determined to be $30.9 \pm 2.8 \mu\text{M}$. ATP or ADP increase the probe's affinity for DAPK. A maximal effect was achieved at ATP or ADP to DAPK ratios higher than two, which led to a K_d -value of the probe of $6.40 \pm 0.54 \mu\text{M}$. Both ATP and ADP have the ability to increase the probe's affinity roughly five times.

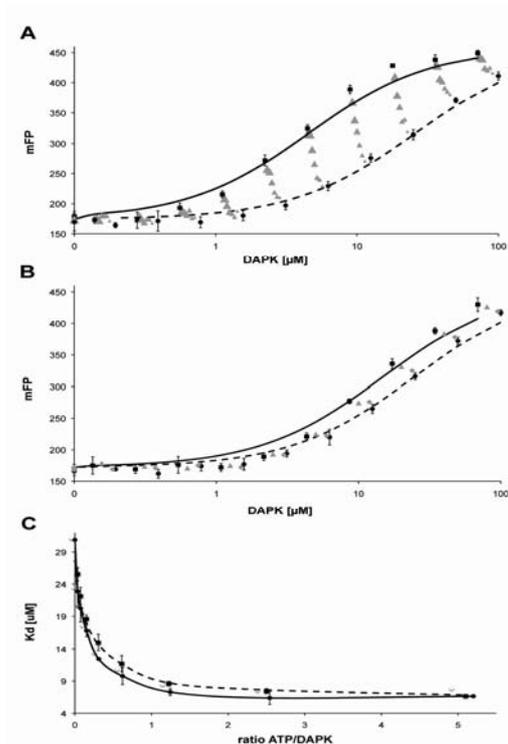


Fig. 4: Titration curves showing mFP in function of the concentration of DAPKwt in HEPES Buffer pH 7.5 (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7.5). Error bars indicating the standard deviation were calculated from four independent titrations. Error bars are only shown for the most out-layer curves in order to keep the representation clear. A) ATP-titration at the following total concentrations of ATP: ● 0 μM; ▲ to ▲ 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5 μM and ■ 25 μM. The graphs for an ATP concentration of 50 μM and 1000 μM are not shown, as they are congruent with the one at 25 μM. B) Peptide substrate-titration. Analogous to the ATP-titration for peptide concentrations of: ● 0 μM; ◆ 0.8 μM ▲ 6.3 μM; ■ 50 μM. Only a representative number of titration curves are shown to keep the graphs well distinguishable from each other. C) Fitted K_d-values of the fluorescent probe in function of the stoichiometrical ratio of ATP/DAPK (—●—) and ADP/DAPK (- - ■ - -), respectively.

ATP/ADP induced monomerization of DAPK's catalytic core

Considering on the one hand the ATP or ADP triggered increase in affinity of the probe for the DAPK's catalytic core, and on the other hand the probe affinity increase when the catalytic core is under the monomeric form, one would expect that the monomeric form of the catalytic core has a higher affinity for ATP and that ATP or ADP act on the monomer/dimer equilibrium by favoring the monomeric form. In order to test our hypothesis, K_d-values were determined for a fluorophore labeled ATP (γ-[6-Aminohexyl]-ATP-Atto495) under the buffer conditions promoting the dimeric (5 mM NH₄Ac) or the monomeric form (250 mM NH₄Ac) of DAPKwt. The results confirm our assumption, as the binding curve is clearly shifted to the left under conditions

favoring monomers (figure 5A). The K_d-value of the labeled ATP for the dimer was determined to be $3.98 \pm 0.22 \mu\text{M}$, while the one for the monomer decreases to $0.290 \pm 0.011 \mu\text{M}$.

To consolidate our model of ATP/ADP induced monomerization, three further experiments were performed:

i) Noncovalent ESI-MS experiments were carried out with DAPKwt in the presence of increasing amounts of ADP-Mg. Figure 5B shows that incubation of the protein with five to twenty molar equivalents of ADP-Mg leads to the detection of 1:1, 2:1 and 2:2 DAPK: ADP-Mg complexes (34199 ± 1 Da, 67964 ± 4 Da, 68411 ± 6 Da respectively). Remarkably, ADP binding is accompanied by a shift of DAPK's oligomerization equilibrium towards the monomeric form, which corroborates our model of ATP/ADP induced monomerization (figure 5B).

ii) We investigated whether the deletion of the basic loop, which impedes dimerization of the catalytic core, would modify the probe's binding upon the addition of ATP or ADP. Therefore, multilayered titration matrices were performed with DAPKdel in the physiological-like buffer (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7.5). Strikingly, we observed that the absence of the basic loop leads to a decrease of the probe affinity upon increasing ATP or ADP concentrations. At ATP or ADP to DAPKdel ratios higher than two, the K_d-values of the probe get maximal for both effectors and were calculated to approximately 30 μM (figure 5C) starting from a K_d value of 26 μM in absence of ATP or ADP (notice that this value was 5.5 μM in the 200 mM acetate buffer, suggesting an impact of the pH-changes on the binding of the probe to the protein). Consequently, these results demonstrate that the presence of ATP or ADP decreases the probe's affinity for the monomeric form of DAPK. On the contrary, the transition from dimer to monomer improves the probe affinity. This transition is induced by ATP or ADP. Therefore, ATP or ADP binding to DAPK triggers two opposite effects involved in the probe's affinity: first, an increase due to the dimer-monomer transition and second, a decrease due to an allosteric coupling in the monomeric form between the ATP/ADP site and the probe site.

iii) In order to distinguish those two effects, ATP titrations were repeated under experimental conditions favoring either the presence of the monomer or the dimer of DAPKwt (250 mM or 5 mM NH₄Ac respectively). Figure 5D shows the probe's determined K_d-values to either the monomer or the dimer of DAPKwt as a function of the ratio of ATP to the protein. In the monomeric form (250 mM NH₄Ac), increasing ATP concentrations induce a decrease of the probe affinity, confirming the allosteric effect between the ATP site and the probe site. When starting from the dimeric state (5 mM NH₄Ac), rising ATP concentration induces an increase of the probe affinity, suggesting that also in this buffer, ATP binding triggers a dimer-monomer transition.

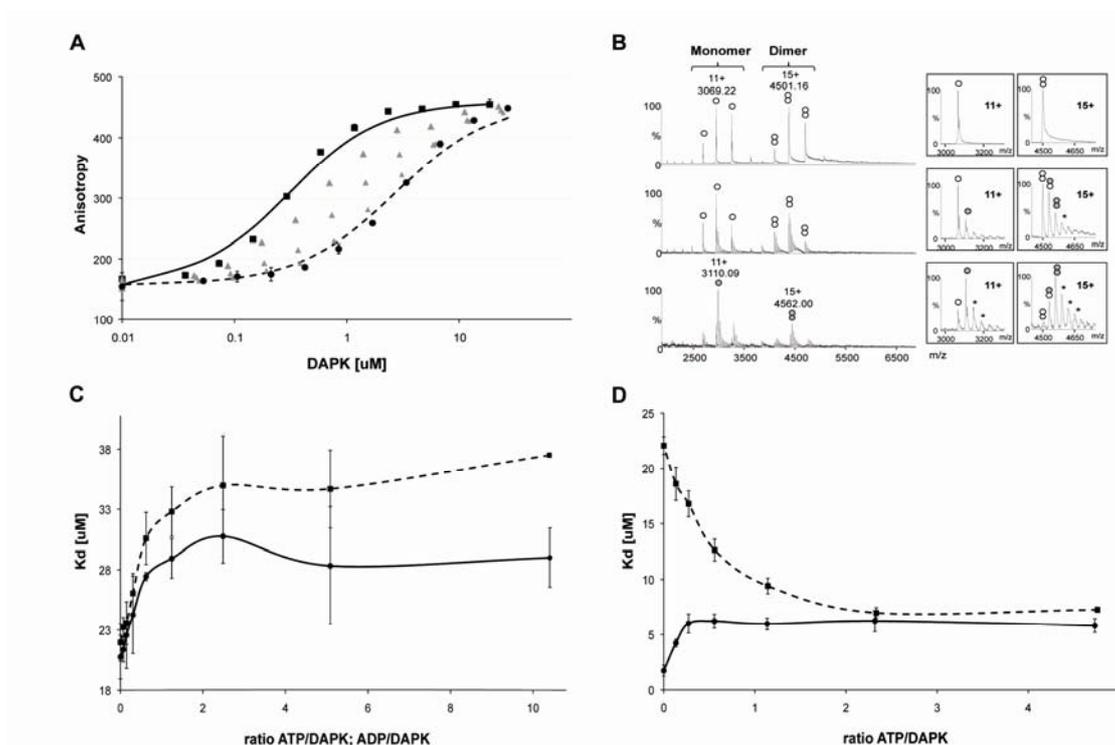


Fig. 5: ATP and ADP induced monomerization of DAPK's catalytic domain. A) Binding of the fluorescently tagged ATP (Atto-495-ATP) to the catalytic domain of DAPKwt. The binding curve of ATP shifts toward the left when the monomeric form is induced by higher NH_4Ac concentrations. One binding curve corresponds to a constant concentration of NH_4Ac : \bullet 5 mM; \blacktriangle 25, 50 and 100 mM, \blacksquare 250 mM. B) Noncovalent mass spectrometry analysis of DAPKwt at 5 μM in 50 mM NH_4Ac buffer at pH 8.8 either alone (top) or in presence of 25 μM ADP-Mg (middle) and 100 μM ADP-Mg (bottom). Inserts correspond to enlargements of 11+ and 15+ charge state of monomeric and dimeric DAPKwt respectively. (\circ) , (\odot) , (\otimes) and (\otimes) are related to 1:0, 1:1, 2:0, 2:1 and 2:2 DAPKwt : ADP-Mg complexes respectively. * represent non-specific ADP-Mg adducts. C) Fitted K_d -values of the fluorescent probe in function of the stoichiometrical ratio of ATP/DAPKdel (\bullet) and ADP/DAPKdel (\blacksquare). D) DAPKwt is assayed under conditions favoring monomers (\bullet 250 mM NH_4Ac) or dimers (\blacksquare 5 mM NH_4Ac).

The obtained results (figure 5D) clearly consolidate our model of equilibrium between monomers and dimers of DAPK's catalytic domain, which can be shifted towards the monomer by the presence of either ATP or ADP. Removal of the basic loop prevents this equilibrium but maintains an allosteric coupling between the ATP/ADP binding site and the probe's binding site.

Significance of DAPK's regulatory switch between monomers and dimers

The previously reported crystallographic structure in the cubic form suggests that both the basic loops and peptide binding regions of the two subunits building the homodimer face each other [5]. Our results that highlight the importance of the basic loop in the process of dimer formation and the structural observation that the loop is neighboring the active site strengthen these previous findings. Therefore, the simple fact that the access to the catalytic cleft of homodimers is sterically limited for substrate proteins, let us propose the monomer as the catalytically more

active form. This hypothesis is also supported by the fact that ATP, which is a reactant of the phosphotransfer reaction, shifts the equilibrium towards the monomer. With this in mind, we also re-analyzed the results of DAPK's multilayered substrate peptide titration matrix in order to quantify the impact of the substrate peptide on the dimerization. Analogous to the described procedure of the ATP/ADP-titrations, we obtained K_d -values for each of the concentrations of the peptide substrate at which a titration with DAPKwt was performed. In the absence of the peptide, the probes affinity was modeled to $26 \pm 1.2 \mu\text{M}$ in the HEPES buffer, which corroborates the initial affinity measurement of the ATP/ADP titrations. The K_d -values decrease with increasing peptide to DAPK ratios down to $16.2 \pm 1.9 \mu\text{M}$ for a ratio of 10. From these data, it becomes obvious that the impact of ATP/ADP on the equilibrium of monomers and dimers is significantly stronger than the one of the substrate peptide. Nevertheless, these results point out a stronger affinity for the substrate peptide for the monomer than for the dimer as increasing the peptide concentration induces a shift into the monomeric form. This might be a

further hint for a higher enzymatic activity of the monomer than of the dimer. Moreover, this interplay between the dimer to monomer equilibrium and the modulation by ATP and the peptide substrates allows to explain ambiguous results from previous reports. These have shown a modification of the K_m -value of ATP as a function of the peptide substrate used in the enzymatic assay. Indeed, if the monomer to dimer equilibrium is differently modulated by various peptide substrates or allosteric modulators, the K_m -values of ATP will be affected as well [14,19].

Discussion

DAPK is seen as an important player in the integration of various signal transduction pathways, which ultimately decides about either cellular survival or induced cell death.

Our here presented results, together with structural considerations show for the first time that the homodimerization of DAPK's core domain is an important regulatory mechanism for this enzyme's catalytic activity. We propose a model of induced monomerization, which assigns the sterically hindered active cleft of dimers and the accessible ones of monomers to cellular survival and induced cell death, respectively.

This dimer to monomer equilibrium is modulated by an allosteric site and the phosphorylated status of DAPK's catalytic core at a specific site (T35), localized in this study. In return, such equilibrium modulates the K_m -values of the two substrates ATP and phosphorylatable peptides. Obviously, it is now needed to prove that this phosphorylation occurs *in vivo* and is modulated by the physiological status of the cell.

In our study, we demonstrated the utility of a chemical biology approach combined to nanoESI-MS experiments. MS experiments allow us to unambiguously show a monomer/dimer equilibrium of the catalytic core domain of DAPK but in a non physiological medium. The chemical biology approach permits the identification of fluorescently marked protein ligands that bind to not *a priori* defined binding sites. As a consequence of the non-competition of these compounds with the known endogenous partners and their fluorescent traceability, they are perfectly suited as small probes to sense the state of molecular systems in a variety of experimental conditions.

By combining those two biophysical approaches, we have identified such a molecular tool that is sensitive to the oligomerization state of the catalytic core of the human Death-Associated Protein Kinase. This probe allowed us to clearly evidence the modulation of the monomer-dimer equilibrium of the catalytic core domain of this protein. Moreover, the use of a mutated core losing the dimerization capability, allowed us to distinguish a modification of the probe binding affinity due to experimental conditions (seen both with the wild type and the mutated core domain of the kinase)

or due to dimerization (only seen with the wild type core domain).

Our described work allows to include in the models describing the molecular role of DAPK, a molecular switch provided by the monomer-dimer equilibrium. We believe that future investigations should aim at bringing into context the here described regulatory mechanism with the ones that were earlier described for this kinase, namely autophosphorylation, pseudosubstrate interference and the activation through CaM.

References

1. Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A (1995) Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 9: 15-30.
2. Shohat G, Shani G, Eisenstein M, Kimchi A (2002) The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochim Biophys Acta* 1600: 45-50.
3. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A (1997) DAP-kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 16: 998-1008.
4. Shohat G, Spivak-Kroizman T, Cohen O, Bialik S, Shani G, et al. (2001) The pro-apoptotic function of death-associated protein kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism. *J Biol Chem* 276: 47460-47467.
5. Tereshko V, Teplova M, Brunzelle J, Watterson DM, Egli M (2001) Crystal structures of the catalytic domain of human protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression. *Nat Struct Biol* 8: 899-907.
6. Schumacher AM, Schavocky JP, Velentza AV, Mirzoeva S, Watterson DM (2004) A calmodulin-regulated protein kinase linked to neuron survival is a substrate for the calmodulin-regulated death-associated protein kinase. *Biochemistry* 43: 8116-8124.
7. Velentza AV, Wainwright MS, Zasadzki M, Mirzoeva S, Schumacher AM, et al. (2003) An aminopyridazine-based inhibitor of a pro-apoptotic protein kinase attenuates hypoxia-ischemia induced acute brain injury. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 3465-3470.
8. Velentza AV, Schumacher AM, Watterson DM (2002) Structure, activity, regulation, and inhibitor discovery for a protein kinase associated with apoptosis and neuronal death. *Pharmacol Ther* 93: 217-224.
9. Jin Y, Blue EK, Dixon S, Hou L, Wysolmerski RB, et al. (2001) Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival. *J Biol Chem* 276: 39667-39678.
10. Bialik S, Kimchi A (2006) The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* 75: 189-210.
11. Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181: 195-213.
12. Gozuacik D, Kimchi A (2006) DAPK protein family and cancer. *Autophagy* 2: 74-79.
13. Bialik S, Berissi H, Kimchi A (2008) A high throughput proteomics screen identifies novel substrates

- of death-associated protein kinase. *Mol Cell Proteomics* 7: 1089-1098.
14. 14. Fraser JA, Hupp TR (2007) Chemical genetics approach to identify peptide ligands that selectively stimulate DAPK-1 kinase activity. *Biochemistry* 46: 2655-2673.
 15. 15. Harrison B, Kraus M, Burch L, Stevens C, Craig A, et al. (2008) DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *J Biol Chem* 283: 9999-10014.
 16. 16. Stevens C, Hupp TR (2008) Novel insights into DAPK autophagic signalling using peptide aptamer combinatorial protein-interaction screens. *Autophagy* 4: 531-533.
 17. 17. Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, Akira S (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol* 18: 1642-1651.
 18. 18. Shani G, Marash L, Gozuacik D, Bialik S, Teitelbaum L, et al. (2004) Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol Cell Biol* 24: 8611-8626.
 19. 19. Velentza AV, Schumacher AM, Weiss C, Egli M, Watterson DM (2001) A protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression: structure, activity, and discovery of peptide substrates. *J Biol Chem* 276: 38956-38965.
 20. 20. McNamara LK, Watterson DM, Brunzelle JS (2009) Structural insight into nucleotide recognition by human death-associated protein kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65: 241-248.
 21. 21. Dagher R, Pigault C, Bonnet D, Boeglin D, Pourbaix C, et al. (2006) Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new calmodulin ligands. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1250-1255.
 22. 22. Babiychuk EB, Babiychuk VS, Sobieszek A (1995) Modulation of smooth muscle myosin light chain kinase activity by Ca²⁺/calmodulin-dependent, oligomeric-type modifications. *Biochemistry* 34: 6366-6372.
 23. 23. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ (2009) Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 44: 861-878.
 24. 24. Kilhoffer MC, Kubina M, Travers F, Haiech J (1992) Use of engineered proteins with internal tryptophan reporter groups and perturbation techniques to probe the mechanism of ligand-protein interactions: investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. *Biochemistry* 31: 8098-8106.
 25. 25. Roehrl MH, Wang JY, Wagner G (2004) A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* 43: 16056-16066.

Supplementary Data

SI: Production of chemical library

General considerations and characterization of fluorescent peptides: All chemicals were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Lissamine Rhodamine B sulfonyl chloride was purchased from Acros, Rink Amide resin (100-200 mesh) and Fmoc-amino acids from Novabiochem.

The RP-HPLC analyses were performed on a Chromolith SpeedROD RP18 (4.6*50 mm) column using water/acetonitrile linear gradient (0-100% B in 5 min, 7 mL/min, 220 and 254 nm). The following buffers were used: (eluent A) water containing 0.1% TFA by volume; (eluent B) acetonitrile containing 0.1% TFA by volume. ESI-TOF (electrospray time of flight) spectra were recorded on a Perseptive Biosystem Mariner 5155 spectrometer. The m/z range 200-2100 was scanned using an ionspray voltage of 4500 V. The nozzle was ranged between 30 and 60 V.

Synthesis of Lissamine Rhodamine B peptides ortho/para-CHPO 187-3-H11: Both peptides were synthesized on an acid-labile Rink resin1 (0.7 mmol/g) using standard Fmoc/tert-Butyl protocols.² The following L-amino-acids were used for the synthesis: Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-2-naphtylalanine-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH and Fmoc-b-Ala-OH. Coupling reactions (3 h) were performed with 3 eq. of the appropriate amino acid using an HOBt/DIC (3/3 eq.) activation in DMF. Fmoc group was removed using a 80/20 (v/v) DMF/piperidine solution (2 x 10 min). Following each coupling, the resin was washed with DMF (3x), CH₂Cl₂ (3x), MeOH (1x) and CH₂Cl₂ (3x). After peptide chain elongation and a-NH₂-b-ala deprotection, the Lissamine Rhodamine B sulfonyl chloride (2 eq.) was reacted with the resin in presence of DIEA (2 eq.) in dichloromethane for 5 h. Final cleavage and deprotection were performed by treating the resin with a freshly made TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) solution for 3h. Crude peptide thus obtained was isolated by precipitation with Et₂O, dissolved in a 1:1 acetonitrile/water (1/3) mixture and freeze-dried to red foams. Both ortho- and para-lissamine rhodamine B peptides were isolated by RP-HPLC on a C18 Symmetry Shield column from Waters (19 x 300 mm, 7 μm) at a flow rate of 10 mL/min.

Ortho-CHPO 187-3-H11 (4 mg), $t_R = 1.85$ min, RP-HPLC purity >97% (224 nm), LC-MS (ESI) calcd for C₅₄H₆₉N₁₁O₁₀S₂ 1096.3; found 1096.5. **Para-CHPO 187-3-H11** (14 mg), $t_R = 1.98$ min, RP-HPLC purity >97% (224 nm), LC-MS (ESI) calcd for C₅₄H₆₉N₁₁O₁₀S₂ 1096.3; found 1096.5.

1. Rink, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3787.
2. Chang, C.D.; Meienhofer, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 11, 246.

SII: Mass spectrometry under denaturing conditions

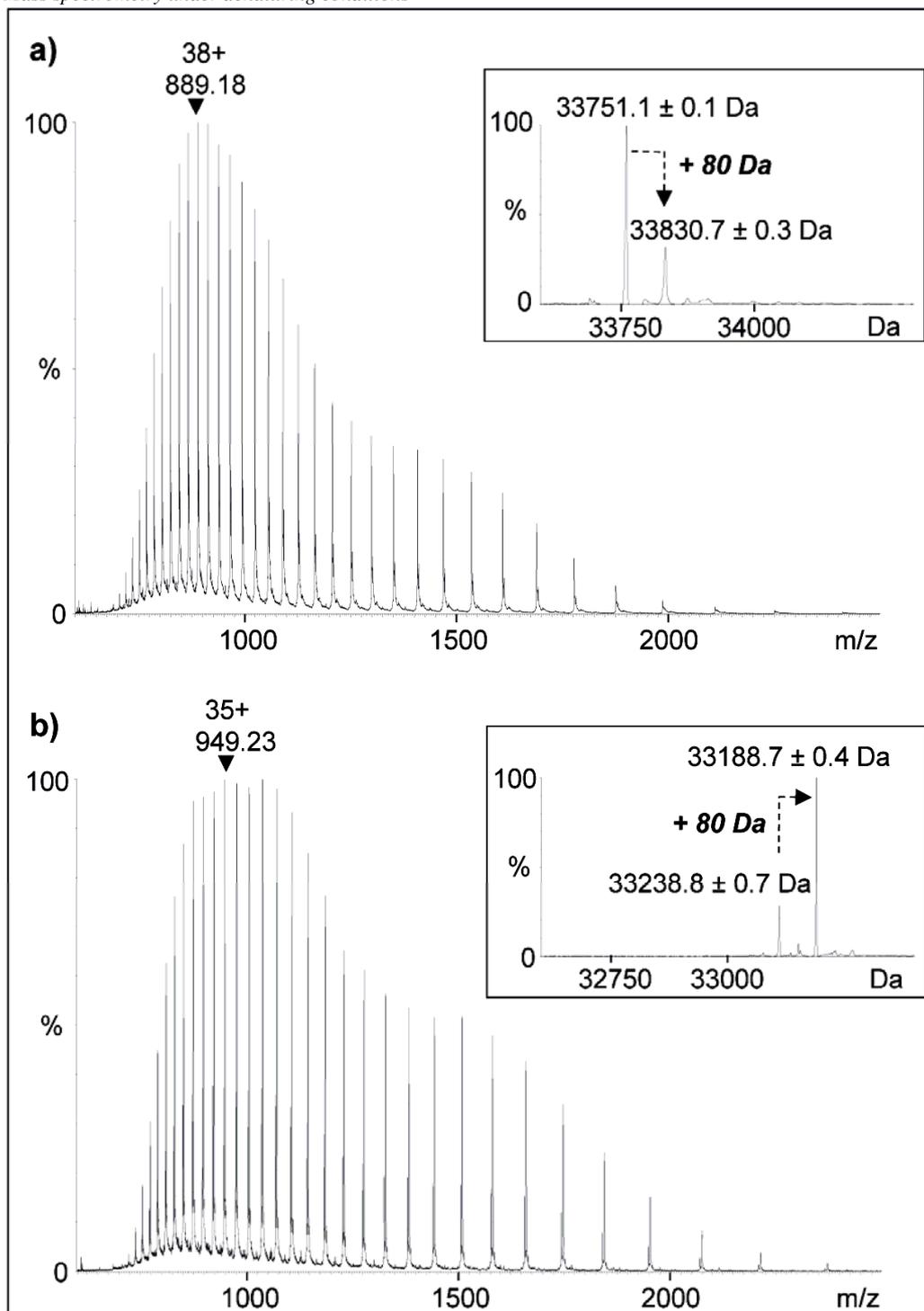


Fig. SII: nanoESI-MS analysis of DAPK under denaturing conditions. (a) DAPKwt and (b) DAPKdel were diluted to 2 μM in a 1:1 water:acetonitrile mixture acidified with 1% formic acid. Inserts correspond to deconvoluted mass spectra obtained using the MaxEnt 1 algorithm from MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

SIII: Localization of the phosphorylation sites by nanoLC-MS/MS

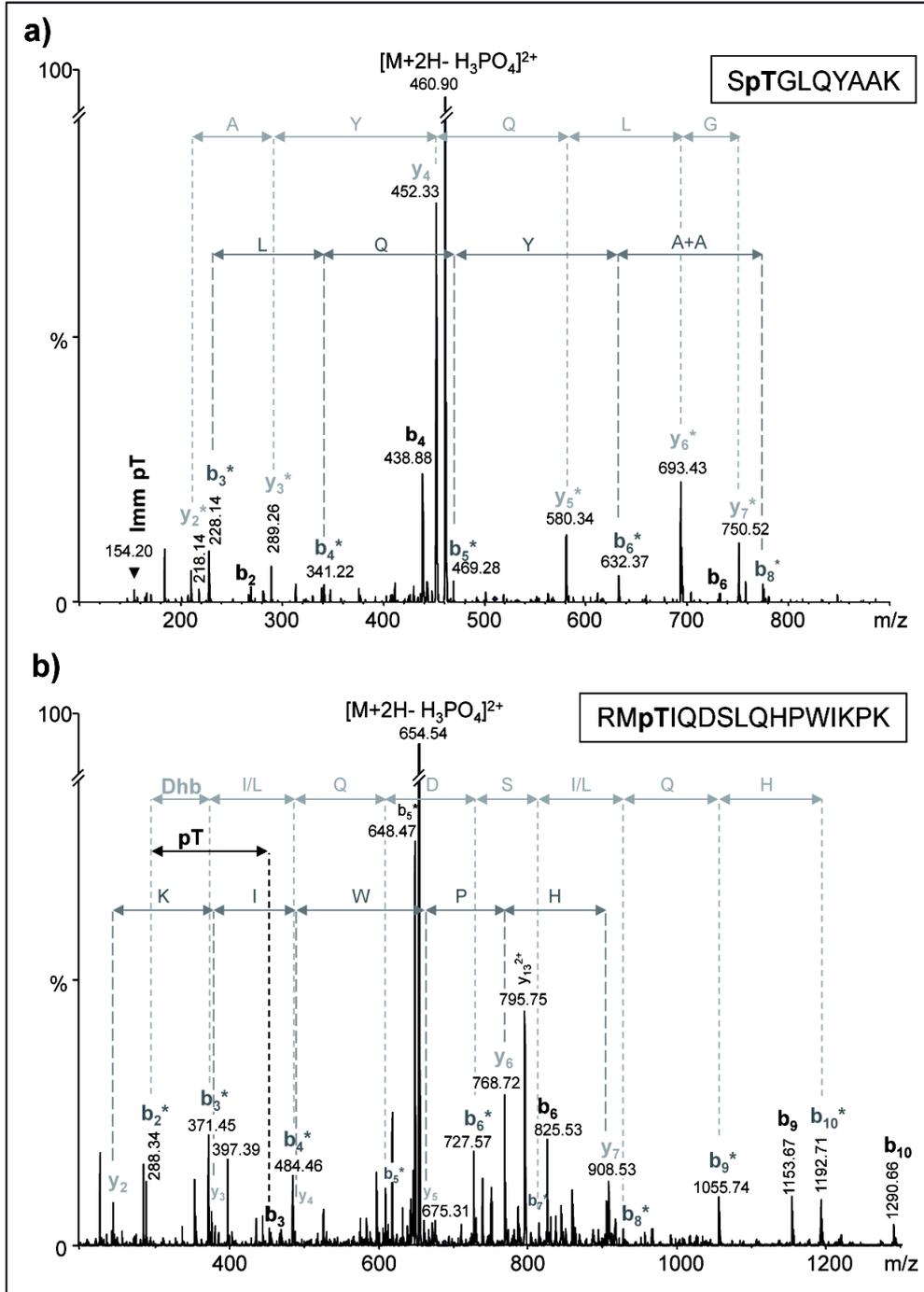


Fig. SIII: Localization of the phosphorylation sites of (a) DAPKwt and (b) DAPKdel. MS/MS spectra correspond to the tryptic doubly charged phosphopeptides a) 34-SpTGLQYAAK-42 (509.9 m/z) from DAPKwt and b) 257-RMpTIQDSLQHPWIKPK-272 (688.2 m/z) from DAPKdel. The most intense peak of each mass spectrum corresponds to the neutral loss of phosphoric acid from the precursor ion (-49 m/z). Phosphorylation sites are assigned by the detection of (a) phosphothreonine immonium ion (Imm pT) and (b) dehydrobutyric acid (Dhb) and phosphothreonine (pT). * are related to diagnostic fragment ions after loss of phosphoric acid.

CONCLUSIONS

Dans cette partie du manuscrit nous avons décrit et évalué les principales caractéristiques du robot d'analyse nanoESI sur puce microfluidique (Triversa Nanomate), mettant ainsi en évidence de nombreux avantages par rapport aux sources ESI et nanoESI conventionnelles. Un accent particulier a ainsi été mis sur la **réduction de la consommation d'échantillon** (facteur 10 à 100 par rapport à l'ESI), les **possibilités d'automatisation** (environ 10-15 fois plus d'analyses possibles en 24 h par rapport à l'ESI et au nanoESI), ainsi que la **reproductibilité des mélanges** et de la **qualité du spray** que permet le système. Certaines limitations ont également été relevées et ont été accompagnées de propositions de solutions.

Les développements méthodologiques liés à la mise en place du couplage Triversa Nanomate-LCT durant ce travail de thèse ont ensuite été mis en application au travers de deux cas d'étude qui ont permis de mettre en avant la **versatilité** que procure ce système pour l'approche MS supramoléculaire. En effet, avec les possibilités d'automatisation, la MS supramoléculaire peut désormais intervenir dans des **criblages primaires** pour la sélection de molécules se liant à des protéines cibles, puis en adaptant la stratégie analytique, il devient possible avec la même approche de **caractériser ces complexes non-covalents** en accédant pour cela à des informations aussi diverses et importantes que la stœchiométrie de complexes, l'état d'oligomérisation de protéines, la nature des interactions non-covalentes mises en jeu dans les complexes ainsi que leur spécificité et leur affinité relative et absolue. La versatilité de l'approche se traduit également par la possibilité d'étudier des **systèmes biologiques différents** impliquant des interactions protéine / ligand, protéine / protéine ainsi que protéine / oligonucléotide (cf. Parties III et IV).

Pour conclure, alors que le robot Triversa Nanomate permet désormais d'atteindre en MS supramoléculaire des débits d'analyse compatibles avec le criblage de banques contenant plusieurs centaines voire milliers de ligands en quelques jours, l'interprétation des spectres de masse se fait encore manuellement au sein du laboratoire. L'une des perspectives qui apparaît alors dans ce contexte de criblage consiste au développement d'une interface logicielle assurant le **dépouillement automatique** des spectres de masse à un débit supérieur ou égal à celui de production des données brutes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Schultz GA, Corso TN, Prosser SJ, Zhang S.**
A Fully Integrated Monolithic Microchip Electrospray Device for Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 4058.
2. **Moon JE, Davis TJ, Galvin GJ, Schultz GA, Corso TN, Lowes S.**
Integrated monolithic microfabricated electrospray and liquid chromatography system and method. *US Patent 6563111*, **2003**.
3. **Lévy F.**
Physique et technologie des semiconducteurs Presses polytechniques et universitaires romandes, **1994**.
4. **Permuy A, Donzier E, Rezgui F.**
Capteurs microélectroniques. *Techniques de l'ingénieur*, **2004**, 1-17.
5. **Advion Biosciences.**
Triversa Nanomate Operator's Guide. **9th Edition**.
6. **Li J, Alpha CG, Smith BL, Corso TN.**
Ultra-High Field Strength Nanoelectrospray via Multiple Embedded Chip-based Electrodes. Advion Biosciences, Ithaca, NY 14850.
7. **Keetch CA, Hernandez H, Sterling A, Baumert M, Allen MH, Robinson CV.**
Use of a Microchip Device Coupled with Mass Spectrometry for Ligand Screening of a Multi-Protein Target. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75, 4937-4941.
8. **Kapron JT, Pace E, Van Pelt CK, Henion J.**
Quantitation of midazolam in human plasma by automated chip-based infusion nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2003**, 17, 2019-2026.
9. **Gabelica V, Vreuls C, Filee P, Duval V, Joris B, Pauw ED.**
Advantages and drawbacks of nanospray for studying noncovalent protein-DNA complexes by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2002**, 16, 1723-1728.
10. **Keetch CA, Bromley EH, McCammon MG, Wang N, Christodoulou J, Robinson CV.**
L55P transthyretin accelerates subunit exchange and leads to rapid formation of hybrid tetramers. *J Biol Chem.*, **2005**, 280, 41667-41674.
11. **Jecklin MC, Touboul D, Bovet C, Wortmann A, Zenobi R.**
Which electrospray-based ionization method best reflects protein-ligand interactions found in solution? A comparison of ESI, nanoESI, and ESSI for the determination of dissociation constants with mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2008**, 19, 332-343.
12. **Tang K, Lin Y, Matson DW, Kim T, Smith RD.**
Generation of Multiple Electrosprays Using Microfabricated Emitter Arrays for Improved Mass Spectrometric Sensitivity. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 1658-1663.
13. **Gibson GTT, Mugo SM, Oleschuk RD.**
Nanoelectrospray emitters: Trends and perspective. *Mass Spectrometry Reviews*, **2009**, 9999, n/a.
14. **Kelly RT, Page JS, Marginean I, Tang K, Smith RD.**
Nanoelectrospray emitter arrays providing interemitter electric field uniformity. *Analytical Chemistry*, **2008**, 80, 5660-5665.
15. **Benkestock K, Van Pelt CK, Akerud T, Sterling A, Edlund PO, Roeraade J.**
Automated nano-electrospray mass spectrometry for protein-ligand screening by noncovalent interaction applied to human H-FABP and A-FABP. *Journal of Biomolecular Screening*, **2003**, 8, 247-256.
16. **Renaud J-P, Delsuc M-A.**
Biophysical techniques for ligand screening and drug design. *Current Opinion in Pharmacology*, **2009**, 9, 1-7.
17. **Vivat Hannah V, Atmanene C, Zeyer D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S.**
Native mass spectrometry: an "ESI" way to support structure- and fragment-based drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, **In Press**.

18. **Rees DC, Congreve M, Murray CW, Carr R.**
Fragment-based lead discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **2004**, 3, 660-672.
19. **Schulz MN, Hubbard RE.**
Recent progress in fragment-based lead discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, **2009**.
20. **Belfield GP, Delaney SJ.**
The impact of molecular biology on drug discovery. *Biochemical Society Transactions*, **2006**, 34, 313-316.
21. **Geoghegan KF, Kelly MA.**
Biochemical applications of mass spectrometry in pharmaceutical drug discovery. *Mass Spectrometry Reviews*, **2005**, 24, 347-366.
22. **Papac DI, Shahrokh Z.**
Mass spectrometry innovations in drug discovery and development. *Pharmaceutical Research*, **2001**, 18, 131-145.
23. **Deng G, Sanyal G.**
Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 40, 528-538.
24. **Annis DA, Nickbarg E, Yang X, Ziebell MR, Whitehurst CE.**
Affinity selection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**, 11, 518-526.
25. **Siegel MM.**
Early Discovery Drug Screening Using Mass Spectrometry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2002**, 2, 13-33.
26. **Rogniaux H, Van Dorsselaer A, Barth P, Biellmann JF, Barbanton J, van Zandt M, Chevrier B, et al.**
Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies - A System for X-ray Crystallography and NMR. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1999**, 10, 635-647.
27. **Sanglier S, Van Dorsselaer A, Vivat Hannah V, Renaud J-P.**
La spectrométrie de masse des assemblages non-covalents en biologie : aspects fondamentaux et applications à la recherche pharmaceutique. *Spectra Analyse*, **2005**, 34, 26-35.
28. **Bovet C, Wortmann A, Eiler S, Granger F, Ruff M, Gerrits B, Moras D, et al.**
Estrogen receptor-ligand complexes measured by chip-based nanoelectrospray mass spectrometry: an approach for the screening of endocrine disruptors. *Protein Science*, **2007**, 16, 938-946.
29. **Barbut F.**
Les infections nosocomiales de l'adulte en 2005 : bilan et perspectives. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2005**, 376, 27-36.
30. **Institut National de Veille Sanitaire.**
Enquête de prévalence nationale 2001 - Résultats. Réseau d'alerte, d'investigations et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN).
http://www.invs.sante.fr/publications/2003/raisin_enp_2001/raisin_enp_2001_p_19_50.pdf.
31. **Institut National de Veille Sanitaire.**
Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006.
http://www.invs.sante.fr/publications/2009/enquete_prevalence_infections_nosocomiales/enquete_prevalence_infections_nosocomiales_plaq.pdf.
32. **Foster TJ.**
Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, **2005**, 3, 948-958.
33. **Joubert O.**
Identification, stabilisation et inhibition de l'interaction monomère S –monomère F des leucotoxines à deux composés de *Staphylococcus aureus*. *Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg*, **2005**.
34. **Prevost G, Cribier B, Couppe P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, Monteil H, et al.**

- Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity*, **1995**, 63, 4121-4129.
35. **Finck-Barbancon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA.**
Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1993**, 1182, 275-282.
 36. **Baba Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pedelacq JD, Samama JP, Sanni A, et al.**
Discoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Letters*, **1999**, 461, 280-286.
 37. **Nguyen VT, Higuchi H, Kamio Y.**
Controlling pore assembly of staphylococcal gamma-haemolysin by low temperature and by disulphide bond formation in double-cysteine LukF mutants. *Molecular Microbiology*, **2002**, 45, 1485-1498.
 38. **Smith RD, Light-Wahl KJ.**
The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biological Mass Spectrometry*, **1993**, 22, 493-501.
 39. **Douteau-Guével N, Coleman AW, Morel J-P, Morel-Desrosiers N.**
Complexation of basic amino acids by water-soluble calixarene sulphonates as a study of the possible mechanisms of recognition of calixarene sulphonates by proteins. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **1998**, 11, 693-696.
 40. **Perret F, Lazar AN, Coleman AW.**
Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chem Commun (Camb)*, **2006**, 2425-2438.
 41. **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. *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, 38, 491-501.
 42. **Bialik S, Kimchi A.**
DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Seminars in Cancer Biology*, **2004**, 14, 283-294.
 43. **Bialik S, Kimchi A.**
The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, **2006**, 75, 189-210.
 44. **Tereshko V, Teplova M, Brunzelle J, Watterson DM, Egli M.**
Crystal structures of the catalytic domain of human protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression. *Nature Structural Biology*, **2001**, 8, 899-907.
 45. **Shani G, Marash L, Gozuacik D, Bialik S, Teitelbaum L, Shohat G, Kimchi A.**
Death-Associated Protein Kinase Phosphorylates ZIP Kinase, Forming a Unique Kinase Hierarchy To Activate Its Cell Death Functions. *Molecular and Cellular Biology*, **2004**, 24, 8611-8626.

TROISIEME PARTIE :

CARACTERISATION DE COMPLEXES PROTEINE / ARN PAR SPECTROMETRIE DE MASSE SUPRAMOLECULAIRE

CHAPITRE I : Introduction à l'Analyse de Complexes Protéine / ARN en MS Supramoléculaire

CHAPITRE II : Etude par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire de Complexes Protéine / ARN impliqués dans la Modification des ARN de Transfert

CHAPITRE III : Reconstitution *in vitro* de Complexes Ribonucléoprotéiques à Boîte H/ACA : Etude des Réseaux d'Interactions Protéine / ARN par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire

CHAPITRE I

Introduction à l'Analyse de Complexes Protéine / ARN en MS Supramoléculaire

Après un bref rappel concernant les ARN et les techniques biophysiques utilisées pour étudier leurs interactions avec les protéines, ce chapitre se consacre à la description des conditions expérimentales et instrumentales spécifiques à la caractérisation des complexes protéine / ARN par MS supramoléculaire.

1) INTRODUCTION AUX INTERACTIONS PROTEINE / ARN

1.1) Généralités sur les interactions protéine / ARN

L'ARN, ou acide ribonucléique, est un biopolymère dont les motifs de répétition (nucléotides) sont composés d'une base, d'un ribose et d'un groupement phosphate et sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiester (figure 1).¹

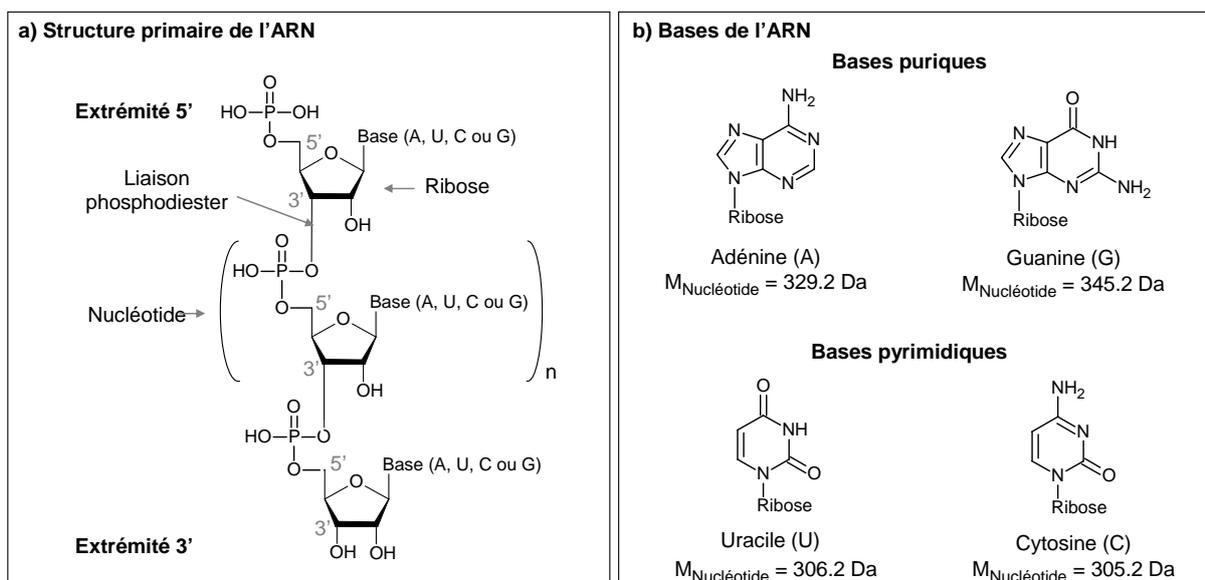


Figure 1 : Structure de l'ARN. (b) Les masses affichées correspondent à la masse du nucléotide (base + ribose + phosphate) intégrant la base en question.

Il existe deux catégories d'ARN :

- ▶ **L'ARN codant** : il s'agit de l'**ARN messager** (ARNm) dont le rôle est d'exporter l'information génétique du noyau vers le cytoplasme où il est traduit par les ribosomes pour exprimer la protéine correspondante.¹ L'ARN codant représente moins de 2% du génome humain.^{2, 3}
- ▶ **Les ARN non-codants** : cette famille d'ARN n'a pendant longtemps regroupé que les **ARN ribosomiques** (ARNr) et les **ARN de transfert** (ARNt) qui interviennent tous deux dans le mécanisme de la traduction. Depuis une vingtaine d'années cependant, cette famille tend à s'élargir avec la découverte de nouveaux types d'ARN non-codants, comme les **petits ARN nucléolaires** (snoRNA - *small nucleolar RNA*) qui interviennent dans la méthylation et la pseudouridylation des ARN ou encore les **petits ARN interférents** (siRNA - *small interfering RNA*) et les **micro ARN** (miRNA - *micro RNA*) qui permettent de réguler l'expression génétique au niveau post-transcriptionnel.^{2, 3}

Les ARN peuvent adopter différentes structures secondaires et tertiaires qui jouent un rôle majeur dans l'affinité et la spécificité d'interaction avec divers partenaires. Dans le cas des complexes protéine / ARN, la stabilité de l'édifice supramoléculaire peut être assurée par i) des interactions électrostatiques entre les groupements phosphates et la chaîne latérale d'acides aminés positivement

chargés (ex : groupement ammonium de la lysine), ii) des liaisons hydrogène entre certains résidus de la protéine et les bases de l'ARN, iii) des interactions aromatiques entre les bases et les acides aminés portant une chaîne latérale aromatique (ex : tyrosine) ainsi que iv) la contribution de l'effet hydrophobe.¹ L'association entre protéine et ARN est à la base de mécanismes clés tels que ceux impliqués dans l'expression génétique (ex : épissage, traduction) ou encore la modification des ARN (ex : méthylation, pseudouridylation), et justifie de ce fait l'intérêt qui est porté à l'étude des complexes protéine / ARN.

1.2) Techniques de caractérisation

L'étude des interactions protéine / ARN peut être réalisée à l'aide de différentes techniques biophysiques couramment utilisées pour caractériser des complexes protéine / protéine ou protéine / ligand, telles que la cristallographie ou la résonance plasmonique de surface. Il existe d'autre part des techniques plus spécifiques de ce type de complexes, parmi lesquelles on trouve :

- ▶ **Le retard sur gel (EMSA - *electrophoretic mobility shift assay*)** : cette technique consiste à suivre la migration d'un ARN radiomarqué (³²P) sur gel d'électrophorèse monodimensionnel réalisé en conditions non-dénaturantes en présence / absence de partenaires protéiques potentiels. La formation d'un complexe protéine / ARN est ainsi mise en évidence par une migration retardée de l'ARN. De plus, en effectuant un titrage de l'ARN par la protéine, il est possible de déterminer la constante d'affinité des complexes formés (figure 2a). Cette technique possède l'avantage de ne consommer que des quantités picomolaires d'échantillon en raison de la grande sensibilité des systèmes de détection de la radioactivité.
- ▶ **La technique du triple hybride** : cette technique consiste à modifier génétiquement une souche de levure de sorte à ce qu'elle produise (i) une protéine hybride P1 possédant un site de fixation à une séquence ADN spécifique ainsi qu'un site de fixation à une séquence ARN spécifique, (ii) un ARN hybride comprenant la séquence nucléotidique reconnue par la protéine P1 ainsi que celle de l'ARN d'intérêt et (iii) une protéine hybride P2 contenant la séquence en acides aminés de la protéine d'intérêt ainsi que d'une protéine capable d'activer la transcription d'un gène rapporteur (figure 2b).⁴ La formation d'un complexe entre l'ARN et la protéine d'intérêt permet de former un complexe quaternaire activant la transcription du gène rapporteur qui est alors détectée soit de manière phénotypique, soit par un test biochimique.⁴ Il s'agit là d'une technique permettant non seulement de confirmer l'existence d'une interaction protéine / ARN, mais également de cribler des ARN partenaires d'une protéine cible ou inversement, de cribler des protéines partenaires d'un ARN cible.⁴
- ▶ **La technique d'empreinte (*footprinting*)** : cette technique consiste à dégrader un ARN radiomarqué à l'une de ses extrémités, soit par des enzymes spécifiques (RNases) ou par des agents chimiques non-spécifiques (ex : Pb(II)). Les fragments de l'ARN sont ensuite séparés sur gel d'électrophorèse. La comparaison des zones de clivage de l'ARN seul et du

complexe protéine / ARN permet de définir les régions protégées du clivage par la protéine et donc de localiser le site d'interaction de la protéine sur l'ARN (figure 2c).^{5,6}

- **La technique SELEX** (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment* - figure 2d) : cette technique consiste à cribler une banque contenant typiquement jusqu'à 10^{15} séquences nucléotidiques potentiellement capables de se lier à une protéine cible.⁷ Après incubation de la protéine cible en présence de la banque entière, les ARN fixés par la protéine sont tout d'abord extraits avant de subir une transcription inverse (synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN). Les ADN ainsi obtenus sont amplifiés par PCR (*polymerase chain reaction*), puis retranscrits en ARN. Ces derniers sont alors à nouveau incubés avec la protéine cible pour subir un nouveau cycle de sélection. En multipliant ainsi les cycles de sélection il est alors possible d'identifier des ARN aptamères, c'est-à-dire des molécules d'ARN disposant de très hautes affinités et spécificités de reconnaissance pour des protéines cibles.⁷

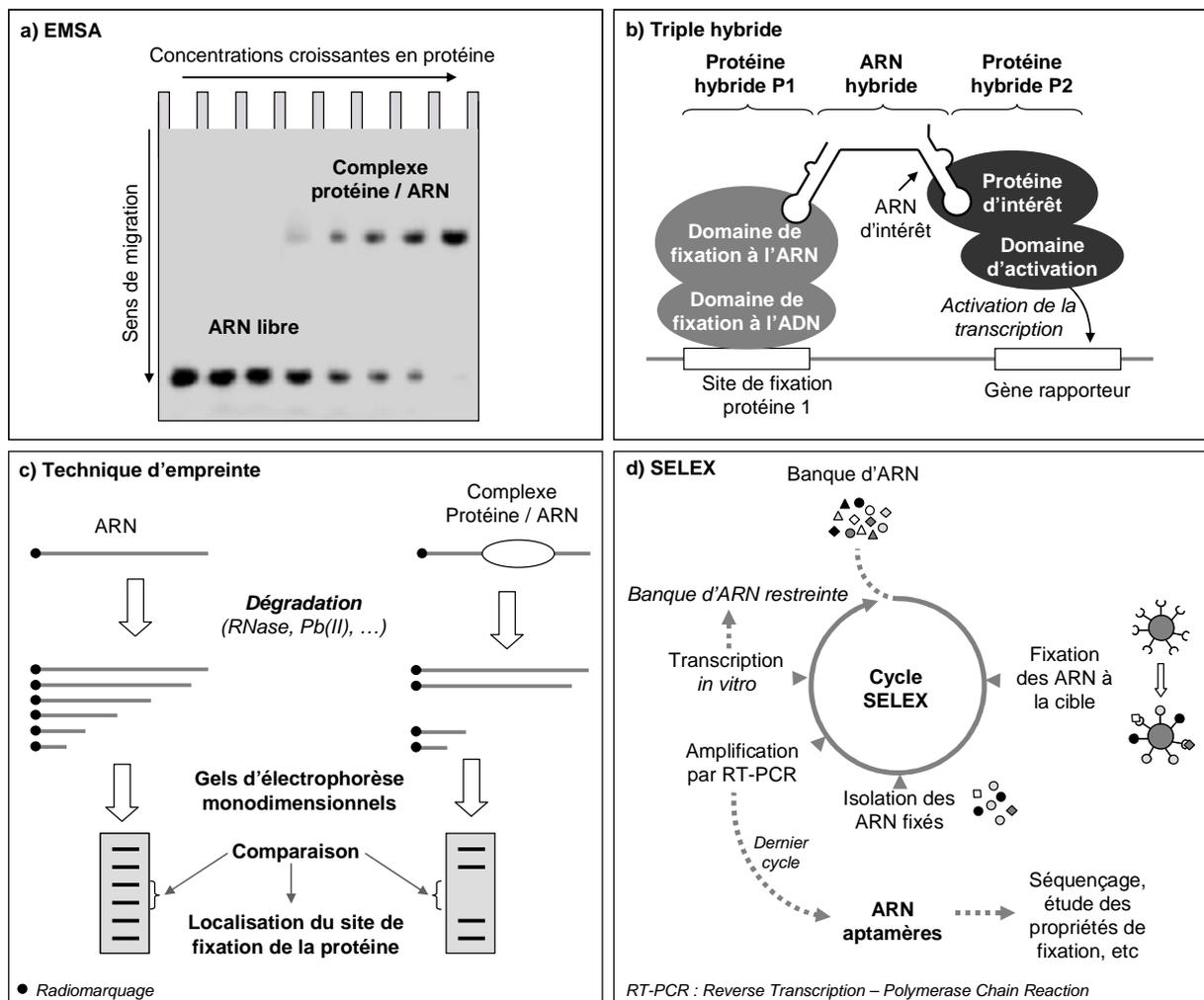


Figure 2 : Principes de certaines techniques mises en œuvre pour l'étude des interactions protéine / ARN. (a) Technique du retard sur gel ou *electrophoretic mobility shift assay*. (b) Technique du triple hybride, adapté d'après ⁴. (c) Technique d'empreinte ou *footprinting*. (d) SELEX pour *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, adapté d'après ⁷.

La MS intervient également comme technique d'analyse des interactions protéine / ARN. L'une des stratégies mises en œuvre au laboratoire fait appel à des **approches protéomiques afin d'identifier les protéines capables de se fixer à un ARN cible**.⁸ Pour cela, l'ARN qui est greffé sur une phase stationnaire joue le rôle « d'appât » pour retenir les protéines partenaires contenues dans un mélange complexe. Après élimination des protéines non retenues, les protéines formant un complexe avec l'ARN sont éluées et identifiées soit (i) par digestion enzymatique suivie d'une analyse par chromatographie liquide couplée à la MS en tandem (LC-MS/MS ou 2D-LC-MS/MS), soit (ii) en séparant tout d'abord les protéines par électrophorèse sur gel mono ou bidimensionnel, suivi d'une digestion enzymatique et d'une analyse LC-MS/MS.⁸

Après cette étape d'identification, il convient d'étudier les interactions qui existent entre les différents partenaires du complexe. Parmi les approches faisant appel à la MS, on distingue l'utilisation d'un pontage chimique ou photochimique entre protéines et acides nucléiques afin de former un **complexe covalent**.⁹ La mesure de masse de ce complexe covalent intact permet alors d'accéder à l'information de stœchiométrie, tandis que l'analyse MS après protéolyse et digestion enzymatique / hydrolyse de l'acide nucléique permet de déterminer les sites d'interaction entre la protéine et l'acide nucléique.^{9, 10} Bien que très informative, cette approche se heurte aux difficultés de mise au point des conditions de pontage. Ainsi, avec la possibilité de **détecter directement des complexes protéine / ARN non-covalents**, la **MS supramoléculaire** constitue une alternative intéressante qui est présentée dans cette troisième partie du manuscrit.

2) SPECIFICITES DE L'ANALYSE DE COMPLEXES PROTEINE / ARN PAR MS SUPRAMOLECULAIRE

2.1) Dessalage

Une première particularité de l'analyse de complexes protéine / ARN concerne la préparation des échantillons, et plus particulièrement le dessalage des ARN. En effet, la présence de nombreux groupements phosphates fait que **ces biomolécules présentent une certaine affinité pour des cations tels que les ions Na⁺ et K⁺, dont la présence en grande quantité est incompatible avec l'ionisation ESI**. La figure 3 illustre en effet l'analyse d'un ARN de 19 kDa en conditions dénaturantes. Dans le cas de la figure 3a, le spectre de masse nanoESI affiche un important bruit de fond, et l'agrandissement d'un état de charge révèle la présence de nombreux adduits de sodium, indiquant un dessalage insuffisant. Après une nouvelle étape d'échange de tampon, la figure 3b montre un spectre de masse de meilleure qualité avec des pics fins et sans adduit de sodium. Cette figure illustre ainsi la nécessité d'optimiser dans un premier temps l'échange de tampon afin de garantir l'obtention de spectres de masse de qualité. Cette étape est particulièrement importante car il a été remarqué à plusieurs reprises durant ce travail de thèse que la présence résiduelle de sels non-volatils dans la solution d'ARN peut être responsable d'une **suppression progressive du signal lors des expériences de titrage d'une protéine par son ARN partenaire**.

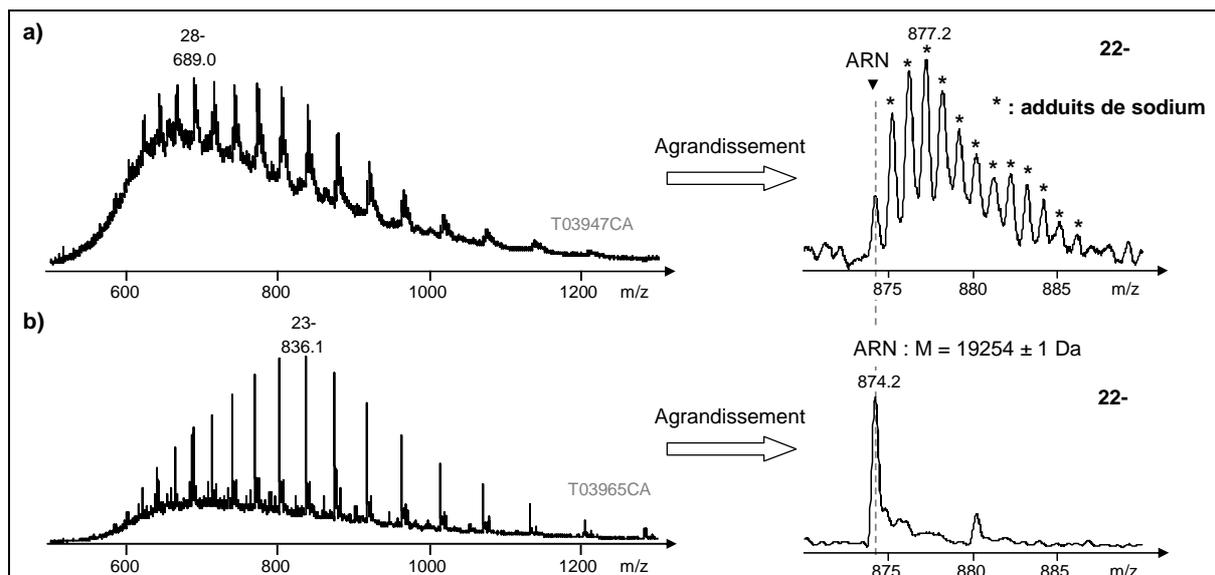


Figure 3 : Influence de la présence résiduelle de sels non-volatils sur l'analyse d'ARN. ARN ($M_{\text{théorique}} = 19255$ Da) dilué à $1 \mu\text{M}$ dans un mélange eau / acétonitrile / triéthylamine 50/50/1 et analysé en mode d'ionisation négatif sur le MicrOTOF-Q soit a) après 3 cycles de concentration / dilution réalisés par ultracentrifugation (Vivaspin, MWCO = 3 kDa), soit b) après un cycle d'échange de tampon supplémentaire réalisé à l'aide d'une colonne de filtration sur gel (Zeba). Dans les deux cas, l'échange a été réalisé à l'aide d'un tampon NH_4HCO_3 200 mM pH 8,0.

Par ailleurs, il faut noter que **l'efficacité du dessalage diminue rapidement lorsque la taille de l'ARN augmente**. Cette tendance, déjà remarquée lors de la thèse de Noëlle Potier au laboratoire,¹¹ est illustrée par la figure 4. En effet, lorsque la taille de l'ARN augmente, les adduits de sodium sur l'ARN sont de plus en plus nombreux, engendrant ainsi une erreur croissante entre la masse mesurée et la masse théorique. A noter également que dans les cas présents aucune amélioration n'a été constatée en multipliant les cycles de dessalage des ARN KS1 et 7SK, illustrant ainsi la difficulté liée à l'analyse d'ARN de grande taille. Dans le cadre de ce travail cependant, l'ensemble des sujets abordés concerne l'étude des interactions entre des protéines et des ARN de masses moléculaires inférieures à 30 kDa, limitant de ce fait les problèmes liés au dessalage de ces biomolécules.

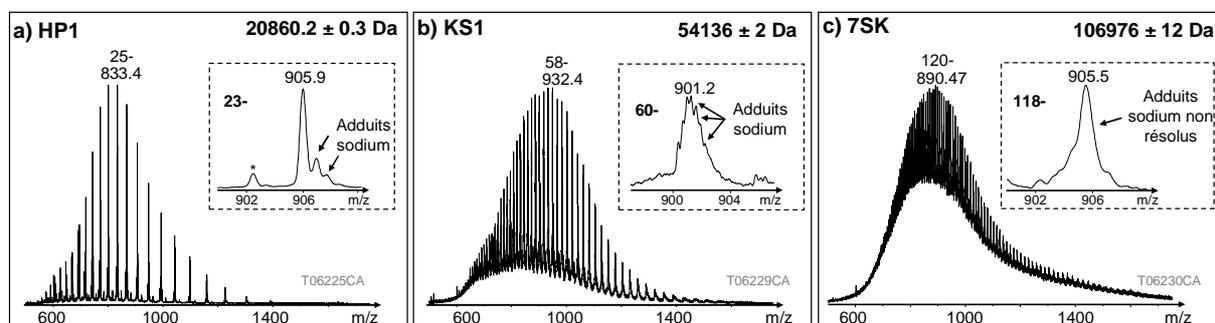


Figure 4 : Influence de la taille de l'ARN sur la qualité de l'échange de tampon. Les ARN a) HP1 ($M_{\text{théorique}} = 20859$ Da), b) KS1 ($M_{\text{théorique}} = 51294$ Da) et c) 7SK ($M_{\text{théorique}} = 101384$ Da) ont été dessalés contre un tampon NH_4Ac 250 mM pH 7,5 à l'aide de colonnes de filtration sur gel (biospin). Les ARN ont ensuite été dilués à $1 \mu\text{M}$ dans un mélange eau / acétonitrile / triéthylamine 50/50/1 et analysés en mode d'ionisation négatif sur le MicrOTOF-Q.

2.2) L'ionisation des ARN

En raison de la présence de nombreux groupements phosphates, les travaux rapportés dans la littérature qui portent sur l'analyse d'ARN par ESI-MS sont la plupart du temps réalisés en **mode d'ionisation négatif**. Durant ce travail de thèse également, la masse des ARN seuls a systématiquement été vérifiée par analyse en conditions dénaturantes en mode d'ionisation négatif. En revanche, **pour les analyses menées en conditions non-dénaturantes, c'est le mode d'ionisation positif qui a été sélectionné** pour l'ensemble des résultats décrits dans cette partie, et cela pour les raisons suivantes :

- ▶ Au laboratoire, tout comme dans la littérature, les protéines sont quasi-exclusivement analysées en mode d'ionisation positif. Par conséquent, les complexes protéine / ARN étudiés durant ce travail de thèse ont logiquement été analysés en mode d'ionisation positif.
- ▶ Les ARN peuvent également être analysés en mode d'ionisation positif, donnant ainsi lieu à des signaux tout aussi intenses qu'en mode négatif, au moins en ce qui concerne les analyses en conditions non-dénaturantes (figure 5).
- ▶ Le MicroTOF-Q faisant exception, les autres instruments utilisés au laboratoire (LCT et Synapt HDMS) présentent une sensibilité nettement meilleure en mode d'ionisation positif qu'en mode négatif.

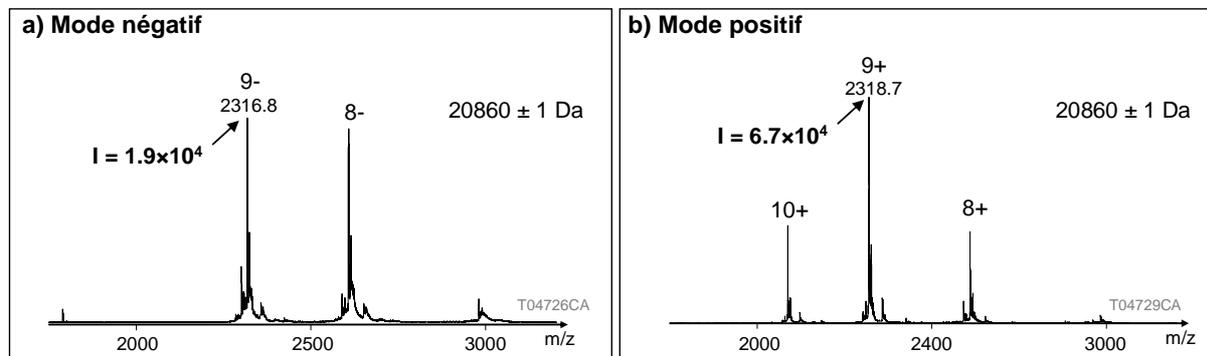


Figure 5 : Analyse de l'ARN HP1 en conditions non-dénaturantes (10 μ M dans un tampon NH_4Ac 250 mM pH 7,5) soit (a) en mode d'ionisation négatif, soit (b) en mode d'ionisation positif. Les analyses ont été réalisées à l'aide du MicroTOF-Q.

NB : Alors que le processus d'ionisation des ARN en mode positif n'a pas fait l'objet d'études approfondies comme dans le cas des protéines, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'ionisation des ARN en conditions non-dénaturantes résulte probablement de la protonation des groupements phosphates (neutralisation des charges négatives) et de celle des bases protonables et accessibles (apport d'un excès de charges positives).

2.3) Production des ARN

Au même titre que la production de protéines recombinantes, les ARN peuvent être produits par différentes méthodes afin d'en disposer de quantités suffisantes pour les études *in vitro*. Sans entrer dans les détails de ces méthodes, on retiendra qu'il existe deux méthodes principales :

- ▶ **La synthèse chimique** qui consiste à procéder à des cycles successifs permettant d'associer les différents nucléotides un par un à partir du nucléotide 3' fixé sur une phase stationnaire. L'oligonucléotide final est ensuite décroché de la phase stationnaire avant de subir une ultime étape de purification. Cette synthèse est réalisée de manière automatique et s'apparente ainsi en quelque sorte à la synthèse chimique de peptides.
- ▶ **La transcription *in vitro***, quant à elle, fait appel à l'utilisation de polymérases qui assurent la transcription de l'ADN de départ en ARN. En fonction de la méthode utilisée, des **hétérogénéités** peuvent être introduites au sein de l'ARN, parmi lesquelles on distingue une hétérogénéité du nombre de phosphates en 5' (-80 Da par groupement phosphate perdu), ainsi que l'ajout de nucléotides supplémentaires en 3' (figure 6a). Afin de s'affranchir de ces hétérogénéités, il est possible de produire un ARN intégrant la séquence d'un ribozyme en 3' et/ou 5' de la séquence d'intérêt. En effet, le ribozyme dispose de la capacité d'auto-cliver l'ARN, permettant ainsi d'obtenir l'ARN d'intérêt avec des extrémités homogènes (figure 6b).

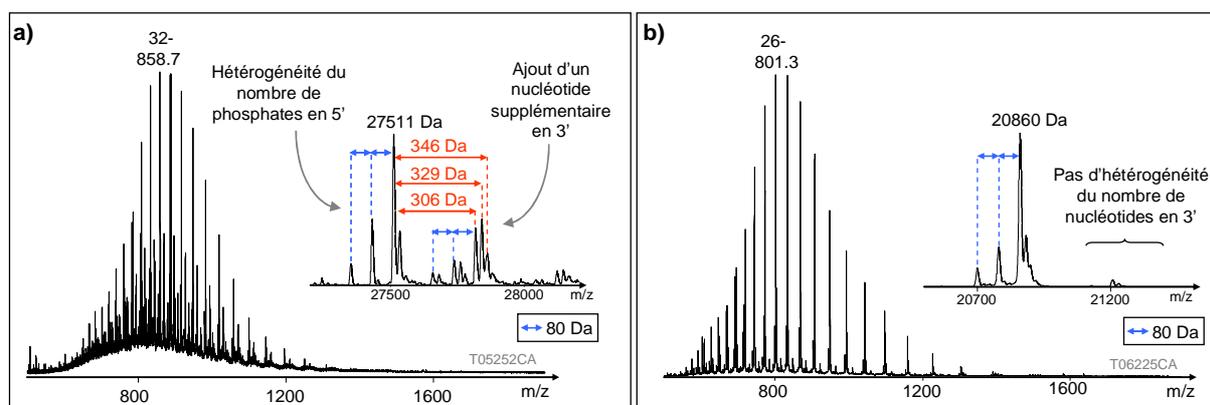


Figure 6 : Comparaison de deux ARN produits par transcription *in vitro* à l'aide d'un plasmide linéarisé soit (a) sans ribozyme, soit (b) avec un ribozyme intégré du côté 3'. (a) L'ARN^{Tyr} et (b) l'ARN HP1 ont été dessalés par filtration sur gel (Zeba) contre un tampon NH₄Ac puis dilués à 1 μM dans un mélange eau / acétonitrile / triéthylamine 50/50/1 avant d'être analysés en mode d'ionisation négatif sur le MicrOTOF-Q. Les spectres de masse en insert ont été obtenus à l'aide de l'algorithme de déconvolution Maxent (DataAnalysis 3.4, Bruker Daltonics). (a) les différences de masse de 306 Da, 329 Da et 346 Da correspondent respectivement à l'addition des nucléotides U/C, A et G.

2.4) Stabilité en phase gazeuse

Les interactions non-covalentes entre protéines et ARN sont en grande partie guidées par des interactions de type électrostatique intervenant d'une part entre les phosphates de l'ARN chargés négativement et les acides aminés de la protéine chargés positivement (lysine, arginine, etc.), et

d'autre part entre les bases de l'ARN et les résidus négativement chargés ou capable de former des liaisons hydrogène.¹ **Les complexes protéine / ARN forment ainsi des édifices particulièrement stables en phase gazeuse**, permettant alors d'appliquer des conditions expérimentales suffisamment énergétiques pour améliorer la désolvatation des ions sans pour autant risquer de dissocier ces édifices supramoléculaires dans le spectromètre de masse. **Les complexes protéine / ARN sont de ce fait particulièrement bien adaptés à l'analyse par MS supramoléculaire.**

2.5) Stabilité en solution – effet de la force ionique du tampon

En raison de l'importante contribution des interactions électrostatiques dans la formation de complexes protéine / ARN, la stabilité de ces édifices supramoléculaires en solution est très fortement dépendante de la force ionique du tampon utilisé.¹ En effet, en présence de fortes concentrations de sels, les charges se trouvent davantage écrantées, réduisant ainsi la force des interactions électrostatiques. La figure 7 illustre en effet l'influence de la force ionique du tampon sur la stabilité d'un complexe protéine / ARN. Il apparaît clairement que des concentrations croissantes d'acétate d'ammonium conduisent à la déstabilisation du complexe en solution comme en témoigne la proportion croissante de protéine libre détectée sur les spectres de masse. Pour chaque système biologique étudié, il convient alors **d'ajuster la force ionique du tampon pour trouver le meilleur compromis entre stabilité de la protéine en solution et stabilité du complexe protéine / ARN.**

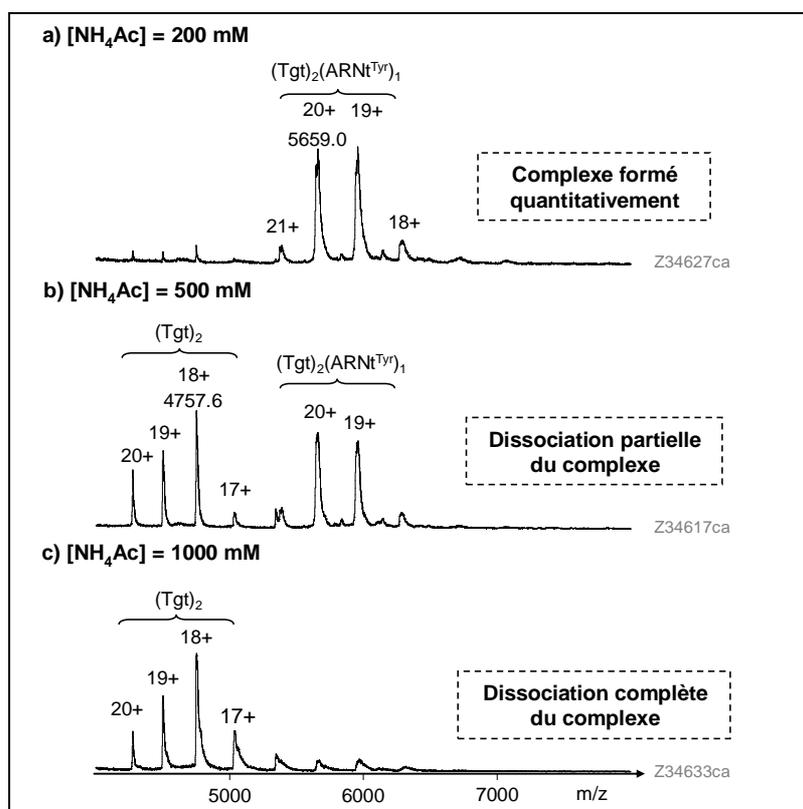


Figure 7 : Effet de la force ionique du tampon sur la stabilité du complexe formé entre la protéine Tgt (tRNA-guanine transglycosylase) et l'ARNt^{Tyr}. La protéine (10 μM - concentration en monomère) et l'ARNt (5 μM) ont été incubés en présence de concentrations d'acétate d'ammonium de (a) 200 mM, (b) 500 mM et (c) 1000 mM. Le pH des solutions a été fixé à 8,0. (Tgt)₂ : 85613 ± 4 Da et (Tgt)₂(ARNt^{Tyr})₁ : 113147 ± 9 Da.

NB : Cette caractéristiques des complexes protéine / ARN peut être mise à profit pour réaliser des expériences de contrôle. En effet, la mise en évidence d'une modification de la proportion de complexe observée sur les spectres de masse en fonction de la force ionique du tampon est un moyen permettant de s'assurer que les complexes détectés en phase gazeuse résultent bien d'une reconnaissance spécifique en solution et non d'un artefact de la technique.¹²

3) VALORISATION

Les développements méthodologiques réalisés durant ce travail de thèse autour du thème de l'étude de complexes protéine / ARN par MS supramoléculaire ont fait l'objet de la communication suivante :

- ▶ **Communication orale** : Atmanene C, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Apports de la spectrométrie de masse supramoléculaire pour l'étude de complexes non-covalents protéine / ARN. Journée du Club ARN, 11 décembre 2008, Bordeaux.

