THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

par

Aurélie Même

DEVELOPPEMENT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE D'EDIFICES NON-COVALENTS EN CHIMIE ET EN BIOLOGIE.

Soutenue le 5 Juillet 2010 devant la commission d'examen :

Dr. Emmanuelle LEIZE Prof. François LALLIER Dr. William BUCHMANN Prof. Catherine FLORENTZ Prof. Rita BERNHARDT Directeur de thèse Rapporteur externe Rapporteur externe Examinateur Examinateur

Merci !

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Dynamique et Structure Moléculaire par Spectrométrie de Masse, sous la direction du Dr. Emmanuelle Leize, Directeur de Recherche au CNRS. Je te remercie Emmanuelle de m'avoir fait découvrir et aimer la spectrométrie de masse. Merci aussi de m'avoir guidée tout au long de ces trois années et un peu plus et pour le temps que tu as su me consacrer malgré tes nombreuses obligations. Merci enfin de m'avoir fait confiance jusqu'au bout dans les bons et les mauvais moments (et même après que j'aie cassé un capillaire un verre...).

J'adresse mes remerciements à Madame Catherine Florentz qui a accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie également Madame Rita Bernhardt, Messieurs François Lallier, William Buchmann et Jack Harrowfield qui ont bien voulu prendre de leur temps pour juger ce travail.

Ce travail étant le fruit de nombreuses collaborations, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui y ont contribué et plus particulièrement : Jack Harrowfield et Xao Yu, pour m'avoir fait découvrir les mystères des édifices supramoléculaires ; Sébastien Ulrich, pour le challenge qu'il m'a donné avec ses échantillons ; Julien Frey, Maryline Beyler et Valérie Heitz, avec qui j'ai exploré les entrelacs des caténanes et rotaxances ; Carolina Duarte, donneuse de sang très courageuse ; Rita Bernardt et Frank Hannemann, notamment pour m'avoir initiée à la biologie et pour leur accueil chaleureux à Sarrebruck.

Je tiens également à remercier le Conseil Régional d'Alsace et le CNRS pour avoir financé ma bourse de thèse.

Je souhaite ensuite remercier chaleureusement Hélène Nierengarten qui m'a encadrée pendant une partie de ce travail de thèse. Merci pour ta disponibilité et pour toutes les connaissances que tu m'as apportées. Je te remercie pour ta gentillesse et ton soutien pendant cette période. Ton aide m'a été très précieuse et j'aurai une petite pensée pour toi à chaque fois que nettoierai consciencieusement un électrospray !

Je souhaite bien sûr adresser un grand merci à toute l'équipe du LDSM2 : Noelle, pour avoir joué le rôle de directrice de thèse pendant 6 mois ; Nathalie, pour ses indispensables résumés de téléréalité ; Yannis, pour ses conseils pour la thèse et la suite ; Mélanie et sa bonne humeur ; Laurianne et ses bonnes idées de resto ; Romain, pour avoir partagé l'électrospray avec moi ; Cristina, avec qui j'ai découvert le MALDI-TOF ; Peran, bien que nous n'ayons jamais mis en œuvre nos plans diaboliques de vengeance ; Julie, et sa délicieuse tarte au fromage blanc ; Mickaël, mon tout premier stagiaire ; Laurie, qui a été indispensable pour la finalisation de ce travail et qui m'a fait découvrir Nancy et ses bons côtés (merci aussi Bruno !) ; et tous les stagiaires anciens et nouveaux pour la bonne ambiance au labo.

Merci aussi à l'ensemble des étudiants que j'ai pu avoir en cours. Cette expérience a été pour moi très enrichissante.

Je tiens évidemment à remercier mes proches pour leur soutien, même s'ils n'en ont pas eu conscience, lors de ces trois dernières années. Merci à ma famille pour m'avoir aidée en toutes circonstances et pour avoir cru en moi (et Olivia, passe ton doctorat d'abord !). Merci à mes amis, My-Linh et Nathalie, mes VAID préférées, Amandine, Pierre-Marie, Mélanie, ma promo de l'ENSCR, avec qui j'ai fait un bon bout de chemin, Mary et Olivier, ex-colloc et actuels voisins, et enfin à tous ceux de Strasbourg que cette thèse m'a permis de rencontrer. Et surtout merci à toi, Thomas, qui a eu la patience de me supporter, surtout lors de cette dernière année, et m'a soutenue jusqu'à la fin.

SOMMAIRE

te des abréviations10

INTRODUCTION GENERALE	12
Références	17

Chapitre 1 : Les édifices non-covalents : Généralités

1.1. Les différents types d'interaction non-covalente	22
1.1.1. Les liaisons électrostatiques (ou liaisons ioniques, ponts salins, paires d'ions)23
1.1.2. Les liaisons de van der vvaals	23
1.1.3. Les llaisons hydrogene	24
1.1.4. Les liaisons de coordination (ou interactions donneur/accepteur, liaisons	
datives)	24
1.1.5. Les liaisons hydrophobes	25
1.2. Les édifices non-covalents en chimie et biologie	25
1.2.1. La chimie supramoléculaire	25
1.2.1.1. L'émergence d'un nouveau concept	25
1.2.1.2. Les interactions mises en jeu	25
1.2.1.3. L'auto-assemblage comme processus de construction	27
1.2.2. L'importance des interactions non-covalentes en biologie	28
1.2.2.1. A l'échelle d'une protéine	28
1.2.2.1.1. La structure primaire	28
1.2.2.1.2. La structure secondaire	28
1.2.2.1.3. La structure tertiaire	. 29
1 2 2 1 4 La structure quaternaire	29
1 2 2 2 A l'échelle cellulaire	30

Chapitre 2 : Les méthodes d'investigation des interactions noncovalentes

2.1. Les techniques analytiques usuelles pour l'étude des interactions non-	
covalentes	32
2.1.1. La résonnance plasmonique de surface (SPR)	32
2.1.2. L'analyse calorimétrique par dosage isotherme (ITC)	33
2.1.3. Le dichroïsme circulaire (CD)	33
2.1.4. La spectroscopie Ultraviolet-Visible et la spectroscopie de Fluorescence	33
2.1.5. La spectroscopies Infrarouge (IR) et Raman	34
2.1.6. La cristallographie aux rayons X (RX)	34
2.1.7. La résonnance magnétique nucléaire (RMN)	34
2.1.8. La spectrométrie de masse	34

2.2. L'apport de la spectrométrie de masse pour l'étude des interactions non-	
covalentes	.35
2.2.1. La spectrométrie de masse à ionisation électrospray	.36
2.2.1.1. Le mécanisme d'ionisation électrospray	.36
2.2.1.1.1. La production de gouttelettes chargées	.36
2.2.1.1.2. La fission des gouttelettes chargées	.37
2.2.1.1.3. L'émission des ions en phase gazeuse	.37
2.2.1.2. Les sources électrospray	.38
2.2.1.2.1. La source nanoESI39	. 38
2.2.1.2.2. La source Cryospray	. 39
2.2.1.2.3. La préparation des échantillons pour l'étude d'édifices non-covalents	39
2.2.1.3. L'interface ESI	.41
2.2.1.3.1. Le rôle de l'interface ESI	.41
2.2.1.3.2. Configurations d'interface ESI	.41
2.2.1.3.3. L'optimisation des paramètres de l'interface ESI pour l'étude des	
complexes non-covalents	.43
2.2.1.4. L'analyseur	.44
2.2.1.4.1. Le couplage ESI-TOF	.44
2.2.1.4.2. La calibration	.45
2.2.1.4.3. Le calcul de la masse moléculaire	.45
2.2.1.5. Les règles d'ionisation et les spectres de masse ESI-MS	.46
2.2.2. La spectrométrie de masse MALDI-MS	.47
2.2.2.1. La préparation de l'analyte	.48
2.2.2.1.1. Le choix de la matrice	.48
2.2.2.1.2. Les différents dépôts	.49
2.2.2.1.3. La cible	. 50
2.2.2.2. Le mécanisme d'ionisation MALDI	.51
2.2.2.2.1. L'ionisation primaire	. 51
2.2.2.2.2. L'ionisation secondaire	.51
2.2.2.3. L'analyseur à Temps de Vol	.52
2.2.2.3.1. Le principe de l'analyseur à Temps de Vol	.52
2.2.2.3.2. Le mode linéaire	.53
2.2.2.3.3. Le mode réflectron	.53
2.2.2.3.4. L'extraction retardée (Delaved Extraction DE)	.54
2.2.2.4. Les détecteurs	.55
2.2.2.4.1. Le détecteur MCP (Microchannel Plate)	.55
2.2.2.4.2. Le détecteur CovalX	.55
2.2.2.5. Les règles d'ionisation en MALDI-MS	.56
2.2.3. Etat de l'art en spectrométrie de masse pour l'observation des édifices non-	
covalents	.56
2.2.3.1. Les informations obtenues par spectrométrie de masse	.57
2.2.3.1.1. La stœchiométrie du complexe	.57
2.2.3.1.2. La spécificité du complexe	.58
2.2.3.1.3. La sélectivité du complexe	.59
2.2.3.1.4. L'étude en phase gazeuse des complexes	.60
2 2 3 1 5 L'étude de la structure tridimensionnelle des complexes biologiques	60
2 2 3 1 6 L'étude de complexes de haut poids moléculaire	61
2 2 3 1 7 La détermination de constantes de stabilité par spectrométrie de	
masse : les stratégies expérimentales	.61
2232 La validité des informations obtenues	65
2 2 3 2 1 Les interactions non-covalentes en phase gazeuse	65
2 2 3 2 2 La formation d'agrégats non spécifiques	65
2 2 3 2 3 Les facteurs de rénonse	66
Références	69

ESULTATS76

Chapitre 3 : Développement d'une approche par MALDI-TOF pour la caractérisation d'architectures supramoléculaires chimiques

3.1. Développement d'une approche par MALDI-TOF pour la caractérisation	04
3.1.1 Ontimisation du protocole	01 82
3 1 1 1 Choix de la matrice	
3.1.1.2. Optimisation de la méthode de dépôt	84
3.1.1.3. Optimisation du tir laser	85
3.1.2. Caractérisation des grilles neutres	87
3.1.2.1. Influence de l'ion métallique sur la stœchiométrie de la grille	87
3.1.2.2. Etude de la stabilité relative des grilles	88
3.1.3. Conclusions	89
2.0 Dévelopment d'une engrache neu MAL DI TOF neur le constérie dies	
3.2. Developpement d'une approche par MALDI-I OF pour la caracterisation d'architectures métallo-supramoléculaires insolubles	Q1
3 2 1 La méthode MAI DI-MS sans solvant	91
3.2.2. La préparation de l'analyte	
3.2.3. Les résultats obtenus pour les commutateurs métallo-contrôlés	93
3.2.4. Conclusions	95
3.3. Developpement d'une approche par MALDI-TOF pour la caractérisation	
3.2.1. L'antimication des paramètres instrumentaux du MALDI TOE pour la	96
caractérisation d'édifices non-covalents solubles dans des solvants volatils	97
3.3.1.1. L'ontimisation de la différence de notentiel IS1/IS2	
3.3.1.2. L'optimisation de l'extraction retardée	
3.3.1.3. L'optimisation de la puissance laser	98
3.3.1.4. L'optimisation du gain	98
3.3.2. Les pseudorotaxanes cycliques	99
3.3.3. Les « presses moléculaires »	101
3.3.4. Conclusions	104
3.4. Conclusions du chapitre 3	105
Références	107

Chapitre 4 : Développement d'une approche par spectrométrie de masse pour l'étude *in vivo* et *in vitro* de l'ITPP dans le sang

4.1. Développement d'un protocole pour l'analyse de l'ITPP dans le sang par MALDI-MS	113
4.1.1. Pourquoi choisir la spectrométrie de masse MALDI ?	.113
4.1.2. La mise au point du protocole pour la détection de l'ITPP dans le sang par	
MALDI-MS	114
4.1.2.1. Les difficultés inhérentes à la détection de l'ITPP dans le sang	. 114
4.1.2.1.1. La nature de l'ITPP	. 114
4.1.2.1.2. Le sang : un milieu complexe	. 115
4.1.2.2. La préparation de l'échantillon	115
4.1.2.2.1. L'échantillon sanguin	.115

4.1.2.2.2. La cible MALDI	116
4.1.2.2.3. La matrice et le type de dépôt	116
4.1.2.2.4. La première étape de désalinisation : le passage sur résine	
échangeuse d'ions	118
4.1.2.2.5. La deuxième étape de désalinisation : le lavage du dépôt	119
4.1.2.3. L'optimisation des paramètres instrumentaux	121
4.1.2.3.1. Le choix du mode d'ionisation	122
4.1.2.3.2. L'optimisation de la différence de potentiel IS1/IS2	123
4.1.2.3.3. L'optimisation de l'extraction retardée	123
4.1.2.3.4. L'optimisation de la puissance laser	123
4.1.2.3.5. L'optimisation du gain	124
4.1.2.3.6. L'optimisation des tirs laser	124
4.1.2.4. Limite de détection de l'ITPP dans chaque fraction sanguine	124
4.1.3. La guantification de l'ITPP dans le sang par MALDI-MS	125
4.1.3.1. La référence interne	125
4.1.3.2. Les courbes de calibration	126
4.1.3.3. La validité des résultats	128
4.1.4. Application du protocole sur du plasma de souris traitées	129
	120
4.1.5. Conclusions	
4.1.5. Conclusions	130
4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS	132
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 	130 132 133
 4.1.5. Conclusions	130 132 133 133
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 	130 132 133 133 133
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine. 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 	130 133 133 133 133 134
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine. 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 	130 133 133 133 134 136
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 	130 133 133 133 134 136 137
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 	130 133 133 133 133 134 136 137 137
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives 	130 133 133 133 133 134 136 137 137 138
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine. 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives. 4.2.1.4. La validation des résultats 	130 133 133 133 133 133 134 136 137 137 138 142
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 	130 133 133 133 134 136 137 137 137 138 142 142
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/IHP 	130 133 133 133 134 136 137 137 137 138 142 142 143
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/IHP 4.2.2.2. Le complexe hémoglobine/BPG 	130 133 133 133 133 134 136 137 137 137 138 142 142 142 143 147
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine. 4.2.1.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/IHP 4.2.2.3. Le complexe hémoglobine/ITPP 	130 133 133 133 133 133 134 136 137 137 138 142 142 143 147 150
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/IHP 4.2.2.3. Le complexe hémoglobine/ITPP 4.2.3. Les expérience de compétition en solution 	130 133 133 133 134 136 137 137 137 137 142 142 142 142 143 1450 153
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/ITPP 4.2.2.3. Le complexe hémoglobine/ITPP 4.2.3. Les expérience de compétition en solution 4.2.4. Conclusions 	130 133 133 133 134 136 137 137 137 137 138 142 142 142 143 150 153 155
 4.1.5. Conclusions 4.2. Etude de l'interaction hémoglobine/ITPP par ESI-MS 4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule 4.2.1.1. La préparation de l'échantillon 4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine 4.2.1.2. L'étape de dessalage 4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux 4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine 4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes 4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives 4.2.1.4. La validation des résultats 4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques 4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/ITPP 4.2.3. Le complexe hémoglobine/ITPP 4.2.3. Les expérience de compétition en solution 4.2.4. Conclusions 	130 133 133 133 133 133 134 136 137 137 138 142 142 143 147 150 155

Chapitre 5 : L'apport de la spectrométrie de masse pour la mesure de constantes de stabilité de complexes protéine/protéine

5.1. Le contexte biologique	160
5.1.1. Adx et AdR : leur rôle dans l'organisme	160
5.1.2. La mesure des constantes de stabilité en biologie	161
5.1.2.1. La résonnance plasmonique de surface (SPR)	161
5.1.2.2. La méthode du Cytochrome C	162
5.1.3. La spectrométrie de masse : une technique alternative pour la mesure de	
constantes de stabilité	162
5.2. L'optimisation des conditions ESI-MS	163
5.2.1. La préparation de l'échantillon	164
5.2.1.1. La solubilisation des protéines	164
5.2.2.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux	165

5.3. L'analyse du complexe Adx/AdR	166
5.3.1. L'analyse d'Adx 1-128 (wild type)	166
5.3.1.1. Analyse d'Adx 1-128 en conditions dénaturantes	167
5.3.1.2. Analyse d'Adx 1-128 en conditions natives	168
5.3.2. L'analyse des Adx mutants et tronqués	169
5.3.3. L'analyse d'AdR	171
5.3.1.1. Analyse d'AdR en conditions dénaturantes	171
5.3.1.2. Analyse d'AdR en conditions natives	172
5.3.4. L'analyse des complexes Adx/AdR	173
5.3.5. La validation des resultats	1/6
5.4. Le titre re thermedynamique quiviner FOLMO	470
5.4.1 Les prérequis	176
5.4.2. Les prerequis	on 170
5.4.3 Les résultats obtenus nour le complexe Adx 1-128/AdR	178
5.4.4. Les résultats obtenus pour les complexes formés à partir d'Adx trongués	ou
mutants	179
5.4.5. Reproduction des expériences de titrage suivi par ESI-MS sur le MicrOTO	DF Q
· · · · · · ·	180
5.4.6. Comparaison des valeurs de constantes de dissociation obtenues par tro	is
méthodes différentes	181
5.5. etude des complexes associés a des modulateurs	184
5.5.1. Les foldamères	184
5.5.2. Perspectives	187
	400
5.6. CONCIUSIONS	188
Páfárances	120
	109

PARTIE EXPERIMENTALE198

LISTE DES ABREVIATIONS

- 3-HPA: Acide 3-hydroxypicolinique
- AdR : Adrénodoxine réductase
- Adx : Adrénodoxine
- **apo :** Protéine non liée (sans ligand)
- **BPG**: 2,3-bisphospho-D-glycerate
- CD : Dichroïsme circulaire
- CI: Ionisation chimique
- **CID :** Dissociation induite par collision
- Da: Dalton
- DE : Extraction retardée
- DHB : Acide 2,5 dihydroxybenzoïque
- EI: Ionisation par impact électronique
- **ESI :** Ionisation par électrospray
- **FAB :** Fast atom bombardement mass spectrometry
- **HCCA** : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
- holo : Protéine liée à un ligand
- ICD : Ion conversion detector
- **IHP :** Myo-inositol hexakisphosphate
- **IR** : Spectroscopies infrarouge
- ITC : Analyse calorimétrique par dosage isotherme
- ITPP : Myo-inositol trispyrophosphate
- MALDI: Ionisation/désorption laser assistée par matrice
- **MS :** Spectrométrie de masse
- m/z : Rapport masse/charge
- **RMN :** Résonnance magnétique nucléaire
- **RX :** Cristallographie aux rayons X
- SA : Acide sinapinique
- SPR : Résonnance plasmonique de surface
- THAP: 2,4,6-trihydroxyacétophénone
- **TOF :** Temps de vol
- MCP : Microchannel plate

Introduction Générale

Introduction générale

Les objectifs de ce travail de thèse

Compte tenu de l'omniprésence des interactions non-covalentes en chimie et en biologie. leur étude est devenue incontournable. La RMN, la cristallographie RX font partie des techniques analytiques les plus fréquemment utilisées pour la caractérisation de ces interactions. Toutefois, ces techniques sont difficiles voire impossibles à mettre en œuvre pour l'analyse de certains édifices non-covalents. En effet, la cristallographie RX requiert l'obtention de cristaux de taille et de qualité suffisantes. D'autre part, cette technique ne donne des informations que sur l'édifice en phase solide et non en solution, où la plupart des réactions se produisent. La RMN quant à elle, ne permet pas l'analyse de molécules paramagnétiques. De plus, les spectres RMN deviennent de plus en plus difficiles à interpréter au fur et à mesure que la complexité et la masse des édifices non-covalents augmentent. Le même problème se pose pour le suivi de la formation des édifices noncovalents. Par exemple, la résonnance plasmonique de surface (SPR) est souvent utilisée pour la détermination de constantes de stabilité d'édifices non-covalents biologiques. Or la fiabilité des valeurs obtenues pour les constantes de stabilité est toujours sujette à controverse : outre la difficulté de mise en œuvre, l'immobilisation du récepteur sur le support peut restreindre ses propriétés de diffusion et de rotation et altérer les propriétés thermodynamiques de la réaction d'association substrat/récepteur. De nouveaux outils analytiques sont par conséquent nécessaires pour résoudre ces problématiques.

Or ces dernières années, la spectrométrie de masse a connu un véritable essor dans ce domaine. La technique électrospray (ESI-MS) notamment est devenue la méthode reine pour l'étude d'édifices non-covalents issus de synthèse ou biologiques. Son mode d'ionisation doux permet de transférer intactes les interactions non-covalentes de la solution à la phase gazeuse. L'ESI-MS est ainsi fréquemment utilisée pour la caractérisation^{1,2,3,4} et le suivi de la formation d'édifices non-covalents^{5,6}. Néanmoins, l'ESI-MS est parfois limitée pour l'analyse d'édifices non-covalents particuliers, par exemple dans le cas d'édifices neutres fragiles ou insolubles. Une autre technique d'ionisation douce, l'Ionisation/Désorption Laser Assistée par Matrice (MALDI) peut alors fournir une alternative intéressante. Il faut toutefois noter que le MALDI-MS a déjà également démontré sa capacité à analyser des édifices non-covalents, comme les protéines¹³. La spectrométrie de masse ESI et MALDI apparait donc comme une technique analytique de grand intérêt pour l'analyse d'édifices non-covalents.

Lors de ce travail de thèse nous avons évalué le potentiel de la spectrométrie de masse selon trois axes :

- L'analyse d'édifices neutres (les grilles), insolubles (les commutateurs) ou solubles dans des solvants très volatils comme le dichlorométhane ou le chloroforme (les caténanes et les rotaxanes) : ces propriétés rendent difficiles voire impossible l'analyse de ces édifices non-covalents par ESI-MS. Une analyse ESI-MS s'effectue en effet sur un analyte en phase liquide dont les ions sont préformés en solution. Par ailleurs, les solvants très volatils déstabilisent le spray généré lors du processus électrospray. Ces analytes offrent l'opportunité de tester une approche par MALDI-MS comme alternative à l'ESI-MS.
- L'étude *in vivo* et *in vitro* d'une petite molécule à visée thérapeutique, le myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP), dans le sang : l'ITPP est une molécule récemment identifiée comme effecteur allostérique de l'hémoglobine, elle régule l'affinité de liaison entre l'oxygène et l'hémoglobine. L'objectif de cette étude est double : i) développer un protocole MALDI-MS utilisé dans le cadre d'études cliniques pour détecter et quantifier l'ITPP dans différentes fractions sanguines et ii) évaluer la constante d'affinité de l'ITPP pour l'hémoglobine par ESI-MS par rapport à deux autres effecteurs allostériques, l'IHP et le BPG. Ces informations doivent permettent de mieux comprendre le mécanisme de régulation de l'ITPP.
- L'étude du complexe Adx/AdR, impliqué dans la biosynthèse des stéroïdes chez les vertébrés : les biologistes cherchent à établir le mécanisme d'interaction lors du transfert d'électron entre ces deux partenaires redox, notamment en étudiant des variants d'Adx. En effet, l'influence des mutations sur l'affinité entre les partenaires redox peut permettre par exemple d'identifier les sites d'interactions. Une mesure fiable des constantes de stabilité des complexes formés à partir des différents variants d'Adx est par conséquent nécessaire. Nous avons donc cherché à développer une approche ESI-MS permettant de déterminer les constantes de stabilité des différents complexes Adx/AdR.

Que les édifices non-covalents soient biologiques ou issus de synthèse, leur caractérisation par ESI-MS ou MALDI-MS nécessite une optimisation fine des conditions d'analyse pour conserver intactes les interactions non-covalentes en solution et générer un spectre de masse représentatif des espèces en solution. Ce travail de thèse s'est donc concentré sur le développement de protocoles assurant des résultats représentatifs des espèces en solution.

Avant d'aborder nos résultats, nous allons faire le point sur l'état de l'art de la spectrométrie de masse pour l'analyse d'édifices non-covalents dans une étude bibliographique.

RÉFÉRENCES

1. Potier, N.; Barth, P.; Tritsch, D.; Biellmann, J. F.; VanDorsselaer, A., Study of noncovalent enzyme-inhibitor complexes of aldose reductase by electrospray mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* **1997**, *243* (1-2), 274-282.

2. Loo, J. A., Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16* (1), 1-23.

3. Schalley, C. A., Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *194* (1), 11-39.

4. Miras, H. N.; Wilson, E. F.; Cronin, L., Unravelling the complexities of inorganic and supramolecular self-assembly in solution with electrospray and cryospray mass spectrometry. *Chemical Communications* **2009**, (11), 1297-1311.

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

6. Jecklin, M. C.; Schauer, S.; Dumelin, C. E.; Zenobi, R., Label-free determination of protein-ligand binding constants using mass spectrometry and validation using surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition* **2009**, *22* (4), 319-329.

Etude Bibliographique

Chapitre 1

Les édifices non-covalents : Généralités

1.1. LES DIFFERENTS TYPES D'INTERACTION NON-COVALENTE

Les édifices non-covalents sont maintenus par des liaisons dites faibles, par comparaison avec les liaisons covalentes. Alors que les atomes impliqués dans des liaisons covalentes partagent deux ou plusieurs électrons de leur couche de valence (leur couche externe), ces liaisons faibles non-covalentes résultent de forces attractives ou répulsives entre les atomes impliqués dans l'interaction. Les liaisons non-covalentes sont de nature très diverse, notamment en ce qui concerne leur force d'interaction (Tableau 1) : certaines sont très fragiles et n'interviennent individuellement que très peu dans la stabilisation d'un édifice non-covalent, comme par exemple les liaisons de van der Waals ; d'autres au contraire sont comparables à une liaison covalente, telles les liaisons de coordination. Parmi les nombreux types d'interactions existants, nous pouvons citer :

Type de liaison	Energie (kJ/mol)
Electrostatique	0.4-40
van des Waals :	
Forces de Keesom	0.5-15
Forces de Debye	0.02-0.5
Forces de London	0.5-10
Hydrogène	8-21
Hydrophobe	4-8

Tableau 1 : L'énergie des différentes interactions non-covalentes en solution¹.

1.1.1. Les liaisons électrostatiques (ou liaisons ioniques, ponts salins, paires d'ions)

Ce type d'interaction résulte de l'attraction entre deux groupements ionisés portant des charges électriques opposées (Figure 1). Ces groupements possèdent soit une charge nette positive ou négative (interactions ion/ion) ou un dipôle permanent ou induit (interactions ion/dipôle ou ion/dipôle induit). Ces interactions, régies par la loi de Coulomb, sont dépendantes de la distance interatomique et de la permittivité du milieu.

Les liaisons électrostatiques sont des liaisons orientées : elles requièrent une géométrie particulière des atomes impliqués dans l'interaction, ce qui leur confère leur spécificité.



Figure 1 : Illustration de l'interaction électrostatique entre deux groupements portant des charges électriques Q_1 et Q_2 .

1.1.2. Les liaisons de van der Waals

Les liaisons de van der Waals sont le résultat d'interactions entre des dipôles permanents ou induits. Elles sont classées en trois catégories en fonction de la nature des dipôles impliqués dans l'interaction : les forces de Keesom (interaction dipôle permanent/dipôle permanent, Figure 2), les forces de Debye (interaction dipôle permanent/dipôle induit, Figure 3) et les forces de London (interaction dipôle induit/dipôle induit, Figure 4).

Les liaisons de van der Waals ne sont pas intrinsèquement spécifiques mais elles peuvent le devenir s'il existe la possibilité de lier simultanément plusieurs contacts de van der Waals entre deux molécules. De la même façon, bien que les liaisons de van der Waals soient très faibles et par conséquent contribuent peu à la stabilité d'une structure, leur contribution devient significative si plusieurs contacts de van der Waals sont formés simultanément entre deux molécules.



Figure 2 : Illustration de l'interaction dipôle/dipôle.



Figure 3 : Illustration de l'interaction dipôle/dipôle induit.



Figure 4 : Illustration de l'interaction dipôle induit/dipôle induit.

1.1.3. Les liaisons hydrogène

Dans ce type de liaisons, un atome d'hydrogène est partagé entre deux atomes électronégatifs (O, N ou S notamment). Les liaisons hydrogène peuvent être considérées comme un cas particulier de liaison électrostatique de type dipôle/dipôle induit. La forte interaction entre le dipôle et le dipôle induit entraîne l'alignement des atomes impliqués dans l'interaction. Les liaisons hydrogènes sont donc des liaisons orientées, comme les liaisons électrostatiques.

1.1.4. Les liaisons de coordination (ou interactions donneur/accepteur, liaisons datives)

Les liaisons de coordination correspondent à une interaction entre une base de Lewis jouant le rôle de donneur d'électrons et un acide de Lewis accepteur d'électrons (Figure 5). Généralement, la notion de liaison de coordination est utilisée pour décrire les complexes de coordination entre un ligand et un cation métallique accepteur d'électrons.



Figure 5 : Illustration de l'interaction de coordination.

1.1.5. Les liaisons hydrophobes

Les liaisons hydrophobes ne sont pas à proprement parler des interactions : ces liaisons non spécifiques sont initiées par le positionnement spontané des molécules d'eau en milieu aqueux pour éviter tout contact avec des groupements non polaires (Figure 6). L'association de ces groupements non polaires n'est par conséquent pas due à une affinité particulière mais aux contributions défavorables à la solvatation de ces groupements dans un milieu aqueux.



Figure 6 : Illustration d'interactions hydrophobes pouvant conduire dans cet exemple à la formation d'une micelle.

1.2. LES EDIFICES NON-COVALENTS EN CHIMIE ET BIOLOGIE

Qu'ils soient biologiques ou issus de synthèses chimiques, deux critères sont fondamentaux pour définir un édifice non-covalent : i) la nature non-covalente des interactions qui maintiennent sa structure tridimensionnelle, ii) sa formation spontanée en solution, grâce à la reconnaissance moléculaire entre les espèces qui le constituent.

1.2.1. La chimie supramoléculaire

1.2.1.1. L'émergence d'un nouveau concept

Le concept de « chimie supramoléculaire » a été introduit pour la première fois en 1978 par Jean-Marie Lehn² qui le définit comme suit :

« Tout comme il existe un domaine de la *chimie moléculaire* caractérisé par la liaison covalente, il existe un domaine de la *chimie supramoléculaire*, qui est la chimie des assemblages moléculaires et de la liaison intermoléculaire. »

Ce domaine de la chimie s'intéresse « aux objets hautement organisés résultant de l'association de deux ou plusieurs espèces chimiques liées entre elles par des interactions non-covalentes » : ce sont les supramolécules³.

1.2.1.2. Les interactions mises en jeu

Une supramolécule se définit tout d'abord par la nature non-covalente des liaisons entre les espèces chimiques qui la constituent (Figures 7, 8 et 9). La somme de toutes ces interactions non-covalentes mises en jeu guide en grande partie la structure tridimensionnelle de l'édifice. Les supramolécules ne doivent donc pas être assimilées systématiquement à des molécules de grande taille. Afin de déterminer sans ambiguïté le caractère supramoléculaire ou non d'une molécule, il faut imaginer en théorie comment celle-ci pourrait être fractionnée³. Si la rupture d'une liaison covalente est nécessaire au fractionnement de la molécule, l'édifice n'est pas supramoléculaire. En revanche, si aucune rupture de liaison covalente n'est requise, l'édifice est supramoléculaire (Figure 10).



Figure 7 : Illustration de liaisons de coordination mises en jeu dans la structure d'une grille [3x3]⁴.



Figure 8 : Illustration de l'interaction hôte/invité mise en jeu dans la structure d'un complexe d'inclusion avec une cyclodextrine⁵.



Figure 9 : Illustration de liaisons hydrogène mises en jeu dans la structure d'une rosette⁶.





1.2.1.3. L'auto-assemblage comme processus de construction

Le terme d'auto-assemblage est utilisé pour décrire la formation spontanée d'un édifice hautement organisé et fonctionnel à partir d'un certain nombre de composés dans des conditions données^{7,8}. Pour qu'une supramolécule se forme par auto-assemblage, un récepteur et son substrat doivent interagir de façon sélective. C'est la reconnaissance moléculaire, appelée également principe du « lock and key »⁹ : les deux partenaires doivent être complémentaires géométriquement (taille et forme) et électroniquement (complémentarité des interactions entre les deux acteurs) pour assurer la stabilité de l'édifice supramoléculaire (Figure 11).