CHAPITRE II

Etude par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire de Complexes Protéine / ARN impliqués dans la Modification des ARN de Transfert

Dans ce chapitre sont présentés deux cas d'études portant sur des protéines intervenant dans la modification des ARNt. Menés respectivement en collaboration avec les équipes du Dr Carine Tisné (Université Paris-Descartes, Paris) et du Pr Dr Gerhard Klebe (Phillips-Universität, Marburg, Allemagne), les études consacrées aux interactions Trml / ARNt et Tgt / ARNt y sont détaillées en mettant un accent particulier sur la complémentarité de la MS supramoléculaire avec les techniques biophysiques utilisées de manière conventionnelle pour la caractérisation des complexes protéine / ARN.

1) ETUDE DES INTERACTIONS TrmI / ARNt

1.1) Contexte de l'étude

Dans ce premier cas d'étude, nous nous sommes intéressés aux propriétés de reconnaissance de l'ARNt par la protéine m1A58 méthyltransférase (TrmI) de la bactérie *Thermus thermophilus*. Comme son nom l'indique, cette enzyme est capable de modifier les ARNt par ajout d'un groupement méthyle sur l'adénosine 58 (figure 1). Cette modification est présente dans près de 25% des ARNt séquencés suggérant ainsi un rôle important dans la structure / fonction de ces biomolécules.¹³ En effet, alors que la croissance de *T. thermophilus* est optimale entre 48 et 85°C,¹³ il a été montré qu'un mutant de la bactérie pour lequel le gène *trmI* a été inactivé présente un défaut de croissance à 80°C.¹⁴ Cette observation suggère l'importance de la méthylation de l'ARNt, qui comme d'autres modifications de l'ARNt, permet de stabiliser la structure de ces biomolécules à haute température.^{15, 16}

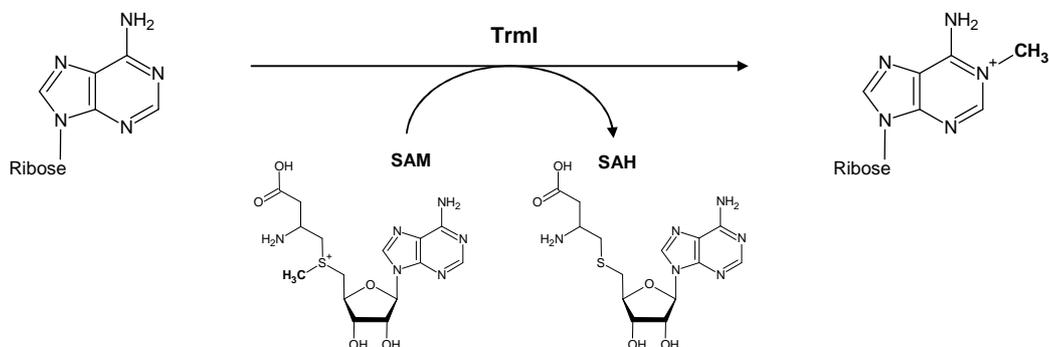


Figure 1 : Réaction de transfert d'un groupement méthyle sur le cycle purine de l'adénosine. SAM : S-Adénosyl méthionine et SAH : S-Adénosyl homocystéine.

Dans cette étude menée en collaboration avec l'équipe du Dr Carine Tisé (Université Paris-Descartes, Paris), la MS supramoléculaire a été sollicitée afin de confirmer l'état d'oligomérisation de la protéine et de déterminer la stœchiométrie d'interaction de l'ARNt. Les résultats ainsi obtenus ont fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Molecular Biology* (cf. page 233) dont un résumé des principaux résultats figure ci-dessous.

1.2) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus

1.2.1) Détermination de l'état d'oligomérisation de TrmI

La MS supramoléculaire a tout d'abord permis de lever une ambiguïté concernant l'état d'oligomérisation de TrmI (26 kDa). En effet, il a été conclu dans une étude antérieure que la protéine se présente sous la forme d'un tétramère bien que la chromatographie d'exclusion stérique ait révélé une masse apparente de 150 kDa proche de celle d'un pentamère.¹⁴ Ainsi, la comparaison de la masse de TrmI mesurée en conditions dénaturantes et non-dénaturantes par MS supramoléculaire a permis de confirmer de manière univoque l'existence de la protéine sous forme tétramérique ($M_{\text{mesurée}} = 115450 \pm 5$ Da et $M_{\text{théorique}} = 115453$ Da), venant ainsi corroborer les données de cristallographie obtenues de manière concomitante.

1.2.2) Stœchiométrie d'interaction de l'ARNt

Dans la mesure où il n'a pas été possible d'obtenir de cristaux du complexe TrmI / ARNt, des expériences de titrage de TrmI par l'ARNt ont été entreprises par MS supramoléculaire. Il a ainsi été montré que **la protéine reste tétramérique en se fixant à l'ARNt** et qu'elle est capable de fixer **jusqu'à deux molécules d'ARNt par tétramère**. La spécificité des complexes détectés en phase gazeuse a par ailleurs été confirmée par deux expériences de contrôle. Premièrement, l'utilisation d'un ARN contrôle négatif a permis de montrer l'absence de complexes avec TrmI, constituant ainsi un premier élément de réponse concernant la **spécificité de reconnaissance de l'ARNt par la protéine**. Deuxièmement, en augmentant la force ionique du tampon, les spectres de masse ont révélé une dissociation progressive des complexes TrmI / ARNt, démontrant que **les mesures réalisées en phase gazeuse reflètent bel et bien le comportement du complexe en solution**. Finalement, il faut encore noter que la fixation de deux molécules d'ARNt par tétramère est en accord avec la structure cristallographique de TrmI montrant l'existence de deux sillons positivement chargés et compatibles d'un point de vue stérique avec la fixation d'un ARNt par sillon.

1.3) Conclusion de l'étude

Grâce à la précision obtenue sur la mesure de la masse moléculaire des complexes protéiques, la MS supramoléculaire a tout d'abord permis de confirmer l'état d'oligomérisation tétramérique de TrmI, avant de renseigner sur la stœchiométrie d'interaction de l'ARNt à la protéine. La combinaison des données de MS supramoléculaire et de cristallographie a ainsi permis de fournir des éléments clés dans la compréhension du mécanisme de méthylation de l'ARNt par TrmI, illustrant ainsi la **complémentarité** de ces deux techniques pour l'étude de complexes protéine / ARNt.

1.4) Valorisation

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet des communications suivantes :

- ▶ **Publication** : Barraud P, Golinelli-Pimpaneau B, Atmanene C, Sanglier S, Van Dorsselaer A, Droogmans L, Dardel F, Tisné C. Crystal structure of *Thermus thermophilus* tRNA m1A58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA. *Journal of Molecular Biology*, **2008**, 377, 535-550.
- ▶ **Communication par affiche** : Atmanene C, Barraud P, Dardel F, Tisné C, Van Dorsselaer A, Sanglier S. Protein-oligonucleotide complexes characterization using noncovalent MS: study of the tRNA binding properties of tRNA m1A58 methyltransferase. 56th conference of the American society of mass spectrometry, 1-5 juin 2008, Denver, CO, USA.
- ▶ **Communication par affiche** : Atmanene C, Barraud P, Dardel F, Tisné C, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Protein-oligonucleotide complexes characterization using noncovalent mass spectrometry: study of the tRNA binding properties of tRNA m1A58 methyltransferase. 25èmes journées françaises de spectrométrie de masse, 8-11 septembre 2008, Grenoble.

2) ETUDE D'INHIBITEURS DE L'INTERACTION ENTRE Tgt ET L'ARNt

2.1) Contexte de l'étude

Les shigelles sont des bactéries responsables de la shigellose ou dysenterie bacillaire, qui est une infection intestinale provoquant près d'un million de morts par an, en particulier dans les pays en voie de développement où le manque d'hygiène favorise la transmission de la maladie.¹⁷ Ces bactéries disposent de facteurs de virulence protéiques accroissant leur pathogénicité. L'expression de ces facteurs de virulence est contrôlée par des facteurs de transcription dont le niveau d'expression est lui-même dépendant de la disponibilité d'ARNt modifiés.¹⁷ En effet, l'inactivation de l'expression de Tgt (tRNA-guanine transglycosylase), une protéine de 43 kDa impliquée dans la modification de l'ARNt, permet de réduire la virulence des shigelles.^{18, 19} Tgt constitue de ce fait une cible thérapeutique intéressante dans le contexte du traitement contre la shigellose.

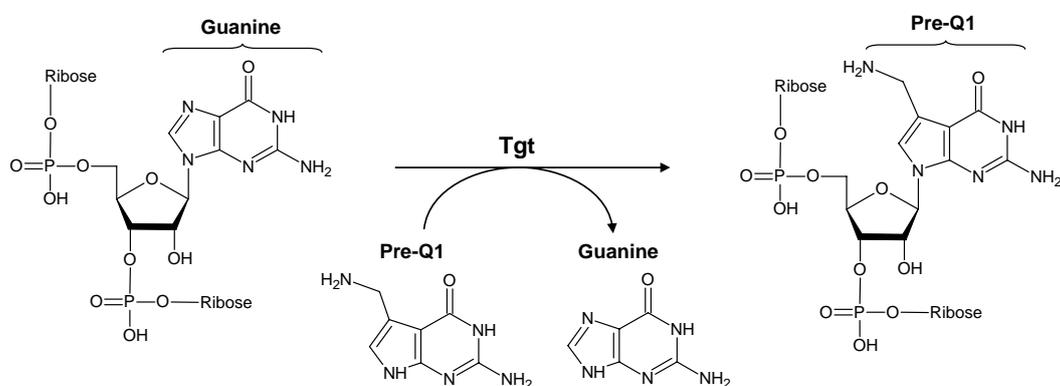


Figure 2 : Réaction d'échange de la guanine 34 de l'ARNt par la 7-aminométhyl-7-déazaguanine (Pre-Q1) catalysée par Tgt.

Tgt catalyse le remplacement de la guanine 34 de certains ARNt en 7-aminométhyl-7-déazaguanine (figure 2). Cette enzyme a fait l'objet de nombreuses études visant à développer des molécules capables d'inhiber son activité et donc de réduire la virulence des shigelles. Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude en collaboration avec l'équipe du Pr Dr Gerhard Klebe (Philipps-Universität, Marburg, Allemagne) visant premièrement à confirmer l'état d'oligomérisation de Tgt ainsi que sa stoechiométrie d'interaction avec l'ARNt. Puis, dans un second temps, nous avons souhaité étudier l'influence sur la structure quaternaire de Tgt de mutations ponctuelles introduites au niveau de l'interface protéine / protéine de l'oligomère. Finalement, la MS supramoléculaire a également été mise en œuvre pour étudier l'influence de différentes molécules inhibitrices sur les interactions entre Tgt et l'ARNt.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Molecular Biology* (cf. page 167) dont un résumé des principaux résultats figure ci-dessous.

2.2) Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus

2.2.1) Détermination de l'état d'oligomérisation de Tgt

L'état d'oligomérisation de Tgt a été étudié par différentes techniques biophysiques aboutissant à des résultats contradictoires allant du monomère jusqu'à l'hexamère.²⁰⁻²⁴ Dans cette étude, les résultats de MS supramoléculaire ont ainsi pu lever l'ambiguïté concernant la structure quaternaire de la protéine en montrant la formation quantitative d'un **dimère de Tgt fixant un ion Zn²⁺ par sous-unité** ($M_{\text{mesurée}} = 85613 \pm 4 \text{ Da}$ et $M_{\text{théorique}} = 85604 \text{ Da}$), corroborant ainsi les résultats de cristallographie.²⁴

2.2.2) Stœchiométrie d'interaction de l'ARNt

Des expériences de titrage de Tgt par l'ARNt ont été menées par MS supramoléculaire et ont démontré la fixation d'**une unique molécule d'ARNt par dimère**, et cela même en présence d'un excès d'ARNt. De plus, les spectres de masses ont montré qu'une augmentation de la force ionique du tampon conduit à la dissociation progressive du complexe (Chapitre I, figure 7), confirmant ainsi que la détection du complexe en phase gazeuse résulte bien d'une **association spécifique en solution**. Ces résultats obtenus avec un ARNt entier viennent ainsi confirmer la structure cristallographique du dimère de Tgt en interaction avec une partie de l'ARNt, montrant la fixation d'un seul fragment d'ARN par dimère.²⁵

2.2.3) Etude d'inhibiteurs de Tgt

La structure quaternaire de la protéine jouant fort probablement un rôle dans son activité catalytique, une stratégie d'inhibition potentielle de Tgt consiste à **déstabiliser l'interface de dimérisation de la protéine, voire à inhiber totalement la formation du dimère**. Pour évaluer l'intérêt de cibler l'interface de dimérisation, des mutants de Tgt ont été produits en modifiant des acides aminés impliqués dans l'interaction protéine / protéine. Des tests d'activité ont alors révélé une baisse significative de l'activité catalytique de Tgt. De plus, les expériences de MS supramoléculaire ont mis en évidence une **dissociation partielle du dimère en monomère**, suggérant ainsi une déstabilisation de l'édifice protéique. Ces résultats ont ensuite été corroborés par la structure cristallographique de l'un des mutants révélant d'importantes modifications au niveau de l'interface du dimère.

Compte tenu de ces résultats, nous avons également souhaité étudier certains inhibiteurs ciblant l'interface du dimère de Tgt. Dans un premier temps, les expériences de MS supramoléculaire ont montré qu'ils sont tous capables de **se fixer à la protéine avec une stœchiométrie de un ligand par sous-unité protéique, et cela sans pour autant provoquer la dissociation du dimère en monomère**. Ensuite, une première série d'expériences de compétition a été réalisée en incubant la protéine avec les inhibiteurs avant de rajouter l'ARNt : les résultats ont ainsi montré que **les inhibiteurs sont capables d'empêcher la fixation de la l'ARNt à la protéine**. Puis, dans une seconde série d'expériences de compétition les inhibiteurs ont cette fois-ci été incubés avec le complexe Tgt / ARNt préalablement formé en solution : les spectres de masse ont ainsi révélé que **les inhibiteurs testés sont également capables de dissocier le complexe Tgt / ARNt préformé**.

2.3) Conclusion de l'étude

Les expériences de MS supramoléculaire menées au cours de ce projet ont permis de confirmer **l'état d'oligomérisation dimérique de Tgt ainsi que la formation d'un complexe protéine / ARNt de stœchiométrie 2:1**. D'autre part, en croisant les données de MS supramoléculaire avec celles de cristallographie et des tests d'activité, il a pu être montré que la **déstabilisation de l'interface de dimérisation de Tgt constitue une stratégie tout à fait prometteuse pour l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme**. Finalement, les développements méthodologiques réalisés autour du thème de l'automatisation des expériences sur puce microfluidique ont été mis en application dans ce projet pour étudier l'influence de différents inhibiteurs de Tgt. Les résultats ont ainsi révélé que ces **inhibiteurs se fixent au dimère de Tgt à raison d'une molécule de ligand par sous-unité**. De plus, les expériences de compétition ont démontré que ces inhibiteurs sont non seulement capables d'**empêcher la formation du complexe Tgt / ARNt**, mais sont **également capables de provoquer la dissociation de ce complexe préalablement formé en solution**. En conclusion, **la complémentarité de la MS supramoléculaire, de la cristallographie et des tests d'activité** a permis d'apporter des informations particulièrement importantes dans le contexte du développement de nouveaux inhibiteurs de Tgt.

La MS supramoléculaire offre par ailleurs des perspectives intéressantes pour **l'étude de la dynamique d'échange des sous-unités du dimère de Tgt**. En effet, dans une étude préalablement réalisée au laboratoire, la cinétique d'échange de la glucosamine-6-phosphate synthase a été suivie par MS supramoléculaire en utilisant pour cela un dimère « léger » contenant de l'azote 14 et un dimère « lourd » dopé à l'azote 15.²⁶ La différence de masse ainsi générée a permis de suivre l'échange des sous-unités dans le temps révélé par la formation d'un hétérodimère « lourd / léger ». De manière intéressante dans cette étude, il a été montré que l'introduction d'une mutation ponctuelle ou la fixation de ligands entraîne une modification de la cinétique d'échange des sous-unités, reflétant ainsi les modifications conformationnelles de l'interface de dimérisation préalablement mises en évidence sur la structure cristallographique de la protéine. En mettant à profit les possibilités d'automatisation des expériences désormais disponibles au laboratoire, une étude cinétique tout à fait similaire pourrait être envisagée dans le cas de Tgt afin de comprendre plus en détail encore l'influence des **inhibiteurs sur la dynamique du dimère de Tgt**.

3) VALORISATION

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'un article actuellement sous presse dans *Journal of Molecular Biology* :

- ▶ **Publication** : Ritschel T, Atmanene C, Reuter K, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S, Klebe G. An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction. *Journal of Molecular Biology*, **2009**, 393, 833-847.

PUBLICATION

« Crystal structure of *Thermus thermophilus* tRNA m1A58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA »

Pierre Barraud, Béatrice Golinelli-Pimpaneau, Cédric Atmanene, Sarah Sanglier, Alain Van Dorselaer, Louis Droogmans, Frédéric Dardel, Carine Tisé

Journal of Molecular Biology, **2008**, 377, 535-550.

JMBAvailable online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect


Crystal Structure of *Thermus thermophilus* tRNA m¹A₅₈ Methyltransferase and Biophysical Characterization of Its Interaction with tRNA

Pierre Barraud¹, Béatrice Golinelli-Pimpaneau², Cédric Atmanene³, Sarah Sanglier³, Alain Van Dorsselaer³, Louis Droogmans⁴, Frédéric Dardel¹ and Carine Tisné^{1*}

¹Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques, Université Paris-Descartes, CNRS UMR 8015, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

²Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS Bâtiment 34, 1 avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

³Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, IPHC-DSA, ULP, CNRS UMR 7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

⁴Laboratoire de Microbiologie, Institut de Recherches Microbiologiques Wiame, Université Libre de Bruxelles, avenue E. Gryson 1, B-1070 Bruxelles, Belgium

Received 26 November 2007; received in revised form 11 January 2008; accepted 16 January 2008
Available online
26 January 2008

Edited by J. Doudna

Methyltransferases from the m¹A₅₈ tRNA methyltransferase (TrmI) family catalyze the S-adenosyl-L-methionine-dependent N₁-methylation of tRNA adenosine 58. The crystal structure of *Thermus thermophilus* TrmI, in complex with S-adenosyl-L-homocysteine, was determined at 1.7 Å resolution. This structure is closely related to that of *Mycobacterium tuberculosis* TrmI, and their comparison enabled us to enlighten two grooves in the TrmI structure that are large enough and electrostatically compatible to accommodate one tRNA per face of TrmI tetramer. We have then conducted a biophysical study based on electrospray ionization mass spectrometry, site-directed mutagenesis, and molecular docking. First, we confirmed the tetrameric oligomerization state of TrmI, and we showed that this protein remains tetrameric upon tRNA binding, with formation of complexes involving one to two molecules of tRNA per TrmI tetramer. Second, three key residues for the methylation reaction were identified: the universally conserved D170 and two conserved aromatic residues Y78 and Y194. We then used molecular docking to position a N₉-methyladenine in the active site of TrmI. The N₉-methyladenine snugly fits into the catalytic cleft, where the side chain of D170 acts as a bidentate ligand binding the amino moiety of S-adenosyl-L-methionine and the exocyclic amino group of the adenosine. Y194 interacts with the N₉-methyladenine ring, whereas Y78 can stabilize the sugar ring. From our results, we propose that the conserved residues that form the catalytic cavity (D170, Y78, and Y194) are essential for fashioning an optimized shape of the catalytic pocket.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: TrmI; m¹A₅₈ methyltransferase; X-ray structure; noncovalent mass spectrometry; protein–RNA interactions

*Corresponding author. E-mail address:

carine.tisne@univ-paris5.fr.

Abbreviations used: TrmI, m¹A₅₈ tRNA methyltransferase; m¹A, N₁-methyladenosine; AdoMet, S-adenosyl-L-methionine; MTase, methyltransferase; mycoTrmI, *Mycobacterium tuberculosis* TrmI; thiTrmI, *Thermus thermophilus* TrmI; AdoHcy, S-adenosyl-L-homocysteine; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; PDB, Protein Data Bank; AIR, ambiguous interaction restraint.

Introduction

Functional tRNAs carry a number of chemically modified nucleosides that are formed enzymatically after transcription, during the tRNA maturation process. To date, >90 different modifications have been identified in tRNAs from various organisms.¹ Among these posttranscriptional nucleoside modifications, N₁-methyladenosine (m¹A) is found at a highly conserved A₅₈ position in the TΨC loop of

many tRNAs in the three domains of life (Bacteria, Archaea, and Eukarya). This modification occurs infrequently in bacteria and, for instance, is absent in *Escherichia coli* tRNAs. On the contrary, it is common in the tRNAs of most eukaryotes and archaea, and this modification seems to be essential for some organisms. Actually, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mutants that are defective in N₁-methylation of A₅₈ are nonviable.² Likewise, in *Thermus thermophilus*, gene disruption studies have shown that m¹A₅₈ modification is required for the growth of this bacterium at high temperatures.³

S-Adenosyl-L-methionine (AdoMet)-dependent methyltransferases (MTases) are involved in a wide variety of biological processes involving methylation of nucleic acids, proteins, phospholipids, and small molecules using the ubiquitous methyl donor AdoMet. Recently, two essential genes of *S. cerevisiae*, GCD10 and GCD14 (renamed TRM6 and TRM61), were identified to encode the two types of subunits of the yeast m¹A₅₈ MTase.⁴ The recombinant enzyme behaves as an $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer, with Trm61p being responsible for AdoMet binding and presumably for catalysis of the methyl transfer reaction,² whereas both types of subunits are essential for tRNA binding.⁵ Indeed, the purified recombinant Trm61p subunit, which binds AdoMet, cannot bind tRNA *in vitro* in the absence of Trm6p.² Interestingly, Trm61p was found to be closely related to a group of prokaryotic proteins that share not only the same AdoMet-binding site but also other highly conserved motifs. Therefore, the corresponding prokaryotic proteins were presumed to act as m¹A₅₈ MTases.⁶ This hypothesis was demonstrated experimentally for the bacterial orthologs in *T. thermophilus* and *Mycobacterium tuberculosis*, and for the archaeal ortholog in *Pyrococcus abyssi*.^{3,7-9} These proteins are α_4 homotetramers of Trm61p-like proteins, hereinafter called TrmI (m¹A₅₈ tRNA methyltransferase). Interestingly, orthologs of the Trm6p protein could only be found in eukaryotes. It was shown that Trm6p, despite the absence of the characteristic MTase motifs, is structurally and evolutionary related to Trm61p, suggesting that the eukaryotic m¹A₅₈ MTases evolved by gene duplication and speciation to form a heteromultimeric protein, whereas their prokaryotic orthologs remained homomultimers.⁶

Despite the low level of sequence similarity between the various families of AdoMet MTases, most of them contain a structurally highly conserved catalytic AdoMet-binding domain organized in a Rossman-like fold (for a review, see Schubert *et al.*¹⁰). Only one crystal structure of an TrmI has been reported to date—that of the *M. tuberculosis* Rv2118c protein (*mycoTrmI*), in complex with AdoMet.⁷ It shows that the catalytic C-terminal domain is very similar to that of other AdoMet-dependent MTases, whereas the N-terminal domain, which is mainly composed of β -sheets, is not found in other MTases of known structure.

In the present work, we have first solved the crystal structure of *T. thermophilus* TrmI (*thTrmI*) at 1.7 Å resolution, in complex with S-adenosyl-L-homocys-

teine (AdoHcy), the product of methyl transfer. We then focused our attention on the tRNA-binding properties of *thTrmI* using several biophysical techniques, including electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), site-directed mutagenesis, steady-state kinetic assays, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. ESI-MS has demonstrated its particular suitability for the investigation of non-covalent complexes.¹¹⁻¹³ More particularly, the so-called noncovalent ESI-MS has been extensively used to characterize supramolecular assemblies involving oligonucleotides in interaction with drugs and proteins (for reviews, see Veenstra,¹⁴ Beck *et al.*,¹⁵ Hofstadler and Griffey,¹⁶ and Rusconi *et al.*¹⁷). As protein-RNA systems are partly driven by electrostatics-based interactions that are strongly enhanced in the gas phase, ESI-MS is well suited for their characterization.^{18,19} Indeed, numerous studies of protein-RNA complexes have revealed a strong agreement between mass spectrometric gas-phase measurements and results obtained by solution-phase techniques.²⁰⁻²⁴ In our work, we used non-covalent ESI-MS: (i) to unambiguously assess the oligomerization state of *thTrmI*; (ii) to monitor the *thTrmI* oligomerization state upon tRNA binding; and (iii) to determine the stoichiometry of the *thTrmI*-tRNA complexes. In addition, a mutagenesis study was performed to identify residues that are potentially crucial for the methylation reaction. We thus showed that the universally conserved D170 residue, together with two conserved aromatic residues Y78 and Y194 that line the catalytic pocket, is a key residue for the enzymatic catalysis. Actually, D170A and Y78A variants are severely altered in their catalytic efficiency. Finally, we have used molecular docking to position a N₉-methyladenine in the active site of TrmI to further investigate the possible role of these residues.

Results and Discussion

Structure determination of *thTrmI*

Production and purification of *thTrmI* have been described by Droogmans *et al.*³ However, the recombinant His₆-tagged protein exhibited low solubility (<0.5 mg/mL), unless high salt concentrations were added (0.2 M imidazole-HCl and 0.5 M KCl). This was a serious issue for crystallization assays, in which precipitating solutions must be added to concentrated protein. In order to improve solubility, the N-terminal His₆-tag of *thTrmI* was cleaved with thrombin. Indeed, after His₆-tag removal, *thTrmI* became highly soluble (>10 mg/mL), even at moderate ionic strengths (150 mM). This type of behavior has already been reported for some His-tagged proteins.²⁵ We then carried out crystallization assays on the complex between *thTrmI*, AdoHcy, and *E. coli* tRNA^{Met}. The latter tRNA was selected because it is devoid of modification on A₅₈ and is a substrate of the *T. thermophilus*

enzyme (see Steady-State Kinetic Assay). Although the tRNA was present in all crystallization conditions, crystals only contained the free thTrmI protein in complex with AdoHcy. Table 1 summarizes the data collection and refinement statistics. The structure of the thTrmI protein was then solved by molecular replacement with the structure of TrmI from *M. tuberculosis* TrmI [Protein Data Bank (PDB) entry code 1I9G]⁷ using PHASER²⁶ (Z score = 23.7). Actually, thTrmI shares 39% identical and 13% similar residues with mycoTrmI. The model was then refined to 1.7 Å, to a final R_{free} factor of 20.9% (Table 1). The last four residues at the N-terminus were too poorly ordered to be included; therefore, the final model consisted of 251 residues per monomer. The asymmetric unit contained a dimer of thTrmI. However, the symmetry-related subunits interact extensively, leading to a tetrameric organization of thTrmI (Fig. 1b).

Overall structure of thTrmI

The thTrmI monomer is composed of two distinct domains connected by an extended linker containing a short α -helix (helix 2; Fig. 1a). The large C-terminal domain (residues 63–255) adopts a typical class I MTase fold, which consists of a central seven-stranded β -sheet (β_1 – β_6 and β_8 ; Fig. 1a) flanked by α -helices on both sides (α_A – α_E ; Fig. 1a).¹⁰ The first five strands of the β -sheet (β_1 – β_5 ; Fig. 1a) are parallel, whereas the last two (β_6 – β_8) are antiparallel. The C-terminal domain contains the AdoMet-binding site and the catalytic pocket. The smaller N-terminal domain (residues 5–62) is largely a β

structure composed of six β strands (β_A – β_F ; Fig. 1a) and one small α -helix (α_1).

The thTrmI tetramer is organized as a dimer of tight dimers. Two monomers interact via their extended β_6 strands, which form a cross-subunit antiparallel β -sheet (Fig. 1b, pale and dark blue). This dimer is further stabilized by ionic interactions between helices α_2 and α_3 from each subunit (Fig. 1b). A pair of β_6 strands from each dimer packs on the related β_6 strands of the other dimer to form a central antiparallel β -sheet structure. The tetramer interaction is limited to this β -sheet region and stabilized by both ionic and hydrophobic interactions, mainly a salt bridge between E220 and R224, and hydrophobic interactions between W226 and F245, and between H234 and F237 from one dimer to H242 from the other dimer. The salt bridge and the hydrophobic interactions between W226 and F245 have been also observed in the mycoTrmI structure⁷ and involve conserved residues.

In the tight dimer found in the asymmetric unit, the two cofactor-binding sites are occupied by AdoHcy molecules in identical conformations, similar to that of AdoMet in the *M. tuberculosis* TrmI structure. The binding cleft is formed by residues belonging to conserved motifs, named I, II, III, and IV (Figs. 1c and d, and 7a).²⁸ The adenine ring of the AdoHcy moiety is bound by motifs II, III, and IV via water-mediated hydrogen bonds between the exocyclic amino group and residues E155 and E173, and between the N₇ position of the adenine and the backbone amide of E173 (Fig. 1c). Adenine binding is also reinforced by hydrophobic contacts between its aromatic ring and residues L171, V177, K153, L154, Y124, A126, and A100. The ribose moiety of AdoHcy is bound by motif II, essentially by hydrogen bonds involving the 2' and 3' hydroxyl groups and residues E125 and H130. The amino acid part of the cofactor is mainly bound by motif I. Interestingly, an aspartate side chain that could be involved in the methylation reaction, the carboxylate chain of D170 from motif IV, participates in a direct polar interaction with the ammonium group of AdoHcy. The GXGXGG pattern of motif I binds to the amine and the carboxylate through a tight network of water-mediated hydrogen bonds involving the backbone (Fig. 1c).

Comparison with mycoTrmI structure and tRNA recognition

Globally, the overall structure of thTrmI closely resembles that of mycoTrmI. Superimposition of *T. thermophilus* and *M. tuberculosis* TrmI structures gives a root mean square deviation (RMSD) of 4.47 Å for C α , with the largest variation occurring in the β strands (β_6 , β_7 , and β_8) that protrude out of the structure. When comparing the active sites more accurately, that of mycoTrmI is narrower by about 1 Å than that of thTrmI. Moreover, the protruding R249 in mycoTrmI, which makes a supplementary step at the exit of the pocket that does not exist in thTrmI as R249, is replaced by a shorter side-chain

Table 1. Data collection and refinement statistics for the determination of TrmI structure

<i>Data collection statistics</i>	
Wavelength (Å)	0.9340
Space group	C222 ₁
Unit cell parameters (Å)	
<i>a</i>	90.4406
<i>b</i>	96.7946
<i>c</i>	140.5837
Number of measured reflections	499,190 (71,441)
Number of unique reflections	67,981 (9830)
Multiplicity	7.3 (7.3)
Resolution limits (Å)	48.39–1.70 (1.79–1.70)
Data completeness (%)	100.0 (100.0)
Mean $I/\sigma(I)$	13.6 (2.9)
R_{merge}	10.6 (67.6)
<i>Refinement statistics</i>	
Resolution limits (Å)	33.67–1.70 (1.74–1.70)
Number of reflections	64,480 (4709)
R -factor (%)	18.0 (24.7)
R_{free} (%)	20.9 (27.9)
Number of atoms	
Protein	4311
Ligands	67
Water molecules	421
Mean B -factors (Å ²)	15.92
RMSD (bounds) (Å)	0.009
RMSD (angles) (°)	1.265
Values in parenthesis are for the outer resolution shell.	

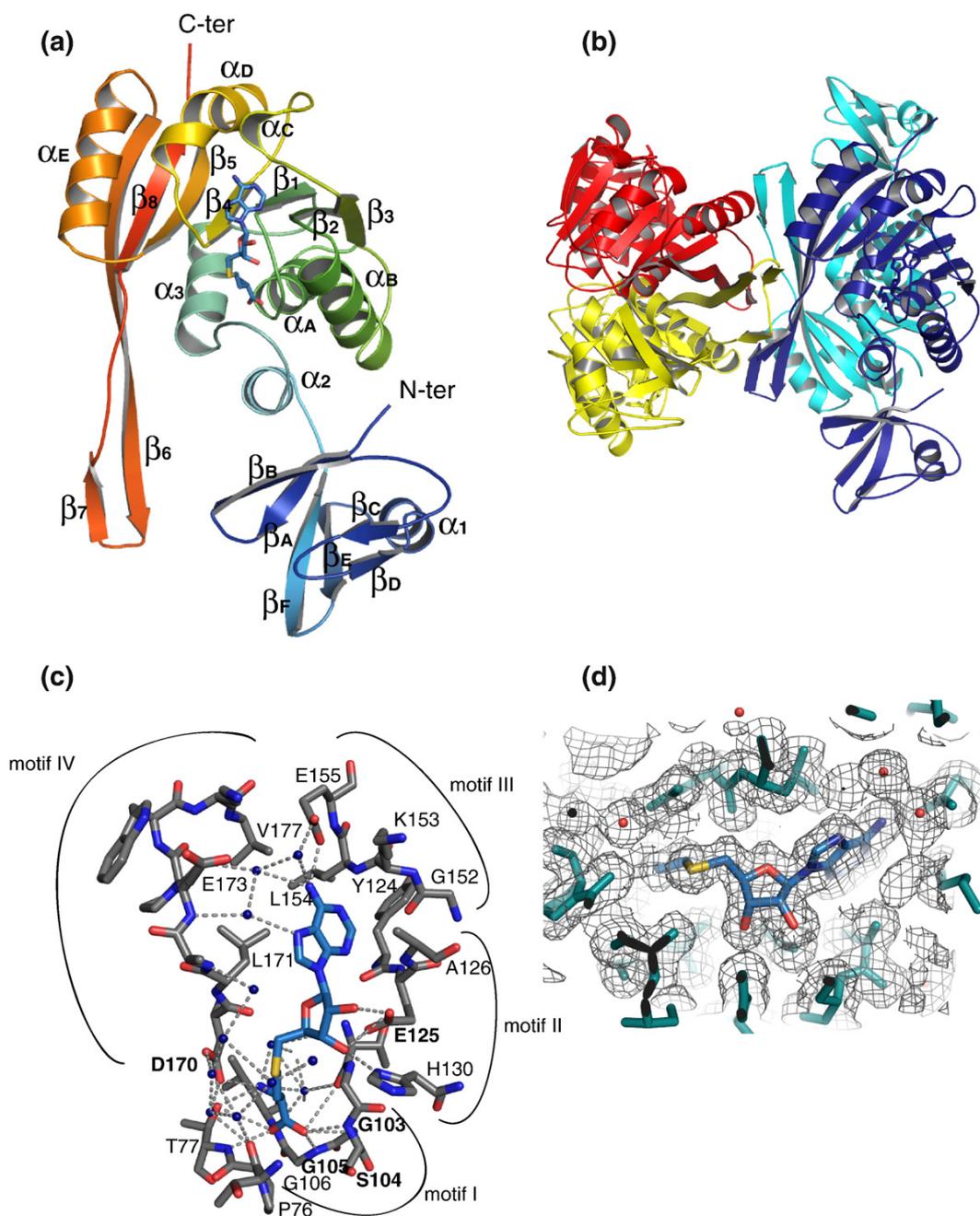


Fig. 1. Crystal structure of *th*TrmI. (a) Overall structure of *th*TrmI monomer. The secondary structure elements are labeled following the nomenclature defined in Schluckebier *et al.*²⁷ The cofactor AdoHcy is shown in blue sticks. (b) Organization of *th*TrmI as a tetramer. Each monomer is drawn with a different color. The two tight dimers are, respectively, in red and yellow, and in pale and dark blue. The tetramerization interface involved strands β_6 and β_7 . (c) The AdoHcy-binding site. The ligand (blue) and the enzyme residues (gray) are shown as sticks. Water molecules are drawn as blue spheres. Polar contacts are represented with dashed lines. Strictly conserved residues among TrmIs are labeled with bold letters. Characteristic motifs from MTases are highlighted. (d) Density map ($2F_o - F_c$ at 1σ) around the cofactor. The AdoHcy ligand (blue) and the enzyme residues (green) are shown as sticks. Water molecules are represented as red spheres.

residue (V240). As a consequence, the accessible surface of Y78 is twice larger in *th*TrmI than that of Y84 in *myco*TrmI. All these features seem to make

the methyl donor less easily accessible in *myco*TrmI. Overall, in both structures, the adenine should enter deeply in the binding cleft to have access to the

methyl donor, therefore implicating a major deformation of the phosphodiester backbone around A₅₈. It is also highly interesting to compare the electrostatic potentials of their molecular surfaces (Fig. 2). These calculations uncover that both proteins have two linked grooves of positive electrostatic potentials indicated by large blue surfaces in Fig. 2 that are large enough to accommodate double-helical RNA. The first groove that covers the β -sheet region forming the tetrameric architecture is less positively charged in *th*TrmI than in *myco*TrmI, whereas the second groove that encompasses the N-terminal domain of one TrmI subunit and that looks like an open hand is more positively charged in *th*TrmI than in *myco*TrmI. Several residues with basic side chains are conserved among the TrmI protein family, namely, K13 (R in some sequences), R15 (K), R72, R127, R217, and R229 (K), together with the his-

tidines involved in the formation of the tetramers H234 and H242. R15 and R217 are only conserved in bacterial TrmI proteins. These grooves have the dimensions to accommodate the acceptor arm (groove 1: 25 Å large and 45 Å long) and the anticodon arm (groove 2: 25 Å large and roughly 30 Å long) without steric clashes, enabling us to position the adenosine 58 near the catalytic pocket (manual docking; data not shown). The gray line in Fig. 2a indicates a possible position of the helix axis of tRNA. Numerous clashes occur within the T-arm, which undoubtedly undergoes huge conformational changes that probably involve the entire T-arm and not only a simple flip of the adenosine 58. These changes are difficult to predict and, for this reason, we could not pursue this docking. In conclusion, the conservation of two grooves of positively charged surfaces supports the idea that TrmI binds tRNA as a tetramer

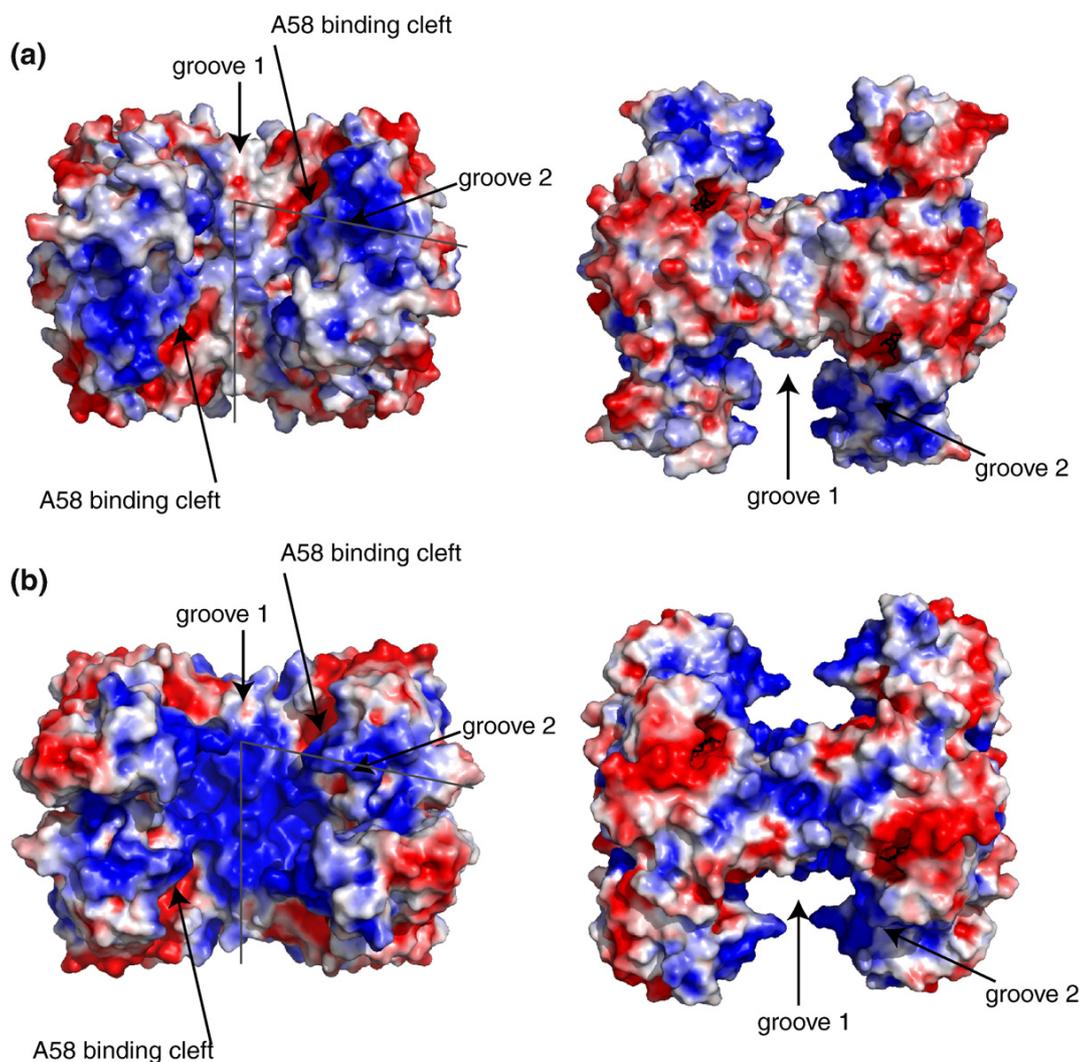
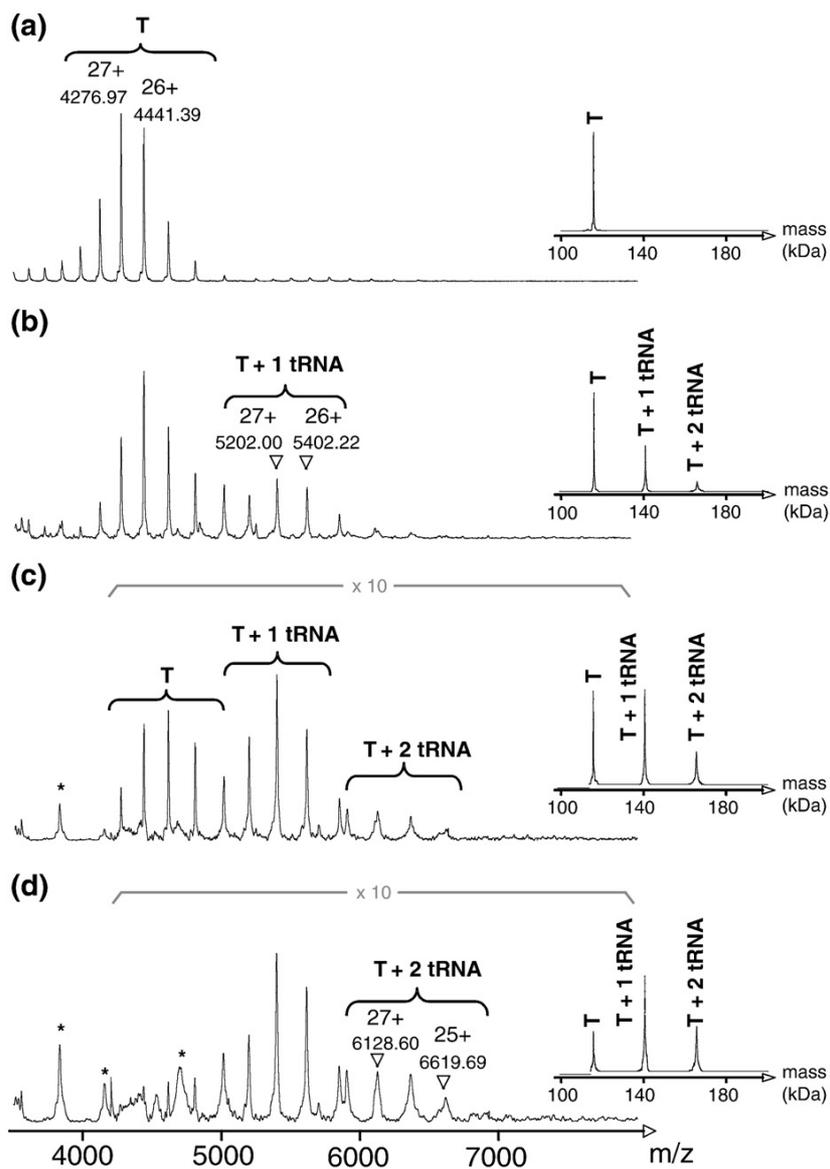


Fig. 2. Electrostatic surface potential of (a) *th*TrmI and (b) *M. tuberculosis* TrmI. Blue indicates positive charge, and red indicates negative charge, with the maximum color saturation corresponding to -3 kT (red) and $+3$ kT (blue). The figure was prepared using the APBS²⁹ PyMOL plug-in.

and that two molecules of tRNA can interact simultaneously with the TrmI tetramer. The fact that, in eukaryotes, the enzyme has evolved from an α_4 homotetramer to an $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer is compatible with a stoichiometry of two tRNAs per TrmI tetramer, with one tRNA being expected to interact with an $\alpha\beta$ subsystem.

*th*TrmI binds up to two tRNA molecules as a tetramer

Close inspection of the crystal structures of *th*TrmI and *myco*TrmI⁷ revealed that the tetramers are formed by two pairs of extensively interacting subunits stabilized by relatively small numbers of con-



T : 115450 ± 5 Da T + 1 tRNA : 140347 ± 6 Da T + 2 tRNA : 165455 ± 10 Da
* : tRNA

Fig. 3. Noncovalent ESI-MS analyses of *th*TrmI and *th*TrmI-tRNA assemblies. ESI mass spectra obtained under nondenaturing conditions (200 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0; $V_c=120$ V; $P_i=6.1$ mbar) for (a) *th*TrmI tetramer (20 μ M) alone and in the presence of (b) 30 μ M, (c) 100 μ M, and (d) 200 μ M *E. coli* tRNA_i^{Met}. Insets correspond to deconvoluted spectra showing molecular weights on the x-scale. T ($M_r=115,450\pm 5$) corresponds to (*th*TrmI)₄; T + 1tRNA ($M_r=140,347\pm 6$) corresponds to the (*th*TrmI)₄:(tRNA)₁ complex; and T + 2tRNA ($M_r=165,455\pm 10$) corresponds to the (*th*TrmI)₄:(tRNA)₂ complex. *tRNA signals.

tacts between the two dimers. Given the architecture of TrmI, it was of interest to investigate the oligomerization state of thTrmI alone and upon tRNA binding, and to determine the binding stoichiometry of the thTrmI-tRNA complexes. Previously reported gel filtration experiments have indicated that both mycoTrmI and thTrmI should form a tetramer in solution.^{3,9} However, in the case of thTrmI, due to an inherent limited precision of this technique, it is difficult to unambiguously state whether the protein is tetrameric or pentameric.³ In this study, we used ESI-MS, which has been proven to be a valuable technique for the determination of oligomerization states of noncovalent assemblies,^{30–33} to first confirm the oligomerization state of thTrmI. Figure 3a presents the ESI mass spectrum obtained for thTrmI under nondenaturing conditions and carefully controlled operating conditions (see Materials and Methods): a single ion distribution is observed in the m/z range of 4000–5000. With a measured molecular weight (M_r) of $115,450 \pm 5$, this distribution can be assigned to the +23 to +30 charge states of a thTrmI tetramer (theoretical $M_r = 115,453$). Thus, ESI-MS allowed us to unambiguously assess the tetrameric nature of the protein in agreement with our crystallographic results.

The tRNA binding stoichiometry was first investigated by gel retardation assay. As shown in Fig. 4, the free tRNA band progressively disappears upon addition of increasing amounts of thTrmI, thus evidencing the existence of thTrmI-tRNA interactions. Moreover, the free tRNA band completely disappears at 1:2 thTrmI:tRNA ratio, substantiating the formation of complexes involving two molar equivalents of thTrmI monomer per tRNA. To further confirm gel retardation experiments, we also used the potentialities of noncovalent ESI-MS to investigate the oligomerization state of thTrmI upon tRNA binding and to determine the tRNA binding stoichiometry. Titration experiments, monitored by noncovalent ESI-MS, involving a fixed concentration of thTrmI and increasing amounts of tRNA_i^{Met} revealed the presence

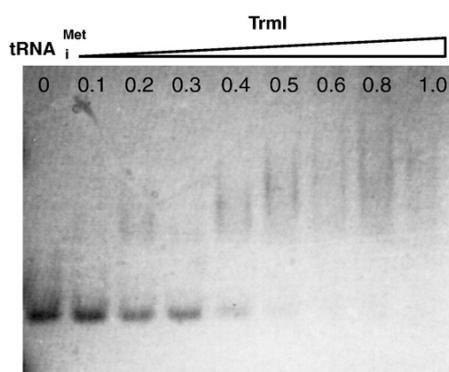


Fig. 4. Nondenaturing agarose gel electrophoresis. Constant amount of *E. coli* tRNA_i^{Met} (4 μ g) with increasing amounts of thTrmI protein (from 0 to 1 molar equivalent of thTrmI tetramer). Bands were visualized by UV shadowing.

of three ion distributions (Fig. 3b–d). The first one in the m/z region of 4000–5000, with a molecular mass of $115,450 \pm 5$ Da, is related to the thTrmI tetramer. For the second ion distribution in the m/z region of 5000–5900, the molecular mass of $140,347 \pm 6$ Da corresponds to the (thTrmI)₄:(tRNA)₁ complex. Finally, a third ion distribution within the m/z range of 5900–6800, with a molecular mass of $165,455 \pm 10$ Da, refers to the (thTrmI)₄:(tRNA)₂ complex. Even a 10-fold molar excess of tRNA per thTrmI tetramer does not lead to the detection of complexes with higher tRNA binding stoichiometries. Interestingly, upon an increase in the tRNA concentration from 1.5 to 10 molar equivalents per thTrmI tetramer, the relative abundances of (thTrmI)₄:(tRNA)₁ and (thTrmI)₄:(tRNA)₂ complexes statistically increase, favoring noncooperative tRNA-binding system and further suggesting the presence of two independent tRNA-binding sites.³⁴ The same experiments were also carried out in the presence of AdoHcy (data not shown), and no effect either on the binding stoichiometry of the complex or on the binding affinity of the tRNA for thTrmI was observed.

As ESI-MS detects species in the gas phase of the mass spectrometer, control experiments are always needed to ensure that mass spectra faithfully reflect the behavior in solution.³⁵ Thus, since electrostatic interactions are sensitive to the ionic strength of the medium,^{36,37} experiments were carried out at different ammonium bicarbonate concentrations (Fig. 5). Decreasing the ammonium bicarbonate concentration from 200 mM to 100 mM displaces the equilibrium towards the formation of (thTrmI)₄:(tRNA)₁ and (TrmI)₄:(tRNA)₂ complexes (Fig. 5a and b). However, the signal intensities were dramatically lower when 100 mM ammonium bicarbonate was used rather than 200 mM buffer, mainly because of protein precipitation. Therefore, no ESI-MS analysis could be performed at buffer concentrations lower than 100 mM. While both (thTrmI)₄:(tRNA)₁ and (thTrmI)₄:(tRNA)₂ complexes are favored at low ionic strengths, the use of higher salt concentrations destabilizes these assemblies (Fig. 5c and d), leading even to a complete dissociation of thTrmI:tRNA complexes into thTrmI tetramer at 1250 mM ammonium bicarbonate (Fig. 5d). The fact that mass spectra do reflect expected changes induced by modification of the solution conditions is further evidence that allows us to definitely rule out the possibility that the TrmI-tRNA complexes result from an artifact of the technique. Moreover, as described in other publications,^{22,38} an additional ESI-MS control experiment was performed in strictly identical experimental and operating conditions, with a nonsubstrate RNA as negative control. The absence of any thTrmI-control RNA complex in ESI mass spectra even in the presence of a 5-fold molar excess of control RNA (Fig. 6) indicates that the gas-phase detection of the TrmI-tRNA complexes arises from a specific recognition in solution and not from any gas-phase artifact.

In conclusion, noncovalent ESI-MS results clearly support that thTrmI remains tetrameric upon tRNA

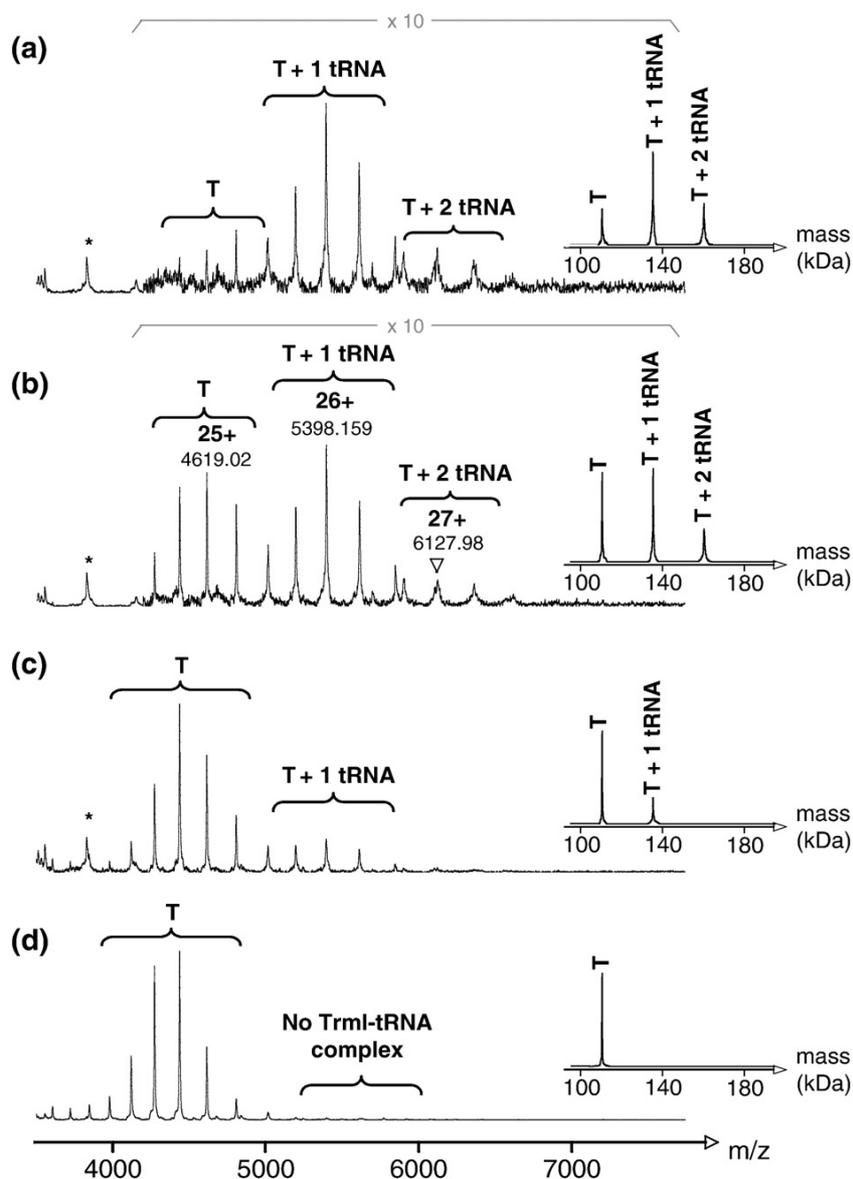


Fig. 5. Influence of the buffer ionic strength on *th*TrmI-tRNA complex stabilities. ESI mass spectra obtained under nondenaturing conditions (ammonium bicarbonate, pH 8.0; $V_c=120$ V; $P_i=6.1$ mbar) for *th*TrmI tetramer (20 μ M) in the presence of 100 μ M *E. coli* tRNA_i^{Met}. Ammonium bicarbonate concentration was set to (a) 100 mM, (b) 200 mM, (c) 400 mM, and (d) 1250 mM. Insets correspond to deconvoluted spectra showing molecular weights on the x-scale. T corresponds to (*th*TrmI)₄; T+1tRNA corresponds to the (*th*TrmI)₄:(tRNA)₁ complex; and T+2tRNA corresponds to the (*th*TrmI)₄:(tRNA)₂ complex. *tRNA signals.

binding and that *th*TrmI binds up to two molecules of tRNA.

The D170A and Y78A variants of *th*TrmI are severely altered in their catalytic efficiency

Based on multiple sequence alignments of the TrmI family members (Fig. 7a) and on the comparison of the crystallographic structures of TrmI from *M. tuberculosis*⁷ and *T. thermophilus*, we chose to mutate three conserved residues, D170, Y194, and

Y78, in order to study their involvement in adenosine binding and/or in catalysis. Figure 7b presents the *th*TrmI residues that are conserved or semiconserved in the catalytic pocket, except the conserved residues that bind to AdoMet, since their role in the catalysis mechanism is known. Yet, the universally conserved AdoMet-binding D170 was selected as it forms the back of the catalytic pocket and may also bind the adenine 58 ring of the tRNA substrate (Fig. 7b). Y194 and Y78 were mutated because they respectively form the left side and the floor of the adenosine-

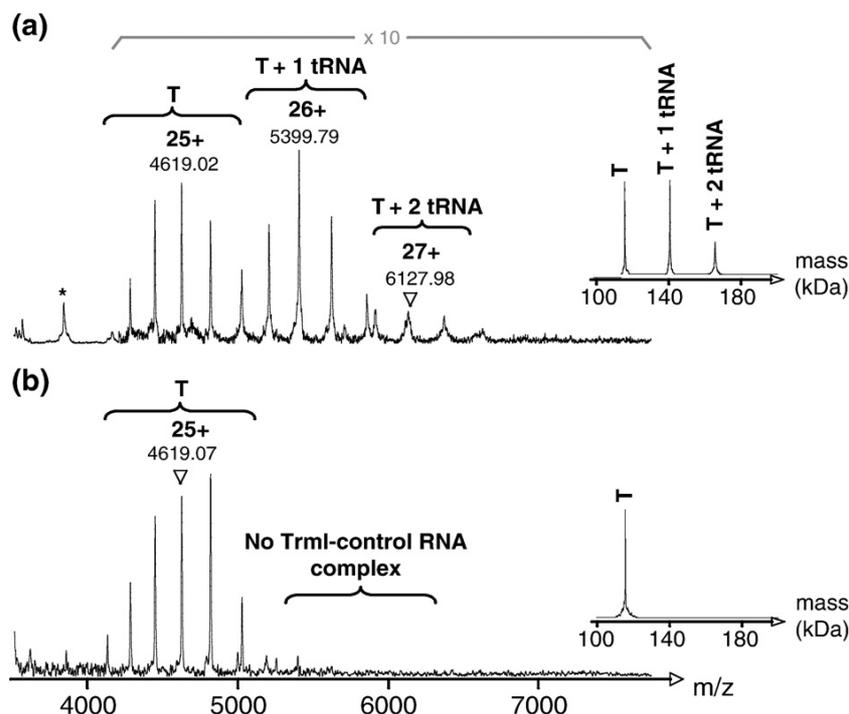


Fig. 6. Specificity of *thTrmI*-tRNA complexes formation. ESI mass spectra obtained under nondenaturing conditions (200 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0; $V_c = 120$ V; $P_i = 6.1$ mbar) for *thTrmI* tetramer (20 μ M) in the presence of (a) 100 μ M *E. coli* tRNA_i^{Met} and (b) 100 μ M nonsubstrate control RNA. Insets correspond to deconvoluted spectra showing molecular weights on the x -scale. T corresponds to (*thTrmI*)₄; T+1tRNA corresponds to the (*thTrmI*)₄:(tRNA)₁ complex; and T+2tRNA corresponds to the (*thTrmI*)₄:(tRNA)₂ complex. *RNA signal.

binding pocket in the 3D structure (Fig. 7b) and are conserved as aromatic residues among TrmIs, belonging, respectively, to motifs V and X (Fig. 7a). Therefore, these aromatic residues could be involved in the stabilization of the target adenine that needs to be flipped out of the tRNA structure to be methylated. P196, which is involved in making the shape of the catalytic cavity, was not selected for mutation because, in *M. tuberculosis*, it is naturally replaced by an alanine. Therefore, we individually mutated Y78, D170, and Y194 to alanines. We expressed and purified the variant proteins as described in Materials and Methods. We then determined the kinetic and RNA-binding parameters for wild-type and variant proteins (Table 2).

First, we investigated whether the mutations altered tRNA binding by the enzyme. Interaction with tRNA induces a quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein by about 40%. We therefore used fluorimetric titrations to determine the apparent dissociation constant between *thTrmI* variants and tRNA_i^{Met} (Table 2). All mutants showed quite unchanged dissociation constants (K_d of about 15 ± 3 nM), thereby indicating that they retained a native folding and similar RNA-binding abilities compared to the wild-type enzyme. We then analyzed their catalytic properties by determining their kinetic parameters k_{cat} and K_M for both AdoMet and tRNA substrates. The overall results are summarized in Table 2. Interestingly, all mutants retain

some catalytic activity, but are altered to various extents, essentially in their catalytic turnover k_{cat} . The D170A mutant retains some activity, but its k_{cat} value is severely reduced by a factor of about 300. D170A also shows an increased K_M for AdoMet substrate, in agreement with the crystal structure. It seems, therefore, to be the most important residue for the catalysis of the reaction. The Y78A mutant leads to a roughly 20-fold decrease in the catalytic turnover constant. Its binding constant for the methyl donor is unchanged compared to the wild-type protein. The Y194A mutant shows a smaller decrease in k_{cat} by a factor of 3 (Table 2). The K_M value for AdoMet is increased, suggesting that this residue is involved in cofactor binding. Yet, in the crystal structure, it is not involved in a direct interaction with AdoHcy, in contrast to D170. The mutation of Y194 to an alanine probably slightly destabilizes the catalytic pocket or indirectly weakens AdoMet binding. In conclusion, D170A is the variant that is most largely altered in its catalytic efficiency, followed by Y78A and then Y194A. Therefore, D170, Y78, and Y194 are key residues in the catalytic mechanism.

The substrate adenine snugly fits into the active site pocket of *thTrmI*

To investigate the positioning of the target A58 into the catalytic pocket of *T. thermophilus* and *M. tuberculosis* TrmI, we decided to locate a N₉-

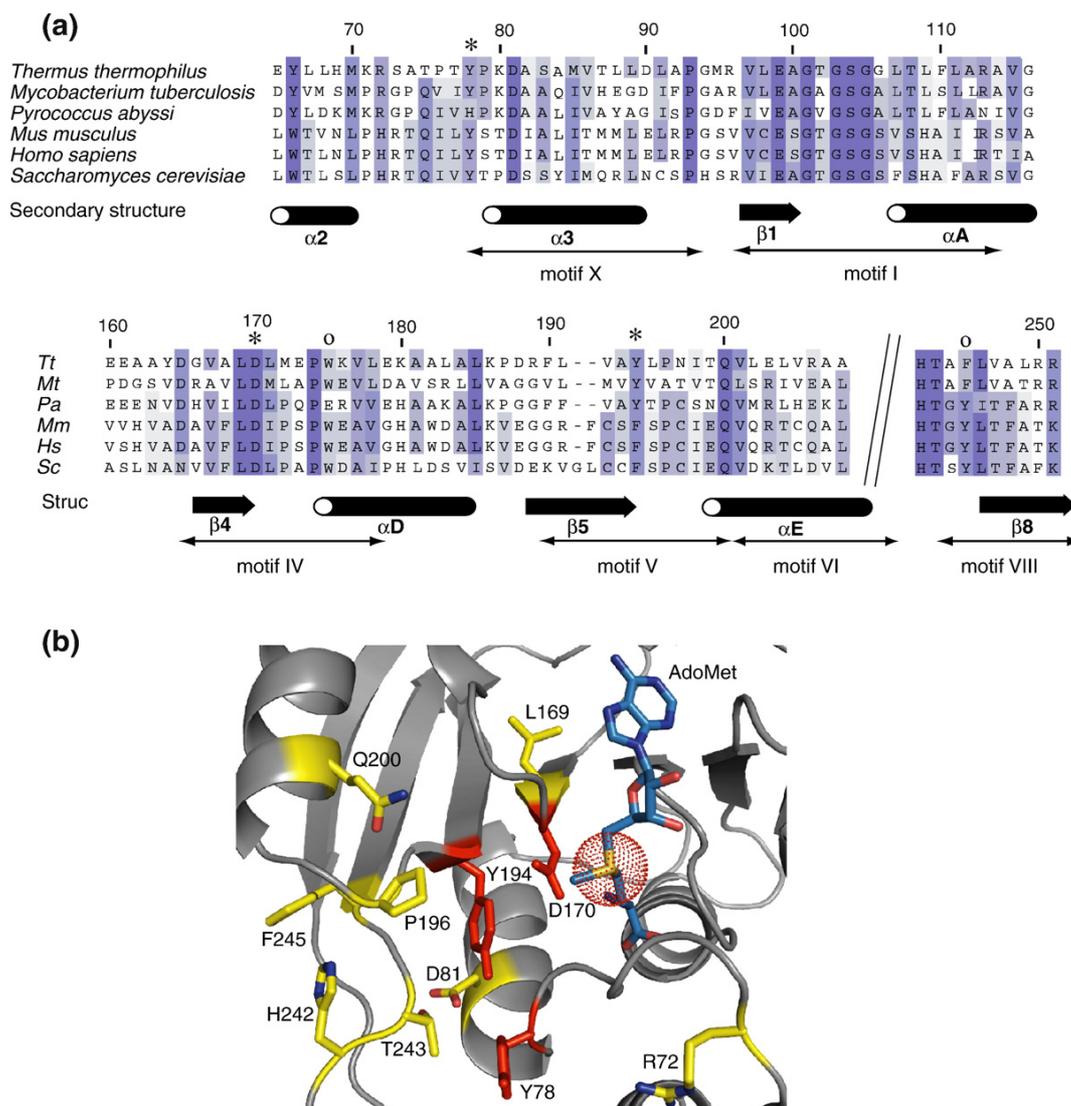


Fig. 7. Sequence alignments of TrmI proteins and conserved residues in *th*TrmI catalytic pocket. (a) Part of the sequence alignment of *T. thermophilus*, *M. tuberculosis*, *P. abyssi*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, and *S. cerevisiae* TrmIs. Residue numbers are those of the *T. thermophilus* sequence. Highly conserved residues are shown against a dark blue background, and residues with a similar physicochemical character are shown against a pale blue background. The secondary structure of the *th*TrmI is shown below the sequences as arrows for β strands and as cylinder for α -helices. The names of the secondary structure elements refer to Fig. 1a. The sequence motifs typical of the AdoMet-dependent MTase family are also indicated. Residues marked with a star (\star) (i.e., Y78, D170, and Y194) are involved in the catalytic pocket formation and are studied by mutagenesis in the present work. Residues marked with a circle (O) (i.e., W175 and F245) are conserved aromatic residues in motifs IV and VIII, belonging to the catalytic pocket in m^6A DNA MTases. (b) Conserved and semiconserved residues around the catalytic pocket of *th*TrmI. The strictly conserved residues among the TrmI family are shown as sticks on the *T. thermophilus* structure, except the conserved residues that bind AdoMet. AdoMet was modeled from AdoHcy by adding a methyl group on the sulfur atom; the methyl is positioned by sulfonium chirality. Y78, Y194, and D170 are indicated as red sticks.

methyladenine in the catalytic pocket of these proteins by molecular docking. We docked a N_9 -methyladenine and not an adenosine or an AMP molecule, since it is impossible to predict the conformation of the sugar of this flipped-out nucleotide. Moreover, Y78, which makes the exit of the catalytic pocket and which may interact with the ribose of the

adenosine 58, can also flip to prevent steric clashes with the A58 ribose. As the molecules of AdoHcy present in the active sites of *th*TrmI have identical conformations to the AdoMet cofactor present in *myco*TrmI, we modeled an AdoMet molecule in the catalytic pocket of *th*TrmI by superimposing the AdoMet from *myco*TrmI with the AdoHcy in *th*TrmI.

Table 2. Kinetic and thermodynamic parameters of wild-type and mutant TrmI enzymes

Mutants	AdoMet		tRNA _i ^{Met}			Relative k_{cat}
	k_{cat} ($s^{-1} \times 10^{-3}$)	K_M (μM)	k_{cat} ($s^{-1} \times 10^{-3}$)	K_M (μM)	K_d (nM)	
Wild type	37 (30–44)	2.1 (1.4–3.0)	36 (28–45)	2.7 (1.7–4.8)	13 (5–24)	100.0
Y194A	6 (5–11)	5.7 (3.9–8.7)	10 (9–13)	2.2 (1.9–3.3)	18 (10–37)	27.4
Y78A	1.4 (1.1–1.7)	1.9 (1.2–2.7)	1.6 (1.5–1.8)	0.16 (0.11–0.23)	16 (7–33)	4.1
D170A	0.13 (0.11–0.14)	5.4 (3.7–8.0)	0.11 (0.10–0.12)	0.17 (0.07–0.39)	14 (6–25)	0.3

The parameters are indicated with a confidence interval of 90%.

We used the program HADDOCK,³⁹ which can take into account mutagenesis results by introducing data as ambiguous interaction restraints (AIRs) to drive the docking process. An AIR is defined as an ambiguous distance between all residues shown to be involved in the interaction. Ambiguous intermolecular distance restraints were applied between D170, Y194, Y78, and the AdoMet cofactor, on one hand, and the N₉-methyladenine, on the other hand. A distance restraint between the N₁ atom of N₉-methyladenine and the methyl of AdoMet was also added. The model resulting from the docking with *th*TrmI is presented in Fig. 8a and shows that the N₉-methyladenine fits snugly into the cavity where methylation takes place. The same result was obtained for *myco*TrmI (data not shown). Moreover, the methyl group introduced to substitute the ribose points above Y78 (Fig. 8b), enabling us to add a

ribose without steric hindrance. Therefore, Y78 is likely to strongly interact with the ribose of the adenosine 58, probably participating in the stabilization of the flipped-out conformation. The distance between the N₉-methyladenine N₁ and the AdoMet methyl group is 2.3 Å. This corresponds to a 4.1-Å distance between the N₉-methyladenine N₁ and the AdoMet sulfur atom. This is in keeping with distances observed in cocrystal structures of other endocyclic purine N-MTases (distances between 3.6 Å and 4.5 Å).⁴⁰ The docked model of the N₉-methyladenine ring suggests a binding mode involving essentially van der Waals interactions with Y194, and a polar contact between the exocyclic amino group of the purine and the carboxylate of D170 (Fig. 8b). Therefore, the side chain of D170 could act as a bidentate ligand binding the amino terminal moiety of AdoMet and the N₆ exocyclic

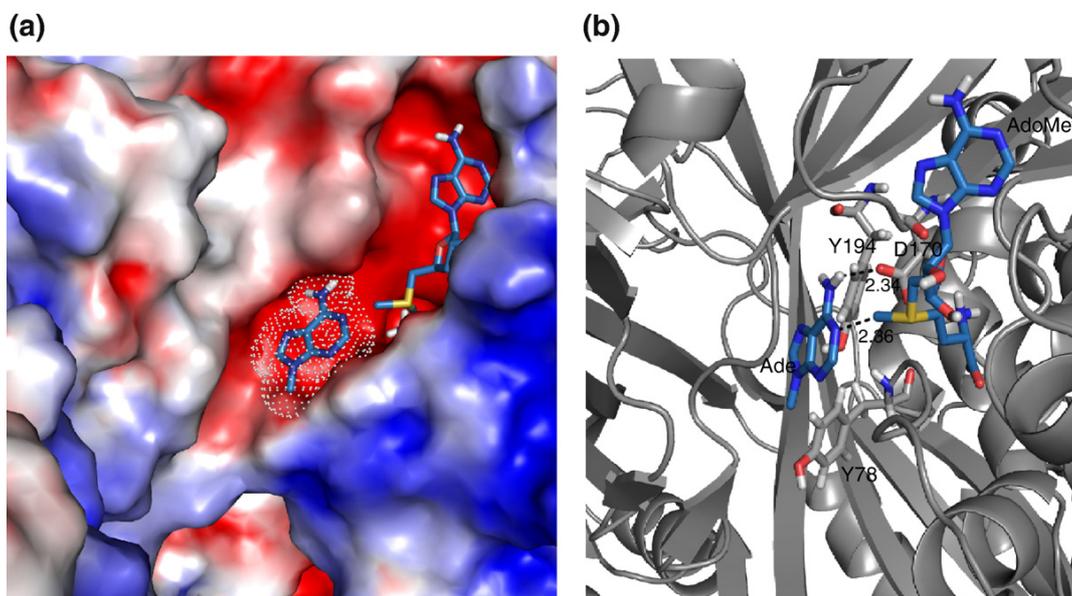


Fig. 8. Modeling a N₉-methyladenine in the catalytic pocket of *th*TrmI. (a) Average docked structure of the N₉-methyladenine ring inside the catalytic pocket of *th*TrmI. The enzyme surface is colored according to the electrostatic surface potential. Positive potential is shown in blue, and negative potential is shown in red. The AdoMet ligand and the docked N₉-methyladenine ring are shown as sticks (carbon atoms in light blue, nitrogen atoms in dark blue, oxygen atoms in red, sulfur atoms in yellow, and hydrogen atoms in white). The van der Waals surface of the N₉-methyladenine ring is shown as white dots. (b) Distances between the average structure of the docked N₉-methyladenine ring and the key moiety of the enzyme. The enzyme is shown in gray with the cartoon representation. The AdoMet ligand, the docked N₉-methyladenine ring, and residues D170, Y78, and Y194 are shown as sticks. Distances are indicated with dashed lines (in Å).

amino group of the adenine ring substrate. Thus, the sulfur–methyl bond of AdoMet is almost coplanar with the N₉-methyladenine ring and points to the same direction as the N₁ lone-pair orbital, which can be of significant importance for the chemical mechanism. We thus propose that D170 could minimize the transition state energy by positioning both the AdoMet and the target base in an optimal orientation for the methylation reaction. D170 could also deprotonate the N₆ group to activate the N₁ lone-pair orbital in order to attack the methyl group of AdoMet and to generate the exocyclic imino tautomer of m¹A as the initial product. The nucleophilic attack leads to the m¹A basic form, which has to be subsequently protonated to give the m¹A cationic form that is stable at physiological pH (pK_a=9.3).⁴¹ As the deprotonation of N₆ of m¹A is easier than the deprotonation of N₆ of the nonmethylated adenine ring (pK_a=16.7),⁴² it seems more reasonable that the deprotonation and the nucleophilic attack occur in the same elementary step. The model perfectly situates D170 to serve that role, which is most definitely consistent with the kinetic results.

The chemical mechanism of the adenine N₁-methylation of RNA has not yet been investigated, in contrast to the N₁-methylation of guanine.⁴³ In the case of m¹G RNA MTase (TrmD),⁴³ an aspartate residue was shown to be involved in the deprotonation step of N₁ of guanine. The two processes are likely to be different, as, under physiological conditions, the N₁ of guanine is protonated but that of adenine is not. DNA MTases have been extensively studied, but the m¹A modification is not encountered in DNA. The methylation of the N₆ position of adenine has been investigated in DNA (for structural studies, see Labahn *et al.*,⁴⁴ Tran *et al.*,⁴⁵ and Goeckel *et al.*⁴⁶) and, more recently, in rRNA.^{47,48} Interestingly, the main catalytic residue in m⁶A RNA or DNA MTases has been clearly identified by mutagenesis studies to be the D/N/S residue of the conserved pattern (D/N/S)PP(Y/F/W), which belongs to MTase motif IV (for reviews on DNA MTases, see Bheemanaik *et al.*⁴⁹ and Jeltsch⁵⁰). In known structures of m⁶A DNA MTases (e.g., M•TaqI; PDB code 2ADM) or m⁶A RNA MTases (ErmC'; PDB code 1QAN) in complex with cofactor (AdoMet or AdoHcy), the position of the D/N/S residue of motif IV relative to the cofactor is closely similar to that of D170 residue in the *thTrmI* crystal structure. Additionally, two other residues have been identified to be important in the catalysis in m⁶A DNA MTases. These residues are aromatic and stabilize the flipped-out target base and/or act as cation- π catalysts. The first one is the aromatic Y/F/W residue of motif IV, which is proposed to stabilize the cationic transition state by cation- π interaction.^{51,52} The second one is the aromatic residue Y/F/W of motif VIII, which stabilizes the flipped base outside the DNA helix.^{51,52} These aromatic residues are conserved in motifs IV and VIII in m¹A tRNA MTases (Fig. 7a, symbol O), but they are not part of the catalytic pocket in the TrmI structure. Strikingly, two other aromatic residues (i.e., Y78 and Y194) are

located in the active site cavity of *thTrmI* (Fig. 7b) at relative positions with respect to the AdoMet cofactor, similar to those of the aromatic residues listed above for DNA MTases. These residues are also conserved as aromatic residues among TrmIs and belong, respectively, to motifs X and V (Fig. 7a). The noticeable structural similarity between the catalytic pocket of m¹A tRNA MTases and the catalytic pocket of m⁶A DNA MTases suggests a similar role in catalysis for these residues. Y78 is thus the most probable candidate for the stabilization of the flipped-out adenosine given its position in the catalytic pocket and the dramatic decrease in k_{cat} of the Y78A mutant. Then, Y194 could act as a cation- π catalyst to stabilize a cationic transition state. These roles are also in agreement with our docking results.

Materials and Methods

Expression and purification of *thTrmI* for structural studies

Recombinant *thTrmI* protein (255 residues) was overexpressed and purified as previously described.³ The N-terminal His₆-tag was removed by thrombin cleavage (25 U thrombin/mg protein) performed overnight at ambient temperature. The *thTrmI* protein was then further purified by gel filtration on a HiLoad 26/60 Superdex 200 prepgrade chromatography column (Amersham Biosciences) equilibrated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 100 mM KCl. Fractions containing pure recombinant protein were pooled, concentrated to 8–10 mg/mL using Amicon® Ultra (Millipore), and stored at 4 °C.

Crystallization and crystal structure determination

Crystallization was performed at 19 °C using the sitting-drop vapor-diffusion method. Protein samples were prepared at 3 mg/mL in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 100 mM KCl, 2 mM AdoHcy, and 1 Eq of tRNA^{iMet}. Drops of 1 μ L were prepared by using a Cybi-Disk robot system that mixes equal volumes of protein and reservoir solutions. Reservoir volumes of 100 μ L were used. Crystals of *thTrmI* were obtained in 2 M ammonium sulfate and 5% isopropanol (vol/vol) (condition no. 5 of the Hampton Research Crystal Screen II kit). The crystals were harvested, soaked in a cryoprotectant solution [2.2 M ammonium sulfate, isopropanol 5% (vol/vol), and glycerol 20% (vol/vol)], and flash-frozen in liquid nitrogen before data collection. Diffraction data were collected at beamline ID14-1 of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France).

All crystallographic calculations were performed using the CCP4 suite version 6⁵³ as implemented in the graphical user interface.⁵⁴ X-ray diffraction data were processed using MOSFLM⁵⁵ and scaled with SCALA.⁵⁶ The structure of *thTrmI* was solved by molecular replacement using the program PHASER²⁶ and the structure of TrmI from *M. tuberculosis* (PDB entry code 1I9G) as a model. In the model, nonconserved residues were truncated to alanine. Model building of *thTrmI* was first performed with ARP/wARP⁵⁷ using the warpNtrace automated procedure. Restrained refinements of the structure were performed with the program REFMAC5.⁵⁸ Model and map visualizations for manual reconstruction

were performed with the program Coot.⁵⁹ Solvent molecules were automatically added using the ARP waters module implemented in REFMAC5. In the last stages of refinement, TLS parameters were refined⁶⁰ using one group for each domain of the protein (i.e., the large C-terminal domain and the small N-terminal domain).

We computed the electrostatic surface potential using APBS Tools—an interface for performing APBS electrostatics calculation²⁹ from within PyMOL†.

Expression and purification of tRNA^{Met}

The *E. coli* tRNA^{Met} was overexpressed from plasmid pBSTtRNA^{Met} in *E. coli* JM101TR using a protocol derived from that of Meinnel and Blanquet.⁶¹ Briefly, after phenol extraction of RNAs from bacteria, total tRNA was separated by gel filtration on a HiLoad 26/60 Superdex 75 prepgrade chromatography column (Amersham Biosciences) equilibrated in 25 mM Tris-HCl (pH 7.0). The overexpressed tRNA^{Met} was then separated from other tRNAs by an anion exchange step (Resource Q column) equilibrated in 25 mM Tris-HCl (pH 7.0). tRNAs were eluted using a 350-mM to 550-mM NaCl gradient in the same buffer. The fractions containing the purified tRNA^{Met} were pooled together, dialyzed against 50 mM Tris-HCl and 100 mM KCl (pH 8.0), concentrated using Amicon® Ultra (Millipore), and stored at -20 °C.

ESI-MS

Noncovalent mass spectrometry experiments were performed on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT; Waters). Samples were continuously infused into the mass spectrometer with a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of 6 µl/min. Mass spectra were acquired in the positive ion mode in the *m/z* mass range of 2000–8000 after calibration with the multiply charged ions produced by horse heart myoglobin diluted to 2 µM in a 1:1 water/acetonitrile mixture (vol/vol) acidified with 1% (vol/vol) formic acid. Deconvoluted mass spectra were obtained using the Transform algorithm of MassLynx 4.0 software. Instrumental parameters were optimized to get the best compromise between ion desolvation, ion transmission, and preservation of noncovalent complexes during the ionization and desorption processes. This optimization concerned especially the pressure in the interface (*P*_i) and the accelerating voltage (*V*_a), which were set to 6.1 mbar and 120 V, respectively.

The purity and homogeneity of thTrmI were checked in denaturing conditions by diluting the protein to 5 µM in a 1:1 water/acetonitrile mixture acidified with 1% (vol/vol) formic acid. A good agreement was found between the measured molecular mass (28,863.0 ± 0.3 Da) and the mass calculated from the amino acid sequence (28,863.3 Da). For experiments performed in nondenaturing conditions, different ammonium bicarbonate concentrations ranging from 100 mM to 1250 mM were tested. A concentration of 200 mM ammonium bicarbonate was chosen as the best compromise to provide good-quality ESI mass spectra without extensive dissociation of thTrmI:tRNA complexes (which takes place at high ionic strengths) or protein aggregation (occurring at low ionic strengths). Thus, this buffer concentration was used to study both thTrmI oligomerization state and its tRNA-binding properties. All experiments were carried out at 20 µM thTrmI (tetramer

concentration), whereas *E. coli* tRNA^{Met} concentration (molecular weight *M*_r = 24,888) was increased up to 200 µM for titration experiments. To study the influence of AdoHcy on the thTrmI-tRNA complexation equilibrium, thTrmI and AdoHcy, both at 20 µM (tetramer concentration), were incubated in the ammonium bicarbonate buffer in the presence or in the absence of tRNA (30 µM). Finally, a nonsubstrate control RNA of 59 nucleotides (*M*_r = 19,255) was also used in a 5-fold molar excess relative to the thTrmI tetramer concentration in order to investigate the specificity of the thTrmI-tRNA interactions. All solutions were incubated for 15 min at room temperature before analysis under nondenaturing conditions.

Nondenaturing agarose gel electrophoresis

Samples were prepared by mixing a constant amount of *E. coli* tRNA^{Met} (4 µg) with increasing amounts of thTrmI protein (from 0 to 1 molar equivalent of thTrmI tetramer) in loading buffer [Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM, KCl 100 mM, and glycerol 18% (vol/vol)]. Samples were kept at 4 °C for 12 h and loaded on a 2% (wt/vol) agarose gel. Migration was performed for 1 h in Tris-acetate buffer (pH 8.0) at 4 °C under an electric field of 100 V. Bands were visualized by UV shadowing.

Site-directed mutagenesis

Alanine site-directed mutagenesis was carried out using the Quickchange® kit and protocol (Stratagene). All oligonucleotides for mutagenesis were designed to have appropriate pairing stability (fusion temperature near 80 °C) and were between 27 nt and 32 nt long. All mutant genes were fully sequenced and contained only the desired substitutions.

Expression and purification of wild-type and mutant thTrmI proteins for kinetic studies

The wild-type and mutant proteins were overexpressed and purified as for structural studies, except that the thrombin cleavage was omitted. Protein concentrations were evaluated with the Bradford method. The proteins were then diluted in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) to a final concentration of 0.25 mg/mL and stored at 4 °C.

Fluorescence titrations of thTrmI by tRNA^{Met}

Fluorescence measurements were performed at 20 °C with a JASCO spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were 280 nm and 343 nm, respectively. The excitation and emission bandwidths were 5 nm and 10 nm, respectively.

Fluorescence titration experiments were performed by adding increasing concentrations of nucleic acid to a fixed amount of thTrmI protein (15 nM) in 50 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, and 0.5% (wt/vol) polyethylene glycol 8000 (pH 8.0). Fluorescence intensities were corrected for dilution and were fitted using Eq. (1), assuming two equivalent tRNA-binding sites per thTrmI tetramer (see Fig. 3):

$$I = I_0 - \frac{I_\infty - I_0}{2nN_t} \left(K_d + L_t + nN_t - \sqrt{(K_d + L_t + nN_t)^2 - 4L_t nN_t} \right) \quad (1)$$

† <http://www.pymol.org>

where I_0 is the fluorescence intensity without tRNA; I is the fluorescence intensity at a given concentration of tRNA; I_8 is the fluorescence intensity at the plateau; n is the number of tRNA-binding sites on the protein; N_t is the total concentration of protein; and L_t is the total concentration of tRNA. Confidence limits on the parameters were estimated by Monte Carlo sampling.⁶²

Steady-state kinetic assay

[Methyl-³H]AdoMet (555 GBq/mmol, 20.5 MBq/mL; MP Biomedicals) was mixed with nonradioactive AdoMet (Sigma) to achieve a specific radioactivity of about 500 cpm/pmol (16.7 Bq/pmol). The methylation kinetic assays were performed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) at 60 °C. The tRNA and [methyl-³H]AdoMet were thermally equilibrated in 1.25× concentrated reaction buffer (96 μL) at 60 °C for 5 min, and the reaction was started by adding the enzyme (24 μL). Aliquots (25 μL) were removed after different incubation times and transferred into 800 μL of 5% (wt/vol) trichloroacetic acid at 0 °C for 30 min in order to quench the reaction and to precipitate the tRNA. The precipitates were collected by filtration through GF/C filters (Whatman). The filters were washed with cold 5% trichloroacetic acid and dried, and the radioactivity was measured by liquid scintillation counting for 2 min, resulting in a counting error below 4%. Data were corrected by subtracting the background radioactivity determined from a control without enzyme.

For the determination of AdoMet K_M and k_{cat} , the reaction mixtures contained MTase (wild type, 25 nM; Y194A, 50 nM; Y78A, 100 nM; D170A, 500 nM), tRNA_i^{Met} (20 μM), and [³H]AdoMet (wild type, 0.5–8 μM; Y194A, 0.5–8 μM; Y78A, 0.5–8 μM; D170A, 5–50 μM). For tRNA_i^{Met} K_M and k_{cat} , the reaction mixtures contained MTase (wild type, 25 nM; Y194A, 50 nM; Y78A, 100 nM; D170A, 500 nM), tRNA_i^{Met} (wild type, 0.5–8 μM; Y194A, 0.5–8 μM; Y78A, 0.25–4 μM; D170A, 0.5–8 μM), and [³H]AdoMet (wild type, 20 μM; Y194A, 50 μM; Y78A, 20 μM; D170A, 50 μM). Initial rates (v_i) for each substrate concentration (tRNA_i^{Met}) were determined from the slope of linear fits of time-course data points (wild type, 9 min; Y194A, 20 min; Y78A, 40 min; D170A, 40 min). Enzyme parameters were obtained by nonlinear least squares fitting using Eq. (2) of Michaelis-Menten kinetics (wild-type and mutant Y194A) or Eq. (3) in cases where enzyme concentration was not negligible compared to substrate concentration (mutants Y78A and D170A). k_{cat} values were calculated for two catalytic sites per TrmI tetramer. Confidence limits on the parameters were estimated by Monte Carlo sampling using the MC-Fit program.⁶²

$$v_i = \frac{V_{max}S_0}{K_M + S_0} \quad (2)$$

$$v_i = \frac{V_{max}}{2E_0} \left(K_M + S_0 + E_0 - \sqrt{(K_M + S_0 + E_0)^2 - 4S_0E_0} \right) \quad (3)$$

Molecular docking

Docking of the N₉-methyladenine ring into the active site of TrmI was performed using HADDOCK 1.3[‡],³⁹

which makes use of CNS⁶³ as structure calculation software. HADDOCK allows dealing with ambiguous constraints (i.e., restraints can be applied between residues and not only between atoms). The protein structure used for the docking was the tetrameric *th*TrmI crystal structure in which the AdoHcy ligand was replaced with the AdoMet methyl donor. A 2-Å distance was used to define AIRs that were applied between the adenine and a set of neighbors composed of AdoMet cofactor and *th*TrmI residues identified by mutagenesis (i.e., Y78, D170, and Y194). One unambiguous restraint set to 2 Å was applied between the atoms that react in the methyl transfer reaction (i.e., the N₁ position of the N₉-methyladenine ring and the C^ε atom of the AdoMet ligand). During the rigid-body energy minimization, 2000 structures were calculated, and the 1000 best solutions based on the intermolecular energy were used for the semiflexible refinement. The docking converged to a single solution. The same protocol was also applied to the *M. tuberculosis* TrmI.

Accession numbers

Coordinates and structure factors for *th*TrmI protein, in complex with AdoHcy, have been deposited at the PDB with accession code 2PWY.

Acknowledgements

The authors would like to thank Franck Brachet for his skills in the setup of the pipetting robot. We acknowledge Dr. Thibaut Crépin for his kind help with synchrotron data collection at beamline ID14-1 of the European Synchrotron Radiation Facility. We thank Nathalie Ulryck for help in site-directed mutagenesis. Pierre Barraud and Cédric Atmanene were supported by a studentship from the “Ministère de la recherche.” We thank the CNRS for financial support. Louis Droogmans was supported by grants from the Fonds pour la Recherche Fondamentale Collective and the Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmb.2008.01.041

References

1. Rozenski, J., Crain, P. F. & McCloskey, J. A. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res.* **27**, 196–197.
2. Anderson, J., Phan, L. & Hinnebusch, A. G. (2000). The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 5173–5178.
3. Droogmans, L., Roovers, M., Bujnicki, J. M., Tricot, C., Hartsch, T., Stalon, V. & Grosjean, H. (2003). Cloning

‡ <http://www.nmr.chem.uu.nl/haddock/>

- and characterization of tRNA (m1A58) methyltransferase (TrmI) from *Thermus thermophilus* HB27, a protein required for cell growth at extreme temperatures. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2148–2156.
4. Anderson, J., Phan, L., Cuesta, R., Carlson, B. A., Pak, M., Asano, K. *et al.* (1998). The essential Gcd10p–Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. *Genes Dev.* **12**, 3650–3662.
 5. Ozanick, S. G., Bujnicki, J. M., Sem, D. S. & Anderson, J. T. (2007). Conserved amino acids in each subunit of the heterologous tRNA m1A58 MTase from *Saccharomyces cerevisiae* contribute to tRNA binding. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6808–6819.
 6. Bujnicki, J. M. (2001). In silico analysis of the tRNA: m1A58 methyltransferase family: homology-based fold prediction and identification of new members from Eubacteria and Archaea. *FEBS Lett.* **507**, 123–127.
 7. Gupta, A., Kumar, P. H., Dineshkumar, T. K., Varshney, U. & Subramanya, H. S. (2001). Crystal structure of Rv2118c: an AdoMet-dependent methyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Mol. Biol.* **312**, 381–391.
 8. Roovers, M., Wouters, J., Bujnicki, J. M., Tricot, C., Stalon, V., Grosjean, H. & Droogmans, L. (2004). A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m1A) methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **32**, 465–476.
 9. Varshney, U., Ramesh, V., Madabushi, A., Gaur, R., Subramanya, H. S. & RajBhandary, U. L. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* Rv2118c codes for a single-component homotetrameric m¹A₅₈ tRNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1018–1027.
 10. Schubert, H. L., Blumenthal, R. M. & Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329–335.
 11. Loo, J. A. (1997). Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **16**, 1–23.
 12. Loo, J. A. (2000). Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 175–186.
 13. Heck, A. J. & Van Den Heuvel, R. H. (2004). Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 368–389.
 14. Veenstra, T. D. (1999). Electrospray ionization mass spectrometry: a promising new technique in the study of protein/DNA noncovalent complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 1–5.
 15. Beck, J. L., Colgrave, M. L., Ralph, S. F. & Sheil, M. M. (2001). Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 61–87.
 16. Hofstadler, S. A. & Griffey, R. H. (2001). Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry. *Chem. Rev.* **101**, 377–390.
 17. Rusconi, F., Guillonau, F. & Praseuth, D. (2002). Contributions of mass spectrometry in the study of nucleic acid-binding proteins and of nucleic acid-protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **21**, 305–348.
 18. Robinson, C. V., Chung, E. W., Kragelund, B. B., Knudsen, J., Aplin, R. T., Poulsen, F. M. & Dobson, C. M. (1996). Probing the nature of noncovalent interactions by mass spectrometry. A study of protein–CoA ligand binding and assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8646–8653.
 19. Rogniaux, H., Van Dorsselaer, A., Barth, P., Biellmann, J. F., Barbanton, J., van Zandt, M. *et al.* (1999). Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 635–647.
 20. Mei, H. Y., Mack, D. P., Galan, A. A., Halim, N. S., Heldsinger, A., Loo, J. A. *et al.* (1997). Discovery of selective, small-molecule inhibitors of RNA complexes: I. The Tat protein/TAR RNA complexes required for HIV-1 transcription. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 1173–1184.
 21. Liu, C., Tolic, L. P., Hofstadler, S. A., Harms, A. C., Smith, R. D., Kang, C. & Sinha, N. (1998). Probing RegA/RNA interactions using electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **262**, 67–76.
 22. Potier, N., Donald, L. J., Chernushevich, I., Ayed, A., Ens, W., Arrowsmith, C. H. *et al.* (1998). Study of a noncovalent trp repressor: DNA operator complex by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci.* **7**, 1388–1395.
 23. Hagan, N. & Fabris, D. (2003). Direct mass spectrometric determination of the stoichiometry and binding affinity of the complexes between nucleocapsid protein and RNA stem-loop hairpins of the HIV-1 Psi-recognition element. *Biochemistry*, **42**, 10736–10745.
 24. Kilic, T., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A. & Suck, D. (2006). Oligomerization behavior of the archaeal Sm2-type protein from *Archaeoglobus fulgidus*. *Protein Sci.* **15**, 2310–2317.
 25. Hamilton, S., Odili, J., Pacifico, M. D., Wilson, G. D. & Kupsch, J. M. (2003). Effect of imidazole on the solubility of a His-tagged antibody fragment. *Hybrid. Hybridomics*, **22**, 347–355.
 26. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **61**, 458–464.
 27. Schluckebier, G., O’Gara, M., Saenger, W. & Cheng, X. (1995). Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **247**, 16–20.
 28. Fauman, E. B., Blumenthal, R. M. & Cheng, X. (1999). Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases. Cheng, X. & Blumenthal, R. M. pp. 1–38, World Scientific Publishing, Singapore.
 29. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 10037–10041.
 30. Rostom, A. A. & Robinson, C. V. (1999). Detection of the intact GroEL chaperonin assembly by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4718–4719.
 31. van Berkel, W. J., van den Heuvel, R. H., Versluis, C. & Heck, A. J. (2000). Detection of intact megadalton protein assemblies of vanillyl-alcohol oxidase by mass spectrometry. *Protein Sci.* **9**, 435–439.
 32. Sanglier, S., Ramstrom, H., Haiech, J., Leize, E. & Van Dorsselaer, A. (2002). Electrospray ionization mass spectrometry analysis revealed a similar to 310 kDa noncovalent hexamer of HPr kinase/phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Int. J. Mass Spectrom.* **219**, 681–696.
 33. Sanglier, S., Leize, E., Van Dorsselaer, A. & Zal, F. (2003). 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.* **14**, 419–429.
 34. Rogniaux, H., Sanglier, S., Strupat, K., Azza, S., Roitel, O., Ball, V. *et al.* (2001). Mass spectrometry as a novel approach to probe cooperativity in multimeric enzymatic systems. *Anal. Biochem.* **291**, 48–61.

35. Smith, R. D. & Light-Wahl, K. J. (1993). The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: promise, pitfalls and prognosis. *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 493–501.
36. Kapur, A., Beck, J. L., Brown, S. E., Dixon, N. E. & Sheil, M. M. (2002). Use of electrospray ionization mass spectrometry to study binding interactions between a replication terminator protein and DNA. *Protein Sci.* **11**, 147–157.
37. Gupta, R., Hamdan, S. M., Dixon, N. E., Sheil, M. M. & Beck, J. L. (2004). Application of electrospray ionization mass spectrometry to study the hydrophobic interaction between the epsilon and theta subunits of DNA polymerase III. *Protein Sci.* **13**, 2878–2887.
38. Cassidy, L. A., Lebruska, L. L., Benson, L. M., Naylor, S., Owen, W. G. & Maher, L. J., III (2002). Binding stoichiometry of an RNA aptamer and its transcription factor target. *Anal. Biochem.* **306**, 290–297.
39. Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein–protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731–1737.
40. McCarthy, A. A. & McCarthy, J. G. (2007). The structure of two N-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* **144**, 879–889.
41. Kettani, A., Gueron, M. & Leroy, J. L. (1997). Amino proton exchange processes in mononucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1108–1115.
42. Stewart, R. & Harris, M. G. (1977). Amino group acidity in nucleotide bases. *Can. J. Chem.* **55**, 3807–3814.
43. Elkins, P. A., Watts, J. M., Zalacain, M., van Thiel, A., Vitazka, P. R., Redlak, M. *et al.* (2003). Insights into catalysis by a knotted TrmD tRNA methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **333**, 931–949.
44. Labahn, J., Granzin, J., Schluckebier, G., Robinson, D. P., Jack, W. E., Schildkraut, I. & Saenger, W. (1994). Three-dimensional structure of the adenine-specific DNA methyltransferase M•Taq I in complex with the cofactor S-adenosylmethionine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 10957–10961.
45. Tran, P. H., Korszun, Z. R., Cerritelli, S., Springhorn, S. S. & Lacks, S. A. (1998). Crystal structure of the DpnM DNA adenine methyltransferase from the DpnII restriction system of *Streptococcus pneumoniae* bound to S-adenosylmethionine. *Structure*, **6**, 1563–1575.
46. Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R. S., Scheidig, A. J. & Weinhold, E. (2001). Structure of the N₆-adenine DNA methyltransferase M•TaqI in complex with DNA and a cofactor analog. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 121–125.
47. Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K. D., Kavanaugh, T. J. & Abad-Zapatero, C. (1999). The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* **289**, 277–291.
48. Maravic, G., Feder, M., Pongor, S., Flogel, M. & Bujnicki, J. M. (2003). Mutational analysis defines the roles of conserved amino acid residues in the predicted catalytic pocket of the rRNA:m6A methyltransferase ErmC'. *J. Mol. Biol.* **332**, 99–109.
49. Bheemanaik, S., Reddy, Y. V. & Rao, D. N. (2006). Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases. *Biochem. J.* **399**, 177–190.
50. Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBioChem*, **3**, 274–293.
51. Pues, H., Bleimling, N., Holz, B., Wolcke, J. & Weinhold, E. (1999). Functional roles of the conserved aromatic amino acid residues at position 108 (motif IV) and position 196 (motif VIII) in base flipping and catalysis by the N₆-adenine DNA methyltransferase from *Thermus aquaticus*. *Biochemistry*, **38**, 1426–1434.
52. Roth, M., Helm-Kruse, S., Friedrich, T. & Jeltsch, A. (1998). Functional roles of conserved amino acid residues in DNA methyltransferases investigated by site-directed mutagenesis of the EcoRV adenine-N₆-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273**, 17333–17342.
53. Collaborative Computational Project Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **50**, 760–763.
54. Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. & Dodson, E. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **59**, 1131–1137.
55. Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. In Joint CCP4+ ESF-AMCB Newsletter on Protein Crystallography (Science and Engineering Research Council, ed), Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
56. Evans, P. R. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*. Science and Engineering Research Council, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
57. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463.
58. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **53**, 240–255.
59. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **60**, 2126–2132.
60. Winn, M. D., Isupov, M. N. & Murshudov, G. N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **57**, 122–133.
61. Meinnel, T. & Blanquet, S. (1995). Maturation of pre-tRNA(fMet) by *Escherichia coli* RNase P is specified by a guanosine of the 5'-flanking sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 15908–15914.
62. Dardel, F. (1994). MC-Fit: using Monte-Carlo methods to get accurate confidence limits on enzyme parameters. *Comput. Appl. Biosci.* **10**, 273–275.
63. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D*, **54**, 905–921.

PUBLICATION

« An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction »

Tina Ritschel*, Cédric Atmanene*, Klaus Reuter, Alain Van Dorsseleer,
Sarah Sanglier-Cianferani, Gerhard Klebe

Journal of Molecular Biology, **2009**, 393, 833-847.

* contribution équivalente des deux auteurs.

JMB

Available online at www.sciencedirect.com

 ScienceDirect


An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction

Tina Ritschel¹†, Cédric Atmanene²†, Klaus Reuter¹,
Alain Van Dorsselaer², Sarah Sanglier-Cianferani² and Gerhard Klebe^{1*}

¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6, 35032 Marburg, Germany

²Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, University of Strasbourg UDS, CNRS UMR7178; 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

Received 25 May 2009;
received in revised form
6 July 2009;
accepted 14 July 2009
Available online
21 July 2009

The tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) is a putative target for new selective antibiotics against *Shigella* bacteria. The formation of a Tgt homodimer was suggested on the basis of several crystal structures of Tgt in complex with RNA. In the present study, noncovalent mass spectrometry was used (i) to confirm the dimeric oligomerization state of Tgt in solution and (ii) to evidence the binding stoichiometry of the complex formed between Tgt and its full-length substrate tRNA. To further investigate the importance of Tgt protein-protein interaction, point mutations were introduced into the dimer interface in order to study their influence on the formation of the catalytically active complex. Enzyme kinetics revealed a reduced catalytic activity of these mutated variants, which could be related to a destabilization of the dimer formation as evidenced by both noncovalent mass spectrometry and X-ray crystallography. Finally, the effect of inhibitor binding was investigated by noncovalent mass spectrometry, thus providing the binding stoichiometries of Tgt:inhibitor complexes and showing competitive interactions in the presence of tRNA. Inhibitors that display an influence on the formation of the dimer interface in the crystal structure are promising candidates to alter the protein-protein interaction, which could provide a new way to inhibit Tgt.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: protein-RNA interaction; protein-protein interaction; noncovalent mass spectrometry; X-ray crystallography; tRNA modification

Edited by R. Huber

Introduction

Shigella ssp. is the causative agent of bacillary dysentery, an acute inflammatory disease of the colon characterized by bloody, mucopurulent stools.¹ Although Shigellosis occurs worldwide, the vast majority of cases are in developing countries, where this disease causes the death of more than one million humans (mainly infants) each year.² A null-mutation in the *tgt* gene encoding the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase (Tgt, EC 2.4.2.29) was found to drastically decrease patho-

genicity of *Shigella* ssp.³ Bacterial Tgt is involved in the biosynthesis of the hypermodified tRNA nucleoside queuosine (Q) by catalyzing the replacement of the genetically encoded guanine at position 34 (the wobble position) of tRNAs^{Asp, Asn, His, Tyr} by preQ₁ (Fig. 1). This premodified base is produced from guanosine triphosphate by means of the *queC*, *queD*, *queE* and *queF* gene products.^{4–14} The base exchange follows a ping pong reaction mechanism (Fig. 2).^{15,16} It was shown that a functional Tgt is prerequisite for efficient translation of *virF*-mRNA encoding the furthest upstream positive transcriptional regulator of *Shigella* pathogenicity genes. Probably, the presence of Q at the wobble position of tRNAs^{Asp, Asn, His, Tyr} is critical for smooth decoding of this particular mRNA. Recently, however, Hurt *et al.* suggested that the loss of *Shigella* pathogenicity due to inactivation of the *tgt* gene may have a different explanation.¹⁷ *In vitro*, Tgt is able to recog-

*Corresponding author. E-mail address:

klebe@mail.uni-marburg.de.

† Contributed equally to this work.

Abbreviation used: ESI-MS, electrospray ionization-mass spectrometry.

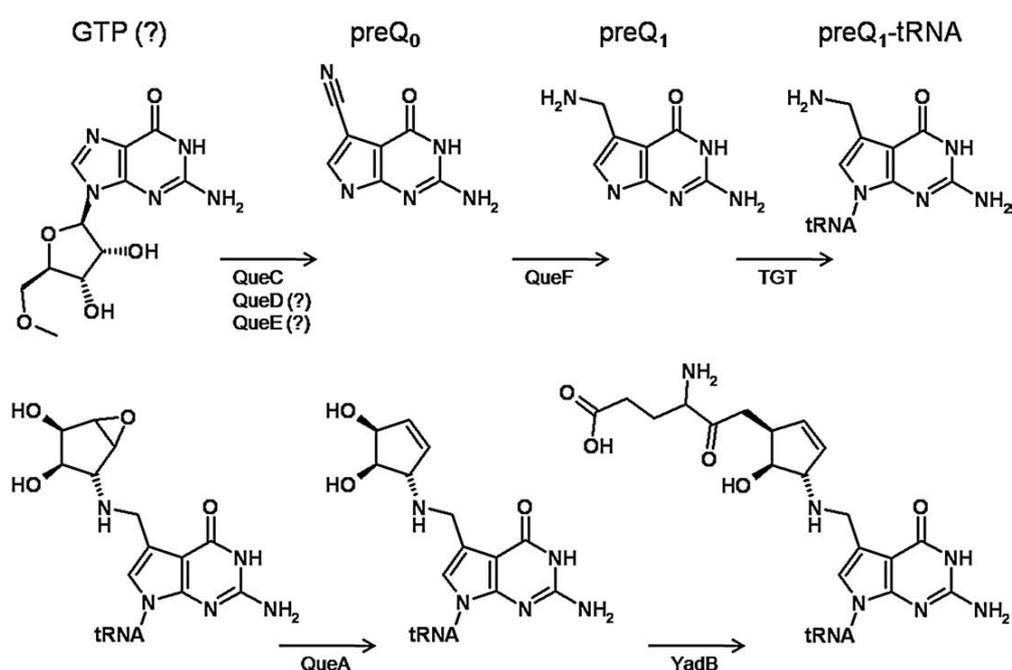


Fig. 1. Queuine modification pathway in bacteria. After insertion of preQ₁ into tRNA, it is further converted to the base Q by S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase (QueA) and a putative coenzyme B₁₂-dependent enzyme, still to be identified. In many bacteria, Q experiences a further modification catalyzed by the *yadB* gene product, which attaches a glutamyl residue to one of the hydroxyl groups of the cyclopentenediol moiety of Q. The figures were prepared using Isis Draw and Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

nize *virF*-mRNA as a substrate and to replace the guanine at position 421 of this mRNA by preQ₁. Similar to guanine 34 in tRNAs constituting Tgt substrates, guanine 421 of *virF*-mRNA is present in the loop region of a stem-loop structure and is flanked by a U nucleotide on either side. Nevertheless, whether the modification of *virF*-mRNA with preQ₁ takes place *in vivo* and has a regulatory role reminiscent of mRNA riboswitches, remains to be elucidated. In any case, the fact that full pathogenicity of *Shigella* ssp. depends on Tgt activity renders this enzyme a promising target for the development of drugs against Shigellosis.

Several small molecule inhibitors of Tgt have been designed and identified with affinities in the low nanomolar range.¹⁸⁻²⁴ Their design was based on the crystal structure of Tgt from *Zymomonas mobilis*, whose active center is virtually identical with that of the *Shigella* enzyme, differing only by a conservative Phe to Tyr exchange proven to be irrelevant for ligand binding.²⁵

Various attempts to find the quaternary structure of bacterial Tgt yielded contradictory results, and the subunit composition of this enzyme has long been a matter of debate. Okada and Nishimura, who were the first to isolate Tgt from *Escherichia coli* to homogeneity, deduced from size-exclusion chromatography an apparent molecular mass of 58 kDa.^{26,27} In view of the calculated molecular mass of 42.5 kDa, this is most consistent with a monomeric state in solution. In contrast, the migration behavior of recombinant *E. coli* Tgt in native PAGE suggests a

pentameric or even hexameric state, although the results of SDS-PAGE of this enzyme crosslinked with bisimidoesters render the formation of a trimer likely.²⁸ In a subsequent work, it was shown that size-exclusion chromatography done with recombinant *E. coli* Tgt does not yield unambiguous results.²⁹ Instead, the apparent molecular mass deduced from each run depends on the concentration of the enzyme loaded on the column and at chromatography with high concentrations asymptotically reaches a value of ~140 kDa (corresponding to a trimer). In contrast, the apparent molecular mass of the recombinant orthologous enzyme from *Z. mobilis* deduced from size-exclusion chromatography constantly amounts to ~55 kDa independent of the concentration applied.

Ultimately, the crystal structures of *Z. mobilis* Tgt in its apo-form and with bound preQ₁, displayed a homodimer with an interface producing a buried surface area of 1667 Å².^{23,25} The identical dimer interface was observed in the crystal structure of *Z. mobilis* Tgt bound to a substrate tRNA anticodon stem-loop, even though the corresponding crystal belonged to a completely different space group than crystals of apo- or preQ₁-containing-Tgt.³⁰ As the active sites of both subunits are in close vicinity and are present on the same face of the dimer (Fig. 3a), binding of two anticodon stem-loops would be sterically hindered. Accordingly, only one RNA molecule is bound per Tgt dimer (Fig. 3b) occupying the binding site of one Tgt subunit (referred to here as A), while leaving empty the active site of the

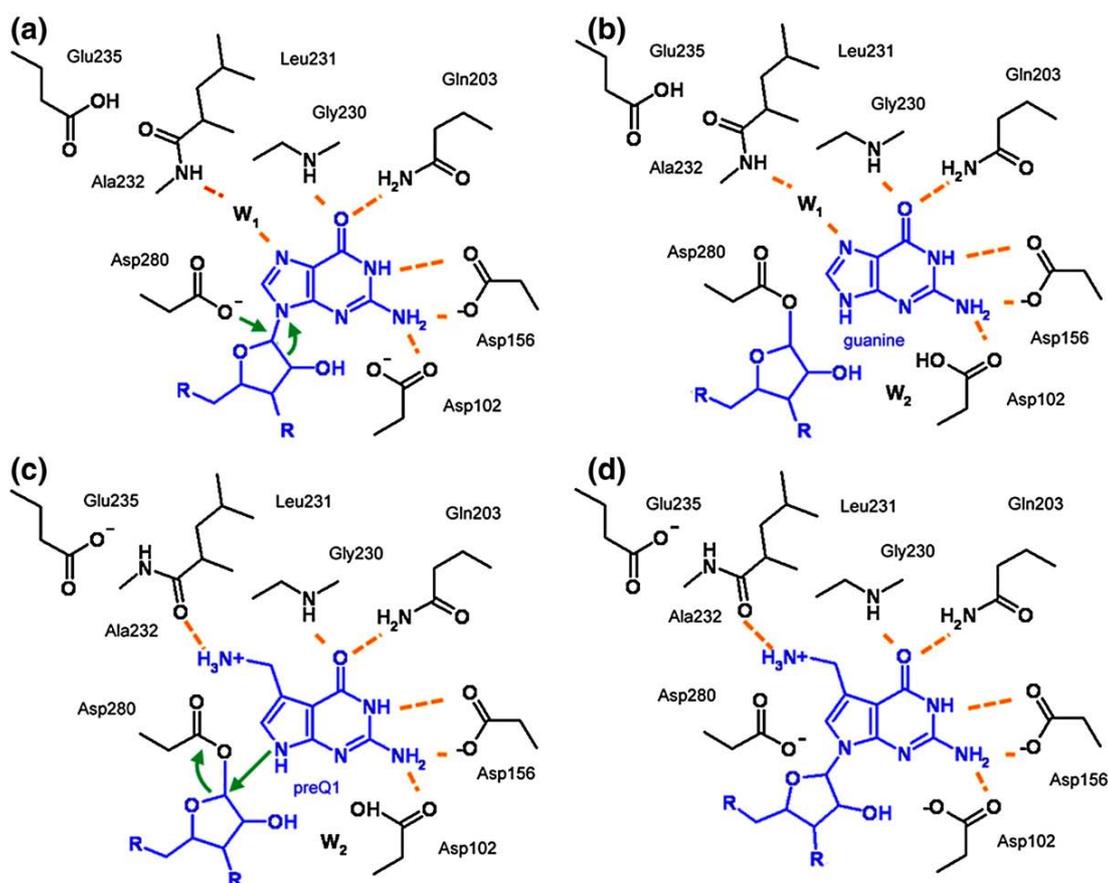


Fig. 2. The assumed mechanism of the base exchange reaction in bacterial Tgt. (a and b) After tRNA substrate binding, the glycosidic bond of guanine 34 is cleaved *via* nucleophilic attack by the Asp280 carboxylate producing a covalent Tgt: tRNA complex. (c and d) PreQ₁ replaces guanine and is incorporated into tRNA in a reverse reaction step. The base replacement induces a Leu231/Ala232 peptide bond flip. While N7 of bound guanine contacts the main chain amide of Ala232 *via* a water molecule (W₁), the main chain carbonyl of Leu231 is required to H bond the exocyclic amino methyl group of preQ₁. Both peptide conformations are stabilized by the side chain carboxyl of the strictly conserved Glu235. Depending on its protonation state, it either accepts or donates an H bond to the backward-oriented carbonyl oxygen of Leu231 or main chain amide of Ala232.

second subunit (referred to here as B). Nevertheless, subunit B interacts with the anticodon stem-loop of the bound substrate RNA *via* Arg77 which forms a hydrogen bond with the phosphate group of Cyt27 (Fig. 3d). Superimposing full-length tRNA onto the Tgt-bound anticodon stem-loop (Fig. 3c) shows that the positively charged residues Lys125 and Arg132 of subunit B are well positioned to form a salt bridge to the phosphate groups of nucleotides 11 and 12 within the dihydrouridine stem (Fig. 3c). These observations suggest that the functional unity of Tgt is indeed a homodimer, which is, however, able to bind and convert only one substrate RNA molecule at a time. This assumption was corroborated by an alignment of 18 bacterial Tgt sequences showing that residues forming the dimer interface are highly conserved.²³ In addition, the crystal structure of Tgt from *Thermotoga maritima* (PDB code 2ASH) also exhibits a homodimer assembled virtually identical with that one found for *Z. mobilis* Tgt.

Recently, a *lin*-benzoguanine based Tgt inhibitor (**1** in Table 1) designed to competitively inhibit binding of substrate tRNAs was unexpectedly found to influence the properties of the dimer interface.²³ This became obvious by a reduction of space group symmetry upon soaking *apo*-Tgt crystals with **1**. Usually, in the absence of RNA, *Z. mobilis* Tgt crystallizes in space group C2 with two identical Tgt dimers present in one unit cell. In crystals containing Tgt complexed with **1**, this space group is reduced to P2 with the unit cell containing two non-identical dimers. This is due to the fact that **1** is bound in a slightly different way by each dimer of the unit cell. One of the dimers binds **1** in a fashion that leaves the dimer interface unchanged compared to virtually all other known Tgt crystal structures, whereas the way the second dimer binds **1** clearly influences the dimer interface. Here, helix α 1 as well as the preceding loop, which are both normally involved in dimer interface formation and

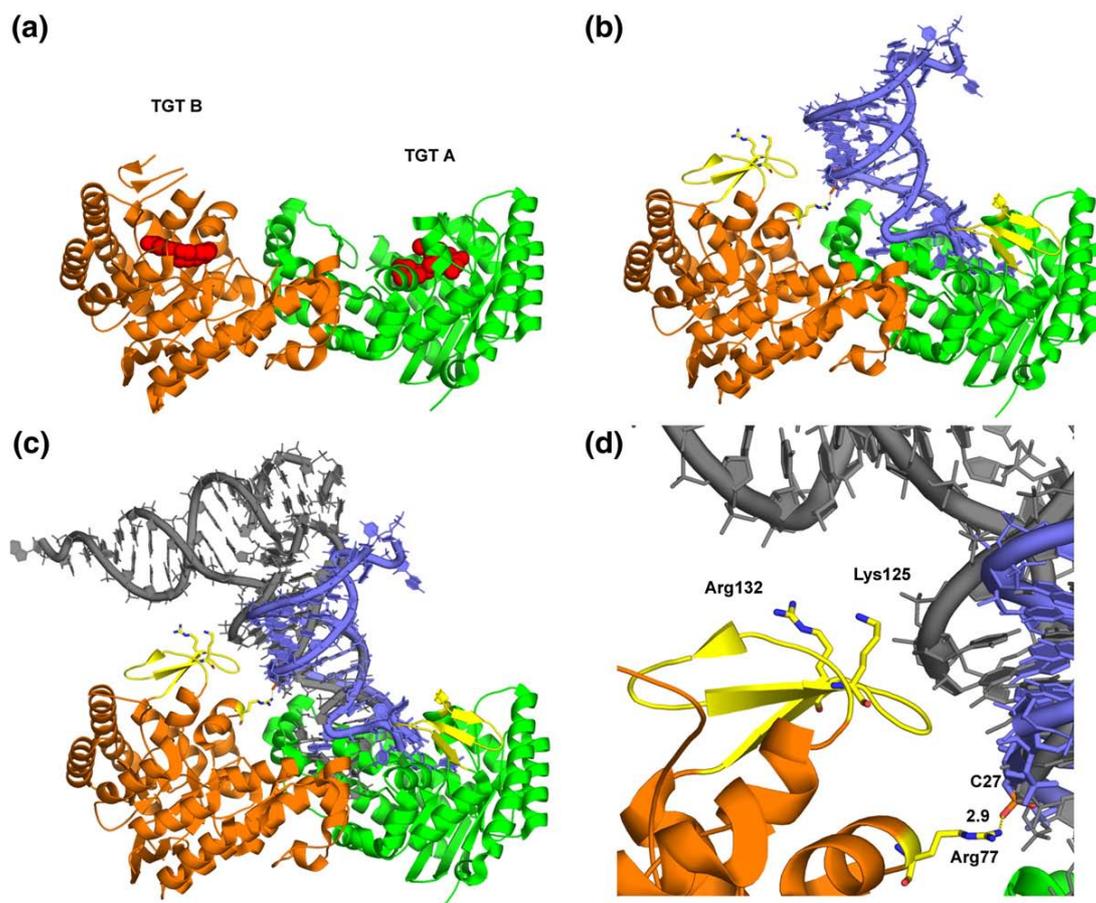


Fig. 3. Ribbon representation of homodimeric *Z. mobilis* Tgt (monomer A, green; monomer B, orange). (a) The active sites of the monomers, both occupied by an inhibitor (red spheres), are located on the same face of the complex (PDB code 2Z7K). (b) Complex of Tgt with a tRNA anticodon stem-loop (blue) (PDB code 1Q2R). The portions of TGT most likely involved in tRNA recognition and binding are highlighted in yellow. Due to steric hindrance, only one tRNA molecule can bind to the Tgt dimer. (c) Superposition of the anticodon stem-loop bound to *Z. mobilis* Tgt with the complete tRNA^{Phe} molecule of yeast (gray) (PDB code 1EHZ). (d) A detailed view of tRNA binding. Protonatable residues, potentially able to interact with the phosphate groups of the tRNA backbone, are shown in stick representation.

perfectly defined in all Tgt crystal structures determined previously, become disordered upon binding of **1**.²³ Meanwhile, the crystal structure of Tgt with **3** (Table 1) revealed that also this inhibitor impairs the proper formation of the Tgt dimer interface. The serendipitous discovery that small molecule inhibitors originally intended to address the guanine/preQ₁ binding site and small surrounding subpockets, interfered with Tgt dimer formation, prompted us to launch a project aimed at systematically perturb Tgt dimerization to provide some novel strategies to possibly interfere and inhibit enzyme function. In the present study, a combination of automated chip-based nanoelectrospray mass spectrometry (nanoESI-MS), enzyme kinetics and X-ray crystallography techniques was used to gain deeper insights into the biological relevance of Tgt quaternary structure for catalysis. Particularly, noncovalent mass spectrometry was first used to confirm the Tgt oligomerization state unambiguously as well as the binding stoichiometry of its

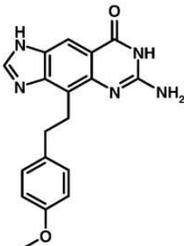
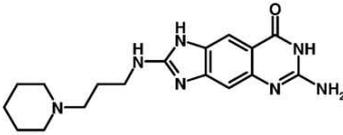
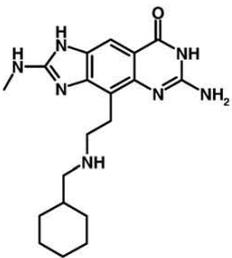
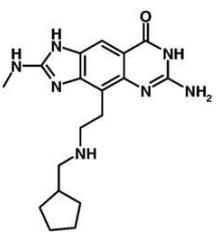
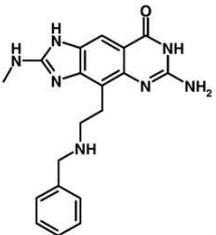
complex with full-length tRNA. Mutations intended to impede dimer formation were then introduced and their influence on the catalytic efficiency as well as on dimer stability were examined. One of the mutated Tgt variants was characterized crystallographically, revealing important structural changes in the interface region coinciding with that perturbed by **1** and **3**. Finally, these inhibitors were investigated to determine their protein binding stoichiometries as well as their effect on the Tgt:tRNA complex.

Results and Discussion

Dimeric Tgt binds a single tRNA molecule

Earlier work on bacterial Tgt found contradictory oligomerisation states ranging from monomer to hexamer.^{26,28} As a first step in this study, noncovalent mass spectrometry experiments were carried

Table 1. Structures and binding affinities of the inhibitors used in the MS experiments

Name	Structure	MW	K _i
1		335.4 Da	3.7 μM ²³
2		341.4 Da	15 nM ⁴⁴
3		369.5 Da	4 nM ³¹
4		355.4 Da	2 nM ³¹
5		363.4 Da	25 nM ³¹

out with *Z. mobilis* Tgt to confirm its oligomerisation state. This technique enables accurate mass measurements of intact noncovalent assemblies in the gas phase, thus providing reliable information on the protein oligomerisation state as well as on the protein:RNA binding stoichiometries.^{31–34} Tgt was first analyzed alone under nondenaturing conditions (Fig. 4a) revealing the presence of a single species, which can be assigned to dimeric Tgt according to the good agreement between the

measured molecular mass ($85,613 \pm 4$ Da) and that expected for a Tgt dimer containing one structural Zn²⁺ per subunit (85,604 Da).

NanoESI-MS experiments were performed with Tgt in the presence of increasing concentrations of tRNA. When the protein (10 μM monomer) was incubated with 5 μM tRNA, two main ion distributions were detected (Fig. 4b); namely, in the *m/z* (mass/charge) ranges 4200–5000 and 5200–6500. While the former corresponds to a Tgt dimer, the

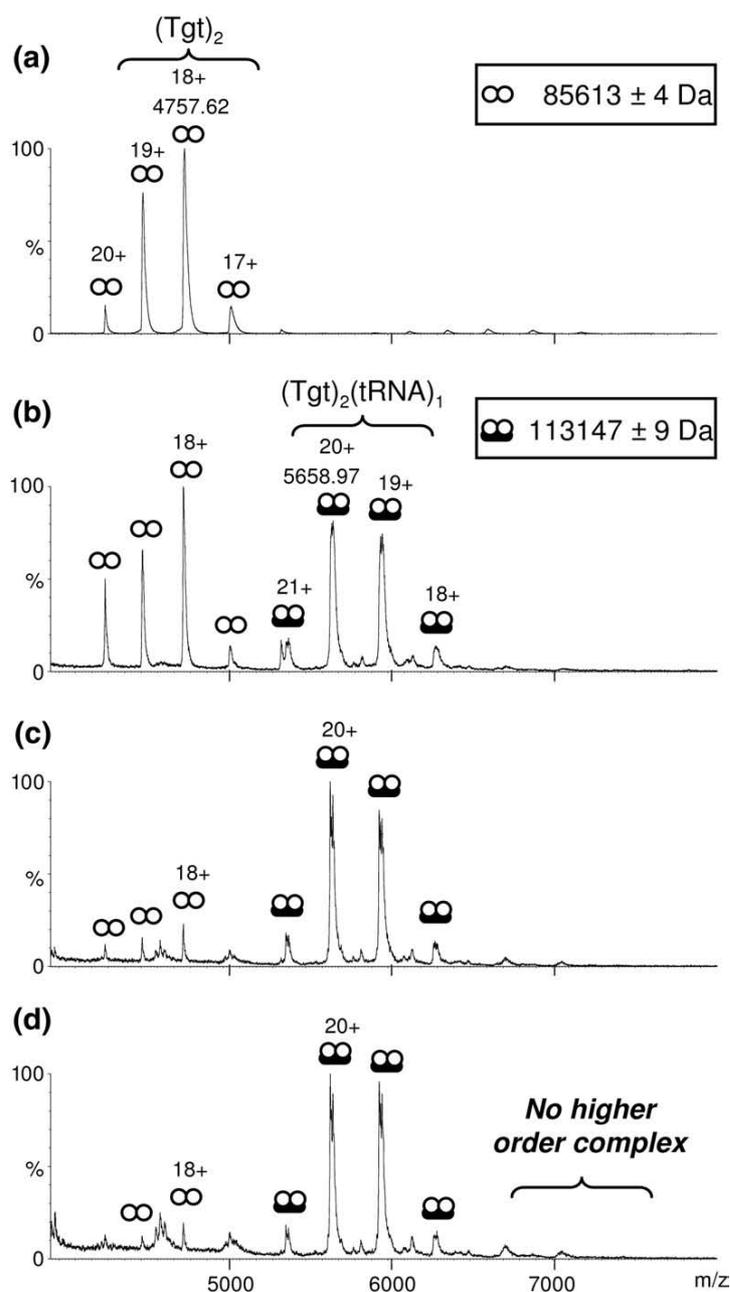


Fig. 4. Noncovalent mass spectrometry analysis of Tgt and Tgt:tRNA assemblies. NanoESI mass spectra were obtained with Tgt diluted to 10 mM monomer: (a) alone; or in the presence of (b) 5 μ M tRNA; (c) 10 μ M tRNA; (d) 15 μ M tRNA. (∞) and (∞∞) are related to dimeric Tgt and the 2:1 Tgt:tRNA complex, respectively. $V_c=150$ V, $P_i=6.0$ mbar.

second has a molecular mass of 113147 ± 9 Da and corresponds to the 2:1 Tgt:tRNA complex. Upon increasing the concentration of tRNA to 10 μ M, nanoESI-MS analysis revealed that the equilibrium shifts completely towards the protein:tRNA complex (Fig. 4c). Notably, no higher-order complex was detected even in presence of a 3-fold molar excess of tRNA over the Tgt dimer (Fig. 4d), which provides evidence that the Tgt dimer binds specifically to a single tRNA molecule. These results obtained with a full-length tRNA corroborate the results from a recent crystallographic study showing the bacterial Tgt homodimer interacting with a single substrate tRNA anticodon stem-loop.³⁰

Together with recent crystallographic data, the present results confirm the dimeric oligomerisation state of Tgt as well as the 2:1 binding stoichiometry of the Tgt:tRNA complex.

Point mutations aimed at destabilizing the homodimer interface alter Tgt catalytic efficiency

To gain deeper insight into the importance of homodimer formation for catalytic activity, we created two mutated variants of *Z. mobilis* Tgt, each containing an amino acid exchange, aimed at disturbing a protein-protein interaction thought to

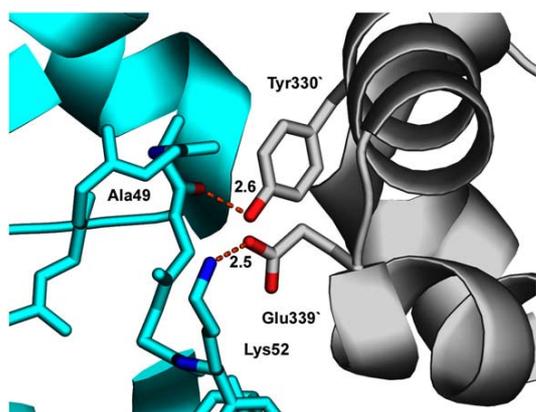


Fig. 5. Interactions within the homodimer interface of Tgt selected for mutagenesis. The hydrogen bond formed between Ala49 (cyan) and the Tyr330' (gray) as well as the salt bridge formed between Lys52 (cyan) and Glu339' (gray) are shown as broken lines (distances are given in Å).

be important for dimer interface stability. It should be noted that, on the basis of a 2-fold symmetry of the dimer interface, each amino acid exchange will disrupt two (identical) protein-protein interactions per dimer. In the first variant, Tyr330 was changed to Phe in order to disrupt the hydrogen bond formed between the main chain carbonyl of Ala49 and the Tyr330' side chain hydroxyl. In the second variant, a salt bridge formed between the side chain ammonium of Lys52 and the side chain carboxylate of Glu339' was eliminated by changing Lys52 to a sterically similar but uncharged Met (Fig. 5).

To analyse the influence of the introduced mutations on tRNA binding and catalytic efficiency, we determined $K_M(\text{tRNA})$ and k_{cat} of both mutated variants using radiolabeled guanine as the second substrate. The kinetic parameters measured for Tgt (Tyr330Phe) and Tgt(Lys52Met) as well as those determined for wild type enzyme are summarized in Table 2. While $K_M(\text{tRNA})$ was, with respect to the error range of the assay, virtually unchanged for both mutated Tgt variants, k_{cat} was reduced by a factor of ~ 10 for Tgt(Tyr330Phe) and by a factor of ~ 50 for Tgt(Lys52Met). These results can be interpreted most plausibly as showing that dimer formation is a precondition for catalytic activity of Tgt. The more efficient the mutation-induced dimer destabilization, the smaller the fraction of catalytically active dimeric Tgt, resulting in the observed reductions of k_{cat} . Alternatively, or in addition, the mutations may result in modified dimer interfaces, which may, in turn, affect the exact orientation and geometry of nearby active site residues, thus negatively influencing catalysis. In any case, from unchanged $K_M(\text{tRNA})$ values of both mutated variants compared to wild type Tgt, it may be deduced that, once a dimer has formed, it will bind the tRNA substrate with virtually the same affinity as wild type Tgt.

NanoESI-MS experiments reveal mutation-induced destabilization of the Tgt dimer

In order to check whether the reduced turnover values measured for Tgt(Lys52Met) and Tgt (Tyr330Phe) are due to a destabilized protein/protein interface, nanoESI-MS experiments were done under nondenaturing conditions with these mutated variants. Using a concentration of $10 \mu\text{M}$ monomer, Tgt (Lys52Met) appears, like wild type Tgt, almost exclusively as a homodimer, while the mass spectrum obtained for $10 \mu\text{M}$ Tgt(Tyr330Phe) also reveals a significant amount of monomer (Fig. 6a–c). When the concentration of protein is lowered to a minimal value of $1 \mu\text{M}$, a substantial proportion of monomer becomes evident for both variants (Fig. 6d–f). In contrast, wild type Tgt remains totally dimeric at this concentration. The finding that the monomer/dimer ratios of Tgt(Lys52Met) and Tgt (Tyr330Phe) obviously depend on the protein concentrations confirmed that the introduced mutations did not completely disrupt but solely destabilized the dimer interface. Since an enzyme concentration as low as 150 nM was used in the assay to determine k_{cat} and $K_M(\text{tRNA})$, the strongly reduced turnover numbers observed for Tgt(Lys52Met) and Tgt (Tyr330Phe) are consistent with the results obtained from the nanoESI-MS experiments.

Crystal structure of Tgt(Lys52Met)

In order to interpret at a structural level the reduced turnover values as well as the data obtained from nanoESI-MS experiments for Tgt(Lys52Met) and Tgt(Tyr330Phe), we tried to crystallize these mutated variants. Yet, solely Tgt(Lys52Met) formed crystals under the same conditions as wild type Tgt, while all attempts to obtain diffracting crystals from Tgt(Tyr330Phe) were unsuccessful. Moreover, compared to crystals of wild type Tgt, crystals of Tgt (Lys52Met) were very fragile and showed only a limited diffraction quality. Nevertheless, using a dataset collected at the BESSY Synchrotron (Berlin), we finally determined the crystal structure of Tgt (Lys52Met) at a resolution of 2.0 \AA . The structure indeed reveals a significant modification of the dimer interface, which is clearly caused by the introduced mutation (Fig. 7). The loss of the salt bridge normally formed between the Lys52 ammonium and the Glu339' carboxylate group results in a complete collapse of helix $\alpha 1$. While this helix is perfectly

Table 2. k_{cat} and $K_M(\text{tRNA})$ for Tgt and mutated variants of Tgt

	Tgt (wild type)	Tgt (Tyr330Phe)	Tgt (Lys52Met)
k_{cat} (10^{-2} s^{-1}) ^a	1.1	0.095	0.023
$K_M(\text{tRNA})$ (μM)	2.17	1.58	0.98

^a Taking into account the presence of Tgt as a homodimer able to bind and convert only one substrate tRNA molecule at a time.

defined in the crystal structure of wild type Tgt, no density could be assigned to this structural element in the electron density map of Tgt(Lys52Met). In addition, the C-terminal half of the loop preceding helix $\alpha 1$ (and containing Met52) is disordered as well, while the N-terminal half of this loop takes a significantly different course compared to the corresponding section in wild type Tgt. The loss of a defined conformation of helix $\alpha 1$ and of a part of the preceding loop, in turn, results in a slight dislocation of helices $\alpha E'$ and $\alpha F'$. It should be noted here that the crystal structure of RNA bound to Tgt shows that the loop connecting β -strand 1 and helix $\alpha 1$ interacts

with the uridine 35 nucleotide of the tRNA anticodon. A destabilization of its conformation might ultimately lead to a slightly distorted orientation of active site residues and substrate, and thus supposedly contribute to the reduced turnover values observed for Tgt(Lys52Met).

NanoESI-MS monitoring of inhibitor-binding effect on Tgt homodimer and the Tgt:tRNA complex

According to the results described above, altering the dimer interface appears as a promising strategy

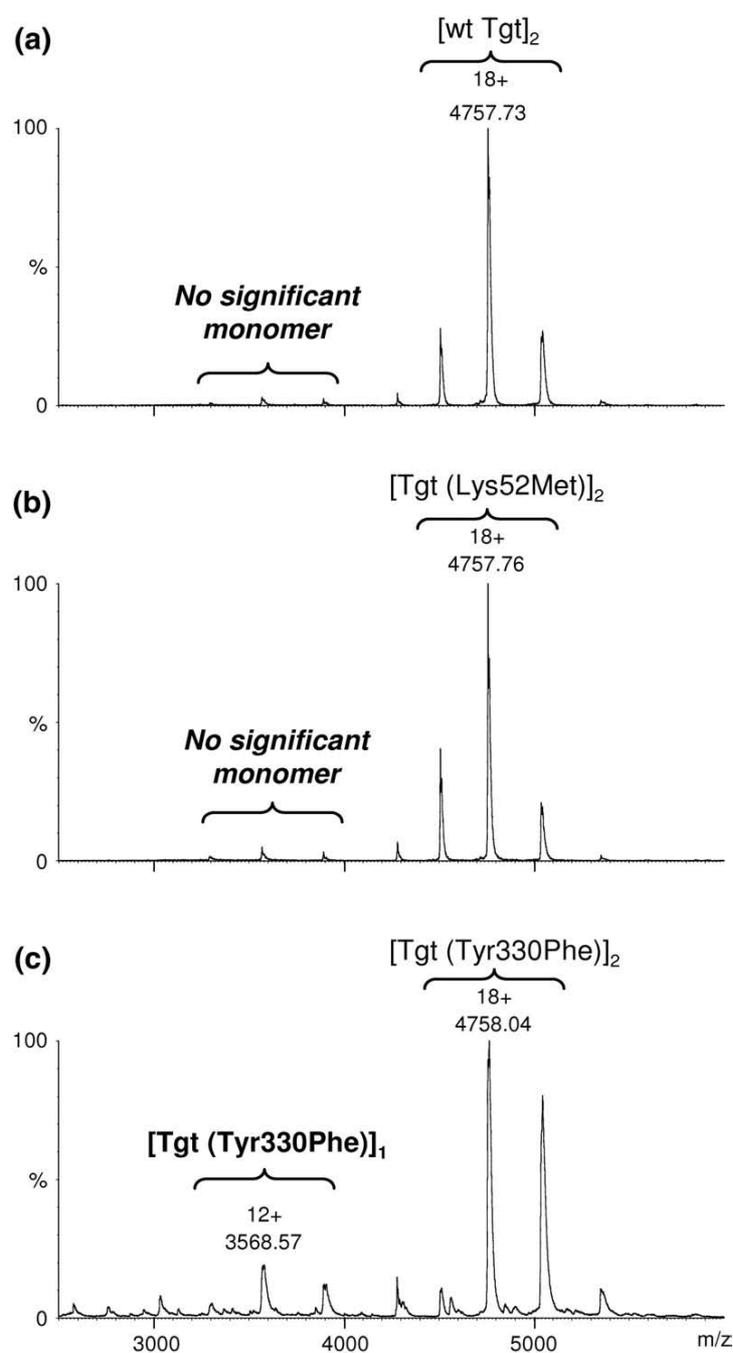


Fig. 6. Effect of mutation points on Tgt dimer stability. (a and d) Wild type Tgt; (b and e) Tgt (Lys52Met); (c and f) Tgt (Tyr330Phe) were diluted either to (a–c) 10 μ M or (d–f) 1 μ M monomer in 500 mM ammonium acetate at pH 8.0. $V_c = 100$ V, $P_i = 6.0$ mbar.

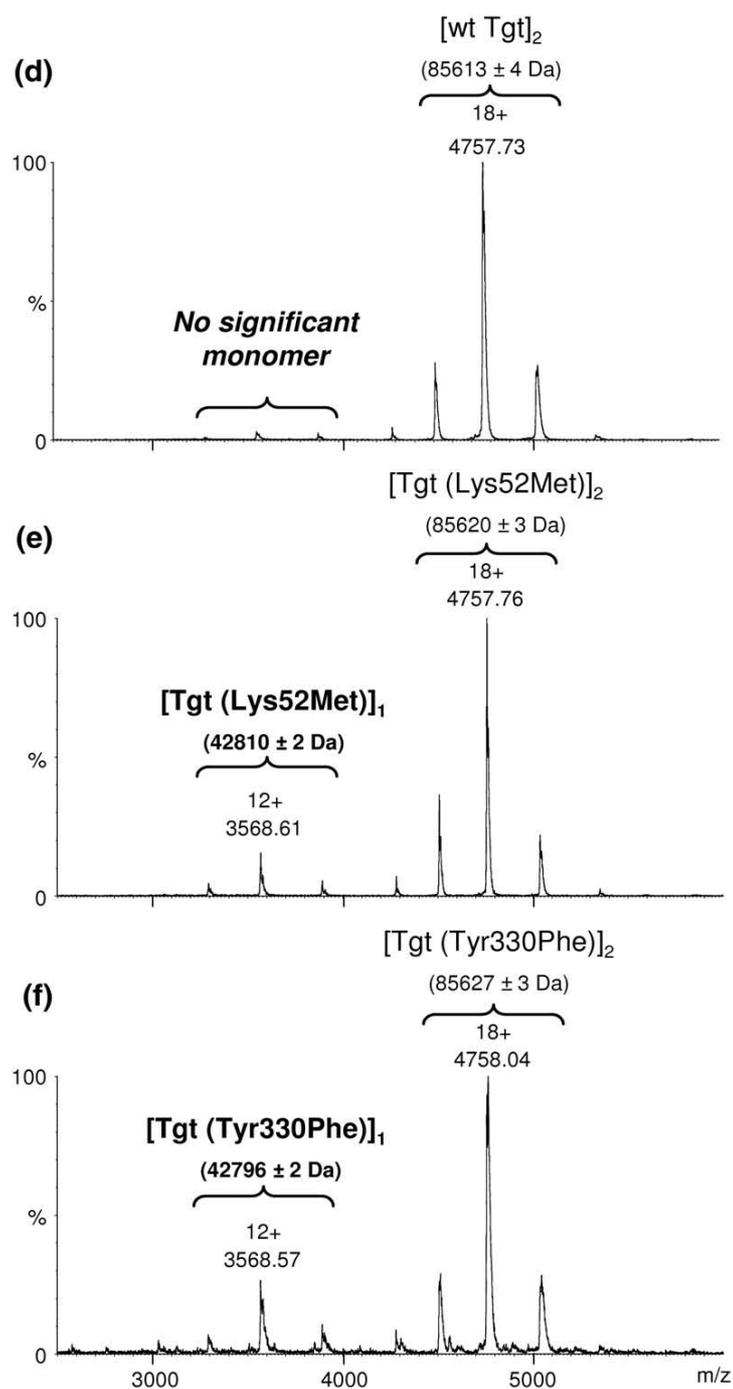


Fig. 6 (legend on previous page)

to inhibit Tgt activity. In this context, nanoESI-MS experiments were done with wild type Tgt in the presence of a number of small molecule inhibitors (**1** – **5** in Table 1) in order to determine inhibitor binding stoichiometries and to reveal potential influence of inhibitor binding on Tgt homodimer stability. For inhibitors **1** and **3**, it was shown by X-ray crystallography that these compounds are able to modify the structure of the dimer interface.²³ Further-

more, inhibitors **4** and **5** address a hydrophobic subpocket close to the dimer interface that might affect quaternary structure formation. Compound **2** addresses a different subpocket and no impact on dimer formation can be expected.³⁵ As shown in Fig. 8, ESI mass spectra obtained after incubation of 10 μ M Tgt in the presence of 50 μ M inhibitor reveals an exclusively homodimeric population with one inhibitor molecule bound to each subunit. Accord-

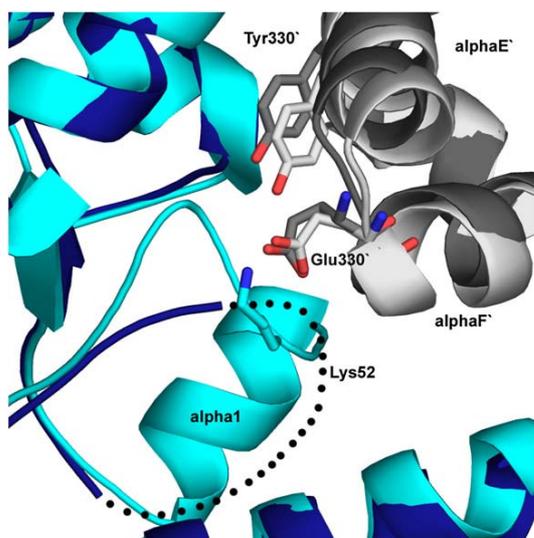


Fig. 7. Superposition of Tgt (PDB code 2Z7K; monomer A, gray; monomer B, cyan) and Tgt(Lys52Met) (monomer A, dark gray; monomer B, blue). In Tgt (Lys52Met), helix $\alpha 1$ as well as the loop connecting β strand 1 and helix $\alpha 1$ are disordered, thus reducing the contact area in the interface and leading to the dislocation of helices αE and αF .

dingly, at this concentration, inhibitors fully saturate Tgt binding sites, which is in agreement with previously reported K_i values (Table 1). However, none of these ligands is able to disrupt the Tgt homodimer.

In order to investigate the influence on Tgt:tRNA complex stability, nanoESI-MS indirect competition experiments were done with tRNA and the different inhibitors. Importantly, desolvation and transmission of Tgt:tRNA assembly require harsh instrumental conditions that induce the disruption of Tgt:inhibitor complex in the gas phase. As a consequence, these competition experiments aimed only at monitoring the inhibitor effect on stability of the Tgt:tRNA complex in solution; no inhibitor binding stoichiometry was obtained using these instrumental conditions.

In a first series of experiments, Tgt (in total $10 \mu\text{M}$) was first incubated with $50 \mu\text{M}$ inhibitor followed by the addition of tRNA (in total $10 \mu\text{M}$). Note that the results described above showed that, at these concentrations, Tgt is detected almost exclusively as a 2:1 tRNA complex and a 2:2 Tgt:inhibitor complex, respectively. In the present competition experiments, deconvoluted ESI mass spectra show, without exception, a main peak corresponding to the Tgt homodimer beside a considerably smaller peak corresponding to the Tgt dimer in complex with one tRNA molecule (Fig. 9). In contrast, in the deconvoluted ESI mass spectrum of the control experiment, where Tgt was incubated with an equimolar concentration of tRNA but in the absence of any small molecule inhibitor, the most intense peak corresponds to the 2:1 Tgt:tRNA complex (Fig. 9a). These results illustrate the ability of the

inhibitor to prevent the formation of the Tgt:tRNA complex.

Interestingly, in a second series of experiments, Tgt (in total $10 \mu\text{M}$) was incubated with tRNA (in total $10 \mu\text{M}$) to allow the formation of the Tgt:tRNA complex. The subsequent addition of inhibitor to $50 \mu\text{M}$ led to nanoESI mass spectra identical with those exposed in Fig. 9 (see the

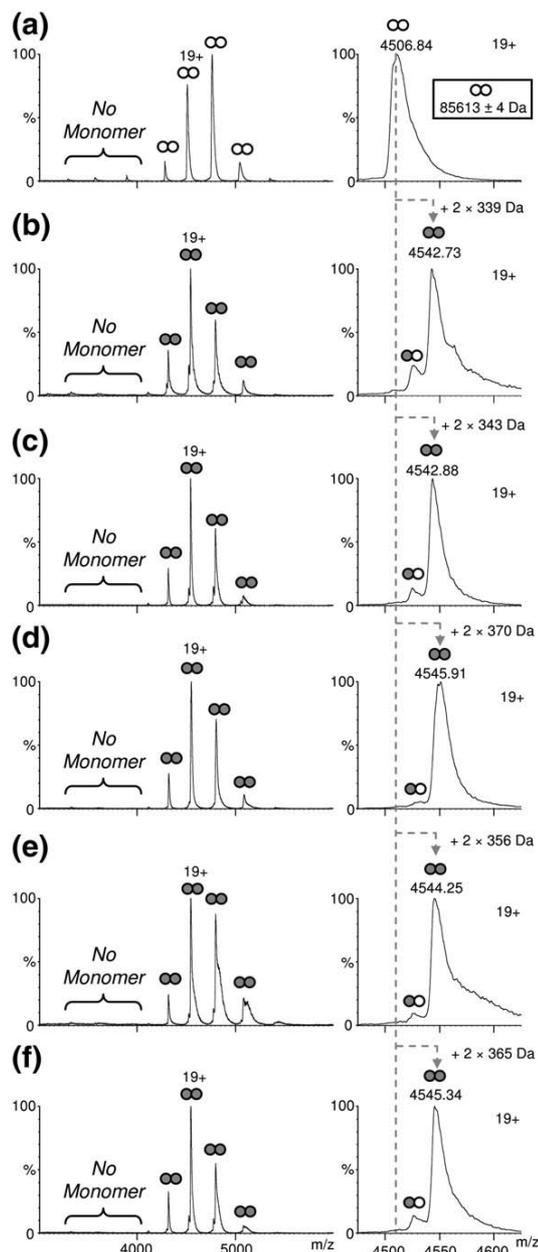


Fig. 8. Investigation of inhibitor binding effect on the Tgt oligomerisation state. Tgt ($10 \mu\text{M}$ monomer) was incubated: (a) alone; or in the presence of $50 \mu\text{M}$ inhibitor (b) 1, (c) 2, (d) 3, (e) 4 and (f) 5. Mass spectra in the right-hand column correspond to an enlargement of the +19 charge state of free and bound Tgt. (○), (◐) and (◑) correspond to free Tgt dimer, 2:1 Tgt:inhibitor complex, and 2:2 Tgt:inhibitor complex. $V_c=60 \text{ V}$, $P_i=6 \text{ mbar}$.