Figure 11 : Représentation schématique de la reconnaissance moléculaire.

1.2.2. L'importance des interactions non-covalentes en biologie

Les liaisons non-covalentes jouent un rôle prépondérant dans de nombreux processus biologiques, aussi bien dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des protéines que dans la reconnaissance moléculaire entre un récepteur et son substrat. La réversibilité de ces liaisons non-covalentes permet une fine régulation de ces processus biologiques.

1.2.2.1. A l'échelle d'une protéine¹⁰

1.2.2.1.1. La structure primaire

Une protéine est constituée d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques covalentes, dont la succession linéaire détermine sa séquence, également appelée structure primaire de la protéine.

1.2.2.1.2. La structure secondaire

La formation d'interactions entre des acides aminés proches les uns des autres dans la structure primaire conduit à l'organisation en hélices alpha et en feuillets beta de la protéine (Figure 12). Ces structures secondaires sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre des groupements carbonyles C=O accepteurs d'hydrogène et des groupements amides N-H donneurs d'hydrogène.





1.2.2.1.3. La structure tertiaire

La structure tertiaire, ou conformation native, correspond à la structure tridimensionnelle de la protéine. Les liaisons hydrophobes notamment jouent un rôle important dans le repliement de la protéine (minimisation des contacts entre les groupements non polaires et le milieu aqueux) et dans la stabilisation des ces structures tertiaires. C'est sous cette conformation native que la protéine est biologiquement active.

1.2.2.1.4. La structure quaternaire

Certaines protéines, comme l'hémoglobine (Figure 13), sont constituées de plusieurs sousunités (ou polypeptides), souvent unies par des liaisons non-covalentes de type van der Waals ou hydrophobes, et possédant chacune leur propre structure tertiaire. La structure d'ensemble est appelée structure quaternaire.



Figure 13 : L'hémoglobine, constituée de 4 sous-unités protéiques.

1.2.2.2. A l'échelle cellulaire

Les liaisons non-covalentes permettent aux protéines d'exercer leur fonction biologique par la fixation réversible d'un ou plusieurs éléments (appelés ligands de la protéine) présents dans la cellule. Par exemple, dans les milieux biologiques, aqueux par nature, l'interaction entre une enzyme et son substrat est favorisée par des liaisons hydrophobes. De même, la stabilité de la bicouche lipidique des membranes cellulaires est assurée notamment par les interactions de van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées des lipides (Figure 14).



Figure 14 : La bicouche lipidique dont les chaînes hydrocarbonées des lipides sont stabilisées par des interactions de van der Waals.

Ces interactions nécessitent le passage par une étape de reconnaissance de son substrat par le récepteur : c'est la reconnaissance moléculaire, appelée également principe du « lock and key »⁹. Les deux partenaires doivent présenter une complémentarité de leurs surfaces et de leurs sites d'interaction permettant la formation d'un certain nombre d'interactions non-covalentes. Plus les surfaces et les sites d'interaction des deux partenaires sont compatibles, plus le nombre d'interactions non-covalentes formées est grand. La force de l'interaction entre une protéine (P) et son ligand (L) est caractérisée par les constantes de dissociation (Kd) et d'association (Ka) :

$$Kd = \frac{1}{Ka} = \frac{IPI. II.}{IPLI}$$
(Equation 1)

où [PL] est la concentration d'équilibre du complexe entre la protéine et son ligand et [P] et [L] sont respectivement les concentrations de la protéine et du ligand dans la solution à l'équilibre.

Chapitre 2

Les méthodes d'investigation des interactions non-covalentes

2.1. LES TECHNIQUES ANALYTIQUES USUELLES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS NON-COVALENTES

Compte tenu de l'omniprésence des interactions non-covalentes en chimie et en biologie, leur étude est devenue incontournable. Les techniques analytiques les plus fréquemment utilisées pour la caractérisation de ces interactions sont présentées dans cette section. Cette liste est loin d'être exhaustive, et de nombreuses autres techniques analytiques ou biologiques également adaptées à l'étude des interactions non-covalentes peuvent être citées à titre informatif : la chromatographie d'exclusion stérique, l'analyse calorimétrique différentielle, l'immunochimie (par exemple la méthode ELISA), l'électrophorèse d'affinité...

2.1.1. La résonnance plasmonique de surface (SPR)

La résonnance plasmonique de surface permet la visualisation en temps réel de l'interaction entre un substrat et son récepteur. Le récepteur est immobilisé sur un support recouvert d'une fine couche métallique. Un flux continu de solution de substrat circule au contact de ce support métallique sur lequel un faisceau lumineux est envoyé. L'association du substrat et du récepteur entraîne une modification de l'indice de réfraction du support qui altère l'angle avec lequel le faisceau lumineux est réfléchi. Les constantes d'association et de dissociation du complexe substrat/récepteur sont directement déduites de cette expérience.

La fiabilité de la valeur des constantes d'association et de dissociation obtenues par SPR est toujours sujette à controverse. En effet, outre la difficulté de mise en œuvre, l'immobilisation du récepteur sur le support peut restreindre ses propriétés de diffusion et de rotation et altérer les propriétés thermodynamiques de la réaction d'association substrat/récepteur. Par ailleurs, comme la modification de l'angle de réflexion de la lumière est proportionnelle à la masse du substrat qui se fixe sur le récepteur, l'analyse de petites molécules est délicate voire impossible.

2.1.2. L'analyse calorimétrique par dosage isotherme (ITC)

Cette méthode assure le suivi de l'association entre un substrat et son ligand par la mesure de la quantité de chaleur dégagée ou absorbée lors de cette réaction. Des quantités croissantes de ligand sont ajoutées au substrat contenu dans la cellule du calorimètre. Celuici mesure la quantité d'énergie nécessaire au maintien de la température de la solution substrat/ligand. La quantité d'énergie utilisée donne un accès direct à l'enthalpie libre d'association, liée à la constante d'interaction. L'ITC reste la méthode de choix pour la mesure des propriétés thermodynamiques de réaction de complexation, malgré la durée importante de l'analyse (au minimum 3h30) et la grande quantité d'analyte requise (plusieurs milligrammes à plusieurs dizaines de milligrammes pour les complexes dont l'affinité est la plus faible).

2.1.3. Le dichroïsme circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire est la mesure de la différence d'absorption de la lumière polarisée circulaire droite et gauche (dans la gamme de 170-700 nm). Ce type de mesure est réservé aux molécules possédant des chromophores chiraux, comme les protéines. La mesure du dichroïsme circulaire d'une protéine apporte par exemple des informations sur sa structure secondaire : la présence majoritaire d'hélices alpha ou de feuillets beta conduit à des spectres CD différents.

2.1.4. La spectroscopie Ultraviolet-Visible et la spectroscopie de Fluorescence

Lors d'une analyse par spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV-Visible) ou de Fluorescence, un faisceau de lumière, dont la longueur d'onde appartient au domaine de l'ultraviolet ou du visible, traverse l'analyte. Les électrons de celui-ci sont excités par les photons incidents et l'analyte passe alors d'un état fondamental à un état excité de plus haute énergie. Le retour à l'état fondamental s'effectue de différente façon, notamment par l'émission de photons de plus basse énergie. La spectroscopie UV-visible mesure la quantité de lumière absorbée lorsque le faisceau lumineux traverse l'échantillon alors que la spectroscopie de Fluorescence mesure la quantité de lumière émise pour le retour à l'état fondamental.

Ces techniques analytiques sont principalement utilisées pour déterminer des affinités de liaison et les modifications de conformation résultant d'interaction entre un récepteur et son substrat. Elles s'avèrent également particulièrement utiles pour l'étude de la formation d'édifices métallosupramoléculaires. Par contre, elles nécessitent la présence d'au moins un chromophore dont l'absorbance est modifiée par l'interaction.

2.1.5. La spectroscopies Infrarouge (IR) et Raman

Les spectroscopies Infrarouge ou Raman exploitent le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques auxquelles elles vibrent. Lors d'une analyse par spectroscopie IR ou Raman, l'analyte étudié est éclairé par un faisceau de lumière, infrarouge dans le cas de l'IR ou monochromatique dans le cas de la spectroscopie Raman. L'examen de la lumière, après sa traversée de l'échantillon, fournit un spectre vibrationnel, c'est-à-dire un spectre des fréquences caractéristiques des vibrations de l'analyte. Des tables de corrélation permettent ensuite d'associer les raies observées sur le spectre aux groupements fonctionnels qui constituent l'analyte.

Lors de l'analyse d'analytes complexes, comme des protéines ou des supramolécules de hauts poids moléculaire, de multiples raies se superposent sur le spectre, rendant celui-ci très difficile à interpréter. De plus, l'analyse IR est délicate en milieu aqueux, l'eau absorbant dans l'infrarouge. L'allure globale des raies donne néanmoins des informations utiles, par exemple sur la structure secondaire des protéines.

2.1.6. La cristallographie aux rayons X (RX)

Cette technique d'analyse utilise la diffraction des rayons X pour déterminer la structure tridimensionnelle de l'analyte. La localisation exacte de chaque atome est possible par diffraction des rayons X car la longueur d'onde de ceux-ci est du même ordre de grandeur que les distances interatomiques. A partir de la structure tridimensionnelle de l'analyte, les interactions mise en jeu et la position des sites actifs peuvent être connus. Toutefois, cette technique requiert l'obtention de cristaux de taille et de qualité suffisante.

2.1.7. La résonnance magnétique nucléaire (RMN)

La résonnance magnétique nucléaire est basée sur la mesure de l'absorption d'une radiofréquence par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. Le noyau atomique résonne alors à une fréquence spécifique, caractéristique du noyau et de son environnement chimique. La RMN apporte de nombreuses informations structurales concernant les édifices non-covalents. Néanmoins, les spectres RMN deviennent de plus en plus difficiles à interpréter au fur et à mesure que la complexité de ce type d'édifice croit. Par ailleurs, cette technique ne permet pas l'analyse d'édifices comportant des ions paramagnétiques, tel que le cuivre II ou le cobalt II ni l'analyse d'édifices de poids moléculaire supérieur à 40kDa.

2.1.8. La spectrométrie de masse

Jusqu'au milieu des années 80, les processus d'ionisation utilisés en spectrométrie de masse, l'ionisation par Impact Electronique (EI) et l'Ionisation Chimique (CI), fragmentent les molécules à analyser. Ces techniques de spectrométrie de masse dites classiques ne permettent donc pas la caractérisation d'édifices non-covalents.

La première technique de spectrométrie de masse à permettre l'étude d'édifices noncovalents fut la FAB-MS (Fast Atom Bombardement Mass Spectrometry)¹¹. Elle fut utilisée avec succès pour la caractérisation de doubles hélices¹², des nœuds moléculaires¹³ ou de complexes éther couronne/métal alcalin¹⁴ par exemple. Cependant, la plupart des édifices non-covalents sont intolérants aux matrices utilisées lors de l'analyse (problème de solubilité de l'échantillon dans la matrice, pH de la matrice non adapté…) et la présence de nombreux pics « parasites » (dus à des phénomènes de fragmentation, réduction, oxydation, réaction ion/molécule…) sur les spectres de masse empêchent souvent la détermination non ambigüe de la structure et de la pureté des édifices non-covalents.

Deux nouvelles méthodes d'ionisation dites « douces » sont développées dans les années 80 : l'ionisation par Electrospray (ESI)^{15,16,17,18} et l'Ionisation/Désorption Laser Assistée par Matrice (MALDI)^{19,20,21,22}. L'introduction de ces méthodes d'ionisation a révolutionné le domaine de la spectrométrie de masse et rendu véritablement accessible l'étude des édifices non-covalents par ce type de technique analytique. Leurs concepteurs, J. Fenn et K. Tanaka, ont d'ailleurs été récompensé en 2002 par le prix Nobel de Chimie. Lors de ce travail de thèse, ce sont ces deux dernières techniques qui ont été utilisées pour mener à bien les différentes études réalisées.

2.2. L'APPORT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS NON-COVALENTES

Le principe général de la spectrométrie de masse est basé sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Un spectromètre de masse se compose de quatre parties distinctes (Figure 15) :

- la source, dans laquelle se produit l'ionisation-désorption de l'analyte et la formation des ions en phase gazeuse ;
- l'interface, qui assure la désolvatation, le transport et la focalisation des ions depuis la source vers l'analyseur, grâce à un gradient de pression et/ou de potentiel;
- L'analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) ;
- Le détecteur, qui permet la détection des ions et l'envoi d'un signal électrique vers le système d'enregistrement de données.

Nous décrirons ici les deux techniques de spectrométrie de masse les plus adaptées à l'étude des édifices non-covalents (et par conséquent utilisées dans le cadre de ce travail de thèse) à savoir l'ESI-MS et le MALDI-MS, ainsi que l'état de l'art de ces techniques concernant l'analyse d'édifices non-covalents biologiques ou issus de synthèses chimiques.



Figure 15 : Illustration schématique d'un spectromètre de masse.

2.2.1. La spectrométrie de masse à ionisation électrospray

Bien que l'ionisation électrospray soit connue depuis plusieurs années²³, ce n'est que dans les années 1980 que le potentiel de cette technique fut réellement mesuré. En 1984, Fenn et Yamashita couplent avec succès un spectromètre de masse électrospray avec un analyseur quadripolaire et démontrent que des ions peuvent être ainsi obtenus sans fragmentation à partir de molécules non volatiles¹⁵. Les premières analyses de biomolécules apparaissent alors rapidement^{18,24,25}.

2.2.1.1. Le mécanisme d'ionisation électrospray

Sous l'effet d'un champ électrique intense, l'ionisation électrospray génère, à pression atmosphérique, des ions en phase gazeuse directement à partir d'ions préformés en solution. Le mécanisme d'ionisation électrospray se scinde en trois étapes majeures^{26,27,28} :

- La production de gouttelettes chargées à partir de l'électrolyte en solution ;
- La fission des gouttelettes chargées en gouttelettes de taille plus petite (gouttelettes filles) par explosions coulombiennes successives ;
- Le transfert des ions désolvatés en phase gazeuse.

2.2.1.1.1. La production de gouttelettes chargées

L'analyte, préalablement ionisé en solution, est introduit dans la source électrospray par l'intermédiaire d'un capillaire. Un champ électrique intense (10⁶V/m), appliqué entre la pointe de ce capillaire métallique et une contre électrode, provoque la polarisation du liquide et la séparation électrophorétique des charges en solution (séparation des charges positives et négatives) afin d'induire un champ électrique contraire à celui imposé (Figure 16).

En mode d'ionisation positif, le capillaire constitue l'anode et la contre électrode, la cathode. Les charges positives s'accumulent donc à la pointe du capillaire et à la surface du liquide. Pour maintenir l'équilibre des charges, des réactions de transfert d'électrons (neutralisation des charges négatives, corrosion du capillaire ou oxydation du solvant²⁹) sont susceptibles de se produire à l'interface entre la solution et le capillaire métallique ainsi qu'à la contre électrode. Les conséquences analytiques de ces réactions d'oxydoréduction sur la nature et la distribution des ions sont l'objet de nombreuses discussions^{29,26,28}.

L'accumulation des charges positives (en mode d'ionisation positif) à la pointe du capillaire provoque la déstabilisation de la surface du liquide qui prend alors la forme d'un cône, appelé cône de Taylor, à la pointe duquel sont émises de façon continue les gouttelettes chargées^{30,31,32}. La formation des gouttelettes chargées est assistée par un gaz coaxial (l'azote), appelé gaz d'assistance pneumatique, favorisant une production stable et régulière de ces gouttelettes.


Figure 16 : Illustration schématique de la production de gouttelettes chargées lors de l'ionisation électrospray en mode positif.

2.2.1.1.2. La fission des gouttelettes chargées

Les gouttelettes chargées sont en général mises en contact avec un gaz chaud (l'azote), provoquant l'évaporation progressive du solvant qu'elles contiennent. La taille des gouttelettes diminue mais leur charge restant constante, leur densité de charge augmente. Lorsque les forces de répulsion électrostatiques l'emportent sur les forces de cohésion du liquide (le rayon de la gouttelette atteint la valeur du « rayon critique de Rayleigh »), la gouttelette explose en gouttelettes filles. Cette explosion coulombienne est hétérogène et génère des gouttelettes filles de densité de charge différente. Ce processus se reproduit sur plusieurs générations jusqu'à l'émission des ions en phase gazeuse^{33,34,26}.

2.2.1.1.3. L'émission des ions en phase gazeuse

Le processus d'émission des ions en phase gazeuse est encore soumis à controverse. Deux modèles sont communément proposés :

• Le modèle de Dole²³ :

D'après Dole, la succession d'explosions coulombiennes conduirait à la formation d'une gouttelette fille ne contenant qu'un seul ion. L'ion en phase gazeuse est généré par l'évaporation du solvant résiduel de cette gouttelette fille (Figure 17).



Figure 17 : Illustration schématique de l'émission des ions en phase gazeuse lors de l'ionisation électrospray en mode positif (modèle de Dole).

 Le modèle d'Iribarne et Thomson^{35,36}: D'après Iribarne et Thomson, avant même que le rayon de la gouttelette n'atteigne la valeur du « rayon critique de Rayleigh », la gouttelette devient suffisamment petite pour que le champ électrique à sa surface soit suffisamment intense et extrait les ions directement en phase gazeuse (Figure 18).



Figure 18 : Illustration schématique de l'émission des ions en phase gazeuse lors de l'ionisation électrospray en mode positif (modèle d'Iribarne et ThoMSon).

De nombreux travaux expérimentaux semblent indiquer que les ions de haute masse sont produits majoritairement d'après le modèle de Dole^{29,26}, alors que les petits ions semblent être générés plutôt par le modèle d'Iribarne et Thomson^{37,38}. Actuellement, aucune preuve validant clairement l'un ou l'autre de ces deux modèles n'existe.

2.2.1.2. Les sources électrospray

Plusieurs variantes de la source électrospray conventionnelle ont été développées pour répondre à des problèmes particuliers. Parmi ces sources, nous pouvons citer :

2.2.1.2.1. La source nanoESI39

Souvent, l'analyte à étudier est en faible quantité. Cette difficulté, à laquelle se heurtent régulièrement les études analytiques, a conduit à la miniaturisation des sources électrospray, afin de réduire le débit d'échantillon transféré dans la source. En effet, la sensibilité d'un ESI-MS ne dépend pas du débit avec lequel l'analyte est infusé dans la source, mais de sa concentration⁴⁰. Or la diminution du débit d'analyte entraîne l'émission de plus petites gouttelettes, de densité de charge plus élevée, à la pointe du cône de Taylor²⁶. Cette plus grande densité de charge des gouttelettes améliore le rendement d'ionisation/désorption électrospray⁴¹ et par conséquent, améliore la sensibilité. La source nanoESI présente ainsi le double avantage d'augmenter la sensibilité de mesure et de réduire la consommation d'analyte.

2.2.1.2.2. La source Cryospray

La source Cryospray⁴² a été développée récemment, notamment pour faciliter l'analyse d'édifices non-covalents et/ou d'analytes solubilisés dans des solvants volatils (dichlorométhane, chloroforme). Les gaz utilisés pour favoriser l'ionisation/désorption électrospray sont refroidis (entre -180 et +100°C, les températures conventionnelles se situant entre 100 et 250°C) avant de pénétrer dans la source. Cette baisse de la température des gaz réduit l'énergie thermique transférée aux ions et donc leur énergie interne à l'entrée de l'interface. Des conditions plus douces sont ainsi obtenues pour l'ionisation/désorption, préservant d'autant mieux les liaisons non-covalentes fragiles.

2.2.1.2.3. La préparation des échantillons pour l'étude d'édifices non-covalents

Quelle que soit l'origine de l'analyte, sa concentration doit être suffisamment élevée pour favoriser la formation de l'édifice non-covalent et suffisamment faible pour être compatible avec l'analyse ESI-MS et éviter la formation d'agrégats non spécifiques.

Lors de l'analyse d'édifices non-covalents issus de synthèse, la température de la source doit être finement ajustée en fonction de la volatilité du solvant utilisé. Une mauvaise optimisation de cette température conduit à un spray instable. Or dans le cas de solvants volatils (dichlorométhane, chloroforme), il est difficile de fixer une température qui ne soit pas trop élevée au regard de la volatilité du solvant. La source Cryospray, dont la température varie entre -180 et +100°C, est alors adaptée à ce type de contrainte.

Dans le cas des édifices non-covalents biologiques, les biologistes utilisent généralement des tampons salins (NaCl, KCl, Tris...) à des concentrations de l'ordre du millimolaire pour stabiliser les protéines et conserver ainsi leurs structures tertiaire et/ou native. Ces tampons sont peu volatils et défavorables à une analyse ESI-MS de bonne qualité. Les sels présents dans ces tampons interagissent de façon aléatoire avec la protéine, entrainant la formation de nombreux adduits et donc une baisse significative de la sensibilité et de la résolution de l'analyse ESI-MS (Figure 19). Les tampons salins doivent par conséquent être systématiquement échangés contre un tampon compatible avec le processus d'ionisation/désorption électrospray, c'est-à-dire un tampon volatil. Ce tampon d'analyse doit également reproduire au mieux les conditions physiologiques : il doit être aqueux, proche du pH physiologique et de force ionique contrôlée. Les sels d'ammonium, comme le citrate d'ammonium^{43,44,45}, répondent à ces critères.



Figure 19 : L'influence du dessalage sur la qualité des spectres ESI-MS. Exemple de l'hémocyanine du crabe Bythograea thermydron après 2 cycles (a), après 4 cycles (b), après 6 cycles (c) sur des systèmes d'ultracentrifugation⁴⁶.

Plusieurs techniques de dessalage sont utilisées pour échanger le tampon d'une protéine :

- Les dialyses à l'équilibre (cassettes ou boudins de dialyse): la mise en œuvre de cette méthode est assez longue. Une étape de concentration est généralement nécessaire avant l'analyse de l'échantillon. Il existe maintenant des systèmes miniaturisés plus appropriés aux petits volumes (<100µL).
- Le passage sur des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique (ou gel filtration): le dessalage de l'échantillon par cette méthode est très efficace mais le

dilue considérablement. Une étape de concentration est indispensable avant l'analyse de l'échantillon.

 Les systèmes d'ultracentrifugation : plusieurs cycles de dilution/concentration par centrifugation permettent d'échanger convenablement le tampon biologique par le tampon d'analyse. Le nombre de cycles optimal doit être déterminé pour chaque molécule biologique. Un nombre trop faible de cycles entraine un dessalage insuffisant alors qu'un nombre trop élevé peut provoquer la dénaturation de la molécule biologique.

Le choix de la méthode de dessalage est dépendant de l'analyte : par exemple, certaines protéines sont susceptibles de s'agréger sur la membrane des systèmes d'ultracentrifugation. Il convient à l'opérateur de déterminer la méthode la plus adaptée pour la protéine étudiée.

2.2.1.3. L'interface ESI

2.2.1.3.1. Le rôle de l'interface ESI

Après leur ionisation et leur désorption à pression atmosphérique, les ions sont dirigés vers l'analyseur (pression réduite de l'ordre de 10⁻⁶mbar) à travers l'interface. Cette interface assure le transport et l'accélération des ions grâce à l'action combinée de différences de potentiels et de gradients de pression.

Comme l'interface doit transférer les ions de la source électrospray à pression atmosphérique jusqu'à l'analyseur à pression réduite, la pression qui y règne est de l'ordre du millibar. Cette pression est suffisamment faible pour que les ions acquièrent une énergie cinétique et suffisamment élevée pour provoquer des collisions entre les ions et des molécules de gaz résiduel (azote ou solvant). Ces collisions, très peu énergétiques (quelques eV) : i) contribuent à l'amélioration de la désolvatation des ions en favorisant leur dissociation d'éventuels adduits non spécifiques de solvant ou de sel, ii) influencent la distribution des états de charge (perte de protons ou de contre-ions).

Augmenter l'accélération des ions dans l'interface augmente leur énergie cinétique et par conséquent augmente leur énergie interne, communiquée aux ions lors des collisions avec des molécules résiduelles (gaz ou solvant). Or une énergie interne trop élevée peut provoquer la rupture des liaisons les plus fragiles de la molécule. Ce phénomène est appelé décomposition induite par collision (CID)⁴⁷. La CID dans l'interface est utilisée pour générer des ions fragments dans l'interface et en déduire des informations structurales. Par ailleurs, la résistance des ions aux collisions dans l'interface est souvent exploitée pour évaluer la stabilité relative en phase gazeuse d'édifices non-covalents.

2.2.1.3.2. Configurations d'interface ESI

De nombreuses configurations d'interface ont été développées au cours de ces dernières années. Les interfaces actuelles possèdent, en plus d'un système de lentilles, des multipôles ou des « ion funnel » assurant une meilleure transmission et une refocalisation des ions vers l'analyseur. Un multipôle, par exemple un quadripôle, est composé de quatre barres

parallèles, deux barres opposées étant connectées électriquement et portées aux mêmes potentiels. Deux barres adjacentes se trouvent alors à des potentiels opposés. Un « ion funnel »⁴⁸ est constitué d'une série d'électrodes en forme de cercles dont le diamètre interne diminue graduellement. Ces deux systèmes permettent également d'augmenter considérablement la gamme de masse des spectromètres de masse, améliorant l'observation d'édifices de haut poids moléculaire. Les configurations de deux appareils utilisés dans le cadre de ce travail de thèse sont représentées ci-après (Figures 20, 21).



Figure 20 : Configuration de l'interface du MicrOTOF (Bruker) avec source orthogonale. Résolution ≈ 10000 et m/z ≈ 20000. Dans ce type de configuration, la source et l'interface sont orientées avec un angle proche de 90°, de façon à ce que seules les espèces chargées soient déviées en direction de l'analyseur sous l'effet de la différence de potentiel. Le passage des molécules neutres dans l'interface est ainsi limité.



Figure 21 : Configuration de l'interface du MicrOTOF Q (Bruker) avec source orthogonale. Résolution ≈ 25000 et m/z ≈ 20000. L'analyseur quadripolaire placé avant l'analyseur TOF a été utilisé dans le cadre de cette thèse uniquement en mode de transmission des ions.



Le transfert des ions à travers l'interface doit être finement contrôlé pour conserver les interactions non-covalentes en phase gazeuse. En effet, si l'énergie interne des ions devient trop importante, les interactions non-covalentes sont susceptibles de se rompre. Différents paramètres sont à optimiser :

- La tension d'accélération (Capillary Exit) : c'est la différence de potentiel entre la sortie du capillaire de désolvatation et le premier skimmer du MicrOTOF. La tension d'accélération assure la transmission des ions jusqu'à l'analyseur en leur communiquant une certaine énergie cinétique. Cette énergie cinétique détermine en grande partie l'énergie interne qui leur est transmise lors des collisions avec les molécules résiduelles (gaz ou solvant) dans l'interface. Ainsi, plus la tension d'accélération est élevée, plus l'énergie interne transmise aux ions lors des collisions est importante. Des collisions énergétiques favorisent la désolvatation des ions en les dissociant de leurs adduits non spécifiques de solvant ou de sels mais peuvent induire la rupture des liaisons non-covalentes.
- La pression dans l'interface : ce paramètre contrôle également l'énergie interne communiquée aux ions. La pression influence le libre parcours des ions dans l'interface entre deux collisions. Par exemple, une pression plus élevée provoque des collisions plus nombreuses mais moins énergétiques, favorisant une désolvatation

efficace tout en préservant les interactions non-covalentes. Par expérience, ce paramètre a une influence significative dans le cas de sources type Waters⁴⁶, contrairement aux sources Bruker.

Dans le cas d'ions de rapport masse sur charge (m/z) élevé, la transmission des ions à travers l'interface nécessite une optimisation particulière :

- La tension d'accélération : les ions de rapport m/z élevés, dont l'inertie est plus grande, requièrent une énergie cinétique plus importante pour être transmis jusqu'à l'analyseur.
- L'hexapôle a pour rôle de refocaliser le faisceau d'ions qui tend à diverger. Ce guide d'ions augmente la transmission des ions et améliore la résolution de l'appareil. Pour favoriser la transmission des ions lourds, l'amplitude du voltage appliqué sur l'hexapôle doit être augmentée, ce qui améliore son pouvoir de refocalisation mais dégrade la transmission des ions plus légers.

L'optimisation des paramètres instrumentaux est un compromis entre une désolvatation efficace, la conservation des interactions non-covalentes et une bonne transmission des ions de m/z élevé jusqu'à l'analyseur. Ils doivent être finement ajustés pour chaque nouvel analyte pour que le spectre de masse reflète les espèces présentes en solution.

2.2.1.4. L'analyseur

2.2.1.4.1. Le couplage ESI-TOF

L'analyseur a pour rôle de mesurer le rapport masse/charge (m/z). Ses performances sont décrites par plusieurs paramètres, notamment : i) sa résolution : elle définit sa capacité à distinguer un ion de rapport (m/z) d'un ion de rapport (m/z + Δ m/z). En général, la résolution est calculée selon : R = (m/z) / (Δ m/z), ii) et sa gamme de masse.

Une source électrospray peut être couplée à une grande variété d'analyseurs : les analyseurs quadripolaires⁴⁹, les trappes ioniques⁵⁰, les analyseurs à résonnance cyclotronique⁵¹... Ces analyseurs sont limités en gamme de m/z à environ 4000. Le développement d'une géométrie orthogonale de la source ESI (source et interface) avec l'analyseur a également permis son couplage avec les analyseurs temps de vol (TOF)⁵², uniquement couplés à des sources MALDI. En effet, contrairement aux sources MALDI, la source ESI produit les ions en continu. Or l'analyseur TOF requiert un « top » de départ pour démarrer la mesure du temps de parcours des ions : cette géométrie orthogonale a permis l'introduction d'une « zone de stockage », appelée pusher où les ions sont stockés avant d'être envoyés par paquet dans l'analyseur TOF. Ce couplage a permis d'augmenter la gamme de m/z de l'ESI-MS jusqu'à 20000.

Le principe de l'analyseur TOF est décrit dans la section 2.2.2.3. L'analyseur à Temps de Vol. Dans le cas du couplage ESI-TOF, le mode réflectron est toujours utilisé.

Les analyses menées lors de ce travail de thèse ont toutes été menées sur des analyseurs temps de vol en mode réflectron.

2.2.1.4.2. La calibration

L'analyse par ESI-TOF permet de mesurer des masses avec une précision de l'ordre de 0,01% en conditions dénaturantes. Pour atteindre cette précision, l'appareil doit être correctement calibré.

Pour des m/z inférieurs à 2000, l'ESI-MS est généralement calibré à l'aide des ions multichargés de la myoglobine de cœur de cheval (solubilisé à 2pmol/µL dans un mélange eau/acétonitrile/1% d'acide formique) (Figure 22 a). L'extrapolation de la calibration par la myoglobine de la partie haute de la gamme de m/z est possible. Cependant au-delà de 4000m/z, les erreurs deviennent vraiment importantes.

Pour l'analyse d'ions de m/z élevés, il est donc conseillé d'utiliser l'iodure de césium Csl (solubilisé à 1mg/mL dans un mélange eau/acétonitrile 50/50 en volume) (Figure 22 b). Le Csl forme en solution des clusters d'ions monochargés de type $Cs_{n+1}I_n$ dans une gamme de m/z comprise entre 2500 et 25000.



Figure 22 : Spectres de masse ESI-MS de la myoglobine de cœur de cheval (a) et d'une solution de CsI (b).

2.2.1.4.3. Le calcul de la masse moléculaire

Lors de l'analyse d'édifices non-covalents de haut poids moléculaire, des difficultés peuvent être rencontrées pour déterminer leur masse avec précision⁴⁵. Pour ce type d'analyte, les pics multichargés observés sur les spectres de masse ont tendance à être plus larges. Ce phénomène s'explique par la fixation d'un grand nombre de petites molécules (sels, solvant...) sur l'édifice non-covalent, difficiles à éliminer complètement lors de la désolvatation. L'élargissement des pics rend difficile la détermination précise du m/z des pics multichargés et donc de leur état de charge⁴⁶, indispensable au calcul de la masse de l'édifice.

Nous n'avons pas rencontré ce problème dans le cadre de ce travail de thèse, les pics multichargés étant suffisamment étroits pour utiliser l'algorithme Bruker pour la détermination de leur état de charge et donc des masses.

2.2.1.5. Les règles d'ionisation et les spectres de masse ESI-MS

Pour être analysé par ESI-MS, les ions doivent être préformés en solution, en d'autres termes, l'analyte doit impérativement acquérir une charge en solution. Selon sa nature, une supramolécule s'ionise de différentes façons :

- Par protonation si la molécule possède des sites basiques ou déprotonation si la molécule possède des sites acides (surtout dans le cas de protéines);
- Par addition de cations ou d'anions (Na⁺, K⁺, Cl⁻...) (surtout dans le cas de supramolécules issues de synthèse) ;
- Par perte successive de contre-ions (PF₆⁻, BF₄⁻...) (surtout dans le cas de supramolécules issues de synthèse);

Le processus d'ionisation ESI a pour caractéristique de générer des ions multichargés. Les spectres de masse ESI-MS présentent donc une distribution statistique de pics multichargés, où deux pics consécutifs diffèrent d'un état de charge (Figure 23). Cette propriété particulière de l'ESI-MS a donné accès à l'analyse d'édifices de haut poids moléculaire dont les rapports m/z sont compatibles avec la gamme de masse de l'analyseur TOF.

Chaque pic multichargé est constitué d'une succession de pics isotopiques, appelé profil isotopique (Figure 24). Ce profil peut être observé sur le spectre de masse si la résolution est suffisante. Le profil isotopique permet i) de connaitre l'état de charge n d'un pic multichargé (la différence entre deux pics isotopiques correspondant à 1/n), ii) de confirmer la présence d'un édifice lorsque celui-ci possède une empreinte isotopique caractéristique (par exemple s'il contient un atome de chlore ou de nickel) (Figure 25).



Figure 23 : Illustration schématique d'un spectre de masse électrospray en mode positif.



Figure 24 : Spectre de masse électrospray théorique d'un rotaxane démétallé de formule $C_{382}H_{400}N_{30}O_{16}Zn_2$ en mode positif. Le pic est monochargé donc les pics isotopiques sont espacés d'un dalton.



Figure 25 : Spectre de masse électrospray théorique de la grille [(L¹)₄Ni₄] de formule C₈₈H₆₄N₃₂Ni₄ en mode positif. Le pic est monochargé donc les pics isotopiques sont espacés d'un dalton. Son profil isotopique est caractéristique d'une molécule possédant un atome de nickel.

2.2.2. La spectrométrie de masse MALDI-MS

Dès 1976, des peptides intacts ont été analysés par désorption laser sur des échantillons solides⁵³. Ce type d'ionisation ne permettait cependant pas d'observer des composés de masse supérieure à 1000Da. Ce n'est qu'à la fin des années 80 que la technique de l'Ionisation/Désorption Laser Assistée par Matrice (MALDI) fut simultanément introduite par

deux équipes (Karas et Hillemkamp^{19,20,21} et Tanaka et coll.²²) : afin de protéger l'analyte, une matrice, absorbant à la longueur d'onde du laser, fut ajoutée en large excès.

Lors de l'ionisation MALDI, l'analyte, incorporé à une matrice solide absorbant à la longueur d'onde du laser, est irradié, à pression réduite (environ 10⁻⁷mbar), par un faisceau laser pulsé de longueur d'onde donnée. Les ions sont générés en phase gazeuse sous l'effet de l'impulsion laser et entraînés vers l'analyseur grâce à l'application d'un fort champ électrique (Figure 26).



Figure 26 : La désorption/ionisation MALDI.

2.2.2.1. La préparation de l'analyte

2.2.2.1.1. Le choix de la matrice

Pour être analysé par MALDI-MS, l'analyte doit tout d'abord être co-cristallisé avec une grande quantité de matrice (généralement, les ratios analyte/matrice sont compris entre 1:100 et 1:10000).

Le rôle de la matrice est de protéger l'analyte des effets destructeurs du faisceau laser en absorbant son énergie, tout en assurant sa désorption et son ionisation. La matrice doit donc absorber à la longueur d'onde du laser (dans le cadre de ce travail de thèse, le laser utilisé est un laser à azote irradiant dans l'ultraviolet à 337nm). En co-cristallisant l'analyte (absorbant généralement peu à la longueur d'onde du laser) avec une grande quantité de matrice, la matrice est préférentiellement excitée et le transfert dans la phase gazeuse de l'échantillon intact est favorisé.

Il n'existe pas de matrice universelle : pour chaque nouvel analyte étudié, il est nécessaire de tester plusieurs matrices afin de choisir celle donnant les meilleurs résultats. Certaines

matrices sont tout de même plus appropriées pour certains types d'échantillons. Les plus courantes sont⁵⁴ :

- l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) pour l'analyse des peptides et des protéines ;
- l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB) pour les oligosaccharides, les glycoprotéines, les lipides, les peptides et les protéines ;
- l'acide sinapinique (SA) pour les peptides, les protéines et les glycoprotéines ;
- l'acide 3-hydroxypicolinique (3-HAP) pour les oligonucléotide.

La technique MALDI-MS est peu utilisée pour l'étude d'édifices non-covalents issus de synthèse. Il existe donc peu de littérature sur les matrices les plus appropriées à ce type d'analyse. Souvent, ce sont les matrices les moins acides, comme la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP), qui sont utilisées.

2.2.2.1.2. Les différents dépôts

La qualité du dépôt matrice/analyte et de ses cristaux conditionnent la réussite d'une analyse par MALDI-MS, notamment sa reproductibilité et sa résolution. Comme pour la matrice, différents types de dépôt doivent être testés pour choisir le plus adapté à l'analyte étudié. Parmi les méthodes existantes, on distingue :

• Le dépôt goutte séchée :

Cette méthode consiste à mélanger à la solution contenant l'analyte, une solution de matrice. La matrice doit donc être soluble dans les solvants utilisés pour dissoudre l'analyte. Une goutte du mélange matrice/analyte est ensuite déposée sur un support métallique et évaporé à l'air ambiant afin qu'il cristallise (Figure 27).

Ce type de dépôt génère souvent des cristaux relativement grossiers et hétérogènes, pouvant avoir une incidence négative sur la résolution et la reproductibilité des spectres de masse.



Figure 27 : Le dépôt goutte séchée.

• Le dépôt couche mince :

Cette méthode consiste, dans un premier temps, à déposer une goutte de solution de matrice sur la cible. Lorsque le solvant est évaporé, une goutte de la solution contenant l'analyte est déposée à la surface de la première couche de matrice et évaporé à l'air ambiant (Figure 28).

Généralement, le solvant utilisé pour dissoudre la matrice est très volatil (souvent l'acétone). Son évaporation quasi instantané génère une couche de cristaux de matrice très fins et homogènes appelée couche mince, améliorant significativement la résolution et la reproductibilité des spectres de masse.



Figure 28 : Le dépôt couche mince.

2.2.2.1.3. La cible

Les dépôts sont réalisés sur un support métallique appelé cible (Figure 29). Ces cibles sont généralement en métal inoxydable (souvent en acier), conductrices et traitées en surface de manière à être chimiquement inerte vis-à-vis de l'analyte. La surface des dépôts sur ces cibles varie entre 5 et 15mm². Mais seule une infime fraction de cette surface (0.002 à 0.003mm²) est irradiée par le laser. Pour obtenir un spectre de masse représentatif du l'analyte et s'affranchir de l'hétérogénéité d'un dépôt, il est nécessaire d'accumuler un grand nombre de tirs laser en balayant toute la surface du dépôt.



Figure 29 : Photo de la surface d'une cible sur laquelle des dépôts couche mince (à gauche) et goutte séchée (à droite) ont été réalisés.

Il est à noter qu'il existe également :

- Des cibles préspottées : la matrice est déjà déposée en couche mince sur la cible. Ce type de cible permet une meilleure reproductibilité des analyses par MALDI-MS.
- Des cibles AnchorChip (Bruker) : ces cibles sont recouvertes d'un revêtement hydrophobe à base de téflon sur lequel se répartissent des sites hydrophiles appelés « ancres ». Ces ancres permettent de concentrer l'analyte sur une très petite surface et d'augmenter ainsi la quantité d'ions désorbés au cours du tir laser. La sensibilité est significativement accrue et la reproductibilité est améliorée.

2.2.2.2. Le mécanisme d'ionisation MALDI

L'analyse par MALDI-MS est très largement utilisée, mais cette technique analytique a presque exclusivement été développée de manière empirique. Les modèles actuels convergent pour la plupart vers un mécanisme d'ionisation en deux étapes⁵⁵ : l'ionisation primaire et l'ionisation secondaire. Ces concepts ont été introduit pour la première fois en 1998 par Zenobi et Knochenmuss⁵⁶.

2.2.2.2.1. L'ionisation primaire

L'ionisation primaire reste l'aspect le plus controversé de ce mécanisme. Les deux modèles principaux sont le « cluster model » (où les ions préformés en solution se retrouvent dans les clusters éjectés lors du tir laser) et le « photoexcitation/pooling model » (où l'énergie de deux molécules excitées voisines dans la plume est redistribuées) résumé par Knochenmuss⁵⁵. Quel que soit le modèle, l'ionisation primaire, qui se produit lors du tir laser ou tout de suite après, entraîne la formation de molécules de matrice excitées.

L'excès d'énergie interne emmagasinée par les molécules de matrices excitées peut être redistribué immédiatement aux molécules de l'analyte mais peut également provoquer la fragmentation de cristaux de matrice.

Cette redistribution d'énergie abaisse les forces de cohésion des cristaux et provoque une co-éjection de molécules de matrice (intactes et fragmentées) et d'analyte dans la phase gazeuse. Le gaz très dense qui résulte de cette éjection de matière subit une expansion adiabatique dans le vide sous forme d'un jet supersonique appelé plume⁵⁷.

2.2.2.2.2. L'ionisation secondaire

Des transferts d'électron, de proton ou des réactions de cationisation impliquant les molécules de matrice et d'analyte se dérouleraient dans ce gaz en expansion, entraînant l'ionisation des molécules de l'analyte en phase gazeuse⁵⁵.

Cette ionisation secondaire engendre majoritairement des ions monochargés.

Les ions ainsi formés sont accélérés par l'application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre de masse, appelée aussi lentille d'extraction, et transportés vers l'analyseur.

2.2.2.3. L'analyseur à Temps de Vol

Le rôle de l'analyseur est de mesurer le rapport masse/charge (m/z) des ions formés lors de l'ionisation MALDI. Même si la source MALDI peut être couplée à un analyseur à résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier⁵⁸, à une trappe ionique⁵⁹ ou à un analyseur à secteur magnétique⁶⁰, ce type de source est le plus souvent couplé à un analyseur à Temps de Vol (TOF). En effet, comme l'ionisation MALDI génère essentiellement des ions monochargés, la gamme de masse théoriquement illimitée d'un analyseur TOF est un atout indéniable. De plus, l'analyseur TOF est bien adapté à l'ionisation pulsée par désorption laser : cet analyseur nécessite en effet un « top » de départ pour démarrer la mesure du temps de parcours des ions.

2.2.2.3.1. Le principe de l'analyseur à Temps de Vol

L'analyseur à Temps de Vol mesure le temps de vol d'un ion, préalablement accéléré dans un champ électrostatique, au travers d'une région libre de champ⁶¹.

L'analyseur à Temps de Vol est constitué de deux parties (Figure 30) :

- Une zone d'accélération : les ions sont accélérés sous l'effet un champ électrique intense.
- Le tube de vol : c'est une zone libre de champ dans laquelle règne un vide poussé (environ 10⁻⁷mbar). Les ions y pénètrent avec l'énergie cinétique Ec acquise dans la zone d'accélération.



Figure 30 : Illustration schématique d'un analyseur à temps de vol en mode linéaire.

La vitesse v (en ms⁻¹) des ions entrant dans le tube de vol est fonction de leur énergie cinétique E_c :

$$v = \sqrt{\frac{2Ec}{m}} = \sqrt{\frac{2zeU}{m}}$$
 (Equation 2)

avec z, la charge de l'ion, e, la charge de l'électron (1,602.10⁻¹⁹C), U, le champ électrique, m, la masse de l'ion en kilogramme.

Le temps t nécessaire aux ions pour traverser le tube de vol, de longueur L, peut donc être déduit de l'équation précédente :

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zeU}}$$
 (Equation 3)

D'après cette dernière équation et dans le cas idéal où tous les ions pénètrent dans le tube de vol avec la même énergie cinétique, le temps nécessaire aux ions pour traverser le tube de vol est dépendant de leur masse et du nombre de charges qu'ils portent. Donc pour deux ions de même état de charge, celui de masse plus élevé traversera le tube de vol plus lentement que celui de masse plus faible. Par conséquent, le rapport masse sur charge (m/z) d'un ion peut être déterminé en mesurant précisément son temps de vol à travers le tube de vol.

2.2.2.3.2. Le mode linéaire

Un spectromètre de masse MALDI-TOF fonctionne généralement selon deux modes. Le premier, le mode linéaire, est le plus simple : après l'irradiation laser, les ions sont expulsés de la source par paquets, accélérés par un gradient de potentiels décroissants (20 à 15kV) leur conférant à tous la même énergie cinétique.

Le mode linéaire permet d'obtenir une bonne sensibilité mais une résolution* assez faible (de l'ordre de 500 pour des ions à 1000m/z)⁵⁷. L'élargissement de pics du spectre de masse, à l'origine de cette faible résolution, s'explique principalement par la dispersion spatiale et en énergie cinétique des ions entrant dans le tube de vol. En effet, les ions ne sont pas nécessairement générés au même moment ni au même endroit dans la source. Par conséquent, deux ions de même rapport m/z n'acquièrent pas forcément la même énergie cinétique initiale et ne sont donc pas sur la même « ligne de départ » avant leur entrée dans l'analyseur.

La résolution des analyseurs TOF a été considérablement améliorée grâce au développement de deux dispositifs : le réflecteur électrostatique et l'extraction retardée.

* La résolution d'un analyseur définit sa capacité à distinguer un ion de rapport (m/z) d'un ion de rapport (m/z + Δ m/z). En général, la résolution est calculée selon : R = (m/z) / (Δ m/z).

2.2.2.3.3. Le mode réflectron

Le réflecteur électrostatique⁶², situé à l'extrémité de l'analyseur TOF, permet de corriger les effets de la dispersion initiale en énergie cinétique des ions et donc d'améliorer la résolution (Figure 31). Le réflecteur électrostatique est composé d'une série de lentilles agissant comme des miroirs électrostatiques. L'application de potentiels croissants sur ces grilles impose un champ électrique s'opposant à la progression des ions. Les ions sont progressivement ralentis jusqu'à atteindre une énergie cinétique nulle, réfléchis puis accélérés à nouveau vers le détecteur. Les ions de même m/z sont ainsi refocalisés en énergie cinétique : les ions de même m/z pénètrent plus ou moins profondément dans le réflecteur en fonction de leur énergie cinétique initiale. Par exemple, les ions d'énergie cinétique plus élevée pénètrent plus profondément dans le réflecteur, leur temps de vol est

alors augmenté. A leur arrivée au détecteur, tous les ions de même m/z auront le même temps de vol.

Le mode réflectron permet d'augmenter significativement la résolution à plus de 5000 pour des ions à 2000m/z. La précision de la mesure de masse est également améliorée grâce à l'allongement de la distance de vol. Cependant, l'analyse en mode réflectron ne s'applique qu'à des molécules dont la masse n'excède pas 10000Da.

2.2.2.3.4. L'extraction retardée (Delayed Extraction DE)

L'extraction retardée peut être utilisée en mode linéaire et en mode réflectron.

La dispersion initiale en énergie cinétique au moment de l'ionisation provoque une dispersion spatiale des ions dans la source (l'irrégularité de la surface du dépôt contribuant également à la dispersion spatiale). Pour refocaliser les ions dans la source avant qu'ils ne soient accélérés, une lentille est ajoutée après la source pour séparer les phénomènes de désorption/ionisation et d'accélération (Figure 31). Après le tir laser, cette lentille DE est portée à une tension très légèrement supérieure au champ électrique de la source pendant un bref délai (quelques centaines de nanosecondes), s'opposant ainsi à la progression des ions dans l'analyseur. Les ions se placent sur « une ligne de départ » et pénètrent donc simultanément dans le tube de vol^{63,64}.

L'extraction retardée permet d'augmenter significativement la résolution à 5000 pour des ions à 3000m/z en mode linéaire et à 10000 pour des ions à 6000m/z en mode réflectron^{65,66}.



Figure 31 : Illustration schématique d'un MALDI-TOF en mode réflectron et comportant un système d'extraction retardée.

2.2.2.4. Les détecteurs

2.2.2.4.1. Le détecteur MCP (Microchannel Plate)

C'est le détecteur classiquement utilisé en spectrométrie de masse-TOF. Ce dispositif, fonctionnant sur le principe du photomultiplicateur, amplifie les charges électriques. Un détecteur MCP est constitué d'une galette de dynodes, des microcanaux incurvés recouverts d'un dépôt métallique et soumis à un fort champ électrique. Lorsqu'un ion entre dans un microcanal et percute sa paroi, l'impact provoque l'émission en cascade d'électrons, accélérés par le champ électrique et propagés ainsi à travers le microcanal, amplifiant le signal initial (Figure 32).



Figure 32 : Illustration schématique d'un détecteur MCP.

2.2.2.4.2. Le détecteur CovalX

Les détecteurs MCP requièrent des ions ayant une vitesse élevée pour les convertir en électrons. Or dans un analyseur TOF, la vitesse des ions est inversement proportionnelle à leur masse (confère Equation 2). Les ions de haute masse sont donc difficilement observés avec un détecteur MCP. Outre ces problèmes de sensibilité, il n'est pas rare que les ions de faible masse saturent les microcanaux du détecteur lors de l'amplification.

CovalX (Zürich, Suisse) a développé un détecteur conçu spécifiquement pour la détection des hautes masses, notamment pour l'étude d'édifices non-covalents biologiques après leur cross link (confère section 2.2.3.1. Les informations obtenues par spectrométrie de masse) : en effet, son principe ne repose pas sur la vitesse des ions dans l'analyseur TOF. Les ions entrant dans le détecteur CovalX percutent tout d'abord la paroi d'une dynode, provoquant l'émission d'ions secondaires. Ces ions secondaires sont réaccélérés avant de pénétrer dans le photomultiplicateur (Figure 33). Ce dispositif appelé « lon Conversion Detector » (ICD) permet une détection plus sensible des hautes masses (jusqu'à 1,2MDa avec une sensibilité de quelques nanomolaires⁶⁷) tout en évitant la saturation du détecteur.



Figure 33 : Illustration schématique du détecteur CovalX.

2.2.2.5. Les règles d'ionisation en MALDI-MS

Contrairement au processus électrospray, le processus MALDI ne nécessite pas que les ions soient préformés en solution. L'analyte peut en effet s'ioniser dans la plume. L'ionisation MALDI ne génère que des ions monochargés.

Les règles d'ionisation restent les mêmes que pour l'ionisation ESI-MS.

2.2.3. Etat de l'art en spectrométrie de masse pour l'observation des édifices non-covalents

Dès ses débuts, la spectrométrie de masse est apparue comme une technique performante pour mesurer avec une grande précision la masse de biomolécules (>0,01%). Très rapidement, une application originale fut également reportée : sous certaines conditions, il était possible de conserver dans le spectromètre de masse des interactions non-covalentes spécifiques d'édifices biologiques en solution^{43,68}. L'étude d'édifices non-covalents par spectrométrie de masse ne cessa alors de se développer afin de déterminer les informations que pouvait apporter cette nouvelle stratégie et de prouver leur fiabilité.

Aujourd'hui, la spectrométrie de masse est devenue une technique incontournable pour la caractérisation d'édifices non-covalents intacts. Elle doit son succès à sa sensibilité (quelques picomoles voire quelques femtomoles suffisent pour obtenir un spectre⁶⁹), sa rapidité de mise en œuvre et sa faible consommation d'analyte. Par ailleurs, la spectrométrie de masse s'avère être une technique complémentaire ou alternative aux techniques plus classiques d'étude des interactions non-covalentes, comme la RMN ou la cristallographie RX. Alors que la spectrométrie de masse fournit des informations par exemple sur la stœchiométrie, sur les forces d'interactions en jeu ou sur la stabilité de l'édifice non-covalent, la RMN et la cristallographie RX renseignent sur sa structure tridimensionnelle. Par contre, dans le cas d'édifices de haut poids moléculaires, là où la RMN est limitée à l'étude de molécules n'excédant pas 40kDa, des molécules de plusieurs millions de Daltons sont analysables par spectrométrie de masse.

Cet état de l'art ne se veut pas être une liste exhaustive de tous les types d'édifices noncovalents étudiés par spectrométrie de masse, mais un aperçu du grand potentiel de cette technique pour l'étude de ces interactions faibles.

2.2.3.1. Les informations obtenues par spectrométrie de masse

Que la méthode d'ionisation utilisée soit l'ESI ou le MALDI, ces deux techniques permettent d'apporter un certain nombre de réponses concernant :

2.2.3.1.1. La stœchiométrie du complexe

La stœchiométrie de l'édifice non-covalent est accessible directement à partir du spectre de masse : connaissant la masse du complexe (indiqué sur le spectre de masse en conditions natives) ainsi que les masses des sous-unités le constituant (ces masses pouvant également être déterminées par la spectrométrie de masse en conditions dénaturantes), la stœchiométrie est déterminée par combinaison des masses des sous-unités. Sanglier et coll.⁴⁵ ont ainsi pu remonter à la stœchiométrie de différentes hémocyanines de crabes après avoir déterminé la masse de leurs sous-unités par spectrométrie de masse (Figure 34).



Figure 34 : Spectres de masse ESI-MS de l'hémocyanine du crabe Segonzacia mesatlantica (AT 54) en conditions dénaturantes (a.) et en conditions natives (b.). La stœchiométrie de l'hémocyanine est déterminée à partir de sa masse en conditions natives et des masses de ses sous-unités obtenuées en conditions dénaturantes⁴⁶.

Cependant, la formation de complexes non spécifiques peut être favorisée à forte concentration. Il est donc primordial de vérifier quels sont les complexes observés en

fonction de la concentration, et de travailler à la concentration la plus faible possible permettant d'observer le complexe spécifique.

La détermination de la stœchiométrie par spectrométrie de masse est possible grâce à la grande résolution de la technique et donc de la grande précision avec laquelle les masses sont mesurée (>0,01%).

Bien que ces techniques d'ionisation soient douces, certains édifices non-covalents sont trop fragiles, trop labiles ou ont une durée de vie trop courte (cinétique rapide de complexation/décomplexation) pour être étudiés par ESI-MS ou MALDI-MS. La méthode de « cross linking » a été développée pour rendre possible leur observation par spectrométrie de masse^{70,71,72}. Le cross linking consiste à introduire un lien chimique entre les différentes sous-unités du complexe pour former un système covalent représentatif du système non-covalent initial. Après cross linking, les édifices sont généralement étudiés par MALDI-MS : la formation d'ions monochargés simplifie les spectres de masse, comparés aux spectres d'ion multichargés obtenus par ESI-MS. CovalX a développé pour ce type d'étude un détecteur permettant d'observer les ions monochargés de haut poids moléculaire issus du cross linking.

2.2.3.1.2. La spécificité du complexe

Il est également possible de vérifier la spécificité d'une interaction entre un récepteur et son substrat, c'est-à-dire la fixation préférentielle d'un substrat sur un site donné du récepteur. Si l'interaction est spécifique, l'ajout croissant de substrat à la solution de récepteur ne doit pas modifier le spectre de masse. La spécificité du complexe aldose réductase/NADP⁺ a ainsi été confirmée⁷³ (Figure 35). Si l'ajout croissant de substrat à la solution de récepteur conduit à des stœchiométries multiples et aléatoires, la fixation du substrat n'est pas spécifique en solution.



Figure 35 : Etude ESI-MS de la spécificité de NADP⁺ pour l'aldose réductase (AR)⁷³. Spectres de masse d'AR apo à 10pM dans un tampon acétate d'ammonium à 25mM (A), d'AR additionnée d'un équivalent de NADP⁺ (B) et de cinq équivalents de NADP⁺ (C). La fixation de plusieurs molécules de NADP⁺ (B) n'est pas observée.

2.2.3.1.3. La sélectivité du complexe

La sélectivité d'un récepteur pour un substrat peut être déterminée par des expériences de compétition. Plusieurs substrats, en compétition pour un même site de fixation, sont mis en présence d'un récepteur. Ce type d'expérience implique que plusieurs complexes soient susceptibles d'être formés simultanément. Or la spectrométrie de masse possède l'avantage de détecter toute les espèces présentes en solution et non pas de donner une mesure moyenne de ces espèces.

Les expériences de compétition donnent accès à la sélectivité d'un récepteur pour différents substrats, aux constantes d'affinité relative, voire aux constantes d'affinité absolues⁷⁴. Par exemple, Cheng et coll. ont déterminé les constantes d'affinité relative de seize inhibiteurs de l'anhydrase carbonique bovine en une seule expérience de compétition⁷⁵.

Dans les expériences de compétition, le spectromètre de masse est utilisé comme simple détecteur, la réaction entre le récepteur et les ligands se produisant en solution. Pour que les résultats de ce type d'expériences soient fructueux, le spectre de masse obtenu doit refléter les espèces présentes en solution. Or parfois, le facteur de réponse des différentes espèces en solution n'est pas le même pour toute et il doit donc être déterminé pour pondérer les résultats obtenus directement sur le spectre de masse⁷⁶.

2.2.3.1.4. L'étude en phase gazeuse des complexes

Pour obtenir des informations sur leurs propriétés en phase gazeuse, la résistance des complexes aux collisions en phase gazeuse est évaluée par ESI-MS. Les complexes sont activés par Dissociation Induite par Collision (CID) : en d'autres termes, après avoir déterminé les paramètres instrumentaux permettant l'observation des complexes, l'énergie cinétique communiquée aux ions est progressivement augmentée jusqu'à provoquer leur dissociation totale. Ce type d'étude apporte des informations sur la stabilité des complexes en phase gazeuse⁷⁷ ou sur leurs propriétés thermochimiques (acidité, basicité en phase gazeuse)⁷⁸.

Ce type d'étude peut être mené soit dans la région de l'interface, soit dans une cellule de collision.

2.2.3.1.5. L'étude de la structure tridimensionnelle des complexes biologiques

Il existe différentes méthodes pour étudier la conformation d'un complexe biologique par spectrométrie de masse :

- Le marquage chimique :
 - Un modificateur chimique est ajouté à la solution du complexe : les régions des sousunités du complexe en interaction avec d'autres sous-unités ne sont pas a priori accessible et ne seront donc pas modifiées. Les modifications sont alors observées par spectrométrie de masse. Des « cartes d'accessibilité » permettent ensuite de comparer les sous-unités libres et complexées et de reconstruire la structure tridimensionnelle du complexe⁷⁹.
- L'échange hydrogène/deutérium : Cette méthode est basée sur le même principe que le marquage chimique : seuls les domaines des sous-unités du complexe exposés en surface seront concernés par l'échange hydrogène/deutérium. Ce marquage isotopique est réalisé en solution puis les variations de masse induites sont observées par spectrométrie de masse⁸⁰.
 Il est également possible d'évaluer les cinétiques de formation ou de dissociation d'un complexe à l'aide de cette méthode.

- L'observation de la distribution des charges :
 - Cette méthode originale pour le suivi de la conformation d'une molécule biologique a été introduite pour la première fois par Chowdhury et coll.⁸¹. Le principe est basé sur l'observation de la distribution des charges d'une protéine analysée par ESI-MS. Lors de l'ionisation électrospray, les sites basiques accessibles de la molécule biologique sont protonés : par conséquent, l'augmentation du nombre de charges (donc le déplacement de la distribution des états de charge vers les petites masses) est corrélée à un dépliement de la molécule. Le repliement ou le dépliement de la molécule biologique sont généralement induits par une modification de la température⁸² ou la présence d'agents dénaturants⁸³.
- Le cross link : un lien chimique est introduit entre les différentes sous-unités du complexe pour former un système covalent représentatif du système non-covalent initial. Une analyse protéomique par MALDI-MS (l'étude du protéome par l'analyse des peptides obtenus après digestion enzymatique de protéines) est alors utilisée pour identifier les sous-unités voisines et déterminer ainsi les sites d'interactions entre sous-unités⁸⁴.

2.2.3.1.6. L'étude de complexes de haut poids moléculaire

Le développement de l'analyseur temps de vol, dont la gamme de masse est théoriquement illimitée, a donné l'accès à l'observation de complexes de haut poids moléculaire. Sous réserve d'optimiser finement la préparation de l'analyte et les paramètres instrumentaux, le couplage de sources ESI ou MALDI avec l'analyseur temps de vol permet l'étude de ce type de complexes. Les plus grandes masses moléculaires observées actuellement sont de l'ordre de quelques millions de daltons. On peut citer notamment les hémocyanines de crabes à 2,2MDa⁴⁵, le ribosome de *Thermus thermophilus* à 2,33MDa⁸⁵ ou le complexe multiprotéique de l'uréase de *Helicobacter pylori* à 4,26MDa⁸⁶.

2.2.3.1.7. La détermination de constantes de stabilité par spectrométrie de masse : les stratégies expérimentales

La spectrométrie de masse ne permet pas qu'une étude qualitative d'un édifice non-covalent, mais également une étude quantitative grâce à la détermination de constantes de stabilité⁸⁷. Les différentes méthodes existantes utilisent le spectromètre de masse comme simple détecteur, la réaction de complexation ayant lieu en solution. Le calcul est réalisé en comparant l'intensité des pics du complexe et les intensités des pics des ses sous-unités libres, déduites du spectre de masse. On peut citer notamment :

• La mesure de température de fusion :

Au cours de l'analyse du complexe par ESI-MS, la température du spray est augmentée graduellement dans la source électrospray. La température de fusion correspond à la température nécessaire pour dissocier 50% du complexe détecté initialement.

Cette méthode ne doit pas être confondue avec une méthode de dissociation en phase gazeuse : c'est la température de la solution qui est augmentée, c'est-à-dire la température des gouttelettes avant le processus d'ionisation/désorption électrospray.

Les résultats obtenus reflètent alors la stabilité du complexe en solution. Par exemple, la mesure de la température de fusion du complexe hexamérique GimC a montré une dissociation de 50% autour de 60°C (Figure 36), un résultat qui confirme les données obtenues par dichroïsme circulaire⁸⁸.



Figure 36 : dissociation thermique en solution du complexe hexamérique GimC⁸⁸.

Les expériences de compétition :

Les expériences de compétition peuvent mettre en présence : i) différents complexes substrat/récepteur, ii) plusieurs récepteurs en compétition pour un seul substrat ou iii) plusieurs substrats en compétition pour un même récepteur. La spectrométrie de masse permet détecter les différents complexes susceptibles d'être formés simultanément.

Jorgensen et coll. ont proposé une méthode pour calculer les valeurs absolues des constantes de stabilités de complexes formés avec la vancomycin et la risocetin (les récepteurs)⁷⁴. La méthode est basée sur la mesure des intensités des pics correspondants au récepteur libre et des pics correspondants aux trois complexes formés. Lorsque des solutions équimolaires sont utilisées, la résolution d'une équation simple suffit pour obtenir la valeur de la constante de stabilité (Equation 4) :

$$K_{\text{HG}_{1}} = \frac{[\text{HG}_{1}]}{[\text{H}][\text{G}_{1}]} = \frac{[\text{HG}_{1}]}{[\text{H}]([\text{H}] + [\text{HG}_{2}] + [\text{HG}_{3}])}$$

avec [HG₁], [HG₂] et [HG₃], les concentrations des trois complexes, [G₁], [G₂] et [G₃], les concentrations des trois substrats libres, [H], la concentration du récepteur libre et K_{HG1} , la constante de stabilité du premier complexe. Les résultats obtenus par cette méthode, dont l'un des avantages majeurs est la rapidité, ont confirmé les valeurs trouvées dans la littérature.