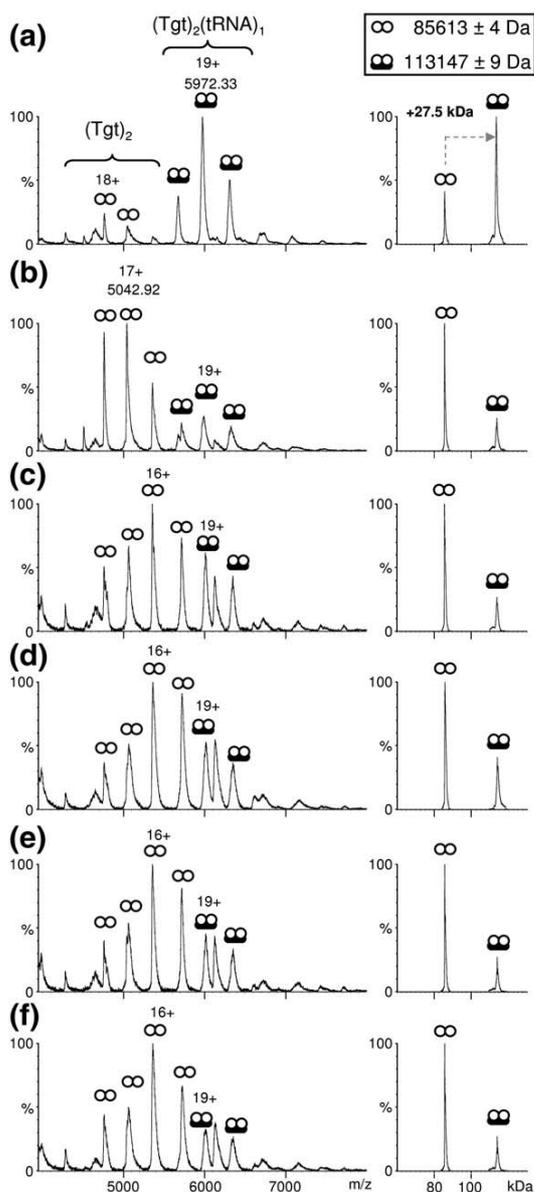


Fig. 9. Investigation of inhibitor binding effect on the formation of the Tgt:tRNA complex. (a) Tgt (10 μ M monomer) was incubated in presence of 10 μ M tRNA. (b–f) Tgt (10 μ M monomer) was first incubated with 50 μ M inhibitor (b) **1**, (c) **2**, (d) **3**, (e) **4** and (f) **5**, followed by the addition of tRNA to 10 μ M. ESI mass spectra in the right-hand column were deconvoluted with the Transform algorithm from MassLynx 4.0. (∞) and (∞∞) are related to dimeric Tgt and the 2:1 Tgt:tRNA complex, respectively. $V_c = 150$ V, $P_i = 6$ mbar.

Supplementary Data). As a conclusion for these competition experiments, inhibitors **1** to **5** are able to prevent the formation of the catalytically active Tgt:tRNA complex, and are able to disrupt the pre-formed complex. This kind of information is of crucial importance for understanding the inhibitor mechanism of action.

Conclusion and Outlook

Here, we report the use of an integrative approach combining the benefits of noncovalent nanoESI-MS, site-directed mutagenesis, enzyme kinetics, and protein X-ray crystallography to investigate the quaternary structure of Tgt and the binding stoichiometry of the Tgt:substrate tRNA complex. The results of nanoESI-MS analysis presented here provide clear evidence that bacterial Tgt is present in solution as a homodimer able to bind specifically only one substrate tRNA molecule at a time. This corroborates the conclusions drawn from the crystal structure of *Z. mobilis* Tgt in complex with a substrate tRNA anticodon stem-loop suggesting a 2:1 stoichiometry for the catalytically active Tgt:tRNA complex. The fact that the active sites of both subunits are located on the same face of the dimer renders, for steric reasons, simultaneous binding of two tRNA molecules virtually impossible. Yet, the Tgt:tRNA complex structure suggests that the subunit with its active site unoccupied supports binding and correct orientation of the substrate tRNA through a number of salt bridges.

In order to ascertain the significance of homodimer formation for the catalytic activity of bacterial Tgt, we created a Tgt(Tyr330Phe) as well as a Tgt(Lys52Met) variant using site-directed mutagenesis. While the Tyr330Phe mutation abolishes two intersubunit hydrogen bonds, the Lys52Met mutation disables the formation of two intersubunit salt bridges. Indeed, nanoESI-MS experiments with these variants showed that the introduced mutations lead to the destabilization of the dimer interface which, in both cases, is accompanied by a significant loss of catalytic activity. It should be noted that no catalytic activity was detectable for the Tgt(Tyr330Phe, Lys52Met) doubly mutated variant that was created in the course of this study. Unfortunately, we were not able to purify this variant to homogeneity, possibly because it showed, compared to wild type Tgt, a completely different behavior during all purification steps. This rendered a detailed analysis of Tgt(Tyr330Phe, Lys52Met) impossible, yet it provided further evidence for the importance of homodimer formation for integrity and functionality of the bacterial Tgt enzyme.

Altogether, these results highlight a crucial structure–activity relationship controlling Tgt catalytic efficiency, which justifies the initiation of a new project with the objective to create Tgt inhibitors aimed at impeding homodimer formation. The serendipitous discovery of competitive Tgt inhibitors able to alter Tgt dimer interface organization is a promising starting point for this intention. In the present study, we investigated, by means of nanoESI-MS, the influence of several inhibitors on both Tgt dimer and Tgt:tRNA complex formation. While all of them were able to bind Tgt dimer with a 2:2 protein:ligand binding stoichiometry, no dimer dissociation could be observed, even for the inhibitors that are known to influence the architecture of the Tgt dimer interface (**1** and **3** in Table 1). However, competition experiments

revealed that each tested inhibitor is able to, at least partially, prevent the formation of the Tgt:tRNA complex, but can also disrupt the preformed protein:RNA complex. Inhibitors **1** and **3** constitute derivatives of a *lin*-benzoguanine skeletal structure substituted with an extended side chain at position 4. It is known from crystallographic analysis that the *lin*-benzoguanine moieties of both inhibitors occupy the guanine/preQ₁ binding pocket of Tgt, while their extended side chains reach the dimer interface region and influence its architecture. In future work, we plan to further enlarge the side chains of inhibitors **1** and **3** with the intention to disrupt the protein-protein interactions between the Tgt subunits more effectively. As soon as we have identified moieties that bind tightly to the dimer interface area and thus inhibit dimerization, we will try to omit the *lin*-benzoguanine skeleton. Following this strategy, we hope to reduce the problem of designing small molecule inhibitors aimed at disturbing a protein-protein interface lacking the defined cavity that is normally defined by the substrate-binding pockets of enzymes.

Materials and Methods

Cloning and Tgt preparation

The Lys52Met and Tyr330Phe mutations were introduced into the wild type *tgt* expression plasmid pET9d-ZM4 by means of the QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the vendor's protocol using Phusion-polymerase and *DpnI* by Fermentas (Lithuania). The primers used for the Lys52Met mutagenesis were Lys52Met-forward:

5'-GCAGCTACCGTAATGGCTTTAAAGCCGG-3'
and Lys52Met-reverse:

5'-CCGGCTTTAAAGCCATTACGGTAGCTGC-3'

while those used for the Tyr330Phe mutagenesis were Tyr330Phe-forward:

5'-GAAATGGAGCCGCGCCTTCATCCATCATTTA-ATTC-3'

and Tyr330Phe-reverse:

5'-GAATTAATGATGGATGAAGGCGCGGCTCCATTTC-3'

Sequencing of the entire mutated *tgt* gene (MWG Biotech, Ebersberg) confirmed the presence of the respective desired mutation as well as the absence of any further unwanted mutation. Subsequently, the mutated plasmid pET9d-ZM4-Lys52Met, or pET9d-ZM4-Tyr330Phe was transformed into *E. coli* BL21(DE3) GOLD cells. These cells were used for the preparation of the Tgt enzyme as described.³⁶

Preparation of tRNA^{Tyr}

Preparation of *E. coli* tRNA^{Tyr} (ECY2) *via in vitro* transcription was done using the RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) according to the vendor's protocol. Preparation of *in vitro* transcribed tRNA was followed by incubation with calf intestine alkaline phosphatase (Fermentas) following the vendor's protocol in order to ensure a consistent phosphorylation state of the tRNA 3'-end for nanoESI-MS experiments.

Determination of kinetic parameters

$K_M(\text{tRNA})$ as well as V_{\max} were determined for wild type Tgt, Tgt(Tyr330Phe) and Tgt(Lys52Met) as described,²¹ using 150 nM Tgt, 20 μM [8-³H]guanine, and various concentrations of *in vitro* transcribed tRNA^{Tyr} (0.25–15 μM). Initial velocities of the base exchange reaction in cts/min were converted to $\mu\text{mol/l}$ and minute using a calibration constant derived from liquid scintillation counting of [8-³H]guanine solutions with variable concentrations. Kinetic parameters were determined *via* double reciprocal linearization using the method of Eadie-Hostee and linear regression using GraFit‡.

Noncovalent nanoESI-MS experiments

Before the mass spectrometry experiments, proteins and tRNA were buffer exchanged against 1 M ammonium acetate pH 8.0 (adjusted with ammonia) using microcentrifuge gel-filtration columns (Zeba 0.5 mL, Thermo Scientific, Rockford, IL). Proteins and tRNA concentrations were determined spectrophotometrically.

Mass spectrometry experiments were done with an electrospray time-of-flight (ESI-TOF) mass spectrometer (LCT, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoESI source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY) operating in the positive ion mode. External calibration was performed with the multiply charged ions produced by 2 μM horse heart myoglobin diluted in 1:1 (v/v) water/acetonitrile acidified with 1% (v/v) formic acid. Molecular mass, integrity and homogeneity of wild type and mutant Tgt were first checked in denaturing conditions by diluting proteins to 2 μM in 1:1 (v/v) water/acetonitrile acidified with 1% (v/v) formic acid. The measured molecular mass of wild type Tgt (42,738.0 \pm 0.2 Da), Tgt(Tyr330Phe) (42,722.9 \pm 0.5 Da) and Tgt(Lys52Met) (42,740.4 \pm 0.5 Da) were found to be in good agreement with that calculated from the theoretical amino acid sequences without the N-terminal methionine (42,738.5 Da, 42,722.5 Da and 42,741.5 Da, respectively). The absence of the Tgt N-terminal methionine was confirmed by N-terminal sequencing of recombinant *Z. mobilis* Tgt.²⁹

Analysis in nondenaturing conditions was done in 500 mM ammonium acetate buffer at pH 8.0. Tgt:tRNA complex formation was investigated by incubating the protein at 10 μM monomer with increasing concentrations of tRNA (5–15 μM) for 5 min at room temperature. Regarding Tgt:inhibitor interaction, the protein and inhibitor concentrations were set to 10 μM monomer and 50 μM , respectively. Incubation was performed at room temperature for 30 min. Indirect competition experiments were designed in order to investigate the influence of inhibitor binding on Tgt:tRNA interactions. In a first series of experiments, Tgt (10 μM monomer) was incubated with 50 μM inhibitor for 30 min at room temperature followed by the addition of tRNA to 10 μM . This mixture was analyzed after incubation for 5 additional minutes. In a second series of experiments using identical concentrations and incubation conditions, Tgt was first incubated with tRNA and then with inhibitors.

Noncovalent mass spectrometry experiments require careful instrumental tuning to find the best compromise between ion desolvation/transmission through the mass spectrometer and preservation of weak

‡ GraFit; version 4.09. Erithacus Software Limited

noncovalent interactions in the gas phase.³⁷ In this study, instrumental optimization especially concerned the accelerating voltage applied on the sample cone (V_c) and the pressure in the first pumping stage of the mass spectrometer (P_i). While P_i was fixed to 6.0 mbar, V_c had to be increased from 60 V for protein:inhibitor complex analysis up to 150 V for protein:RNA complex detection. The values of P_i and V_c are reported in the figure legends. Data analysis was performed with MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK).

Crystal structure determination

Tgt(Lys52Met) crystals were produced in a two-step procedure. In the first step, microcrystals were grown *via* the hanging-drop, vapor-diffusion method. Droplets were prepared by mixing 2 μ L of protein solution (12 mg·mL⁻¹ Tgt(Lys52Met) in 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) with 2 μ L of reservoir solution (13% (w/v) PEG 8000, 100 mM Mes pH 5.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO). Microcrystals grew

within two weeks at 291 K in the presence of 1.0 mL of reservoir solution.

Subsequently, macroseeding was performed under similar conditions. Again, droplets were prepared by mixing 2 μ L of protein solution with 2 μ L of macroseeding reservoir solution (8% (w/v) PEG 8000, 100 mM Mes pH 5.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO). One microcrystal per droplet was transferred into this solution. Single crystals with a size of approximately 0.7 mm×0.7 mm×0.2 mm grew within four weeks.

For data collection, crystals were transferred for about 10 s into a solution containing glycerol as cryo-protectant (4% (w/v) PEG 8000, 50 mM Mes, pH 5.5, 0.5 mM DTT, 0.3 M NaCl, 2% (v/v) DMSO, 30% (v/v) glycerol) then flash-frozen directly in liquid nitrogen. A dataset was collected at BESSY beamline 14.1. The crystal exhibited monoclinic symmetry in space group C2 and contained one monomer per asymmetric unit. The unit cell dimensions are given in Table 3. Processing and scaling of the data were performed with the HKL2000 package (statistics are given in Table 3).³⁸

For an initial rigid-body refinement of the structure, the coordinates of Tgt apo-structure 1POE were used and a cycle of conjugate gradient energy minimization, simulated annealing, and B-factor refinement using the CNS program package, was done.³⁹

Further refinement cycles were made with the program SHELXL based on the high resolution of the data.⁴⁰ Here, at least 20 cycles of conjugate gradient minimization were done with default restraints on bonding geometry and B-values: 5% of all data were used for the calculation of R_{free} . Amino acid side-chains were fit to σA -weighted $|F_o| - |F_c|$ and $2|F_o| - |F_c|$ electron density maps using Coot.⁴¹ Subsequently, water and glycerol molecules were located and included in further refinement cycles. In the last refinement, riding H atoms were introduced for the protein residues without using additional parameters.

Protein Data Bank accession code

Protein Data Bank (PDB) accession code 3HFY was allocated to the Tgt(Lys52Met) structure determined in this work.

Table 3. Crystal data and statistics

Crystal data	
PDB code	3HFY
<i>A. Data collection and processing</i>	
No. crystals used	1
Wavelength (Å)	0.91841
Space group	C2
Unit cell parameters	
<i>a</i> (Å)	84.6
<i>b</i> (Å)	65.1
<i>c</i> (Å)	71.6
β (deg.)	93.7
<i>B. Diffraction data</i>	
Resolution range (Å)	50–2.0 (2.0–2.03)
Unique reflections	26,320 (1301)
$R(I)_{\text{sym}}$ (%) ^a	9.2 (40.0)
Completeness (%)	99.2 (99.0)
Redundancy	4.2 (4.0)
$I/\sigma(I)$	16.3 (3.9)
<i>C. Refinement</i>	
Program used for refinement	SHELXL
Resolution range (Å)	10–2.0
Reflections used in refinement	25,041
Final R values	
R_{free} (F_o ; $F_o > 4\sigma$) ^c	27.8 (25.6)
R_{work} (F_o ; $F_o > 4\sigma$) ^b	20.4 (19.0)
No. atoms (non-hydrogen)	
Protein atoms	2620
Water molecules	99
RMSD from ideality	
Bond angles (deg.)	1.7
Bond lengths (Å)	0.007
Ramachandran plot	
Most favoured regions (%)	94.3
Additionally allowed regions (%)	5.4
Generously allowed regions (%)	0.3
Mean B-factors (Å ²)	
Protein atoms	25.1
Water molecules	29.2

Values in parentheses are statistics for the highest resolution shell. The Ramachandran values were obtained with PROCHECK.

^a $R(I)_{\text{sym}} = [\sum_i \sum_j |I_i(h) - I_j(h)| / \sum_i \sum_j I_i(h)] \times 100$, where $I(h)$ is the mean of the $I(h)$ observation of reflection h .

^b $R_{\text{work}} = \sum_{kl} |F_o - F_c| / \sum_{kl} |F_o|$.

^c R_{free} was calculated as for R_{work} but with 5% of the data excluded from refinement.

Acknowledgements

This work was funded by the CNRS, the University of Strasbourg UDS, the region Alsace. C.A. was supported by a studentship from the French Ministère de la Recherche. We thank Steffi Dörr (University of Marburg, Marburg, Germany) for the expression and purification of Tgt. We acknowledge support and travel grants from the beam-line staff at the Protein Structure Factory, BESSY II, Berlin, Germany and the German Minister of Science and Technology (BMBF).

Supplementary Data

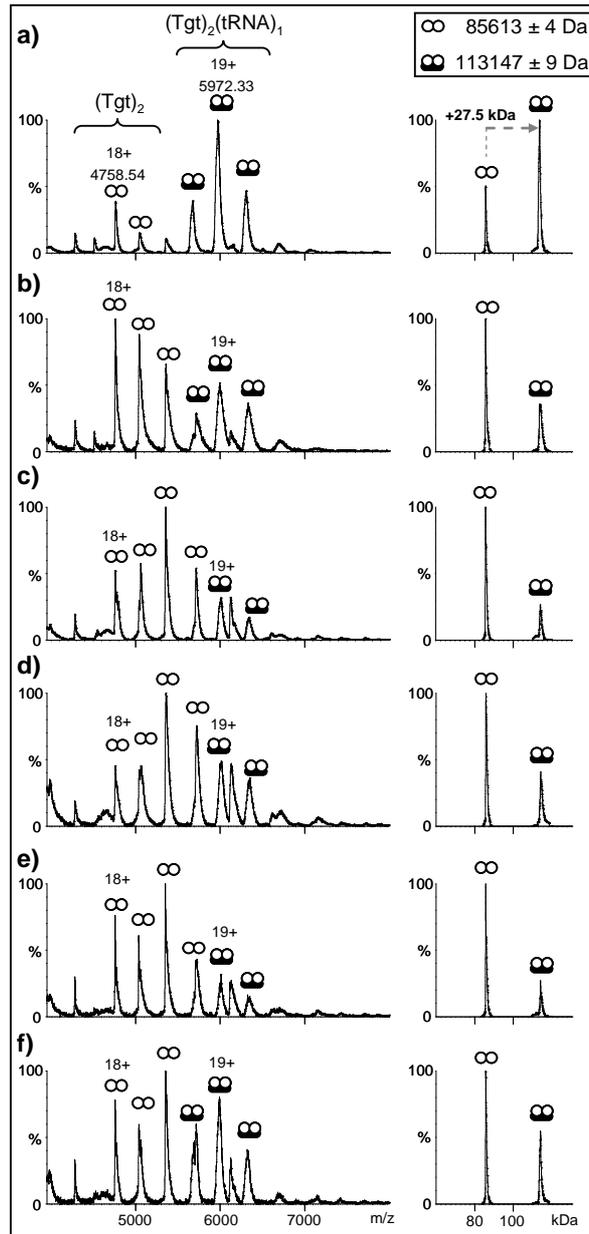
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jmb.2009.07.040](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.040)

References

- Sansonetti, P. J. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G319–G323.
- Kotloff, K., Winickoff, J., Ivanoff, B., Clemens, J., Swerdlow, D., Sansonetti, P. *et al.* (1999). Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. W.H.O.* 651–666.
- Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E. & Bjork, G. R. (2000). Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of Shigella flexneri: the expression of the virF gene. *Mol. Microbiol.* **35**, 924–935.
- Van Lanen, S. G., Reader, J. S., Swairjo, M. A., de Crecy-Lagard, V., Lee, B. & Iwata-Reuyl, D. (2005). From cyclohydrolase to oxidoreductase: discovery of nitrile reductase activity in a common fold. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 4264–4269.
- Kuchino, Y., Kasai, H., Nihei, K. & Nishimura, S. (1976). Biosynthesis of the modified nucleoside Q in transfer RNA. *Nucleic Acids Res.* **3**, 393–398.
- Reader, J. S., Metzgar, D., Schimmel, P. & de Crecy-Lagard, V. (2004). Identification of four genes necessary for biosynthesis of the modified nucleoside queuosine. *J. Biol. Chem.* **279**, 6280–6285.
- Gaur, R. & Varshney, U. (2005). Genetic analysis identifies a function for the queC (ybaX) gene product at an initial step in the queuosine biosynthetic pathway in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **187**, 6893–68901.
- Kinzie, S. D., Thern, B. & Iwata-Reuyl, D. (2000). Mechanistic studies of the tRNA-modifying enzyme QueA: a chemical imperative for the use of AdoMet as a “ribosyl” donor. *Org. Lett.* **2**, 1307–1310.
- Grimm, C., Ficner, R., Sgraja, T., Haebel, P., Klebe, G. & Reuter, K. (2006). Crystal structure of Bacillus subtilis S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 695–701.
- Iwata-Reuyl, D. (2003). Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. *Bioorg. Chem.* **31**, 24–43.
- Blaise, M., Becker, H. D., Keith, G., Cambillau, C., Lapointe, J., Giege, R. & Kern, D. (2004). A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2768–2775.
- Campanacci, V., Dubois, D. Y., Becker, H. D., Kern, D., Spinelli, S., Valencia, C. *et al.* (2004). The Escherichia coli YadB gene product reveals a novel aminoacyl-tRNA synthetase like activity. *J. Mol. Biol.* **337**, 273–283.
- Dubois, D. Y., Blaise, M., Becker, H. D., Campanacci, V., Keith, G., Giege, R. *et al.* (2004). An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by the Escherichia coli yadB gene glutamylates specifically tRNA^{Asp}. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 7530–7535.
- Salazar, J. C., Ambrogelly, A., Crain, P. F., McCloskey, J. A. & Soll, D. (2004). A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 7536–7541.
- Goodenough-Lashua, D. & Garcia, G. (2003). tRNA-guanine transglycosylase from E. coli: a ping-pong kinetic mechanism is consistent with nucleophilic catalysis. *Bioorg. Chem.* **31**, 331–344.
- Tidten, N., Stengl, B., Heine, A., Garcia, G. A., Klebe, G. & Reuter, K. (2007). Glutamate versus glutamine exchange swaps substrate selectivity in tRNA-guanine transglycosylase: insight into the regulation of substrate selectivity by kinetic and crystallographic studies. *J. Mol. Biol.* **374**, 764–776.
- Hurt, J. K., Olgen, S. & Garcia, G. A. (2007). Site-specific modification of Shigella flexneri virF mRNA by tRNA-guanine transglycosylase in vitro. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4905–4913.
- Grädler, U., Gerber, H. D., Goodenough-Lashua, D. M., Garcia, G. A., Ficner, R., Reuter, K. *et al.* (2001). A new target for shigellosis: rational design and crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase. *J. Mol. Biol.* **306**, 455–467.
- Brenk, R., Naerum, L., Grädler, U., Gerber, H. D., Garcia, G. A., Reuter, K. *et al.* (2003). Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. *J. Med. Chem.* **46**, 1133–1143.
- Brenk, R., Meyer, E. A., Reuter, K., Stubbs, M. T., Garcia, G. A., Diederich, F. & Klebe, G. (2004). Crystallographic study of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase suggests a new structure-based pharmacophore for virtual screening. *J. Mol. Biol.* **338**, 55–75.
- Meyer, E., Donati, N., Guillot, M., Schweizer, B., Diederich, F., Stengl, B. *et al.* (2006). Synthesis, biological evaluation, and crystallographic studies of extended guanine-based (lin-benzoguanine) inhibitors for tRNA-guanine transglycosylase (TGT). *Helv. Chim. Acta*, **89**, 573–597.
- Hortner, S. R., Ritschel, T., Stengl, B., Kramer, C., Schweizer, W. B., Wagner, B. *et al.* (2007). Potent inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase, an enzyme linked to the pathogenicity of the Shigella bacterium: charge-assisted hydrogen bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8266–8269.
- Stengl, B., Meyer, E., Heine, A., Brenk, R., Diederich, F. & Klebe, G. (2007). Crystal structures of tRNA-guanine transglycosylase (TGT) in complex with novel and potent inhibitors unravel pronounced induced-fit adaptations and suggest dimer formation upon substrate binding. *J. Mol. Biol.* **370**, 492–511.
- Ritschel, T., Hoertner, S., Heine, A., Diederich, F. & Klebe, G., (in press). Crystal structure analysis and in silico pK(a) calculations suggest strong pK(a) shifts of ligands as driving force for high-affinity binding to TGT. *ChemBiochem.* **10**, 716–727.
- Brenk, R., Stubbs, M. T., Heine, A., Reuter, K. & Klebe, G. (2003). Flexible adaptations in the structure of the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase and their implications for substrate selectivity, reaction mechanism and structure-based drug design. *ChemBiochem*, **4**, 1066–1077.
- Okada, N. & Nishimura, S. (1979). Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **254**, 3061–3066.
- Nakanishi, S., Ueda, T., Hori, H., Yamazaki, N., Okada, N. & Watanabe, K. (1994). A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by Escherichia coli tRNA-guanine transglycosylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32221–32225.
- Garcia, G. A., Koch, K. A. & Chong, S. (1993). tRNA-guanine transglycosylase from Escherichia coli. Overexpression, purification and quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **231**, 489–497.

29. Reuter, K. & Ficner, R. (1995). Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* tgt gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **177**, 5284–5288.
30. Xie, W., Liu, X. & Huang, R. H. (2003). Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 781–788.
31. Gordiyenko, Y. & Robinson, C. V. (2008). The emerging role of MS in structure elucidation of protein-nucleic acid complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 723–731.
32. Heck, A. J. & Van Den Heuvel, R. H. (2004). Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.* **23**, 368–389.
33. Sanglier, S., Leize, E., Van Dorsselaer, A. & Zal, F. (2003). 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.* **14**, 419–429.
34. Barraud, P., Golinelli-Pimpaneau, B., Atmanene, C., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Droogmans, L. *et al.* (2008). Crystal structure of *Thermus thermophilus* tRNA m1A58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA. *J. Mol. Biol.* **377**, 535–550.
35. Ritschel, T. (2009). Structure based drug design and X-ray crystallography for the development of high affine inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase PhD thesis, Philipps-University, Marburg.
36. Romier, C., Ficner, R., Reuter, K. & Suck, D. (1996). Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **24**, 516–519.
37. Sanglier, S., Atmanene, C., Chevreux, G. & Van Dorsselaer, A. (2008). Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. *Methods Mol. Biol.* **484**, 217–243.
38. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
39. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. D*, **54**, 905–921.
40. Sheldrick, G. M. & Schneider, T. R. (1997). SHELXL: high-resolution refinement. *Methods Enzymol.* **277**, 319–343.
41. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D*, **60**, 2126–2132.

Supplementary Data



Investigation of inhibitor ability to disrupt pre-formed Tgt : tRNA complex. Tgt (10 μ M) was pre-incubated with tRNA (10 μ M) and was subsequently analysed either (a) without inhibitor or (b-f) after addition of 50 μ M of inhibitor (b) **1**, (c) **2**, (d) **3**, (e) **4** and (f) **5**. Mass spectra in the right-hand column were deconvoluted with the Transform algorithm from MassLynx 4.0. (∞) and (\ominus) are respectively related to dimeric Tgt and the 2:1 Tgt : tRNA complex. Vc = 150 V, Pi = 6 mbar.

CHAPITRE III

Reconstitution in vitro de Complexes Ribonucléoprotéiques à Boîte H/ACA : Etude des Réseaux d'Interactions Protéine / ARN par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire

Ce chapitre est consacré à l'étude de complexes ribonucléoprotéiques par MS supramoléculaire, un projet mené en collaboration avec l'équipe du Dr Christiane Branlant (Laboratoire ARN-RNP, structure-fonction-maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale (AREMS), Nancy). Dans ce travail la MS supramoléculaire permet de suivre la reconstitution progressive d'un édifice biologique contenant plusieurs protéines et ARN afin d'étudier le réseau d'interactions entre les différents partenaires du complexe.

1) CONTEXTE DE L'ETUDE

Dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressés à des protéines capables à elles seules de reconnaître des ARN et de catalyser la modification d'une base spécifique. Dans l'étude présente, nous avons souhaité étudier un système plus complexe où la modification d'un ARN cible est catalysée non pas par une unique protéine mais par un édifice supramoléculaire constitué d'un ARN guide et de différentes protéines : le complexe ribonucléoprotéique (RNP) à boîte H/ACA. Ce complexe intervient dans la modification de différents types d'ARN et en particulier des ARN ribosomiques dont il modifie une uridine en pseudouridine (figure 1).



Figure 1 : Réaction de pseudouridylation catalysée par le complexe RNP à boîte H/ACA.

La conversion des uridines (U) en pseudouridines (Ψ) est l'une des modifications post-transcriptionnelles les plus fréquemment rencontrées au sein des ARN,²⁷ et a probablement pour rôle de stabiliser la structure tridimensionnelle de ces biomolécules.^{28, 29} Les enzymes capables de catalyser cette réaction sont appelées Ψ -synthases et peuvent fonctionner, soit seules, soit au sein du complexe RNP à boîte H/ACA.²⁸ Ce complexe qui est constitué de quatre protéines et d'un ARN guide a fait l'objet de nombreuses études cristallographiques ayant permis d'obtenir la structure tridimensionnelle de plusieurs sous-complexes.³⁰⁻³⁵ Ce n'est que très récemment que la structure du complexe entier comprenant également l'ARN cible a pu être résolue.³⁶ La figure 2 représente l'organisation schématique du complexe.

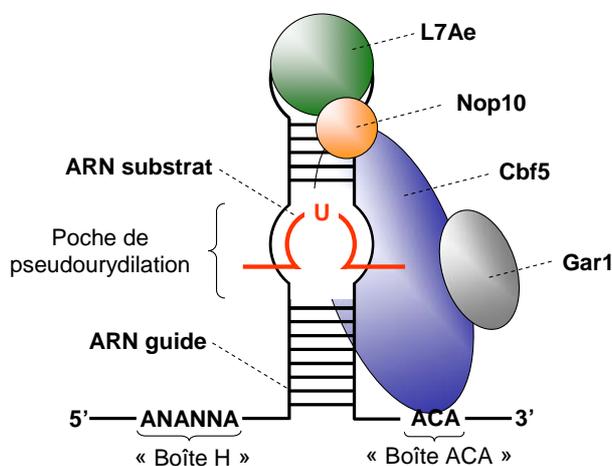


Figure 2 : Organisation schématique du complexe RNP à boîte H/ACA, d'après³⁷.

Dans ce complexe, la protéine Cbf5 est la Ψ -synthase responsable de la réaction de pseudouridylation de l'ARN cible, tandis que les protéines L7Ae, Nop10 et Gar1 permettent d'accentuer l'activité catalytique du complexe en participant notamment pour cela au positionnement de l'ARN cible au sein de l'édifice supramoléculaire.^{30, 38-40} L'ARN guide, quant à lui, présente une structure dite en « tige-boucle » caractérisée par la présence du côté 5' d'une séquence ANANNA (ou N désigne n'importe quel nucléotide), appelée « **boîte H** », ainsi que de la séquence ACA, appelée « **boîte ACA** » et localisée du côté 3' de la séquence nucléotidique.³⁷ L'ARN guide dispose également d'une boucle interne appelée « **poche de pseudouridylation** » permettant de reconnaître spécifiquement la séquence nucléotidique de l'ARN cible.

Durant ce travail de thèse, nous avons souhaité étudier ce système par MS supramoléculaire en collaboration avec l'équipe du Dr Christiane Branlant (Laboratoire ARN-RNP, structure-fonction-maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale (AREMS), Nancy). En effet, la disponibilité d'informations structurales détaillées en fait un « système modèle » permettant d'évaluer le potentiel de la MS supramoléculaire pour la reconstitution de complexes RNP et l'obtention d'informations sur le réseau d'interactions existant entre les différents partenaires de tels édifices biologiques. Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en binôme avec le Dr Jean-Michel Saliou, post-doctorant au sein du laboratoire.

2) RESULTATS DE L'ETUDE

2.1) Description de la stratégie expérimentale mise en œuvre

La stratégie expérimentale mise en œuvre dans cette étude est représentée sur la figure 3. Après l'étape de préparation des échantillons, les différents partenaires sont tout d'abord analysés individuellement. Puis en mettant à profit les possibilités d'automatisation des expériences nanoESI-MS sur puce microfluidique, il est possible d'incuber les partenaires en testant les différentes combinaisons permettant d'accéder au réseau d'interactions du complexe RNP à boîte H/ACA.

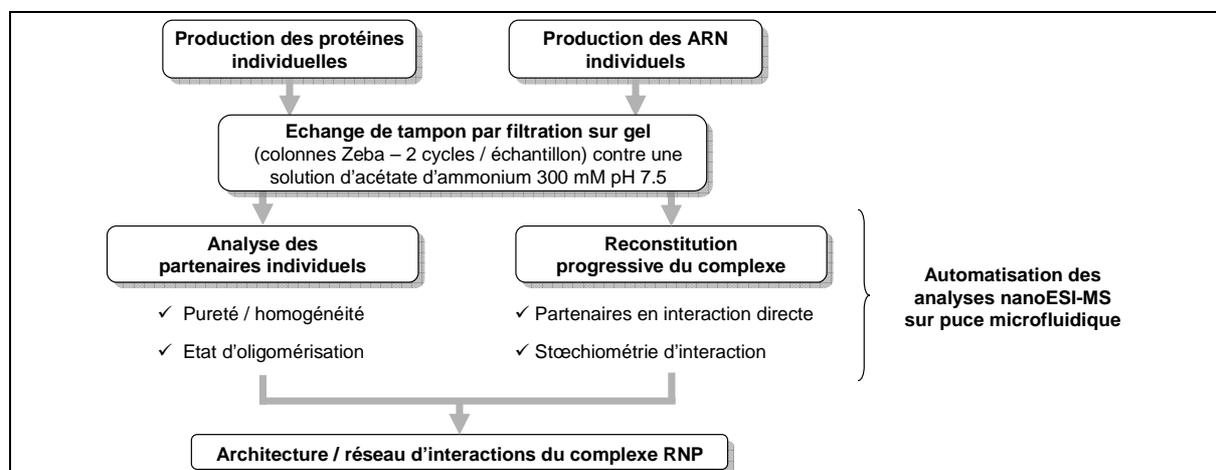


Figure 3 : Description de la stratégie expérimentale mise en œuvre pour l'étude du réseau d'interactions du complexe RNP à boîte H/ACA.

2.2) Analyse des protéines individuelles

Les protéines recombinantes L7Ae, Cbf5, Nop10 et Gar1 de *Pyrococcus abyssi* ont été produites individuellement dans *Escherichia coli*. Seules les protéines Cbf5 et Nop10 ont ensuite été mélangées en proportions équimolaires car Nop10 seule est peu stable lors de la conservation. Ces protéines ont donc tout d'abord été analysées en **conditions dénaturantes** afin de vérifier leur **masse moléculaire** ainsi que leur **homogénéité**. Les masses mesurées dans ces conditions sont en bon accord avec les masses théoriques déduites des séquences en acides aminés correspondantes (tableau 1). Concernant l'homogénéité des différents échantillons, seule la protéine L7Ae présente des produits de dégradation très minoritaires également visibles sur les spectres de masse nanoESI acquis en conditions non-dénaturantes (figure 5a).

	$M_{\text{théorique}}$ (Da)	$M_{\text{mesurée}}$ (Da)
L7Ae	13422.6	13422.7 ± 0.1
Gar1	11363.5	11363.5 ± 0.1
Cbf5	38139.6	38140.5 ± 0.1
Nop10	7485.8	7485.8 ± 0.1

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des masses mesurées en conditions dénaturantes pour les différentes protéines constitutives du complexe RNP à boîte H/ACA.

Ensuite, les différentes protéines ont été analysées en **conditions non-dénaturantes** afin de déterminer leur **état d'oligomérisation**. Alors que les protéines L7Ae (figure 5a) et Gar1 (figure 5b) sont présentes en solution sous forme monomérique, la masse mesurée dans le cas du mélange Cbf5 et Nop10 révèle la formation d'un hétérodimère ayant fixé un ion zinc ($M_{\text{théorique}} = 45689$ Da – figure 5g), fournissant ainsi une première information d'interaction directe entre ces deux protéines en accord avec les résultats de cristallographie.³⁴

2.3) Analyse des ARN individuels

Il existe différents ARN guides, tous capables de recruter les protéines nécessaires pour former un complexe RNP à boîte H/ACA. **Chaque ARN guide fixe la spécificité de reconnaissance de l'ARN cible, permettant aux quatre mêmes protéines d'intervenir dans la modification de nombreux ARN.** Dans la présente étude, ce sont l'ARN guide Pab91 et l'ARN cible taPab91 qui ont été sélectionnés. Alors que l'ARN cible (13 nucléotides) a été synthétisé par voie chimique, l'ARN guide, plus grand (57 nucléotides), a été produit par transcription *in vitro* à l'aide d'un plasmide linéarisé, risquant ainsi l'introduction d'une hétérogénéité au niveau de la séquence nucléotidique en 3' (cf. Chapitre I, 2.3). Ainsi, les deux ARN ont premièrement été analysés seuls afin de vérifier leur **masse moléculaire** et leur **homogénéité**. Les spectres de masse acquis en mode d'ionisation positif dans des conditions non-dénaturantes sont représentés sur la figure 4. De manière intéressante, on note que l'ARN cible taPab91 présente une bonne homogénéité, tandis que l'ARN guide Pab91 affiche une importante hétérogénéité liée au nombre de nucléotides (tableau 2). Alors que cette hétérogénéité donne lieu à des spectres de masse potentiellement plus compliqués à interpréter, elle peut

également être à l'origine des problèmes de cristallisation rencontrés par nos collaborateurs. Suite à ces mesures de masse, des modifications du protocole de production de l'ARN guide ont été envisagées par nos collaborateurs et sont actuellement en cours de réalisation.

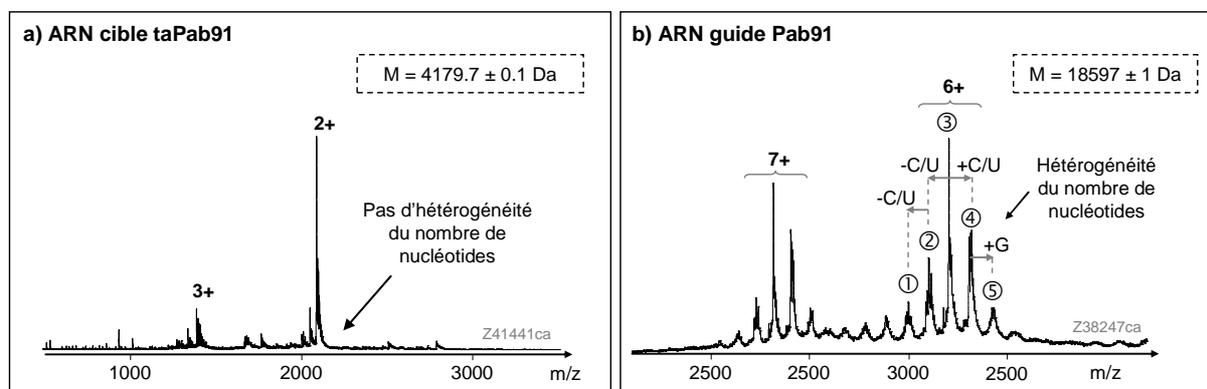


Figure 4 : Analyse des ARN guide et cible en conditions non-dénaturantes. (a) L'ARN cible taPab91 et (b) l'ARN guide Pab91 ont été dilués à 10 μ M dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5. (b) La masse affichée correspond à celle de l'espèce majoritaire. $V_{\text{ESI}} = 1,7$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,6$ psi ; $V_c = 120$ V ; $P_i = 6$ mbar.

Les différentes masses mesurées sur ces spectres de masse sont résumées dans le tableau 2. Alors que l'ajout des nucléotides supplémentaires C/U et G à l'ARN guide Pab91 est sans doute liée à la méthode de production, la perte des nucléotides C/U correspond fort probablement à une dégradation de l'ARN du côté 3' dont la séquence commence justement par deux cytosines.

	$M_{\text{théorique}}$ (Da)	$M_{\text{mesurée}}$ (Da)	ΔM (Da)	Remarques
taPab91	4179.6	4179.7 ± 0.1	+ 0.1	/
		17986 ± 1	-611	Perte de 2 x C/U
		18293 ± 1	-304	Perte de C/U
Pab91	18597	18597 ± 1	0	/
		18903 ± 1	+ 306	Ajout de C/U
		19249 ± 1	+ 652	Ajout de C/U + G

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des masses mesurées en conditions non-dénaturantes pour l'ARN cible taPab91 et l'ARN guide Pab91. $\Delta M = M_{\text{mesurée}} - M_{\text{théorique}}$.

NB : Pour des raisons de simplicité, seules les masses des complexes formés avec la forme majoritaire de l'ARN (18597 ± 1 Da) seront rapportées dans la suite du manuscrit.

2.4) Reconstitution du complexe – étude du réseau d'interactions

Afin d'établir le réseau d'interactions entre les différents partenaires du complexe, l'édifice supramoléculaire a été progressivement reconstitué en incubant les protéines et ARN selon différentes combinaisons et selon différents rapports stœchiométriques afin de déterminer (i) quels

sont les partenaires capables d'interagir directement ensemble et (ii) quelle est la stœchiométrie d'interaction de chacun des complexes formés.

2.4.1) Interactions entre l'ARN guide et les protéines individuelles

L'ARN guide a été incubé tour-à-tour avec les différentes protéines dans des conditions non-dénaturantes. Alors que dans le cas de la protéine L7Ae, la formation d'un complexe protéine / ARN de stœchiométrie 1:1 est observée (figure 5a-c), aucune interaction directe n'est détectée entre Gar1 et l'ARN guide Pab91 (figure 5d-f). Concernant le complexe Cbf5 / Nop10, le spectre de masse de la figure 4i indique la formation d'un complexe Cbf5 / Nop10 / Pab91 de stœchiométrie 1:1:1. Des résultats identiques ont été obtenus en présence d'un excès de protéine ou d'ARN confirmant ainsi les stœchiométries unitaires observées sur les spectres de masse de la figure 5, ainsi que la spécificité des complexes détectés.

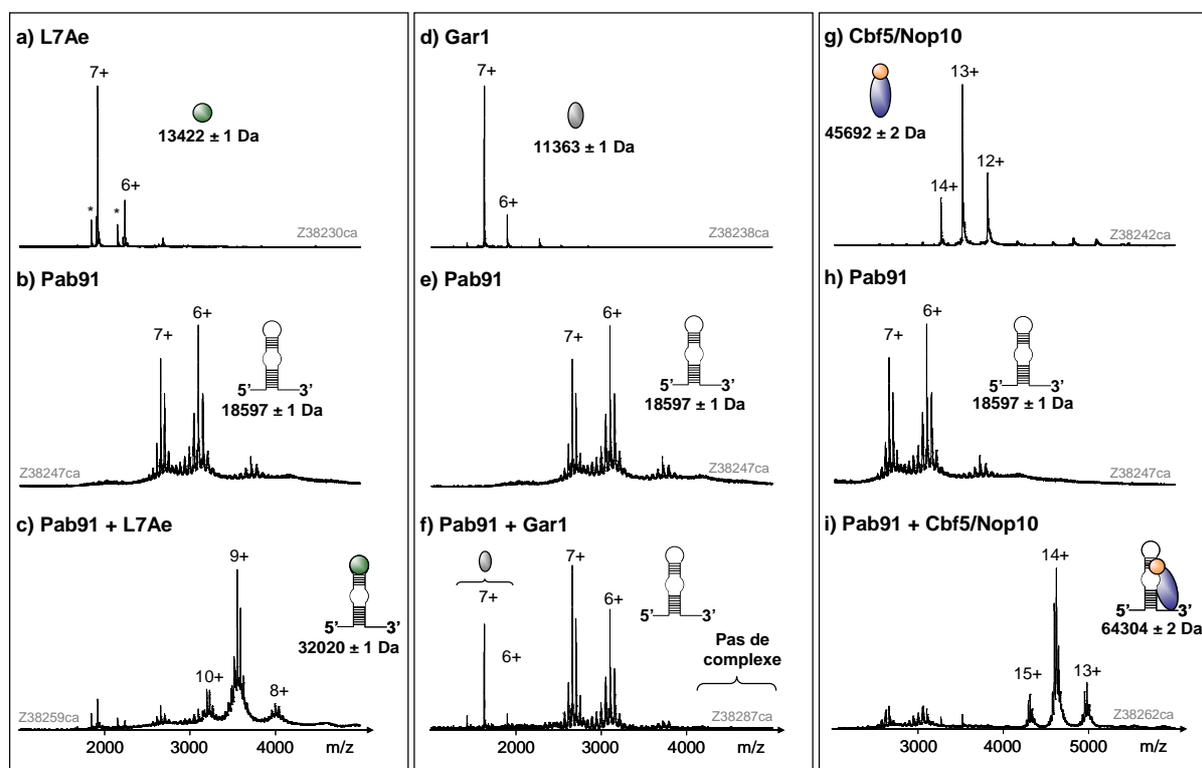


Figure 5 : Tests d'interaction entre l'ARN guide Pab91 et les différentes protéines. Les protéines (a) L7Ae, (d) Gar1, (g) le complexe Cbf5 / Nop10 ainsi que (b, e, h) l'ARN guide Pab91 ont été analysés à 10 μ M dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5. (c, f, i) Analyse de l'ARN guide Pab91 à 10 μ M en présence de 10 μ M (c) de L7Ae, (f) de Gar1, (i) de complexe Cbf5 / Nop10. * produit de dégradation de la protéine L7Ae. $V_{\text{ESI}} = 1,7$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,6$ psi ; $V_c = 120$ V ; $P_i = 6$ mbar.

2.4.2) Interactions entre protéines

Afin de déterminer si les différents partenaires protéiques sont capables d'interagir ensemble en absence d'ARN guide, le complexe Cbf5 / Nop10 a été incubé avec les protéines L7Ae et Gar1 séparément puis ensemble. Tandis que L7Ae n'interagit pas de manière directe avec Cbf5 / Nop10 en

absence d'ARN guide (figure 6a), Gar1 forme un complexe Cbf5 / Nop10 / Gar1 de stœchiométrie 1:1:1 en accord avec les résultats de cristallographie (figure 6b).³² De plus, le spectre de masse de la figure 6c indique que L7Ae n'interagit pas non plus avec le complexe Cbf5 / Nop10 / Gar1.

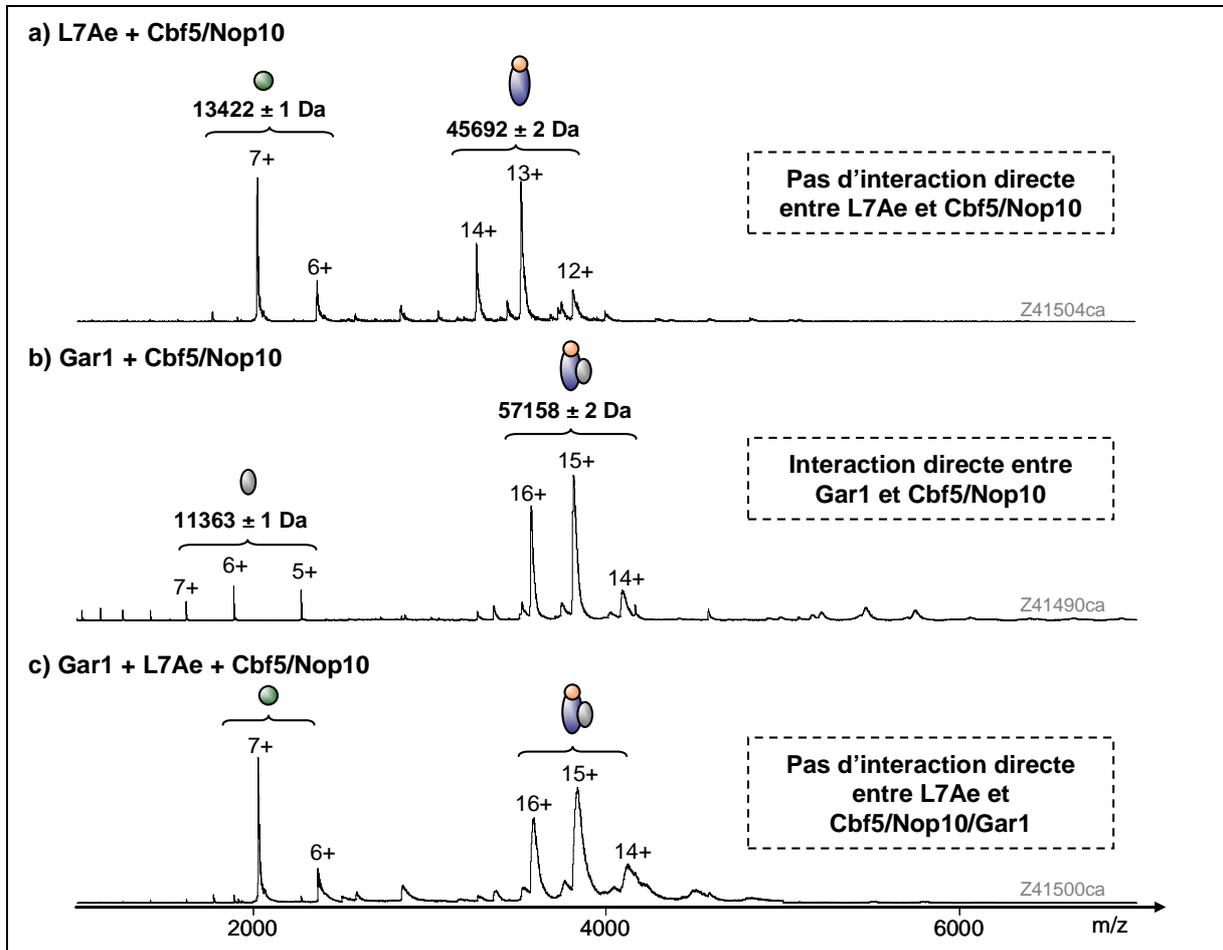


Figure 6 : Test d'interaction entre les différentes protéines en absence d'ARN. Le complexe Cbf5 / Nop10 (10 μ M) a été incubé en présence de (a) L7Ae (10 μ M), (b) Gar1 (10 μ M) et (c) L7Ae et Gar1 (10 μ M chacune). (a) Agrandissements ($\times 2$) de l'intervalle de rapports m/z 2500-4000. (c) Agrandissements ($\times 4$) de l'intervalle de rapports m/z 2500-5000. $V_{ESI} = 1,7$ kV ; $P_{ESI} = 0,6$ psi ; $V_c = 80$ V ; $P_i = 6$ mbar.

NB : Des stœchiométries d'interaction identiques ont été déterminées en présence d'un excès de l'un ou l'autre des partenaires et cela quel que soit l'ordre d'incubation des protéines dans le cas du mélange quaternaire (figure 6c).

2.4.3) Interaction entre l'ARN guide et l'ARN cible

Dans l'objectif de vérifier l'existence d'une interaction directe entre les ARN, l'ARN guide Pab91 et sa cible taPab91 ont été incubés et analysés en conditions non-dénaturantes, révélant ainsi la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1 (figure 7c). Afin de s'assurer de la spécificité de ce complexe, une expérience similaire a été réalisée en remplaçant l'ARN guide Pab91 par l'ARN guide Pab21 servant de contrôle négatif. Le spectre de masse de la figure 7f indique l'absence de complexe, confirmant ainsi la spécificité de reconnaissance de l'ARN cible taPab91 par l'ARN guide Pab91. Ces

résultats sont en accord avec ceux de cristallographie montrant la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:1 par appariement de bases entre l'ARN guide et l'ARN cible.^{41, 42}

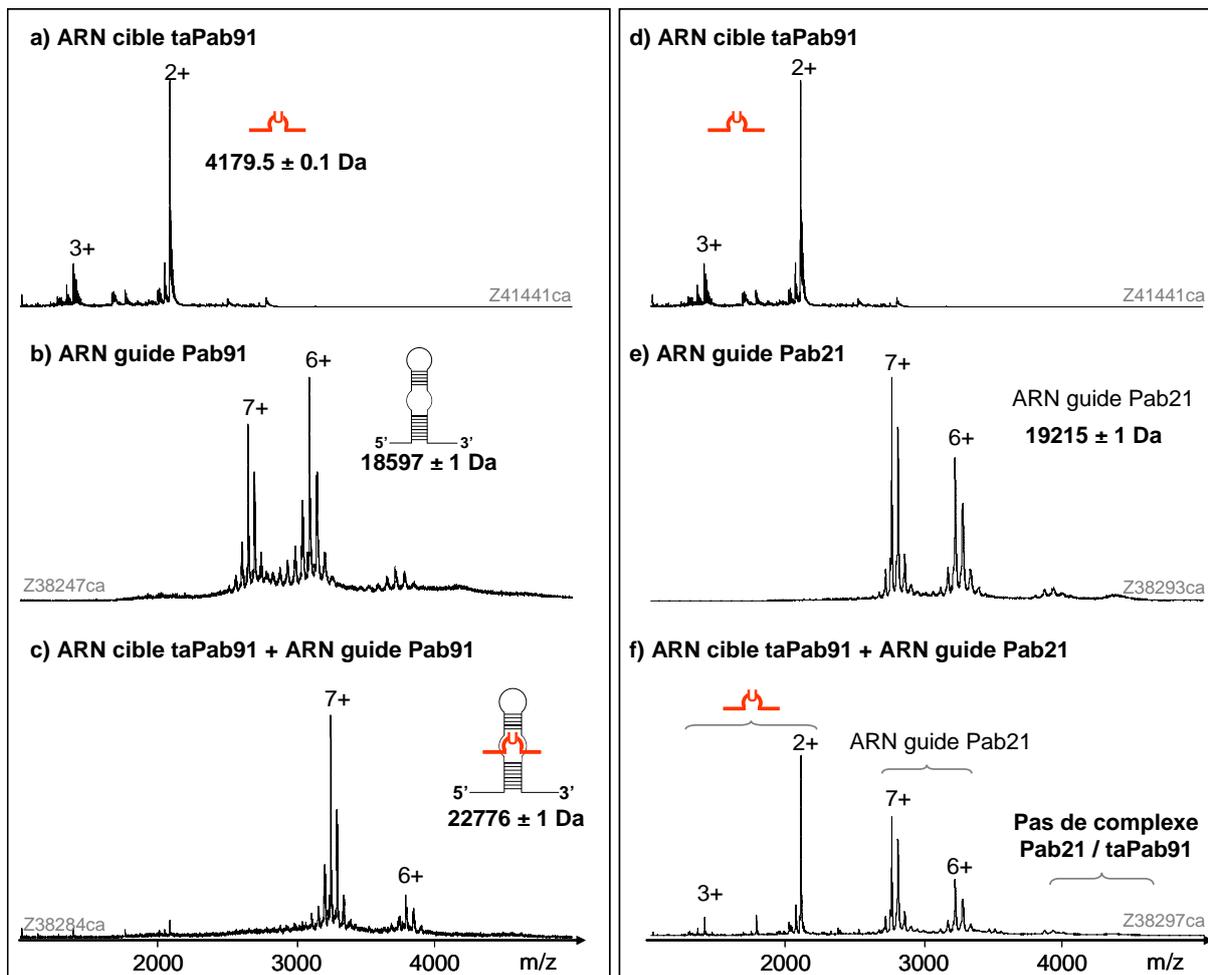


Figure 7 : (a-c) Test d'interaction entre l'ARN guide Pab91 et l'ARN cible taPab91. (d-f) Test d'interaction entre l'ARN guide Pab21 et l'ARN cible taPab91. (a-f) La concentration de chaque ARN a été fixée à 10 μ M dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5. $V_{\text{ESI}} = 1,7$ kV ; $P_{\text{ESI}} = 0,6$ psi ; $V_c = 120$ V ; $P_i = 6$ mbar.

2.4.4) Reconstitution du complexe entier

Plusieurs essais ont été réalisés afin de reconstituer le complexe entier contenant les quatre protéines et les deux ARN, en variant pour cela les concentrations et l'ordre d'incubation des partenaires ainsi que les temps et températures d'incubation. Cependant aucune de ces tentatives n'a permis d'obtenir des signaux exploitables. En effet, il a été constaté que l'ajout de la protéine Gar1 s'accompagne de manière inexplicable d'une suppression du signal sur les spectres de masse, et cela quel que soit l'ordre d'incubation de la protéine. Une précipitation du complexe ou la formation d'agrégats est potentiellement à envisager. Ces observations sont éventuellement à mettre en relation avec le rôle mal défini de cette protéine au sein du complexe, ainsi que son comportement qualifié « d'intrigant » dans la littérature.⁴⁰ La question du rôle exact de Gar1 reste ainsi ouverte pour de futures investigations.

Ainsi, la reconstitution progressive du complexe a été réalisée avec l'ARN guide Pab91, l'ARN cible taPab91 ainsi que les protéines L7Ae, Cbf5 et Nop10. Quel que soit l'ordre d'incubation de ces partenaires, le complexe contenant un exemplaire de chacune de ces biomolécules a pu être reconstitué comme illustré sur la figure 8.

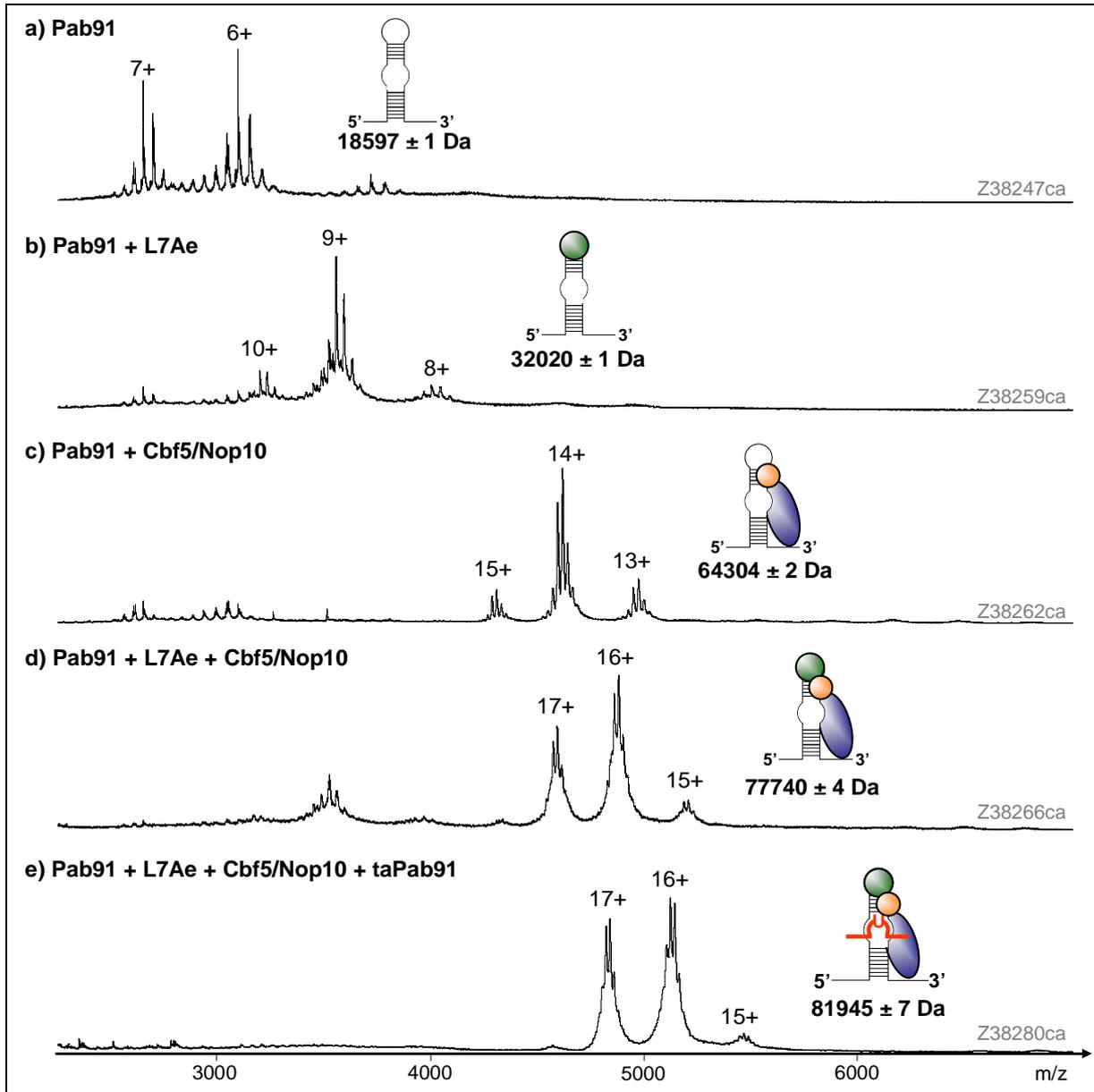


Figure 8 : Reconstitution progressive du complexe RNP à boîte H/ACA. Les ARN et les différentes protéines ont été incubés à $10 \mu\text{M}$ dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH $7,5$. $V_{\text{ESI}} = 1,7 \text{ kV}$; $P_{\text{ESI}} = 0,6 \text{ psi}$; $V_c = 120 \text{ V}$; $P_i = 6 \text{ mbar}$.

Finalement, une dernière expérience a été réalisée en incubant l'ARN cible taPab91 en présence de la protéine L7Ae et du complexe Cbf5 / Nop10. Le spectre de masse de la figure 9 indique qu'aucun complexe protéine / ARN cible n'est formé, confirmant ainsi le rôle de « charpente » de l'ARN guide Pab91 sur lequel viennent se greffer les différents partenaires du complexe RNP à boîte H/ACA, permettant ainsi à la réaction de pseudouridylation de l'ARN cible d'avoir lieu.

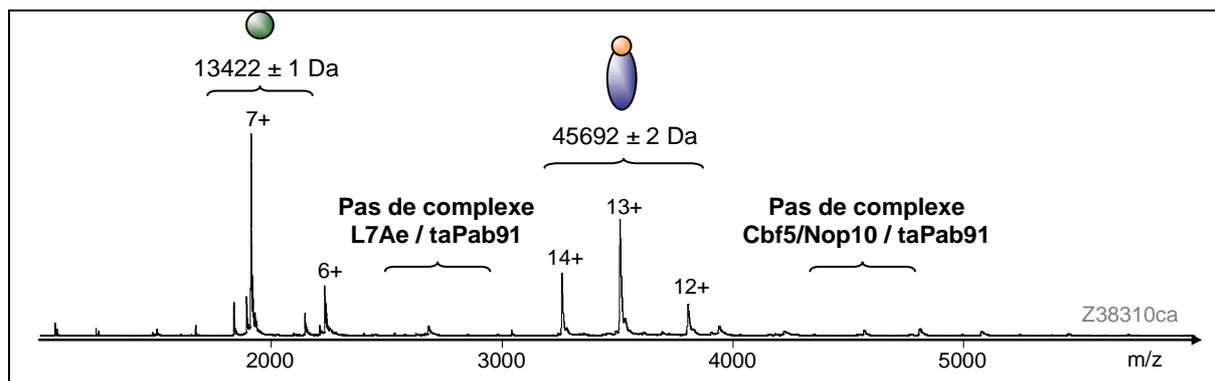


Figure 9 : Test d'interaction entre l'ARN cible taPab91 (10 μ M), la protéine L7Ae (10 μ M) et le complexe Cbf5 / Nop10 (10 μ M). Un phénomène de compétition entre les différents analytes au moment de l'ionisation nanoESI est probablement à l'origine de l'absence de signal d'ARN. $V_{ESI} = 1,7$ kV ; $P_{ESI} = 0,6$ psi ; $V_c = 120$ V ; $P_i = 6$ mbar.

2.5) Bilan et discussion des résultats

En combinant les résultats des différentes expériences de MS supramoléculaire il est possible d'établir le réseau d'interactions de la figure 10a et de le comparer avec les résultats de techniques orthogonales. En effet, l'organisation fonctionnelle du complexe RNP à boîte H/ACA a fait l'objet de nombreuses études faisant notamment appel à des techniques comme le retard sur gel,^{38, 39} ou la cristallographie.^{30-34, 36} La confrontation de ces résultats avec ceux de MS supramoléculaire met en avant les points d'accord suivants :

- ▶ **Cbf5 / Nop10** et **L7Ae** sont capables d'interagir **directement** et **indépendamment** avec l'**ARN guide** contrairement à la protéine Gar1 (cf. 2.4.1).^{38, 39}
- ▶ Tandis que **L7Ae n'interagit avec aucune des autres protéines** du complexe de manière directe, c'est-à-dire en absence d'ARN guide,³⁹ les protéines **Cbf5, Nop10 et Gar1 sont capables de former un complexe ternaire** (cf. 2.4.2),^{32, 39} permettant ainsi à la protéine Gar1 d'être incluse dans le complexe via des interactions protéine / protéine uniquement.³⁹ Notons cependant que la structure cristallographique de l'un des sous-complexes a mis en évidence l'existence d'interactions entre L7Ae et Nop10,³¹ alors que ni les résultats de la présente étude, ni ceux préalablement obtenus par retard sur gel n'ont permis de détecter cette interaction,³⁹ suggérant ainsi qu'elle intervient probablement une fois les protéines fixées sur l'ARN guide.
- ▶ **L'ARN guide assure la spécificité de reconnaissance de l'ARN cible** avec lequel il est capable de former un **complexe de stœchiométrie 1:1** même en absence des différentes protéines (cf. 2.4.3).^{41, 42}
- ▶ **L'ARN guide joue un rôle central en recrutant les différents partenaires du complexe** (cf. 2.4.4). En effet, en plus des résultats de cristallographie allant dans ce sens,^{30, 31, 36} il a été montré qu'une absence d'ARN guide se traduit par une abolition de l'activité catalytique, et cela en dépit de la présence des quatre protéines et de l'ARN cible.³⁹

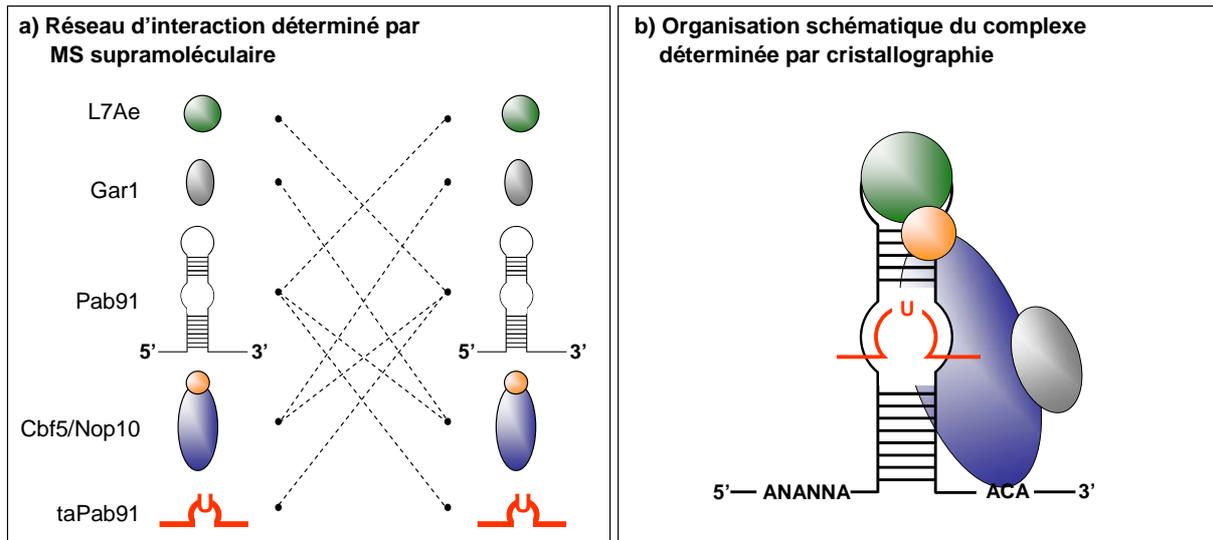


Figure 10 : Bilan des résultats de MS supramoléculaire et comparaison avec les données de cristallographie.^{30-34, 36}

Ainsi, le bon accord avec les résultats préalablement obtenus à l'aide de différentes techniques biophysiques démontre la possibilité d'étudier des réseaux d'interactions de complexes RNP, en suivant pour cela par MS supramoléculaire la **reconstitution progressive** de l'édifice biologique à partir de ces composants purifiés individuellement.

3) CONCLUSION DE L'ETUDE

La stratégie de **reconstitution progressive** présentée dans ce chapitre apparaît comme complémentaire à celle où le réseau d'interactions d'un complexe entier est déterminé en suivant par MS supramoléculaire la **dissociation progressive** de l'édifice biologique en sous-complexes provoquée soit en solution, soit en phase gazeuse (cf. Partie I, Chapitre III, 2.2.6).⁴³⁻⁴⁶ La complémentarité des deux stratégies se situe à plusieurs niveaux :

- ▶ **La stratégie par reconstitution progressive convient davantage aux édifices biologiques constitués d'un nombre limité de partenaires (< 10).** En effet, la purification des différents constituants du complexe pris individuellement peut se révéler particulièrement laborieuse lorsque le nombre de partenaires augmente. Il est alors potentiellement plus intéressant de procéder à une purification par affinité en tandem (TAP) du complexe entier,⁴⁷⁻⁴⁹ suivie d'une étude du réseau d'interactions par dissociation progressive du complexe.⁴³⁻⁴⁶
- ▶ **La stratégie par reconstitution progressive permet d'étudier le réseau d'interactions de chacun des partenaires.** En effet, avec la stratégie de dissociation progressive (cf. Partie I, Chapitre III, 2.2.6), le niveau d'information concernant le réseau d'interactions dépend de la possibilité de générer suffisamment de sous-complexes ce qui peut constituer une limitation de la stratégie dans certains cas. En revanche, avec la stratégie par reconstitution

progressive, il est possible de tester l'ensemble des combinaisons nécessaires à la mise en évidence des interactions intermoléculaires au sein du complexe.

- ▶ **La stratégie par reconstitution progressive permet de suivre la dynamique d'assemblage.** En effet, le fait de disposer des différents partenaires du complexe pris individuellement offre la possibilité de suivre la cinétique de formation du complexe mais également de déterminer l'ordre d'insertion des différents partenaires du complexe. Cette possibilité n'a malheureusement pas pu être illustrée dans l'exemple du complexe RNP à boîte H/ACA étant donné que les expériences menées par MS supramoléculaire ont montré que le complexe entier (sans Gar1) s'assemble en moins d'une minute à température ambiante et cela quel que soit l'ordre d'incubation des constituants du complexe.
- ▶ **La stratégie par dissociation progressive pourrait permettre de détecter des interactions n'existant qu'au sein du complexe entier.** En effet, il est possible que des partenaires n'interagissent entre eux qu'une fois intégrés au complexe (ex : L7Ae et Nop10 dans l'exemple présent). Ce type d'interaction échappe donc à la stratégie par reconstitution progressive. Par contre, avec la stratégie par dissociation progressive du complexe, il semble possible de détecter ce genre d'interactions à condition qu'elles soient suffisamment stables pour ne pas être immédiatement dissociées en solution ou en phase gazeuse.

En conclusion, **la MS supramoléculaire offre une alternative intéressante pour l'étude des réseaux d'interactions au sein de complexes RNP.** Plus particulièrement, la **rapidité** d'analyse et d'interprétation des résultats, **la précision de la mesure de masse**, ainsi que la **consommation modérée d'échantillon** font de la MS supramoléculaire une technique tout à fait complémentaire de la cristallographie, ainsi que du retard sur gel. De plus, en dehors d'une preuve de concept, le travail présenté dans ce chapitre constitue une étape préliminaire permettant de définir la méthodologie à suivre pour l'étude de complexes RNP à boîte C/D pour lesquels nettement moins d'informations structurales sont disponibles. Ces complexes s'apparentent au système H/ACA dans la mesure où ils font intervenir plusieurs protéines ainsi qu'un ARN guide afin d'assurer la modification d'ARN en catalysant la 2'-O-méthylation de riboses.²⁷ Ces complexes sont actuellement en cours d'étude dans le laboratoire du Dr Christiane Branlant et feront très prochainement l'objet d'une étude intégrant la MS supramoléculaire, et plus particulièrement la stratégie de reconstitution progressive présentée dans ce chapitre afin d'étudier le réseau d'interactions des complexes RNP à boîte C/D.

4) VALORISATION

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet de la communication suivante :

- ▶ **Communication par affiche :** Atmanene C, Saliou JM, Manival X, Branlant C, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Etude par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire de la Reconstitution *in vitro* de particules RNP H/ACA. Sixièmes Rencontres de Figeac, 26 septembre au 1^{er} octobre 2008, Figeac.

CONCLUSIONS

Le travail présenté dans cette partie a permis de réaliser les développements méthodologiques nécessaires à **l'extension du potentiel de la MS supramoléculaire pour l'analyse de complexes protéine / ARN au sein du laboratoire**. En effet, ces édifices biologiques présentent certaines caractéristiques qui imposent des **conditions de préparation des échantillons particulières**, ainsi que des **conditions instrumentales distinctes** de celles couramment employées pour l'étude de complexe de type protéine / ligand de petite taille. Deux points critiques ont ainsi été soulevés : (i) **l'échange de tampon** qui présente une difficulté plus importante dans le cas des ARN que dans le cas des protéines, et (ii) le choix du tampon et plus particulièrement de **la force ionique** qui influence fortement la stabilité des complexes protéine / ARN. Par ailleurs, il faut encore rappeler que les complexes protéine / ARN sont **relativement stables en phase gazeuse** en raison de l'existence de nombreuses interactions électrostatiques et sont par conséquent **particulièrement bien adaptés à l'analyse par MS supramoléculaire**.