(Equation 4)

D'autres méthodes de compétition existent, utilisant des équations différentes pour calculer les constantes, notamment la méthode de Kempen et Brodbelt⁸⁹. La constante de stabilité inconnue est déterminée indirectement, en suivant uniquement l'intensité d'un complexe de référence dont la constante de stabilité est connue. Ce complexe de référence doit avoir en commun avec le complexe d'intérêt soit le récepteur, soit le substrat. Une courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration du complexe de référence est nécessaire, rendant cette méthode plus longue que la première. La constante de stabilité est calculée directement à partir de la concentration du complexe de référence lors de l'expérience de compétition. Le facteur d'ionisation du complexe d'intérêt n'a pas besoin d'être évalué, c'est l'avantage majeur de cette méthode.

• Les titrages :

Cette méthode est sans doute la plus utilisée pour déterminer les valeurs absolues des constantes de stabilité. En général, la concentration en récepteur est gardée constante, alors que la concentration en substrat varie. En chaque point du titrage (c'est-à-dire pour chaque concentration du substrat), l'intensité du complexe est comparée à l'intensité du récepteur libre. La comparaison des intensités relatives déduites des spectres de masse n'est justifiée que si les facteurs de réponse du complexe et du récepteur libre sont similaires.

A partir de ces données, différentes équations peuvent être utilisées pour calculer la constante de dissociation K_d du complexe. La méthode la plus simple pour ce calcul est la méthode graphique appelée Scatchard Plot : le ratio du complexe (GH) sur le substrat libre (G_F) est tracé en fonction de la concentration du complexe, connaissant la concentration totale du récepteur (H₀) (Figure 37). La régression linéaire des points expérimentaux donne une droite de pente -1/K_D (Equation 5).



Figure 37 : Illustration schématique du Scatchard Plot.

$$\frac{[\text{GH}]}{[\text{G}_{\text{F}}][\text{H}]_{0}} = \frac{-1}{K_{\text{D}}} \frac{[\text{GH}]}{[\text{H}]_{0}} + \frac{n}{K_{\text{D}}}$$
(Equation 5)

avec n, la stœchiométrie du complexe.

Une méthode de calcul alternative, plus robuste et insensible à une variation de l'efficacité d'ionisation globale a été développée par Daniel et coll.⁹⁰. La démonstration de cette méthode repose sur quatre équations :

$$\mathbf{K}_{a} = \frac{1}{\mathbf{K}_{d}} = \frac{\mathbf{[PL]}}{\mathbf{[P]}.\mathbf{[L]}}$$
(1)

Cette première équation caractérise la formation du complexe PL dont la constante d'association est K_a et la constante de dissociation est K_d . [L] et [P] sont les concentrations respectivement du substrat et du récepteur libre.

$$\begin{bmatrix} \mathbf{L} \end{bmatrix}_{\mathbf{0}} = \begin{bmatrix} \mathbf{L} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{PL} \end{bmatrix}$$
(2)
$$\begin{bmatrix} \mathbf{P} \end{bmatrix}_{\mathbf{0}} = \begin{bmatrix} \mathbf{P} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{PL} \end{bmatrix}$$
(3)

D'après la loi de conservation de la matière, les équations (2) et (3) établissent une relation entre la concentration totale de récepteur et de substrat introduite lors de l'analyse ($[P]_0$ et $[L]_0$), et les concentrations de ces mêmes espèces libres ([P] et [L]) et complexées ([PL]).

$$\mathbf{R} = \frac{\mathbf{[PL]}}{\mathbf{[P]}} \tag{4}$$

Daniel et coll. utilisent le rapport R, représentant la mesure expérimentale de la concentration du complexe sur la concentration du récepteur libre, en d'autres termes, R correspond au rapport de l'intensité des pics du complexe sur l'intensité des pics du récepteur libre, déterminées directement des spectres de masse.

$$[\mathbf{P}] = \frac{[\mathbf{P}]\mathbf{0}}{\mathbf{1} + \mathbf{R}}$$
(5)

$$[\mathbf{L}] = [\mathbf{L}]_0 - \frac{\mathbf{R} \cdot [\mathbf{P}]_0}{\mathbf{1} + \mathbf{R}}$$
(6)

A partir des équations (1) à (4), [P] et [L] sont exprimés en fonction de R, [P]₀ et [L]₀.

$$K_{a} = \frac{R^{2} + R}{[L]_{0} \cdot (1 + R) - R \cdot I_{P}]_{0}}$$
(7)

Il s'agit ensuite de trouver une relation entre les paramètres connus (R, [P]₀ et [L]₀) et l'inconnue K_a. En intégrant les équations (4), (5), et (6) à l'équation (1), on obtient l'équation (7). La résolution de cette équation du second degré pour le paramètre R, donne l'équation ci-dessous, où K_a est le seul paramètre inconnu :

$$R = 1/2(-1 - K^*a^* \cdot [P]^*0^* + K^*a^* \cdot [L]^*0^* + \sqrt{((1 + K^*a^* \cdot [P]^*0^* - K^*a^* \cdot [L]^*0^*)^{1/2} + 4K^*a^* \cdot [L]^*0^*)}$$
(8)

Expérimentalement, un spectre de masse est enregistré en chaque point du titrage, c'est-à-dire pour chaque concentration du substrat. Les intensités des pics correspondant au complexe et les intensités des pics correspondant au récepteur libre sont mesurées directement sur les spectres de masse pour chaque point. Si l'on pose l'hypothèse que les spectres de masse reflètent les espèces en solution, les

intensités du complexe et du récepteur correspondent à leur concentration respective en solution. Le rapport R peut donc être calculé avec ces intensités puis tracé en fonction de la concentration de substrat ajouté. L'équation (8) est alors utilisée pour effectuer une régression non linéaire de ces points expérimentaux. La constante d'association K_a obtenue grâce à cette régression non linéaire, correspond à la valeur qui permet de faire passer la courbe de régression au plus près de tous les points expérimentaux.

2.2.3.2. La validité des informations obtenues

Une question est à l'heure actuelle encore largement débattue : l'analyse par spectrométrie de masse est-elle le reflet fidèle des édifices non-covalents et des équilibres en solution ?

2.2.3.2.1. Les interactions non-covalentes en phase gazeuse

En effet, le passage des espèces en phase gazeuse lors des processus d'ionisation/désorption ESI ou MALDI modifient les interactions non-covalentes. Toutefois ces interactions ne sont pas toutes affectées de la même façon :

- Les liaisons électrostatiques et hydrogène, dépendantes de la permittivité du milieu, sont favorisées lorsque cette valeur diminue. La permittivité du vide (ε = 1) étant beaucoup plus faible que celle de l'eau (ε = 80), les liaisons électrostatiques et hydrogène sont renforcées dans le spectromètre de masse.
- Comme les liaisons de van der Waals ne sont pas affectées par la présence ou l'absence de molécules d'eau, il est en général supposé que la force de ces interactions est du même ordre de grandeur en solution et en phase gazeuse.
- Les liaisons hydrophobes, dont la force motrice est la présence de molécules d'eau, sont considérablement affaiblies lors de la désolvatation dans le spectromètre de masse. Plusieurs études ont ainsi montré que l'observation d'un édifice non-covalent dans lequel les interactions hydrophobes jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la structure, est beaucoup plus difficile^{91,87}.

Les édifices non-covalents dont la structure n'est maintenue que par un seul type de liaison sont rares voir inexistants. Ainsi même si certaines interactions non-covalentes sont rompues lors du passage en phase gazeuse, notamment les interactions hydrophobes, les sous-unités de l'édifice non-covalent restent associées. La spectrométrie de masse, utilisée comme détecteur, permet donc l'observation des édifices non-covalents en solution, sous réserve d'optimiser finement les conditions analytiques pour éviter leur fragmentation.

2.2.3.2.2. La formation d'agrégats non spécifiques

L'ionisation ESI⁹² ou MALDI¹⁰ engendre parfois la formation d'agrégats non spécifiques, c'est-à-dire des espèces détectées en phase gazeuse mais ne résultant pas d'une association spécifiques préexistante en solution (impliquant par exemple des sels présents

en solution). Bien que le processus d'agrégation aspécifique ne soit pas clairement identifié, plusieurs raisons peuvent les favoriser :

- La faculté de l'analyte à s'agréger ;
- La concentration trop importante de l'analyte⁹³: Il est primordial de vérifier quels sont les complexes observés en fonction de la concentration, et de travailler à la concentration la plus faible possible permettant d'observer le complexe.
- La nature de la matrice et la puissance laser en MALDI-MS : une puissance laser trop importante provoque une forte densité de la plume de désorption. Les multiples collisions qui s'y produisent alors, favorisent la formation des agrégats⁹⁴.

Pour s'assurer de la spécificité des complexes observés par spectrométrie de masse, et éviter ainsi les faux positifs⁹⁵, il est possible de réaliser plusieurs expériences. La modification d'un paramètre de l'analyse par exemple doit entraîner une évolution du spectre de masse, sinon ce dernier ne reflète pas correctement les espèces en solution. Parmi les paramètres facilement modifiables, nous pouvons citer :

- Les conditions en solution : la modification de la température, du pH, de la force ionique, l'introduction de solvant organique dans une solution aqueuse... induisent la dissociation des édifices non-covalents en solution, facilement observable sur le spectre de masse⁷⁵.
- Les paramètres instrumentaux : les interactions non-covalentes doivent être facilement dissociées lorsque les conditions dans la source et dans l'interface sont plus destructrices.
- Les partenaires de l'interaction : la modification d'un des partenaires de l'interaction, au travers d'expériences de titrage ou de compétition par exemple, doit affecter la formation du complexe en solution. De même, une modification chimique du site d'interaction de l'un des deux partenaires doit rendre impossible l'observation du complexe non-covalent.

Ainsi, même si la spécificité d'une espèce observée par spectrométrie de masse n'est a priori par connue, elle est facilement vérifiable par la mise en œuvre de différentes méthodes.

2.2.3.2.3. Les facteurs de réponse

Lorsque l'on cherche à comparer différents édifices non-covalents par spectrométrie de masse (par exemple lors de la détermination de constantes de stabilité relatives ou absolues), il est indispensable de savoir si les intensités des pics observés sur les spectres de masse peuvent être corrélées aux concentrations en solution. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse déforme dans certains cas l'image de la solution que reflète le spectre de masse :

 Lors de la désorption MALDI : la matrice, le mode de dépôt ainsi que la puissance du tir laser doivent être choisis avec soin pour minimiser tout risque de dégradation, d'agrégation non spécifiques ou de fragmentation d'une ou des espèces à analyser. Dans le cas contraire, les résultats basés sur les spectres de masse seront erronés.

- Lors de la formation des espèces ionisées : les espèces ne possèdent pas forcément toutes le même rendement d'ionisation. En fonction du mode positif ou négatif choisi, certaines espèces s'ioniseront plus facilement que d'autres.
- Lors de la désolvatation des espèces ionisées en ESI-MS : outre l'affaiblissement des liaisons hydrogène, qui rend l'étude des complexes dont la structure est maintenue essentiellement par ce type d'interactions très difficile, l'étape de désolvatation influence fortement le facteur de réponse des espèces. Il a été montré que plus l'énergie de solvatation des espèces est forte, moins le signal généré est intense⁷⁶.
- Lors des collisions dans l'interface : il est nécessaire d'optimiser finement les paramètres de transmission afin d'éviter la fragmentation des édifices non-covalents fragiles dans l'interface.
- Lors de la focalisation des ions vers l'analyseur : il est impossible d'observer simultanément des espèces dont les masses sont trop éloignées. Par exemple, l'optimisation des paramètres de transmission et de focalisation pour l'observation d'ions lourds engendre une discrimination des ions légers et réciproquement.

REFERENCES

1. Voillard, S. Etude des associations non covalentes impliquant le récepteur des oestrogènes selon deux approches : la biochimie et la spectrométrie de masse. Université Paris 6, 2009.

2. Lehn, J. M., Cryptates - Inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules. *Pure and Applied Chemistry* **1978**, *50* (9-10), 871-892.

3. Constable, E. C., Oligopyridines as helicating ligands. *Tetrahedron* **1992**, *48* (46), 10013-10059.

4. Nierengarten, H.; Leize, E.; Breuning, E.; Garcia, A.; Romero-Salguero, F.; Rojo, J.; Lehn, J. M.; Van Dorsselaer, A., Characterization of multimetallic grid-type complexes by electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37* (1), 56-62.

5. Lawrence, D. S.; Jiang, T.; Levett, M., Self-Assembling Supramolecular Complexes. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2229–2260.

6. Russell, K. C.; Leize, E.; Vandorsselaer, A.; Lehn, J. M., Investigation of selfassembled supramolecular species in solution by IL-ESMS, a new mass-spectrometric technique. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34* (2), 209-213.

7. Lindsey, J. S., Self-assembly in synthetic routes to molecular devices - Biological principles and chemical perspectives - A Review. *New Journal of Chemistry* **1991**, *15* (2-3), 153-180.

8. Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Seto, C. T., Molecular self-assembly and nanochemistry - A Chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science* **1991**, *254* (5036), 1312-1319.

9. Fischer, E., Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1894, 27, 2985.

10. Farmer, T. B.; Caprioli, R. M., Determination of protein-protein interactions by matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1998**, 33 (8), 697-704.

11. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N., Fast atom bombardment of solids (FAB) - A new ion-source for mass-spectrometry. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1981**, (7), 325-327.

12. Potts, K. T.; Keshavarzk, M.; Tham, F. S.; Abruna, H. D.; Arana, C., Metal ion-induced self-assembly of functionalized 2,6-oligopyridines .4. Metal-metal interaction in double-stranded, dicuprous helicates derived from terpyridine derivatives. *Inorganic Chemistry* **1993**, *32* (20), 4450-4456.

13. Dietrichbuchecker, C.; Sauvage, J. P., Synthetic molecular knots. *New Journal of Chemistry* **1992**, *16* (1-2), 277-285.

14. Gokel, G. W.; Barbour, L. J.; De Wall, S. L.; Meadows, E. S., Macrocyclic polyethers as probes to assess and understand alkali metal cation-pi interactions. *Coordination Chemistry Reviews* **2001**, *222*, 127-154.

15. Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray ion source -Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88* (20), 4451-4459.

16. Yamashita, M.; Fenn, J. B., Negative-ion production with the electrospray ion-source. *Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88* (20), 4671-4675.

17. Meng, C. K.; Mann, M.; Fenn, J. B., Of protons or proteins - A beams a beam for a that (BURNS,O.S.). *Zeitschrift Fur Physik D-Atoms Molecules and Clusters* **1988**, *10* (2-3), 361-368.

18. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246* (4926), 64-71.

19. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, *78*, 53-68.

20. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (20), 2299-2301.

21. Karas, M.; Bahr, U.; Ingendoh, A.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization massspectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1989**, *28* (6), 760-761.

22. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1988**, *2*, 151-153.

23. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B., Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240.

24. Larsen, B. S.; McEwen, C. N., An electrospray ion-source for magnetic-sector mass spectrometers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1991**, *2* (3), 205-211.

25. Loo, J. A.; Loo, R. R. O.; Light, K. J.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D., Multiply charged negative-ions bu electrospray ionization of polypeptides and proteins. *Analytical Chemistry* **1992**, *64* (1), 81-88.

26. Cole, R. B., Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35* (7), 763-772.

27. Kebarle, P., A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35* (7), 804-817.

28. 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* (1), 11-35.

29. de la Mora, J. F.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez, M.; Fenn, J. B., Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry - Discussion. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35* (8), 939-952.

30. Hayati, I.; Bailey, A. I.; Tadros, T. F., Investigation into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying af liquids. 1. Effect of electric-field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization. *Journal of Colloid and Interface Science* **1987**, *117* (1), 205-221.

31. Ikonomou, M. G.; Blades, A. T.; Kebarle, P., Electrospray ion spray - A comparison of mechanisms and performance. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (18), 1989-1998.

32. Blades, A. T.; Ikonomou, M. G.; Kebarle, P., Mechanism of electrospray massspectrometry - Electrospray as an electrolysis cell. *Analytical Chemistry* **1991**, 63 (19), 2109-2114.

33. Gomez, A.; Tang, K. Q., Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids* **1994**, *6* (1), 404-414.

34. Taflin, D. C.; Ward, T. L.; Davis, E. J., Electrified droplet fission and the rayleigh limit. *Langmuir* **1989**, *5* (2), 376-384.

35. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A., Evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics* **1976**, *64* (6), 2287-2294.

36. Thomson, B. A.; Iribarne, J. V., Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric-pressure. *Journal of Chemical Physics* **1979**, *71* (11), 4451-4463.

37. Kebarle, P.; Tang, L., From ions in solution to ions in the gas-phase - The mechanism of electrospray mass-spectrometry. *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (22), A972-A986.

38. Gamero-Castano, M.; de la Mora, J. F., Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *406* (1), 67-91.

39. Wilm, M.; Mann, M., Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry* **1996,** *68* (1), 1-8.

40. Ikonomou, M. G.; Blades, A. T.; Kebarle, P., Investigation of the electrospray interface for liquid-chromatography mass-spectrometry. *Analytical Chemistry* **1990**, *62* (9), 957-967.

41. Fligge, T. A.; Kast, J.; Bruns, K.; Przybylski, M., Direct monitoring of protein-chemical reactions utilising nanoelectrospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10* (2), 112-118.

42. Yamaguchi, K., Cold-spray ionization mass spectrometry: principle and applications. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (5), 473-490.

43. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D., Observation of noncovalent enzyme substrate and enzyme product complexes by ion-spray mass-spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7818-7819.

44. Loo, J. A., Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *200* (1-3), 175-186.

45. Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F., Comparative ESI-MS study of similar to 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* (5), 419-429.

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

47. Loo, J. A.; Udseth, H. R.; Smith, R. D.; Futrell, J. H., Collisional effects on the charge distribution of ions from large molecules, formed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2*, 207-210.

48. Kelly, R. T.; Tolmachev, A. V.; Page, J. S.; Tang, K. Q.; Smith, R. D., The ion funnel: Theory, implementations, and applications. *Mass Spectrometry Reviews* **2010**, *29* (2), 294-312.

49. Meng, C. K.; Mann, M.; Fenn, J. B., Of protons or proteins - A beams a beam for a that. *Zeitschrift Fur Physik D-Atoms Molecules and Clusters* **1988**, *10* (2-3), 361-368.

50. Stafford, G. C.; Kelley, P. E.; Syka, J. E. P.; Reynolds, W. E.; Todd, J. F. J., Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technilogy. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1984**, *60* (SEP), 85-98.

51. Henry, K. D.; Williams, E. R.; Wang, B. H.; McLafferty, F. W.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F., Fourier-transform mass-spectrometry of large molecules by electrospray ionization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86* (23), 9075-9078.

52. Verentchikov, A. N.; Ens, W.; Standing, K. G., Reflecting time-of-flight mass-spectrometer with an electrospray ion-source and orthogonal extraction. *Analytical Chemistry* **1994**, *66* (1), 126-133.

53. Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Tennoeverdebrauw, M. C., Laser desorption-mass spectrometry of polar non-volatile bio-organic molecules. *Analytical Chemistry* **1978**, *50* (7), 985-991.

54. Kussmann, M.; Nordhoff, E.; RahbekNielsen, H.; Haebel, S.; RosselLarsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; KrollKristensen, A.; Palm, L.; Roepstorff, P., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32* (6), 593-601.

55. Knochenmuss, R., Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966-986.

56. Zenobi, R.; Knochenmuss, R., Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17* (5), 337-366.

57. Beavis, R. C.; Chait, B. T., Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption. *Chemical Physics Letters* **1991**, *181* (5), 479-484.

58. Sheng, L. S.; Covey, J. E.; Shew, S. L.; Winger, B. E.; Campana, J. E., Matrixassisted laser-desorption ionization Fourier-transform mass-spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, *8* (6), 498-500.

59. Schwartz, J. C.; Bier, M. E., Matrix-assisted laser desorption of peptides and proteins using a quadrupole ion trap mass-spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, *7* (1), 27-32.

60. Hill, J. A.; Annan, R. S.; Biemann, K., Matrix-assisted laser desorption ionization with a magnetic mass-spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, *5* (9), 395-399.

61. Wiley, W. C.; McLaren, I. H., Time-of-flight mass spectrometry with improved resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26*, 1150-1157.

62. Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A., Mass reflectron. New nonmagnetic time-of-flight high-resolution mass spectrometer. *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* **1973**, *64*, 82-89.

63. Cotter, R. J., Time-of-flight mass-spectrometry - An increasing role in the life sciences. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **1989**, *18* (8), 513-532.

64. Spengler, B.; Cotter, R. J., Ultraviolet-laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins above 100000 Daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis. *Analytical Chemistry* **1990**, *62* (8), 793-796.

65. Brown, R. S.; Lennon, J. J., Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser-desorption ionization linear time-of-flight mass-spectrometer. *Analytical Chemistry* **1995**, 67 (13), 1998-2003.

66. Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A., Delayed extraction matrix-assisted laserdesorption time-of-flight mass-spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, 9 (11), 1044-1050.

67. <u>http://www.covalx.com/hm2</u>.

68. Katta, V.; Chait, B. T., Observation of the heme globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass-spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (22), 8534-8535.

69. Lim, S.; Peshenko, I.; Dizhoor, A.; Ames, J. B., Effects of Ca2+, Mg2+, and Myristoylation on Guanylyl Cyclase Activating Protein 1 Structure and Stability. *Biochemistry* **2009**, *48* (5), 850-862.

70. Bolbach, G., Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-covalent complexes: Fundamentals and applications. *Current Pharmaceutical Design* **2005**, *11* (20), 2535-2557.

71. Nazabal, A.; Wenzel, R. J.; Zenobi, R., Immunoassays with direct mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (11), 3562-3570.

72. Nierengarten, H.; Rojo, J.; Leize, E.; Lehn, J. M.; Van Dorsselaer, A., High molecular weight Cu-II coordination polymers and their characterisation by electrospray mass spectrometry (ESMS). *European Journal of Inorganic Chemistry* **2002**, (3), 573-579.

73. Potier, N.; Barth, P.; Tritsch, D.; Biellmann, J. F.; VanDorsselaer, A., Study of noncovalent enzyme-inhibitor complexes of aldose reductase by electrospray mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* **1997**, *243* (1-2), 274-282.

74. Jorgensen, T. J. D.; Roepstorff, P.; Heck, A. J. R., 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* (20), 4427-4432.

75. Cheng, X. H.; Chen, R. D.; Bruce, J. E.; Schwartz, B. L.; Anderson, G. A.; Hofstadler, S. A.; Gale, D. C.; Smith, R. D.; Gao, J. M.; Sigal, G. B.; Mammen, M.; Whitesides, G. M., Using electrospray-ionization FTICR mass-spectrometry to study competitive-binding of inhibitors to carbonic-anhydrase. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (34), 8859-8860.

76. Leize, E.; Jaffrezic, A.; VanDorsselaer, A., Correlation between solvation energies and electrospray mass spectrometric response factors. Study by electrospray mass spectrometry of supramolecular complexes in thermodynamic equilibrium in solution. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31* (5), 537-544.

77. Rogniaux, H.; Van Dorsselaer, A.; Barth, P.; Biellmann, J. F.; Barbanton, J.; van Zandt, M.; Chevrier, B.; Howard, E.; Mitschler, A.; Potier, N.; Urzhumtseva, L.; Moras, D.; Podjarny, A., Binding of aldose reductase inhibitors: Correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10* (7), 635-647.

78. Jones, C. M.; Bernier, M.; Carson, E.; Colyer, K. E.; Metz, R.; Pawlow, A.; Wischow, E. D.; Webb, I.; Andriole, E. J.; Poutsma, J. C., Gas-phase acidities of the 20 protein amino acids. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *2*67, 54-62.
79. Kaltashov, I. A.; Eyles, S. J., Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2002**, *21* (1), 37-71.

80. Maier, C. S.; Deinzer, M. L., Protein conformations, interactions, and H/D exchange. *Biological Mass Spectrometry* **2005**, *402*, 312-360.

81. Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T., Probing conformational-changes in proteins by mass-spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (24), 9012-9013.

82. Benesch, J. L. P.; Sobott, F.; Robinson, C. V., Thermal dissociation of multimeric protein complexes by using nanoelectrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2003**, 75 (10), 2208-2214.

83. Konermann, L.; Douglas, D. J., Equilibrium unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: Distinguishing two-state from multi-state transitions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12* (8), 435-442.

84. Borchers, C.; Tomer, K. B., Characterization of the noncovalent complex of human immunodeficiency virus glycoprotein 120 with its cellular receptor CD4 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **1999**, *38* (36), 11734-11740.

85. Benesch, J. L.; Robinson, C. V., Mass spectrometry of macromolecular assemblies: preservation and dissociation. *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, *16* (2), 245-251.

86. Heck, A. J. R.; van den Heuvel, R. H. H., Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, *23* (5), 368-389.

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

88. Fandrich, M.; Tito, M. A.; Leroux, M. R.; Rostom, A. A.; Hartl, F. U.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V., 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* (26), 14151-14155.

89. Kempen, E. C.; Brodbelt, J. S., A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (21), 5411-5416.

90. Daniel, J. M.; McCombie, G.; Wendt, S.; Zenobi, R., Mass spectrometric determination of association constants of adenylate kinase with two noncovalent inhibitors. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14* (5), 442-448.

91. Wu, Q. Y.; Gao, J. M.; JosephMcCarthy, D.; Sigal, G. B.; Bruce, J. E.; Whitesides, G. M.; Smith, R. D., Carbonic anhydrase-inhibitor binding: From solution to the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (5), 1157-1158.

92. Geoghegan, K. F.; Dixon, H. B. F.; Rosner, P. J.; Hoth, L. R.; Lanzetti, A. J.; Borzilleri, K. A.; Marr, E. S.; Pezzullo, L. H.; Martin, L. B.; LeMotte, P. K.; McColl, A. S.; Kamath, A. V.; Stroh, J. G., Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a "His tag" in Escherichia coli: The cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins. *Analytical Biochemistry* **1999**, *267* (1), 169-184.

93. Terrier, P.; Tortajada, J.; Buchmann, W., A study of noncovalent complexes involving single-stranded DNA and polybasic compounds using nanospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (2), 346-358.

94. Zehl, M.; Allmaier, G., Instrumental parameters in the MALDI-TOF mass spectrometric analysis of quaternary protein structures. *Analytical Chemistry* **2005**, 77 (1), 103-110.

95. Cunniff, J. B.; 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 (5), 437-447.

Résultats

Même s'il existe encore de nombreux débats sur la validité des résultats obtenus par cette technique, la spectrométrie de masse ESI-MS et MALDI-MS est devenue incontournable pour l'étude d'édifices non-covalents. Cependant, ces analyses nécessitent une optimisation minutieuse de la préparation de l'échantillon et des paramètres instrumentaux afin d'obtenir des résultats fiables. De même, des expériences de contrôle sont indispensable pour éviter toute interprétation erronée.

Dans la suite de ce mémoire, nous présenterons des applications de la spectrométrie de masse supramoléculaire à la chimie et à la biologie.

1. L'étude d'édifices non-covalents issus de synthèse sera tout d'abord abordée au travers de trois études :

- La caractérisation d'architecture métallosupramoléculaires neutres ;
- La caractérisation d'architecture métallosupramoléculaires insolubles ;
- La caractérisation de caténanes et de rotaxanes de hauts poids moléculaire.

2. Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude in vivo et in vitro d'une molécule à visée thérapeutique dans l'hémoglobine, l'ITPP. Le premier protocole développé doit permettre la détection par MALDI-MS de l'ITPP à de très faibles concentrations, ainsi que sa quantification dans différentes fractions sanguines. Le deuxième protocole a pour but d'évaluer par ESI-MS la constante d'affinité de l'ITPP pour l'hémoglobine, en comparaison avec celles d'autres effecteurs allostériques de l'hémoglobine, l'IHP et le BPG.

3. Dans le dernier chapitre, nous illustrerons le potentiel de la spectrométrie de masse pour la détermination de constante de stabilité de complexes protéine/protéine. Les complexes étudiés sont formés à partir d'AdR et de différents variants d'Adx, dont les constantes de dissociation ont déjà été déterminées par SPR ou par la méthode du Cytochrome C. La mise en place de titrages thermodynamiques suivi par ESI-MS doit permettre de valider l'une ou l'autre de ces méthodes.

Chapitre 3

Développement d'une approche par MALDI-TOF pour la caractérisation d'architectures supramoléculaires chimiques

Nous cherchons dans ce chapitre à déterminer le potentiel de la technique MALDI-MS comme alternative à l'ESI-MS pour l'analyse d'édifices non-covalents. En effet, certains de ces édifices, neutres ou solubles dans des solvants très volatils ou insolubles, peuvent être difficiles à caractériser par ESI-MS.

La structure de la majorité des édifices non-covalents est déterminée par cristallographie RX ou RMN. Cependant, il est parfois difficile voire impossible d'utiliser ces techniques analytiques. La cristallographie requiert d'une part l'obtention de cristaux de taille et de qualité suffisante. D'autre part, cette technique ne donne des informations que sur l'édifice en phase solide et non en solution, où la plupart des réactions se produisent. Quant à la RMN, cette technique est tout d'abord incompatible avec l'analyse de molécules paramagnétiques. Ensuite, la synthèse d'édifices non-covalents de plus en plus complexes et de masse de plus en plus élevée génèrent des spectres RMN de plus en plus difficile à interpréter. Dans ce contexte, la spectrométrie de masse apparait comme une alternative intéressante à ces techniques, aussi bien pour apporter des informations supplémentaires que pour les remplacer.

En spectrométrie de masse, l'ESI-MS est la technique reine pour l'analyse d'édifices noncovalents. La littérature très abondante concernant ce sujet l'atteste^{1,2,3,4,5,6,7,8}. Néanmoins, l'analyse de certains de ces édifices est plus complexe à mettre en œuvre : lorsque l'analyte est neutre (Section 3.1.), insoluble (Section 3.2.) ou soluble dans un solvant volatil comme le dichlorométhane ou le chloroforme (Section 3.3.), sa caractérisation par ESI-MS est plus difficile. Nous avons par conséquent cherché à développer des approches MALDI-MS pour l'analyse de ces édifices non-covalents.

3.1. DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE PAR MALDI-TOF POUR LA CARACTERISATION D'ARCHITECTURES METALLO-SUPRAMOLECULAIRES NEUTRES.

La chimie supramoléculaire a généré une grande variété d'architectures inorganiques par des processus d'auto-assemblage entre des ligands de conception adaptée et des ions métalliques^{9,10,11,12}. Parmi la grande diversité des structures actuellement connues, les métallo-grilles tiennent une place importante. Ces grilles consistent en un réseau plan et régulier d'ions métalliques maintenu par des ligands rigides^{13,14,15}. Les grilles les plus abondantes sont celles de type [2x2] formées par des ligands ditopiques (ligands pouvant se lier à deux ions métalliques) relativement facile à synthétiser. Cette étude s'intéresse aux grilles [2x2] formées à partir des ligands L¹H₂ à L¹⁰H₂ sous leur forme déprotonée (Figure 1). Ces grilles [M₄(Lⁿ)₄], avec M, un ion métallique dichargé, sont par conséquent neutres.

La structure de ces grilles est en général facilement déterminée à l'état solide par des mesures de cristallographie RX^{13,14}. Cependant, étant donné leur application possible comme récepteurs en solution, il est indispensable de vérifier si leur structure est conservée en solution et sous quelles conditions. Dans le cas de certaines grilles diamagnétiques et de la majorité des grilles paramagnétiques, le spectre RMN ne peut être utilisé pour établir sans ambiguïté la structure de la grille¹⁶. La spectrométrie de masse apparait alors comme une technique d'analyse alternative de grand intérêt.



Figure 1 : Les ligands L^1H_2 à $L^{10}H_2$, à partir desquels les grilles analysées dans cette étude sont formées.

Au cours de ces dernières années, l'ESI-MS s'est imposé comme la technique analytique de premier choix aussi bien pour la caractérisation de complexes non-covalents

biologiques^{1,2,3,4}que d'architectures supramoléculaires issues de synthèse^{5,6,7,8}, comme les grilles¹⁷. Toutefois, une analyse ESI-MS requiert que les espèces soient préalablement chargées en solution. Lorsque les espèces sont neutres, un peu d'acide est généralement ajouté à leur solution pour les protoner. Alors que la structure de certaines grilles résiste aux réactions réversibles de protonation/déprotonation en solution^{18,19}, les grilles dérivées des diacylhydrazones (Figure 1, ligands L³ - L¹¹) sont stables tant que leurs ligands sont sous leur forme de dianion, mais ont tendance à se dissocier lors de l'ajout d'acide¹⁶. Par contre, lors du processus d'ionisation MALDI-MS, les grilles sont susceptibles d'être ionisées par un transfert de proton provenant des molécules de matrice²⁰. L'avantage de cette ionisation réside dans l'absence de contact en solution entre les grilles et un agent ionisant, qui conduirait à leur dissociation. Pour cette raison, nous avons choisi le MALDI-MS pour l'étude de ces grilles neutres, bien que cette technique ne soit pas a priori la plus adaptée pour ce type d'analyse²¹.

En effet, dès son développement, il était admis que le MALDI-MS ne pouvait pas permettre la détermination de masses pour les édifices non-covalents : le contact initial des analytes avec la solution acide de matrice et l'utilisation d'un laser de haute énergie pour l'analyse étaient supposés provoquer la rupture des interactions faibles. Pourtant, dès ses débuts, le MALDI-MS a démontré sa capacité à analyser des édifices non-covalents, comme les protéines²², sous des conditions analytiques adaptées. De plus, la possibilité d'étudier des architectures supramoléculaires organiques par MALDI-MS a été prouvée par quelques exemples analysés avec succès par cette technique ^{23,24,25}. Dans ce contexte, nous avons cherché lors de cette étude à développer un protocole adapté à l'analyse des grilles neutres [2x2] par MALDI-MS.

3.1.1. Optimisation du protocole

3.1.1.1. Choix de la matrice

Deux méthodes sont en général utilisées pour analyser des molécules neutres par spectrométrie de masse : l'addition de cations²⁶ et la méthode du « ion labelling »²⁷. Cependant, ces deux méthodes possèdent certains inconvénients. L'addition de cations peut i) déstabiliser l'équilibre en solution, modifiant les espèces en solution et/ou ii) générer des ions moléculaires avec des degrés variés de cationisation, dispersant ainsi le signal sur de nombreux pics. Dans le cas du « ion labelling », un site de fixation approprié est nécessaire. Par conséquent cette méthode ne peut pas être appliquée à toutes les situations, notamment pour notre étude : les sites de fixation potentiels sont en effet occupés lors de la formation des grilles. Par contre, il a été démontré dans la littérature qu'un transfert de protons des molécules de matrices à celles de l'analyte était un mécanisme d'ionisation possible²⁰. Ce mécanisme d'ionisation évite un contact de l'édifice non-covalent avec un agent ionisant en solution, qui conduirait à sa dissociation. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer la matrice la plus adaptée pour activer ce mécanisme d'ionisation. Ici, le paramètre pertinent pour choisir la matrice est l'affinité protonique en phase gazeuse. En effet, le transfert de proton se produit uniquement si l'affinité protonique de l'analyte est plus élevé que celui de la matrice²⁸. Néanmoins, plus la différence entre les affinités protoniques est grande, plus la réaction de transfert de protons est exothermique. Cette énergie en excès augmente les risques de fragmentation de l'analyte²⁸. Ainsi trois matrices classiques d'affinité protonique variée ont été testées lors de cette étude (Tableau 1) : l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), le 1,8,9-anthracenetriol (Dithranol) et la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP). Comme les grilles dérivées du ligand L¹H₂ sont connues pour être suffisamment stables pour être caractérisées par ESI-MS, les deux grilles [Zn₄(L⁶)₄] et [Zn₄(L⁷)₄] ont été

choisies comme modèle pour le choix de la matrice. Toutes les analyses suivantes ont été réalisées en utilisant le dépôt couche mince.

Matrice	Structure	Masse (g/mol)	Affinité protonique (kcal/mol)
Acide α-cyano-4-hydroxy-cinnamic (HCCA)	OH HO CN	189.17	201.0 ²⁹
1,8,9-anthracènetriol (Dithranol)	OH O OH	226.23	211.5 ²⁹
2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP)	HO OH O CH ₃ HO OH ·H ₂ O	186.16	213.3 ²⁹

Tableau 1: Affinité protonique (kcal/mol) des matrices testées.

Lorsque la matrice utilisée est la THAP (à 100 g/L dans du tétrahydrofurane), le spectre de masse de $[Zn_4(L^6)_4+H^+]^+$ (m/z 2224,8) (Figure 2a.). Lorsque les deux autres matrices, le Dithranol et le HCCA, sont utilisées, d'autres pics sont observés sur les spectres de masse. Dans le cas du Dithranol (solution saturée dans du tétrahydrofurane), le pic du ligand libre protoné $[L^6H_2+H^+]^+$ (m/z 493,2) est le plus intense, indiquant que le complexe est déjà dissocié en solution (Figure 2b.). Dans le cas du HCCA (solution saturée dans du tétrahydrofurane), le spectre de masse montre le pic du ligand libre protoné $[L^6H_2+H^+]^+$ (m/z 493,2), le plus intense, avec d'autres pics correspondant à $[(L^6)_2H_2Zn_2+H^+]^+$ (8% de l'intensité du ligand). Ces pics indiquent une dissociation partielle de la grille. Avec cette matrice, le pic correspondant à la grille protonée intacte est très peu intense (7% de l'intensité du ligand) (Figure 2c.). Des résultats similaires ont été obtenus pour la grille $[Zn_4(L^7)_4]$ avec ces trois matrices.

Un pic correspondant à la grille intacte protonée a été observé pour les deux grilles quelle que soit la matrice utilisée. Comme le transfert de protons ne se produit que si l'affinité protonique de d'analyte est plus élevée que celle de la matrice²⁸, l'affinité protonique de la grille est donc plus élevée que celle des trois matrices testées. Cependant, plus la différence d'affinité protonique entre la grille et matrice est grande, plus la réaction de transfert de protons est exothermique. Cet excès d'énergie provoque la fragmentation de la grille²⁸, comme lors des analyses utilisant le Dithranol ou le HCCA. Dans cette étude, la matrice la plus « froide » ²⁹, la THAP, est la matrice la plus adaptée pour l'analyse des grilles neutres : lorsque cette matrice est utilisée, le transfert de protons s'accompagne d'une quantité d'énergie suffisamment faible pour éviter la fragmentation de la grille. La THAP sera donc utilisée pour toutes les analyses suivantes.



<u>Figure 2 :</u> Spectres de masse de la grille [Zn₄(L⁶)₄] en mode positif, dépôt couche mince. Un total de 160 tirs a été effectué pour chaque spectre. Matrice utilisée : THAP solubilisé dans du THF (a.), Dithranol solubilisé dans du THF (b.), CHCA solubilisé dans du THF (c.).

3.1.1.2. Optimisation de la méthode de dépôt

Deux méthodes de dépôt, le dépôt couche mince et le dépôt goutte séchée, ont été évaluées sur la grille $[Zn_4(L^6)_4]$ en utilisant la THAP comme matrice. La méthode du dépôt couche mince consiste, dans un premier temps, à déposer une goutte de solution de matrice sur la cible. Lorsque le solvant est évaporé, une goutte de la solution contenant l'analyte est déposée à la surface de la première couche de matrice et évaporé à l'air ambiant. La méthode du dépôt goutte séchée consiste à mélanger à la solution contenant l'analyte, une solution de matrice. Une goutte du mélange matrice/analyte est ensuite déposée sur la cible et évaporé à l'air ambiant afin qu'il cristallise.

Lors de l'utilisation de la méthode couche mince, le spectre de masse montre un unique pic correspondant à la grille intacte protonée $[Zn_4(L^6)_4+H^+]^+$ (m/z 2224,8) (Figure 3a.). Par contre, lors de l'utilisation de la méthode goutte séchée (Figure 3b.), un pic correspondant au ligand libre protoné $[L^6H_2+H^+]^+$ est présent à m/z 493,2 (36% de l'intensité de la grille intacte). Dans le cas de la méthode couche mince, le temps de contact entre la matrice et l'analyte est nul alors que ce temps de contact est de quelques minutes dans le cas de la méthode goutte séchée. Des analyses plus approfondies ont donc été menées pour vérifier si le temps de contact entre la matrice et l'analyte influence la dissociation de la grille, c'est-à-dire pour vérifier si le caractère acide de la matrice ne provoque pas la dissociation de la grille en solution.

Ainsi, la méthode goutte séchée a été utilisée en laissant l'analyte en contact en solution avec la matrice pendant cinq minutes, vingt minutes ou une heure avant qu'un aliquote ne soit déposé sur la cible et évaporé à l'air. Les dépôts ont alors été analysés immédiatement. Après un temps de contact de cinq minutes (Figure 3b.), le pic du ligand libre protoné (m/z 493,2; 36% de l'intensité de la grille intacte) apparait en plus du pic de la grille intacte protonée, indiquant que la dissociation du complexe a déjà lieu en solution. Après un temps de contact de vingt minutes ou d'une heure (Figures 3c. et 3d.), le pic du ligand libre protoné est devenu le pic le plus intense et un pic supplémentaire correspondant à $[(L^6)_2H_2Zn+H^+]^+$ apparait en plus du pic de la grille intacte protonée. Ces données sont cohérentes avec une dissociation partielle de complexe.

Ces observations confirment l'influence du temps de contact entre la matrice et la grille en solution pour l'observation de la grille intacte. Lorsqu'elle est en contact pendant une durée trop importante, la grille est partiellement dissociée et cette dissociation augmente avec le temps de contact. Comme la méthode couche mince minimise ce temps de contact, c'est cette méthode de dépôt qui sera utilisée pour les analyses suivantes.



Figure 3 : Spectres de masse de la grille $[Zn_4(L^6)_4]$ en mode positif (matrice : THAP). Un total de 500 tirs a été effectué pour chaque spectre. Méthode de dépôt utilisée : dépôt couche mince (a.), dépôt goutte séchée à t = 5 minutes (b.), dépôt goutte séchée à t = 20 minutes (c.), dépôt goutte séchée à t = 1 heure (d.).

3.1.1.3. Optimisation du tir laser

Il a été démontré que pour les complexes non-covalents biologiques, certaines interactions non-covalentes ne pouvaient être observées par MALDI-MS qu'en moyennant les spectres de masse obtenus à partir du ou des quelques premiers tirs laser effectués sur une position du dépôt non irradiée. Les signaux correspondants aux espèces dissociées prédominent sur les spectres de masse obtenus à partir des irradiations suivantes³⁰. Ce phénomène est appelé « first-shot phenomenon »³¹. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir si ce « first-shot phenomenon » existe également pour les édifices supramoléculaires issus de synthèse.

La Figure 4 montre le spectre de masse obtenu pour la grille $[(L^4)_4Co_4]$ en utilisant la méthode goutte mince et la matrice THAP. Un total de 400 tirs a été accumulé pour chaque spectre. Afin de conserver intacte la structure de la grille, tous les spectres de masse ont été enregistrés à la puissance laser minimale, c'est-à-dire légèrement au-dessus du seuil de désorption de l'analyte. Nous avons en effet observé la rupture de liaisons covalentes, notamment de doubles liaisons entre des atomes d'azote, à de trop fortes irradiances laser (Figure 5).

La Figure 3a. montre le spectre de masse obtenu lorsque seul le premier tir laser effectué sur une position du dépôt non irradiée est pris en compte. Pour pouvoir changer la position du tir laser entre deux irradiations, la fréquence du laser a été abaissée de 50Hz à 1Hz. L'accumulation des 400 tirs laser s'est fait en mode automatique afin que chaque tir soit effectué sur une position non irradiée. Les Figures 4b. à 4e. montrent les spectres de masses obtenus en moyennant du deuxième au onzième tirs sur une position donnée (4b.),

du onzième au vingtième tirs (4c.), du vingt-et-unième au centième (4d.) et du cent unième au deux centièmes (4e.).



Figure 4 : Spectres de masse de la grille [(L⁴)₄Co₄] en mode positif (matrice : THAP, dépôt couche mince). Un total de 400 tirs a été effectué pour chaque spectre. Accumulation : des premiers tirs laser (a.), des 2^{èmes} aux 11^{èmes} tirs laser (b.), des 11^{èmes} aux 21^{èmes} tirs laser (c.), des 21^{èmes} aux 100^{èmes} tirs laser (d.), des 101^{èmes} aux 201^{èmes} tirs laser.



Figure 5 : Spectres de masse des grilles [(L⁶)₄Zn₄] (a.) et [(L¹)₄Zn₄] (b.) en mode positif, à une irradiance laser plus élevée que l'irradiance seuil permettant la désorption de l'analyte (matrice : THAP, dépôt couche mince). Un total de 400 tirs a été effectué pour chaque spectre.

Ces analyses démontrent qu'un signal intense de la grille intacte n'est observé que pour les quelques premiers tirs laser effectués sur une position non irradiée. Les tirs suivants ne génèrent que du bruit de fond. Les analyses réalisées avec les matrices Dithranol et HCCA conduisent aux mêmes observations. Quelque soit la matrice, des signaux intenses de la grille intacte et des espèces dissociées ne sont enregistrés que dans les premières couches du dépôt, correspondant aux quelques premiers tirs laser effectués sur une position non irradiée, alors que les tirs suivants ne génèrent que du bruit de fond.

Contrairement à ce que l'on aurait dû observer dans le cas d'un « first-shot phenomenon »³⁰, aucune espèce dissociée n'est détectée dans les couches plus profondes du dépôt lorsque

la THAP est utilisée. Par conséquent, le phénomène observé lors de cette étude doit être dû à la méthode du dépôt plutôt qu'à un « first-shot phenomenon ». La méthode couche mince produit un dépôt très fin qui semble être rapidement épuisé sous les tirs laser successifs. Cependant, cette méthode de dépôt est celle qui préserve le mieux la structure de la grille (confère la section 3.2.2). Nous avons par conséquent gardé la méthode de dépôt couche mince et limité le nombre de tirs laser sur une position non irradiée à cinq, pour éviter l'accumulation du bruit de fond.

3.1.2. Caractérisation des grilles neutres

3.1.2.1. Influence de l'ion métallique sur la stœchiométrie de la grille

Le protocole développé précédemment a été appliqué à 24 grilles neutres dérivées des ligands de la Figure 1 et de divers ions métalliques. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 2. Pour la majorité de ces grilles, un pic, souvent unique, est observé pour la grille [2x2] attendue. Par contre, la grille [$(L^6)_4Cu_4$] est une exception.

La structure des trois grilles $[(L^6)_4Zn_4]$, $[(L^6)_4Ni_4]$ et $[(L^6)_4Cu_4]$, formées à partir du même ligand, a été confirmée par cristallographie RX en phase solide¹⁶. Sur les spectres de masse des grilles $[(L^6)_4Zn_4]$ et $[(L^6)_4Ni_4]$ (Figures 6a. et b.), seul le pic correspondant à la grille intacte protonée est observé (m/z 2224,8 et m/z 2198,9 respectivement). Au contraire, le spectre de masse de la grille $[(L^6)_4Cu_4]$ est beaucoup plus complexe et montre de nombreux pics correspondants aux espèces $[(L^6)_4Cu_4+H^+]^+$, $[(L^6)_3Cu_6+H^+]^+$, $[(L^6)_3Cu_5+H^+]^+$, $[(L^6)_2Cu_4+H^+]^+$, $[(L^6)_2Cu_4+H^+]^+$, $[(L^6)_2Cu_3+H^+]^+$ and $[(L^6)_2Cu+H^+]^+$ (Figure 6c.). Ceci concorde avec l'observation par cristallographie RX de distorsions dans la structure de la grille formée à partir d'ions cuivre en phase solide¹⁶. Ce phénomène est probablement à relier au fait qu'une configuration de coordination octaèdrale n'est quasiment jamais observée pour le cuivre II.



<u>Figure 6:</u> Spectres de masse des grilles $[(L^6)_4 Zn_4]$ (a.), $[(L^6)_4 Ni_4]$ (b.) et $[(L^6)_4 Cu_4]$ (c.) en mode positif (matrice : THAP, dépôt couche mince). Un total de 500 tirs a été effectué pour chaque spectre. Ratio ligand/métal = 1.

Grille	Formule	Solvant	Masses isotopiques théoriques ^a	Masses expérimentales
--------	---------	---------	---	--------------------------

			[M+H [⁺]] (Da)	[M+H [⁺]] (Da)
$[(L^{1})_{4}Ni_{4}]$	C ₈₈ H ₆₄ N ₃₂ Ni ₄	Méthanol	1801.35	1801.32
$[(L^{1})_{4}Zn_{4}]$	$C_{88}H_{64}N_{32}Zn_4$	Méthanol	1825.32	1825.11
$[(L^2)_4Mn_4]$	$C_{136}H_{129}N_{16}O_{24}Mn_4$	Méthanol	2593.34	2593.75
$[(L^2)_4Fe_4]$	$C_{136}H_{129}N_{16}O_{24}Fe_4$	Méthanol	2594.68	2594.76
$[(L^2)_4Cu_4]$	$C_{136}H_{129}N_{16}O_{24}Cu_4$	Méthanol	2629.79	2629.24
$[(L^2)_4 Zn_4]$	$C_{136}H_{129}N_{16}O_{24}Zn_4$	Méthanol	2633.65	2633.52
[(L ³) ₄ Co ₄]	$C_{64}H_{56}N_{24}O_8Co_4$	Tétrahydrofurane	1525.21	1525.23
[(L ³) ₄ Zn ₄]	$C_{64}H_{56}N_{24}O_8Zn_4$	Méthanol	1545.20	1545.02
$[(L^4)_4Mn_4]$	$C_{104}H_{72}N_{24}O_8Mn_4$	Tétrahydrofurane	2005.36	2005.32
[(L ⁴) ₄ Co ₄]	$C_{104}H_{72}N_{24}O_8CO_4$	Tétrahydrofurane	2021.34	2021.18
$[(L^4)_4Ni_4]$	C ₁₀₄ H ₇₂ N ₂₄ O ₈ Ni ₄	Tétrahydrofurane	2017.35	2017.26
[(L ⁴) ₄ Cu ₄]	$C_{104}H_{72}N_{24}O_8Cu_4$	Tétrahydrofurane	2037.32	2037.29
$[(L^4)_4 Zn_4]$	$C_{104}H_{72}N_{24}O_8Zn_4$	Tétrahydrofurane	2041.32	2041.31
[(L ⁵) ₄ Cu ₄]	$C_{112}H_{88}N_{24}O_8Cu_4$	Tétrahydrofurane	2149.45	2149.46
$[(L^5)_4 Zn_4]$	$C_{112}H_{88}N_{24}O_8Zn_4$	Tétrahydrofurane	2153.45	2153.50
[(L ⁵) ₄ Co ₄]	$C_{112}H_{152}N_{24}O_8CO_4$	Tétrahydrofurane	2197.96	2197.87
[(L ⁶) ₄ Ni ₄]	$C_{112}H_{152}N_{24}O_8Ni_4$	Tétrahydrofurane	2193.97	2193.78
[(L ⁶) ₄ Cu ₄]	$C_{112}H_{152}N_{24}O_8Cu_4$	Tétrahydrofurane	2213.95	2213.41
[(L ⁶) ₄ Zn ₄]	$C_{112}H_{152}N_{24}O_8Zn_4$	Tétrahydrofurane	2217.95	2217.63
$[(L^7)_4Zn_4]$	$C_{168}H_{264}N_{24}O_8Zn_4$	Tétrahydrofurane	3002.82	3002.76
[(L ⁸) ₄ Zn ₄]	$C_{88}H_{104}N_{24}O_{24}Zn_4$	Acétonitrile	2137.49	2138.37
[(L ⁹) ₄ Zn ₄]	$C_{88}H_{96}N_{32}O_{16}Zn_4$	Méthanol	2113.49	2113.41
$[(L^{10})_4 Zn_4]$	$C_{392}H_{648}N_{24}O_{32}Zn_4$	Tétrahydrofurane	6472.09 ^b	6471.90 ^b
$[(L^{11})_4 Zn_4]$	$C_{208}H_{152}N_{24}O_8Zn_4$	Dichlorométhane	3378.19 ^b	3378.82 ^b

^a L'annotation des pics a été vérifiée en comparant le profil isotopique expérimental au profil isotopique théorique.

^b Pour ces grilles, les masses mesurées et calculées sont des masses moyennes (le profil isotopique n'est pas suffisamment résolu : la masse mesurée correspond au maximum d'intensité du pic monochargé)

Tableau 2 : Résultats MALDI-MS obtenus pour les différentes grilles neutres analysées.

3.1.2.2. Etude de la stabilité relative des grilles

Alors que le spectre de masse des grilles étudiées à une concentration de 10⁻³M montre, sauf exception, un unique pic correspondant à la grille intacte protonée, l'analyse de solutions plus diluées démontre que les grilles se dissocient en solution.

Par exemple, en utilisant le même protocole développé précédemment, le spectre de masse de la grille $[(L^6)_4Zn_4]$ montre un unique pic correspondant à $[(L^6)_4Zn_4+H^+]^+$ (m/z 2224.8) à la concentration de 10⁻³M. Par contre, aux concentrations inférieures à 10⁻⁴ M, un autre pic apparait, correspondant au ligand libre protoné $[L^6H_2+H^+]^+$ (m/z 493.2), dont l'intensité augmente avec la dilution (Figure 7). En déterminant la concentration à laquelle le pic du ligand libre commence à être détecté, il a été possible d'établir un ordre de stabilité en solution entre six grilles formées à partir de ligands et d'ions métalliques variés (Tableau 3). Nous avons déterminé l'ordre de stabilité suivant : $[(L^{10})_4Zn_4] > [(L^4)_4Co_4] > [(L^6)_4Co_4] \sim$

 $[(L^6)_4Ni_4] \sim [(L^6)_4Cu_4] \sim [(L^6)_4Zn_4]$. Il semble que dans les solvants utilisés, relativement apolaires, la stabilité de la grille dépend plus de la nature du ligand que de l'ion métallique.



Figure 7: Spectres de masse de la grille [(L⁶)₄Zn₄]solubilisée dans le tétrahydrofurane à une concentration de 10⁻³M (a.), 10⁻⁴M (b.), 10⁻⁵M (c.) et 10⁻⁶M (d.) en mode positif (matrice : THAP, dépôt couche mince). Un total de 500 tirs a été effectué pour chaque spectre.

Ligand	Metal Ion	Dissociation	
Liganu		concentration	
[L ⁴] ²⁻	Co ²⁺	10 ⁻⁴ M	
[L ⁶] ²⁻	Co ²⁺	10⁻³ M	
[L ⁶] ²⁻	Cu ²⁺	10⁻³ M	
[L ⁶] ²⁻	Ni ²⁺	10⁻³ M	
[L ⁶] ²⁻	Zn ²⁺	10⁻³ M	
[L ¹⁰] ²⁻	Zn ²⁺	10⁻⁵ M	

Tableau 3 : Résistance des grilles à la dissociation. Les concentrations données correspondent à celles auxquelles le ligand libre est détecté sur le spectre de masse.

3.1.3. Conclusions

Dans cette étude, nous avons caractérisé avec succès 24 grilles [2x2] neutres par MALDI-MS. L'analyse de ce type de complexe combine deux difficultés : i) ces grilles ne peuvent pas être chargées en solution sans se dissocier ; l'ionisation de la grille, indispensable à l'analyse par spectrométrie de masse, doit avoir lieu lors du processus de désorption, ii) les ligands et les métaux qui constituent les grilles sont liés par des interactions non-covalentes, pouvant être facilement dissociées et/ou fragmentées lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Il a donc été nécessaire de développer un protocole adapté pour l'analyse des ces grilles neutres par MALDI-MS. Nous avons alors sélectionné i) la matrice THAP, dont l'affinité protonique est suffisamment élevée pour favoriser l'ionisation par un transfert de proton entre la matrice et la grille lors du processus de désorption, et suffisamment faible pour éviter la fragmentation, ii) la méthode de dépôt couche mince, qui n'implique aucun contact en solution entre la matrice et la grille et donc évite toute dissociation. Comme cette méthode génère un dépôt très fin rapidement épuisé sous les tirs laser successifs, un maximum de cinq tirs doit être effectué sur une position du dépôt non irradiée, pour réduire l'accumulation du bruit de fond.

Les analyses réalisées avec ce protocole ont permis notamment de confirmer que les structures [2x2] des grilles, établies en phase solide par cristallographie RX, sont retenues en solution, exception faite des grilles formées à partir d'ions cuivre II. Toutes les grilles cependant ne résistent pas à la dilution de façon identique.

Nous avons démontré pour la première fois que la caractérisation d'architectures supramoléculaires inorganiques neutres était possible par MALDI-MS sous des conditions analytiques adaptées. Néanmoins, ce type d'analyse est loin d'être de la routine : le choix de la matrice, la préparation de l'échantillon et les paramètres instrumentaux sont dépendants de l'édifice non-covalent étudié. Cette même optimisation doit donc être réalisée pour chaque nouvel analyte. Un protocole standard pour l'analyse de ce type d'édifices ne peut par conséquent pas être donné.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en cours de soumission (Aurélie Même, Jack Harrowfield, Xiao-Yu Cao, Noëlle Potier, Jean-Marie Lehn, Emmanuelle Leize. Development of a MALDI-TOF approach for the detection of neutral metallosupramolecular architectures. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*) et d'un poster aux 24èmes *Journées Françaises de Spectrométrie de Masse* à Pau en 2007.

3.2. DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE PAR MALDI-TOF POUR LA CARACTERISATION D'ARCHITECTURES METALLO-SUPRAMOLECULAIRES INSOLUBLES.

Les propriétés moléculaires sont principalement liées à leurs structures, définissant ainsi des relations structure-propriété. Les commutateurs moléculaires³² sont des molécules présentant une dynamique de leur structure contrôlable par un stimulus. Il est donc possible d'accéder à différentes propriétés à partir d'une seule structure. Les commutateurs moléculaires étudiés ici sont des commutateurs métallo-contrôlés dont le changement de conformation est provoqué par un processus de complexation.

Certains de ces commutateurs métallo-contrôlés sont insolubles. Leur analyse par des techniques classiques comme la RMN ou l'ESI-MS est proscrite, car elle nécessite la solubilisation de l'échantillon, dans ce cas impossible. Par contre, la technique MALDI-MS est une des rares techniques permettant l'analyse d'échantillons insolubles.

Cette étude a été menée en collaboration avec Sébastien Ulrich du Laboratoire de Chimie Supramoléculaire (dirigé par Jean-Marie Lehn, Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Strasbourg).

3.2.1. La méthode MALDI-MS sans solvant

Cette méthode originale de préparation MALDI de l'échantillon, bien que peu exploitée, a fait l'objet de plusieurs études intéressantes. Des analytes très variés ont ainsi été caractérisés avec succès grâce à cette méthode : des biomolécules (insuline bovine³³, bacteriorhodopsines³⁴) mais aussi des fullerènes³⁵, des hydrocarbones aromatiques polycycliques³⁶ ou des polymères synthétiques³⁷.

La méthode de préparation sans solvant n'est pas utilisée que dans le cas d'analyte insoluble. La méthode de préparation MALDI conventionnelle à base de solvant peut entrainer notamment des problèmes de ségrégation des espèces lors de la cristallisation ou la suppression de certaines espèces (par exemple, les peptides amphiphiles sont sous-représentés comparés aux peptides hydrophiles³⁸). La plupart de ces études ont démontré que la méthode de préparation sans solvant améliore l'analyse MALDI-MS : le mélange matrice/analyte est plus homogène, la reproductibilité, d'un dépôt à l'autre et d'un tir à l'autre, est plus élevée³⁷. Par conséquent, la puissance laser nécessaire à une bonne désorption est souvent plus faible. Les conditions MALDI sont donc plus douces, réduisant le bruit de fond et augmentant la résolution.

La méthode sans solvant est généralement constituée de deux étapes³⁹ :

- Le mélange de la matrice avec l'analyte : il est effectué en utilisant un mortier et un pilon⁴⁰, un mini-broyeur à balles⁴¹ ou un vortex⁴².
- L'application de ce mélange solide sur la cible MALDI : plusieurs techniques sont possibles : i) le mélange est appliqué en couche fine sur la cible avec⁴³ ou sans le faire fondre préalablement³³, ii) le mélange est suspendu dans un solvant dans lequel il est insoluble puis déposé sur la cible³³, iii) le mélange est pressé en un disque (similaire à la préparation de disque de bromure de potassium pour les analyses

infrarouges) et fixé sur la cible à l'aide d'un scotch double-face⁴⁰, iv) ou simplement appliqué en fine couche sur la cible à l'aide d'une spatule.

3.2.2. La préparation de l'analyte

Nous avons choisi la préparation suivante : i) la matrice et l'échantillon sont broyés finement à l'aide d'un pilon et d'un mortier en agate, ii) ce mélange est déposé en fine couche à l'aide d'une spatule sur un ruban adhésif double face conducteur fixé à la cible et l'excédent de mélange solide est éliminé.

La première difficulté concerne la calibration. Pour être précise, la calibration doit s'effectuer dans les mêmes conditions analytiques que celles de l'analyte. Or le calibrant standard en MALDI-MS est constitué d'un mélange de peptides solubilisé dans de l'eau acidifiée avec 1% d'acide formique (gamme de masse de 500 à 3000m/z). Ce calibrant est par conséquent incompatible avec une méthode de préparation sans solvant. Nous avons donc choisi des polyéthylènes glycols en poudre, facilement adaptable à la méthode sans solvant.

Lors de la précédente étude, nous avons démontré que la THAP était une matrice adaptée à l'analyse de complexes métallosupramoléculaires. Nous l'avons choisi également pour l'analyse des commutateurs métallo-contrôlés.

Le ratio analyte/matrice influence de façon significative la qualité du spectre de masse. Afin d'optimiser ce paramètre, nous avons tout d'abord testé cette préparation sur un analyte que nous avions déjà observé par MALDI-MS avec une préparation classique (dépôt couche mince avec la THAP, Figures 8 et 9a.). L'analyte a été mélangé à des quantités croissantes de matrice. Lorsque la quantité de matrice augmente, le bruit de fond s'intensifie sur les spectres de masse (Figures 9b. et c.). C'est donc le ratio 1:10 qui a été conservé pour les préparations suivantes.



Figure 8 : Structure de l'analyte utilisé comme modèle pour tester le dépôt sans solvant.



Figure 9 : Spectres de masse MALDI-MS de l'analyte de référence : dépôt couche mince avec la THAP (a.), dépôt sans solvant ratio 1:10 (b.), dépôt sans solvant ratio 1:100 (c.).

3.2.3. Les résultats obtenus pour les commutateurs métallocontrôlés

Ce type de molécule s'ionise par protonation. Le pic correspondant au commutateur (représenté sur le spectre de masse) est présent sur tous les spectres et le pic du dimère du commutateur, seulement sur le spectre du commutateur 4 (Figure 10). Les pics non annotés correspondent à des clusters de matrice.





Figure 10 : Spectres de masse MALDI-MS des commutateurs 1 à 4 analysés avec le dépôt sans solvant (matrice : THAP, ratio analyte/matrice = 1:10).

3.2.4. Conclusions

La méthode de dépôt sans solvant s'est avérée très efficace pour l'analyse d'édifice de synthèses insolubles. Les paramètres à optimiser sont, comme dans le cas d'un dépôt classique, la matrice mais surtout le ratio analyte/matrice. Une calibration particulière est également nécessaire : le calibrant doit pouvoir être analysé dans les mêmes conditions de préparation que l'analyte. Nous avons donc choisi des polyéthylènes glycols.

Des structures variées ont ainsi pu être caractérisées sans ambiguïté. Grâce à cette méthode de dépôt originale, la technique MALDI-MS est l'une des rare technique analytique à permettre l'analyse d'un échantillon insoluble.

3.3. DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE PAR MALDI-TOF POUR LA CARACTERISATION D'ARCHITECTURES METALLO-SUPRAMOLECULAIRES DE SYNTHESE.