Le potentiel de la MS supramoléculaire a ensuite été illustré au travers de différents exemples traitant de protéines et de complexes RNP intervenant dans la modification des ARN. Ainsi, il a non seulement été possible de déterminer des **stœchiométries d'interaction de complexe protéine / ARN**, de vérifier la **spécificité de reconnaissance entre protéines et ARN**, mais également d'étudier **l'influence de petites molécules sur la stabilité de tels édifices**. De plus, en mettant à profit les possibilités d'automatisation des expériences nanoESI sur puce microfluidique, il a été possible de proposer et d'évaluer le potentiel d'une **stratégie de reconstitution progressive** de complexes RNP pour **l'étude du réseau d'interactions** entre les protéines et les ARN constituant ce type de complexes. Finalement, au travers de ces différents cas d'étude, il a été possible de confronter le potentiel de la MS supramoléculaire à celui de techniques biophysiques, telles que la cristallographie ou le retard sur gel, mettant ainsi en avant la **complémentarité de la MS supramoléculaire pour l'étude des interactions protéine / ARN**.

Pour terminer, il faut noter que ces travaux ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes vers l'étude du réseau d'interactions d'édifices biologiques plus complexes, contenant un nombre important de partenaires en interaction, ou encore le suivi de la dynamique d'échange de protéines impliquées au sein de complexe protéine / ARN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Blackburn GM, Gait MJ.**
Nucleic Acids in Chemistry and Biology. IRL Press, Oxford, **1992**.
2. **Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N.**
Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends in Genetics*, **2005**, *21*, 289-297.
3. **Szymanski M, Barciszewska MZ, Zywicki M, Barciszewski J.**
Noncoding RNA transcripts. *Journal of Applied Genetics*, **2003**, *44*, 1-19.
4. **Bernstein DS, Buter N, Stumpf C, Wickens M.**
Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system. *Methods*, **2002**, *26*, 123-141.
5. **Haynes SR.**
RNA-protein interaction protocols. Humana Press, **1999**.
6. **Perdew GH, Van den Heuvel JP, Peters JM.**
Regulation of gene expression: molecular mechanisms. Humana Press, **2006**.
7. **Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B.**
SELEX-a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, **2007**, *24*, 381-403.
8. **Fouillen L.**
Universalité des méthodologies protéomiques pour l'identification et la caractérisation des protéines. *Thèse de l'Université de Strasbourg*, **2009**.
9. **Steen H, Jensen ON.**
Analysis of protein-nucleic acid interactions by photochemical cross-linking and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2002**, *21*, 163-182.
10. **Rusconi F, Guillonéau F, Praseuth D.**
Contributions of mass spectrometry in the study of nucleic acid-binding proteins and of nucleic acid-protein interactions. *Mass Spectrometry Reviews*, **2002**, *21*, 305-348.
11. **Potier N.**
Caractérisation de complexes biologiques non covalents par spectrométrie de masse avec ionisation électrospray. *Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg*, **1996**.
12. **Smith RD, Light-Wahl KJ.**
The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biological Mass Spectrometry*, **1993**, *22*, 493-501.
13. **Barraud P.**
Etudes structurales de différents processus biologiques impliquant les ARN de transfert. *Thèse de l'Université Paris-Descartes, Paris*, **2008**.
14. **Droogmans L, Roovers M, Bujnicki JM, Tricot C, Hartsch T, Stalon V, Grosjean H.**
Cloning and characterization of tRNA (m1A58) methyltransferase (TrmI) from *Thermus thermophilus* HB27, a protein required for cell growth at extreme temperatures. *Nucleic Acids Research*, **2003**, *31*, 2148-2156.
15. **Kowalak JA, Dalluge JJ, McCloskey JA, Stetter KO.**
The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 7869-7876.
16. **Yokoyama S, Watanabe K, Miyazawa T.**
Dynamic structures and functions of transfer ribonucleic acids from extreme thermophiles. *Adv Biophys*, **1987**, *23*, 115-147.
17. **Ritschel T.**
Tgt a drug target to study pKa shifts, residual solvation & protein - protein interface formation. *Thèse de la Philipps-Universität, Marburg*, **2009**.
18. **Okada N, Sasakawa C, Tobe T, Yamada M, Nagai S, Talukder KA, Komatsu K, et al.**

- Virulence-associated chromosomal loci of *Shigella flexneri* identified by random Tn5 insertion mutagenesis. *Molecular Microbiology*, **1991**, 5, 187-195.
19. **Durand JM, Okada N, Tobe T, Watarai M, Fukuda I, Suzuki T, Nakata N, et al.**
vacC, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to tgt, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **1994**, 176, 4627-4634.
 20. **Reuter K, Ficner R.**
Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* tgt gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, **1995**, 177, 5284-5288.
 21. **Garcia GA, Koch KA, Chong S.**
tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Overexpression, purification and quaternary structure. *Journal of Molecular Biology*, **1993**, 231, 489-497.
 22. **Nakanishi S, Ueda T, Hori H, Yamazaki N, Okada N, Watanabe K.**
A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269, 32221-32225.
 23. **Okada N, Nishimura S.**
Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **1979**, 254, 3061-3066.
 24. **Romier C, Reuter K, Suck D, Ficner R.**
Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *EMBO Journal*, **1996**, 15, 2850-2857.
 25. **Xie W, Liu X, Huang RH.**
Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. *Nature Structural Biology*, **2003**, 10, 781-788.
 26. **Chevreux G.**
Etude des interactions moléculaires spécifiques par spectrométrie de masse : application à la chimie du vivant. *Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg*, **2005**.
 27. **Reichow SL, Hamma T, Ferre-D'Amare AR, Varani G.**
The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research*, **2007**, 35, 1452-1464.
 28. **Ofengand J.**
Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Letters*, **2002**, 514, 17-25.
 29. **Decatur WA, Fournier MJ.**
rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, **2002**, 27, 344-351.
 30. **Liang B, Xue S, Terns RM, Terns MP, Li H.**
Substrate RNA positioning in the archaeal H/ACA ribonucleoprotein complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, **2007**.
 31. **Li L, Ye K.**
Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. *Nature*, **2006**, 443, 302-307.
 32. **Rashid R, Liang B, Baker DL, Youssef OA, He Y, Phipps K, Terns RM, et al.**
Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita. *Molecular Cell*, **2006**, 21, 249-260.
 33. **Charron C, Manival X, Clery A, Senty-Segault V, Charpentier B, Marmier-Gourrier N, Branlant C, et al.**
The archaeal sRNA binding protein L7Ae has a 3D structure very similar to that of its eukaryal counterpart while having a broader RNA-binding specificity. *Journal of Molecular Biology*, **2004**, 342, 757-773.
 34. **Manival X, Charron C, Fourmann JB, Godard F, Charpentier B, Branlant C.**

- Crystal structure determination and site-directed mutagenesis of the *Pyrococcus abyssi* aCBF5-aNOP10 complex reveal crucial roles of the C-terminal domains of both proteins in H/ACA sRNP activity. *Nucleic Acids Research*, **2006**, *34*, 826-839.
35. **Liang B, Zhou J, Kahen E, Terns RM, Terns MP, Li H.**
Structure of a functional ribonucleoprotein pseudouridine synthase bound to a substrate RNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, **2009**, *16*, 740-746.
36. **Duan J, Li L, Lu J, Wang W, Ye K.**
Structural Mechanism of Substrate RNA Recruitment in H/ACA RNA-Guided Pseudouridine Synthase. *Molecular Cell*, **2009**, *34*, 427-439.
37. **Ye K.**
H/ACA guide RNAs, proteins and complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, **2007**, *17*, 287-292.
38. **Charpentier B, Muller S, Branlant C.**
Reconstitution of archaeal H/ACA small ribonucleoprotein complexes active in pseudouridylation. *Nucleic Acids Research*, **2005**, *33*, 3133-3144.
39. **Baker DL, Youssef OA, Chastkofsky MI, Dy DA, Terns RM, Terns MP.**
RNA-guided RNA modification: functional organization of the archaeal H/ACA RNP. *Genes & Development*, **2005**, *19*, 1238-1248.
40. **Liang B, Kahen EJ, Calvin K, Zhou J, Blanco M, Li H.**
Long-distance placement of substrate RNA by H/ACA proteins. *RNA*, **2008**, *14*, 2086-2094.
41. **Jin H, Loria JP, Moore PB.**
Solution structure of an rRNA substrate bound to the pseudouridylation pocket of a box H/ACA snoRNA. *Molecular Cell*, **2007**, *26*, 205-215.
42. **Wu H, Feigon J.**
H/ACA small nucleolar RNA pseudouridylation pockets bind substrate RNA to form three-way junctions that position the target U for modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2007**, *104*, 6655-6660.
43. **Lorenzen K, Vannini A, Cramer P, Heck AJ.**
Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure*, **2007**, *15*, 1237-1245.
44. **Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, Schenauer MR, Yokoi-Fong T, et al.**
Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**.
45. **Taverner T, Hernandez H, Sharon M, Ruotolo BT, Matak-Vinković D, Devos D, Russell RB, et al.**
Subunit Architecture of Intact Protein Complexes from Mass Spectrometry and Homology Modeling *Accounts of Chemical Research*, **2008**, *41*, 617-627.
46. **Sharon M, Mao H, Boeri Erba E, Stephens E, Zheng N, Robinson CV.**
Symmetrical Modularity of the COP9 Signalosome Complex Suggests its Multifunctionality. *Structure*, **2009**, *17*, 31-40.
47. **Damasceno CMB, Rose JKC.**
Tandem-affinity purification (TAP) tags. *Encyclopedia of Life Sciences*, **2007**.
48. **Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, et al.**
The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods*, **2001**, *24*, 218-229.
49. **Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B.**
A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, **1999**, *17*, 1030-1032.

QUATRIEME PARTIE :

NOUVELLES METHODES DE CARACTERISATION D'EDIFICES SUPRAMOLECULAIRES PAR COUPLAGE ENTRE SPECTROMETRIE DE MOBILITE IONIQUE ET SPECTROMETRIE DE MASSE

CHAPITRE I : Synapt HDMS – Principe, Evaluation et Mise en Œuvre du Couplage Spectrométrie de Mobilité Ionique / Spectrométrie de Masse pour l'Etude de Protéines et de Complexes Intacts

CHAPITRE II : Caractérisation de Complexes Antigène / Anticorps : Apports de la MS Supramoléculaire pour le Développement de Biomolécules Thérapeutiques

CHAPITRE III : Etude de la Dynamique Structurale de CggR, un Régulateur Transcriptionnel Ligand-Dépendant

CHAPITRE I

Synapt HDMS – Principe, Evaluation et Mise en Œuvre du Couplage Spectrométrie de Mobilité Ionique / Spectrométrie de Masse pour l'Etude de Protéines et de Complexes Intacts

Dans ce chapitre consacré au couplage entre la spectrométrie de mobilité ionique et la spectrométrie de masse, nous détaillerons tout d'abord le principe de fonctionnement du Synapt HDMS. Puis, après avoir présenté les développements méthodologiques réalisés au cours de ce travail de thèse, quelques exemples d'applications seront décrits afin d'illustrer le potentiel de cette nouvelle technologie pour la caractérisation de protéines intactes et de complexes non-covalents.

1) INTRODUCTION A LA SPECTROMETRIE DE MOBILITE IONIQUE (IMS)

La spectrométrie de mobilité ionique (IMS) regroupe l'ensemble des techniques qui sont basées sur la **séparation d'analytes en phase gazeuse en fonction de leur mobilité ionique**, c'est-à-dire de leur vitesse de déplacement au sein d'un gaz (ex : He, N₂) lorsqu'ils sont soumis à l'effet d'un champ électrique. La mobilité d'un ion en phase gazeuse dépend essentiellement de sa charge et de sa section efficace, c'est pourquoi on retrouve une certaine analogie entre l'IMS et l'électrophorèse capillaire. En se basant sur la possibilité de séparer des ions en fonction de leur mobilité en phase gazeuse, les développements instrumentaux réalisés durant les vingt dernières années ont conduit à la conception de différents types de cellules de mobilité :

- ▶ **Les cellules de type DTIMS (*Drift-time IMS*)** : le principe de ces cellules consiste à soumettre les ions à un faible champ électrique et de mesurer le temps (*drift time*) mis pour traverser un « bain de gaz ». ¹ Plus la mobilité d'un ion sera grande, plus rapidement il arrivera au détecteur (figure 1a). Son fonctionnement présente ainsi une certaine analogie avec celui des analyseurs TOF. Il s'agit des cellules les plus couramment utilisées. ²
- ▶ **Les cellules de type AIMS (*Aspiration IMS*)** : dans le cas de ces cellules, les ions transportés par un flux laminaire de gaz sont soumis à un champ électrique perpendiculaire provoquant leur déflexion sur un détecteur (figure 1b). Pour un champ électrique donné, plus la mobilité d'un ion sera faible, plus long sera le trajet parcouru au sein de la cellule avant d'atteindre le détecteur. ^{2, 3} L'utilisation d'un détecteur segmenté permet de déterminer la longueur du trajet parcouru (figure 1b). ¹⁻³ Une autre alternative consiste à balayer le champ électrique afin de dévier tour à tour les ions de différentes mobilités sur un détecteur unique. ³
- ▶ **Les cellules de type FAIMS (*Field Asymmetric IMS*)** : également appelées DMS pour *differential mobility spectrometer*, ces cellules sont composées de deux électrodes entre lesquelles circule un flux de gaz transportant les ions. Ces derniers sont alternativement soumis à un champ électrique intense de courte durée, puis à un champ électrique faible de durée plus longue (figure 1c). ² En fonction de leur différence de mobilité entre champ fort et champ faible, les ions vont subir une déflexion vers les électrodes. ^{2, 4, 5} L'application d'un « voltage de compensation » spécifique à des ions de mobilité donnée, permet de contrebalancer cette déflexion et d'assurer leur transmission au travers de la cellule de mobilité. En balayant différentes valeurs de voltage de compensation, il devient possible de filtrer les ions en fonction de leur mobilité. ^{1, 2, 4, 5} Le fonctionnement de cette cellule s'apparente ainsi en quelque sorte à celui d'un quadripôle. ²
- ▶ **La cellule de type TWIMS (*Travelling Wave IMS*)** : il s'agit de la cellule de mobilité dont est équipé le Synapt HDMS et qui est décrite en détail ci-dessous. En quelques mots, les ions sont séparés en fonction de leur vitesse de déplacement au sein d'un gaz sous l'effet du champ électrique créé par des impulsions de potentiel appliquées successivement sur les différentes lentilles composant un guide d'ions de type SRIG (figure 1d).

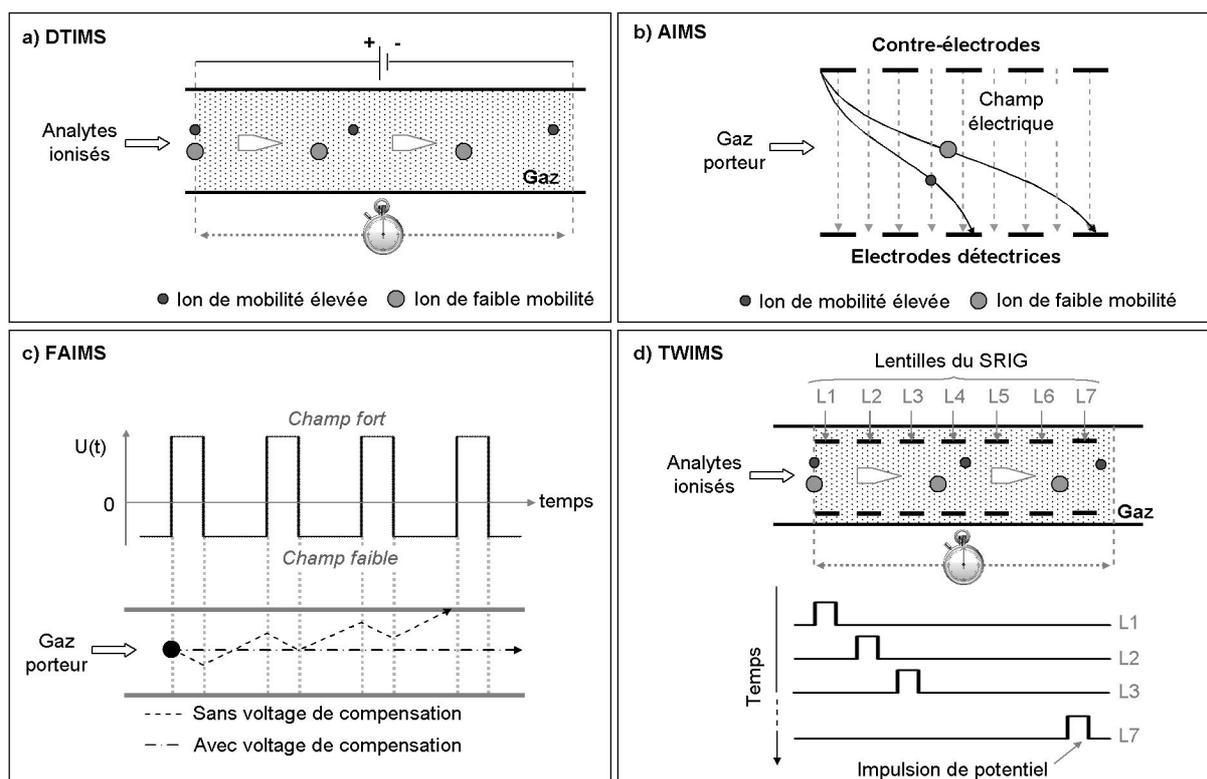


Figure 1 : Principe de fonctionnement de différentes cellules de mobilité ionique. (a) Cellule de type *Drift Time IMS*. (b) Cellule de type *Aspiration IMS*, adapté d'après ³. (c) Cellule de type *Field Asymmetric IMS*, adapté d'après ⁵. $U(t)$ correspond à la tension alternative. (d) Cellule de type *Travelling Wave IMS*, adapté d'après ⁶.

Alors que la cellule de type DTIMS est la plus résolutive et la seule permettant de déterminer la section efficace des ions de manière directe, elle présente le désavantage d'être peu sensible, notamment en raison de son fonctionnement cyclique qui nécessite un échantillonnage des ions,² mais également à cause de la perte des ions par diffusion radiale lors de l'analyse. Les cellules AIMS et FAIMS sont compatibles avec l'analyse des ions en flux continu (sans échantillonnage) et bénéficient de ce fait d'une meilleure sensibilité, mais leur résolution reste par contre inférieure aux cellules DTIMS. Finalement, la cellule TWIMS du Synapt HDMS est la moins résolutive des quatre,² mais présente une bonne sensibilité notamment grâce à la capacité de confinement des ions dans le SRIG qui limite les pertes par diffusion radiale. De plus, cette cellule permet de déterminer la section efficace des ions en procédant pour cela à un étalonnage à l'aide d'analytes dont la section efficace a préalablement été déterminée par DTIMS.⁷

NB : La résolution d'une cellule de mobilité représente sa capacité à séparer des ions ne présentant qu'une faible différence de mobilité. Dans le cas des cellules DTIMS et TWIMS, la résolution peut être quantifiée par la distribution des temps d'arrivée au détecteur, en calculant pour cela le rapport entre le temps au maximum du pic et sa largeur à mi-hauteur. A titre comparatif, la résolution de la cellule TWIMS du Synapt HDMS est de quelques unités alors que celle des cellules DTIMS est de plusieurs dizaines voire centaines d'unités.⁸

2) LE SYNAPT HDMS - FONCTIONNEMENT DETAILLE

Une brève présentation du Synapt HDMS a été réalisée dans la première partie de ce manuscrit (cf. Partie I, Chapitre II, 4.3). Afin de décrire plus en détail le fonctionnement de cet instrument en mode « mobilité ionique », nous proposons de reprendre le schéma général du spectromètre de masse comme support de discussion pour les prochains paragraphes (figure 2).

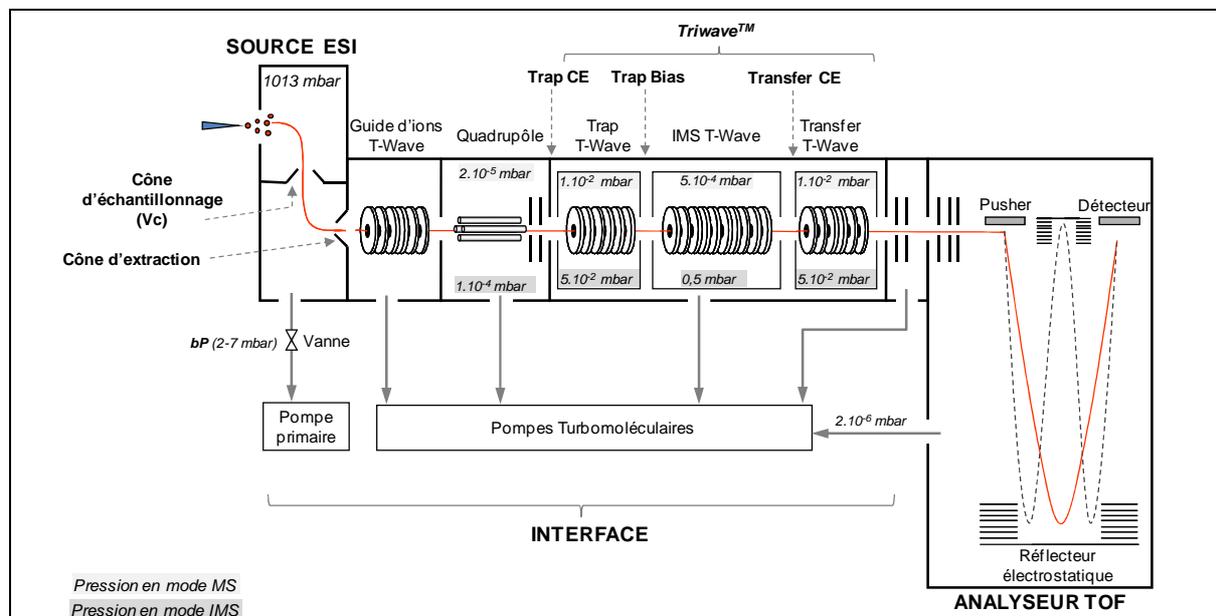


Figure 2 : Représentation schématique du Synapt HDMS (Waters).

2.2) Principe de fonctionnement de la cellule *Triwave*TM

La cellule *Triwave* correspond à la région de l'instrument dans laquelle est réalisée la séparation des analytes en fonction de leur mobilité ionique. Cette cellule est composée de trois guides d'ions de type SRIG, respectivement nommés *Trap*, *IMS* et *Transfer* (figure 3). Ces guides d'ions sont constitués de lentilles annulaires dont l'épaisseur est de 0,5 mm, le diamètre interne de 5 mm et l'espacement de 1,5 mm.⁹ Elles sont au nombre de 66 pour les guides d'ions *Trap* et *Transfer*, tandis que la cellule *IMS* en compte 122 sur une longueur totale de 185 mm.⁹ Alors que les guides *Trap* et *Transfer* sont alimentés en argon pour pouvoir jouer le rôle de cellules de collision, le guide d'ions *IMS* se trouve dans un espace confiné permettant de l'alimenter indépendamment en azote lors des expériences de mobilité ionique.

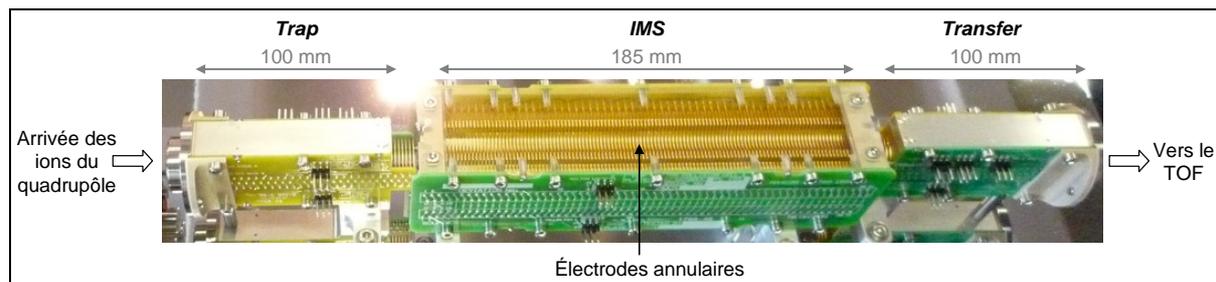


Figure 3 : Photographie de la cellule *Triwave*TM du Synapt HDMS

Au sein de la cellule *Triwave*, le guide d'ions *Trap* a pour rôle d'échantillonner les ions arrivant en flux continu du quadrupôle, afin de permettre leur séparation dans la cellule *IMS* qui, elle, fonctionne par cycles d'analyse. Après séparation dans la cellule *IMS*, les ions entrent finalement dans le guide d'ions *Transfer*, qui permet de les transmettre vers l'analyseur TOF tout en conservant leur séparation.

Dans ces trois guides, les ions sont soumis à un **potentiel radiofréquence** auquel est superposée une **impulsion de potentiel** qui se déplace de paire de lentilles en paire de lentilles. Alors que la radiofréquence permet de confiner les ions au sein des guides d'ions et donc de limiter les pertes par diffusion radiale (cf. Partie I, Chapitre II, 3.2.3), l'impulsion de potentiel crée une « **vague** » qui « draine » les ions vers la sortie du guide, assignant à cette cellule le nom de « *travelling wave ion mobility spectrometry* » (TWIMS).^{6, 9}

Pour séparer les analytes en fonction de leur mobilité ionique, les ions sont accélérés entre les guides *Trap* et *IMS* grâce à la tension *Trap Bias* et pénètrent ensuite dans la cellule *IMS* où règne une pression d'azote de l'ordre de 0,2-0,9 mbar. Sous l'effet des **collisions avec les molécules de gaz**, **les ions entraînés par les vagues de potentiel vont être ralentis différemment selon leur mobilité** et plus particulièrement en fonction de leur section efficace et de leur charge :

- ▶ **Pour un état de charge donné**, les ions de structure compacte seront peu ralentis et pourront « surfer » sur la première vague, alors que ceux ayant une structure étendue seront suffisamment ralentis pour subir des mouvements de « *roll over* » qui consistent à passer de la vague *n* à la vague *n+1*, engendrant ainsi un retard dans les temps d'arrivée (figure 4). Ainsi, à charge égale, **le temps mis par un ion pour traverser la cellule IMS augmente quand sa section efficace augmente**.
- ▶ **Pour des ions de section efficace identique**, plus la charge de l'ion sera importante, plus il sera accéléré sous l'effet du champ électrique et moins de mouvements de « *roll over* » il subira (figure 4). Ainsi, à section efficace identique, **le temps mis par un ion pour traverser la cellule IMS diminue quand sa charge augmente**.

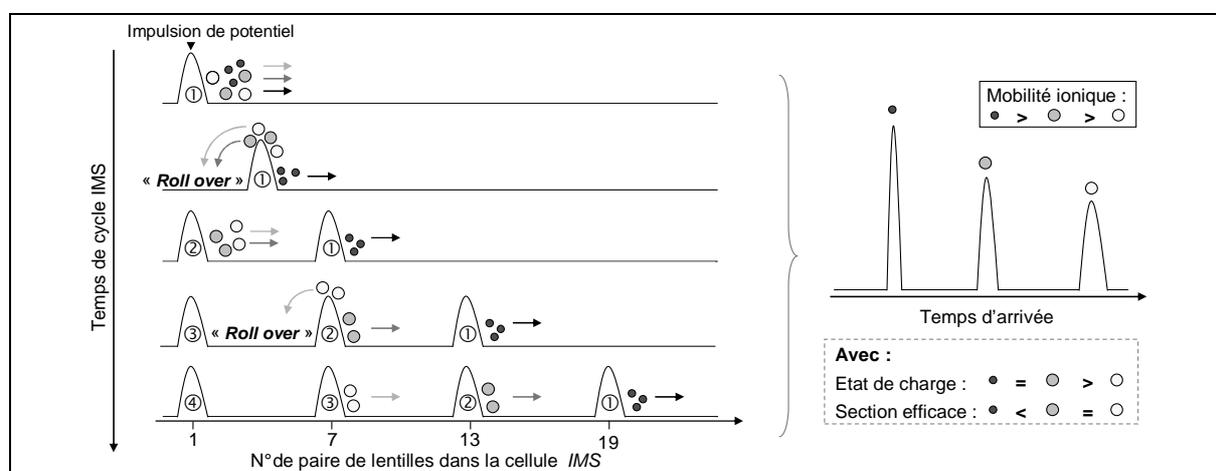


Figure 4 : Séparation des ions dans la cellule *IMS*. Les chiffres encadrés correspondent aux vagues de potentiel successives qui sont espacées de 5 paires de lentilles au sein du guide d'ion SRIG.⁹

2.3) Le couplage mobilité ionique / spectrométrie de masse, une question de « timing »

Le couplage entre spectrométrie de mobilité ionique et spectrométrie de masse nécessite de pouvoir mesurer le temps de passage des ions dans la cellule IMS appelé « *drift time* » (information de mobilité), ainsi que leur temps de vol dans l'analyseur TOF (mesure du rapport m/z). Dans le cas du Synapt HDMS, **la cellule IMS et l'analyseur TOF fonctionnent de manière synchronisée** de sorte à pouvoir accéder simultanément à ces deux informations avec un unique détecteur.

Pour comprendre la manière dont ces deux analyseurs sont synchronisés, il est important de préciser qu'un cycle d'analyse de la cellule IMS s'étale sur une durée de **5 à 40 ms** alors que le temps de cycle de l'analyseur TOF dure entre **30 et 200 μs** . Compte tenu de cette différence d'échelle de temps, le Synapt HDMS réalise **200 cycles d'analyse du TOF par cycle d'analyse de la cellule IMS**.⁹ L'information de rapport m/z est obtenue de manière habituelle par mesure du temps de vol dans l'analyseur TOF, tandis que l'information de *drift time* d'un ion en sortie de la cellule IMS est obtenue en multipliant la durée d'un cycle TOF par le nombre de cycles TOF réalisés depuis l'injection des ions dans la cellule IMS. Par exemple, pour un temps de cycle du TOF de 100 μs , un ion arrivant dans le 125^{ème} cycle TOF aura un *drift time* de $100 \times 125 = 12500 \mu\text{s} = 12,5 \text{ ms}$. Lorsqu'un cycle IMS est achevé au bout de 200 cycles TOF (la valeur de 200 est un paramètre fixe sur le Synapt HDMS), un nouveau paquet d'ions est envoyé dans la cellule IMS et le comptage des cycles TOF reprend à zéro (figure 5). Le signal est ainsi accumulé pendant une durée de l'ordre de la seconde correspondant à la valeur du « *scan time* » définie par l'utilisateur (figure 5).

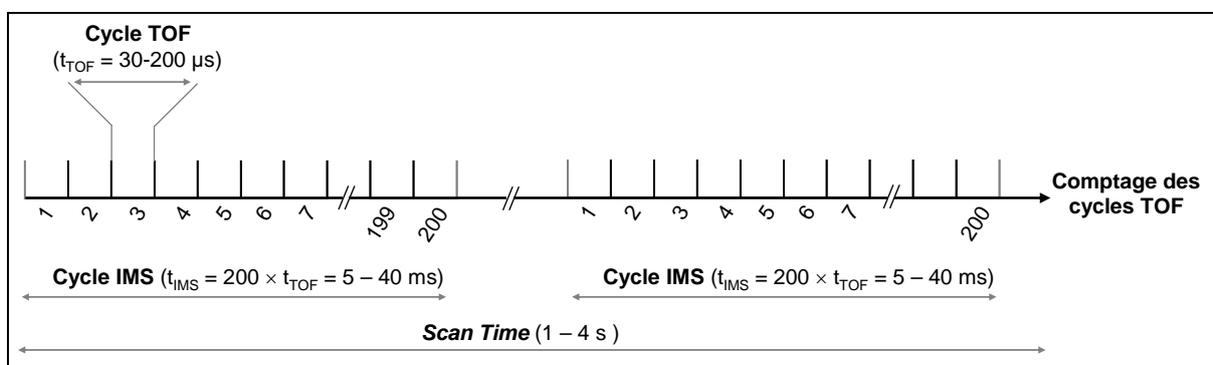


Figure 5 : Comparaison de la durée des cycles d'analyse du TOF (t_{TOF}), de l'IMS (t_{IMS}) et du *scan time*.

NB : Pour obtenir une estimation plus précise du temps mis par un ion pour traverser la cellule IMS, il convient de retrancher le temps requis par l'ion pour être transféré de la sortie de la cellule IMS jusqu'au détecteur. Ce temps reste généralement inférieur à 1 ms et la manière de l'évaluer sera exposée dans la suite du chapitre (cf. 3.2).

2.4) Représentation des données

Le graphique représentant le rapport m/z des ions en fonction de leur *drift time* porte le nom de « *driftscope* » (figure 6a). L'intensité relative de chaque espèce est quant à elle représentée par un code couleur. La projection des données sur l'axe des ordonnées permet de produire un spectre de

masse conventionnel (figure 6b), tandis que la projection des données sur l'axe des abscisses conduit à l'obtention d'un graphique représentant l'intensité du signal en fonction du *drift time* : ce graphique porte le nom de « mobilogramme » par analogie avec un chromatogramme (figure 6c).

De manière intéressante, comme pour un chromatogramme il est possible d'extraire une partie des données figurant sur le *driftscope*. A titre d'exemple, les spectres de masses de la figure 6b ont été obtenus en projetant sur l'axe des ordonnées, soit la totalité du *driftscope* (spectre de masse du haut), soit les régions ① et ② délimitées par la ligne en pointillés sur le *driftscope*. De la même manière, par projection du *driftscope* sur l'axe des abscisses (figure 6c), il est possible d'obtenir un mobilogramme d'ensemble (mobilogramme du haut), ou alors de ne sélectionner qu'un état de charge particulier pour en extraire le mobilogramme. L'utilité de ces outils qui permettent de « décortiquer » les *driftscopes* sera illustrée dans la suite du chapitre.

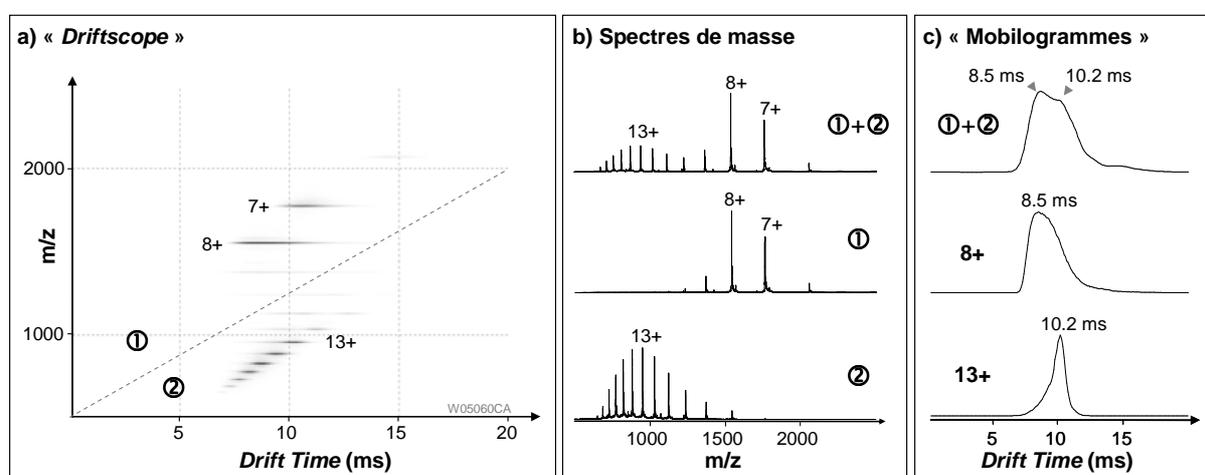


Figure 6 : Représentation des données d'IM-MS. Analyse d'une solution de cytochrome C bovin à 2 μM dans un mélange eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1.

3) MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE EN MS SUPRAMOLECULAIRE

3.1) Optimisation des paramètres instrumentaux

3.1.1) Paramètres de séparation des ions dans la cellule IMS

Lorsque les ions sont dans la cellule IMS, ils sont d'une part soumis aux vagues de potentiel les propulsant vers la sortie et d'autre part aux collisions avec les molécules de gaz, qui elles, ont pour effet de freiner les ions dans leur progression. Ainsi, les paramètres instrumentaux qui influencent directement le *drift time* des ions sont :

- ▶ **La pression de gaz dans la cellule IMS (P_{IMS})** : lorsque la pression d'azote augmente, la fréquence des collisions augmente et les ions sont davantage ralentis. **Ainsi, le *drift time* d'un ion augmente lorsque la pression augmente** (figure 7a).

- ▶ **La hauteur de la vague de potentiel (IMS WH – IMS wave height)** : lorsque l'amplitude de l'impulsion de potentiel augmente, la probabilité pour un ion d'effectuer des mouvements de *roll over* diminue. Par conséquent, **le drift time d'un ion diminue lorsque la hauteur de la vague augmente** (figure 7b).
- ▶ **La vitesse de la vague de potentiel (IMS WV – IMS wave velocity)** : lorsque la vitesse de la vague augmente, il est possible de produire un plus grand nombre de vagues par intervalle de temps (plus grande fréquence), augmentant de ce fait le nombre de mouvements de *roll over* qu'un ion peut réaliser au cours d'un cycle de séparation dans la cellule IMS. Ainsi, **le drift time d'un ion augmente lorsque la vitesse de la vague augmente** (figure 7c).

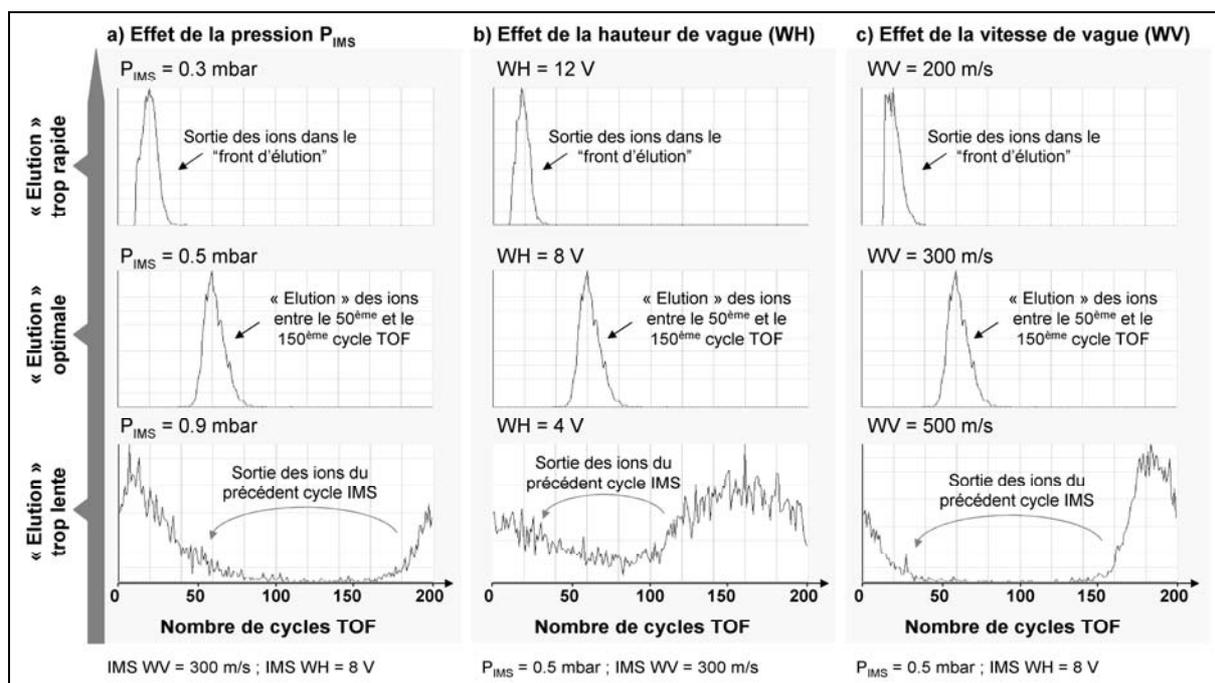


Figure 7 : Evolution du *drift time* de l'ion +8 de la myoglobine de cœur de cheval analysée à 5 µM dans un tampon NH₄Ac 50 mM pH 6,8 en fonction (a) de la pression dans la cellule IMS, (b) de la hauteur de la vague de potentiel et (c) de la vitesse de la vague de potentiel. 1 cycle TOF correspond à 100 µs de *drift time*.

Pour chaque type d'échantillon, il convient d'optimiser ces paramètres simultanément de sorte à respecter les critères suivants :

- ▶ Premièrement, il faut que « l'élution » des ions soit **suffisamment lente** pour éviter qu'ils ne sortent dans le « front d'élution » empêchant ainsi leur séparation en fonction de leur mobilité ionique (figure 7 – mobilogrammes du haut). Il s'agit pour cela de diminuer la hauteur de vague et d'augmenter la pression d'azote ainsi que la vitesse de vague.
- ▶ Deuxièmement, il faut que « l'élution » des ions soit **suffisamment rapide** pour éviter que les ions du n-ième cycle IMS ne sortent de la cellule de mobilité lors du cycle n+1 (figure 7 – mobilogrammes du bas). Il s'agit pour cela d'augmenter la hauteur de vague et de diminuer la pression d'azote ainsi que la vitesse de vague.

En résumé, l'optimisation des paramètres P_{IMS} , IMS WH et IMS WV consiste à trouver le **meilleur compromis entre séparation des ions et rendement de fonctionnement de la cellule IMS**. Dans le cas d'analyses où l'écart de mobilité ionique entre les différents analytes est important, il est possible d'utiliser une rampe permettant d'augmenter progressivement la hauteur de la vague ou de diminuer progressivement sa vitesse afin d'obtenir à la fois une séparation satisfaisante des analytes de faible et de haute mobilité ionique.

3.1.2) Paramètres de désolvatation et de transmission des ions

Un nombre croissant de publications suggère que la conformation native d'une protéine peut être maintenue en phase gazeuse pendant le temps d'une analyse IM-MS, à condition cependant d'appliquer des conditions expérimentales suffisamment douces.^{7, 10-13} Dans le cas du Synapt HDMS, les expériences d'IM-MS conduites sur des protéines natives ou des complexes non-covalents nécessitent de procéder à une **optimisation rigoureuse des tensions d'accélération situées en amont de la cellule IMS**, c'est-à-dire les tensions V_c , Trap CE et Trap Bias (figure 2).

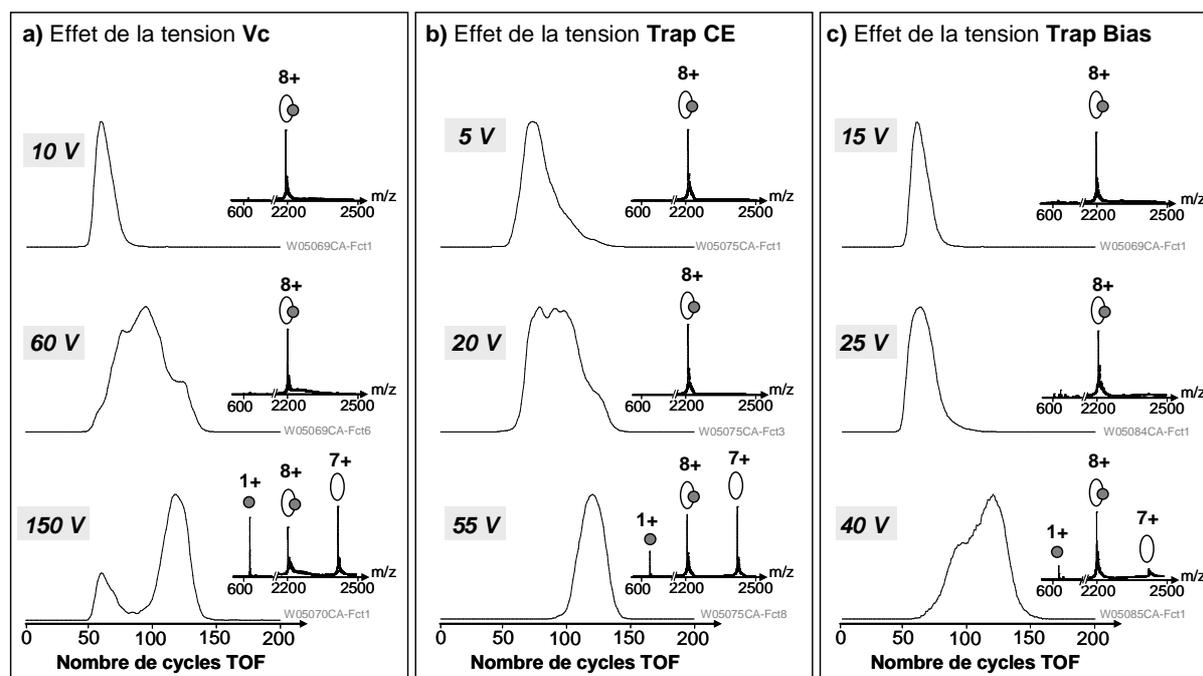


Figure 8 : Influence des tensions (a) V_c , (b) Trap CE et (c) Trap Bias sur l'intégrité du complexe hème / myoglobine dilué à 5 μM dans un tampon NH_4Ac 50 mM pH 6,8. Les mobilogrammes correspondent à la distribution des temps d'arrivée de l'ion +8 du complexe. Les spectres de masse en insert correspondent à un agrandissement des états de charge +8, +7 et +1, du complexe, de la protéine libre et de l'hème, respectivement.

Ces trois tensions ont un effet qualitativement identique sur l'intégrité structurale des protéines natives et des complexes non-covalents en phase gazeuse. La figure 8 illustre leur influence sur un complexe hème / myoglobine. Alors que le complexe reste intact pour une augmentation modérée de ces tensions (figure 8 – spectres de masse du milieu), il est possible de constater un élargissement de la distribution des temps d'arrivée qui se déplace vers les hautes valeurs de *drift times* et qui devient même multimodale dans certains cas. Cette observation indique que les conditions expérimentales

sont suffisamment énergétiques pour engendrer une dénaturation partielle du complexe en phase gazeuse qui adopte alors différentes conformations (distributions des temps d'arrivée larges et multimodales) qui sont plus étendues que la conformation initiale (décalage vers les hautes valeurs de *drift times*).^{11, 14-16} En poursuivant l'augmentation des tensions d'accélération (figure 8 – spectre de masse du bas), la dénaturation du complexe s'accroît comme en atteste le décalage de la distribution des temps d'arrivée vers les hautes valeurs de *drift times*, et on note en plus la présence de la protéine libre et de l'hème qui témoigne de la dissociation partielle du complexe. Cet exemple illustre la nécessité d'employer des **conditions de transmission des ions les plus douces possibles afin de préserver la conformation des biomolécules en phase gazeuse** : il s'agit là d'une condition *sine qua non* pour pouvoir estimer la section efficace de biomolécules dans des conditions non-dénaturantes.

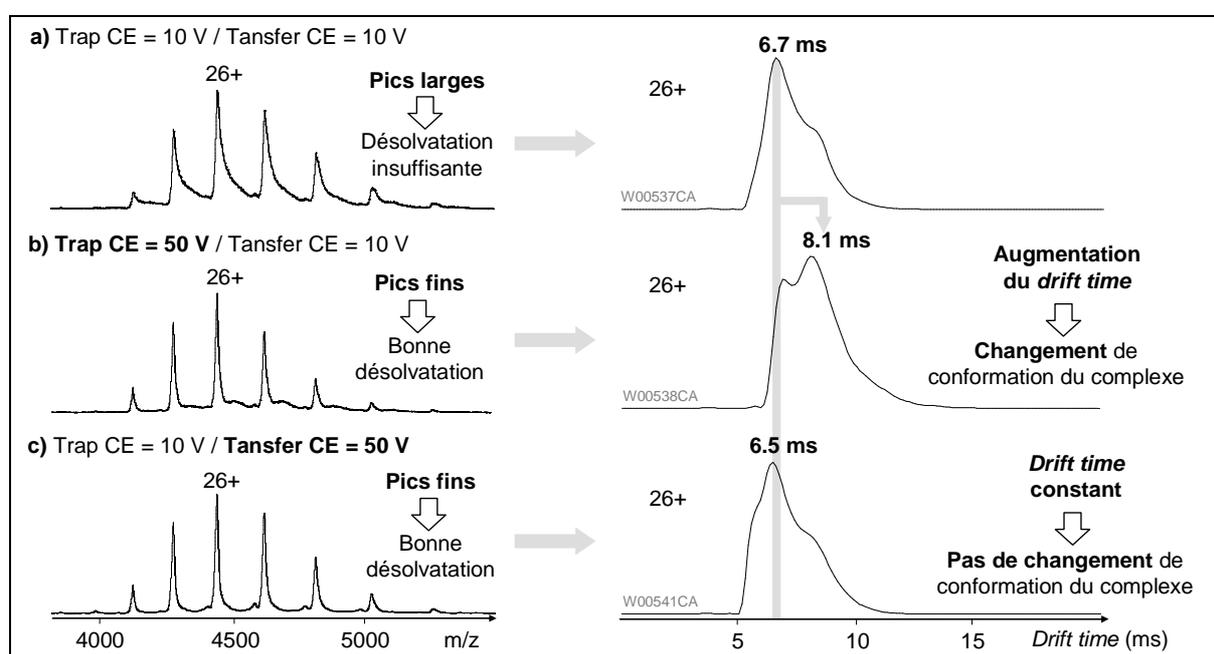


Figure 9 : Influence des tensions Trap CE et Transfer CE sur la désolvatation et l'intégrité structurale des complexes non-covalents. Analyse de Trml à 10 μM en tétramère dans un tampon NH_4HCO_3 200 mM pH 8,0. Les mobilogrammes représentent la distribution des temps d'arrivée de l'état de charge +26 du tétramère de Trml.

Il est cependant important de mentionner que comme dans le cas du LCT (cf. Partie I, Chapitre III, 1.2), **l'application de tensions d'accélération trop faibles en amont de la cellule IMS détériore considérablement la transmission et la désolvatation des ions**. La stratégie d'optimisation, qui a ainsi été mise en œuvre durant ce travail de thèse, consiste à réduire les tensions d'accélération situées avant la cellule IMS (V_c , Trap CE et Trap Bias) aux valeurs minimales qui permettent encore d'assurer un **niveau de transmission suffisant**. Puis, l'application d'une tension d'accélération Transfer CE suffisamment élevée permet alors **d'améliorer la désolvatation des ions sans affecter la mesure de *drift time***. En effet, la figure 9 compare l'influence des tensions Trap CE et Transfer CE qui se situent respectivement **avant** et **après** la cellule IMS. Dans cet exemple, l'emploi de tensions trop faibles conduit premièrement à un spectre de masse présentant des pics relativement larges, témoignant d'une désolvatation insuffisante (figure 9a). Ensuite, en accélérant premièrement les ions

dans le guide *Trap* (**avant** la cellule *IMS*), les pics s'affinent (meilleure désolvatation), mais la distribution des temps d'arrivée est décalée vers les hautes valeurs de *drift times* indiquant un changement de conformation du complexe provoqué par des collisions énergétiques avec les molécules de gaz (figure 9b). En revanche, en augmentant la valeur de tension *Transfer CE* qui se situe **après** la cellule *IMS*, il est possible de conserver le même effet bénéfique sur la désolvatation sans pour autant affecter la mesure de *drift time* (figure 9c).

NB : Concernant les pressions autres que celle appliquée dans la cellule de mobilité ionique, l'effet est tout à fait comparable à celui de la pression dans la première zone de pompage du LCT (P_i) : des pressions plus élevées dans l'interface (*backing pressure* - bP) et dans les guides d'ions *Trap* et *Transfer* ($P_{Trap} = P_{Transfer}$, figure 2) favorisent non seulement le maintien des interactions faibles en phase gazeuse mais assurent également une meilleure transmission des ions de hauts rapports m/z .

3.2) Mesure de la section efficace des ions

3.2.1) Correction du *drift time*

Comme cela a précédemment été mentionné dans ce chapitre, l'estimation exacte du temps de passage dans la cellule *IMS* nécessite de tenir compte du temps mis par les ions pour aller de la sortie de la cellule de mobilité jusqu'au détecteur. Ce temps, généralement inférieur à 1 ms, est la somme de trois contributions qu'il est possible d'évaluer et de retrancher au *drift time* total :

- ▶ **Le temps mis par l'ion pour traverser le guide d'ions *Transfer*** : en absence de mouvements de *roll over*, l'ion voyage à la vitesse de la vague (*Transfer WV*) qui est un paramètre expérimental connu, tout comme la longueur du guide d'ions *Transfer* ($L = 10$ cm). Le temps passé dans la cellule de *Transfer* est alors donné par l'équation (8) :⁷

$$t_{Transfer} = \frac{L}{Transfer WV} \quad (8)$$

- ▶ **Le temps mis par l'ion pour aller de la sortie du guide d'ions *Transfer* jusqu'au *pusher* du TOF** : ce temps est fonction du rapport m/z des ions et d'une constante instrumentale c qui est égale à 1,54 dans notre cas. Ce temps en ms est donné par la relation (9) :⁷

$$t_{Transfer-Pusher} = c \times \frac{\sqrt{m/z}}{1000} \quad (9)$$

- ▶ **Le temps de vol de l'ion dans l'analyseur** : ce temps est déduit d'une règle de trois tenant compte de la relation qui lie le temps de vol d'un ion à la racine carrée de son rapport m/z (cf. Partie I, Chapitre II, 3.3). Ce temps en ms est donné par la relation (10) :

$$t_{TOF} = 0,044 \times \sqrt{\frac{m/z}{1000}} \quad (10)$$

3.2.2) Courbe d'étalonnage

Dans une cellule de mobilité conventionnelle de type DTIMS, la mobilité d'un ion, notée K , est définie par le rapport entre sa vitesse dans la cellule (v_d) et le champ électrique (E) auquel il est soumis (équation (11)). Cette grandeur est généralement normalisée selon la température et la pression pour être rapportée en termes de mobilité réduite K_0 (équation (12)).¹

$$K = \frac{v_d}{E} = \frac{L}{t_d \times E} \quad (11)$$

$$K_0 = K \times \frac{P}{760} \times \frac{273,15}{T} = \frac{L}{t_d \times E} \times \frac{P}{760} \times \frac{273,15}{T} \quad (12)$$

K : mobilité ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$)

K_0 : mobilité réduite ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$)

v_d : vitesse de dérive ($m.s^{-1}$)

E : champ électrique ($V.m^{-1}$)

P : pression dans la cellule de mobilité (Torr)

T : température (K)

L : longueur de la cellule de mobilité ionique (m)

t_d : drift time (s)

D'autre part, l'équation de Mason-Schamp permet d'établir un lien entre la mobilité réduite d'un ion et sa section efficace :¹⁷

$$K_0 = \frac{3 \times e \times z}{16N} \times \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T} \times \left(\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}} \right)} \times \frac{1}{\Omega} \quad (13)$$

Ω : section efficace (m^2)

N : densité de nombre du gaz (m^{-3})

e : charge de l'électron (C)

k_b : constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$)

M : masse molaire ($kg.mol^{-1}$)

z : nombre de charges de l'ion

En combinant les équations (12) et (13), on obtient l'équation (14) dans laquelle les seuls paramètres qui ne soient ni des constantes physiques (e , k_b , π), ni des paramètres expérimentaux (N , T , P , M_{gaz} , L , E) sont la charge de l'ion, sa masse ainsi que son *drift time*, qui peuvent tous trois être déduits des mesures effectuées. Cette relation permet alors d'estimer la section efficace des ions analysés dans une cellule de mobilité de type DTIMS.⁷

$$\Omega = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273,15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T} \times \left(\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}} \right)} \times \frac{z \times t_d \times E}{L} \quad (14)$$

Dans le cas de la cellule TWIMS du Synapt HDMS la relation (14) n'est pas directement applicable sous cette forme, car d'une part le **champ électrique n'est pas constant**, et d'autre part, la **longueur parcourue par un ion dépend du nombre de mouvements de roll over** qu'il effectue au cours de son trajet. Ces deux grandeurs ne peuvent pas être déterminées dans l'état actuel des connaissances concernant le fonctionnement de la cellule TWIMS.¹⁸ Par conséquent, l'évaluation des sections efficaces est réalisée à partir de courbes d'étalonnage obtenues à l'aide d'ions dont la section efficace a préalablement été déterminée par DTIMS.¹⁹ Dans les études concernant les édifices protéiques, l'étalonnage est réalisé en analysant l'ubiquitine bovine (8565 Da), le cytochrome C bovin (12359 Da) et la myoglobine de cœur de cheval (16952 Da) en conditions dénaturantes afin d'obtenir un nombre élevé d'états de charge et donc de points d'étalonnage.^{7, 19, 20} **L'étalonnage n'est cependant pas trivial.** Pour cela les étalons sont tout d'abord analysés dans des **conditions instrumentales strictement identiques à celles utilisées pour les échantillons d'intérêt**, puis, les courbes d'étalonnage sont établies en procédant à différentes étapes de calcul.

Premièrement, en considérant les paramètres expérimentaux N , T et P constants entre la mesure de *drift time* de l'analyte d'intérêt et celle de l'analyte étalon, on définit Ω' à partir de la relation (14) :

$$\Omega' = \frac{\Omega}{z \times \sqrt{\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}}} = A \times \frac{t_d \times E}{L} \quad (15)$$

Avec :

$$A = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \quad (16)$$

De cette manière, à partir des mesures de l'échantillon étalon, il est possible d'obtenir une relation du type $\Omega' = f(t_d)$ où t_d correspond au *drift time* corrigé (cf. 3.2.1). Les résultats expérimentaux ont permis de montrer que cette relation peut être ajustée par une fonction de type puissance :^{7, 20}

$$\Omega' = a \times t_d^b \quad (17)$$

D'où :

$$\ln(\Omega') = \ln(a) + b \times \ln(t_d) \quad (18)$$

D'après la relation (18), le tracé de la droite $\ln(\Omega') = f(\ln(td))$ permet de déterminer les paramètres a et b , où a est un facteur correctif de la température, et b est un facteur correctif de la non-linéarité de la cellule de mobilité.²⁰ Lorsque les paramètres a et b ont été déterminés, la droite d'étalonnage est finalement obtenue en combinant les équations (15) et (17) :

$$\Omega = a \times t_d' \quad (19)$$

Avec

$$t_d' = t_d^b \times z \times \sqrt{\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}}$$

Connaissant la masse, la charge et le *drift time* d'un ion d'intérêt, il est alors possible de calculer la valeur de t_d' et d'évaluer sa section efficace à partir de la relation (19).

3.2.3) Comparaison avec les données structurales de cristallographie et de RMN

La section efficace d'une molécule peut être déterminée à partir des données structurales obtenues par cristallographie et par RMN. Dans le cadre de ce travail de thèse, l'ensemble des calculs de section efficace ont été réalisés à l'aide du programme MOBCAL mis en ligne par l'équipe de Jarrold,^{21, 22} auquel nous avons apporté les modifications proposées par Ruotolo et coll.⁷ En quelques mots, ce programme se base sur les coordonnées tridimensionnelles de la molécule dont il estime la section efficace à l'aide de trois méthodes :

- ▶ **La méthode « *Projection Approximation* » (PA) :** cette méthode calcule la section efficace en moyennant l'aire de la molécule projetée sur un plan sous différentes orientations. Cette méthode est rapide mais a tendance à sous-estimer la valeur de section efficace pour des ions de grande taille tels que des protéines ou des complexes biologiques.¹⁵
- ▶ **La méthode « *Trajectory Method* » (TM) :** cette méthode fournit les estimations les plus fiables car elle intègre l'ensemble des interactions ayant lieu entre les ions et les molécules de gaz. Cependant, elle nécessite un grand nombre d'itérations demandant ainsi plusieurs jours de calcul pour une protéine de taille moyenne (30 kDa).^{15, 23}
- ▶ **La méthode « *Exact Hard Sphere Scattering* » (EHSS) :** cette méthode tient compte d'une partie des interactions entre les ions et les molécules de gaz dans les limites du modèle des sphères dures. L'écart des estimations avec la méthode TM n'est que de quelques % et les calculs peuvent être réalisés en quelques heures : cette méthode offre donc le meilleur compromis pour la détermination de la section efficace de biomolécules.

L'estimation de la section efficace à l'aide de ces différentes méthodes permet de disposer de « valeurs de référence » qui sont utiles d'une part pour vérifier la fiabilité de la courbe d'étalonnage, et d'autre part pour s'assurer que les paramètres instrumentaux préalablement optimisés permettent bien de préserver la conformation des biomolécules lors de l'analyse en phase gazeuse. En cas d'indisponibilité des coordonnées tridimensionnelles d'une protéine, il est possible de réaliser une estimation grossière de sa section efficace à partir de sa masse, en utilisant pour cela la relation proposée par Ruotolo et coll. :⁷

$$\Omega = 2,435 \times M^{2/3} \quad (20)$$

Cette relation issue d'une modélisation de données de sections efficaces disponibles dans la littérature, est valable uniquement pour des ions de conformation sphérique.⁷

4) EXEMPLES D'APPLICATIONS EN MS SUPRAMOLECULAIRE

4.1) L'IMS en tant que technique séparative pour le « nettoyage » des spectres de masse

En discriminant les ions en fonction de leur mobilité, la cellule IMS du Synapt HDMS offre une **dimension de séparation supplémentaire et orthogonale à la chromatographie liquide** qui est couramment utilisée en couplage avec la MS. Dans l'exemple de la figure 10, la protéine a subi un échange de tampon et a directement été infusée sans étape de séparation supplémentaire. Le spectre de masse obtenu en combinant l'intégralité des données du *driftscope* correspond à celui qui aurait été obtenu dans le cas d'une analyse MS conventionnelle (figure 10b). On y détecte la protéine JAM-A comme attendu, avec l'existence cependant d'un important bruit de fond dans la gamme de rapports m/z 500-1500 indiquant la présence de contaminants. De manière intéressante, les ions responsables de ce bruit de fond présentent une mobilité différente de celle de la protéine et peuvent donc être extraits du *driftscope* (figure 10a). En combinant de cette manière les régions ① et ② du *driftscope* on obtient un spectre de masse exempt de ce bruit de fond et qui laisse apparaître une seconde protéine (figure 10c). En effet, en isolant la région ②, le spectre de masse obtenu met en évidence la présence d'une seconde protéine de masse plus élevée (figure 10d). Concernant finalement les contaminants, le spectre de masse correspondant à la région ③ du *driftscope* présente des pics séparés de 44 Da, caractéristiques de polymères comportant un motif éthylène glycol ($(-CH_2-CH_2-O-)_n$) tels que le polyéthylène glycol (PEG). En résumé, le « nettoyage » du spectre de masse en utilisant l'IMS comme technique de séparation en amont de l'analyse MS a permis d'identifier et d'extraire les impuretés du mélange, révélant ainsi la présence d'une protéine copurifiée faiblement abondante.

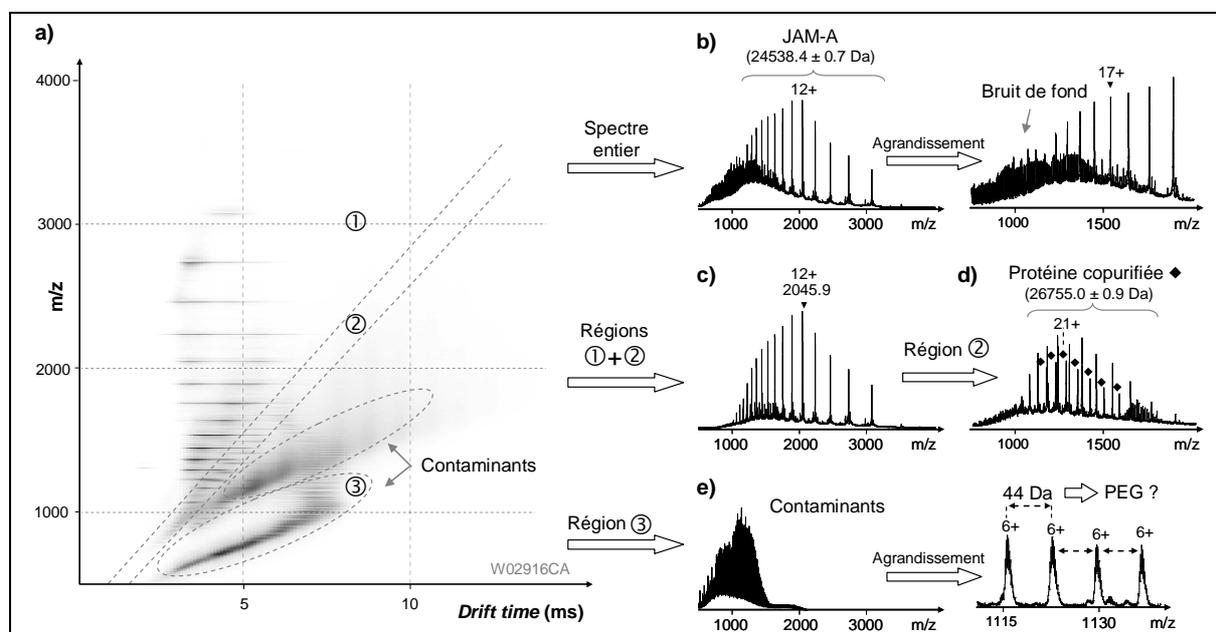


Figure 10 : Exemple d'utilisation de la cellule IMS du Synapt HDMS en tant que technique séparative. La protéine JAM-A a été diluée à 2 μ M dans un mélange eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1. (a) *Driftscope*. (b) Spectre de masse obtenu en combinant l'intégralité du *driftscope*. (c-e) Spectres de masse obtenus en combinant les données du *driftscope* situées (c) dans les régions ① et ②, (d) dans la région ② et (e) dans la région ③.

4.2) Le suivi des changements conformationnels en solution

L'une des applications potentielles de la mobilité ionique qui semble particulièrement intéressante en MS supramoléculaire consiste à **suivre les changements conformationnels des biomolécules** sous l'effet d'une modification des conditions de tampon ou encore lors de la fixation d'un ligand. Pour illustrer ce type d'applications, des expériences ont été réalisées à l'aide de la protéine AR DBD qui contient deux doigts de zinc connus pour leur rôle structurant sur les protéines (figure 11). Alors que la protéine sous sa forme *holo* (en complexe avec le zinc) est détectée sous deux états de charge (figure 11a), la protéine *apo* (sans le zinc) affiche une distribution plus large des états de charge suggérant une structure plus étendue en absence de zinc (figure 11b). De manière intéressante, l'ajout de zinc à la protéine *apo* permet de retrouver une conformation compacte (distribution étroite des états de charge) confirmant le rôle structurant du zinc sur AR DBD (figure 11c).

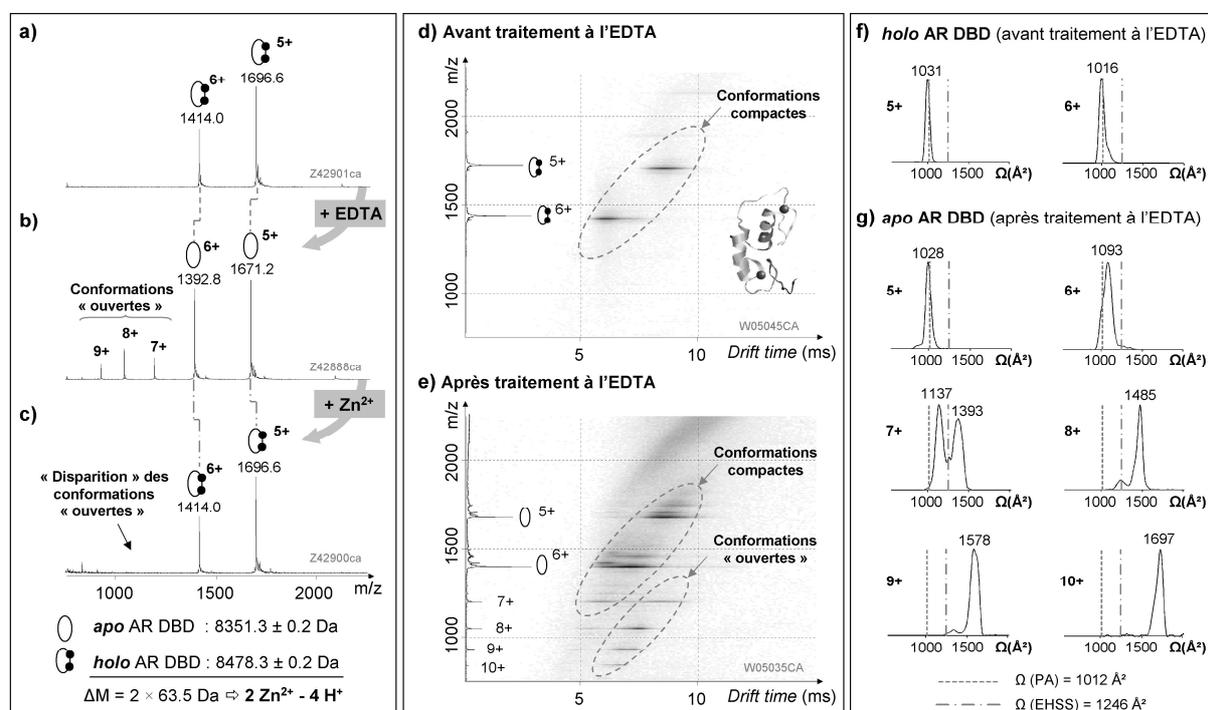


Figure 11 : Suivi par IM-MS du changement conformationnel induit par le retrait du zinc complexé par les doigts de zinc de la protéine AR DBD (*Androgen receptor DNA binding domain*). La protéine a été analysée à $5 \mu\text{M}$ dans un tampon NH_4Ac 200 mM pH 6,8. Retrait du zinc : incubation de la protéine en présence de 200 équivalents molaires d'EDTA (30 min température ambiante), suivi d'un échange contre le tampon NH_4Ac . (a-c) Spectres de masse nanoESI obtenus (a) avant, (b) après traitement à l'EDTA et (c) après ajout de 2 équivalents molaires d'acétate de zinc à la protéine *apo*. (d, e) *Driftscopes* obtenus (d) avant et (e) après traitement à l'EDTA ($V_c = 10 \text{ V}$, $bP = 4,5 \text{ mbar}$, $\text{Trap CE} = 5 \text{ V}$, $\text{Trap Bias} = 5 \text{ V}$, $P_{\text{IMS}} = 0,5 \text{ mbar}$, $\text{IMS WH} = 8 \text{ V}$, $\text{IMS WV} = 400 \text{ m/s}$, $\text{Transfer CE} = 20 \text{ V}$). (f, g) Évaluation de la section efficace des différents états de charge de la protéine sous sa forme (f) *holo* et (g) *apo*. La protéine ainsi que ses coordonnées tridimensionnelles déterminées par RMN (cf. encadré d) ont été fournies par le Dr Bruno Kieffer (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg).

En analysant AR DBD sous sa forme *holo* en IM-MS, le *driftscope* montre que les deux états de charge ont des distributions des temps d'arrivée étroites indiquant la présence d'une structure bien

définie en phase gazeuse (figure 11d). De manière intéressante, la section efficace évaluée pour ces deux états de charges est en accord avec les estimations faites à partir de la structure tridimensionnelle de la protéine en solution (figure 11f). Le fait que les valeurs de sections efficaces déduites des expériences d'IM-MS coïncident davantage avec la valeur calculée par la méthode PA de MOBCAL, suggère une structure en phase gazeuse sensiblement plus compacte que celle adoptée en solution ; il s'agit là d'une observation couramment réalisée en IMS.^{23, 24}

En analysant ensuite AR DBD sous sa forme *apo*, le *driftscope* révèle la présence de deux populations principales qui diffèrent par leur mobilité ionique (figure 11e). En effet, il a été mentionné précédemment dans ce chapitre que pour un ion de section efficace donnée, le *drift time* diminue quand la charge augmente (cf. 2.2). Alors que cette tendance est respectée pour les états de charge +7 à +10, une rupture intervient lorsque l'on passe aux états de charge +5 et +6. Cette observation suggère la présence de la protéine *apo* sous différentes conformations, les plus étendues correspondant aux états de charge +7 à +10 et les plus compactes aux états de charge +5 et +6. Cette hypothèse est confirmée en comparant les sections efficaces de ces différents états de charge. Alors que les états de charge +5 et +6 de la forme *apo* de la protéine conservent une structure compacte de section efficace identique à la forme *holo*, les états de charge +7 à +10 correspondent à différents états conformationnels dont la section efficace augmente en même temps que la charge. Dans cet exemple, l'analyse de la distribution des états de charge ainsi que les mesures de sections efficaces ont permis de démontrer l'importance du zinc pour la stabilité de la structure tridimensionnelle de la protéine AR DBD.

Un dernier point à noter concerne les droites d'étalonnage. Dans le cas présent, les sections efficaces de la protéine ont été déterminées en utilisant différents paramétrages de la cellule IMS. Les droites d'étalonnage ainsi obtenues affichent des coefficients directeurs significativement différents en fonction de la hauteur et de la vitesse des vagues de potentiel, soulignant l'importance de conserver des paramètres instrumentaux identiques entre la mesure de l'analyte et celles des étalons (figure 12).

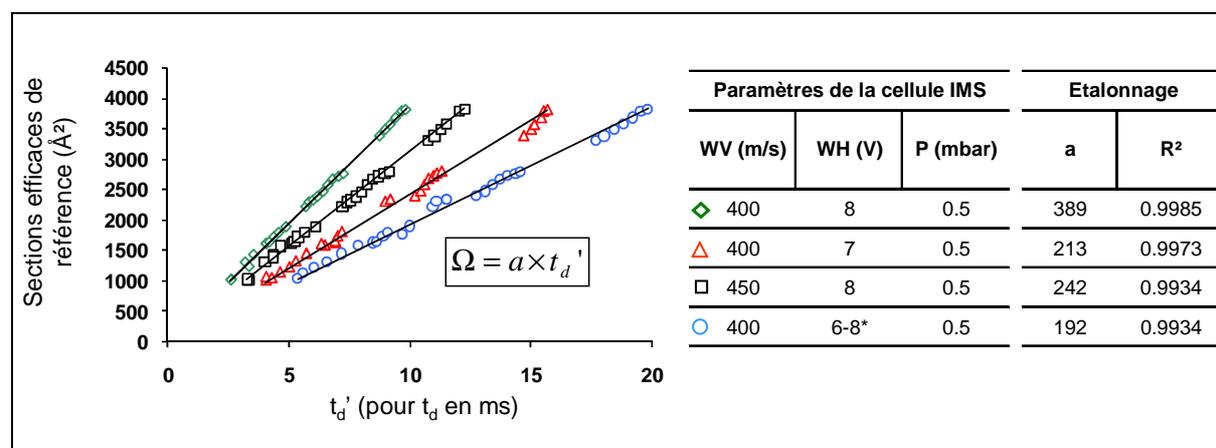


Figure 12 : Courbes d'étalonnage obtenues par analyse d'ubiquitine bovine, de cytochrome C bovin et de myoglobine de cœur de cheval en conditions dénaturantes (5 μ M dans un mélange eau / acétonitrile / acide formique 50/50/1). * rampe de hauteur de vague effectuée sur la durée entière du cycle IMS.