Les caténanes sont constitués d'au minimum deux macrocycles imbriqués l'un dans l'autre et s'associant en forme de chaîne. Les rotaxanes sont constitués d'une molécule linéaire rigide, appelée « rail », sur laquelle sont enfilés un ou plusieurs macrocycles, appelés « anneaux ». Les macrocycles sont retenus par des « bouchons » placés aux extrémités du rail.

Bien que les caténanes et les rotaxanes soient connus depuis longtemps^{44,45} ce domaine de recherche n'est devenu actif que depuis peu, notamment grâce aux nouvelles propriétés démontrées par ces composés (transfert d'électron, mouvements contrôlés...). Ils pourraient notamment conduire à la synthèse de machines moléculaires⁴⁶ utilisables en solution pour catalyser des réactions ou changer des conformations de substrats. Ces machines moléculaires sont des systèmes capables de subir des mouvements de grande amplitude sous l'action d'un signal externe, qu'il soit chimique, électrochimique ou photochimique. Plusieurs exemples spectaculaires ont déjà été reportés, comme les « ascenseurs » moléculaires⁴⁷ ou « muscles » moléculaires, capable de s'étirer et de se contracter^{48,49}.

La stratégie la plus efficace pour synthétiser de tels composés est basée sur des méthodes « template »⁵⁰. L'utilisation d'un ion métallique, comme l'ion cuivre I, permet d'assembler deux fragments organiques autour de l'ion avant de les incorporer sur le squelette de caténane voulu.

Ces architectures supramoléculaires sont composées d'un grand nombre d'atomes de carbone et d'hydrogène, rendant les spectres RMN très complexes. C'est pourquoi l'analyse par spectrométrie de masse s'avère être une alternative intéressante.

L'analyse de ce type d'édifice est traditionnellement réalisée par ESI-MS. Cependant, ces architectures supramoléculaires sont généralement solubles dans des solvants tels que le dichlorométhane ou le chloroforme. Ces solvants sont particulièrement délicats à utiliser lors d'une analyse par ESI-MS car ils génèrent un spray très peu stable. Afin d'améliorer la stabilité du spray, les analytes sont souvent dilués dans un solvant plus adapté à l'ionisation électrospray (comme l'acétonitrile ou le méthanol) après avoir été solubilisé dans leur solvant d'origine. Cette opération n'est pourtant pas sans incidence sur l'analyte et peut parfois déstabiliser l'architecture supramoléculaire étudiée.

Ces difficultés associées aux résultats concluants obtenus par MALDI-MS sur les grilles neutres précédemment citées nous ont conduits à évaluer cette même approche sur certains rotaxanes et caténanes. En effet, certaines contraintes sont les mêmes : ces molécules possèdent à certains stades de leur formation des métaux et donc des liaisons non-covalentes, susceptibles de se dissocier lors de l'analyse par MALDI-MS.

Ce projet a été réalisé en collaboration avec Julien Frey et Maryline Beyler du Laboratoire de Chimie Organo-Minérale (dirigé par Jean-Pierre Sauvage, UMR 7177, Strasbourg). De nombreux complexes, constitués d'anneaux et de rails variés, ayant été analysés dans le cadre de cette collaboration, seuls ceux ayant abouti à une publication seront exposés ici.

3.3.1. L'optimisation des paramètres instrumentaux du MALDI-TOF pour la caractérisation d'édifices non-covalents solubles dans des solvants volatils

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est couramment utilisée pour la caractérisation de complexes biologiques de haut poids moléculaire, comme l'aerolysine (335kDa), la catalase de foie de bovin (235kDa) ou l'alcool déshydrogénase de levure (147kDa)⁵¹. L'analyse par MALDI-TOF d'édifices non-covalents de synthèse de m/z supérieur à 4000 est donc envisageable, sous réserve d'optimiser les paramètres instrumentaux. Ces édifices non-covalents sont en effet fragiles et ont des facteurs de réponse assez faibles. Nous expliquons donc ici la démarche d'optimisation des paramètres instrumentaux de l'Autoflex II TOF TOF (Bruker Daltonics) dans le but de maximiser la transmission des ions de m/z supérieur à 4000 jusqu'au détecteur.

La cible, sur laquelle l'analyte co-cristallisé avec la matrice est déposé, est fixée sur une première lentille, appelée « IS1 ». Les ions formés lors de la désorption/ionisation MALDI traversent une deuxième lentille, appelée « IS2 » qui correspond également à la lentille DE (Delayed Extraction), avant d'entrer dans l'analyseur (Figure 11).



Figure 11 : Illustration schématique de la source de l'Autoflex II TOF TOF.

3.3.1.1. L'optimisation de la différence de potentiel IS1/IS2

Les ions formés par les processus de désorption/ionisation MALDI sont accélérés grâce à la différence de potentiel entre l'IS1 et l'IS2. Les ions les plus lourds possèdent une plus grande inertie : la différence de potentiel entre l'IS1 et l'IS2 doit donc être plus grande pour les accélérer efficacement. En général, c'est la valeur de potentiel de l'IS2 qui est modifiée. Néanmoins, si le potentiel de l'IS2 est trop bas, les ions sont tellement accélérés que l'étape de refocalisation des ions lors de l'extraction retardée n'est plus efficace et entraîne une perte de résolution. Un compromis doit donc être trouvé entre une différence de potentiel suffisante pour accélérer les ions lourds et une résolution satisfaisante. Pour cette étude, IS1 est fixée à 19kV et IS2 à 16,3kV.

3.3.1.2. L'optimisation de l'extraction retardée

L'extraction retardée réduit la dispersion spatiale et temporelle des ions dans l'analyseur et améliore ainsi la résolution : la lentille IS2 est portée à une tension très légèrement supérieure à la tension de la lentille IS1 pendant un bref délai (quelques centaines de nanosecondes), s'opposant ainsi à la progression des ions dans l'analyseur. Les ions se placent sur « une ligne de départ » et pénètrent donc simultanément dans le tube de vol.

Le délai pendant lequel la tension de la lentille IS2 est augmentée doit être adapté à la gamme de masse des ions analysés : plus les ions sont lourds, plus le temps qui leur est nécessaire pour arriver jusqu'à la lentille IS2 est grand. Le « delayed extraction » doit donc être prolongé afin que la refocalisation des ions soit efficace. Pour cette étude, le delayed extraction est fixé à 180ns.

3.3.1.3. L'optimisation de la puissance laser

La puissance laser nécessaire pour assurer le processus de désorption/ionisation MALDI est dépendante notamment de la matrice, du type de dépôt et de l'analyte étudié. Dans le cadre de cette étude, la même matrice et le même type de dépôt sont utilisés pour tous les analytes. L'irradiance laser optimale dépend donc surtout de l'analyte étudié.

Lors du processus de désorption/ionisation MALDI, l'analyte est protégé des effets destructeurs du faisceau laser grâce à la grande quantité de matrice avec laquelle il est cocristallisé. La matrice absorbe en effet à la longueur d'onde du laser et est préférentiellement excitée, favorisant le transfert dans la phase gazeuse de l'analyte intact. Toutefois, lorsque la puissance laser augmente, la quantité d'énergie absorbée par l'analyte augmente également, provoquant à terme sa fragmentation. Un compromis doit donc être trouvé entre une puissance laser suffisamment élevée pour assurer le processus de désorption/ionisation MALDI de l'analyte et une puissance laser suffisamment faible pour éviter sa fragmentation.

Il est généralement conseillé de travailler au seuil de désorption laser, c'est-à-dire à la puissance laser la plus basse permettant de désorber l'analyte.

3.3.1.4. L'optimisation du gain

Le facteur de réponse des édifices non-covalents étant souvent faible, il est possible d'augmenter le gain du détecteur pour améliorer leur observation. Par contre, si l'augmentation du gain du détecteur intensifie le signal des ions analysés, il en va de même pour le bruit de fond : le rapport signal/bruit n'est pas amélioré et peut même être dégradé. Par ailleurs, un gain trop élevé, sature le détecteur et l'endommage. Le gain a donc été augmenté à 10 pour améliorer la sensibilité.

3.3.2. Les pseudorotaxanes cycliques

Ces pseudorotaxanes sont composés de deux doubles macrocycles en forme de menotte (A) et de deux rails (R) (Figures 12 et 13).



Figure 12 : Principe de la formation du [2]pseudorotaxane cyclique⁵².



Figure 13 : Formule développée du [2]pseudorotaxane cyclique⁵².

Les conditions de préparation de l'échantillon de ces pseudorotaxanes cycliques sont celles utilisées pour l'analyse des grilles : les échantillons sont tout d'abord dissous à 10⁻³M dans leur solvant (dichlorométhane ou chloroforme), puis déposés selon la méthode couche mince avec la matrice THAP. Les paramètres instrumentaux ont été optimisés pour la détection d'édifices non-covalents de haut poids moléculaire.

Le spectre de masse MALDI-MS du [2]pseudorotaxane cyclique⁵² présente différents pics en plus de celui correspondant au [2]pseudorotaxane cyclique attendu (Figure 14). Ces pics correspondent à l'anneau A seul ou à l'association d'un anneau A avec un ou deux rails R. La charge unique de ces pics est obtenue suite à des réactions d'oxydoréduction. Deux pics

sont caractéristiques du [2]pseudorotaxane cyclique : le premier correspond au [2]pseudorotaxane cyclique ayant perdu un contre-anion PF_6^- et le deuxième à la perte de deux contre-anions PF_6^- .

Malgré la présence de pics supplémentaires, le [2]pseudorotaxane cyclique a été caractérisé sans ambiguïté par MALDI-MS. Ces pics supplémentaires peuvent soit être des produits secondaires de la synthèse, soit provenir de fragmentations du [2]pseudorotaxane cyclique lors de l'analyse par MALDI-MS.



Figure 14 : Spectre de masse MALDI-MS en mode positif du [2]pseudorotaxane cyclique à 10⁻³M dans le dans le dichlorométhane (matrice : THAP, dépôt couche mince). A correspond au double macrocycle, R au rail et M au [2]pseudorotaxane cyclique.

Ce [2]pseudorotaxane cyclique est le précurseur d'un caténane : les fonctions terminales (des oléfines) des deux rails du [2]pseudorotaxane cyclique permettent de former le caténane par « ring-closing metathesis » (RCM)^{53,54} (Figure 15). Dans ce but, la structure chimique des rails du [2]pseudorotaxane a été conçu avec le plus grand soin : leur longueur est suffisante pour que deux rails puissent s'associer une fois que le précurseur est formé mais trop courte pour permettre la cyclisation entre deux fonctions terminales situées sur le même rail.



Figure 15 : Formation présumée du caténane⁵².

Sur le spectre de masse MALDI-MS du caténane, les pics correspondants aux caténanes sont majoritaires : le caténane est observé après la perte d'un contre-anion PF_6^- ou de deux contre-anions PF_6^- et après la perte d'un ion cuivre et de deux contre-anions (Figure 16). D'autres pics moins intenses sont également détectés. Il correspondent aux espèces composées d'un anneau A et d'un rail R associés à un ou deux ions cuivre.



Figure 16 : Spectre de masse MALDI-MS en mode positif du caténane à 10⁻³M dans le dans le dichlorométhane (matrice : THAP, dépôt couche mince). A correspond au double macrocycle, R au rail et M au caténane.

3.3.3. Les « presses moléculaires »

Lorsque le rotaxane n'est pas complexé avec des ions cuivre, les anneaux bougent librement le long du rail (qui est nécessairement rigide). Par conséquent, la distance entre les deux porphyrines fluctue, permettant au rotaxane d'agir comme un récepteur dont la géométrie s'adapte à la taille du substrat.

Par contre, lorsque le rotaxane est complexé avec des ions cuivre, les anneaux sont fixes et la distance entre les porphyrines est contrôlée. Ce système peut alors devenir un « compresseur » : la distance entre les deux porphyrines peut être fortement réduite, entrainant la compression du substrat piégé (si celui-ci est relativement long), et, si les tensions stériques deviennent trop fortes, entraînant son expulsion du rotaxane (Figure 17).



Figure 17 : (a) Représentation schématique du rotaxane complexé avec deux ions cuivre, la distance entre les deux porphyrines est imposée. (b) Représentation schématique du rotaxane s'adaptant à la géométrie du substrat⁵⁵.

Nous nous sommes orientés également vers une approche MALDI-MS pour l'analyse de ces deux rotaxanes. En effet, ces édifices sont solubles dans le dichlorométhane, un solvant volatil qui génère souvent un spray peu stable lors du processus électrospray. Les conditions de préparation de l'échantillon de ces rotaxanes sont celles utilisées pour l'analyse des grilles : les échantillons sont tout d'abord dissous à 10⁻³M dans leur solvant (dichlorométhane ou chloroforme), puis déposés selon la méthode couche mince avec le matrice THAP. Les paramètres instrumentaux ont été optimisés pour la détection d'édifices non-covalents de haut poids moléculaire.

Sur les spectres de masse du rotaxane et du rotaxane complexé avec deux ions cuivre, le pic correspondant au rotaxane d'intérêt est détecté (Figures 18 et 19). Le rotaxane complexé avec deux ions cuivre s'ionise par perte d'un ou de deux contre-anions PF_6^- alors que le rotaxane s'ionise par protonation. Néanmoins, dans les deux cas, les spectres de masse présentent toujours un massif correspondant à l'anneau A protoné seul.



Figure 18 : Spectre de masse MALDI-MS en mode positif du rotaxane complexé aux ions cuivre à 10⁻³M dans le dans le dichlorométhane (matrice : THAP, dépôt couche mince). A correspond au macrocycle et M au rotaxane.



Figure 19 : Spectre de masse MALDI-MS en mode positif du rotaxane démétallé à 10⁻³M dans le dichlorométhane (matrice : THAP, dépôt couche mince). A correspond au macrocycle et M au rotaxane.

3.3.4. Conclusions

La méthode reine pour l'analyse de rotaxanes ou de caténanes reste actuellement l'ESI-MS. Mais les résultats concluants obtenus lors la caractérisation des grilles neutres par MALDI-MS nous ont conduit à évaluer cette approche dans le cas d'édifices non-covalents délicats à analyser par ESI-MS. En effet, l'ionisation électrospray des édifices solubles dans des solvants très volatils, comme le dichlorométhane ou le chloroforme, génère souvent des sprays très peu stables. Cependant, l'ionisation MALDI est plus énergétique que l'ionisation électrospray et les spectres MALDI-MS présentent souvent, en plus du massif de l'édifice analysé, des massifs correspondants à des fragments de l'édifice (anneau seul ou associé à un ou deux rails dans le cas de rotaxanes ou de caténanes). Les rotaxanes et les caténanes ont tout de même été caractérisés avec succès par MALDI-MS. Par ailleurs, l'absence de contamination entre échantillons, la facilité de standardisation et sa rapidité, font du MALDI-MS une technique avantageuse pour l'analyse en routine de ce type d'édifice.

3.4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3

Même si l'ESI-MS reste la technique de choix en spectrométrie de masse pour l'analyse d'édifices non-covalents de synthèse, certaines conditions expérimentales ne favorisent pas son utilisation. C'est le cas notamment i) des grilles neutres, impossible à ioniser en solution sans les dissocier, ii) des commutateurs insolubles et iii) des caténanes ou des rotaxanes solubles dans des solvants très volatils comme le dichlorométhane ou le chloroforme, générant un spray ESI peu stable.

Nous avons alors cherché à mettre au point une approche alternative pour l'analyse de ces types d'édifices. Dans l'objectif de développer un protocole de routine, nous avons choisi la technique MALDI-MS : en effet, l'absence de contamination entre échantillons, la facilité de standardisation et d'automatisation, sa sensibilité, sa robustesse et sa rapidité, font du MALDI-MS une technique avantageuse pour l'analyse en routine.

Notre approche s'est révélée être bien adaptée pour l'analyse de grilles neutres. La mise au point d'un protocole utilisant la THAP comme matrice, la méthode de dépôt couche mince et un faible nombre de tirs laser sur une même position a en effet permis de caractériser avec succès 24 grilles neutres formées à partir de ligands et de cations métalliques variés.

De même, les commutateurs insolubles ont pu être caractérisés sans ambiguïté grâce à une méthode originale de dépôt : le dépôt sans solvant. Cette méthode réalisée avec la THAP comme matrice à un ratio analyte/matrice de 1:10, a permis d'analyser différentes structures de commutateurs.

La technique MALDI-MS est donc une alternative avantageuse à l'ESI-MS pour l'analyse de grilles neutres ou de commutateurs insolubles.

Par contre, bien que les caténanes et les rotaxanes, solubles dans des solvants très volatils comme le dichlorométhane ou le chloroforme, soient clairement identifiés lors d'une analyse MALDI-MS, des fragments sont toujours présents sur les spectres de masse. Ces fragments rendent difficile la vérification de la pureté de l'échantillon. Pour ce type d'étude, la source cryospray, une source ESI permettant de réaliser les analyses à des températures comprises entre -180°C et +100°C (par comparaison avec une source classique : entre +100°C et +250°C), semble être alors une nouvelle alternative intéressante. Cette source sera prochainement installée au laboratoire.

REFERENCES

1. Potier, N.; Barth, P.; Tritsch, D.; Biellmann, J. F.; VanDorsselaer, A., Study of noncovalent enzyme-inhibitor complexes of aldose reductase by electrospray mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* **1997**, *243* (1-2), 274-282.

2. Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F., Comparative ESI-MS study of similar to 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* (5), 419-429.

3. Loo, J. A., Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16* (1), 1-23.

4. Heck, A. J. R.; van den Heuvel, R. H. H., Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, *23* (5), 368-389.

5. Cheng, X. H.; Gao, Q. Y.; Smith, R. D.; Simanek, E. E.; Mammen, M.; Whitesides, G. M., Characterization of hydrogen-bonded aggregates in chloroform by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (6), 2204-2206.

6. Schalley, C. A., Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *194* (1), 11-39.

7. Solladie, N.; Walther, M. E.; Herschbach, H.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Duarte, T. M. F.; Nierenoarten, J. F., Supramolecular complexes obtained from porphyrin-crown ether conjugates and a fullerene derivative bearing an ammonium unit. *Tetrahedron* **2006**, *62* (9), 1979-1987.

8. Miras, H. N.; Wilson, E. F.; Cronin, L., Unravelling the complexities of inorganic and supramolecular self-assembly in solution with electrospray and cryospray mass spectrometry. *Chemical Communications* **2009**, (11), 1297-1311.

9. Lehn, J.-M., Supramolecular Chemistry – Concepts and Perspectives. *VCH, Weinheim* **1995**.

10. Albrecht, M., "Let's twist again" - Double-stranded, triple-stranded, and circular helicates. *Chemical Reviews* **2001**, *101* (11), 3457-3497.

11. Seidel, S. R.; Stang, P. J., High-symmetry coordination cages via self-assembly. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35* (11), 972-983.

12. Faiz, J. A.; Heitz, V.; Sauvage, J. P., Design and synthesis of porphyrin-containing catenanes and rotaxanes. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (2), 422-442.

13. Ruben, M.; Rojo, J.; Romero-Salguero, F. J.; L. H. Uppadine, L. H.; Lehn, J.-M., Grid-Type Metal Ion Architectures: Functional Metallosupramolecular Arrays. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2004**, *43*, 3644-3662.

14. Ramirez, J.; Stadler, A. M.; Harrowfield, J. M.; Brelot, L.; Huuskonen, J.; Rissanen, K.; Allouche, L.; Lehn, J. M., Coordination architectures of large heavy metal cations (Hg2+ and Pb2+) with bis-tridentate ligands: Solution and solid-state studies. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie* **2007**, *633*, 2435-2444.

15. Manzano, B. R.; Jalaton, F. A.; Ortiz, I. M.; Soriano, M. L.; De la Torre, F. G.; Elguero, J.; Maestro, M. A.; Mereiter, K.; Claridge, T. D. W., Self-assembly of ligands designed for the building of a new type of 2 x 2 metallic grid. Anion encapsulation and diffusion NMR spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47* (2), 413-428.

16. Cao, X. Y.; Harrowfield, J.; Nitschke, J.; Ramirez, J.; Stadler, A. M.; Kyritsakas-Gruber, N.; Madalan, A.; Rissanen, K.; Russo, L.; Vaughan, G.; Lehn, J. M., Generation of 2X2 grid metallosupramolecular architectures from preformed ditopic bis(acylhydrazone) ligands and through component self-assembly. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 2944-2965.

17. Nierengarten, H.; Leize, E.; Breuning, E.; Garcia, A.; Romero-Salguero, F.; Rojo, J.; Lehn, J. M.; Van Dorsselaer, A., Characterization of multimetallic grid-type complexes by electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37* (1), 56-62.

18. Ruben, M.; Lehn, J. M.; Vaughanc, G., Synthesis of ionisable 2 x 2 grid-type metalloarrays and reversible protonic modulation of the optical properties of the (Co4L4)-L-II (8+) species. *Chemical Communications* **2003**, (12), 1338-1339.

19. Uppadine, L. H.; Gisselbrecht, J. P.; Lehn, J. M., Protonic modulation of redox properties in ionisable 2x2 grid-like metalloarrays. *Chemical Communications* **2004**, (6), 718-719.

20. Calba, P. J.; Muller, J. F.; Inouye, M., H-atom transfer following analyte photoionization in matrix-assisted laser desorption/ionization processes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12* (22), 1727-1731.

21. Nuutinen, J. M. J.; Purmonen, M.; Ratilainen, J.; Rissanen, K.; Vainiotalo, P., Mass spectrometric studies on pyridine-piperazine-containing ligands and their complexes with transition metals formed in solution. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15* (15), 1374-1381.

22. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (20), 2299-2301.

23. Timmerman, P.; Jolliffe, K. A.; Calama, M. C.; Weidmann, J. L.; Prins, L. J.; Cardullo, F.; Snellink-Ruel, B. H. M.; Fokkens, R. H.; Nibbering, N. M. M.; Shinkai, S.; Reinhoudt, D. N., Ag+ labeling: A convenient new tool for the characterization of hydrogen-bonded supramolecular assemblies by MALDI-TOF mass spectrometry. *Chemistry-a European Journal* **2000**, *6* (22), 4104-4115.

24. Jahier, C.; Nlate, S., Dendritic polyallyl and polyferrocenyl bipyridine ligands: Synthesis, MALDI-TOF characterization and ruthenium(II) complexation studies. *Journal of Organometallic Chemistry* **2009**, *694* (5), *637-642*.

25. Schubert, U. S.; Eschbaumer, C., Characterization of metallo-supramolecular systems by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* **1999**, *35*, 101-109.

26. Choi, S. S.; Lee, H. M.; Jang, S.; Shin, J., Comparison of ionization behaviors of ring and linear carbohydrates in MALDI-TOFMS. *International Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *279* (1), 53-58.

27. Russell, K. C.; Leize, E.; Vandorsselaer, A.; Lehn, J. M., Investigation of selfassembled supramolecular species in solution by IL-ESMS, a new mass-spectrometric technique. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34* (2), 209-213.

28. Zenobi, R.; Knochenmuss, R., Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17* (5), 337-366.

29. Mirza, S. P.; Raju, N. P.; Vairamani, M., Estimation of the proton affinity values of fifteen matrix-assisted laser desorption/ionization matrices under electrospray ionization conditions using the kinetic method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15* (3), 431-435.

30. Cohen, L. R. H.; 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* (10), 1046-1052.

31. Horneffer, V.; Strupat, K.; Hillenkamp, F., Localization of noncovalent complexes in MALDI-preparations by CLSM. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17* (11), 1599-1604.

32. *Molecular Switches*. Wiley-VCH, Weinheim,: 2001.

33. Trimpin, S.; Rouhanipour, A.; Az, R.; Rader, H. J.; Mullen, K., New aspects in matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15* (15), 1364-1373.

34. Trimpin, S.; Deinzer, M. L., Solvent-free MALDI-MS for the analysis of a membrane protein via the mini ball mill approach: Case study of bacteriorhodopsin. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (1), 71-78.
35. Kotsiris, S. G.; Vasil'ev, Y. V.; Streletskii, A. V.; Han, M.; Mark, L. P.; Boltalina, O. V.; Chronakis, N.; Orfanopoulos, M.; Hungerbuhler, H.; Drewello, T., Application and evaluation of solvent-free matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of derivatized fullerenes. *European Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *12* (6), 397-408.

36. Edwards, W. F.; Thies, M. C., Dense-gas fractionation and MALDI characterization of carbonaceous pitches. *Energy & Fuels* **2005**, *19* (3), 984-991.

37. Trimpin, S.; Keune, S.; Rader, H. J.; Mullen, K., Solvent-free MALDI-MS: Developmental improvements in the reliability and the potential of MALDI in the analysis of synthetic polymers and giant organic molecules. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17* (5), 661-671.

38. Trimpin, S.; Deinzer, M. L., Solvent-free MALDI-MS for the analysis of beta-amyloid peptides via the mini-ball mill approach: Qualitative and quantitative advances. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (8), 1533-1543.

39. Hughes, L.; Wyatt, M. F.; Stein, B. K.; Brenton, A. G., Investigation of Solvent-Free MALDI-TOFMS Sample Preparation Methods for the Analysis of Organometallic and Coordination Compounds. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (2), 543-550.

40. Skelton, R.; Dubois, F.; Zenobi, R., A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (7), 1707-1710.

41. Przybilla, L.; Brand, J. D.; Yoshimura, K.; Rader, H. J.; Mullen, K., MALDI-TOF mass spectrometry of insoluble giant polycyclic aromatic hydrocarbons by a new method of sample preparation. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (19), 4591-4597.

42. Hanton, S. D.; Parees, D. M., Extending the solvent-free MALDI sample preparation method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16* (1), 90-93.

43. Marie, A.; Fournier, F.; Tabet, J. C., Characterization of synthetic polymers by MALDI-TOF/MS: Investigation into new methods of sample target preparation and consequence on mass spectrum finger print. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (20), 5106-5114.

44. Schill, G.; Lüttringhaus, A., The Preparation of Catena Compounds by Directed Synthesis. **1964**, *3*, 546-547.

45. Schill, G., Catenanes, Rotaxanes and Knots. *Academic Press, New York and London* **1971**.

46. Special Issue on Molecular Machines. *Accounts of Chememical Research* **2001**, *34*, 409-522.

47. Badjic, J. D.; Balzani, V.; Credi, A.; Silvi, S.; Stoddart, J. F., A molecular elevator. *Science* **2004**, *303* (5665), 1845-1849.

48. Jimenez, M. C.; Dietrich-Buchecker, C.; Sauvage, J. P., Towards synthetic molecular muscles: Contraction and stretching of a linear rotaxane dimer. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39* (18), 3284.

49. Liu, Y.; Flood, A. H.; Bonvallett, P. A.; Vignon, S. A.; Northrop, B. H.; Tseng, H. R.; Jeppesen, J. O.; Huang, T. J.; Brough, B.; Baller, M.; Magonov, S.; Solares, S. D.; Goddard, W. A.; Ho, C. M.; Stoddart, J. F., Linear artificial molecular muscles. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (27), 9745-9759.

50. Dietrichbuchecker, C. O.; Sauvage, J. P.; Kern, J. M., Templated synthesis of interlocked macrocyclic ligands - The catenands. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106* (10), 3043-3045.

51. Moniatte, M.; Lesieur, C.; Vecsey-Semjen, B.; Buckley, J. T.; Pattus, F.; van der Goot, F. G.; Van Dorsselaer, A., Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry in the subunit stoichiometry study of high-mass non-covalent complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *1*69, 179-199.

52. Frey, J.; Tock, C.; Collin, J. P.; Heitz, V.; Sauvage, J. P.; Rissanen, K., Cyclic 2 pseudorotaxane tetramers consisting of two rigid rods threaded through two bis-macrocycles: Copper(I)-templated synthesis and X-ray structure studies. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (33), 11013-11022.

53. Trnka, T. M.; Grubbs, R. H., The development of L2X2Ru = CHR olefin metathesis catalysts: An organometallic success story. *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34* (1), 18-29.

54. Grubbs, R. H., Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45* (23), 3760-3765.

55. Sauvage, J. P.; Collin, J. P.; Durot, S.; Frey, J.; Heitz, V.; Sour, A.; Lock, C., From chemical topology to molecular machines. *Comptes Rendus Chimie* **2010**, *13* (3), 315-328.

Chapitre 4

Développement d'une approche par spectrométrie de masse pour l'étude *in vivo* et *in vitro* de l'ITPP dans le sang

L'objectif de cette étude est double : i) détecter et quantifier une petite molécule dans le sang, un milieu biologique complexe, par MALDI-MS, ii) évaluer les constantes de stabilité relative de trois ligands pour un récepteur protéique, l'hémoglobine, par ESI-MS.

Le myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP) est une molécule récemment identifiée permettant la régulation allostérique de l'affinité de liaison de l'oxygène de l'hémoglobine¹. Ce pyrophosphate permet de diminuer l'affinité de liaison de l'oxygène avec l'hémoglobine et donc d'augmenter la distribution d'oxygène vers les muscles et ainsi d'accroitre leur capacité maximale d'exercice. L'ITPP est par conséquent un candidat très attractif dans le cadre de thérapie pour des patients ayant des capacités d'activité réduites suite à des défaillances cardiaques². Parallèlement, des recherches ont mis en évidence le potentiel de l'ITPP dans la lutte anti-cancer : en favorisant la libération d'oxygène dans les tissus, l'ITPP contribue à la réduction de l'angiogénèse, le processus par lequel la tumeur active la création de nouveaux vaisseaux permettant sa croissance^{3,4}.

Pour mieux comprendre son mécanisme de régulation, nous avons été amenés :

- i) D'une part à développer un protocole d'analyse de l'ITPP dans le sang par MALDI-MS pour comprendre la fixation *in vivo* de l'ITPP sur l'hémoglobine.
- ii) D'autre part à étudier par ESI-MS l'interaction de l'ITPP avec l'hémoglobine pour comprendre la fixation *in vitro* de l'ITPP sur l'hémoglobine.

Ce projet a été réalisé en collaboration avec Carolina Duarte de la Société NormOxys (dirigée par Jean-Marie Lehn et Claude Nicolau, ISIS, Strasbourg).

4.1. DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE POUR L'ANALYSE DE L'ITPP DANS LE SANG PAR MALDI-MS

Le développement de ce premier protocole a deux objectifs :

- La détection de l'ITPP dans le sang de souris et de porcs après injection ou ingestion par l'eau de boisson. Pour cette étude, nous avons notamment cherché à améliorer la sensibilité de détection par MALDI-MS de l'ITPP dans différentes fractions sanguines (le sang entier, le plasma et les globules rouges).
- ii) La quantification par MALDI-MS de l'ITPP dans chaque fraction sanguine afin d'apporter des réponses concernant la fixation *in vivo* de l'ITPP sur l'hémoglobine.

4.1.1. Pourquoi choisir la spectrométrie de masse MALDI ?

Afin de vérifier ces résultats prometteurs, l'ITPP est actuellement testé *in vivo* sur des souris et des porcs. La société NormOxys nous a donc contacté pour mettre au point un protocole d'analyse simple, rapide, réalisable à grande échelle et conforme aux recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) permettant de détecter et quantifier l'ITPP dans le sang des souris et des porcs après injection ou absorption par l'eau de boisson. Plusieurs techniques analytiques ont été envisagées.

La chromatographie d'échange d'ions (CI) tout d'abord a été proposée, étant donné que cette technique est utilisée pour vérifier la pureté de l'ITPP en fin de synthèse. Comme elle est couplée avec un détecteur spécifique à l'ITPP, la CI est très sensible. Par contre, des prétraitements impliquant de l'acide trifluoroacétique et provoquant l'hydrolyse de l'ITPP sont nécessaires. Ces prétraitements engendrent des problèmes de reproductibilité : l'ITPP n'est en effet pas toujours hydrolysé dans les mêmes proportions. De plus, l'analyse d'échantillons sanguins par CI risque de requérir un nombre important de prétraitements supplémentaires, réduisant la facilité de mise en œuvre et la reproductibilité.

L'ESI-MS fut rapidement écarté pour deux raisons principales : i) cette technique est peu tolérante aux sels présents dans les milieux biologiques, ii) il est difficile d'étudier un mélange complexe, comme un échantillon sanguin, par ESI-MS. L'ionisation électrospray génère des ions multichargés qui se superposent généralement dans les basses masses, augmentant le risque d'occulter le massif (ou profil isotopique) de l'ITPP.

Le MALDI-MS en revanche répondait aux exigences requises. Avant toute chose, le MALDI-MS est une technique validée par la FDA. D'autre part, c'est une technique robuste et rapide. Elle est utilisable pour de grandes séries d'échantillons à un coût peu élevé et il n'y a aucun risque de contamination lors des analyses. De plus, elle est sensible et la reproductibilité des résultats est facilement vérifiable par l'analyse d'un grand nombre de dépôts. Comme le projet implique l'analyse de l'ITPP dans le sang, la capacité du MALDI-MS à analyser des milieux biologiques complexes (riches en sels, en petites molécules organiques, en protéines, …) et la simplicité des spectres de masse obtenus (son mode d'ionisation générant des ions monochargés) sont également des atouts non négligeables.

4.1.2. La mise au point du protocole pour la détection de l'ITPP dans le sang par MALDI-MS

4.1.2.1. Les difficultés inhérentes à la détection de l'ITPP dans le sang

La détection de l'ITPP dans le sang par MALDI-MS est loin d'être triviale au premier abord. Deux difficultés majeures rendent cette analyse délicate :

4.1.2.1.1. La nature de l'ITPP

L'ITPP est une molécule polyanionique (Figure 1), donc associée à plusieurs contre-cations. Le sel d'ITPP le plus efficace comme régulateur allostérique de l'hémoglobine est le sel de sodium¹, mais pour être compatible avec un traitement médical et éviter la décalcification des cellules, un ion calcium lui est également associé. Nous avons ainsi réalisé cette étude sur le sel de monocalcium-tetrasodium de l'ITPP (ITPP CaNa₄). Par conséquent, le spectre de masse de ce sel d'ITPP présente de nombreux adduits de cations (Figure 2), diminuant considérablement la sensibilité de l'analyse.



Figure 1 : Formule développée de la myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP).



Figure 2 : Spectre MALDI-MS de l'ITPP Na₆ à 10^{-3} M dans l'eau (matrice : THAP, dépôt couche mince, mode négatif). Les pics non annotés correspondent à des clusters de matrice.

De plus, l'ITPP est une molécule de poids moléculaire relativement faible (masse exacte de l'ITPP H_6 : 605.83Da). Le rapport m/z de l'ion généré par désorption/ionisation MALDI est proche des rapports m/z des clusters de matrice, ce qui pose des problèmes de sélectivité.

4.1.2.1.2. Le sang : un milieu complexe

Aux difficultés résultant de la nature de l'ITPP, s'ajoutent les problèmes engendrés par le milieu d'analyse : le sang. La caractérisation d'un analyte dans un milieu biologique complexe est un véritable défi quelque soit la technique analytique utilisée. Les nombreuses autres biomolécules et les sels présents dans le sang risquent d'interférer avec l'analyte, souvent en faible concentration.

L'analyse du sang est a priori difficile tel quel. Mais pour garder un protocole de préparation le plus simple et le plus reproductible possible, il est nécessaire de réduire au maximum les prétraitements avant analyse.

4.1.2.2. La préparation de l'échantillon

Pour améliorer la sensibilité de détection de l'ITPP dans les différentes fractions sanguines, le protocole de préparation de l'échantillon doit permettre l'observation par MALDI-MS d'un unique massif spécifique de l'ITPP. Tout en cherchant à réduire au maximum les prétraitements, l'optimisation de ce protocole s'est axée autour des points suivants :

4.1.2.2.1. L'échantillon sanguin

L'ITPP doit non seulement être détecté dans le sang mais également dans le plasma et les globules rouges. Le sang entier utilisé pour cette étude est prélevé sur des donneurs sains peu de temps avant l'analyse et fractionné selon la procédure suivante : le sang entier est centrifugé à 1500 tpm (tour par minute) pendant 5 minutes ; le surnageant, correspondant au plasma, est siphonné et réservé dans un tube séparé ; le culot, correspondant aux globules rouges, est lavé trois fois avec une solution de chlorure de sodium à 0.9% (5 minutes de centrifugation à 1500 tpm) et les globules rouges sont resuspendus dans une solution de chlorure de sodium à 0.9%. La détection de l'ITPP dans chacune de ces fractions sanguines apportera des informations sur son devenir dans l'organisme.

Les échantillons sanguins sont relativement épais comparés aux solutions généralement analysées par MALDI-MS. Le processus de désorption/ionisation MALDI sur les échantillons tels quels n'est pas efficace et conduit à des spectres de masse où seul le bruit de fond est visible. Une étape de dilution est donc nécessaire. Mais pour garder une sensibilité la plus grande possible, nous avons effectué plusieurs tests pour trouver la dilution minimum (dilution x10) permettant l'observation de l'ITPP par MALDI-MS.

4.1.2.2.2. La cible MALDI

Nous avons tenté d'utiliser des cibles possédant des propriétés particulières susceptibles d'améliorer la détection :

La cible NALDI (Nanotechnology-assisted laser desorption/ionization) (Bruker) : la surface de ce support est en silicium nanostructuré. Ce type de plaque, qui ne nécessite aucune matrice, a été développé pour l'analyse de petites molécules, comme des drogues, des pesticides ou de petits peptides. Cependant, la surface de la plaque étant hydrophobe, il est conseillé de réaliser les dépôts dans des solvants organiques. Par ailleurs, ce type de cible n'est pas forcément optimisé pour l'analyse de faibles concentrations.

L'analyse de l'ITPP sur une cible NALDI n'a de toute façon aboutit à aucun résultat exploitable.

La cible AnchorChip⁵ (Bruker) : ces cibles sont recouvertes d'un revêtement hydrophobe à base de téflon sur lequel se répartissent des sites hydrophiles appelés « ancres ». Ces ancres permettent de concentrer l'analyte sur une très petite surface et d'augmenter ainsi la quantité d'ions désorbés au cours du tir laser. La sensibilité est significativement accrue et la reproductibilité est améliorée.

Cependant dans notre cas, les échantillons sanguins sont trop complexes : beaucoup de constituants du sang sont concentrés en même temps que l'ITPP donc aucun apport significatif à la sensibilité de détection de l'ITPP n'est observable.

En ayant le même objectif que lors de l'utilisation de la cible AnchorChip, c'est-à-dire concentrer l'ITPP avant analyse, nous avons également testé des billes IMAC fer (Immobilized metal affinity chromatography). L'échantillon est laissé en contact des billes le temps que les molécules d'intérêt se fixent au métal puis, un solvant d'élution est utilisé pour les récupérer. Cette technique, particulièrement efficace avec les phosphates, n'a donné aucun résultat concluant avec notre pyrophosphate, l'ITPP. La complexité de l'échantillon sanguin est à mettre en cause : de nombreuses molécules autres que l'ITPP se fixent également sur ces billes.

Nous avons donc poursuivi le développement du protocole sur une cible MALDI classique en acier inoxydable.

4.1.2.2.3. La matrice et le type de dépôt

La matrice devait répondre à plusieurs critères : i) elle devait résister à l'étape de lavage, ii) aucun pic correspondant à un cluster de matrice ne devait être observé dans la fenêtre de détection de l'ITPP.

Un lavage consiste à appliquer temporairement une goutte d'eau acidifiée sur le dépôt MALDI. Cette étape est très utile pour élimer les sels présents dans la matrice et/ou dans l'échantillon. Par contre, la matrice 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), soluble dans l'eau, ne peut être utilisée, le lavage entrainant la redissolution du dépôt. D'autres matrices également solubles dans l'eau ont donc été écartées.

Le processus de désorption/ionisation MALDI génère des clusters de matrices, dont les rapports m/z se situent généralement en dessous de 700. Or comme son poids moléculaire est relativement faible (masse exacte : 605.83Da), le massif correspondant à l'ITPP est

observé parmi les massifs de clusters de matrice. Ceci pose problème surtout pour des faibles concentrations d'ITPP, lorsque les massifs de clusters de matrices deviennent plus intenses que le massif de l'ITPP (Figure 3). Les matrices telles que l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) ou la Trihydroxyacétophenone (THAP), présentant des adduits respectivement à 604.02Da et 605.13Da, ont donc été exclues (Figures 3 et 4).

Une des matrices répondant donc à ces deux critères est l'acide 3-hydroxypyridine-2carboxilique (3-HPA). La solution de matrice doit être préparée peu de temps avant son utilisation, pour éviter sa dégradation, dans les proportions suivantes : 8mg de 3-HPA sont dissous dans un mélange constitué de 50µL de citrate d'ammonium à 50mg/mL et de 50µL d'acétonitrile. Comme la matrice est solubilisée dans un solvant aqueux, nous avons réalisé un dépôt goutte séché, bien que le lavage soit moins efficace pour ce type de dépôt.



Figure 3 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ dans l'eau en mode négatif à 10⁻⁵M (a.), 10⁻⁶M (b.) et 10⁻⁷M (c.) - matrice : THAP. L'adduit de la matrice à 605.1Da pose problème pour les faibles concentrations d'ITPP.



Figure 4 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ à 10⁻³M dans l'eau en mode négatif - matrice : HCCA. L'adduit de la matrice à 604.0Da est déjà intense pour des fortes concentrations d'ITPP.

Afin de standardiser le plus possible notre protocole, nous avons étudié l'influence de l'hygrométrie sur la cristallisation du dépôt. Trois pourcentages d'humidité ont été testés :

- 30% d'humidité : la cristallisation des dépôts a été réalisée dans l'enceinte d'un dessiccateur contenant des cristaux de chlorure de cobalt ;
- 60% d'humidité : la cristallisation des dépôts a été réalisée à l'air ambiant ;
- 90% d'humidité : la cristallisation des dépôts a été réalisée dans l'enceinte d'un dessiccateur contenant un cristallisoir rempli d'eau.

Les spectres de masse obtenus à 30% et 60% d'humidité sont similaires, par contre la sensibilité diminue significativement à 90% d'humidité (Figure 5). Cette détérioration s'explique par une cristallisation plus lente donc la formation de cristaux de matrice plus gros. Le lavage est alors moins efficace et l'irrégularité de la surface du dépôt entraîne une diminution de la résolution et de la sensibilité. Nous avons confirmé que l'hygrométrie, et donc le temps de cristallisation d'un dépôt, influence sensiblement la qualité des spectres de masse. Bien que les hygrométries testées soient très différentes les unes des autres, des observations empiriques nous font penser que de plus faibles écarts influencent également la qualité des résultats. Par conséquent, la préparation des échantillons suivants sera toujours réalisée dans une pièce climatisée.



Figure 5 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ à 10⁴M dans le sang en mode négatif (matrice : 3-HPA, dépôt goutte séchée) - taux d'humidité de 30% (a.), 60% (b.) et
90% (c.). L'intensité des pics de petites molécules présentes dans le sang (*) ne varie pas et permet donc de voir l'évolution de l'intensité des pics de l'ITPP.

4.1.2.2.4. La première étape de désalinisation : le passage sur résine échangeuse d'ions

Bien que l'ITPP soit détecté dans le sang sans prétraitement, le passage de l'échantillon sanguin sur une résine sulfonate échangeuse d'ions (DISCOVERY DSC-SCX 50mg de phase, 1 ml, Supelco) (Figure 6) améliore nettement la qualité du spectre de masse (Figure 7). Nous supposons que cette étape, en plus de retenir les cations et les sels, élimine de petites molécules contenues dans le sang, qui interfèrent potentiellement avec l'analyse de l'ITPP.



Figure 6 : Le dispositif de résine échangeuse d'ions. L'échantillon est poussé à travers la résine à l'aide d'une seringue.



Figure 7 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ à 10⁻⁴M dans le sang en mode négatif (matrice : 3-HPA, dépôt goutte séchée) sans passage sur la résine échangeuse d'ions (a.) ou avec passage sur la résine échangeuse d'ions b.). Les pics de petites molécules présentes dans le sang (*) sont moins nombreux et moins intenses après le passage sur résine échangeuse d'ions.

4.1.2.2.5. La deuxième étape de désalinisation : le lavage du dépôt

Le lavage est une technique classique pour l'analyse par MALDI-MS des peptides. Cette étape élimine les sels (Na⁺, K⁺, Cl⁻....) ou les détergents présents dans la matrice et/ou dans l'échantillon et susceptibles de s'associer avec l'analyte. Nous avons adapté cette technique à l'analyse de l'ITPP dans le but d'éliminer les cations sodium et calcium qui lui sont associés ainsi que les sels présents dans le sang.

Lors du lavage, une goutte d'eau acidifiée est appliquée temporairement sur le dépôt. La solution de lavage, généralement acidifiée avec de l'acide formique, doit être froide avant son application : ceci réduit la redissolution de la matrice et de l'analyte. Deux paramètres sont à optimiser :

- Le pourcentage d'acide ajouté : l'acide favorise l'échange des cations sodium et calcium par des protons.
- Le temps de contact entre la solution de lavage et le dépôt : l'ITPP est très polaire et se dissout facilement dans l'eau. Un temps de contact trop long entraîne la disparition progressive du signal de l'ITPP sur les spectres de masse (Figure 8). La durée de contact avec la solution de lavage est un compromis entre une durée suffisamment

longue favorisant l'échange d'un maximum de cations et une durée suffisamment courte évitant la redissolution de l'ITPP.



Figure 8 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ à 10⁴M dans le sang en mode négatif (matrice : 3-HPA, dépôt goutte séchée) - temps de lavage de 4 secondes (a.), 8 secondes (b.) et 12 secondes (c.). L'intensité des pics de petites molécules présentes dans le sang (*) ne varie pas et permet donc de voir l'évolution de l'intensité des pics de l'ITPP.

Différents tests nous ont conduits à choisir les paramètres suivant : i) le lavage est réalisé avec une solution aqueuse acidifiée avec 5% d'acide formique, ii) le temps de contact avec le dépôt est optimal entre 4 et 6 secondes.

Cette étape de lavage est indispensable : sans lavage, le bruit de fond est trop important pour identifier l'ITPP sans ambiguïté. De plus, si le lavage n'est pas correctement optimisé, les cations ne sont pas tous éliminés et les adduits de sodium sont présents sur le spectre de masse (Figure 9). Le lavage réalisé avec les paramètres définis précédemment (solution aqueuse acidifiée avec 5% d'acide formique et temps de contact avec le dépôt entre 4 et 6 secondes) permet d'éliminer en grande partie les cations. Un seul massif correspondant à l'ITPP est alors observé. Par ailleurs, cette technique améliore considérablement le rapport signal sur bruit et la résolution du spectre de masse ainsi que la reproductibilité des résultats.

À l'issue du lavage, le dépôt présente une couronne blanche et un centre sombre (Figure 10). Un phénomène de migration des espèces et des sels doit avoir lieu lors de l'étage de lavage, provoquant une ségrégation des espèces dans le dépôt. Pour que le spectre de masse soit représentatif de l'échantillon, un grand nombre de tirs répartis de façon statistique sur tout le dépôt doit donc être effectué, afin de compenser cette inhomogénéité.



Figure 9 : Spectre de masse de l'ITPP Na₆ à 10³M dans l'eau en mode négatif (matrice : THAP, dépôt couche mince, mode négatif) - temps de lavage trop court (a.), lavage optimisé (b.). Les pics non annotés correspondent à des clusters de matrice.



Figure 10 : Dépôt d'ITPP CaNa₄ à 10⁻⁵M dans le sang (matrice : 3-HPA, dépôt goutte séchée).

4.1.2.3. L'optimisation des paramètres instrumentaux

La transmission optimale des ions de faible poids moléculaire jusqu'au détecteur nécessite une adaptation des paramètres instrumentaux. Nous expliquons ici la démarche d'optimisation de ces paramètres pour l'Autoflex II TOF TOF (Bruker Daltonics).

La cible, sur laquelle l'analyte co-cristallisé avec la matrice est déposé, est fixé sur une première lentille, appelée « IS1 ». Les ions formés lors de la désorption/ionisation MALDI traversent une deuxième lentille, appelée « IS2 » qui correspond également à la lentille DE (Delayed Extraction), avant d'entrer dans l'analyseur (Figure 11).



Figure 11 : Illustration schématique de la source de l'Autoflex II TOF TOF.

4.1.2.3.1. Le choix du mode d'ionisation

En mode négatif, le processus de désorption/ionisation MALDI de l'ITPP est beaucoup plus efficace qu'en mode positif. Par ailleurs, beaucoup moins de clusters de matrice ou petites molécules présentes dans le sang sont observées avec ce mode d'ionisation (Figure 12).



Figure 12 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ à 10⁻³M dans l'eau en mode positif (a.) ou en mode négatif (b.) (matrice : 3-HPA, dépôt goutte séchée). Les pics non annotés correspondent à des clusters de matrice ou à des petites molécules présentes dans le sang.

Après les deux étapes de désalinisation, les ions sodium et calcium de l'ITPP CaNa₄ sont remplacés par six protons. En mode négatif, l'ITPP s'ionise par perte d'un proton des groupements phosphate et le spectre de masse de l'ITPP présente donc un massif caractéristique à 604.8Da.

4.1.2.3.2. L'optimisation de la différence de potentiel IS1/IS2

Les ions formés par les processus de désorption/ionisation MALDI sont accélérés grâce à la différence de potentiel entre l'IS1 et l'IS2. Les ions les plus légers possèdent une faible inertie : la différence de potentiel entre l'IS1 et l'IS2 n'a pas besoin d'être très importante pour les accélérer efficacement. Une réduction de la différence de potentiel entre les deux lentilles provoque une discrimination vis-à-vis des ions de haut poids moléculaire qui favorise l'observation des ions plus légers. Pour cette étude, IS1 est fixée à 19kV et IS2 à 17,2kV.

4.1.2.3.3. L'optimisation de l'extraction retardée

L'extraction retardée réduit la dispersion spatiale et temporelle des ions dans l'analyseur et améliore ainsi la résolution : la lentille DE est portée à une tension très légèrement supérieure au champ électrique de la source pendant un bref délai (quelques centaines de nanosecondes), s'opposant ainsi à la progression des ions dans l'analyseur. Les ions se placent sur « une ligne de départ » et pénètrent donc simultanément dans le tube de vol.

Le délai pendant lequel la tension de la lentille DE est augmentée doit être adapté à la gamme de masse des ions analysés : plus les ions sont légers, moins le temps qui leur est nécessaire pour arriver jusqu'à la lentille DE est grand. Le « delayed extraction » est donc en général diminué lorsque les ions étudiés sont légers. Cependant, des temps trop courts de delayed extraction (moins de 10 nanosecondes) risquent d'endommager l'appareil (variation de potentiel trop rapide).

Pour l'analyse de l'ITPP, différents tests ont montré que l'extraction retardée n'améliorait pas significativement la résolution. Nous avons donc choisi de ne pas l'utiliser (le delayed extraction est alors égal à zéro). Cette manœuvre permet de gagner en sensibilité ce qui est perdu en résolution.

4.1.2.3.4. L'optimisation de la puissance laser

La puissance laser nécessaire pour assurer le processus de désorption/ionisation MALDI est dépendante notamment de la matrice, du type de dépôt et de l'analyte étudié. Dans le cadre de cette étude, la même matrice et le même type de dépôt sont utilisés pour tous les analytes. L'irradiance laser optimale dépend donc surtout de l'analyte étudié.

Lors du processus de désorption/ionisation MALDI, l'analyte est protégé des effets destructeurs du faisceau laser grâce à la grande quantité de matrice avec laquelle il est cocristallisé. La matrice absorbe en effet à la longueur d'onde du laser et est préférentiellement excitée, favorisant le transfert dans la phase gazeuse de l'analyte intact. Toutefois, lorsque la puissance laser augmente, la quantité d'énergie absorbée par l'analyte augmente également, provoquant à terme sa fragmentation. Un compromis doit donc être trouvé entre une puissance laser suffisamment élevée pour assurer le processus de désorption/ionisation MALDI de l'analyte et une puissance laser suffisamment faible pour éviter sa fragmentation.

Il est généralement conseillé de travailler au seuil de désorption laser, c'est-à-dire à la puissance laser la plus basse permettant de désorber l'analyte. Pour l'étude de l'ITPP dans

le sang, travailler au seuil de désorption laser de l'ITPP évite également une interférence avec d'autres pics correspondant à des molécules présentes dans le sang et qui risqueraient d'être désorbées à des irradiances laser plus importantes.

4.1.2.3.5. L'optimisation du gain

Le facteur de réponse de l'ITPP dans le sang étant assez faible, il est possible d'augmenter le gain du détecteur pour améliorer son observation. Par contre, si l'augmentation du gain du détecteur intensifie le signal des ions analysés, il en va de même pour le bruit de fond : le rapport signal/bruit n'est pas amélioré et peut même être dégradé. Par ailleurs, un gain trop élevé, sature le détecteur et l'endommage. Le gain a donc été légèrement augmenté à 5 pour améliorer la sensibilité.

4.1.2.3.6. L'optimisation des tirs laser

De trop nombreux tirs laser sur une même position ne permettent pas l'observation des pics correspondants à l'ITPP mais seulement celle des pics présents lors de l'analyse du sang seul. Un maximum de 20 tirs est donc réalisé sur une même position pour éviter toute accumulation de bruit de fond biologique.

À l'issue du lavage, le dépôt n'est pas homogène : il présente une couronne blanche et un centre sombre (Figure 10). Afin que le spectre de masse soit représentatif de la présence de l'ITPP sur le dépôt, un grand nombre de tirs laser (20000) est effectué aléatoirement sur l'ensemble du dépôt.

4.1.2.4. Limite de détection de l'ITPP dans chaque fraction sanguine

Pour estimer les limites de détection de l'ITPP dans chacune des fractions sanguines, des échantillons de référence sont préparés selon la procédure suivante :

- Le sang fraichement prélevé est tout d'abord homogénéisé manuellement (pour éviter l'hémolyse);
- Les cristaux de sel d'ITPP CaNa4 (fournit par NormOxys) sont solubilisés dans de l'eau à 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷M ;
- 20µL de sang et 20µL d'ITPP à la concentration désirée sont mélangés ;
- Ce mélange est dilué dix fois dans 160µL d'acétate d'ammonium à 20mM ;
- Le mélange dilué est passé sur la résine échangeuse d'ion ;
- L'échantillon est mélangé à la matrice (ratio 1:1 en volume);
- 1µL du mélange échantillon/matrice est immédiatement déposé sur la cible MALDI et séché à l'air ambiant ;
- 5µL d'eau froide acidifiée avec 5% d'acide formique sont appliqués sur le dépôt pendant 4 à 6 secondes puis chassés à l'aide d'une poire.

Le même protocole est utilisé pour préparer des échantillons de référence pour le plasma et les globules rouges.

La limite de détection de l'ITPP a été définie comme suit : l'intensité du massif correspondant à l'ITPP doit être deux fois plus élevée que l'intensité du bruit de fond. Toutefois, la ligne de base d'un spectre de masse n'est pas une ligne droite et certaines de ses variations peuvent être interprétées comme des massifs caractéristiques de l'ITPP. Il est impératif de réaliser dans les mêmes conditions d'analyse un dépôt témoin (sans ITPP) pour vérifier la validité du résultat.

L'analyse de ces références nous a permis de déterminer les limites de détections, qui dépendent de la nature de la fraction sanguine :

- Dans le sang total et les globules rouges, la limite de détection de l'ITPP est de 10⁻⁶M, soit 50 femtomoles d'ITPP déposées sur la cible.
- Dans le plasma, la limite de détection de l'ITPP est de 10⁻⁷M, soit 5 femtomoles d'ITPP déposées sur la cible.

4.1.3. La quantification de l'ITPP dans le sang par MALDI-MS

Une fois la préparation de l'échantillon et les paramètres instrumentaux optimisés, l'analyse par MALDI-MS de l'ITPP dans le sang est très rapide et sensible. Par contre, d'une analyse à une autre, la reproductibilité n'est pas toujours suffisante pour obtenir une quantification fiable. En effet, le mélange matrice/analyte ne cristallise pas toujours de façon homogène entrainant des variations significatives d'un dépôt à un autre, voire même au sein d'un même dépôt selon la position du tir laser. L'ajout d'une référence interne compense ce problème de reproductibilité^{6,7}.

4.1.3.1. La référence interne

La référence interne choisie doit posséder des caractéristiques proches de celles de l'analyte afin que leur comportement soit similaire lors de l'analyse par MALDI-MS. L'analyte sous sa forme deutéré est la référence interne idéale, à condition qu'il soit disponible. D'une part, les masses de l'analyte et de son homologue deutéré sont proches, les deux massifs de leurs ions apparaissent donc dans la même fenêtre de détection. D'autre part, leurs propriétés physicochimiques étant quasiment identiques, la co-cristallisation avec la matrice, la désorption laser, l'efficacité d'ionisation et le comportement en phase gazeuse de l'homologue deutéré sont supposés être similaires à ceux de l'analyte d'intérêt^{8,9}.

L'homologue deutéré de l'ITPP est disponible sous la forme du sel d'hexasodium (ITPP-d₆ Na₆). La différence de masse entre l'ITPP et l'ITPP-d₆ est de 6Da, un écart suffisamment grand pour que les deux molécules soient clairement identifiées par MALDI-MS.

La référence interne est ajoutée aux échantillons avant l'étape de dilution pour que ses conditions d'analyse soient les mêmes que celles de l'ITPP contenu dans l'échantillon sanguin. La concentration de l'ITPP deutéré est fixée à 10⁻⁵M, car c'est la concentration médiane de la gamme dynamique d'observation de l'ITPP la plus probable (10⁻³ à 10⁻⁷M).

Après les deux étapes de désalinisation, les ions sodium de l'ITPP-d₆ Na₆ sont remplacés par six protons. En mode négatif, l'ITPP deutéré s'ionise par perte d'un proton et le spectre de masse de l'ITPP deutéré présente donc un massif caractéristique à 610.8Da.

4.1.3.2. Les courbes de calibration

La quantification fiable de l'ITPP dans le sang requiert la construction d'une courbe de calibration avant chaque analyse.

Il faut tout d'abord déterminer la gamme de concentration de cette courbe de calibration :

- La limite basse correspond aux limites de détection précédemment déterminées en fonction de la fraction sanguine ;
- La limite haute est fixée à quatre décades au-dessus de la limite basse : c'est la gamme dynamique maximum du MALDI-MS.

La courbe de calibration est construite à partir de solutions de référence contenant une concentration constante d'ITPP deutéré (10⁻⁵M) et des concentrations variables d'ITPP (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ or 10⁻⁷M). Les solutions de référence doivent être préparées et analysées dans les mêmes conditions que les échantillons inconnus :

- Le sang fraichement prélevé est tout d'abord homogénéisé manuellement (pour éviter l'hémolyse);
- Les cristaux de sel d'ITPP CaNa4 (fournit par NormOxys) sont solubilisés dans de l'eau à 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷M ;
- Les cristaux de sel d'ITPP-d₆ Na₆ (fournit par NormOxys) sont solubilisés dans de l'eau à 10⁻⁵M ;
- 20µL de sang, 20µL d'ITPP-d₆ Na₆ à 10⁻⁵M et 20µL d'ITPP à la concentration désirée sont mélangés ;
- Ce mélange est dilué dix fois dans 140µL d'acétate d'ammonium à 20mM ;
- Le mélange dilué est passé sur la résine échangeuse d'ion ;
- L'échantillon est mélangé à la matrice (ratio 1:1 en volume);
- 1µL du mélange échantillon/matrice est immédiatement déposé sur la cible MALDI et séché à l'air ambiant ;
- 5µL d'eau froide acidifié avec 5% d'acide formique sont appliqués sur le dépôt pendant 4 à 6 secondes puis chassés sous flux d'air à l'aide d'une poire.

Le même protocole est utilisé pour préparer les solutions de référence de plasma et de globules rouges.

Sur le spectre de masse caractéristique de l'ITPP, le massif (ou profil isotopique) est constitué de 3 pics. Le premier pic isotopique étant beaucoup plus intense que les deux autres (Figure 13), seule l'intensité de celui-ci sera mesurée pour la construction de la courbe de calibration.

Les intensités des pics de l'ITPP et de l'ITPP deutéré sont mesurées sur les spectres de masse des solutions de référence. Comme l'ITPP et l'ITPP deutéré sont supposés avoir le même comportement lors du processus de désorption/ionisation MALDI, les intensités de leur pic respectif représentent leurs concentrations relatives en solution (Figure 14). Le ratio de l'intensité de l'ITPP sur l'intensité de l'ITPP deutéré est tracé en fonction de la concentration en ITPP. Les courbes de calibration ainsi obtenues pour chaque fraction sanguine sont linéaires pour des concentrations d'ITPP comprises entre 10⁻³ et 10⁻⁷M (Figure 15). Ces courbes permettent de déterminer la concentration d'ITPP dans un échantillon sanguin inconnu analysé par MALDI-MS, à partir de la mesure des ratios des intensités de l'ITPP et de l'ITPP deutéré.



Figure 13 : Profil isotopique de l'ITPP H₅.



Figure 14 : Spectre de masse de l'ITPP CaNa₄ à 10⁻⁵M et de l'ITPP deutéré à 10⁻⁵M dans le sang en mode négatif (matrice : 3-HPA, dépôt goutte séchée). Les pics non annotés correspondent à des clusters de matrice ou à des petites molécules présentent dans le sang.



Figure 15 : Courbes de calibration de l'ITPP dans le sang (a.), les globules rouges (b.) et le plasma (c.).

4.1.3.3. La validité des résultats

Pour vérifier la fiabilité de la quantification de l'ITPP dans le sang, nous avons évalué la reproductibilité des résultats obtenus.

Chaque point des trois courbes de calibration a été répété dix fois, sur des jours différents et avec des solutions de référence préparées peu de temps avant l'analyse. La précision moyenne, exprimée à l'aide du RSD (Relative Standard Deviation) a été calculée pour chaque fraction sanguine :

- Dans le sang, le RSD est inférieur à 12% ;
- Dans le plasma, le RSD est inférieur à 14% ;
- Dans les globules rouges, le RSD est inférieur à 13%.

Ces valeurs de RSD sont tout à fait correctes vu la complexité des échantillons sanguins.

Il est donc possible de quantifier l'ITPP dans le sang selon le protocole décrit ci-dessus sous réserve de suivre ces recommandations : i) pour les faibles concentrations d'ITPP, il est nécessaire de vérifier la présence réelle d'ITPP par comparaison avec un « témoin », ii) la

courbe de calibration doit être réalisée avant chaque série d'analyse et pour chaque fraction sanguine.

4.1.4. Application du protocole sur du plasma de souris traitées

Ce protocole a été utilisé pour déterminer la quantité d'ITPP présente dans le plasma des souris après injection ou ingestion. L'étude du plasma a été choisie préférentiellement à celle du sang complet en raison de sa facilité de conservation sur plusieurs jours. Cette étude permet donc d'évaluer quelle est l'influence du mode d'administration (injection ou ingestion) sur la quantité d'ITPP atteignant le plasma, et donc sang.

Trois groupes distincts de souris ont été traitées avec de l'ITPP. Le premier groupe avait accès libre pendant huit semaines à une solution à 20g/ml en ITPP comme eau de boisson (ingestion). Les deuxième et troisième groupes ont reçu une unique injection (un gramme d'ITPP par kilogramme) soit intrapéritonéale (injection dans l'abdomen) ou intraveineuse. Un quatrième groupe de souris non traitées servait de témoin.

Le sang prélevé sur les souris est centrifugé pour obtenir le plasma.

Des solutions de référence préparées, selon le protocole décrit précédemment, à partir du plasma, d'une concentration constante d'ITPP deutéré (10⁻⁵M) et de concentration variable d'ITPP (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷M) ont permis d'établir la courbe de calibration (Figure 16).

Tous les échantillons ont été analysés par MALDI-MS selon le même protocole. A l'aide du ratio des intensités de l'ITPP et de l'ITPP deutéré (mesurées sur les spectres de masse) et de la courbe de calibration, la concentration en ITPP de ces différents échantillons a pu être déterminée (Figure 17). Aucun pic correspondant à l'ITPP n'a été observé sur les spectres de masse du plasma prélevé sur le groupe témoin non traité.