On note par ailleurs que dans les quatre cas, les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,99 (figure 12). De plus, le tableau 1 qui résume les valeurs de sections efficaces mesurées dans ces différentes conditions instrumentales, affiche des coefficients de variation n'excédant pas 5%. Ces résultats permettent ainsi de vérifier que la mesure de section efficace ne dépend pas des paramètres de séparation de la cellule IMS.

Paramètres de la cellule IMS			Sections efficaces (Å ²)									
WV (m/s)	WH (V)	P (mbar)	holo-AR DBD		apo-AR DBD							
			6 +	5 +	10 +	9 +	8 +	7 +	6 +	5 +		
400	8	0.5	1007	989	1709	1577	1469	1231	1131	1364	1076	989
400	7	0.5	1012	1006	1689	1564	1473	1250	1133	1370	1074	1004
450	8	0.5	1029	1087	1686	1584	1506	1220	1138	1420	1119	1082
400	6-8*	0.5	1017	1043	1703	1588	1491	1221	1147	1416	1104	1036
Moyenne			1016	1031	1697	1578	1485	1231	1137	1393	1093	1028
CV			0.9%	4.2%	0.6%	0.7%	1.2%	1.1%	0.6%	2.1%	2.0%	4.0%

Tableau 1 : Récapitulatif des sections efficaces mesurées dans différentes conditions instrumentales pour la protéine AR DBD analysée sous ses formes *holo* et *apo*. * rampe de hauteur de vague effectuée sur la durée entière du cycle IMS.

En conclusion, cet exemple illustre le potentiel du Synapt HDMS pour le **suivi de la conformation des protéines et des complexes non-covalents en solution**, pouvant ainsi apporter des informations cruciales sur la dynamique structurale d'édifices supramoléculaires en solution.

4.3) Comparaison de la forme des protéines et des complexes non-covalents

Dans l'exemple traité dans ce paragraphe nous avons souhaité évaluer le potentiel du Synapt HDMS pour **comparer la forme de biomolécules**. Cette expérience a été réalisée à l'aide de la catalase bovine et de la protéine Prx qui possèdent des masses similaires (environ 236 kDa) mais des formes différentes. En effet, la catalase forme un tétramère adoptant une structure approximativement globulaire,²⁵ alors que Prx existe sous la forme d'un décamère avec une structure annulaire.²⁶ Sur les *driftscopes* de la figure 13, les états de charge des deux protéines affichent des *drift times* homogènes indiquant l'existence d'une structure bien définie en phase gazeuse. Concernant les spectres de masse, ils montrent l'existence d'un décalage dans la distribution des états de charge de Prx vers les hautes valeurs de charge par rapport à la catalase, suggérant ainsi l'existence d'une structure plus étendue dans le cas de Prx (figure 13c).

Concernant les sections efficaces, l'estimation réalisée à partir de la masse moléculaire d'une protéine sphérique de 236 kDa affiche un résultat de 9300 Å² (relation (20), page 216), alors que les estimations réalisées à partir des *driftscopes* sont de 9950 ± 350 Å² pour la catalase et de 10870 ± 150 Å² pour Prx (figure 13d). Ces résultats confirment d'une part que ces protéines ne sont pas parfaitement sphériques et d'autre part qu'il est possible de **distinguer des molécules de formes différentes sur la base de leur section efficace** mesurée par IM-MS.

Un autre point intéressant concerne la comparaison des valeurs de sections efficaces mesurées par IM-MS et celles déduites de la structure cristallographique de ces protéines : alors que ces valeurs coïncident dans le cas de la catalase dont la structure en solution est relativement compacte (pas de grandes cavités), un écart plus important est obtenu dans le cas de la structure annulaire de Prx. De telles observations ont déjà été réalisées au préalable pour des protéines adoptant le même type de structure présentant une large cavité interne capable de s'agréger en phase gazeuse, donnant ainsi lieu à une section efficace plus faible que celle prédite d'après la structure cristallographique.¹¹ De manière intéressante, cet effondrement peut être provoqué en utilisant des conditions instrumentales suffisamment énergétiques (ex : augmentation de Trap CE) et il a même été suggéré d'utiliser cette propriété pour **distinguer la présence de larges cavités au sein des édifices protéiques**.¹⁴

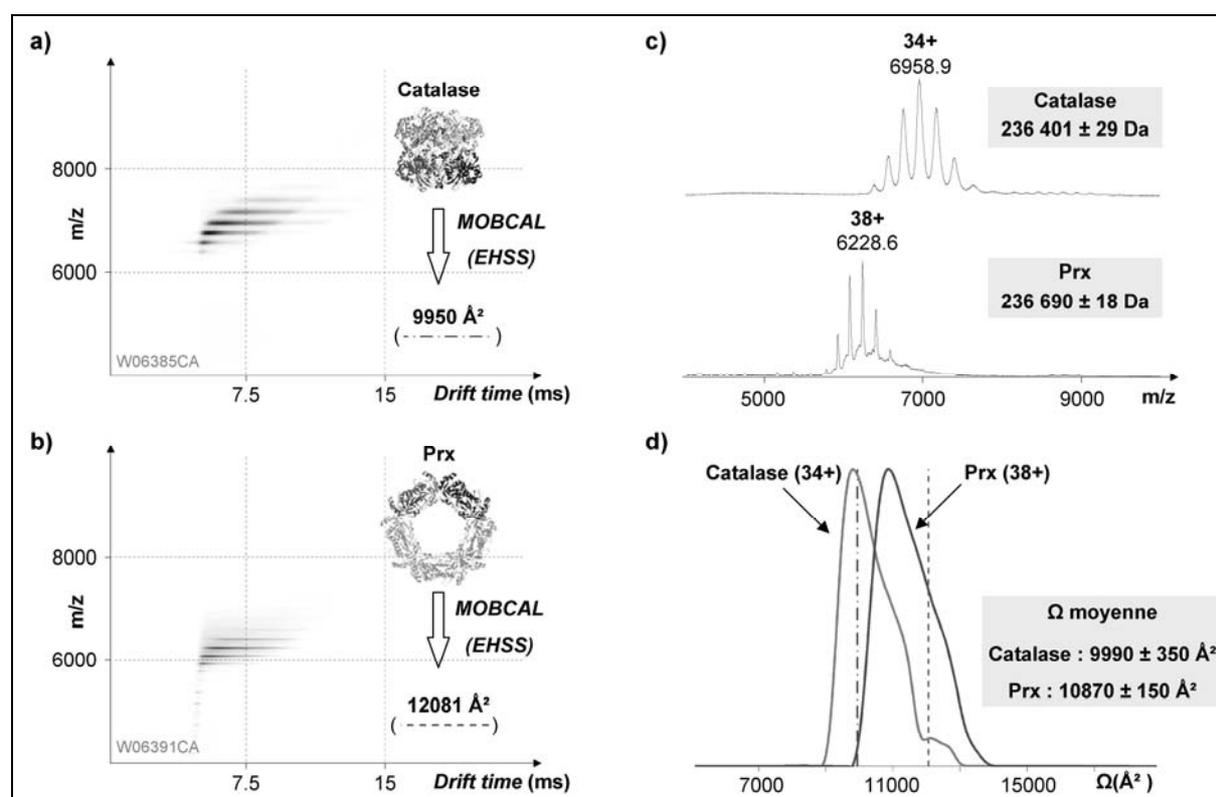


Figure 13 : Comparaison de la forme des biomolécules. Le tétramère de catalase et le décimère de Prx ont été analysés à 5 μM dans un tampon NH_4Ac 150 mM pH 6,8 ($V_c = 50$ V, $bP = 5,0$ mbar, Trap CE = 10 V, Trap Bias = 15 V, $P_{\text{IMS}} = 0,5$ mbar, IMS WH = 11 V, IMS WV = 300 m/s, Transfer CE = 50 V). (a, b) *Driftscopes* et structures cristallographiques de la catalase (PDB : 1TGU) et de Prx (PDB : 1QMV). (c) Spectres de masse obtenus en combinant l'intégralité des *driftscopes* correspondants. (d) Comparaison de la section efficace de l'état de charge principal des deux protéines. Les pointillés représentent les sections efficaces déterminées par le programme MOBCAL en utilisant les coordonnées tridimensionnelles présentes dans la banque PDB. Les sections efficaces dans l'encadré correspondent aux valeurs moyennes et aux écart-types calculés sur les cinq principaux états de charge des deux protéines.

Une dernière remarque importante dans cet exemple concerne la détermination de sections efficaces par IM-MS sur le Synapt HDMS. Dans le cas de molécules de grande taille ($\Omega > 4000$ \AA^2), cette évaluation reste encore approximative en raison de l'indisponibilité d'étalons de sections efficaces

suffisamment importantes. Cependant, bien qu'approximative, l'estimation de sections efficaces par extrapolation des droites d'étalonnage permet d'obtenir des valeurs fiables comme semble l'indiquer le bon accord entre les résultats de section efficace évaluée à partir des expériences d'IM-MS et celle déduite de la structure cristallographique de la catalase. Des sections efficaces de près de 30000 Å² ont ainsi été déterminées.²⁷ Notons pour terminer, que si l'imprécision liée à l'extrapolation de la droite d'étalonnage peut être gênante pour la détermination de sections efficaces absolues, elle n'empêche en rien la comparaison des sections efficaces mesurées dans des conditions expérimentales strictement identiques comme c'est le cas ici.

En résumé, cet exemple illustre le potentiel du Synapt HDMS pour évaluer la **section efficace d'édifices protéiques de grande taille** ainsi que pour accéder à des informations structurales, telles que la **forme globale des édifices protéiques** en solution (compacte, étendue, annulaire, etc.).

4.4) Etude de la stabilité conformationnelle des biomolécules en phase gazeuse

Dans la stratégie d'optimisation des paramètres instrumentaux proposée dans ce chapitre (cf. 3.1), il a été montré que des conditions relativement douces sont nécessaires pour pouvoir estimer la section efficace des protéines en solution. Cependant, au même titre que les expériences de CID visant à déterminer les valeurs de V_{C50} de complexes protéine / ligand (cf. Partie I, Chapitre III, 2.2.5), l'activation des protéines et des complexes non-covalents en amont de la cellule IMS peut apporter des informations intéressantes concernant **l'effet de la fixation de ligands sur la stabilité conformationnelle des biomolécules en phase gazeuse.**^{11, 28-30}

A titre d'exemple, une expérience a été réalisée avec le complexe LukS-PV / SC8 étudié dans la deuxième partie du manuscrit (cf. Partie II, Chapitre II). Dans cette étude, il a été montré que la stabilité en phase gazeuse de ce complexe est relativement importante, suggérant ainsi l'existence d'interactions électrostatiques entre les groupements sulfonates du ligand et les groupements amines de la protéine. L'analyse de ce complexe par IM-MS a tout d'abord été réalisée en utilisant des conditions instrumentales relativement douces (Trap CE = 10 V - figures 14a et 14c). Dans ce cas, les différents états de charge de la protéine et du complexe apparaissent sur le *driftscope* avec des distributions des temps d'arrivée relativement étroites, indiquant que la protéine présente une conformation homogène. La section efficace mesurée pour la protéine (2580 ± 20 Å²) est par ailleurs en bon accord avec la valeur déduite de la structure cristallographique (2650 Å²). On note également que la fixation du ligand SC8 (1489,5 Da) engendre une augmentation de la section efficace d'environ 2%. Cette différence, bien que faible, a été détectée de manière reproductible sur les 3 états de charge de la protéine et du complexe, indiquant ainsi que de **faibles différences de section efficace peuvent être mises en évidence.**²³

Dans un second temps, ce complexe a été analysé dans des conditions plus énergétiques (Trap CE = 45 V - figures 14b et 14d). Sur le *driftscope* correspondant, il est possible d'observer un élargissement significatif de la distribution des temps d'arrivée des pics de protéine libre et de complexe, élargissement qui s'accompagne d'un décalage vers les hautes valeurs de *drift times*, indiquant

l'apparition de plusieurs conformations plus étendues. En s'intéressant plus particulièrement à l'état de charge +10 de la protéine, la mesure de section efficace fait apparaître une distribution large, multimodale et centrée vers les hautes valeurs de sections efficaces. En revanche dans le cas du complexe, une structure relativement compacte est préservée dans ces conditions instrumentales, indiquant un effet stabilisateur du ligand sur la conformation de la protéine en phase gazeuse. Bien qu'un lien direct avec l'effet du ligand en solution ne puisse être établi en raison de la modification de la force des interactions non-covalentes en phase gazeuse, il est possible de faire l'hypothèse que ce ligand de grande taille qui dispose de plusieurs points d'ancrage potentiels (groupements sulfonates) puisse également stabiliser, voire figer la structure de la protéine en solution. En l'absence de structures cristallographiques du complexe, il s'agit là d'une piste supplémentaire pour tenter de comprendre la capacité de ce ligand à moduler l'activité de la protéine en solution (cf. Partie II, Chapitre II).

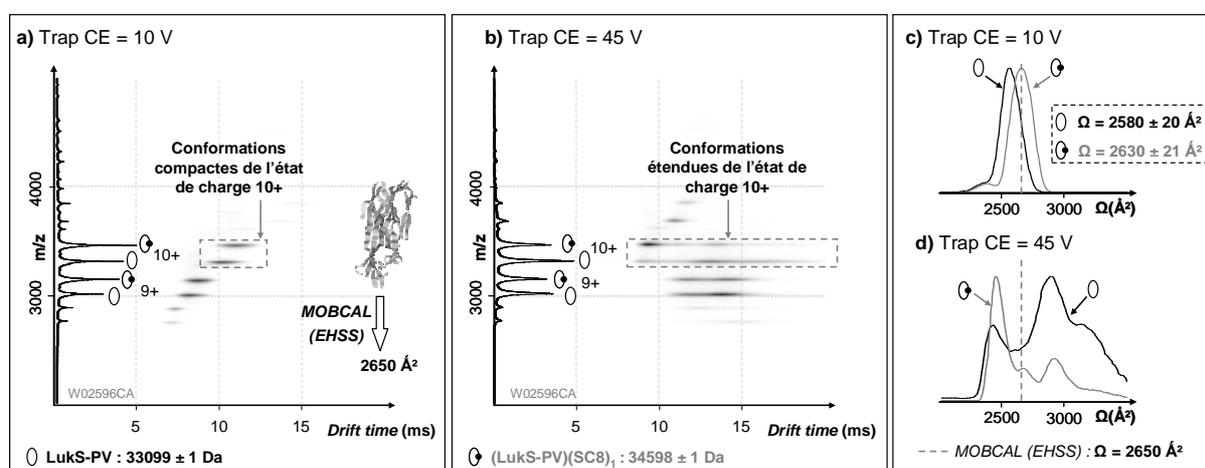


Figure 14 : Effet de la fixation du calixarène SC8 sur la stabilité conformationnelle de la protéine LukS-PV soumise à des collisions avec les molécules d'argon dans le guide d'ions *Trap* du Synapt HDMS ($P_{\text{Trap}} = 6,5 \times 10^{-2}$ mbar). Le mélange LukS-PV (5 μM) / SC8 (7,5 μM) a été analysé dans un tampon NH_4Ac 300 mM pH 7,5 en appliquant une tension *Trap* CE (a, c) de 10 V, puis (b, d) de 45 V. (a) Numéro d'accèsion PDB : 1T5R. (c) Les sections efficaces dans l'encadré correspondent aux valeurs moyennes et aux écart-types calculés sur les trois principaux états de charge. $V_c = 10$ V, $bP = 3,5$ mbar, *Trap* Bias = 25 V, $P_{\text{IMS}} = 0,75$ mbar, IMS WH = 11 V, IMS WV = 300 m/s, Transfer CE = 50 V.

5) CONCLUSIONS

La possibilité de réaliser des expériences d'IM-MS fait du Synapt HDMS un outil particulièrement intéressant pour la caractérisation de protéines natives et de complexes intacts en MS supramoléculaire. L'arrivée au laboratoire de cette nouvelle technologie a fait l'objet du travail d'évaluation et des développements méthodologiques présentés dans ce chapitre. Pour cela, un accent particulier a été mis sur la description de l'instrument, car **une connaissance détaillée de son fonctionnement est incontournable pour réaliser une optimisation des paramètres instrumentaux qui soit rigoureuse et qui garantisse la fiabilité des résultats**. Dans les quelques

exemples présentés, l'accord entre les valeurs de **sections efficaces mesurées en phase gazeuse par IM-MS** et celles déduites des structures tridimensionnelles obtenues par RMN et par cristallographie, indique que l'utilisation de **conditions instrumentales adaptées** permet de remonter à des informations concernant la **conformation d'édifices protéiques en solution**. Les différentes étapes de la mesure de sections efficaces ainsi que les paramètres instrumentaux critiques et les informations accessibles par IM-MS sont résumés sur la figure 15.

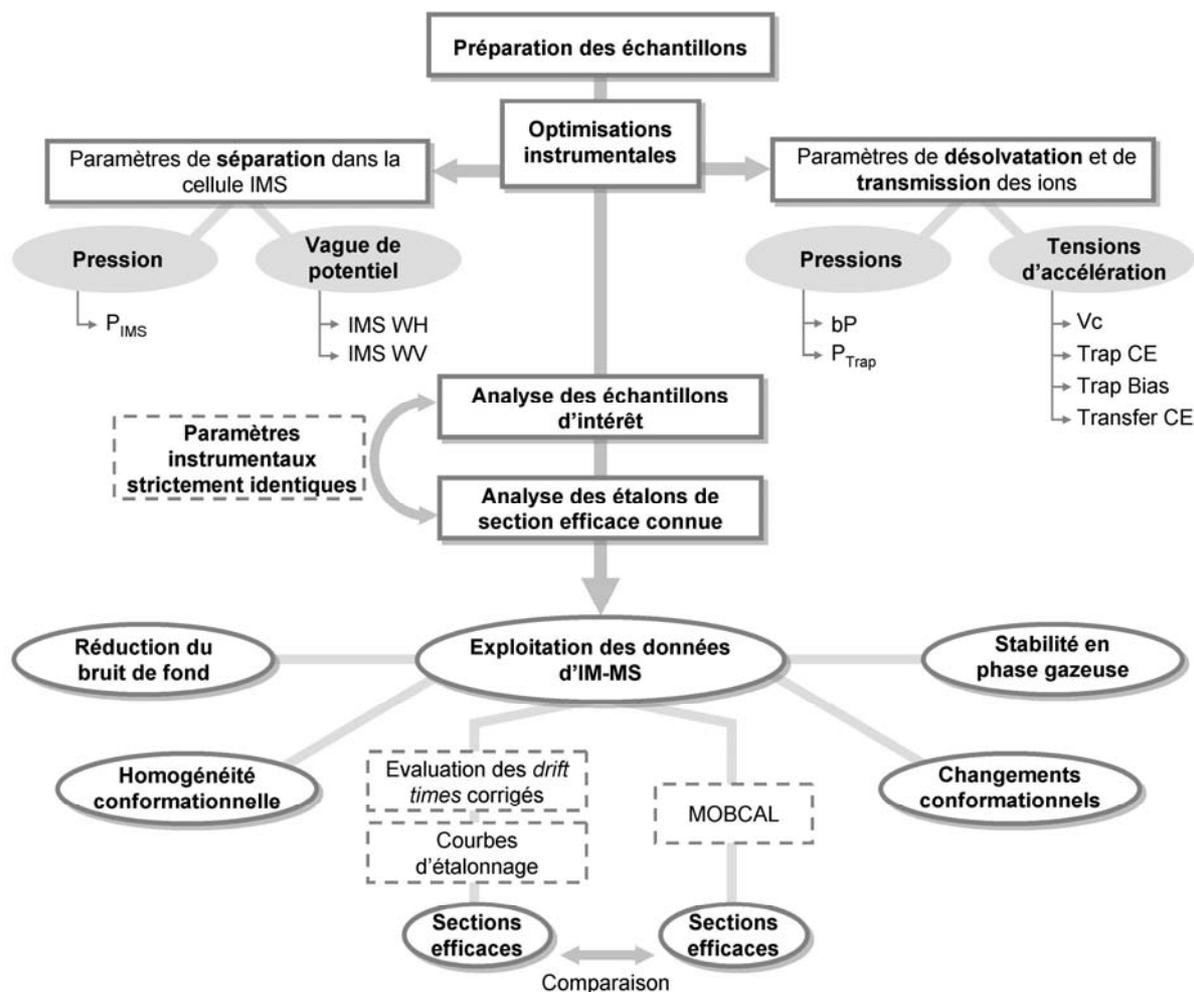


Figure 15 : Stratégie d'analyse de protéines et de complexes non-covalents par IM-MS résumant les différentes étapes de la mesure de sections efficaces, ainsi que les paramètres instrumentaux critiques et les informations accessibles.

6) VALORISATION

Les exemples illustrant les développements méthodologiques présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de la communication suivante :

- **Communication orale** : Atmanene C, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Caractérisation de complexes non-covalents par spectrométrie de masse : apports de la mobilité ionique. Réunion Utilisateurs Waters, 5 décembre 2008, Paris.

CHAPITRE II

Caractérisation de Complexes Antigène / Anticorps : Apports de la MS Supramoléculaire pour le Développement de Biomolécules Thérapeutiques

Dans ce chapitre sont décrits les résultats d'une étude illustrant le potentiel de la MS supramoléculaire pour le développement d'anticorps à visée thérapeutique, un travail réalisé en collaboration avec les équipes du Dr Nathalie Corvaia et du Dr Alain Beck (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois). Après une brève introduction concernant les propriétés caractéristiques des anticorps, nous présenterons les résultats de ce travail faisant appel au nanospray sur puce microfluidique ainsi qu'à la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse pour l'étude des propriétés de reconnaissance antigénique de l'anticorps 6F4 dirigé contre la protéine transmembranaire JAM-A.

1) INTRODUCTION AUX ANTICORPS

1.1) Généralités concernant les anticorps

Les **anticorps** ou **immunoglobulines** (Ig) sont des protéines produites par les lymphocytes B et qui interviennent dans le fonctionnement du système immunitaire. En **reconnaissant** des **antigènes** (Ag), tels que des protéines et autres molécules du non-soi, les anticorps neutralisent les corps étrangers et/ou déclenchent les mécanismes biologiques nécessaires à leur élimination.

Bénéficiant des progrès réalisés dans les biotechnologies depuis près d'une trentaine d'années, les **anticorps monoclonaux** (mAb) - c'est-à-dire issus d'une unique souche de lymphocyte B et reconnaissant de ce fait un unique **épitope** (partie de l'antigène reconnue par l'anticorps) - rencontrent un vif succès dans le traitement de pathologies graves, telles que des cancers ou des maladies auto-immunes.^{31, 32} En effet, le nombre total d'anticorps monoclonaux et de produits dérivés ayant obtenus l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) a subi une croissance exponentielle depuis une vingtaine d'années, portant ainsi leur total à 29 en 2008.^{31, 33, 34} Parmi eux, la grande majorité des anticorps monoclonaux correspond à des immunoglobulines de type IgG1 (150 kDa) dont la structure est représentée par la figure 1.³³ En comparaison à des molécules thérapeutiques de petites tailles (< 1000 Da), les anticorps monoclonaux présentent de nombreux avantages, tels qu'une meilleure **spécificité** et une meilleure **affinité** pour l'antigène cible, une **demi-vie** plus longue (jusqu'à 27 jours),³⁵ ainsi que des **effets secondaires relativement limités** par rapports aux drogues conventionnelles.

1.2) Structure et fonction des anticorps

Les anticorps présentent une structure en forme de « Y » constituée de quatre chaînes polypeptidiques (figure 1) : deux chaînes lourdes (H, 50 kDa chacune) et deux chaînes légères (L, 25 kDa chacune), elles-mêmes subdivisées en domaines variables (V) et constants (C). Ces quatre chaînes sont interconnectées entre-elles par des ponts disulfures pour former une structure complexe comprenant :

- ▶ **Une région Fab**, pour « *fragment antigen-binding* », qui correspond aux « bras » de l'anticorps. Chacune des chaînes polypeptidiques du Fab contient trois régions déterminant la complémentarité (**CDR** – « *complementary determining region* ») dont la juxtaposition permet de former le **paratope** du Fab, c'est-à-dire le site capable de fixer la partie de l'antigène appelée **épitope**.
- ▶ **Une région Fc**, pour « *fragment crystallizable* », qui correspond au « tronc » de la molécule. Cette partie joue un **rôle effecteur** en déclenchant les mécanismes destinés à éliminer les éléments du non-soi.³³ Cette région contient un site de glycosylation qui influence non-seulement la fonction effectrice de l'anticorps mais également son immunogénicité.³⁶

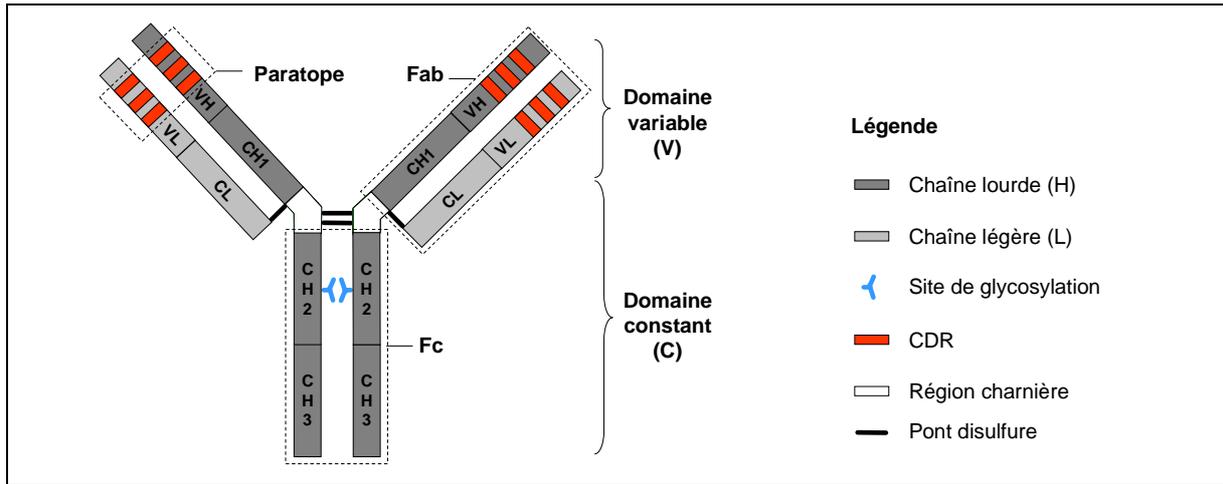


Figure 1 : Structure d'un anticorps de type IgG1.

Une étape particulièrement importante dans le développement d'un anticorps monoclonal consiste justement à réduire son **immunogénicité**. En effet, la stratégie thérapeutique initialement utilisée consistait à injecter chez l'Homme des anticorps d'origine murine. Cependant, ces molécules du non-soi sont susceptibles de déclencher une réaction du système immunitaire conduisant rapidement à leur neutralisation. Ainsi, afin d'augmenter l'efficacité des anticorps monoclonaux thérapeutiques, la stratégie actuelle consiste à remplacer les régions de l'anticorps murin n'intervenant pas dans la reconnaissance de l'antigène par la séquence en acides aminés correspondante d'un anticorps humain de la même famille. Au cours des vingt dernières années, les différentes technologies mises au point ont ainsi permis d'augmenter progressivement la proportion d'acides aminés d'origine humaine, en passant d'anticorps 100% murin à des anticorps 100% humain (figure 2), diminuant de ce fait les risques de réactions immunitaires à l'encontre des anticorps monoclonaux thérapeutiques.³²⁻³⁴

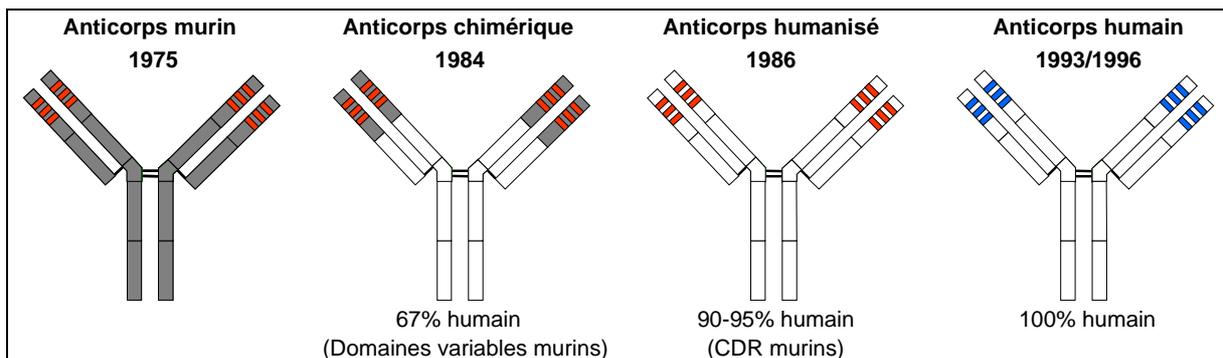


Figure 2 : Progrès réalisés dans l'optimisation des anticorps murins, adapté d'après³⁴.

1.3) Le rôle actuel de la MS dans le développement des anticorps à visée thérapeutique

Les propriétés de reconnaissance antigénique d'un anticorps monoclonal, ainsi que ses propriétés effectrices sont intimement liées à sa structure. Ainsi, il est nécessaire de disposer de techniques biophysiques complémentaires permettant de caractériser finement l'ensemble des micro-hétérogénéités jouant un rôle déterminant dans l'activité des anticorps, telles que leur séquence en acides aminés (ex : déamidation), la formation des ponts disulfures ou encore leur profil de

glycosylation.³⁷ La MS intervient de cette manière dès les premières étapes du développement de ces biomolécules à visée thérapeutique,³⁸ en faisant appel pour cela à différentes approches protéomiques résumées dans une revue récente.³⁷ Alors que le potentiel de la MS pour l'étude de la structure primaire des anticorps et de leurs modifications post-traductionnelles est clairement démontré, seules quelques d'études ont rapporté jusque-là l'observation directe de complexes non-covalents mAb / Ag par MS supramoléculaire.^{39, 40} Ainsi, c'est dans le contexte général de l'étude des propriétés de reconnaissance antigénique d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique que viennent s'inscrire les travaux décrits dans ce chapitre.

2) CONTEXTE DE L'ETUDE

Les travaux menés par l'équipe du Dr Nathalie Corvaia (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois) ont permis d'identifier la protéine transmembranaire JAM-A (*Junctional Adhesion Molecule A*) comme une cible potentielle dans le traitement contre le cancer des poumons (travaux en cours de publication). De plus, il a été montré dans cette étude que l'anticorps monoclonal murin 6F4 dirigé contre JAM-A présente des propriétés antiprolifératives et antitumorales particulièrement intéressantes.

Dans l'objectif de comprendre le mécanisme d'action de cet anticorps et de sa forme humanisée, des expériences de MS supramoléculaire ont ainsi été entreprises afin d'étudier la formation des complexes immuns entre le domaine extracellulaire de JAM-A et ces deux anticorps. Dans le cadre de ce projet mené en collaboration avec les équipes du Dr Nathalie Corvaia et du Dr Alain Beck (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois), les résultats obtenus par nanoESI-MS sur puce microfluidique et par nanoESI-IM-MS ont fait l'objet d'un article publié dans *Analytical Chemistry* (cf. page 233) dont un résumé des principaux résultats figure ci-dessous.

3) RESUME DE LA STRATEGIE MISE EN ŒUVRE ET DES RESULTATS OBTENUS

3.1) Mise en évidence d'une hétérogénéité structurale de l'antigène recombinant

La purification de l'antigène recombinant JAM-A (domaine extracellulaire – 24,5 kDa) a été réalisée de deux manières (fraction soluble et corps d'inclusion) et la mesure de masse en conditions dénaturantes a permis de mettre en évidence un **nombre de ponts disulfures** qui diffère entre les deux lots (-2 Da par pont formé). De plus, l'analyse par nanoESI-IM-MS a également révélé la présence de différentes populations au sein de chacun des lots, indiquant l'existence d'une **hétérogénéité intrinsèque liée à l'appariement des cystéines au travers de ponts disulfures** (figures 3a et 3b). Ces résultats ont d'une part été confirmés par l'analyse de l'antigène réduit pour lequel une unique population a été détectée (figure 3c), et d'autre part par une analyse LC-MS ayant confirmé la présence d'un mélange de différentes espèces.

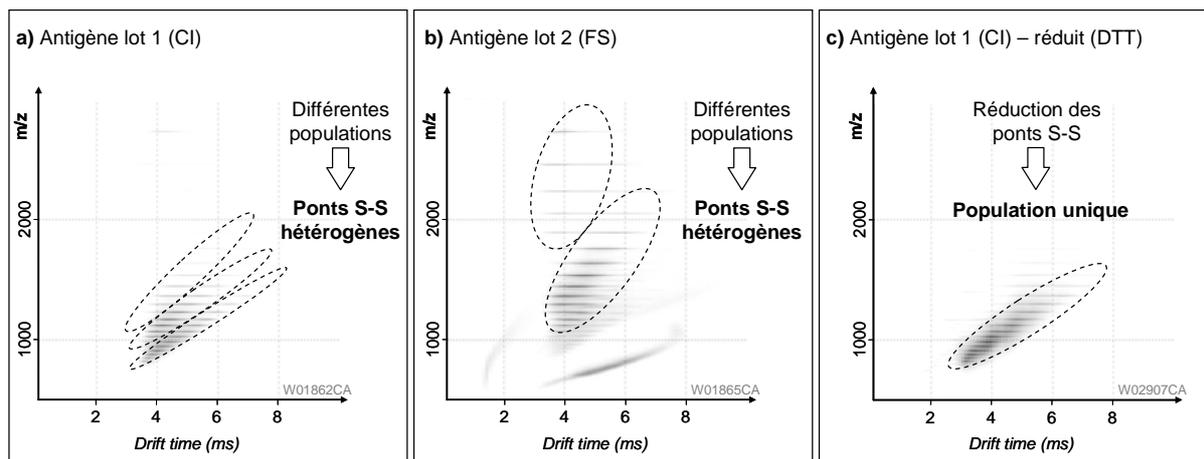


Figure 3 : Analyse des différents lots d'antigène par IM-MS en conditions dénaturantes. CI : corps d'inclusion, FS : Fraction soluble. Vc = 30 V ; bP = 2,1 mbar ; Trap CE = 10 V ; Trap bias = 25 V ; P_{IMS} = 0,5 mbar ; IMS WH = 8 V ; IMS WV = 250 m/s. Adapté d'après l'article page 233.

3.2) Influence de l'hétérogénéité des ponts disulfures sur la conformation de la protéine JAM-A native

La complémentarité de forme entre l'épitope et le paratope intervient de manière directe dans la formation des complexes immuns, c'est pourquoi les deux lots de JAM-A ont été analysés par nanoESI-MS en conditions non-dénaturantes afin d'étudier l'état de repliement de la protéine. Quel que soit le lot considéré, les spectres de masse ainsi obtenus ont mis en évidence l'existence d'un équilibre monomère / dimère de JAM-A. De plus, l'analyse de la distribution des états de charge a révélé que la protéine adopte une structure compacte en solution, confirmée par les mesures réalisées par nanoESI-IM-MS indiquant des sections efficaces homogènes et identiques quel que soit le lot analysé. Ces résultats démontrent que **l'hétérogénéité d'appariement des cystéines n'affecte pas de manière drastique l'état de repliement de la protéine en solution.**

3.3) Stœchiométrie des complexes anticorps / antigène

Afin de déterminer la stœchiométrie de fixation de JAM-A aux anticorps murin (mumAb) et humanisé (hzmAb), des expériences de titrage ont été réalisées en présence d'une quantité fixe d'anticorps et de quantités croissantes d'antigène. Quel que soit l'anticorps considéré, les spectres de masse nanoESI-MS ont ainsi montré la formation de complexes successifs contenant jusqu'à **4 molécules d'antigène par anticorps**, résultant hypothétiquement de la fixation d'un dimère de JAM-A sur chaque fragment Fab. Par ailleurs, des expériences de titrage complémentaires ont été menées avec le fragment Fab de l'anticorps humanisé, montrant la formation de complexes Fab / JAM-A de stœchiométrie 1:2 et confirmant de ce fait la possibilité pour **chaque fragment Fab de l'anticorps de fixé un dimère de JAM-A.**

3.4) Spécificité de reconnaissance de JAM-A

Dans l'objectif de vérifier la spécificité des complexes immuns détectés entre les anticorps 6F4 et JAM-A, des expériences de contrôle ont été effectuées avec un antigène et un anticorps n'étant pas sensés interagir avec les biomolécules faisant l'objet de cette étude. En effet, l'analyse par nanoESI-MS des différentes combinaisons mAb / Ag, a confirmé l'absence de complexes entre JAM-A et l'anticorps contrôle négatif ainsi qu'entre les anticorps 6F4 et l'antigène contrôle négatif. Ces résultats démontrent que **les complexes détectés en phase gazeuse résultent bien d'une reconnaissance spécifique ayant lieu en solution.**

3.5) Affinité relative des anticorps mumAb et hzmAb pour JAM-A

Le passage d'un anticorps murin à sa forme humanisée nécessite de s'assurer que l'affinité de l'anticorps pour sa cible a été conservée au cours du processus d'humanisation. Dans le cas présent, la comparaison des intensités relatives des complexes immuns formés entre JAM-A et les anticorps 6F4 murin et humanisé lors des expériences de titrage a révélé des proportions de complexes tout à fait comparables, suggérant que les deux anticorps ont des affinités du même ordre de grandeur pour JAM-A et indiquant ainsi la fiabilité du processus d'humanisation de l'anticorps.

4) CONCLUSION DE L'ETUDE

Dans cette étude, la MS supramoléculaire a permis d'obtenir des informations déterminantes concernant les propriétés de reconnaissance de l'antigène JAM-A par l'anticorps 6F4, révélant notamment la capacité de l'anticorps à fixer **spécifiquement** jusqu'à **4 molécules d'antigène** et cela avec une **affinité comparable entre ses formes murine et humanisée.**

Finalement, il faut souligner que les avantages du **nanospray sur puce microfluidique (rapidité, réduction de la consommation d'échantillon, automatisation)**, combinés au **contenu informatif** de la **mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse** contribuent à étendre le potentiel de la MS supramoléculaire comme technique biophysique complémentaire pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux et autres **biomolécules thérapeutiques de haute valeur ajoutée.**

5) VALORISATION

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet des communications suivantes :

- ▶ **Publication** : Atmanene C, Wagner-Rousset E, Malissard M, Chol B, Robert A, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Sanglier-Cianférani S. Extending Mass Spectrometry Contribution to Therapeutic Monoclonal Antibody Lead Optimization: Characterization of Immune Complexes Using Noncovalent ESI-MS. *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, 6364-6373.

- ▶ **Communication orale** : Atmanene C, Wagner-Rousset E, Colas O, Robert A, Malissard M, Chol B, Corvaia N, Beck A, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Apports de la spectrométrie de masse supramoléculaire pour l'étude des systèmes antigène / anticorps. 25^{èmes} journées françaises de spectrométrie de masse, 8-11 septembre 2008, Grenoble.
- ▶ **Communication par affiche** : Atmanene C, Wagner-Rousset E, Colas O, Robert A, Malissard M, Chol B, Corvaia N, Beck A, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Noncovalent mass spectrometry characterization of monoclonal antibody / antigen complexes. 25^{èmes} journées françaises de spectrométrie de masse, 8-11 septembre 2008, Grenoble.
- ▶ **Communication par affiche** : Atmanene C, Wagner-Rousset E, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Sanglier-Cianférani S. Antibody / antigen complexes: characterization of immune complexes using noncovalent mass spectrometry. 57th conference of the American society of mass spectrometry, 31 mai - 4 juin 2009, Philadelphie, PA, USA.

PUBLICATION

« Extending Mass Spectrometry Contribution to Therapeutic Monoclonal Antibody Lead Optimization: Characterization of Immune Complexes Using Noncovalent ESI-MS »

Cédric Atmanene*, Elsa Wagner-Rousset*, Martine Malissard, Bertrand Chol, Alain Robert, Nathalie Corvaia, Alain Van Dorsselaer, Alain Beck, Sarah Sanglier-Cianférani

Analytical Chemistry, **2009**, 81, 6364-6373.

* contribution équivalente des deux auteurs.

Extending Mass Spectrometry Contribution to Therapeutic Monoclonal Antibody Lead Optimization: Characterization of Immune Complexes Using Noncovalent ESI-MS

Cédric Atmanene,[†] Elsa Wagner-Rousset,^{**‡} Martine Malissard,[‡] Bertrand Chol,[‡] Alain Robert,[‡] Nathalie Corvaia,[‡] Alain Van Dorsselaer,[†] Alain Beck,[‡] and Sarah Sanglier-Cianféran^{**†}

Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, University of Strasbourg UDS, CNRS, UMR7178; 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France, and Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF), 5 Av. Napoléon III, BP 60497, 74164 Saint-Julien-En-Genevois, France

Monoclonal antibodies (mAbs) have taken on an increasing importance for the treatment of various diseases including cancers, immunological disorders, and other pathologies. These large biomolecules display specific structural features, which affect their efficiency and need, therefore, to be extensively characterized using sensitive and orthogonal analytical techniques. Among them, mass spectrometry (MS) has become the method of choice to study mAb amino acid sequences as well as their post-translational modifications. In the present work, recent noncovalent MS-technologies including automated chip-based nanoelectrospray MS and traveling wave ion mobility MS were used for the first time to characterize immune complexes involving both murine and humanized mAb 6F4 directed against human JAM-A, a newly identified antigenic protein (Ag) overexpressed in tumor cells. MS-based structural insights evidenced that heterogeneous disulfide bridge pairings of recombinant JAM-A alter neither its native structure nor mAbs 6F4 recognition properties. Investigations focused on mAb:Ag complexes revealed that, similarly to murine mAb, humanized mAb 6F4 binds selectively up to four antigen molecules with a similar affinity, confirming in this way the reliability of the humanization process. Noncovalent MS appears as an additional supporting technique for therapeutic mAbs lead characterization and development.

Monoclonal antibodies (mAbs) and related-products (Fab (fragment antigen binding) fragments, Fc-fusion proteins, radio-, and antibody-drug conjugates) are the fastest growing class of therapeutics with currently more than 30 G-type immunoglobulins (IgGs) and derivatives approved worldwide.¹ Because of their versatility as therapeutic agents, their high target specificity and

their lower clinical attrition rates compared to small-drugs, more than 200 mAb candidates are currently investigated in clinical trials.² Moreover beside mAbs, smaller protein scaffolds are proposed as alternatives to whole IgGs and have reached the early clinical development stage for safety and proof-of-concept studies.³

Most marketed mAbs and derivatives are indicated in oncology and in inflammatory diseases, but many other pathologies are now also successfully treated by mAbs, including ischemia, organ rejections, respiratory syncytial virus infections, asthma, psoriasis, age-related macular degeneration, hemoglobinuria as well as more and more orphan diseases.⁴

Following the first clinical attempts to use murine mAbs in human, the triggered immune responses against these “nonself” proteins led, in most cases, to a reduction of efficacy by neutralization antibodies and safety issues like infusion reactions.⁵ In the last two decades, the generation of chimeric, humanized, and human antibodies by molecular biology engineering greatly improved the immunogenic profiles of the subsequent mAbs tested in humans, by reducing the number of amino acids of mouse origin while retaining the appropriate affinity for the target antigen. Humanized mAbs are generated by grafting the 6 heavy and light chains complementary determining regions (CDRs) responsible for antigen binding, from a murine mAb of pharmacological interest, to human antibody frameworks of IgG1, 2, or 4 isotype.^{6,7} More specifically in oncology the generation of mAbs against new specific surface antigens of tumor cells constitutes a very active field involving both the generation of novel therapeutic antibodies and the identification of biomarkers.⁸

Indeed, several groups tried to identify new potential antigens as targets for immunotherapy using microarrays, phage display

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33 (0)3 90 24 26 79 (S.S.-C.); +33 (0)4 50 35 65 67 (E.W.-R.). Fax: +33 (0)3 90 24 27 81 (S.S.-C.); +33 (0)4 50 35 35 90 (E.W.-R.). E-mail: sarah.sanglier@chimie.u-strasbg.fr (S.S.-C.); elsa.wagner@pierre-fabre.com (E.W.-R.).

[†] University of Strasbourg UDS.

[‡] Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF).

(1) Beck, A.; Wurch, T.; Corvaia, N. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 421–422.

(2) Reichert, J. M. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 423–430.

(3) Wurch, T.; Lowe, P.; Caussanel, V.; Bes, C.; Beck, A.; Corvaia, N. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 502–509.

(4) Boyiadzis, M.; Foon, K. A. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8*, 1151–1158.

(5) Schneider, C. K. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 431–438.

(6) Goetsch, L.; Gonzalez, A.; Leger, O.; Beck, A.; Pauwels, P. J.; Haeuw, J. F.; Corvaia, N. *Int. J. Cancer* **2005**, *113*, 316–328.

(7) Fuh, G.; Wu, P.; Liang, W. C.; Ultsch, M.; Lee, C. V.; Moffat, B.; Wiesmann, C. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6625–6631.

(8) Davis, R. A.; Butterfield, A. M.; Konrad, R. J.; Bourdage, J. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 897–901.

technologies or proteomic approaches.⁹ Other functional approaches consist in immunization of mice with cancer cells or tissues in order to generate antibodies, which are further screened on the basis of their antitumoral properties. In a second step, the corresponding target is identified by a proteomic approach and validated using several methodologies including Western blots, immunoprecipitation and flow cytometry with transfected siRNA-treated cells. As a result of immunization with breast cancer cells (MCF-7), the murine mAb 6F4 (mumAb) was selected for its remarkable *in vitro* and *in vivo* antiproliferative and antitumoral properties (Corvaia, N. et al., manuscript in preparation). Within the same study, proteomics was used to identify mAb 6F4 target as the junctional adhesion molecule A (JAM-A), which is a single transmembrane protein belonging to the immunoglobulin superfamily.¹⁰ JAM-A localizes in tight junctions in normal epithelial and endothelial cells where homophilic JAM-A interactions were shown to be important for regulation of epithelial barrier function.¹¹ This newly identified target is overexpressed in many tumor tissues and therefore is of prime interest as a target in oncology (Corvaia, N. et al., manuscript in preparation). The lead murine mAb 6F4 antibody was then humanized (hzmAb) and a series of experiments was carried out with both antibodies in order (i) to demonstrate that the affinity and the antitumoral properties observed for the murine mAb are conserved in the humanized version, (ii) to characterize the antibody and antigen complex, and (iii) to investigate the mechanism of action of both antibodies.

In this context, sensitive and orthogonal analytical methods are required both for mAbs and recombinant target antigen structural assessment and quality control. Among them, mass spectrometry has mainly been applied to characterize mAbs at the amino acid level including their glycosylation patterns, their disulfide linkages and other post-translational modifications, which may impact on their pharmacology, pharmacokinetic, and immunogenicity.^{12–17} Mass spectrometry was also used to identify antigen epitopic and antibody paratopic regions.^{18–20} However, although soft ionization techniques have been extensively used to investigate protein–protein assemblies,^{21–24} only a limited number of articles have reported so far the detection of intact immune complexes using either matrix-assisted laser desorption/

ionization mass spectrometry (MALDI-MS) or electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). While MALDI-MS requires a preliminary chemical cross-linking of the interacting partners as well as the use of a high-mass detector,^{20,25,26} ESI-MS presents the advantage to allow the direct observation of noncovalent immune complexes without any chemical modification.^{27,28}

In the present paper, recent noncovalent MS-technologies including automated chip-based nanoESI-MS and traveling wave ion mobility mass spectrometry (TWIMS) were used to study the formation of immune complexes involving mumAb 6F4 and its humanized form raised against recombinant human JAM-A extracellular domain (ECD).

Recognition specificity of immune complexes is determined by the shape complementarity of an antibody and its target antigen, allowing specific noncovalent interactions to take place between them. Individual analysis of binding partners is of primary importance to ensure that they display the expected structural characteristics, especially those potentially involved in the molecular recognition. Consequently, as a first step in the present study, combination of both MS technologies was used to analyze recombinant antigen batches in order to verify their structural homogeneity, to determine their oligomerization state and to check that folded conformation is maintained in the experimental conditions used for binding assays. Such a quality control provided the basis of our study, ensuring thus that reliable results could be obtained with recombinant JAM-A ECD. Formation of immune complexes between JAM-A ECD and each mAb was then investigated in order (i) to determine mAb:antigen (Ag) binding stoichiometry, (ii) to assess mAbs recognition selectivity of the target antigen, (iii) to compare mumAb and hzmAb relative binding affinity toward JAM-A ECD, and (iv) to support Ag/Fab cocrystallization studies.

EXPERIMENTAL SECTION

Molecular Cloning of JAM-A ECD. A construct including the 242 amino acid extra-cellular domain of human JAM-A receptor was generated using conventional PCR methods. Oligonucleotides used for PCR amplification included 5' NcoI and 3' XhoI restriction sites for subsequent cloning into pET22b prokaryotic expression vector (Novagen, Merck Chemical, Nottingham, UK). Resulting fusion protein enclosed C-terminally located (His) × 6 tag. Nucleotide sequence was verified by DNA sequencing and the construct pET22b [JAM-A ECD] was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) strain.

Production of Recombinant JAM-A ECD and Beta2-microglobulin. A 180 mL shake flask of grown cells up to 4.0 OD_{620 nm} was used to inoculate a benchtop fermentor (Prelude–Pierre Guerin, Mauze, France) containing 1.8 L of semidefined medium and glycerol as carbon source. *E. coli* cultures were grown in fed batch mode at pH 7.0, 37 °C with 30% dissolved oxygen until the absorbance at 620 nm reaches 130 ± 10 AU. Protein expression was induced by adding 0.2 mM IPTG for

- (9) Conrotto, P.; Roesli, C.; Rybak, J.; Kischel, P.; Waltregny, D.; Neri, D.; Castronovo, V. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 2856–2864.
- (10) Mandell, K. J.; Parkos, C. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 857–867.
- (11) Mandell, K. J.; McCall, I. C.; Parkos, C. A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16254–16262.
- (12) Lim, A.; Reed-Bogan, A.; Harmon, B. J. *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 163–172.
- (13) Qian, J.; Liu, T.; Yang, L.; Daus, A.; Crowley, R.; Zhou, Q. *Anal. Biochem.* **2007**, *364*, 8–18.
- (14) Srebalus Barnes, C. A.; Lim, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 370–388.
- (15) Vlasak, J.; Ionescu, R. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 468–481.
- (16) Wagner-Rousset, E.; Bednarczyk, A.; Bussat, M. C.; Colas, O.; Corvaia, N.; Schaeffer, C.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *872*, 23–37.
- (17) Zhang, Z.; Pan, H.; Chen, X. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 147–176.
- (18) Hager-Braun, C.; Katinger, H.; Tomer, K. B. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 7471–7481.
- (19) Kiselar, J. G.; Downard, K. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1792–1801.
- (20) Pimenova, T.; Nazabal, A.; Roschitzki, B.; Seebacher, J.; Rinner, O.; Zenobi, R. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 185–195.
- (21) Heck, A. J. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927–933.
- (22) Heck, A. J.; Van Den Heuvel, R. H. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 368–389.
- (23) Loo, J. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1–23.
- (24) Loo, J. A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 175–186.

- (25) Bich, C.; Scott, M.; Panagiotidis, A.; Wenzel, R. J.; Nazabal, A.; Zenobi, R. *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 35–45.
- (26) Nazabal, A.; Wenzel, R. J.; Zenobi, R. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3562–3570.
- (27) Oda, M.; Uchiyama, S.; Robinson, C. V.; Fukui, K.; Kobayashi, Y.; Azuma, T. *FEBS J.* **2006**, *273*, 1476–1487.
- (28) Tito, M. A.; Miller, J.; Walker, N.; Griffin, K. F.; Williamson, E. D.; Despeyroux-Hill, D.; Titball, R. W.; Robinson, C. V. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 3503–3509.

5 h at 25 °C. Cells were harvested by centrifugation at 10 000g for 20 min at 4 °C.

Purification of the Soluble Fractions of JAM-A ECD and Beta2-microglobulin. Fifty grams of fresh cell dry weight were resuspended per liter of a selective extracting buffer (20 mM Tris, 400 mM arginine, complete protease inhibitor EDTA free, pH 8.0). After 4 h at 4 °C under gentle agitation, the supernatant containing soluble periplasmic proteins was recovered by centrifugation at 10 000g for 20 min. This extract was completed with 500 mM NaCl and 30 mM imidazole and filtrated (0.2 μ m) before loading on IMAC column (NiSepharose FF, GE Healthcare, Piscataway, NJ) at 140 cm/h. His-tag proteins were eluted with 250 mM imidazole and finally diafiltered by tangential flow filtration with 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0 as buffer.

Purification and Refolding of JAM-A ECD from Inclusion Bodies. *E. coli* cell pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20 (w/v) and incubated 45 min at room temperature under magnetic stirring. Cell lysis was obtained by 1 h incubation at room temperature with 0.02% lysozyme solubilized in the previous buffer. Inclusion bodies were pelleted at 10 000g for 25 min at 4 °C, resuspended in 25 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 100 mM DTT, 6 M urea and incubated 2 h at 37 °C under magnetic stirring. The crude extract containing JAM-A ECD was recovered from the supernatant of 10 000g centrifugation for 10 min at 4 °C. Two additional steps of purification including affinity and size exclusion chromatographies proceeded as follow: sample was diluted 20-fold in 25 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 6 M urea and subsequently loaded onto HiTrap chelating Sepharose column. Bound material was refolded on the resin using 1% linear gradient from 6 to 0 M urea. Elution used 0.5% imidazole linear gradient. Fractions containing JAM-A were pooled, diluted 30-fold in 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and applied onto Q-Sepharose column. Bound material was eluted with 0.5% linear gradient of NaCl. The fractions containing JAM-A were pooled, concentrated and dialyzed against 25 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, 200 mM imidazole.

Antibody Production and Purification. The recombinant antibodies analyzed in this study were expressed in eukaryotic cell lines²⁹ at the Centre d'Immunologie Pierre Fabre (Saint-Julien-en-Genevois, France) and purified using standard manufacturing procedures, including a protein A affinity chromatography step as previously described.³⁰ Humanized antibody hzmAb (IgG4, anti-hJAM-A) and a negative control (IgG4, anti-hIGF-1R) were purified from CHO and NS0 cell supernatants, respectively, whereas mumAb (anti-hJAM-A) was purified from a murine hybridoma (Corvaia N. et al., manuscript in preparation).

Papain Digestion of hzmAb and Purification of the Fab Fragment. Papain, 1 mg/mL final concentration, was activated for 30 min at 37 °C in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 3 mM EDTA, 50 mM L-cystein. Activated papain was dialyzed overnight at 4 °C against 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 3 mM EDTA. Concentration was measured using UV method. hzmAb and papain were mixed (1:1, w:w) and further incubated 24 h at 37 °C in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 10 mM EDTA, 10 mM L-cystein. The reaction was stopped by adding 50

μ g/mL final concentration of E64 (Roche, Indianapolis, IN). E64 (N-[N-(L-3-trans-carboxoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine) is a thiol protease inhibitor which specifically inhibits papain and other cysteine proteases such as cathepsin B and L, bromelain and ficin.³¹ Following dialysis against 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0, the crude Fab preparation was loaded on SP Sepharose HP column. Bound material was eluted using a 0.25% linear gradient of NaCl. Fractions containing Fab were pooled, dialyzed against 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and applied to Mono Q column. Bound material was eluted using a 1% linear gradient of NaCl. The fractions containing Fab were pooled and stored at -20 °C.

LC-MS Experiments. LC-MS experiments were performed using a HPLC system (Alliance 2695, Waters, Manchester, UK) coupled to an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT Premier, Waters, Manchester, UK). Chromatographic separation was achieved on a ZORBAX 300SB-C8 reversed-phase column 2.1 \times 150 mm, 3.5 μ m (Interchim, Montluçon, France) set at 60 °C. Reversed-phase HPLC conditions involved propanol gradient using two mobile phases with a flow rate of 0.25 mL/min. Solvent A consisted of acidified water (0.1% formic acid) and solvent B of *n*-propanol/water 90/10 containing 0.1% formic acid and 0.02% trifluoroic acid. The gradient was setup as follows: 10 min at 0% of B; 60 min with increasing B from 0 to 60%; 1 min with increasing B from 60 to 80%; and 10 min of isocratic elution at 80% of B. Elution was monitored spectrophotometrically between 210 and 300 nm. The LCT Premier was operated in W positive ion mode with a capillary voltage of 3400 V and a sample cone voltage of 150 V. Acquisitions were performed on the mass range *m/z* 500–4000 with a 1 s scan time. Calibration was performed using the singly charged ions produced by a 2 mg/L solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1/1). Data analysis was performed with MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK).

Noncovalent nanoESI-MS Experiments. Prior to noncovalent mass spectrometry experiments, samples were desalted against 150 mM ammonium acetate solution at pH 7.2 using gel filtration columns (NAP-5, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Samples were subsequently concentrated using centrifugal concentrators (Vivaspin, 3 kDa (JAM-A) and 30 kDa (mAbs) molecular weight cutoff membranes, (Sartorius, Göttingen, Germany). Protein concentration was determined with the Bradford assay using a 2 g/L BSA solution as standard.

Mass spectrometry experiments were performed on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoelectrospray device (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY). Optimal accelerating voltages applied on the sample cone (Vc) and a well-adapted pressure in the interface (Pi) were used to allow fragile noncovalent assemblies to be transferred intact from solution to the gas phase while achieving efficient ion desolvation and ion transmission through the mass spectrometer. Mass measurements under denaturing conditions were carried out by diluting samples to 2 μ M in water/acetonitrile/formic acid 50/50/1 (Vc = 30 V; Pi = 2.5 mbar).³² Experiments in nondenaturing conditions were achieved in 150 mM ammonium acetate buffer at pH 7.2 (Vc = 120 V; Pi = 6 mbar).³² External calibration was

(29) Chartrain, M.; Chu, L. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 447–467.

(30) Beck, A.; Bussat, M. C.; Zorn, N.; Robillard, V.; Klinguer-Hamour, C.; Chenu, S.; Goetsch, L.; Corvaia, N.; Van Dorselaer, A.; Haeuw, J. F. J. *Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *819*, 203–218.

(31) Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523–528.

performed using the singly charged ions produced by a 3 mg/mL solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1/1). Data analysis was performed with MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK).

Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. TWIMS experiments were performed using a hybrid quadrupole/ion mobility separator/time-of-flight instrument (Synapt HDMS, Waters, Manchester, UK) described elsewhere.³³ Samples were loaded into 4- μm i.d. PicoTip nanospray emitters (New Objective, Woburn, MA) and directly infused after calibration with a 3 mg/mL solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1/1). Ion mobility data were acquired after careful optimization of the instrumental parameters. Particularly, while the backing pressure (bP) was increased to improve ion collisional cooling, the accelerating voltage applied on the sample cone (Vc), the trap collision energy (Trap CE) and the trap bias voltage were kept to a minimum so that ions could be transferred without extensive activation before ion mobility separation while keeping a sufficient desolvation. For mobility separation, the wave height (IMS WH), the wave velocity (IMS WV) and the pressure in the ion mobility cell (P_{IMS}) were optimized to improve the separation of ions displaying different mobilities. Analyses in denaturing conditions were carried out by diluting samples to 2 μM in water/acetonitrile/formic acid 50/50/1 (Vc = 30 V; bP = 2.1 mbar; Trap CE = 10 V; Trap bias = 25 V; IMS WH = 8 V; IMS WV = 250 m/s; P_{IMS} = 0.5 mbar).³² Experiments in nondenaturing conditions were achieved in 150 mM ammonium acetate buffer at pH 7.2 (Vc = 30 V; bP = 4.0 mbar; Trap CE = 10 V; Trap bias = 25 V; IMS WH = 8 V; IMS WV = 300 m/s; P_{IMS} = 0.5 mbar).³² Collision cross section measurements were realized using a calibration curve obtained with horse heart myoglobin diluted to 2 μM in water/acetonitrile/formic acid 50/50/1 as described by Ruotolo et al.³⁴ Data analysis was performed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

RESULTS AND DISCUSSION

JAM-A ECD Displays a Heterogeneous Disulfide Bridge Pairing. Several factors like the expression system, the cell culture or fermentation conditions and the purification process are known to have a crucial impact on protein tertiary structure and especially on disulfide bridge pairing. Therefore, correct S—S bonds formation between cystein residues needs to be investigated in-depth.^{35,36}

In the context of the present study, recombinant human JAM-A ECD was expressed in *E. coli* and purified either from the soluble fraction (JAM-A SF) or from inclusion bodies (JAM-A IB). Both antigen preparations were first analyzed for quality control purposes under denaturing conditions by nanoESI-MS, nanoESI-

TWIMS and LC-ESI-MS in order to check their purity and homogeneity.

In nanoESI-MS experiments, JAM-A SF and JAM-A IB measured molecular weights are 24540.3 ± 0.5 Da and 24542.5 ± 0.6 Da, respectively, which are both in agreement with the theoretical value calculated from the amino acid sequence (24539.4 Da) (Table 1). Interestingly, JAM-A IB measured mass is 2 Da higher than JAM-A SF. Compared to JAM-A SF, JAM-A IB also displays a charge state distribution shifted toward lower m/z (Figure 1a and 1b). Both observations may be correlated to the absence of a disulfide bond in the case of JAM-A IB. Indeed, lack of disulfide linkages, resulting in wide open protein structure under denaturing conditions, was reported to increase the number of protonation sites available during the ESI ionization/desorption process.³⁷ The presence of disulfide bridges in JAM-A was evidenced in the protein crystal structure revealing two S—S bonds involving four out of the five cysteins present in the protein sequence.^{38,39} Recombinant JAM-A SF and IB batches hence contain different cystein oxidation states, thus revealing an interbatch heterogeneity.

In order to check the presence of intrabatch heterogeneities, nanoESI-TWIMS and LC-MS experiments were carried out for both antigen batches. nanoESI-TWIMS analysis in denaturing conditions reveals that multiply charged ions of JAM-A IB display lower m/z with longer drift times than those detected for JAM-A SF (Figure 1d and e). This observation confirms that JAM-A IB contains less disulfide bonds resulting in more extended protein conformations conferring lower mobilities (i.e., longer drift times) to protein ions.⁴⁰

Furthermore, detailed observation of the driftscopes of JAM-A SF and JAM-A IB reveals several ion populations differing one from the other by their mobilities (see surrounded populations on Figure 1d and e). We assume that these ion populations correspond to different gas phase conformers arising from diverse disulfide bridge pairings. In order to confirm this hypothesis, JAM-A was analyzed after DTT reduction under the same experimental and instrumental settings. As shown in Figure 1f, reduced JAM-A displays a unique ion population, which confirms that both JAM-A SF and JAM-A IB contain an intrinsic heterogeneity linked to the disulfide bridge pairing.

Finally, reversed-phase LC-MS analyses of both JAM-A batches evidence heterogeneous profiles (Figure 1g and h), whereas the protein elutes as a single peak after DTT treatment (Figure 1i). Based on measured masses, these different species can be assigned to JAM-A containing two S—S bonds (24538.4 Da), one S—S bond (24540.4 Da), or no S—S bond (24542.4 Da), supporting that initial heterogeneity is related to heterogeneous disulfide bridge pairing.

Taken together these results highlight (i) a crucial impact of the extraction process (i.e., from inclusion bodies or soluble fraction) on cysteins oxidation state of the recombinant antigen

(32) Sanglier, S.; Atmanene, C.; Chevreux, G.; Van Dorsselaer, A. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *484*, 217–243.

(33) Pringle, S. D.; Giles, K.; Wildgoose, J. L.; Williams, J. P.; Slade, S. E.; Thalassinou, K.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *261*, 1–12.

(34) Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L. P.; Sandercock, A. M.; Hyung, S.; Robinson, C. V. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1139–1152.

(35) Beck, A.; Klinguer-Hamour, C.; Bussat, M. C.; Champion, T.; Haeuw, J. F.; Goetsch, L.; Wurch, T.; Sugawara, M.; Milon, A.; Van Dorsselaer, A.; Nguyen, T.; Corvaia, N. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 588–602.

(36) Haeuw, J.-F.; Beck, A. In *Proteomics: Biomedical and Pharmaceutical Applications*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2004; pp 243–278.

(37) Loo, J. A.; Edmonds, C. G.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 693–698.

(38) Kostrewa, D.; Brockhaus, M.; D'Arcy, A.; Dale, G. E.; Nelboeck, P.; Schmid, G.; Mueller, F.; Bazzoni, G.; Dejana, E.; Bartfai, T.; Winkler, F. K.; Hennig, M. *EMBO J.* **2001**, *20*, 4391–4398.

(39) Prota, A. E.; Campbell, J. A.; Schelling, P.; Forrest, J. C.; Watson, M. J.; Peters, T. R.; Aurrand-Lions, M.; Imhof, B. A.; Dermody, T. S.; Stehle, T. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5366–5371.

(40) Valentine, S. J.; Anderson, J. G.; Ellington, A. D.; Clemmer, D. E. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3891–3900.

Table 1. Molecular Weights Measured in Denaturing Conditions (Top Panel) and Nondenaturing Conditions (Bottom Panel)^a

Denaturing conditions	Glycoforms	Calculated MW (Da)	Measured MW (Da)	Δ MW (Da)	Δ MW (ppm)
JAM-A SF	/	24 539.5 ^b	24 540.3 ± 0.5	0.8	33
JAM-A IB	/	24 539.5 ^b	24 542.5 ± 0.6	3.0	122
reduced JAM-A	/	24 539.5 ^b	24 543.5 ± 0.2	4.0	163
control Ag	/	12 767.2	12 767.5 ± 0.1	0.3	23
humanized Fab	/	47 117.6	47 117.9 ± 0.6	0.3	6
murine mAb	G0F/G0F	147 073	147 099 ± 5	+26	177
	G0F/G1F	147 236	147 256 ± 8	+20	136
	G0F/G2F	147 398	147 414 ± 8	+16	109
humanized mAb	G0F/G0F	147 240	147 248 ± 3	+8	54
	G0F/G1F	147 402	147 411 ± 6	+9	61
	G0F/G2F	147 565	147 570 ± 3	+5	34
	G1F/G2F	147 727	147 728 ± 7	+1	7
	G2F/G2F	147 889	147 888 ± 6	-1	7
negative control mAb	G0F/G0F	148 576	148 583 ± 3	+7	47
	G0F/G1F	148 738	148 748 ± 4	+10	67
	G0F/G2F	148 901	148 912 ± 4	+11	74
	G1F/G2F	149 063	149 074 ± 3	+11	74
	G2F/G2F	149 225	149 232 ± 2	+7	47
	G2F/G2F + Gal	149 387	149 388 ± 6	+1	7
	G2F/G2F + 2Gal	149 549	149 542 ± 10	-7	47

Nondenaturing conditions	Binding stoichiometry	Calculated MW (Da)	Measured MW (Da)	Δ MW ^a (Da)	Δ MW ^a (%)
JAM-A SF	monomer	24 539.5 ^b	24 541 ± 1	1.5	0.01%
	dimer	49 079.0 ^b	49 083 ± 1	4	0.01%
JAM-A IB	monomer	24 539.5 ^b	24 543 ± 1	3.5	0.01%
	dimer	49 079.0 ^b	49 088 ± 1	9	0.02%
murine mAb: JAM-A IB	1:0	147 073	147 099 ± 5	+26	0.02%
	1:1	171 663	171 783 ± 15	+121	0.10%
	1:2	196 205	196 368 ± 8	+163	0.10%
	1:3	220 748	220 878 ± 15	+131	0.10%
	1:4	245 290	245 485 ± 15	+195	0.10%
humanized mAb: JAM-A IB	1:0	147 240	147 248 ± 16	+8	0.01%
	1:1	171 814	172 000 ± 16	+187	0.10%
	1:2	196 356	196 522 ± 26	+166	0.10%
	1:3	220 899	221 187 ± 22	+289	0.10%
	1:4	245 441	246 067 ± 31	+626	0.30%
negative control mAb	1:0	149 074	149 088 ± 1	+14	0.01%
humanized Fab: JAM-A IB	1:0	47 118	47 122 ± 2	+4	0.01%
	1:1	71 665	71 687 ± 3	+23	0.03%
	2:2	143 329	143 410 ± 4	+81	0.06%
	1:2	96 207	96 214 ± 4	+7	0.01%

^a Δ MW = measured MW - calculated MW. ^b Antigen molecular weights are calculated based on two disulfide bridges.

and (ii) an intrinsic disulfide bridge heterogeneity observed mainly for the IB batch and to a lower extent for the SF batch.

Determination of JAM-A Oligomerization State. In some cases, small modifications of pharmaceutical proteins may have dramatic consequences on protein properties and activities,⁴¹ especially when protein conformations are altered.⁴² Given the differences observed in denaturing conditions between JAM-A SF and JAM-A IB, it was of interest to check if the disulfide bridge pairing heterogeneity is likely to induce differences in the native

conformation of the protein. nanoESI-MS and nanoESI-TWIMS experiments were thus carried out under nondenaturing conditions.

nanoESI-MS analyses of both JAM-A SF and JAM-A IB (Figure 2a and b, respectively) lead to similar ESI mass spectra with the detection of two main ion distributions in the mass ranges m/z 2000–3000 and m/z 3500–4500. These species correspond respectively to JAM-A monomer (24541 ± 1 Da for JAM-A SF and 24543 ± 1 Da for JAM-A IB) and JAM-A dimer (49083 ± 1 Da for JAM-A SF and 49088 ± 1 Da for JAM-A IB). Interestingly,

(41) Rehder, D. S.; Chelius, D.; McAuley, A.; Dillon, T. M.; Xiao, G.; Crouse-Zeineddini, J.; Vardanyan, L.; Perico, N.; Mukku, V.; Brems, D. N.; Matsumura, M.; Bondarenko, P. V. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2518–2530.

(42) Bobst, C. E.; Abzalimov, R. R.; Houde, D.; Kloczewiak, M.; Mhatre, R.; Berkowitz, S. A.; Kaltashov, I. A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7473–7481.

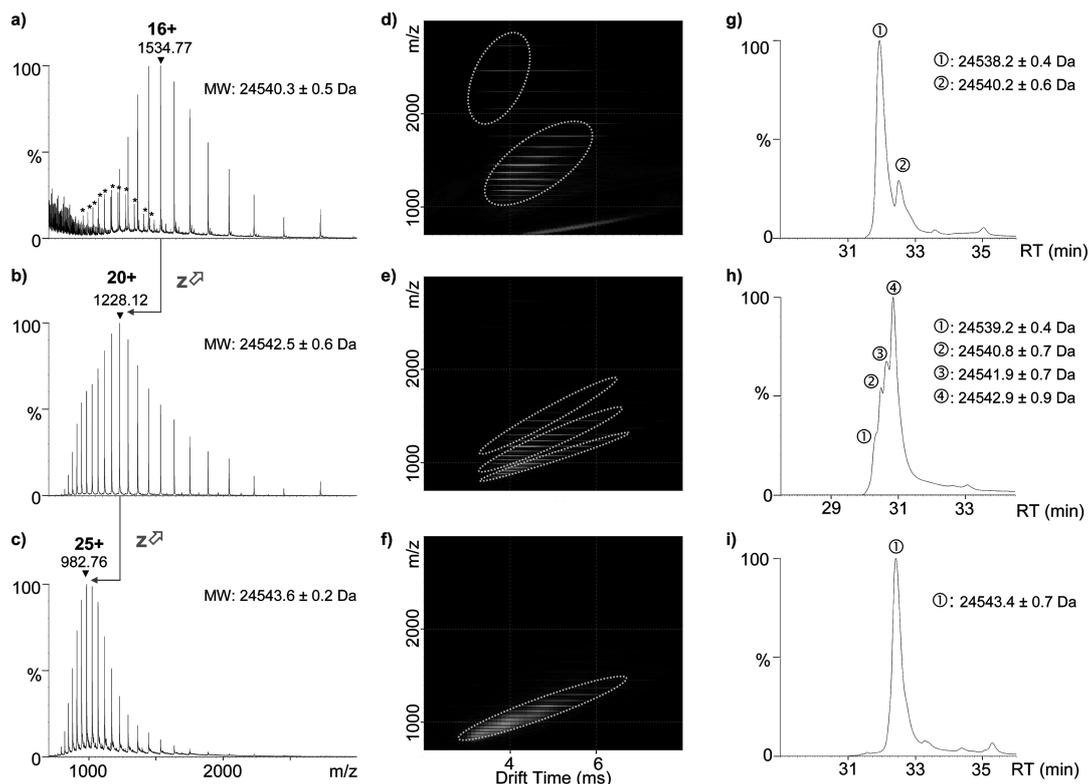


Figure 1. JAM-A analyses under denaturing conditions. (a–c) nanoESI-MS analyses of JAM-A SF, JAM-A IB, and DTT-reduced JAM-A IB, respectively. (d–f) nanoESI-TWIMS analyses of JAM-A SF, JAM-A IB, and DTT-reduced JAM-A IB, respectively. (g–i) UV trace after LC-MS analyses of JAM-A SF, JAM-A IB, and DTT-reduced JAM-A IB, respectively. * refers to a copurified protein (26754.6 ± 0.9 Da). Surrounded ions populations correspond to species with different mobility properties.

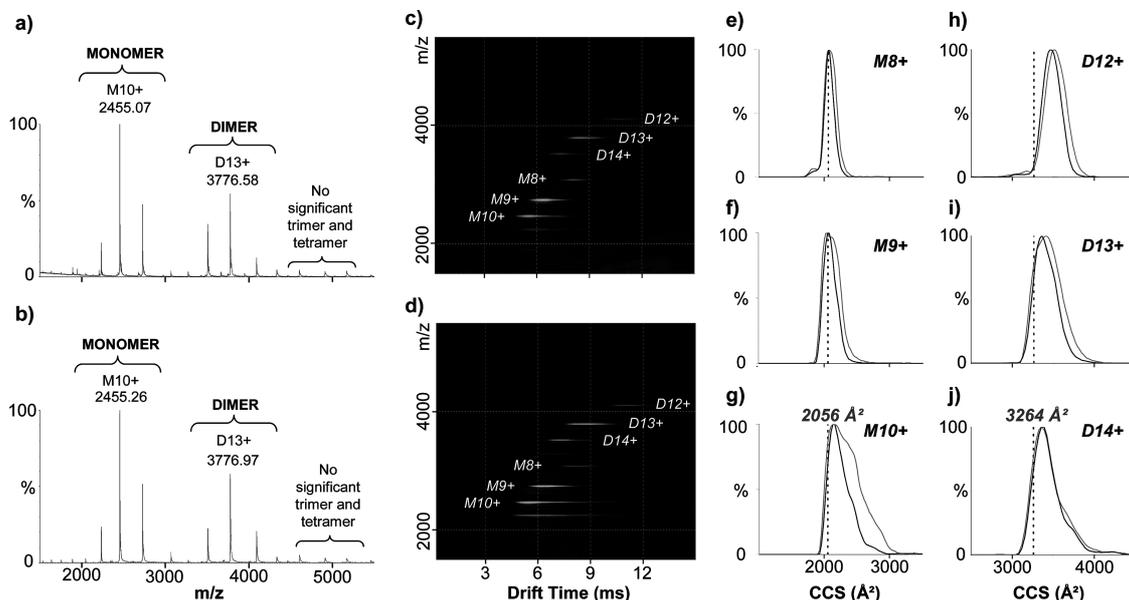


Figure 2. JAM-A analyses under non-denaturing conditions. (a, c) JAM-A SF (5 μM) and (b, d) JAM-A IB (5 μM) were analyzed either by (a, b) nanoESI-MS experiments or (c, d) nanoESI-TWIMS experiments. (e–j) Black and gray curves are related to JAM-A SF and JAM-A IB collision cross sections, respectively. Vertical dashed lines correspond to molecular weight-based estimations of collision cross sections for (e–g) JAM-A monomer and (h–j) JAM-A dimer. Numeric values for JAM-A monomer and dimer cross sections are 2056 Å² and 3264 Å², respectively.

increasing antigen concentration from 5 to 40 μM favors the dimer formation which relative intensity increases from 35 to 61% (see Supporting Information (SI) Figure S1). Detection of dimeric JAM-A is consistent with the X-ray crystallography structure

showing two antigen molecules interacting together through extensive ionic and hydrophobic interactions.³⁹ In addition, it is noteworthy that the small proportion of protein trimer and tetramer which appears at 5 μM does not significantly increase

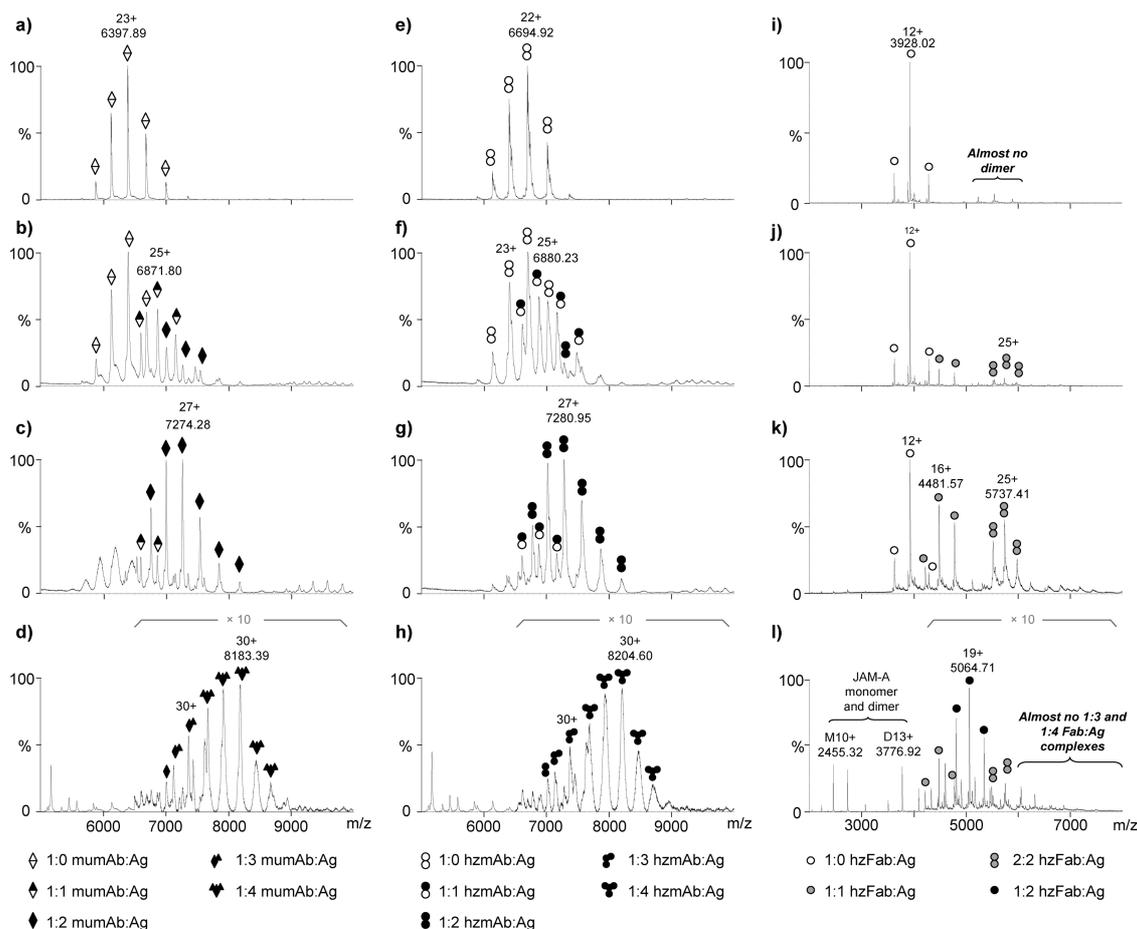


Figure 3. Determination of mAb:Ag binding stoichiometries. (a–d) mumAb was analyzed at 5 μM either (a) alone or in presence of (b) 5 μM , (c) 10 μM , and (d) 40 μM JAM-A IB. (e–h) hzmAb was analyzed at 5 μM either (e) alone or in presence of (f) 5 μM , (g) 10 μM , and (h) 40 μM JAM-A IB. (i–l) hzFab was analyzed at 10 μM either (i) alone or in presence of (j) 5 μM , (k) 10 μM and (l) 40 μM JAM-A IB.

at 40 μM (<10%) suggesting that these higher oligomerization states arise from a nonspecific aggregation occurring in solution and/or during the ESI process.

Finally, an increasing number of published works indicates that electrosprayed proteins conserve at least part of their solution phase structure when transferred in the gas phase under gentle conditions.^{43–45} Therefore, TWIMS experiments were performed under nondenaturing conditions to get further details on the native structure of the studied antigen batches. Driftscopes obtained for both JAM-A SF and JAM-A IB show the detection of antigen monomer and dimer ions with arrival time distributions ranging from 4.5 to 9 ms and from 7 to 12 ms, respectively (Figure 2c and d). On the contrary to driftscopes obtained under denaturing conditions, homogeneous monomeric and dimeric ion populations are detected under nondenaturing conditions, which is a first indication that both antigen batches are uniformly folded despite their heterogeneous S–S bonding. Moreover, Figure 2e–j represents corresponding collision cross-section (CCS) estimations

of the most intense charge states. Averaged CCS of JAM-A CI (monomer: $2205 \pm 155 \text{ \AA}^2$ and dimer: $3485 \pm 37 \text{ \AA}^2$) and JAM-A SF (monomer: $2163 \pm 116 \text{ \AA}^2$ and dimer: $3456 \pm 32 \text{ \AA}^2$) are similar and in good agreement with molecular weight-based estimations (monomer: 2056 \AA^2 and dimer: 3264 \AA^2).³⁴ Therefore, previously described heterogeneities linked to cysteins oxidation state and disulfide bridge pairing do not seem to affect the global protein conformation.

Intact mAbs Analyses. mAbs integrity and homogeneity were first checked by mass spectrometry analyses under denaturing conditions. In these conditions, each mAb displays a broad charge state distribution in the mass range m/z 2500–5000. Mass measurements were performed with a mean relative error below 100 ppm for the different glycoforms (Table 1), which gave rise to typical mAbs glycosylation profiles on deconvoluted mass spectra (see SI Figure S2).⁴⁶

Mass spectrometry analyses were then performed under nondenaturing conditions. As illustrated on Figures 3a, e and 4a, mAbs are detected in the mass range m/z 5500–7000 with narrow charge states distributions centered on the 22+ and 23+ charge

(43) Ruotolo, B. T.; Giles, K.; Campuzano, I.; Sandercock, A. M.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Science* **2005**, *310*, 1658–1661.

(44) Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 402–408.

(45) Scarff, C. A.; Thalassinou, K.; Hilton, G. R.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 3297–3304.

(46) Beck, A.; Wagner-Rousset, E.; Bussat, M. C.; Lokteff, M.; Klinguer-Hamour, C.; Haeuw, J. F.; Goetsch, L.; Wurch, T.; Van Dorsselaer, A.; Corvaia, N. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 482–501.

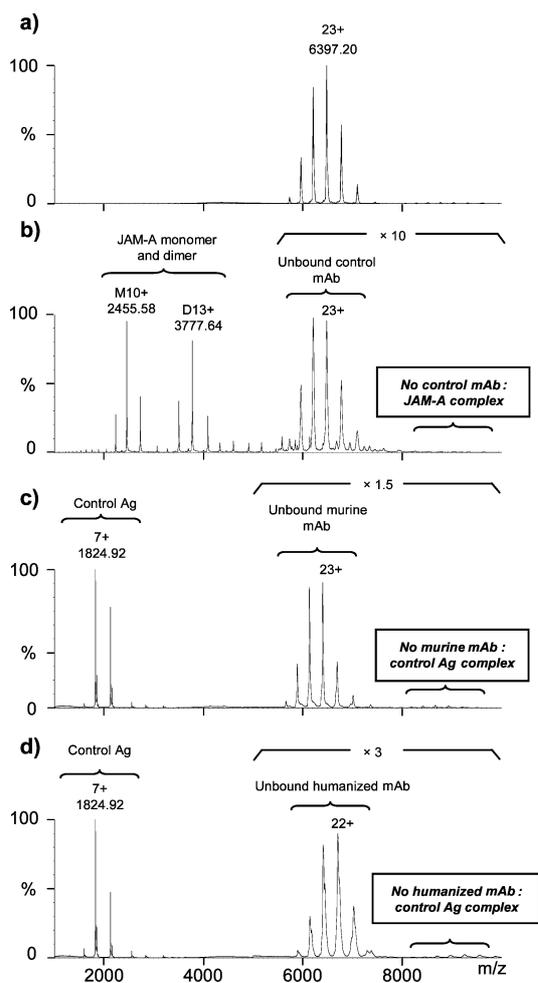


Figure 4. Assessment of mAb:Ag binding selectivity. (a–b) Negative control mAb was diluted at $5 \mu\text{M}$ either (a) alone or (b) in presence of $10 \mu\text{M}$ JAM-IB. (c) mumAb, and (d) hzmAb were incubated at $5 \mu\text{M}$ in presence of $10 \mu\text{M}$ negative control antigen.

states. This observation suggests that a native-like structure of mAbs is retained in solution.⁴⁷ In addition, efficient desalting and ion desolvation are achieved as indicated by the detection of resolved glycoforms (data not shown). For each mAb, mass measurements of the most abundant glycoforms fall within $+0.05\%$ of the corresponding theoretical molecular weights (Table 1).

mAbs Specifically Bind up to Four JAM-A Molecules. The knowledge of mAb:Ag binding stoichiometry is of primary importance to understand recognition mechanisms involved in immune complexes and to gain insights in possible mechanism of action. For several FDA and EMEA-approved mAbs, size-exclusion chromatography (SEC) was successfully used to investigate noncovalent mAb:Ag immune complexes. In the case of mAb:TNF α complexes, different stoichiometries were found for adalimumab (human IgG1, 3:3 ratio), infliximab (chimeric IgG1, 1:1 ratio), and etanercept (Fc-fusion protein, 6:3 ratio) and were correlated to different neutralizing mechanisms and

pharmacokinetic profiles.^{48,49} In the case of mAb:EGFR ECD complexes both panitumumab (human IgG2) and cetuximab (chimeric IgG1) were shown by SEC to have a 1:2 molecular ratio.⁴¹

We also used SEC to characterize mumAb and hzmAb:JAM-A ECD complexes, which yielded complicated profiles difficult to interpret from a ratio point of view (data not shown). Noncovalent nanoESI-MS titration experiments were then carried out in order to address the stoichiometry question. A fixed amount of mAb ($5 \mu\text{M}$) was incubated with increasing amounts of JAM-A IB. As shown on Figure 3b, when mumAb and JAM-A IB are present in equimolar concentrations, three species are detected: the intact mAb ($\text{MW} = 147099 \pm 5 \text{ Da}$) and two additional compounds corresponding to the formation of 1:1 and 1:2 mAb:Ag complexes ($\text{MW} = 171783 \pm 15 \text{ Da}$ and $196368 \pm 8 \text{ Da}$, respectively). Then, increasing JAM-A IB concentration up to two molar equivalents ($10 \mu\text{M}$) induces an almost quantitative shift of the equilibrium toward the formation of the 1:2 mumAb:Ag complex (Figure 3c). Finally, addition of an 8-fold molar excess of JAM-A IB ($40 \mu\text{M}$), leads mainly to the formation of a 1:4 mumAb:Ag complex ($\text{MW} = 245485 \pm 13 \text{ Da}$) with a small proportion of 1:3 complex ($\text{MW} = 220878 \pm 15 \text{ Da}$) (Figure 3d). Interestingly, in spite of this high antigen molar excess, no higher order complexes are detected which indicates that mumAb is able to bind up to four antigen molecules. The observed binding stoichiometries may result from mumAb association with JAM-A either as a monomer or as a dimer. The same kind of experiment was also performed with hzmAb. Similarly to mumAb, results depicted on Figure 3e–h demonstrate that hzmAb is able to bind up to four JAM-A IB molecules. Same experiments were carried out with JAM-A SF (data not shown) and lead to similar results, which ascertains that the previously described antigen heterogeneity does not affect mAbs 6F4 recognition. Note also that absence of heterogeneous glycosylation patterns for recombinant JAM-A ECD corresponds to a favorable case and that the use of noncovalent nanoESI-MS to monitor the formation of immune complex is limited to low-heterogeneity samples.

To gain further insights into the formation of these immune complexes, titration experiments were performed with the humanized papain-generated Fab fragment (hzFab). Since the corresponding hzmAb is bivalent, experiments used twice as much hzFab concentration ($10 \mu\text{M}$) such that hzFab and hzmAb titrations could be compared. In the presence of $5 \mu\text{M}$ JAM-A IB, the main ion distribution is related to the 11+ to 13+ charge states of unbound hzFab ($\text{MW} = 47122 \pm 2 \text{ Da}$) (Figure 3j). Two additional low intense species are detected with molecular weights of $71687 \pm 2 \text{ Da}$ and $143410 \pm 4 \text{ Da}$ which correspond to 1:1 and 2:2 hzFab:JAM-A complexes, respectively. The relative intensities of 1:1 and 2:2 complexes increase significantly when the concentration of JAM-A IB is raised to $10 \mu\text{M}$. Since the hzFab fragment appears quasi-exclusively monomeric in absence of JAM-A (Figure 3i), the detection of 2:2 complex is most likely due to the binding of two Fab fragments per JAM-A homodimer. Interestingly, increasing JAM-A IB concentration to $40 \mu\text{M}$ induces a quasi-quantitative shift of the equilibrium toward the formation of the

(48) Kim, M. S.; Lee, S. H.; Song, M. Y.; Yoo, T. H.; Lee, B. K.; Kim, Y. S. *J. Mol. Biol.* **2007**, *374*, 1374–1388.

(49) Santora, L. C.; Kaymakalan, Z.; Sakorafas, P.; Krull, I. S.; Grant, K. *Anal. Biochem.* **2001**, *299*, 119–129.

(47) Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9012–9013.

1:2 hzFab:JAM-A. Almost no higher order assemblies are detected even in the presence of such a large antigen excess. According to these results, the formation of 1:4 mAb:Ag complexes previously described must result from the recognition of two JAM-A homodimers by the antibody, each one interacting with one of the Fab arms. This unusual ratio for mAb/antigen complexes contrasts with the previously described TNF and EGFR mAbs binding ratios or with bevacizumab Fab/VEGF-A complexes (2 Fabs for 1 VEGF-A dimer, as assessed by cocrystallography).⁷ Interestingly, the fact that mAbs 6F4 are able to bind four JAM-A ECD chains suggest that these mAbs may bind JAM-A tetramers in a cellular context.

mAbs Selectively Recognize JAM-A. The great interest aroused by mAbs in the therapeutic field is largely due to their high selectivity toward their target antigen. In such a context, control experiments were designed in order to assess the selectivity of previously detected mAb:Ag complexes. For that purpose, *E. coli* produced 12.8 kDa beta2-microglobulin antigen and humanized IgG4, which specifically targets another transmembrane receptor (same subclass as our studied mAb) were selected as negative controls. Each molecular entity was first analyzed under nondenaturing conditions alone and in combination with either JAM-A or mAbs (mAb/Ag, 5 μ M/10 μ M). Analyses were performed under strictly identical experimental conditions as applied to detect previously described noncovalent immune complexes. As shown on Figure 4c and d, neither mumAb nor hzmAb bind the negative control antigen. Similarly, no complex is detected between JAM-A IB and the negative control mAb (Figure 4b). These results unambiguously confirm that both mumAb:JAM-A and hzmAb:JAM-A complexes arise from a selective recognition in solution and not from any artifact of the MS technique.

mumAb and hzmAb Display Similar Binding Affinities.

Along with specificity, affinity of mAb toward its target is crucial for its therapeutic efficiency.^{41,50,51} Many different biophysical methods are commonly used to assess the stability of mAb:Ag interactions and more generally of noncovalent complexes involving proteins,^{52,53} as for example surface plasmon resonance (SPR),⁵⁴ enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA),⁵⁵ or SEC.^{41,49} Immune complexes usually display dissociation constants in the picomolar and nanomolar ranges while noncovalent ESI-MS is much more suited to complexes with high nanomolar up to low micromolar dissociation constants.^{56,57} Moreover, considering MS response factors which include ionization efficiency, ion transmission through the mass spectrometer and detection, discrepancies are likely to occur between free mAbs and

mAb:Ag complexes due to their important mass differences.^{58–60} Nevertheless, because mumAb and hzmAb have similar molecular weights, it seems reasonable to compare the relative intensity of their complexes for a given binding stoichiometry.⁶⁰ Titration experiments in the present study (Figure 3) showed that mumAb and hzmAb generated similar complex relative intensities for a given antigen concentration suggesting similar affinity of both mAbs for JAM-A. This comparison aims at roughly estimating relative affinities and would not be reliable to detect subtle affinity changes. This approach is however valuable in the present case to ensure that the humanization process of mAb 6F4 is meaningful and does not lead to a dramatic loss of affinity for JAM-A.

CONCLUSIONS

Multiple and complementary mass spectrometry methods are used at all stages of mAbs discovery, preclinical and clinical development: selection of the best antibody-producing clone with the right glycoprofile; full structural characterization of research leads and clinical candidates; identification of “hot spots” which may be deleterious for stability, pharmacokinetics and pharmacology; comparability assays for formulation, scaling-up and process transfer. In the present study as an extension of the use of MS for antibody R&D, automated chip-based nanoESI-MS and TWIMS were used for the first time to characterize mAb:Ag complexes. Potentialities of both techniques were first illustrated through the analysis of recombinant JAM-A antigen, which revealed that inter- and intra- batch heterogeneous disulfide bridge pairings influence neither JAM-A native ternary/quaternary structure nor mu and hz mAbs 6F4 binding properties. These techniques provide thus rapid and reliable way to perform quality control of recombinant proteins.

Regarding immune complexes, nanoESI-MS experiments enlightened that murine and humanized mAbs 6F4 selectively recognize JAM-A to form specific complexes containing up to four JAM-A molecules per mAb. This 1:4 mAb:Ag binding stoichiometry was further confirmed by the detection of 1:2 Fab:Ag complexes suggesting that each Fab arm is able to bind one antigen homodimer. Our results also indicate that mumAb and hzmAb have similar relative binding affinity for JAM-A, substantiating the reliability of the humanization process.

Finally, in addition to the valuable information mentioned above, it is noteworthy that automation availability, assay rapidity (10 min/experiment) and low sample consumption (2.5 pmol mAb/experiment) make of noncovalent nanoESI-MS a powerful technique to investigate the binding properties of immune complexes. In combination with Fab/antigen cocrystallization study,⁶¹ noncovalent nanoESI-MS will undoubtedly be a strong support to gain deep insights into structure–function relationships, providing thus optimized mAb candidates for pharmaceutical and clinical development.

(50) Bachmann, M. F.; Kalinke, U.; Althage, A.; Freer, G.; Burkhart, C.; Roost, H.; Aguet, M.; Hengartner, H.; Zinkernagel, R. M. *Science* **1997**, *276*, 2024–2027.

(51) Usinger, W. R.; Lucas, A. H. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 2366–2370.

(52) Hensley, P. *Structure* **1996**, *4*, 367–373.

(53) Neri, D.; Montigiani, S.; Kirkham, P. M. *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 465–470.

(54) Lofgren, J. A.; Dhandapani, S.; Pennucci, J. J.; Abbott, C. M.; Mytych, D. T.; Kaliyaperumal, A.; Swanson, S. J.; Mullenix, M. C. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 7467–7472.

(55) Orosz, F.; Ovadi, J. *J. Immunol. Methods* **2002**, *270*, 155–162.

(56) Griffey, R. H.; Sannes-Lowery, K. A.; Drader, J. J.; Mohan, V.; Swayze, E. E.; Hofstadler, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9933–9938.

(57) Sannes-Lowery, K. A.; Griffey, R. H.; Hofstadler, S. A. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 264–271.

(58) Ayed, A.; Krutchinsky, A. N.; Ens, W.; Standing, K. G.; Duckworth, H. W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 339–344.

(59) Gabelica, V.; Galic, N.; Rosu, F.; Houssier, C.; De Pauw, E. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 491–501.

(60) Peschke, M.; Verkerk, U. H.; Kebarle, P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1424–1434.

(61) Schmitz, K. R.; Ferguson, K. M. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 659–670.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by the CNRS, the University of Strasbourg UDS, the region Alsace. We thank the Fondation pour la Recherche Médicale for financial support of a Synapt HDMS mass spectrometer. C.A. was supported by a studentship from the French Ministère de la Recherche. We acknowledge Valérie Vivat-Hannah for critical reading of the manuscript. C.A. and E.W.-R. contributed equally to this work.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Further details are given in Figures S1 and S2. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review April 8, 2009. Accepted June 24, 2009.

AC9007557

Supporting information

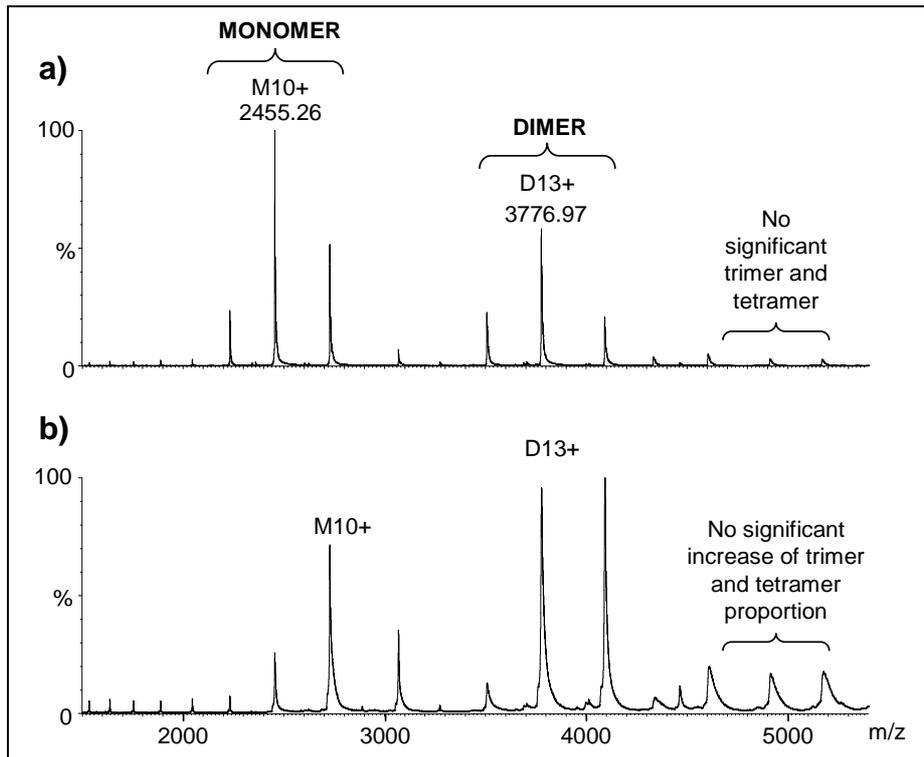


Figure S1. JAM-A IB analysis in non-denaturing conditions showing a concentration-dependant monomer / dimer equilibrium. JAM-A IB was diluted to a) 5 μM and b) 40 μM (monomer concentration) in 150 mM ammonium acetate buffer (pH 7.2).

Supporting information

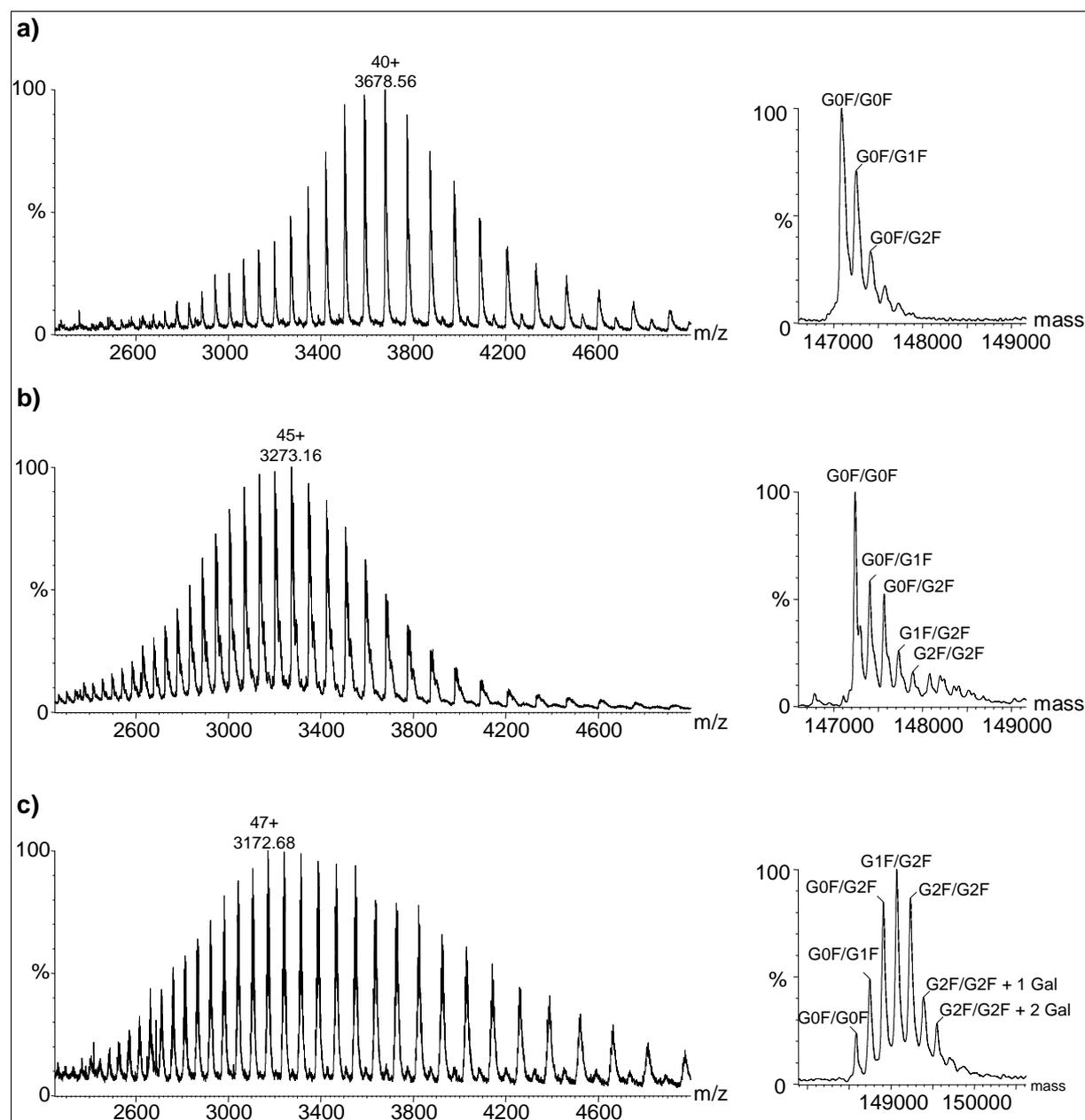


Figure S1. mAbs analyses in denaturing conditions. a) mumAb, b) hzmAb and c) negative control mAb were diluted to 5 μ M in water/acetonitrile/formic acid 50/50/1. Deconvoluted mass spectra are shown in the right-hand column. Deconvolutions were performed using MaxEnt 1 algorithm from MassLynx 4.0. Vc = 70 V, Pi = 4 mbar.

CHAPITRE III

Etude de la Dynamique Structurale de CggR, un Régulateur Transcriptionnel Ligand-Dépendant

Dans ce chapitre sont exposés les résultats d'une étude concernant la modulation ligand-dépendante des interactions protéine / ADN intervenant dans le cas de CggR, un facteur de transcription impliqué dans la régulation des mécanismes de la glycolyse chez *Bacillus subtilis*. Dans ce projet mené en collaboration avec l'équipe du Dr Nathalie Declerck (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier), la MS supramoléculaire, et plus particulièrement les mesures de sections efficaces par mobilité ionique ont permis de révéler d'importants changements conformationnels se produisant au sein du complexe CggR / ADN lors de la fixation d'un métabolite du glucose.

1) CONTEXTE DE L'ETUDE

L'utilisation du glucose comme source de carbone et d'énergie chez *Bacillus subtilis* fait intervenir plusieurs enzymes au cours des étapes de la glycolyse, l'une des principales voies du métabolisme du carbone chez cette bactérie. CggR (*central glycolytic genes repressor*) est une protéine de 37 kDa codée par le premier gène de l'opéron hexacistronique (contenant six gènes) *gapA* (figure 1a).⁴¹ Cette protéine est constituée d'un domaine de fixation à l'ADN situé du côté N-terminal (motif hélice-tour-hélice), ainsi que d'un domaine régulateur constituant la partie C-terminale de la protéine. En se fixant à l'opéron *gapA*, CggR réprime la transcription des cinq autres gènes qui codent pour des enzymes intervenant dans le mécanisme de la glycolyse (figure 1a).⁴¹

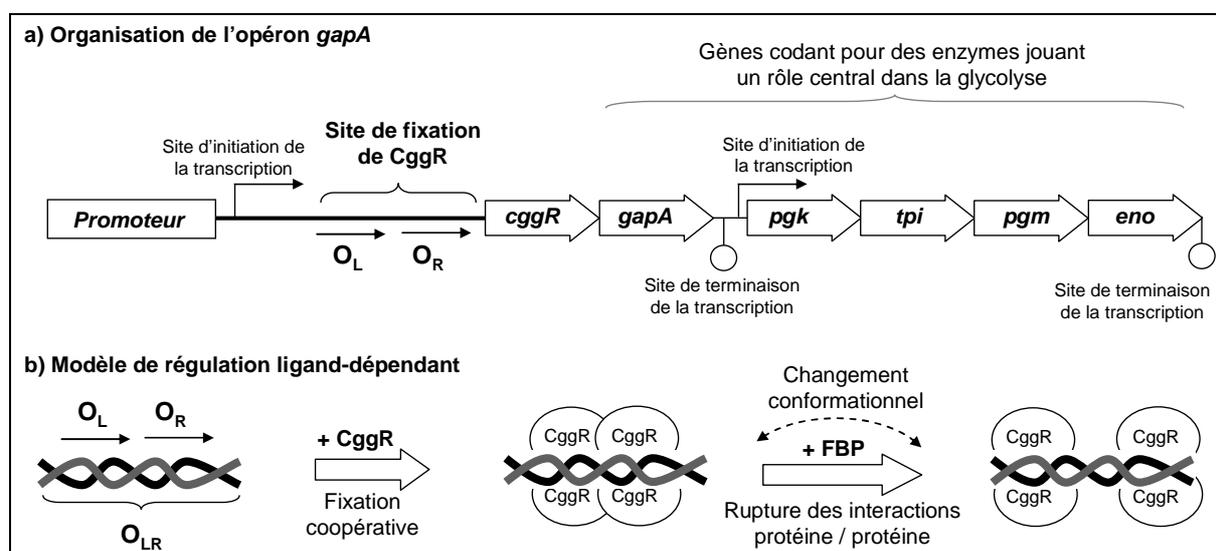


Figure 1 : (a) Organisation de l'opéron *gapA*, adapté d'après⁴². (b) Modèle de régulation ligand-dépendant de la transcription de l'opéron *gapA* : influence du FBP sur l'interaction CggR / ADN. O_{LR} : opérateur entier intégrant les demi-sites gauche (O_L) et droit (O_R).

L'interaction CggR / ADN a été étudiée par différentes techniques biophysiques. Il a ainsi été montré que la séquence nucléotidique de *gapA* reconnue par CggR est constituée d'une répétition directe de deux motifs (figures 1a), appelés opérateur demi-site gauche (O_L) et opérateur demi-site droit (O_R).⁴³ La protéine se fixe ainsi de manière coopérative sur l'opérateur entier (O_{LR}) pour former un complexe protéine / ADN de stœchiométrie 4:1 (figure 1b).⁴⁴ D'autre part, il a été montré que l'ajout de fructose-1,6-bisphosphate (FBP), un métabolite intermédiaire du glucose, modifie l'interaction CggR / ADN en se fixant au niveau du domaine régulateur de la protéine et joue ainsi le rôle d'inducteur de la transcription de l'opéron *gapA*.⁴³

Plus particulièrement, l'étude de ce mécanisme de régulation ligand-dépendant a révélé que le FBP modifie la dynamique conformationnelle du complexe CggR / ADN et abolit la coopérativité de fixation de la protéine sur l'ADN cible.⁴⁴ Il a ainsi été suggéré que la fixation de ce sucre effecteur sur CggR s'accompagne de la **dissociation des interactions protéine / protéine** au sein du complexe CggR /

ADN (figure 1b), permettant ainsi à l'ARN polymérase de procéder à la transcription de l'opéron *gapA*.⁴⁴

Dans ce projet mené en collaboration avec l'équipe du Dr Nathalie Declerck (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier), nous avons souhaité caractériser plus en détail les modifications structurales intervenant au sein du complexe CggR / ADN lors de la fixation du FBP. Les résultats ainsi obtenus par nanoESI-MS sur puce microfluidique ainsi que par nanoESI-IM-MS font l'objet d'un article en cours de préparation qui sera soumis dans *Analytical Chemistry* (cf. page 253) et dont un résumé des principaux résultats figure ci-dessous.

2) RESUME DE LA STRATEGIE MISE EN ŒUVRE ET DES RESULTATS OBTENUS

2.1) Effet de la fixation du FBP sur l'état d'oligomérisation de CggR

Les expériences menées par nanoESI sur puce microfluidique en conditions non-dénaturantes ont révélé que la protéine seule est principalement détectée sous la forme d'un tétramère accompagné d'une proportion plus faible de monomère et de dimère. De plus, en présence de quantités croissantes de FBP, le tétramère est progressivement dissocié pour ne laisser apparaître que les formes monomérique et dimérique de CggR, apportant ainsi un **premier élément de réponse concernant l'effet du FBP sur les interactions entre molécules de CggR**. Finalement, concernant la stœchiométrie d'interaction du FBP, après saturation d'un premier site de fixation, les expériences de titrage ont suggéré l'existence potentielle d'un deuxième site de fixation du FBP par protéine, venant ainsi appuyer les conclusions de précédents travaux.⁴⁵

2.2) Effet de la fixation du FBP sur les interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN

Selon le modèle exposé sur la figure 2a, la dissociation éventuelle des interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN **ne modifie pas la masse** du complexe protéine / ADN car l'opérateur O_{LR} « retient » les différentes sous-unités protéiques au sein de l'édifice supramoléculaire. En effet, les spectres de masse nanoESI ont permis de confirmer que le complexe **CggR / O_{LR} de stœchiométrie 4:1 reste quasiment intact même en présence d'un excès de FBP** conduisant à la fixation moyenne d'environ une molécule de FBP par sous-unité protéique.

Ainsi, afin de mettre en évidence une éventuelle dissociation des interactions entre les deux dimères de CggR fixés à l'ADN, un complexe a été formé en incubant CggR non pas en présence de l'opérateur entier (O_{LR}), mais uniquement avec le **demi-site** droit (O_R - figure 2b). Après purification du complexe par chromatographie d'exclusion stérique, l'analyse par nanoESI-MS sur puce microfluidique a premièrement confirmé la formation **d'un complexe CggR / O_R de stœchiométrie 4:2**. Puis, en rajoutant des concentrations croissantes de FBP, les spectres de masse nanoESI ont permis de montrer la dissociation symétrique du complexe CggR / O_{LR} de stœchiométrie 4:2 en

complexes de stœchiométrie 2:1, **démontrant ainsi la capacité du FBP à rompre les interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN.**

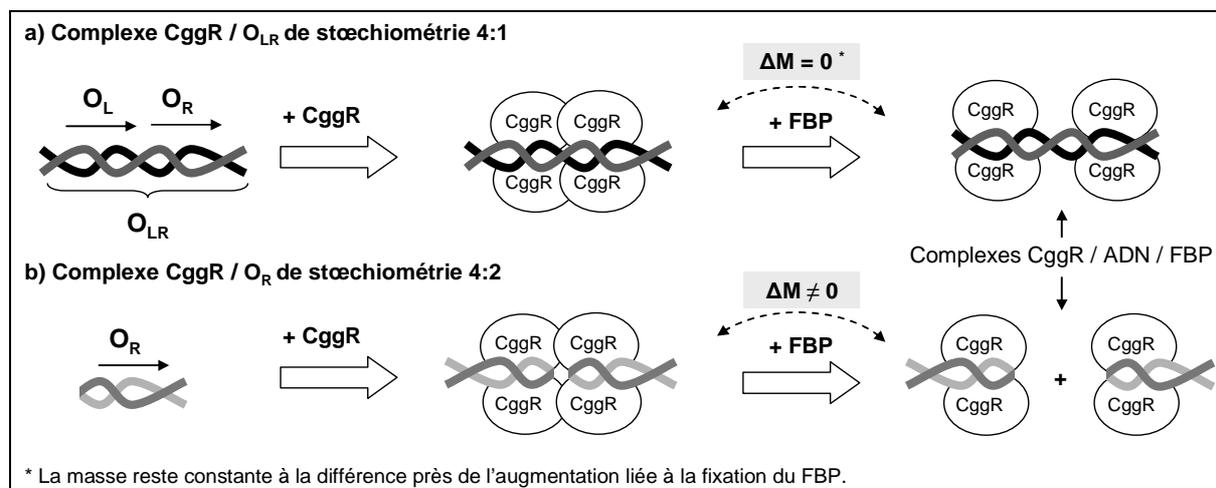


Figure 2 : Stratégie utilisée pour mettre en évidence la dissociation des interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN par mesure de masse en conditions non-dénaturantes.

2.3) Changement conformationnel du complexe CggR / ADN induit par la fixation du FBP

En l'absence de structure cristallographique du complexe CggR / O_{LR}, nous avons souhaité caractériser ce complexe en croisant les données des techniques de basse résolution que sont la **chromatographie d'exclusion stérique (SEC)**, la **diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)** ainsi que l'**IM-MS**. En ce qui concerne plus particulièrement l'IM-MS, après optimisation des paramètres instrumentaux conformément aux explications fournies dans le chapitre précédent (cf. Chapitre I, 3.1), les mesures de **section efficace** du complexe ont permis de mettre en évidence une augmentation d'environ **5%** en présence de FBP, **révélant ainsi d'importants changements conformationnels provoqués par la fixation du sucre effecteur**. De plus, la confrontation des résultats d'IM-MS, de SAXS et de SEC ont révélé un **accord intéressant** non seulement sur le **plan qualitatif** (mise en évidence des changements conformationnels), mais également sur le **plan quantitatif** (dimensions du complexe), illustrant ainsi **la capacité de l'IM-MS à fournir des informations sur la conformation des biomolécules en solution**.

2.4) Résultats complémentaires : rôle spécifique du FBP

Dans une expérience de contrôle, nous avons souhaité comparer l'effet du FBP sur le complexe CggR / O_R avec celui de dérivés tels que le fructose-1-phosphate (F1P), le fructose-6-phosphate (F6P) et le glucose-1,6-bisphosphate (GBP). Comme le montre la figure 3, bien que ces sucres soient capables de se fixer sur le complexe CggR / O_R, aucun d'entre eux n'est capable de produire un effet comparable à celui du FBP, ce qui démontre **le rôle spécifique que joue le FBP dans la modulation des interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN**.

Finalement, on considérant la stœchiométrie d'interaction du FBP, le spectre de masse de la figure 3b indique la formation de complexes CggR / O_R de stœchiométrie 2:1 contenant jusqu'à 4 molécules de FBP (2 molécules de FBP par monomère de CggR), alors que dans le cas de ses dérivés, on observe essentiellement la fixation de 1 voire 2 molécules de sucre. Le fait qu'une modification sensible du FBP engendre des effets aussi distincts sur les spectres de masse nanoESI, suggère que la fixation de deux molécules de FBP par sous-unité de CggR résulte bien d'une association spécifique en solution, et non pas d'un artefact quelconque de la technique.⁴⁶ Ces résultats corroborent ainsi une précédente étude ayant décrit l'existence de deux sites de fixation par monomère de CggR, l'un de haute affinité (K_d = 4-7 μM) et l'autre d'affinité plus faible (K_d > 100 μM).⁴⁵

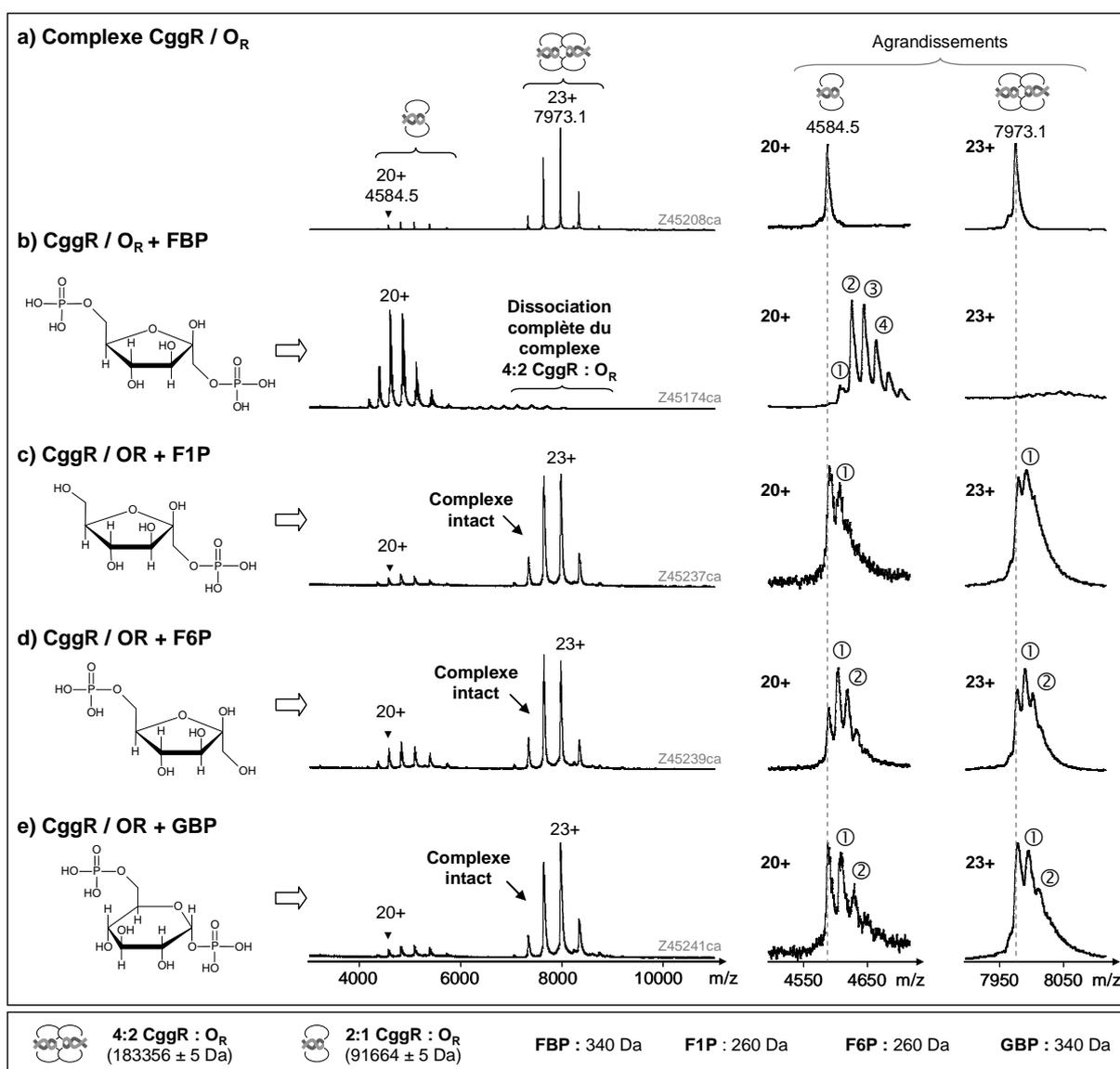


Figure 3 : Spécificité du rôle du FBP dans la modulation des interactions protéine / protéine au sein du complexe CggR / ADN. Le complexe CggR / O_R a été incubé à une concentration de 3 μM dans un tampon NH₄Ac 150 mM pH 8,0, soit a) seul, soit en présence de b) 30 μM de FBP, c) 30 μM de F1P, d) 30 μM de F6P et e) 30 μM de GBP. Les chiffres encadrés correspondent au nombre de molécules de FBP fixées sur les complexes. Les analyses ont été réalisées à l'aide du couplage Triversa Nanomate – LCT (V_{ESI} = 1,85 kV, P_{ESI} = 0,8 psi, V_c = 200 V, P_i = 7 mbar).

3) CONCLUSION DE L'ETUDE

Dans cette étude menée par MS supramoléculaire, il a tout d'abord été possible de mettre en évidence que la fixation de FBP induit la dissociation des interactions protéine / protéine assurant l'intégrité du tétramère de CggR en solution. De plus, les données obtenues par nanoESI-MS sur puce microfluidique ainsi que par nanoESI-IM-MS ont révélé que le FBP provoque également la dissociation de ces interactions au sein du complexe formé entre CggR et son ADN cible, provoquant ainsi d'importants changements conformationnels comme en témoigne l'augmentation de 5% de la section efficace du complexe lors de la fixation du sucre effecteur. Placées dans leur contexte biologique, ces informations cruciales contribuent ainsi à la compréhension du **rôle de CggR dans la régulation de la transcription de l'opéron *gapA* et plus généralement dans le mécanisme de la glycolyse chez *B. subtilis*.**

D'un point de vue plus général, cette étude a permis de mettre en valeur les développements méthodologiques réalisés durant ce travail de thèse autour du thème de la mobilité ionique, en révélant notamment **une bonne corrélation entre les mesures d'IM-MS en phase gazeuse et les données obtenues en solution par SEC et par SAXS.** De plus, dans cet exemple, il a été possible d'étudier simultanément la formation de complexes **protéine / protéine, protéine / ligand, protéine / ADN et protéine / ADN / ligand**, pour remonter au final à des informations de **stœchiométrie**, de **spécificité**, de **dynamique d'assemblage** ainsi que de **dynamique conformationnelle**, illustrant ainsi la **versatilité de l'approche MS supramoléculaire pour la caractérisation d'édifices biologiques.**

4) VALORISATION

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'un article en cours de rédaction pour une soumission dans *Analytical Chemistry* :

- ▶ **Publication** : Atmanene C, Chaix D, Royer CA, Declerck N, Van Dorselaer A, Sanglier-Cianferani S. Combination of Noncovalent Mass Spectrometry and Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry Reveals Sugar-Induced Conformational Changes of CggR / DNA Complex.

PUBLICATION

« Combination of Noncovalent Mass Spectrometry and Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry Reveals Sugar-Induced Conformational Changes of CggR / DNA Complex »

Cédric Atmanene, Denix Chaix, Catherine A. Royer, Nathalie Declerck,
Alain Van Dorsseleer, Sarah Sanglier-Cianferani

Article en cours de préparation

Combination of Noncovalent Mass Spectrometry and Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry Reveals Sugar-Induced Conformational Changes of CggR / DNA Complex

Cédric Atmanene¹, Denix Chaix², Catherine A. Royer², Nathalie Declerck², Alain Van Dorsselaer¹, and Sarah Sanglier-Cianferani^{1*}

¹ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, University of Strasbourg UdS, CNRS UMR7178; 25 rue Becquerel, 67087 STRASBOURG, France

² INSERM (UMR554), Centre de Biochimie Structurale, CNRS (UMR5048), and Université Montpellier 1, 29, rue de Navacelles, F-34090 Montpellier, France

* Corresponding author: Dr Sarah Sanglier-Cianféran, phone: +33 (0)3 68 85 26 79, fax: +33 (0)3 68 85 27 81, e-mail: sarah.sanglier@chimie.u-strasbg.fr

Abstract

The central glycolytic genes repressor (CggR) is a 37-kDa transcriptional repressor protein which plays a key role in *Bacillus subtilis* glycolysis by regulating the transcription of the *gapA* operon. Fructose-1,6-bisphosphate (FBP), identified as the effector sugar, has been shown to abolish the binding cooperativity of CggR to its DNA target and to modify the conformational dynamics of the CggR:DNA complex. In the present study, noncovalent mass spectrometry (MS) was used to get deeper insights into FBP-dependent CggR:DNA interactions. FBP binding effect on CggR alone and on CggR:DNA complex was examined using automated chip-based nanoelectrospray MS and traveling wave ion mobility mass spectrometry (TWIMS). Results first enlightened that tetrameric CggR is dissociated into dimers upon FBP binding. We then evidenced that FBP binding to CggR:DNA complex triggers the disruption of intermolecular protein:protein interactions within the complex, which significantly affects its conformation as evidenced by a 5% increase of its collision cross section. For the first time, the use of TWIMS to probe ligand-induced conformational modifications of a protein:DNA complex is reported, with an emphasis on instrumental tuning and comparison with in-solution techniques.

Abbreviations:

CggR, Central glycolytic genes repressor; FBP, Fructose-1,6-bisphosphate; F6P, Fructose-6-phosphate; nanoESI-MS, nanoelectrospray ionization mass spectrometry; TWIMS, Traveling wave ion mobility mass spectrometry; CCS, collision cross-section

Keywords:

Traveling wave ion mobility, noncovalent mass spectrometry, automated chip-based nanoelectrospray, protein – DNA interactions, central glycolytic genes repressor

INTRODUCTION

The central glycolytic genes repressor (CggR) is a 37-kDa transcriptional repressor protein which plays a key role in *Bacillus subtilis* glycolysis by regulating the transcription of the *gapA* operon.¹⁻³ While CggR is encoded by the first gene of this hexacistronic operon, key glycolytic enzymes are the products of the five additional genes.^{4, 5} CggR is able to bind to a DNA operator sequence located in the *gapA* leader region, acting thus as transcriptional repressor of *gapA* genes.⁶ The full-length operator consists of a 45-basepair DNA sequence containing two direct repeats.⁶ Interactions between CggR and both the full-length operator (O_{LR}) as well as the independent left (O_L) and right (O_R) half-site operators have been extensively studied using several biophysical techniques.⁶⁻⁹ In particular, those investigations revealed that CggR, initially present in solution as a concentration-dependent mixture of different oligomers, binds to the target DNA as a tetramer.^{7, 9} Moreover, CggR oligomerization state and its interaction with DNA have been shown to be modulated by the binding of fructose-1,6-bisphosphate (FBP).^{6, 7, 9} While this sugar prevents the formation of CggR higher order oligomers (higher than dimer), it also modifies the

binding cooperativity of CggR to its DNA target: increased FBP concentrations induce a decrease in CggR affinity for its DNA partner.^{7, 9, 10} These observations have been interpreted as arising from disruption of intermolecular protein:protein interactions, leading to the dissociation of CggR tetramer in two independent dimers which remain “sealed” to the DNA sequence, preserving thus the 4:1 CggR:DNA binding stoichiometry.⁹

Deciphering such intricate biological mechanisms involved in the regulation of genes expression is a challenging task, which often requires complementary approaches combining the benefits of orthogonal biophysical techniques to study protein:DNA interactions. In this context, nanoelectrospray mass spectrometry (nanoESI-MS) plays a key role as demonstrated by the growing number of reported works focused on the characterization of protein:oligonucleotide complexes.¹¹⁻¹⁹ Since the first evidences of the possibility to analyze intact noncovalent assemblies in the gas phase using electrospray ionization,^{20, 21} important methodological and instrumental achievements have been realized, allowing now complexes of various compositions and different sizes ranging from some hundreds up to more than millions Daltons to be investigated with this technique.²² Based on accurate

mass measurements, noncovalent MS (i.e., MS for the study of noncovalent assemblies) can provide crucial information on protein oligomerization states and protein:ligand binding stoichiometries.²³⁻²⁵ Moreover, MS-based strategies have also been developed to get insights into the 3D architecture of intact proteins and noncovalent complexes. These strategies include charge state distribution analysis,²⁶⁻²⁸ limited proteolysis,²⁹⁻³¹ footprinting techniques (e.g., H/D exchange,²⁶⁻²⁸ or hydroxyl radical labeling^{28, 32, 33}) as well as chemical and gas-phase dissociation of intact complexes,^{12, 23, 34} which altogether provide information on topology, solvent-exposed area, interaction networks and conformational dynamics of supramolecular assemblies.

More recently, traveling-wave ion mobility mass spectrometry (TWIMS) has been introduced as a powerful technique to probe the size / shape of macromolecular ions in the gas phase.^{22, 35-41} The basic principle of TWIMS relies on the ability of gas phase ions to fly through a neutral buffer gas under the influence of a weak electric field. Ions with extended structure experience more collisions with the buffer gas than ions with compact structure. Since those collisions impede ions progression through the ion mobility cell, information on the shape / size of gas-phase ions can be derived from the measurement of their drift time, i.e., the time required by an ion to go through the ion mobility cell.

In the present work, we used a combination of MS-based techniques to investigate FBP-modulated interactions between CggR and its target DNA. As a first step, automated chip-based nanoESI-MS experiments were carried out in nondenaturing conditions to investigate FBP binding effect on both CggR oligomerization state and CggR:DNA complex stability. Using a protein:DNA assembly formed with two independent DNA binding sites (half-site operators), we demonstrated that FBP-binding disrupts protein:protein interactions within CggR:DNA complex. Impact of such structural modifications on CggR:full-length DNA complex was subsequently investigated using nanoESI-TWIMS, which revealed important conformational changes triggered by sugar binding. Finally, data provided by nanoESI-TWIMS experiments are discussed in the light of the results obtained by size-exclusion chromatography (SEC) and small-angle X-ray scattering (SAXS), highlighting both qualitative and quantitative adequacy between gas phase nanoESI-TWIMS measurements and outcomes from in-solution techniques.

EXPERIMENTAL SECTION

Protein expression and purification

CggR was produced in *E. coli* with a N-terminal His-tag and the protein was purified by affinity chromatography essentially as described previously.^{6, 9} Cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 3 mM β -mercaptoethanol, 1 mM benzamidine, pH 8 buffer (HT buffer) supplemented with 5 mM benzamidine. Cells were lysed by sonication after 30 min incubation on ice with 0.2 mg/mL of lysozyme together with 2 μ g/mL of DNase 1 and 50 mM Na₂HPO₄. After centrifugation at 18000 rpm for 20 min at 4°C, the cell supernatant was loaded onto a Ni²⁺-NTA agarose resin (Qiagen, Germantown, MD) and incubated for 30 min at 4°C with gentle shaking. The resin was then washed extensively with HT buffer supplemented with,

successively, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄ and 0.4 M KCl, before eluting the protein with 300 mM imidazole in HT buffer. The most concentrated fractions were dialysed against 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 2 mM EDTA, 10% glycerol buffer, pH 8. The fractions were pooled and protein aliquots were stored at -80°C. Protein concentration was determined by Bradford assay.

DNA/protein complex purification

The oligonucleotides containing the full-length O_{LR} operator (45 bp 5'-TGACGGGACGTTTTTGTGCATAGCGGGACATATAATGTCCAGCAA-3') or the half-site O_R (23 bp 5'-TAGCGGGACATATAATGTCCAGC-3') were purchased from Eurogentec. The sense and anti-sense strands were hybridized by heating a mixture at 50 μ M in TE buffer, 150 mM NaCl to 90 °C for 10 min and slowly cooling down to room temperature using a thermocycler. Complexes with DNA were formed by mixing the purified protein and DNA at a molar ratio of 4:1 (O_{LR}) or 2:1 (O_R) (protein/DNA) in a final volume of 500 μ L. The complex was purified by size exclusion chromatography, using a Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) column pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 2 mM DTT. The protein:DNA complexes was eluted in a single peak and the most concentrated fractions (500 μ L) were pooled and eventually concentrated to a final concentration of 1 mg/ml of complex as estimated by Bradford assay.

Samples buffer exchange

Prior to any mass spectrometry experiments, CggR and CggR:DNA complexes were desalted against 150 mM ammonium acetate solution pH 8.0 (adjusted with ammonia). While CggR was buffer exchanged using a microcentrifuge gel filtration column (Zeba 0.5 ml, Thermo Scientific, Rockford, IL), CggR:DNA complexes were buffer exchanged using 7 successive concentration / dilution steps performed with centrifugal concentrators (Vivaspin, 30 kDa molecular-weight cutoff membranes, Sartorius, Göttingen, Germany). Protein concentration was determined by Bradford assay. Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) trisodium salt hydrate was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and sodium counter-ions were exchanged against volatile ammonium ions using a 1 ml anionic exchange column (HiTrap Q-Sepharose, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Subsequent quantification of desalted FBP was performed by LC-MS/MS analysis using an HPLC system (1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to an electrospray triple quadrupole mass spectrometer (LC/MS 6410B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Noncovalent nanoESI-MS experiments

Noncovalent mass spectrometry experiments were carried out on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoelectrospray source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY, USA). Mass spectra were recorded in the positive ion mode over the mass range m/z 500-12000 after calibration with a 2 g/l solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1/1). His-tagged CggR monomer

molecular weight was first measured in denaturing conditions by diluting the protein to 5 μM in a 1:1 (v/v) water:acetonitrile mixture acidified with 1% (v/v) formic acid. Measured molecular weight (38780.3 ± 0.8 Da) was in good agreement with the mass calculated from the theoretical amino acid sequence (38780.8 Da). Experiments under nondenaturing conditions were performed by diluting samples in 150 mM ammonium acetate buffer pH 8.0. Instrumental settings were carefully tuned in order to preserve the integrity of noncovalent assemblies in the gas phase while ensuring an optimal ion desolvation and transmission through the mass spectrometer. This optimization especially concerns the pressure (P_i) in the first pumping stage of the instrument as well as the accelerating voltage applied on the sampling cone (V_c). V_c and P_i values were differently adjusted for CggR and CggR:DNA assemblies and are mentioned in figures legend. Data analysis was performed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Traveling wave ion mobility mass spectrometry

NanoESI-TWIMS experiments were performed using a hybrid quadrupole / ion mobility separator / time-of-flight instrument (Synapt HDMS, Waters, Manchester, UK) described elsewhere.⁴² External calibration was performed in the positive ion mode with a 3 mg/ml solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1/1). Samples were infused using 4- μm i.d. PicoTip nanospray emitters (New Objective, Woburn, MA, USA) and ion mobility data were recorded after careful optimization of instrumental parameters (see Results and Discussion). Particularly, while the pressure in the first pumping stage (backing pressure) and in the Trap T-wave device were raised to 5.1 mbar and 0.065 mbar, respectively, the accelerating voltage applied on the sampling cone, the trap collision energy voltage and the trap bias voltage were set to 50 V, 10 V and 15 V, respectively. For mobility separation, the wave height, the wave velocity and the pressure in the ion mobility cell were respectively set to 11 V, 300 m/s and 0.5 mbar corresponding to optimized parameters providing an improved separation of ions displaying different mobilities. Collision cross section (CCS) measurements were realized using a calibration curve obtained with horse heart myoglobin, bovine cytochrome C and bovine ubiquitin diluted to 2 μM in 1:1 (v/v) water:acetonitrile mixture acidified with 1% (v/v) formic acid according to the procedure described by Ruotolo *et al.*³⁶ CCS determination was performed in duplicate showing a reproducibility better than 2%. Data analysis was performed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Collision cross section computation by MOBCAL

Theoretical CCS were determined using the open source program MOBCAL,^{43, 44} which was modified as described elsewhere.³⁶ While the PDB file 1TGU was used for bovine liver catalase,⁴⁵ coordinate files for free and FBP-bound CggR:O_{LR} complex were obtained from SAXS data modeling using the program SASREF (Chaix *et al.*, manuscript in preparation). Only CCS calculated with the exact hard sphere scattering (EHSS) method are reported here since it provides better CCS estimations for proteins than the projection approximation model does, and it requires much less computation time compared to the trajectory method.⁴⁶

RESULTS AND DISCUSSION

NanoESI-MS investigation of FBP-binding effect on CggR and CggR:DNA complexes

FBP-binding alters CggR quaternary structure

In the present study, CggR was first analyzed alone in order to investigate its oligomerization state under the present experimental conditions. When diluted to 20 μM (monomer concentration), CggR is mainly detected as a tetramer (155145 ± 3 Da) accompanied to a lower extent by monomeric (38781 ± 2 Da) and dimeric (77567 ± 3 Da) forms of the protein (figure 1a). Since it has been reported that CggR oligomerization state is dependent on protein concentration,^{7, 10} experiments were also carried out with protein diluted from 10 to 40 μM , showing no significant differences in this concentration range (data not shown). The theoretical molecular weight of the CggR dimer and tetramer being 77561 Da and 155123 Da, respectively, it can be deduced that no carbohydrate ligand remains bound to the purified protein, in contrast to the protein preparation used for crystallization by Rezacova *et al.*¹⁰

The binding of FBP, the effector sugar of CggR, has been studied previously using different techniques, providing insights into its binding stoichiometry and affinity, as well as its effect on protein structure and oligomerization state.^{7, 9, 10} While these studies univocally showed that FBP binding prevents the formation of CggR high molecular weight aggregates, different sugar binding stoichiometries were proposed. Indeed, X-ray crystallography and isothermal titration calorimetry only detected a single FBP molecule bound per CggR molecule,^{7, 10} whereas fluorescence anisotropy, limited proteolysis and pressure perturbation experiments suggested the presence of two non-equivalent FBP binding sites per CggR monomer.⁷ As mass resolution afforded by noncovalent mass spectrometry allows a direct visualization of all different species present in solution, this technique was well suited in the present case to simultaneously observe FBP-binding effect on CggR oligomerization state and to determine its binding stoichiometry to the protein. Titration experiments involving a fixed CggR concentration and increasing amounts of FBP were thus monitored by nanoESI-MS. NanoESI mass spectra obtained after incubation of CggR (20 μM) with 0.5 to 1.5 molar equivalents of FBP (10 - 30 μM) show that CggR tetramer is progressively dissociated into dimers, evidencing that binding of this effector sugar triggers the disruption of intermolecular protein:protein interactions (figure 1b to d).

Regarding FBP binding stoichiometry, nanoESI mass spectrum obtained in presence of an equimolar concentration of FBP (20 μM - figure 1c) is sufficient to fully saturate CggR with one sugar molecule per protein monomer. Interestingly, in presence of 30 μM of FBP, CggR tetramer is totally dissociated and the binding of a second FBP molecule per protein subunit becomes observable on CggR monomer (1:2 CggR:FBP complex) and dimer (2:4 CggR:FBP complex). Unfortunately, attempts to saturate this second binding site failed because higher FBP concentrations led to noisy mass spectra, precluding clear interpretation and confirmation of the specificity of this second binding event.

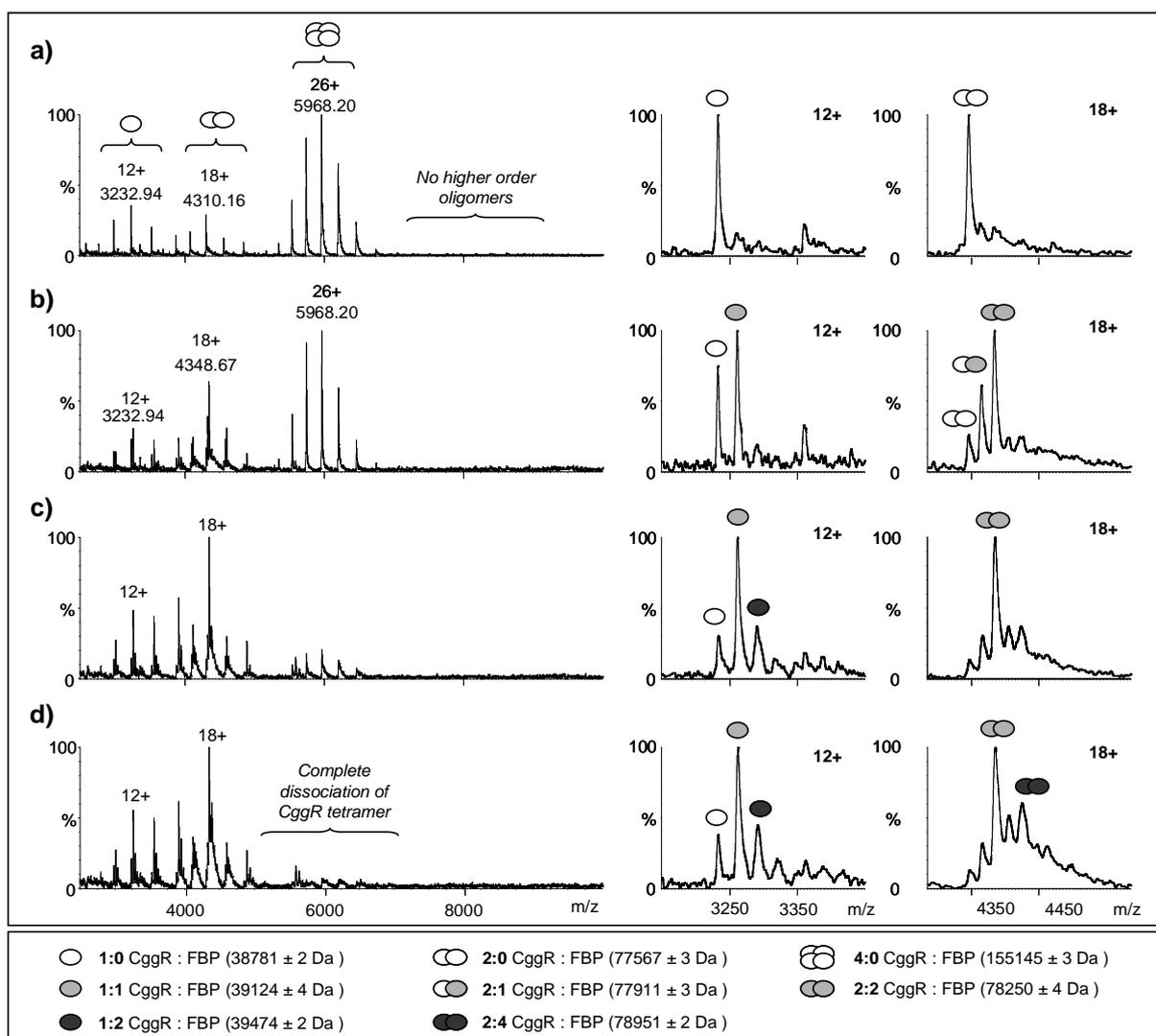


Figure 1. NanoESI-MS monitoring of FBP binding to CggR. CggR was diluted to 20 μ M (monomer concentration) and analyzed either (a) alone or in presence of (b) 10 μ M FBP, (c) 20 μ M FBP and (d) 30 μ M FBP. Enlarged mass spectra from the right-hand columns correspond to the +12 charge state of monomeric CggR (2nd column) and the +18 charge state of dimeric CggR (3rd column). Vc = 120 V, Pi = 6 mbar.

In conclusion, the present titration experiments highlight that FBP binding to CggR is responsible for the disruption of intermolecular protein:protein interactions leading to the dissociation of CggR tetramer into dimers. Results also show that CggR contains a high-affinity binding site which can be fully saturated by FBP using micromolar analyte concentrations, which is in agreement with previously determined K_d values ranging from 3 to 7 μ M.^{7,10}

FBP-binding induces the dissociation of protein:protein interactions involved in CggR:DNA complex

In a previously published study, formation of the complex between CggR and its full-length DNA operator was investigated by analytical ultracentrifugation, revealing a 4:1 protein:DNA binding stoichiometry.⁹ Additionally, it was evidenced that FBP abolishes the binding cooperativity of CggR to its target DNA without altering the binding stoichiometry of the complex, suggesting a possible sugar-induced disruption of intermolecular protein:protein interactions within the CggR:DNA complex. In order to examine this hypothesis in the present work, nanoESI-MS experiments were

performed with CggR in complex with either the full-length DNA operator (O_{LR}) or the right half-site operator (O_R).

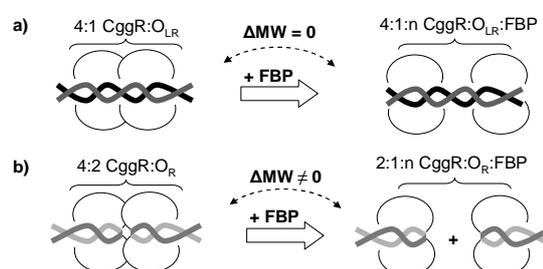


Figure 2. Working hypothesis used to enlighten FBP-induced disruption of protein:protein interactions within CggR:DNA complex. Upon FBP-induced disruption of protein:protein interactions, (a) molecular weight of 4:1 CggR: O_{LR} remains constant ($\Delta \text{MW} = 0$ Da), while (b) 4:2 CggR: O_R dissociation can be evidenced through mass measurements in non-denaturing conditions.

The rationale behind the use of a half-site operator is that the disruption of protein:protein contacts within the

CggR: O_{LR} complex would not change the molecular weight of the complex because full-length DNA would act as a framework retaining protein subunits within the complex (figure 2a). Therefore, noncovalent MS could remain blind to such structural modifications. Nevertheless, the use of two independent half-site operators, i.e., which are not covalently bound one to the other as in the case of O_{LR} operator, would result in a complex whose integrity depends solely on noncovalent protein:protein interactions. Consequently, disruption of those interactions upon FBP binding would provoke complex dissociation, enabling thus the effect of sugar binding to be monitored by noncovalent nanoESI-MS (figure 2b).

Accordingly, both complexes were first formed *in vitro*, purified by size-exclusion chromatography (see Experimental Section) and subsequently analyzed by

noncovalent nanoESI-MS to determine their binding stoichiometries. NanoESI mass spectrum obtained for the complex involving the full-length operator (figure 3a) reveals the presence of a unique species which measured molecular weight (182868 ± 9 Da) indicates the formation of a 4:1 CggR: O_{LR} complex (182802 Da). In the case of the right half-site operator O_R (figure 3e), the most intense species is detected in the mass range m/z 7000-9000 with a molecular weight of 183356 ± 5 Da corresponding to the 4:2 CggR: O_R complex (183298 Da). An additional minor ion distribution assigned to the 2:1 CggR: O_R complex (91649 Da) is also detected in the mass range m/z 4000-6000 with a measured molecular weight of 91664 ± 5 Da. It is noteworthy that quasi-quantitative formation of the 4:2 CggR: O_R complex (instead of independent 2:1 CggR: O_R complexes) provides here a direct evidence for the existence of

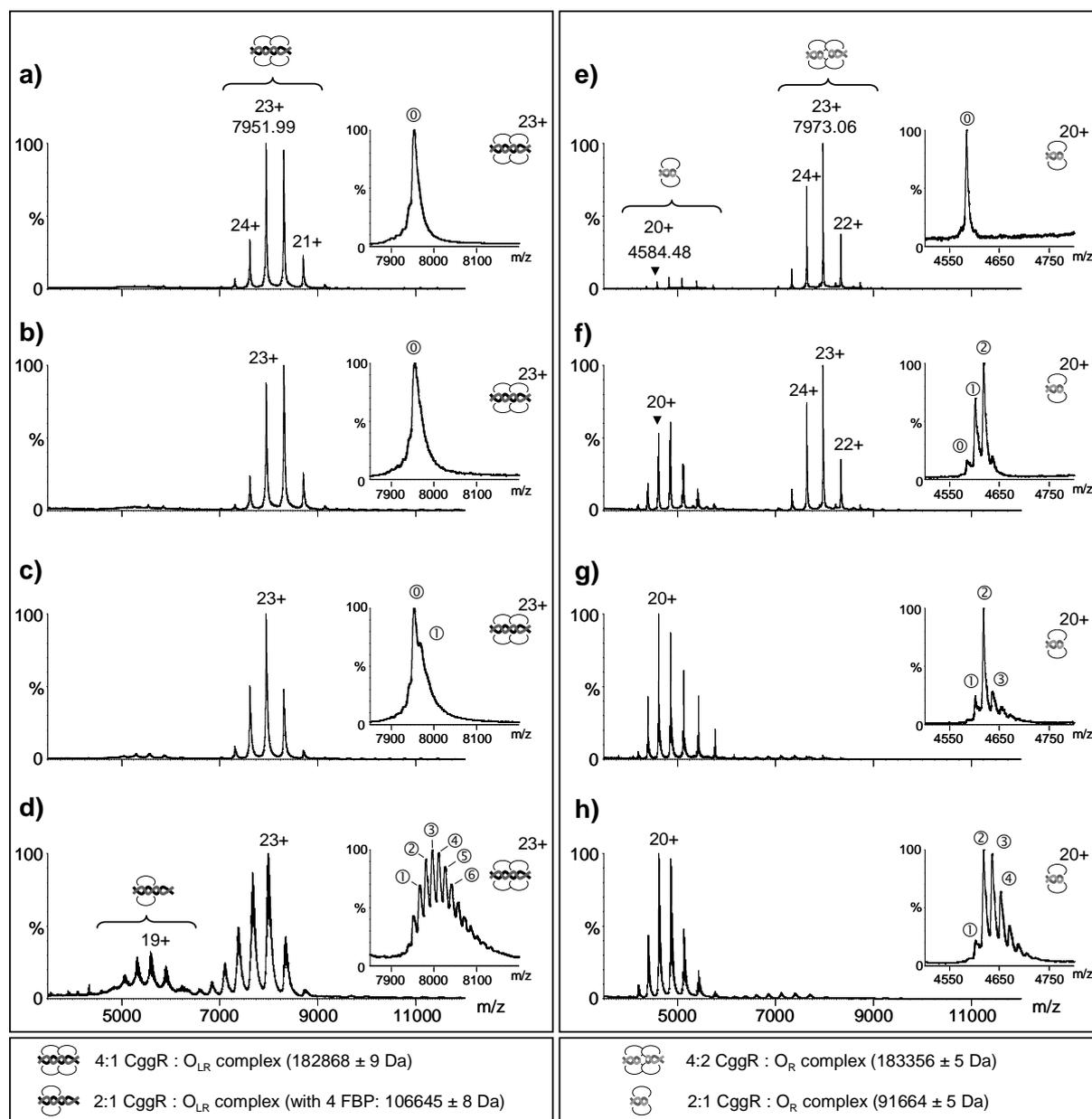


Figure 3. NanoESI-MS monitoring of FBP binding effect on CggR:DNA complex. (a-d) CggR: O_{LR} complex and (e-h) CggR: O_R complex were diluted to $3 \mu\text{M}$ either (a, e) alone or in presence of (b, f) $3 \mu\text{M}$ FBP and (c, g) $15 \mu\text{M}$ FBP and (d, h) $30 \mu\text{M}$ FBP. Insets represent enlarged mass spectra showing (a-d) the +23 charge state of the 4:1 CggR: O_{LR} complex and (e-h) the +20 charge state of the 2:1 CggR: O_R complex. Circled numbers correspond to the number of FBP molecules bound to each complex. $V_c = 200$ V, $P_i = 7$ mbar.

intermolecular protein:protein interactions within CggR:DNA complex. In previously published works, this information about CggR:DNA complex architecture could only be indirectly inferred from correlation between the protein tetrameric oligomerization state and the 4:1 protein:full-length DNA binding stoichiometry.⁹

Titration experiments were then carried out by incubating CggR:DNA complexes (3 μ M) in the presence of increasing FBP concentrations. In the case of the full-length operator, the 4:1 CggR:O_{LR} complex remains almost completely intact upon FBP addition (figure 3a-d). Indeed, although the 4:1 CggR:O_{LR} complex mainly binds three or four FBP molecules in the presence of a ten-fold molar excess of this effector sugar (30 μ M – figure 3d), only a small fraction of the 2:1 CggR:O_{LR} complex is observed. This observation is consistent with previous fluorescence anisotropy and electrophoretic mobility shift assay experiments showing that even millimolar concentrations of FBP do not allow a complete release of CggR from the complex.^{9,10} In contrast, incubation of 4:2 CggR:O_R complex (3 μ M) with 1 molar equivalent of FBP (3 μ M) is sufficient to induce its partial dissociation into 2:1 CggR:O_R complexes (figure 3f). Complete dissociation is observed in presence of 5 molar equivalents (15 μ M) of effector sugar (figure 3g), demonstrating the ability of FBP to induce the disruption of protein:protein interactions ensuring the integrity of the 4:2 CggR:O_R complex.

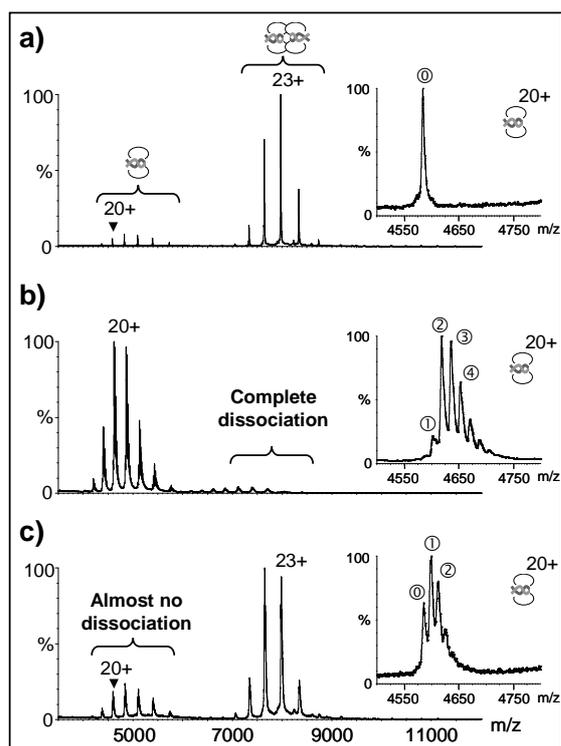


Figure 4. Assessment of the specificity of FBP-binding effect on CggR:DNA interactions. CggR:O_R complex was diluted to 3 μ M in 150 mM ammonium acetate buffer at pH 8.0 and analyzed either (a) alone or in presence of (b) 30 μ M FBP and (c) 30 μ M F6P. Insets represent enlarged mass spectra showing the +20 charge state of the 2:1 CggR:O_R complex. Circled numbers correspond to the number of FBP molecules bound to each complex. Vc = 200 V, Pi = 7 mbar.

Interestingly, nanoESI mass spectra obtained in the case of the half-site operator (figure 3e-h) show that

increasing FBP concentration leads first to complex saturation with a single FBP molecule per CggR subunit (detection of 2:1:2 CggR:O_R:FBP complex), in agreement with the presence of a micromolar binding site on the protein.^{7,10} Then, in the presence of 30 μ M FBP (figure 3h), complexes containing a second FBP molecule per CggR subunit are also observed (detection of 2:1:3 and 2:1:4 CggR:O_R:FBP complexes), suggesting the presence of a second binding site on the protein.

In order to assess the specificity of the detected complexes, control experiment was performed with fructose-6-phosphate (F6P) whose affinity for CggR is much lower (K_d = 94 μ M) than FBP (K_d = 3-7 μ M).¹⁰ Mass spectra acquired under strictly identical experimental and instrumental conditions first show that F6P-binding does not trigger the disruption of protein:protein interactions as observed in the case of FBP (figure 4), confirming thus the specific role of FBP in the modulation of CggR:DNA cooperative interactions.⁸ Moreover, considering the sugar binding stoichiometry, comparison of figures 4b and 4c indicates that only one F6P molecule is bound per CggR monomer (detection of 2:1:1 and 2:1:2 CggR:O_R:F6P complexes), while FBP is able to bind twice to the protein (detection of 2:1:3 and 2:1:4 CggR:O_R:F6P complexes) under identical conditions. The fact that nanoESI mass spectra reflect subtle modifications of the ligand structure strongly suggests that complexes detected in the gas phase arise from a specific association in solution,⁴⁷ and strengthens thus previous observations indicating the presence of a second FBP binding site per CggR subunit.^{7,8}

NanoESI-TWIMS experiments evidence CggR:DNA conformational changes upon FBP binding

From the data collected so far, it is evident that FBP specifically triggers the disruption of protein:protein interactions within CggR tetramer as well as 4:2 CggR:O_R complex. Extrapolating such observations to the 4:1 CggR:O_{LR} complex implies that important conformational changes occur upon FBP binding. Indeed, the strongest hint for such modifications arises from the outcomes of fluorescence-based techniques, suggesting that sugar binding increases the conformational dynamics of the CggR:O_{LR} complex.⁹ In noncovalent MS, modifications of the tridimensional structure of biomolecules can be evidenced by a shift in the charge state distribution: the more extended the structure, the higher the number of charges carried by proteins.⁴⁸ In the present titration experiments, increasing FBP concentration only provokes a small shift of the 4:1 CggR:O_{LR} complex charge state distribution, which mean value increases from 22.6 in absence of FBP (figure 3a) to 23.8 in presence of 30 μ M FBP (figure 3d), suggesting thus a slightly extended conformation of the complex in presence of effector sugar. In order to get deeper insights into this conformational transition, nanoESI-TWIMS experiments were performed with CggR:O_{LR} complex, both in absence and presence of effector sugar.

Optimization of instrumental settings for native CCS determination of CggR:DNA complexes

In conventional noncovalent MS experiments, an essential condition to be fulfilled is that integrity of fragile assemblies formed in solution is maintained in the

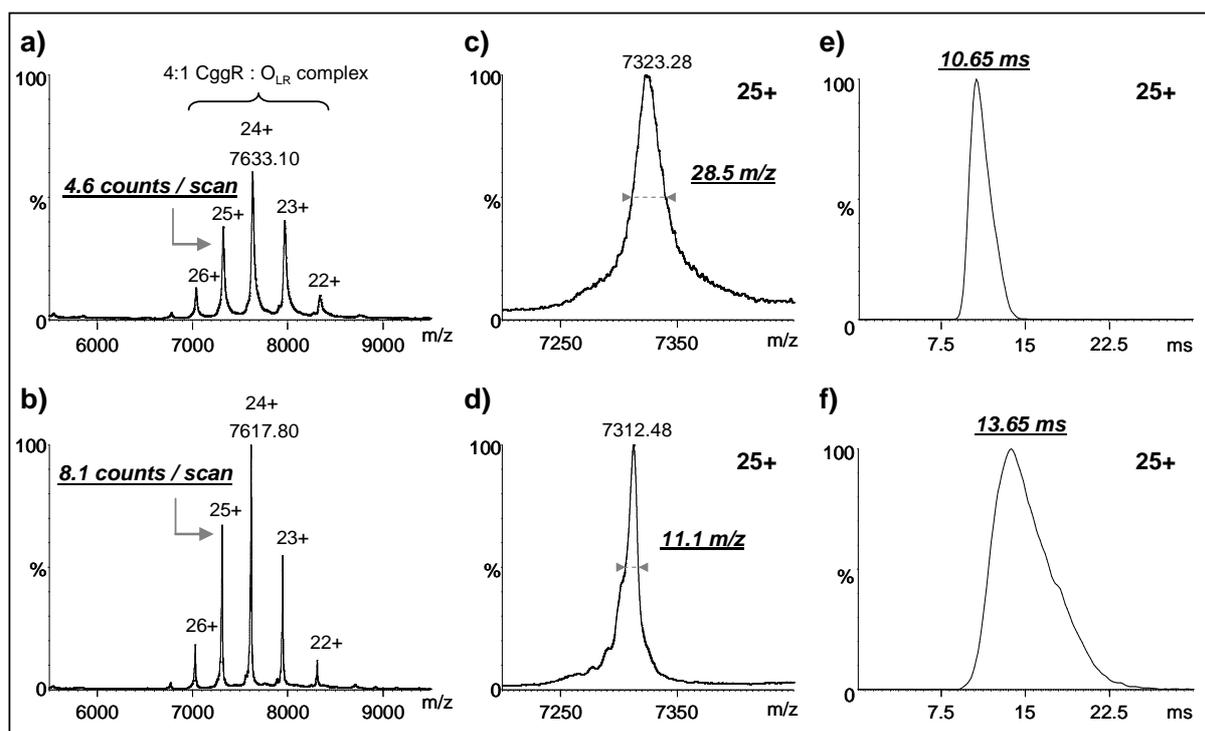


Figure 5. Influence of collision activation on the detection of CggR:O_{LR} complex. CggR:O_{LR} complex was diluted to 3 μ M in 150 mM ammonium acetate buffer at pH 8.0 and analyzed either (a, c, e) in low-activating conditions (Trap CE = 10 V) or (b, d, f) in high-activating conditions (Trap CE = 100 V). (a, b) Y-axes of full-scale mass spectra were normalized to the intensity of the +24 charge state of spectrum (b). (c, d) Enlarged mass spectra showing the full-width at half maximum of CggR:O_{LR} complex +25 charge state. (e, f) Arrival-time distributions of the +25 charge state of CggR:O_{LR} complex.

gas phase throughout their transfer in the mass spectrometer. While this *sine qua non* condition is still true for nanoESI-TWIMS experiments, an additional requirement has to be matched for correct CCS determination of native proteins and complexes. Indeed, several reports have enlightened that, upon high activating conditions, ions undergo conformational transitions before disruption of protein:protein or protein:ligand associations.^{35, 39, 46, 49-52} Such structural modifications are likely to alter the measured drift times (and consequently the derived CCS values) and have thus to be avoided using a fine instrumental tuning. This optimization concerns especially the accelerating voltages applied before the ion mobility stage, which are namely the sampling cone voltage (V_c), the collision energy voltage applied at the entrance of the trap T-wave device (Trap CE), and the bias voltage applied between the trap and the ion mobility T-wave devices (Trap bias). All these voltages have to be kept to a minimum value to allow ions to be transferred without extensive activation before entering the ion mobility cell. In addition, pressures in the first pumping stage of the mass spectrometer as well as in the Trap T-wave can also be increased to improve collisional cooling. Alternatively, once ions have been separated in the traveling wave ion mobility cell, high transfer collision energy voltages (Transfer CE) can be used to improve their desolvation without affecting drift time measurement.^{36, 39}

A trade-off arising from the use of such smooth conditions is that ions may be poorly desolvated, giving thus rise to broad peaks on ESI mass spectra, which can sometimes be deleterious when a sufficient mass resolution is required to distinguish between different species. As an example of the effect of above-mentioned accelerating voltages, figure 5 illustrates the influence of

a high Trap CE voltage on both the mass spectrum and the arrival time distribution obtained for the 4:1 CggR:O_{LR} complex. While this assembly remains intact upon increase of the Trap CE voltage from 10 V to 100 V, the full-width at half maximum of the +25 charge state decreases from 28.5 m/z to 11.1 m/z (61% decrease) and its absolute intensity increases in the same time from 4.6 counts / scan to 8.1 counts / scan (76% increase). These observations indicate an improved ion desolvation and transmission when a Trap CE voltage of 100 V is used. Such instrumental conditions would be well-suited to conventional noncovalent MS experiments aiming at determining the complex binding stoichiometry. However, in the present case, figures 5e and 5f show that the measured drift time of the +25 charge state shifts from 10.65 ms (Trap CE = 10 V) to 13.65 ms (Trap CE = 100 V). Together with the substantial broadening of the arrival time distribution, this 28% increase of the drift time indicates that, under these activating conditions, the complex has experienced structural modifications resulting in more extended conformations. While the monitoring of such collision-induced conformational evolution of noncovalent complexes can provide useful information on their gas phase stability,^{35, 51, 52} such alteration of the complex structure prevents the determination of its native collision cross section.

Additionally, while water and buffer adducts caught in the complex structure are responsible for large and poorly resolved peaks on nanoESI mass spectra, it is noteworthy that their presence might be beneficial for near-native CCS determination. Indeed, small ions and water molecules can display specific structural roles, more particularly in the case of protein:DNA interactions.⁵³ As a consequence, analyzing poorly desolvated (or partially hydrated) ions, instead of completely anhydrous ions,

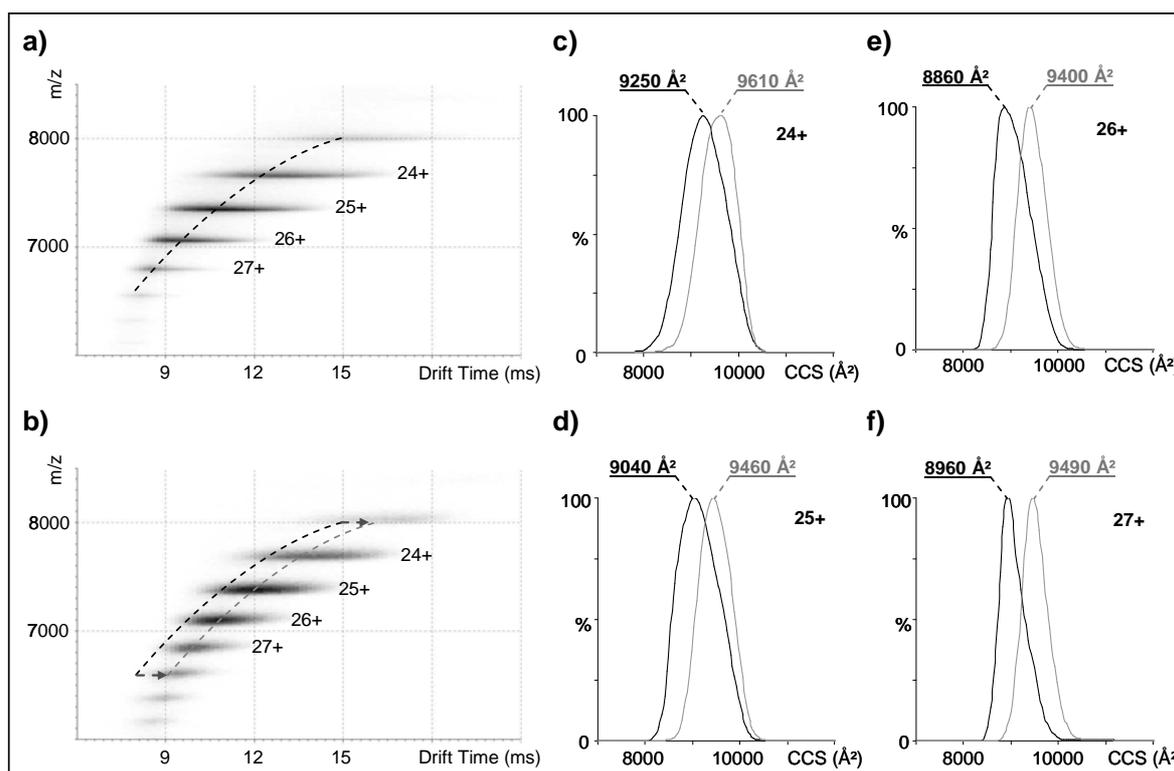


Figure 6. NanoESI-TWIMS monitoring of FBP-induced conformational modifications of CggR:O_{LR} complex. (a, b) Driftscopes were obtained for 4:1 CggR:O_{LR} complex diluted to 3 μM either (a) alone or (b) in presence of 30 μM FBP. Arrival time distribution maxima of the most intense charge states are linked together by dashed curves. (c-f) CCS estimation for the 24+ to 27+ charge states of free and FBP-bound 4:1 CggR:O_{LR} complex. Black and grey curves are related to free and FBP-bound 4:1 CggR:O_{LR} complex, respectively.

might potentially give rise to gas phase ions with a conformation closer to that adopted in solution.⁴⁶ This proposition is supported by several works suggesting that smaller CCS values than those derived from NMR and X-ray crystallography structures, result from shrinkage of protein structure in a solvent-free environment.^{46, 54, 55} Consequently, a Trap CE voltage of 10 V was preferred in the present study in order to preserve complexes native-like conformation to the detriment of peak resolution on nanoESI mass spectra.

NanoESI-TWIMS calibration for CCS determination of large noncovalent assemblies

Several works have reported the use of ions with known collision cross section (CCS) to get an empirical relationship allowing the CCS of an analyte of interest to be derived from its mass- and charge-corrected drift time as measured by TWIMS experiments.^{22, 35-41} Indeed, denatured proteins are generally used to calibrate the instrument for the determination of CCS between 1000 and 4000 Å², which corresponds approximately to spherical proteins between 10 and 70 kDa.³⁶

In the present study, complexes of interest display molecular weights of about 185 kDa, requiring thus a large extrapolation of the calibration curve to assess their CCS. With such an extrapolation, small errors in the slope of the calibration curve may provoke important errors on determined CCS. As a consequence and in order to ensure that reliable CCS measurements could be performed for CggR:DNA complexes, denatured bovine ubiquitin, bovine cytochrome C as well as horse heart myoglobin were used to create a calibration curve defined with a maximum number of points. This curve was subsequently used to assess the CCS of bovine liver

catalase in nondenaturing conditions. This protein forms a large tetrameric assembly of about 236 kDa and its CCS can be derived from its crystallographic structure,⁴⁵ providing thus a reference value to estimate the validity of this extrapolation. In the present work, the mean CCS of bovine liver catalase averaged over its five most intense charge states (+32 to +36) was 10000 ± 350 Å², which was found to be in good agreement with the value of 9950 Å² calculated from its crystallographic structure using the EHSS method from MOBCAL, and showing thus that reliable CCS estimations could be obtained from the extrapolation of the calibration curve up to 10000 Å².

The collision cross section of CggR:DNA assembly increases upon FBP binding

In order to investigate the effect of FBP binding on the conformation of CggR:DNA assembly, 4:1 CggR:O_{LR} complex was incubated at 3 μM in absence or in presence of 30 μM FBP. At these concentrations, previously described nanoESI-MS experiments have shown that 4:1 CggR:O_{LR} complex mainly binds 3-4 FBP molecules and that FBP binding induces a complete dissociation of the 4:2 CggR:O_R complex, indicating that important structural modifications occur in these conditions.

Accordingly, nanoESI-TWIMS analysis of 4:1 CggR:O_{LR} complex in absence of effector sugar and under optimized instrumental conditions, shows that the +24 to +27 charge states of the complex are detected with drift times ranging from 8 to 16 ms (figure 6a). Those drift times were corrected for the charge and reduced mass of the corresponding ion, so that CCS of each ion could be estimated using the above-mentioned calibration curve.

Technique	Physical quantity	No FBP	+ FBP
TWIMS	R_{TWIMS} (nm)*	5.36	5.50
SEC	R_S (nm)	5.40	5.80
SAXS	R_g (nm)	4.46	5.38
	Measured MW (Da)	183500	185000
TWIMS	MW-based estimation of CCS (\AA^2) [#]	7860	7900
	Measured CCS (\AA^2)	9030	9490
SAXS	CCS from MOBCAL [‡]	11160	11770

Table 1. Comparison of TWIMS, SEC and SAXS experiments performed on CggR:O_{LR} complex in absence and presence of FBP. SEC and SAXS data were obtained from Chaix *et al.* (manuscript in preparation). * $R_{TWIMS} = (CCS / \pi)^{1/2}$. # $CCS = 2.435 \times MW^{2/3}$ according to Ruotolo *et al.*³⁶ ‡ SAXS-derived 3D models (Chaix *et al.*, manuscript in preparation) were used for CCS estimation using the exact hard sphere scattering method from MOBCAL.

Averaging the CCS of 4:1 CggR:O_{LR} complex over the four most intense charge states (+24 to +27) gives thus rise to a value of $9030 \pm 165 \text{\AA}^2$ (figure 6c-f). In contrast, when 4:1 CggR:O_{LR} complex is incubated with a ten-fold molar excess of FBP, driftscope obtained under identical experimental and instrumental conditions enlightens a significant shift in the measured drift times (figure 6b) which is reflected in corresponding CCS values (figure 6c-f). Indeed, CCS of 4:1 CggR:O_{LR} complex averaged over the +24 to +27 charge states is $9490 \pm 90 \text{\AA}^2$. Together with nanoESI-MS results obtained with CggR alone and in complex with the right half-site operator, this 5% increase of the CCS upon FBP binding provides strong evidence that this sugar is indeed able to trigger significant conformational alterations of the 4:1 CggR:O_{LR} complex by disrupting intermolecular protein:protein interactions without changing the complex binding stoichiometry.

Comparison with in-solution techniques

Even though a growing number of articles have enlightened that gas phase collision cross sections are in good agreement with values derived from other biophysical techniques,^{35, 38-40} the question of whether a protein or a complex can preserve its native conformation in a solvent-free environment is still a matter of debate.^{56, 57} In such a context, it is of interest to compare the results from nanoESI-TWIMS with those obtained by small-angle X-ray scattering (SAXS) and size-exclusion chromatography (SEC) experiments which were performed concomitantly to the present study (Chaix *et al.*, manuscript in preparation). SAXS can provide both the radius of gyration (R_g) of the analyte of interest as well as estimations of its 3D structure based on data modeling. Regarding SEC, calibration with well-adapted standards allows Stokes radius (R_S) and apparent molecular weight to be determined from experimental data. Table 1 summarizes the outcomes of these different techniques.

While the relationship between R_g and R_S depends on the molecular shape of the analyte, both physical quantities are sensitive to the global shape and size of the molecule in solution. For the comparison of TWIMS results with these in-solution techniques, the radius (R_{TWIMS}) of free and FBP-bound 4:1 CggR complex was derived from the corresponding CCS assuming a spherical shape of the complex. As shown in table 1, R_{TWIMS} is in good agreement with both R_g and R_S which evidences that 4:1 CggR:O_{LR} complex preserves a folded native-like conformation in the gas phase, and that

conformational modifications occurring in solution are at least partially conserved in this solvent-free environment.

Table 1 also shows CCS measured by nanoESI-TWIMS experiments compared to CCS estimations based on the molecular weight of the corresponding complexes. Those estimations were performed with a relationship relating the molecular weight to the CCS of roughly spherical ions.³⁶ Interestingly, significant differences are observed between measured and estimated CCS, which strongly suggests that 4:1 CggR:O_{LR} complex has a non-spherical shape, which is consistent with the presence of a DNA framework which imposes a rather elongated shape to this assembly (Chaix *et al.*, manuscript in preparation).

Finally, table 1 also reports CCS values calculated by MOBCAL using the 3D structures of 4:1 CggR:O_{LR} complex obtained by SAXS data modeling (Chaix *et al.*, manuscript in preparation). While those MOBCAL estimations are somewhat higher than corresponding TWIMS values, CCS values still display a 5% difference between free and FBP-bound forms of the complex, which is in close agreement with the 5% increase measured in the gas phase.

Consequently, comparison with SEC and SAXS validates nanoESI-TWIMS results, showing that CggR:DNA complex retains a memory of its solution structure in the gas phase and illustrating thus the potentialities of this technique to probe the size and shape of proteins and noncovalent complexes in solution.

CONCLUSION

In the present study, we report the use of recent MS-based technologies to get detailed structural information on FBP-modulated CggR:DNA interactions. NanoESI-MS experiments first showed that tetrameric CggR dissociates into dimers upon FBP binding to the high (micromolar) affinity binding site of CggR. Then, using the 4:2 CggR:O_R complex, where both half-site operators are not covalently bound, we demonstrated that FBP binding leads to the symmetrical dissociation of this assembly into 2:1 CggR:O_R complexes. In contrast, the 4:1 CggR:O_{LR} assembly remains almost completely intact in presence of FBP, most probably because full-length DNA acts as a framework holding the different protein subunits together in the complex. However, nanoESI-TWIMS experiments enlightened important FBP-induced changes in the structure of the 4:1 CggR:O_{LR} complex, as evidenced by the 5% increase of the complex CCS upon FBP binding. Notably, both the symmetrical dissociation and the increase of the complex CCS triggered by FBP

binding corroborate a previously proposed model which suggests that CggR binds primarily as a dimer to each half-site of the full-length operator and that both dimers interact subsequently together, resulting in a cooperative protein binding to the DNA target which is abolished in presence of FBP.⁹ Altogether the present results thus provide important evidences for the understanding of the mechanisms governing CggR interactions with its DNA target. The knowledge of such regulation mechanism is of crucial importance to decipher the underlying sugar-dependent transcriptional activation of glycolytic genes in *B. subtilis*.

To our knowledge, the present study is the first one describing the use of nanoESI-TWIMS to detect ligand-induced conformational changes of a protein:DNA assembly. While this article stresses the importance of a careful instrumental tuning for CCS determination of native complexes, it also reports an interesting comparison between those gas phase measurements and the data obtained by in-solution techniques. The close correlation found between the results from nanoESI-TWIMS, SAXS and SEC indicates that CCS measurement in the gas phase can provide reliable information on the shape / size of native proteins and noncovalent complexes in solution. Finally, it is of interest to point out that nanoESI-TWIMS displays some unique advantages over biophysical techniques which are conventionally used for complexes structural characterization. Indeed, combining MS dimension with ion mobility separation affords a simultaneous and independent determination of the binding stoichiometry and the CCS of noncovalent assemblies within a few minutes. Moreover, this technique does not require data modeling since it allows a direct and independent visualization of all ionizable species present in solution as illustrated here through the simultaneous detection of protein:protein, protein:ligand, protein:DNA and protein:DNA:ligand complexes. Those features make of nanoESI-TWIMS and more generally of noncovalent MS, a well-suited technique to investigate heterogeneous and poorly characterized systems where assumptions required by other techniques for data interpretation can hardly be justified.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by the CNRS, the University of Strasbourg UdS and the region Alsace. We thank the Fondation pour la Recherche Médicale for financial support of a Synapt HDMS mass spectrometer. C.A. was supported by a studentship from the French Ministère de la Recherche. Authors would like to acknowledge Cyril Colas for FBP quantification.

REFERENCES

- (1) Fillinger, S.; Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Dervyn, E.; Branlant, G.; Aymerich, S. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 14031-14037.
- (2) Ludwig, H.; Homuth, G.; Schmalisch, M.; Dyka, F. M.; Hecker, M.; Stulke, J. *Mol. Microbiol.* 2001, 41, 409-422.
- (3) Fuhrer, T.; Fischer, E.; Sauer, U. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 1581-1590.
- (4) Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, A. M.; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, M. G.; Bessieres, P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; Borriss, R.; Boursier, L.; Brans, A.; Braun, M.; Brignell, S. C.; Bron, S.; Brouillet, S.; Bruschi, C. V.; Caldwell, B.; Capuano, V.; Carter, N. M.; Choi, S. K.; Codani, J. J.; Connerton, I. F.; Danchin, A.; *et al.* *Nature* 1997, 390, 249-256.
- (5) Tobiasch, S.; Zuhlke, D.; Bernhardt, J.; Stulke, J.; Hecker, M. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 6996-7004.
- (6) Doan, T.; Aymerich, S. *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 1709-1721.
- (7) Zorrilla, S.; Chaix, D.; Ortega, A.; Alfonso, C.; Doan, T.; Margeat, E.; Rivas, G.; Aymerich, S.; Declerck, N.; Royer, C. A. *Biochemistry* 2007, 46, 14996-15008.
- (8) Doan, T.; Martin, L.; Zorrilla, S.; Chaix, D.; Aymerich, S.; Labesse, G.; Declerck, N. *Proteins* 2008, 71, 2038-2050.
- (9) Zorrilla, S.; Doan, T.; Alfonso, C.; Margeat, E.; Ortega, A.; Rivas, G.; Aymerich, S.; Royer, C. A.; Declerck, N. *Biophys. J.* 2007, 92, 3215-3227.
- (10) Rezacova, P.; Kozisek, M.; Moy, S. F.; Sieglöva, I.; Joachimiak, A.; Machius, M.; Otwinowski, Z. *Mol. Microbiol.* 2008, 69, 895-910.
- (11) Kurimoto, K.; Kuwasako, K.; Sandercock, A. M.; Unzai, S.; Robinson, C. V.; Muto, Y.; Yokoyama, S. *Proteins* 2009, 75, 360-372.
- (12) Gordiyenko, Y.; Robinson, C. V. *Biochem. Soc. Trans.* 2008, 36, 723-731.
- (13) Barraud, P.; Golinelli-Pimpaneau, B.; Atmanene, C.; Sanglier, S.; Van Dorsselaer, A.; Droogmans, L.; Dardel, F.; Tisne, C. *J. Mol. Biol.* 2008, 377, 535-550.
- (14) Turner, K. B.; Hagan, N. A.; Fabris, D. J. *Mol. Biol.* 2007, 369, 812-828.
- (15) Hagan, N. A.; Fabris, D. J. *Mol. Biol.* 2007, 365, 396-410.
- (16) Hanson, C. L.; Robinson, C. V. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 24907-24910.
- (17) Rusconi, F.; Guillonneau, F.; Praseuth, D. *Mass Spectrom. Rev.* 2002, 21, 305-348.
- (18) Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. *Chem Rev* 2001, 101, 377-390.
- (19) Beck, J. L.; Colgrave, M. L.; Ralph, S. F.; Sheil, M. M. *Mass Spectrom. Rev.* 2001, 20, 61-87.
- (20) Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 6294-6296.
- (21) Katta, V.; Chait, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 8534-8535.
- (22) Utrecht, C.; Versluis, C.; Watts, N. R.; Wingfield, P. T.; Steven, A. C.; Heck, A. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008.
- (23) Heck, A. J. *Nat. Methods* 2008, 5, 927-933.
- (24) Hernandez, H.; Robinson, C. V. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 715-726.
- (25) Sanglier, S.; Atmanene, C.; Chevreux, G.; Van Dorsselaer, A. *Methods Mol. Biol.* 2008, 484, 217-243.
- (26) Kaltashov, I. A.; Eyles, S. J. *Mass Spectrom. Rev.* 2002, 21, 37-71.
- (27) Eyles, S. J.; Kaltashov, I. A. *Methods* 2004, 34, 88-99.
- (28) Konermann, L.; Tong, X.; Pan, Y. *J. Mass Spectrom.* 2008, 43, 1021-1036.
- (29) Shields, S. J.; Oyeyemi, O.; Lightstone, F. C.; Balhorn, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 14, 460-470.
- (30) Hager-Braun, C.; Tomer, K. B. *Expert Rev Proteomics* 2005, 2, 745-756.
- (31) Downard, K. M. *Proteomics* 2006, 6, 5374-5384.
- (32) Maleknia, S. D.; Downard, K. *Mass Spectrom. Rev.* 2001, 20, 388-401.
- (33) Takamoto, K.; Chance, M. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006, 35, 251-276.
- (34) Sharon, M.; Mao, H.; Boeri Erba, E.; Stephens, E.; Zheng, N.; Robinson, C. V. *Structure* 2009, 17, 31-40.
- (35) Ruotolo, B. T.; Giles, K.; Campuzano, I.; Sandercock, A. M.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Science* 2005, 310, 1658-1661.
- (36) Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L. P.; Sandercock, A. M.; Hyung, S.; Robinson, C. V. *Nat. Protoc.* 2008, 3, 1139-1152.
- (37) Lorenzen, K.; Olia, A. S.; Utrecht, C.; Cingolani, G.; Heck, A. J. *J. Mol. Biol.* 2008, 379, 385-396.
- (38) Scarff, C. A.; Thalassinos, K.; Hilton, G. R.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, 3297-3304.

- (39) Smith, D. P.; Knapman, T. W.; Campuzano, I.; Malham, R. W.; Berryman, J. T.; Radforda, S. E.; Ashcroft, A. E. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2009, 15, 113-130.
- (40) Duijn, E.; Barendregt, A.; Synowsky, S.; Versluis, C.; Heck, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 1452-1459.
- (41) Scarff, C. A.; Patel, V. J.; Thalassinos, K.; Scrivens, J. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20, 625-631.
- (42) Pringle, S. D.; Giles, K.; Wildgoose, J. L.; Williams, J. P.; Slade, S. E.; Thalassinos, K.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. *Int. J. Mass Spectrom.* 2007, 261, 1-12.
- (43) Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F. *Chem. Phys. Lett.* 1996, 261, 86-91.
- (44) Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 16082-16086.
- (45) Sugadev, R.; Balasundaresan, D.; Ponnuswamy, M. N.; Kumaran, D.; Swaminathan, S.; Sekar, K. To be published.
- (46) Jarrold, M. F. *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 360-367.
- (47) Smith, R. D.; Light-Wahl, K. J. *Biol. Mass Spectrom.* 1993, 22, 493-501.
- (48) Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 9012 - 9013.
- (49) Ruotolo, B. T.; Hyung, S. J.; Robinson, P. M.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007, 46, 8001-8004.
- (50) Benesch, J. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2008.
- (51) Hyung, S. J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. *Chem. Biol.* 2009, 16, 382-390.
- (52) Schenauer, M. R.; Leary, J. A. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, Article in Press.
- (53) Schwabe, J. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7, 126-134.
- (54) Shelimov, K. B.; Clemmer, D. E.; Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 2240-2248.
- (55) Faull, P. A.; Korkeila, K. E.; Kalapothakisa, J. M.; Graya, A.; McCullough, B. J.; Barran, P. E. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 283, 140-148
- (56) Meyer, T.; de la Cruz, X.; Orozco, M. *Structure* 2009, 17, 88-95.
- (57) Breuker, K.; McLafferty, F. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105, 18145-18152.

CONCLUSIONS

Dans cette partie consacrée au couplage entre mobilité ionique et spectrométrie de masse, nous avons décrit les développements méthodologiques réalisés au cours de ce travail de thèse dans le contexte de la caractérisation de protéines intactes et de complexes non-covalents par MS supramoléculaire. En insistant sur le **principe de fonctionnement** du Synapt HDMS, ainsi que sur l'importance de l'**optimisation des paramètres instrumentaux**, les différents exemples traités dans cette partie ont illustré les possibilités offertes par l'IM-MS pour accéder à des informations concernant **la taille, la forme d'édifices biologiques en solution, ainsi que le rôle spécifique de ligands sur leur conformation générale**. Le potentiel de l'IM-MS ne s'arrête évidemment pas à la mesure de la section efficace de biomolécules. En effet, les quelques exemples présentés dans ce manuscrit ont également mis en évidence l'intérêt de la technique pour étudier la **stabilité en phase gazeuse de complexes non-covalents**, ainsi que l'utilisation de la mobilité ionique comme **dimension de séparation**, permettant d'une part de « nettoyer » les spectres de masse, et d'autre part de **séparer les différentes isoformes d'une protéine**.

Dans le contexte de l'étude structurale de biomolécules, l'IM-MS vient se positionner dans la catégorie des techniques de basse résolution (tableau 1). Cependant, la combinaison de données structurales, même de basse résolution, avec la rapidité, les possibilités d'automatisation, la faible consommation d'échantillon, et surtout la possibilité de visualiser directement et simultanément l'ensemble des espèces présentes en solution font de **l'IM-MS un outil puissant et complémentaire aux autres techniques biophysiques** classiquement mises en œuvre pour la caractérisation structurale de protéines et de complexes non-covalents (tableau 1).

Haute Résolution	Résolution Intermédiaire	Basse Résolution
<ul style="list-style-type: none"> • Cristallographie des rayons X • Résonance magnétique nucléaire (RMN) 	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopies (AFM, cryo-EM, ...)* • Techniques de fluorescence • Dichroïsme circulaire (CD) • Techniques de marquage en MS (échange H/D, oxydation radicalaire,...) • Protéolyse ménagée • Etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mobilité ionique • Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) • Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) • Diffusion dynamique de la lumière (DLS) • Etc.
Informations structurales à l'échelle atomique	Topologie et forme détaillée, structure secondaire (hélices α / feuillets β), surface exposée au solvant, ...	Topologie et forme générale : section efficace, rayon de gyration, rayon hydrodynamique, ...

Tableau 1 : Tableau comparatif des différentes techniques biophysiques couramment utilisées pour la caractérisation structurale de biomolécules. * AFM : microscopie à force atomique ; cryo-EM : cryo-microscopie électronique.

Alors que des améliorations du Synapt HDMS sont déjà en cours (**amélioration du pouvoir résolutif de la cellule IMS** dans le cas du Synapt G2 HDMS), ou à prévoir (compréhension détaillée du fonctionnement de la cellule IMS pour une **détermination plus directe des sections efficaces**),¹⁸ cet

instrument ouvre d'ors et déjà de **nouvelles perspectives en MS supramoléculaire**, comme l'étude de protéines impliquées dans les « **maladies conformationnelles** », c'est-à-dire les pathologies telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou les maladies à prion, dont l'origine est un repliement incorrect des protéines.⁴⁷ L'IM-MS pourrait également présenter un intérêt particulier pour l'étude de **protéines intrinsèquement non structurées**. En effet, ces protéines encore peu caractérisées se distinguent notamment par leur grande flexibilité et leur capacité à subir d'importantes transitions conformationnelles, pour lesquelles l'IM-MS pourrait apporter de précieuses informations.⁴⁸

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Eiceman GA, Karpas Z.**
Ion Mobility Spectrometry, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**.
2. **Kanu AB, Dwivedi P, Tam M, Matz L, Hill HH, Jr.**
Ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2008**, 43, 1-22.
3. **Zimmermann S, Abel N, Baether W, Barth S.**
An ion-focusing aspiration condenser as an ion mobility spectrometer. *Sensors and Actuators B*, **2007**, 127, 428-434.
4. **Guevremont R.**
High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry: a new tool for mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1058, 3-19.
5. **Kolakowski BM, Mester Z.**
Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS). *Analyst*, **2007**, 132, 842-864.
6. **Giles K, Pringle SD, Worthington KR, Little D, Wildgoose JL, Bateman RH.**
Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2004**, 18, 2401-2414.
7. **Ruotolo BT, Benesch JLP, Sandercock AM, Hyung S, Robinson CV.**
Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nature Protocols*, **2008**, 3, 1139 - 1152.
8. **Bohrer BC, Merenbloom SI, Koeniger SL, Hilderbrand AE, Clemmer DE.**
Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2008**, 1, 293-327.
9. **Pringle SD, Giles K, Wildgoose JL, Williams JP, Slade SE, Thalassinos K, Bateman RH, et al.**
An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2007**, 261, 1-12.
10. **Hoaglund-Hyzer CS, Counterman AE, Clemmer DE.**
Anhydrous protein ions. *Chem Rev*, **1999**, 99, 3037-3080.
11. **Ruotolo BT, Giles K, Campuzano I, Sandercock AM, Bateman RH, Robinson CV.**
Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science*, **2005**, 310, 1658-1661.
12. **Scarff CA, Patel VJ, Thalassinos K, Scrivens JH.**
Probing hemoglobin structure by means of traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2009**, 20, 625-631.
13. **Breuker K, McLafferty FW.**
Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase, 10^{-12} to 10^2 s. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105, 18145-18152.
14. **Benesch JL.**
Collisional Activation of Protein Complexes: Picking Up the Pieces. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2008**.
15. **Jarrold MF.**
Unfolding, Refolding, and Hydration of Proteins in the Gas Phase. *Accounts of Chemical Research*, **1999**, 32, 360-367.
16. **Ruotolo BT, Hyung SJ, Robinson PM, Giles K, Bateman RH, Robinson CV.**
Ion mobility-mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **2007**, 46, 8001-8004.
17. **Gabelica V.**

- Intérêt de la spectrométrie de mobilité ionique pour l'étude de la conformation et des assemblages non-covalents de biomolécules. *Spectra Analyse*, **2006**, 251, 30-36.
18. **Shvartsburg AA, Smith RD.**
Fundamentals of Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2008**.
 19. **Clemmer D.**
Cross Section Database.
<http://www.indiana.edu/~clemmer/Research/cross%20section%20database/cs%20database.htm>.
 20. **Smith DP, Knapman TW, Campuzano I, Malham RW, Berryman JT, Radforda SE, Ashcroft AE.**
Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry- mass spectrometry studies. *European Journal of Mass Spectrometry*, **2009**, 15, 113-130.
 21. **Mesleh MF, Hunter JM, Shvartsburg AA, Schatz GC, Jarrold MF.**
Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential. *Journal of Physical Chemistry*, **1996**, 100, 16082-16086.
 22. **Shvartsburg AA, Jarrold MF.**
An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions. *Chemical Physics Letters*, **1996**, 261, 86-91.
 23. **Scarff CA, Thalassinos K, Hilton GR, Scrivens JH.**
Travelling wave ion mobility mass spectrometry studies of protein structure: biological significance and comparison with X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2008**, 22, 3297-3304.
 24. **Shelimov KB, Clemmer DE, Hudgins RR, Jarrold MF.**
Protein Structure in Vacuo: Gas-Phase Conformations of BPTI and Cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119, 2240-2248.
 25. **Sugadev R, Balasundaresan D, Ponnuswamy MN, Kumaran D, Swaminathan S, Sekar K.**
The crystal structure of bovine liver catalase. *To be published*.
 26. **Schroder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN.**
Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure*, **2000**, 8, 605-615.
 27. **Utrecht C, Versluis C, Watts NR, Wingfield PT, Steven AC, Heck AJ.**
Stability and Shape of Hepatitis B Virus Capsids In Vacuo. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **2008**.
 28. **Schenauer MR, Leary JA.**
An ion mobility-mass spectrometry investigation of monocyte chemoattractant protein-1. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2009**, Article in Press.
 29. **Hyung SJ, Robinson CV, Ruotolo BT.**
Gas-phase unfolding and disassembly reveals stability differences in ligand-bound multiprotein complexes. *Chemistry & Biology*, **2009**, 16, 382-390.
 30. **Hopper JT, Oldham NJ.**
Collision Induced Unfolding of Protein Ions in the Gas Phase Studied by Ion Mobility-Mass Spectrometry: The Effect of Ligand Binding on Conformational Stability. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2009**.
 31. **Lawrence S.**
Billion dollar babies--biotech drugs as blockbusters. *Nature Biotechnology*, **2007**, 25, 380-382.
 32. **Chartrain M, Chu L.**
Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2008**, 9, 447-467.
 33. **Reichert JM, Valge-Archer VE.**
Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **2007**, 6, 349-356.

34. **Beck A, Wurch T, Corvaia N.**
Therapeutic antibodies and derivatives: from the bench to the clinic. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2008**, 9, 421-422.
35. **Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP.**
Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2004**, 93, 2645-2668.
36. **Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC, Lokteff M, Klinguer-Hamour C, Haeuw JF, Goetsch L, et al.**
Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2008**, 9, 482-501.
37. **Zhang Z, Pan H, Chen X.**
Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrometry Reviews*, **2008**.
38. **Beck A, Wagner-Rousset E, Goetsch L, Corvaia N.**
Therapeutic antibodies: structure assessment by Mass Spectrometry from screening to clinical batches. *Screenings: Trends in drugs discovery*, **2008**, 9, 18-20.
39. **Tito MA, Miller J, Walker N, Griffin KF, Williamson ED, Despeyroux-Hill D, Titball RW, et al.**
Probing molecular interactions in intact antibody: antigen complexes, an electrospray time-of-flight mass spectrometry approach. *Biophysical Journal*, **2001**, 81, 3503-3509.
40. **Oda M, Uchiyama S, Robinson CV, Fukui K, Kobayashi Y, Azuma T.**
Regional and segmental flexibility of antibodies in interaction with antigens of different size. *FEBS Journal*, **2006**, 273, 1476-1487.
41. **Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, et al.**
The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **1997**, 390, 249-256.
42. **Doan T.**
Etude fonctionnelle du génome de *Bacillus subtilis* : de nouvelles régulations transcriptionnelles du métabolisme central du carbone. *Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon*, Paris, **2003**.
43. **Doan T, Aymerich S.**
Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate. *Molecular Microbiology*, **2003**, 47, 1709-1721.
44. **Zorrilla S, Doan T, Alfonso C, Margeat E, Ortega A, Rivas G, Aymerich S, et al.**
Inducer-modulated cooperative binding of the tetrameric CggR repressor to operator DNA. *Biophysical Journal*, **2007**, 92, 3215-3227.
45. **Zorrilla S, Chaix D, Ortega A, Alfonso C, Doan T, Margeat E, Rivas G, et al.**
Fructose-1,6-bisphosphate acts both as an inducer and as a structural cofactor of the central glycolytic genes repressor (CggR). *Biochemistry*, **2007**, 46, 14996-15008.
46. **Smith RD, Light-Wahl KJ.**
The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biological Mass Spectrometry*, **1993**, 22, 493-501.
47. **Smith DP, Giles K, Bateman RH, Radford SE, Ashcroft AE.**
Monitoring Copopulated Conformational States During Protein Folding Events Using Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, 18, 2180-2190.
48. **Uversky VN.**
Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science*, **2002**, 11, 739-756.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

En introduction de ce travail de thèse nous rappelions que « l'histoire et le succès de la spectrométrie de masse supramoléculaire sont intimement liés aux développements instrumentaux » qui ont été réalisés au XX^{ème} siècle, et plus particulièrement durant ces vingt dernières années. La première partie de ce manuscrit a donc été consacrée à un rappel bibliographique décrivant les principaux développements concernant la MS supramoléculaire, en insistant plus particulièrement sur les principes physico-chimiques qui régissent les différentes étapes d'une analyse MS (ionisation, transmission, discrimination en fonction du rapport m/z et détection).

Nous avons montré dans cette première partie que la compréhension détaillée du fonctionnement des spectromètres de masse est essentielle en MS supramoléculaire, non seulement pour évaluer le potentiel et les limitations de l'approche, mais également pour l'optimisation rigoureuse et systématique des instruments. Cette étape incontournable conditionne la fiabilité des résultats obtenus, au même titre que la phase de préparation des échantillons. La maîtrise de l'instrument et de l'échantillon permet alors de mettre en œuvre différentes stratégies analytiques, également exposées dans cette première partie, qui donnent accès à des informations aussi cruciales que la stœchiométrie des édifices supramoléculaires, leur affinité, leur spécificité, leur dynamique d'assemblage ou encore leur conformation. Cette partie bibliographique a donc constitué la base du travail expérimental décrit dans les parties suivantes.

La seconde partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'apport du nanospray sur puce microfluidique en MS supramoléculaire. Nous avons ainsi procédé aux développements méthodologiques qui ont permis d'automatiser des expériences de MS supramoléculaire grâce au robot Triversa Nanomate (Advion Biosciences). Les avantages et inconvénients de ce système ont été identifiés et le potentiel de l'instrument a ensuite été illustré dans deux cas d'études concrètes :

- ▶ La première étude, axée sur la caractérisation des **interactions entre des molécules de la famille des calixarènes et des toxines protéiques (leucotoxines) sécrétées par le staphylocoque doré**, a permis de confirmer l'existence d'interactions spécifiques entre ces partenaires, et d'en déterminer la stœchiométrie ainsi que les affinités relatives et absolues.
- ▶ La seconde étude réalisée concerne la détermination de l'**état d'oligomérisation de DAPK**, une protéine à activité kinase impliquée dans les mécanismes de mort cellulaire. Dans ce projet, le croisement des données de MS supramoléculaire et de fluorescence ont permis de proposer un modèle de régulation de la protéine basé sur une **relation structure-activité**, dans lequel la dimérisation de la protéine bloque l'accès au site catalytique et réduit donc l'activité kinase de DAPK.

Le travail présenté dans cette seconde partie ouvre de nouvelles perspectives dans le contexte du développement de molécules à visée thérapeutique. En effet, alors que l'**automatisation** et la **réduction de la consommation d'échantillon** liées à l'utilisation du nanospray sur puce microfluidique permettent désormais d'intégrer la MS supramoléculaire dans les phases de **criblage primaire et secondaire de moyen débit**, le **contenu informatif** de la technique en fait également un outil de choix pour assister les **étapes d'optimisation des molécules préalablement sélectionnées**. De plus, la **versatilité** de la MS supramoléculaire permet également de mettre cette approche en œuvre dans des études plus fondamentales visant à **comprendre à l'échelle moléculaire le rôle et les mécanismes d'action** de protéines représentant des cibles thérapeutiques potentielles, telles que les leucotoxines ou la protéine DAPK.

La troisième partie de ce manuscrit se focalise sur l'étude de complexes protéine / ARN par MS supramoléculaire, une application qui jusqu'alors avait très peu été abordée dans la littérature.

Les interactions entre protéines et ARN sont impliquées dans les processus fondamentaux du fonctionnement cellulaire et justifient de ce fait l'intérêt grandissant qui leur est porté. Dans ce contexte la MS supramoléculaire offre un potentiel intéressant pour la caractérisation de tels édifices, potentiel qui a été illustré au travers de trois études portant sur des protéines intervenant dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN :

- ▶ **L'étude par MS supramoléculaire de Trml, une protéine assurant la méthylation de l'ARNt**, a permis de déterminer l'état d'oligomérisation de la protéine, ainsi que la stœchiométrie de fixation de l'ARNt.

- ▶ **L'étude de Tgt, une protéine modifiant des ARNt impliqués dans la dysenterie bactérienne**, a premièrement révélé l'état d'oligomérisation dimérique de la protéine, ainsi que la stœchiométrie du complexe formé entre Tgt et un ARNt cible. De plus, le criblage de différents inhibiteurs a montré qu'en se fixant à la protéine, ces molécules non seulement interfèrent avec la fixation de l'ARNt, mais sont également capables de dissocier les complexes Tgt / ARNt préalablement formés.
- ▶ **La reconstitution *in vitro* de complexes ribonucléoprotéiques à boîte H/ACA** impliqués dans la pseudouridylation de l'ARN a permis d'illustrer les potentialités de la MS supramoléculaire pour l'étude des réseaux d'interaction de complexes protéine / ARN.

Le travail décrit dans cette partie a donc permis de développer des stratégies analytiques pour la caractérisation de complexes protéine / ARN par MS supramoléculaire, répondant ainsi d'une part à une demande croissante de la part des biologistes, et assurant d'autre part le **lien entre protéomique descriptive et protéomique fonctionnelle** dans la thématique des interactions protéine / ARN qui est abordée au laboratoire.

La quatrième et dernière partie de ce manuscrit a été consacrée à l'apport en MS supramoléculaire du couplage entre mobilité ionique et spectrométrie de masse. Le principe de cette technologie nouvelle au laboratoire a tout d'abord été détaillé en mettant un accent particulier sur la stratégie d'optimisation du Synapt HDMS pour la caractérisation de protéines intactes et de complexes non-covalents par IM-MS. Les développements méthodologiques réalisés durant ce travail de thèse ont ensuite été concrétisés dans deux études :

- ▶ **Dans une première étude portant sur l'étude des propriétés de reconnaissance antigénique d'anticorps**, l'IM-MS a permis de mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité de pontage des cystéines au sein de différents lots d'antigène JAM-A. De plus, il a été montré que cette hétérogénéité structurale n'affecte ni la conformation globale de la protéine, comme démontré par la mesure de sa section efficace par nanoESI-IM-MS, ni la reconnaissance spécifique par les anticorps anti-JAM-A qui, elle, a été étudiée par détection directe en phase gazeuse des complexes immuns formés en solution. Cette étude a ainsi révélé la formation de complexes anticorps / antigène de stœchiométrie 1:4, une information cruciale dans la compréhension du mécanisme d'action de ces biomolécules à visée thérapeutique.
- ▶ **L'objet de la seconde étude concerne l'interaction ligand-dépendante entre le facteur de transcription CggR et son ADN cible.** La combinaison d'expériences menées par nanoESI-MS sur puce microfluidique et par nanoESI-IM-MS a permis de révéler que la fixation du fructose-1,6-bisphosphate provoque la dissociation des interactions entre les sous-unités de CggR fixées à l'ADN, provoquant ainsi **d'importants changements conformationnels mis en évidence par la mesure de la section efficace du complexe en phase gazeuse** (IM-MS), et confirmés par des techniques en solution (SAXS, SEC).

Ainsi, les développements méthodologiques réalisés au cours de cette thèse autour du thème de la mobilité ionique représentent, au sein du laboratoire, une ouverture vers de nouvelles études, où les possibilités de séparer des conformères d'une protéine ou bien encore de mesurer la section efficace d'édifices non-covalents pourront être pleinement exploitées pour décrypter des mécanismes biologiques toujours plus complexes.

En conclusion, ce travail de thèse a été focalisé sur l'apport en MS supramoléculaire des développements instrumentaux récents que sont le **nanospray sur puce microfluidique** et le **coupage entre mobilité ionique et spectrométrie de masse**. L'évaluation des performances, les optimisations instrumentales et les développements méthodologiques liés à ces nouvelles technologies ont constitué une part importante de ce travail de thèse. Nous avons ainsi pu démontrer la manière avec laquelle ces nouvelles technologies permettent d'étendre le potentiel de l'approche MS supramoléculaire pour la caractérisation d'assemblages moléculaires particulièrement complexes (stœchiométrie, spécificité, affinité, réseau d'interaction, dynamique d'assemblage, dynamique conformationnelle, etc.).

Finalement, il est important de rappeler que les différentes collaborations menées durant cette thèse ont permis de confronter les résultats de la MS supramoléculaire à ceux de techniques biophysiques plus conventionnelles. De cette confrontation, il ressort que la **MS supramoléculaire apparaît désormais comme une technique non seulement complémentaire mais également de plus en plus indispensable en biologie structurale pour la caractérisation détaillée de complexes non-covalents**. Finalement, notre travail apporte de nombreux éléments montrant que la **pertinence des informations** et la **faible consommation d'échantillon** apportées par les performances instrumentales actuelles et les développements à venir, font de la MS supramoléculaire une **technique incontournable** dans les nouveaux défis qui se posent en biologie, tels que la caractérisation de complexes endogènes ou encore de protéines membranaires.

PARTIE EXPERIMENTALE

Informations concernant les échantillons et leur préparation

Le principe des différentes techniques d'échange de tampon utilisées au cours de ce travail de thèse a été décrit dans la première partie de ce manuscrit (Partie I, Chapitre III, 1). La mise en œuvre de ces différentes techniques a été réalisée conformément aux recommandations des fournisseurs.

La concentration des protéines a été mesurée par la méthode de Bradford en utilisant l'albumine de sérum bovin en tant qu'étalon.¹ Concernant les ARN, leur concentration a été déterminée par mesure directe de leur absorbance à une longueur d'onde de 260 nm dans l'eau en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $33,3 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Le tableau ci-dessous récapitule les conditions d'échange de tampon des protéines étudiées ainsi que leur masse moléculaire, leur point isoélectrique et leur séquence en acides aminés :

Protéine	Masse moléculaire théorique (Da)	pI	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
LukS-PV	33099.5	8.4	NH ₄ Ac 300 mM pH 7.5	3 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	GPLGSPEFDNNIENIGDGAIEVVKRTEDTSSDKWGVQTQNI QDFVFKDKKYNKDALILKMQGFINSKTTYNYKNTDHIKA MRWPFQYNIKLTNDPNVDLNLKPKNKIDSVNSQTLG YNIGGNFNSGPGSTGGNGSFNYSKTISYNQQNYISEVEHQ NSKSVQWGIKANSFITSLGKMSGHPNLFVGYKPYSQN PRDYFVPDNEPLPLVHSGFNPSFIATVSHEKGSDDTSEF EITYGRNMDVTHATRTRTHYG
LukF-PV	35233.9	8.8			GPLGSPEFAQHITPVSEKVVDDKITLYKTTATSDSKLKIS QILTFNFIKDKSYDKDTLILKAAGNIYSGYTKPNKDTISSQ FYWGSKYNISINDSNDSDVNDVYAPKNQNEEFVQVQT VGYSYGGDINISNGLSGGNGSKSFSETINYKQESYRTS LDKRTNFKKIGWVDEAHKIMNNGWGPYGRDSYHSTYGN EMFLGSRQSNLNAGQNFLEYHKMPVLSRGNFNPEFIGVL SRKQNAAKKSKITVTYQR
HlgA	32678.8	9.5			GPLGSPEFENKIEDIGQGAIEIKRTQDITSKRLAITQNIQFD FVKDKKYNKDALVVKMQGFISRTTYSDLKPYIKRMIW PFQYNIKLTNDPNVDLNLKPKNKIDSADVSQKLGYNIGG NFQSAISGSGSFNYSKTISYNQKQNYVEVESQNSKGV KWGVKANSFVTPNGQVSAYDQYLFADPTGPAARDYFV PDNQLPPLIQSGFNPSFITLTSHEKGGKDKSEFEITYGRN MDATYAYVTRHRLAV
HlgC	32993.5	9.3			GPLGSANDTEDIGKNDVEIIRKTEDKTSNKWGVQTQNIQ DFVFKDKKYNKDALILKMQGFISRTTYYNYKNTNHIKSM RWPFQYNIKLTNDKYYSLINYLKPKNIESTNASQTLGYNI GGNFQSAISLGGNGSFNYSKISYTOQNYVSEVEQQNS KSVLWGVKANSFATKSGQKSAFDSDLFVGYKPHSKDPR DYFVPSDELPLVQSGFNPSFIATVSHEKGSDDTSEFEIT YGRNMDVTHAIKRSTHYGN
DAPK	33750.4	5.4	NH ₄ Ac 10 mM pH 8.8	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	TVFRQENVDDYDTEGELGSGQFAVVKCREKSTGLQY AAKFIKRRRTKSSRRGVSREDIEREVSILKEIQHPNVITLH EVYENKTDVILILELVAGGELFDFLAEKESLTEEEATEFLK QILNGVYYLHSLQIAHFDLKPENIMLLDRNVKPRIKIIDFG LAHKIDFGNEFKNIFGTPEFVAPEIVNYEPLGLEADMWSI GVITYILLSGASPFLGDTKQETLANVSAVNYEFEDEYFSN TSALAKDFIRRL
DAPKdel	33107.7	5.2			TVFRQENVDDYDTEGELGSGQFAVVKCREKSTGLQY AAKFIKRRRTKSSREDIEREVSILKEIQHPNVITLHEVYENK DVLILELVAGGELFDFLAEKESLTEEEATEFLKQILNGVY YLHSLQIAHFDLKPENIMLLDRNVKPRIKIIDFGLAHKIDF GNEFKNIFGTPEFVAPEIVNYEPLGLEADMWSIGVITYILL SGASPFLGDTKQETLANVSAVNYEFEDEYFSNTSALAKD FIRRLLVKDPKK

Protéine	Masse moléculaire théorique (Da)	pI	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
Trml	28863.3	7.4	NH ₄ HCO ₃ 200 mM pH 8.0	/	GSHMAWPGPLLLKDRKGRAYLVFPKGGVFHHHKGSV PHEALLEAGPGVVRTHLGEELSVHRPTLEEYLLHMKRS ATPTYKPDASAMVTLDDLAPGMRVLEAGTSGGGLTLFLA RAVGEKGLVESYEARPHHLQAERNVRAFVQVENVRF HLGKLEEALEEAAYDGVALDLMFPWKVLEKAALALKPD RFLVAYLPNITQVLELVRAEAHPFRLERLVLEVGWREWE VRLPVAHPRFQQVGHATAFLVALRRW
Tgt	42738.5	6.6	NH ₄ Ac 1 M pH 8.0	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	VEATAQETDRPRFSFSAAREGKARTGTIEMKRGVIRTPA FMPVGTAAATVKALKPETVTRATGADILGNTYHMLRPGAE RIAKLGLLHSMGWDPRILTDSSGGYQVMSLSLTKQSEE GVTFKSHLDGSRHMLSPERSIEIQHLLGSDIVMAFDECTP YPATPSRAASSMERSMRWAKRSRDAFDSRKEQAENAA LFGIQQGSVFENLRQQSADALAEIGFDGYAVGGLAVGEG QDEMFRVLDFSVPLPDDKP
L7Ae	13422.6	5.3	NH ₄ Ac 300 mM pH 7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	MAKPSYVKFEVPEKELAEKALQAVEIARDTGKIRKGTNETT KAVERGQAKLVIAEDVDPEEIVAHLPPLCEEKIPYIYVPS KKELGAAAGIEVAASVAIIEPGKARDLVEEIAMVKVRELMK
Cbf5	38139.6	9.1			GPLGSMARDEVRRILPADIKREVIVKDDKAETNPKWGFPP PDKRPIELHIQYGVINLDKPPGPTSHEVVAVIKRILNLEKA GHGGTLDPKVSGLPVALERATRVVQALLPAGKEYVALM HLHGDVPEDKIRAVMKEFEGEIQRPLRSVAVKRRLRTRK VYIEILEIDGRDVLFRVGVAGTYRSLIHHIGLALGVGAH MAELRRTRSGPFKEDETLVTLHDLVDYHYHFKEDGIEEY IRKAIQPMKAVEHL
Nop10	7485.8	10.2			GPLGSMRFRIRKCPKCGRATLKETCPVCGEKTKVAHPP RFSPEDPYGEYRRRLKRELLGIGRKEK
Gar1	11363.5	10.4			GPLGSMKRLGKVSHYAKQGLLIVRSTWVPSLNDPVIDKD LKFVGVKDVFGVPVKRPYVAIKPKVDDPEKYGVQVLYIDE RRKKRKRKGRGRMKKKFKG
JAM-A	24539.5	/	NH ₄ Ac 150 mM pH 7.5	1 cycle de dessalage sur colonne de filtration sur gel (NAP-5)	/
Antigène contrôle	12767.2	/		/	
Anticorps murin	147073 (G0F/G0F)	/		1 cycle de dessalage sur colonne de filtration sur gel (NAP-5) + Concentration par ultracentrifugation (Vivaspin, MWCO = 30 kDa)	/
Anticorps humanisé	147240 (G0F/G0F)	/		/	
Anticorps contrôle	148576 (G0F/G0F)	/		/	
CggR	38780.6	6.39	NH ₄ Ac 150 mM pH 8.0	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	MRGSHHHHHGSMNQLIQAKKLLPDLLVMQKRFELQ YIRLTEPIGRRSLSASLGISERVLRGEVQFLKEQNLVDIKT NGMTLTEEGYELLSVLEDTMKDVLTGLLEKTLKERLNLK DAIIVSGDSDQSPWVVKEMGRAAVACMKKRFSQKNIVAV TGGTTIEVAEMMTPDSKNRELLFVPARGGLGEDVKNQA NTICAHMAEKASGTYRLLFVPGQLSQGAYSSIIIEEPSVKE VLNTIKSASMLVHGIGE
Complexe 4:2 CggR:O _R	183298	/		7 cycles de dessalage par ultracentrifugation (Vivaspin, MWCO = 30 kDa)	/
Complexe 4:1 CggR:O _{RL}	182802	/		/	

Le tableau ci-dessous récapitule les conditions d'échange de tampon des différents ARN étudiés ainsi que leur masse moléculaire et leur séquence nucléotidique :

ARN	Masse moléculaire théorique (Da)	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence nucléotidique
ARN ^{Tyr}	27511.5	NH ₄ Ac 200 mM pH 8.0	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	5' ppp-GGUGGGGUUCCCGAGCGGCCAAA GGGAGCAGACUGUAAAUCUGCCGUCAU CGACUUCGAAGGUUCGAAUCCUCCCCC ACCACCA-3' OH
Pab91	18597.1	NH ₄ Ac 300 mM pH 7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba, 0.5 ml)	5' ppp-CCCCUGGGGUCUCACACCUCGG GAUCAGUACCGGAGGGCGUCCCCA GGGGACA-3' OH
taPab91	4179.6			5' OH-GACCGUCGUGAGA-3' OH
Pab21	19217.5			5' pp-GGGCCGGUCUCCGCCUCUCCG GGGAAUAGUGAACCGGGGUUCCGGCC GGGGUACU-3' OH

Les échantillons mentionnés ci-dessus ont été produits par les collaborateurs suivants :

Echantillons	Collaborations	
LukS-PV	Daniel Keller, Benoît Laventie, Dr Gilles Prévost	Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg
LukF-PV		
HlgA		
HlgC		
DAPK	Michael Zimmermann, Pr Jacques Haiech	Faculté de Pharmacie, Strasbourg
DAPK _{del}		
Trml	Dr Pierre Barraud, Dr Frédéric Dardel, Dr Carine Tisné	Université Paris-Descartes, Paris
Tgt	Dr Tina Ritschel, Pr Dr Gerhard Klebe	Phillips-Universität, Marburg, Allemagne
ARN ^{Tyr}		
L7Ae	Dr Xavier Manival, Pr Bruno Charpentier, Dr Christiane Branlant	Laboratoire ARN-RNP, structure-fonction- maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale, Nancy
Cbf5		
Nop10		
Gar1		
Pab91		
taPab91		
Pab21		
JAM-A	Dr Elsa Wagner-Rousset, Dr Martine Malissard, Dr Bertrand Chol, Dr Alain Robert, Dr Nathalie Corvaia, Dr Alain Beck	Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois
Antigène contrôle		
Anticorps murin		
Anticorps humanisé		
Anticorps contrôle	Denis Chaix, Dr Catherine Royer, Dr Nathalie Declerck	Centre de Biochimie Structurale, Montpellier
CggR		
Complexe 4:2 CggR:O _R		
Complexe 4:1 CggR:O _{RL}		

Référence :

1. Bradford MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72, 248-254.

***LISTE DES PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS***

LISTE DES PUBLICATIONS

1. Barraud P, Golinelli-Pimpaneau B, Atmanene C, Sanglier S, Van Dorsselaer A, Droogmans L, Dardel F, Tisne C. Crystal structure of *Thermus thermophilus* tRNA m1A58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA. **Journal of Molecular Biology** (2008), 377, 535-550.
2. Sanglier S, Atmanene C, Chevreux G, Van Dorsselaer A. Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. **Methods in Molecular Biology** (2008), 484, 217-243.
3. Diemer H, Atmanene C, Sanglier S, Morrissey B, Van Dorsselaer A, Downard KM. Detection and structural features of the betaB2-B3-crystallin heterodimer by radical probe mass spectrometry (RP-MS). **Journal of Mass Spectrometry** (2009), 44, 803–812.
4. Atmanene C, Laux A, Glattard E, Muller A, Schoentgen F, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Van Dorsselaer A, Stefano GB, Sanglier-Cianféroni S, Goumon Y. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. **Medical Science Monitor** (2009), 15, BR178-187.
5. Atmanene C*, Wagner-Rousset E*, Malissard M, Chol B, Robert A, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Sanglier-Cianféroni S. Extending mass spectrometry contribution to therapeutic monoclonal antibody lead optimization: characterization of immune complexes using noncovalent ESI-MS. **Analytical Chemistry** (2009), 81, 6364-6373.
6. Ritschel T*, Atmanene C*, Reuter K, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianféroni S, Klebe G. An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interactions. **Journal of Molecular Biology** (2009), 393, 833-847.
7. Vivat Hannah V, Atmanene C, Zeyer D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianféroni S. Native Mass Spectrometry: an "ESI" Way to Support Structure- and Fragment-Based Drug Discovery. **Future Medicinal Chemistry - Sous presse**.
8. Zimmermann M, Atmanene C, Xu Q, Fouillen L, Van Dorsselaer A, Bonnet D, Marsol C, Hibert M, Sanglier-Cianféroni S, Pigault C, Watterson DM, Kilhoffer MC, Haiech J. Homodimerization of the Death-Associated Protein Kinase is Central to its Regulation. **PLoS One - Article soumis (octobre 2009)**.
9. Atmanene C, Chaix D, Royer CA, Declerck N, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianféroni S. Combination of Noncovalent Mass Spectrometry and Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry Reveals Sugar-Induced Conformational Changes of CggR / DNA Complex. **Article en cours de rédaction pour une soumission dans Analytical Chemistry**.

* contribution équivalente des deux auteurs.

COMMUNICATIONS ORALES

1. Atmanene C, Keller D, Prévost G, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Etude des interactions leucotoxines / calixarènes par spectrométrie de masse des complexes non-covalents. 12èmes rencontres du club des jeunes de la société française de spectrométrie de masse, 19-23 mars 2007, Saint-Dié des Vosges.
2. Atmanene C, Ayoub D, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Apports de la spectrométrie de masse pour la caractérisation de complexes supramoléculaires en chimie et en biologie. Journée des doctorants de l'institut pluridisciplinaire Hubert Curien, 31 janvier 2008, Strasbourg.
3. Atmanene C, Wagner-Rousset E, Colas O, Robert A, Malissard M, Chol B, Corvaia N, Beck A, Van Dorsselaer A, Sanglier S. Apports de la spectrométrie de masse supramoléculaire pour l'étude des systèmes antigène / anticorps. 25èmes journées françaises de spectrométrie de masse, 8-11 septembre 2008, Grenoble.
4. Atmanene C, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Caractérisation de complexes non-covalents par spectrométrie de masse : apports de la mobilité ionique. Réunion Utilisateurs Waters, 4-5 décembre 2008, Paris.
5. Atmanene C, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Apports de la spectrométrie de masse supramoléculaire pour l'étude de complexes non-covalents protéine / ARN. Club ARN, 11 décembre 2008, Bordeaux.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

1. Atmanene C, Keller D, Prévost G, Dalla Serra M, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Noncovalent mass spectrometry for the study of leucotoxins / calixarenes interactions. Biophysics of ligand binding to drug targets, 14-16 mai 2007, Strasbourg.
2. Atmanene C, Delagoutte B, Lallous N, Birck C, Samama J-P, Sanglier S, Van Dorsselaer A. Benefits of using noncovalent mass spectrometry for the characterization of ICBP90 functional domains. 24èmes journées françaises de spectrométrie de masse, 17-20 septembre 2007, Pau.
3. Atmanene C, Barraud P, Dardel F, Tisné C, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Protein-oligonucleotide complexes characterization using noncovalent mass spectrometry: study of the tRNA binding properties of tRNA m1A58 methyltransferase. 56th conference of the American society of mass spectrometry, 1-5 juin 2008, Denver, CO, USA.
4. Atmanene C, Barraud P, Dardel F, Tisné C, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S. Protein-oligonucleotide complexes characterization using noncovalent mass spectrometry: study of the tRNA binding properties of tRNA m1A58 methyltransferase. 25èmes journées françaises de spectrométrie de masse, 8-11 septembre 2008, Grenoble.
5. Atmanene C, Wagner-Rousset E, Colas O, Robert A, Malissard M, Chol B, Corvaia N, Beck A, Van Dorsselaer A, Sanglier S. Noncovalent mass spectrometry characterization of monoclonal antibody / antigen complexes. 25èmes journées françaises de spectrométrie de masse, 8-11 septembre 2008, Grenoble.

6. Atmanene C, Wagner-Rousset E, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Sanglier-Cianfèrani S. Antibody / antigen complexes: characterization of immune complexes using noncovalent mass spectrometry. 57th conference of the American society of mass spectrometry, 31 mai - 4 juin 2009, Philadelphie, PA, USA.²
7. Atmanene C, Saliou JM, Manival X, Branlant C, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianfèrani S. Etude par Spectrométrie de Masse Supramoléculaire de la Reconstitution *in vitro* de particules RNP H/ACA. Sixièmes Rencontres de Figeac, 26 septembre au 1er octobre 2008, Figeac.