Les mêmes concentrations sont obtenues après les injections intrapéritonéale et intraveineuse uniques (0.17 μ M et 0.15 μ M respectivement). Par contre, le groupe de souris ayant eu accès à volonté à la solution d'ITPP comme eau de boisson présente des concentrations d'ITPP dans le plasma quatre fois plus élevées (0.59 μ M).



Figure 16 : Courbe de calibration d' l'ITPP dans le plasma de souris traitées.



Figure 17 : Quantification de l'ITPP dans le plasma de souris après différents modes d'administration : administration orale (p.o.), injection intrapéritonéale unique (i.p.) et injection intraveineuse unique (i.v.). les barres d'erreur représentent les déviations standards.

Ce protocole a permis de déterminer les concentrations d'ITPP dans le plasma de souris traitées :

- Après les injections intrapéritonéale et intraveineuse uniques, les concentrations dans le plasma sont similaires : 0.17 μM et 0.15 μM respectivement ;
- Après l'ingestion chronique par l'eau de boisson, la concentration dans le plasma est de 0.59 μM, c'est-à-dire quatre fois plus élevée qu'après une injection unique.

L'étude sur le plasma de souris nous a permis de prouver que le mode d'administration influence significativement la biodisponibilité de l'ITPP dans le sang. Cette étude semble en effet démontrer que l'ingestion chronique est plus favorable pour la biodisponibilité de l'ITPP dans le sang qu'une injection unique.

4.1.5. Conclusions

Nous avons ainsi validé un protocole permettant la détection et la quantification d'une molécule à visée thérapeutique, le myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP), dans les fractions sanguines par MALDI-MS.

La détection de l'ITPP a nécessité le développement d'un protocole original. Nous nous sommes concentrés sur certains paramètres pour améliorer la sensibilité de l'ITPP dans le sang: i) la dilution adéquate de l'échantillon sanguin, ii) le choix d'une matrice compatible avec l'analyse de molécules de faible poids moléculaire, iii) la mise en place d'étapes de désalinisation (un passage sur une résine échangeuse d'ions et un lavage sur cible du dépôt MALDI), iv) l'optimisation minutieuse des paramètres instrumentaux permettant l'observation des ions de faible m/z.

Ce protocole a permis de détecter de très faibles concentrations d'ITPP :

- Jusqu'à 10⁻⁶M dans le sang total et les globules rouges soit 50 femtomoles d'ITPP déposées sur la cible.
- Jusqu'à 10⁻⁷M dans le plasma soit 5 femtomoles d'ITPP déposées sur la cible.

L'ITPP a également pu être quantifié de façon fiable et reproductible grâce à l'introduction d'une référence interne, l'ITPP deutéré, et à la construction de courbes de calibration. La quantification de molécules dans des échantillons biologiques est de première importance dans les études pharamacocinétiques.

Ce protocole a permis de déterminer les concentrations d'ITPP dans le plasma de souris traitées :

- Après les injections intrapéritonéal et intraveineuse uniques, les concentrations dans le plasma sont similaires : 0.17 μM et 0.15 μM respectivement ;
- Après l'ingestion chronique par l'eau de boisson, la concentration dans le plasma est de 0.59 μM, c'est-à-dire quatre fois plus élevée qu'après une injection unique.

L'étude sur le plasma de souris nous a permis de montrer que le mode d'administration influence significativement la biodisponibilité de l'ITPP dans le sang.

Cette étude semble en effet démontrer que l'ingestion chronique est plus favorable pour la biodisponibilité de l'ITPP dans le sang qu'une injection unique. De plus, cette étude démontre que l'ITPP traverse les membranes biologiques, car lorsque l'administration de l'ITPP est réalisée par ingestion orale ou injection intrapéritonéal, l'ITPP est détecté dans le plasma.

Ce protocole a été envoyé au laboratoire Human Health Risk Resources, Inc. basé à Seattle, Washington, dirigé par Dr. Gay Goodman. Le protocole a pu être reproduit à l'identique dans ce laboratoire et est en cours d'évaluation par la Food and Drug Administration (FDA).Ce protocole serait l'un des rares comprenant une analyse par MALDI-MS validé par la FDA dans le cadre d'études toxicologiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en cours de soumission (Carolina D. Duarte, Aurélie Même, Michaël Biacchi, Alexandros Koumbis, Ruth Greferath, Emmanuelle Leize-Wagner, Claude Nicolau, Jean-Marie Lehn. Bioavailability of *myo*-inositol trispyrophosphate (ITPP), a novel allosteric effector of hemoglobin, after oral and parenteral administration in mice assessed by MALDI-TOF mass spectrometry.).

4.2. ETUDE DE L'INTERACTION HEMOGLOBINE/ITPP PAR ESI-MS

Les globules rouges sont principalement constitués d'hémoglobine, qui leur confère leur couleur rouge. L'hémoglobine est un tétramère non-covalent composé de quatre chaînes polypeptidiques (deux chaînes α et deux chaînes β) liées à quatre hèmes (Figure 18). Les hèmes possèdent un atome de fer susceptible de fixer de petites molécules, comme le dioxygène, le monoxyde de carbone ou le dioxyde de carbone. L'hémoglobine assure de cette façon le transport du dioxygène dans l'organisme.



Figure 18 : L'hémoglobine constituée de deux chaînes α (en rouge), de deux chaînes β (en bleu) et de quatre hèmes.

L'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène est régulée par des effecteurs allostériques. Ils stabilisent l'hémoglobine en l'absence de molécule de dioxygène. Le 2,3-bisphospho-D-glycerate (BPG) (Figure 19) notamment est, chez l'homme, un effecteur allostérique naturel de l'hémoglobine qui se fixe dans la cavité centrale de l'hémoglobine (au milieu des quatre chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine).

D'autres molécules, comme les inositols polyphosphorylés, peuvent également jouer le rôle d'effecteur allostérique de l'hémoglobine : lorsqu'ils se fixent sur l'hémoglobine, son affinité pour le dioxygène diminue, favorisant ainsi la libération du dioxygène dans l'organisme. Ces molécules sont par conséquent des candidats très attractifs dans le cadre de traitements anti-cancer^{3,4} ou pour des patients ayant des capacités d'activité réduites suite à des défaillances cardiaques².

Dans cette famille de molécules, le myoinositol hexakisphosphate (IHP) (Figure 19) est l'inositol polyphosphorylé dont la fixation sur l'hémoglobine réduirait le plus l'affinité avec le dioxygène. Cependant, dans les conditions physiologiques, l'IHP porte sept charges et est donc incapable de traverser la membrane des globules rouges. Par contre, les pyrophosphates cycliques, comme le myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP) (Figure 19), peuvent traverser cette membrane, malgré les charges qu'ils portent, et tout en conservant les capacités d'effecteurs allostériques.

Les constantes de stabilité sont des données très utiles pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de ces effecteurs allostériques. Elles sont connues pour les complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/IHP : l'interaction hémoglobine/IHP est beaucoup plus forte que l'interaction hémoglobine/BPG. L'interaction hémoglobine/ITPP

quant à elle, est supposée être de force similaire à l'interaction hémoglobine/BPG. Toutefois, les constantes de stabilité sont évaluées de façon indirecte en mesurant la constante de dissociation de l'interaction oxygène/hémoglobine en présence des effecteurs allostériques.

La spectrométrie de masse, et plus particulièrement l'ESI-MS, s'est avérée être une méthode alternative de choix pour confirmer ces données. Cette étude sera par conséquent réalisée sur un MicrOTOF (Bruker).



Figure 19 b : Les formules développées du BPG, de l'IHP et de l'ITPP.

4.2.1. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine seule

L'hémoglobine intacte a déjà été observée à plusieurs reprises par ESI-MS^{10,11}. Le processus d'ionisation électrospray a pour caractéristique de générer des ions multichargés, facilitant l'analyse d'édifices de haut poids moléculaire. Il est en effet plus facile d'observer des rapports masse sur charge (m/z) plus faibles. Néanmoins, cette propriété particulière rend les spectres de masse de milieux complexes souvent difficiles à interpréter. Il sera donc nécessaire de traiter l'hémoglobine avant analyse par ESI-MS.

Avant de pouvoir déterminer les constantes de stabilité relatives des complexes hémoglobine/BPG, hémoglobine/IHP et hémoglobine/ITPP, la préparation de l'échantillon et les paramètres instrumentaux doivent être tout d'abord optimisés pour observer l'hémoglobine seule.

4.2.1.1. La préparation de l'échantillon

Le sang entier utilisé pour cette étude est prélevé sur des donneurs sains peu de temps avant l'analyse puis centrifugé à 1500 tpm (tour par minute) pendant 5 minutes ; le surnageant est siphonné ; le culot, correspondant aux globules rouges, est lavé trois fois avec une solution de chlorure de sodium à 0.9% (5 minutes de centrifugation à 1500 tpm) et les globules rouges sont resuspendus dans une solution de chlorure de sodium à 0,9%. Ils sont ensuite lysés par centrifugation et passés sur une résine Sephadex (résine polyosidique dont la matrice est composée de cellulose ou de dextranes). Cette étape permet d'éliminer les membranes et la plupart des autres petites molécules constituant les globules rouges ainsi que le BPG pour ne garder que l'hémoglobine. Le tampon utilisé est l'acétate d'ammonium à 100mM additionné d'EDTA Na⁺ à 10⁻⁵M, et dont le rôle est de capter les métaux.

4.2.1.1.1. La solubilisation de l'hémoglobine

Il est nécessaire de travailler avec un solvant compatible avec le processus d'ionisation/désorption électrospray, c'est-à-dire un solvant volatil. Ce solvant doit également favoriser le maintien des édifices non-covalents en solution. Dans le cas de molécules biologiques, ce solvant doit reproduire au mieux les conditions physiologiques : il doit être aqueux, proche du pH physiologique et de force ionique contrôlée. Les sels d'ammonium, comme le citrate d'ammonium ou l'acétate d'ammonium^{12,13,14}, répondent à ces critères. C'est ce dernier solvant, l'acétate d'ammonium, que nous avons utilisé pour diluer l'hémoglobine.

La concentration de l'hémoglobine doit quant à elle, être suffisamment élevée pour favoriser la formation du tétramère et suffisamment faible pour être compatible avec l'analyse ESI-MS et éviter la formation d'agrégats non spécifiques. Pour cette étude, l'hémoglobine a été diluée à une concentration de l'ordre de 5μ M : c'est la concentration la plus faible permettant d'observer correctement le tétramère.

4.2.1.1.2. L'étape de dessalage

Les biologistes utilisent généralement des tampons salins (NaCl, KCl, Tris...) à des concentrations de l'ordre du millimolaire pour stabiliser les protéines et conserver ainsi leurs structures tertiaire et quaternaire. Ces tampons sont peu volatils et défavorables à une analyse ESI-MS de bonne qualité. Les sels présents dans ces tampons interagissent de façon aléatoire avec la protéine, entrainant la formation de nombreux adduits et donc une baisse conséquente de la sensibilité et de la résolution de l'analyse ESI-MS (Figure 20). Les tampons salins doivent par conséquent être systématiquement échangés contre un tampon compatible avec l'analyse de protéine par ESI-MS, comme les sels d'ammonium.



Figure 20 : Spectre de masse en mode positif de l'hémoglobine non dessalée à 5µM dans AcONH₄ 50mM. La formation d'adduits de sels provoque l'élargissement des pics multichargés. La sensibilité et la résolution sont alors diminuées de façon significative. Sur le spectre sont présents : l'hémoglobine (\bigcirc), le dimère (\blacktriangle), la chaîne α + 1 hème (\Box), la chaîne β + 1 hème (\bigstar).

Plusieurs techniques de dessalage, comme le passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique (ou gel filtration) ou la dialyse sur membrane, sont utilisées pour

échanger le tampon d'une protéine. Dans le cadre de cette étude, nous avons opté pour des systèmes d'ultracentrifugation, simples à mettre en œuvre et permettant un dessalage efficace : plusieurs cycles de dilution/concentration par centrifugation permettent d'échanger convenablement le tampon biologique par le tampon d'analyse. Le nombre de cycle optimal doit être déterminé pour chaque molécule biologique. Un nombre trop faible de cycles entraine un dessalage insuffisant alors qu'un nombre trop élevé provoque la dénaturation de la molécule biologique.

Comme le passage de l'hémoglobine sur la résine s'effectue avec un tampon acétate d'ammonium, un nombre limité de cycles de dilution/concentration est nécessaire. Des tests, reproduits plusieurs fois sur des jours différents et des échantillons d'hémoglobine différents, montrent que quatre cycles apportent une sensibilité et une résolution optimales (Figure 21).



Figure 21: Spectres de masse en mode positif de l'hémoglobine à 5µM dans AcONH₄ 50mM après deux cycles (a.) ou quatre cycles (b.) de dessalage. La sensibilité et la résolution des spectres de masse ne s'améliorent pas, voire baissent légèrement, lorsque le nombre de cycles de dessalage est supérieur à quatre. Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (○), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (★).
L'hémoglobine se dégrade beaucoup plus rapidement une fois qu'elle est dessalée (Figure 22). Il est donc fortement conseillé de réaliser le dessalage le jour même de l'analyse.



Figure 22 : Spectres de masse en mode positif de l'hémoglobine à 5µM dans AcONH₄ 50mM dessalée le jour même (a.) ou dessalée la veille (b.) de l'analyse. Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (○), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (☆).

4.2.1.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux

Tout d'abord, les débits des gaz de nébulisation et de séchage doivent être réglés de façon à stabiliser le spray et à favoriser une bonne désolvatation des ions. Une désolvatation efficace est indispensable pour obtenir un spectre de masse de bonne qualité : les molécules de solvant interagissent de façon aléatoire avec l'hémoglobine, entrainant la formation de nombreux adduits et donc une baisse conséquente de la sensibilité et de la résolution de l'analyse ESI-MS.

Ensuite, le transfert des ions à travers l'interface (entre la source à pression atmosphérique et l'analyseur à pression réduite) doit être finement contrôlé pour conserver les interactions non-covalentes en phase gazeuse. En effet, si l'énergie interne des ions devient trop

importante, les interactions non-covalentes sont susceptibles de se rompre. Différents paramètres sont à optimiser :

- La température des gaz de nébulisation et de séchage : ces températures doivent être suffisamment élevées pour permettre une désolvatation efficace, mais l'énergie thermique augmente l'énergie interne des ions. En général, ces températures sont ajustées en fonction du solvant utilisé et gardées constantes pendant les analyses. Nous avons fixé ces températures à 150°C pour l'analyse de l'hémoglobine en solvant aqueux.
- La tension d'accélération (Capillary Exit) : c'est la différence de potentiel entre la sortie du capillaire de désolvatation et le premier skimmer du MicrOTOF. La tension d'accélération assure la transmission des ions jusqu'à l'analyseur en leur communiquant une certaine énergie cinétique. Cette énergie cinétique détermine en grande partie l'énergie interne qui leur est transmise lors des collisions avec les molécules résiduelles (gaz ou solvant) dans l'interface. Ainsi, plus la tension d'accélération est élevée, plus l'énergie interne transmise aux ions lors des collisions est importante. Des collisions énergétiques favorisent la désolvatation des ions en les dissociant de leurs adduits non spécifiques de solvant ou de sels mais peuvent induire la rupture des liaisons non-covalentes. Le Capillary Exit optimal a été fixé à 180V pour l'étude de l'hémoglobine.

La transmission à travers l'interface d'ions de rapport masse sur charge (m/z) élevé nécessite également l'optimisation particulière de certains paramètres :

- La tension d'accélération : les ions de rapport m/z élevés, dont l'inertie est plus grande, requièrent une énergie cinétique plus importante pour qu'ils soient transmis jusqu'à l'analyseur.
- L'hexapôle a pour rôle de refocaliser le faisceau d'ions qui tend à diverger. Ce guide d'ions augmente la transmission des ions et améliore la résolution de l'appareil. Pour favoriser la transmission des ions lourds, l'amplitude du voltage appliqué sur l'hexapôle doit être augmentée, ce qui améliore son pouvoir de refocalisation mais dégrade la transmission des ions plus légers.

L'optimisation des paramètres instrumentaux est un compromis entre une désolvatation efficace, la conservation des interactions non-covalentes et une bonne transmission des ions de m/z élevé jusqu'à l'analyseur. Ils doivent être finement ajustés pour que le spectre de masse reflète les espèces présentes en solution.

4.2.1.3. L'analyse ESI-MS de l'hémoglobine

L'analyse d'une molécule biologique se déroule en deux étapes :

4.2.1.3.1. Analyses ESI-MS en conditions dénaturantes

L'hémoglobine est tout d'abord analysée dans un solvant légèrement acidifié (typiquement eau/acétonitrile 50/50 et 1% d'acide formique). Dans ces conditions, appelées conditions dénaturantes, les liaisons non-covalentes sont rompues en solution et l'hémoglobine perd alors sa structure quaternaire (tout en gardant sa structure primaire) : l'hémoglobine est dénaturée.

Sous cette forme dénaturée, les chaînes α et β et les hèmes sont dissociés et les chaînes sont dépliées. Leurs sites basiques sont plus accessibles et donc plus facilement protonés (en mode d'ionisation positif). Les spectres de masse ESI-MS présentent un pic correspondant à l'hème et deux distributions d'états de charge, correspondant aux deux chaînes α et β . Les distributions des états de charge sont plus étendues et les états de charge sont plus élevés (déplacés vers des m/z plus faibles) (Figure 23).

Les conditions dénaturantes permettent d'obtenir une grande sensibilité et une bonne précision de mesure : ici, la résolution est égale à 1900, soit une précision sur la mesure de masse de 0,05%. Elles sont donc utilisées pour vérifier la qualité de l'échantillon, c'est-à-dire la séquence de la protéine (à l'aide de la masse mesurée), l'homogénéité et la pureté de l'échantillon. Ici, les masses de l'hème et des chaînes α et β obtenues à partir du spectre de masse sont en accord avec les masses calculées à partir de leur séquence et aucune autre espèce n'est observée.



Figure 23 : Spectre de masse en mode positif de l'hémoglobine à 5µM dans eau/acétonitrile/1% d'acide formique - quatre cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions dénaturantes. Sur le spectre sont présents : la chaîne α (\blacklozenge) et la chaîne β (\blacklozenge).

4.2.1.3.2. Analyses ESI-MS en conditions natives

L'hémoglobine est ensuite analysée dans des conditions les plus proches possible des conditions physiologiques, c'est-à-dire dans une solution tamponnée à pH physiologique et dont la force ionique est contrôlée (ici l'acétate d'ammonium à 50mM et pH 6,8). Ces conditions dites natives permettent de conserver les interactions non-covalentes, sous réserve d'optimiser les paramètres instrumentaux. L'hémoglobine est sous sa forme native.

Sous sa forme native, l'hémoglobine est repliée. Ses sites basiques sont moins accessibles et donc moins facilement protonés (en mode d'ionisation positif). Les spectres de masse ESI-MS présentent une distribution des états de charge étroite et des états de charge moins élevés (déplacés vers des m/z plus élevés) (Figure 24).

Les conditions natives permettent d'observer les édifices non-covalents en solution avec suffisamment de précision pour déterminer leur stœchiométrie. Ici, la résolution est égale à 2300, soit une précision sur la mesure de masse de 0,05%. L'hémoglobine, composée de deux chaînes α , deux chaînes β et quatre hèmes, est clairement identifiée.



		Masses mesurées (Da)	Masses théoriques (Da)
0	2 chaînes α + 2 chaînes β + 4 hèmes	64456,31	64453,20
	1 chaîne α + 1 chaîne β + 2 hèmes	32227,16	32226,60
	Chaîne α + 1 hème	15743,62	15742,87
☆	Chaîne β + 1 hème	16484,38	16483,73

Figure 24 : Spectre de masse en mode positif de l'hémoglobine à 5µM dans AcONH₄ 50mM quatre cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions natives. Sur le spectre sont présents : l'hémoglobine (○), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (☆).

Le dimère (une chaîne α + une chaîne β + 2 hèmes) ainsi que les chaînes α et β liées à un hème sont toujours présentes sur les spectres de masse, que l'hémoglobine soit dessalée ou non. L'étape de dessalage ne provoque donc pas cette dissociation du complexe en solution lors des cycles de dilution/concentration. Nous avons alors augmenté la concentration graduellement : même à une concentration 25 fois plus élevée, le dimère et les chaînes α et β liées à un hème sont toujours observées, bien que dans des proportions plus

faibles (Figure 25). Cette observation n'est donc pas la conséquence d'une concentration trop faible provoquant la dissociation de tétramère en solution mais plutôt du processus d'ionisation/désorption électrospray.



Figure 25 : Spectres de masse en mode positif de l'hémoglobine dans AcONH₄ 50mM à 5 μ M (a.) ou à 125 μ M (b). Bien que le signal du tétramère soit plus intense à des concentrations plus élevées, ces concentrations sont difficilement compatibles avec un travail quotidien sur l'ESI-MS. Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (\bigcirc), le dimère (\blacktriangle), la chaîne α + 1 hème (\square), la chaîne β + 1 hème (\bigstar).

L'hémoglobine génère des ions de rapport m/z élevé qui requièrent une énergie cinétique plus importante pour être transmis jusqu'à l'analyseur. Or il est parfois impossible d'augmenter cette tension d'accélération sans provoquer la fragmentation partielle de l'analyte, surtout dans le cas d'édifices non-covalents comme l'hémoglobine. Ici, nous avons opté pour la tension d'accélération permettant le meilleur compromis entre transmission des ions lourds et conservation du tétramère (c'est-à-dire un cap exit de 180V) (Figure 26) :

 Pour des tensions d'accélération inférieures à 180V, l'intensité des massifs des chaînes α et β est très faible mais le massif de l'hémoglobine est lui aussi peu intense et peu résolu. Ce manque de sensibilité et de résolution provient d'une mauvaise transmission et d'une mauvaise désolvatation des ions : la tension d'accélération est trop faible.

Le dimère semble par contre plus abondant à ces tensions d'accélération. Ceci n'est dû qu'au fait que le dimère, dont les ions ont des rapports m/z plus faibles, est plus facilement transmis que le tétramère pour des tensions d'accélération identiques. Etant donné leur différence de masse importante et donc leur différence de comportement lors du processus d'ionisation/désorption électrospray, l'abondance relative du dimère et du tétramère est difficilement calculable.

 Pour des tensions d'accélération supérieures à 180V, l'intensité des massifs des chaînes α et β augmente considérablement : la tension d'accélération trop élevée provoque la fragmentation du tétramère en phase gazeuse.

Néanmoins, le tétramère est observé majoritairement, les conditions d'analyse sont donc adaptées à son étude.





Figure 26 : Spectres de masse en mode positif de l'hémoglobine à 5µM dans AcONH₄ 50mM à une tension d'accélération de 130V (a.), de 180V (b), de 240V (c). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (○), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (☆), la chaîne α (◆) et la chaîne β (✦).

4.2.1.4. La validation des résultats

Il est indispensable de s'assurer que l'association observée par ESI-MS est bien spécifique et ne correspond donc pas à des agrégats formés en phase gazeuse. Nous avons réalisé ce contrôle en comparant les spectres de masse obtenus en conditions natives et dénaturantes. Si l'hémoglobine préexiste en solution, les conditions dénaturantes, éloignées des conditions physiologiques, doivent la dissocier¹⁵. Or le spectre de masse de l'hémoglobine en conditions natives présente majoritairement un massif caractéristique de l'hémoglobine intacte alors que seules les sous-unités qui composent l'hémoglobine (les chaînes α et β et les hèmes) sont observées sur le spectre de masse en conditions dénaturantes.

Par ailleurs, lorsque la tension d'accélération est augmentée (les paramètres instrumentaux favorisent donc la fragmentation des complexes), le tétramère de l'hémoglobine se fragmente en chaînes α et β . C'est une preuve supplémentaire de l'existence non artéfactuelle de l'édifice non-covalent observé par ESI-MS.

4.2.2. L'analyse ESI-MS des complexes hémoglobine/effecteur allostériques

L'hémoglobine existe sous différentes formes :

- Le fer des hèmes peut être oxydé (Fe III) ou réduit (Fe II). Le fer doit être sous sa forme réduite pour lier des petites molécules comme le dioxygène ;
- L'hémoglobine peut contenir des oxygènes liés (forme oxy) ou non (forme déoxy). Au contact de l'air, l'hémoglobine s'oxyde. Un dégazage à l'azote permet de revenir à la

forme déoxy. La forme déoxy a une cavité allostérique plus petite, permettant aux effecteurs allostériques de se fixer aux extrémités des chaînes β .

D'après les mesures de masse effectuées sur les spectres ESI-MS, seule l'hémoglobine déoxy (64456.31Da), la forme nécessaire à la fixation des effecteurs allostériques, semble être présente. Nous allons tout de même étudier en premier le complexe hémoglobine/effecteur allostérique dont la constante de stabilité est la plus élevée, c'est-àdire le complexe hémoglobine/IHP. D'après des études menées par les biologistes, la formation de ce complexe ne semble pas être affectée par la forme oxy ou déoxy de l'hémoglobine, contrairement aux complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP. Le complexe hémoglobine/IHP va ainsi nous permettre de vérifier que l'interaction entre l'hémoglobine et un effecteur allostérique est observable par ESI-MS.

4.2.2.1. Le complexe hémoglobine/IHP

L'IHP est synthétisé sous forme d'un sel dodécasodium (IHP Na₁₂). La solution d'IHP Na₁₂ étant très basique, l'analyse du complexe hémoglobine/IHP est réalisée sur une solution d'IHP H₁₂, obtenue par passage de l'IHP Na₁₂ sur cartouche échangeuse d'ions dans l'acétate d'ammonium. Le pH de la solution d'IHP H₁₂ est ajusté à pH neutre à l'aide d'une petite quantité d'hydroxyde de sodium.

Nous avons choisi de dessaler tout d'abord l'hémoglobine (dans les mêmes conditions décrites précédemment) puis d'y additionner l'IHP. Lorsque l'IHP est ajouté à l'hémoglobine avant son dessalage, une grande partie de l'IHP passe au travers des pores de la membrane et est éliminée, rendant difficile la détermination exacte du ratio de concentration IHP/hémoglobine.

La fixation de l'effecteur allostérique sur l'hémoglobine est a priori immédiate. Différents temps et températures d'incubation n'ont en effet révélé aucun changement notable de l'interaction effecteur allostérique/hémoglobine. Afin de standardiser la procédure, le temps d'incubation a été fixé à 10 minutes à température ambiante (21°C).

Les paramètres instrumentaux utilisés pour l'observation des complexes hémoglobine/effecteur allostérique sont les mêmes que pour l'observation de l'hémoglobine seule.

Le test de spécificité de l'interaction hémoglobine/effecteur allostérique consiste à étudier les spectres de masse obtenus en fonction de la quantité d'effecteur allostérique ajoutée à l'hémoglobine. Plusieurs ratios de concentration IHP/hémoglobine ont ainsi été testés (Figure 27). Dès le ratio 0,01, des pics très peu intenses correspondant au complexe hémoglobine/IHP sont observés. Au ratio 0,1, les pics correspondant au complexe hémoglobine/1 IHP sont majoritaires. Au ratio 2, jusqu'à 9 IHP sont fixés sur l'hémoglobine. Aux ratios supérieurs à 2, les spectres de masse ne sont plus assez résolus pour donner des informations fiables sur le nombre d'IHP fixés : l'addition d'un volume trop important de solution d'IHP, qui doit contenir des sels résiduels, dégrade la résolution et la sensibilité. C'est le ratio 0,4 qui permet d'observer majoritairement l'hémoglobine/1 IHP tout en minimisant les pics de l'hémoglobine seule et ceux de l'hémoglobine associée à plusieurs effecteurs allostériques.




Figure 27 : Spectres de masse en mode positif du complexe l'hémoglobine/IHP dans AcONH₄ 50mM au ratio 0.1 (a.), 0.4 (b), 2 (c), 5 (d). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (Hb) (\bigcirc), l'hémoglobine + 1 IHP (\mathbb{X}), le dimère (\blacktriangle), la chaîne α + 1 hème (\Box), la chaîne β + 1 hème (\bigstar).

Cette absence de spécificité de l'IHP pour l'hémoglobine s'explique par la présence à la surface de l'hémoglobine de nombreux autres sites chargés susceptibles de lier les effecteurs allostériques.

Il est à noter qu'en présence d'IHP, l'intensité des pics correspondant au dimère et aux chaînes α et β diminue. L'IHP semble renforcer les interactions non-covalentes du tétramère, par conséquent moins fragile devant la tension d'accélération relativement élevée.

Le test de fragmentation consiste à faire varier la tension d'accélération pour observer la fragmentation du complexe hémoglobine/effecteur allostérique. Plusieurs tensions d'accélération ont ainsi été testées (Figure 28). Pour des tensions d'accélération trop faibles (inférieures à 160V), les pics du complexe sont peu intenses et peu résolus. La transmission et la désolvatation des ions ne sont pas efficaces. Le meilleur compromis entre une désolvatation des ions et une transmission efficaces et la conservation des interactions non-covalentes correspond à une tension d'accélération de 180V. Pour des tensions d'accélération trop élevées (supérieures à 200V), le complexe se fragmente. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la tension d'accélération provoque l'apparition des pics correspondant aux chaînes α et β seules sans l'augmentation de l'intensité des pics correspondant à l'hémoglobine seule : soit les interactions non-covalentes du tétramère et l'interaction hémoglobine/IHP sont rompues simultanément, soit la fragmentation du tétramère provoque la rupture de l'interaction hémoglobine/IHP.



Figure 28 : Spectres de masse en mode positif du complexe l'hémoglobine/IHP dans
AcONH₄ 50mM au ratio 1 à une tension d'accélération de 100V (a.), de 180V (b.) ou de 240V (c). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (○), l'hémoglobine + 1 IHP (X), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (★), la chaîne α (♦) et la chaîne β (★).

4.2.2.2. Le complexe hémoglobine/BPG

L'observation du complexe hémoglobine/IHP par ESI-MS ayant été un succès, la même étude est menée sur les complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP.

Le BPG, synthétisé sous forme d'un sel de sodium, est passé sur une cartouche échangeuse d'ions dans l'acétate d'ammonium. Le pH de cette solution est ajusté à pH neutre à l'aide d'une petite quantité d'hydroxyde de sodium.

Les conditions d'analyse sont les mêmes que pour l'observation du complexe hémoglobine/IHP : l'hémoglobine est dessalée seule avant d'être additionnée de BPG et le temps d'incubation est fixé à 10 minutes à température ambiante (21°C). Les paramètres instrumentaux utilisés pour l'observation du complexe hémoglobine/BPG sont les mêmes que pour l'observation de l'hémoglobine seule.

Plusieurs ratios de concentration BPG/hémoglobine ont été testés pour vérifier la spécificité de leur l'interaction (Figure 29). Dès le ratio 0,01, des pics très peu intenses correspondant au complexe hémoglobine/BPG sont observés. Au ratio 1, jusqu'à 6 BPG sont fixés sur l'hémoglobine. Aux ratios supérieurs à 1, les spectres de masse ne sont plus assez résolus pour donner des informations fiables sur le nombre de BPG fixés : l'addition d'un volume trop important de solution de BPG, qui doit contenir des sels résiduels, dégrade la résolution et la sensibilité. La résolution et la sensibilité décroissent plus rapidement avec l'ajout d'un volume plus important de solution de BPG que de solution d'IHP. C'est le ratio 0,8 qui permet d'observer majoritairement l'hémoglobine/1 BPG tout en minimisant les pics de l'hémoglobine seule et ceux de l'hémoglobine associée à plusieurs effecteurs allostériques.

Cette absence de spécificité du BPG pour l'hémoglobine s'explique par la présence à la surface de l'hémoglobine de nombreux autres sites chargés susceptibles de lier les effecteurs allostériques.

Contrairement à l'IHP, en présence de BPG, l'intensité des pics correspondant au dimère et aux chaînes α et β ne diminue pas. Le BPG ne semble pas renforcer les interactions non-covalentes du tétramère.

Plusieurs tensions d'accélération ont été testées pour étudier la fragmentation du complexe hémoglobine/BPG (Figure 30). Les conclusions sont les mêmes que pour l'IHP. Pour des tensions d'accélération trop faibles (inférieures à 160V), les pics du complexe sont peu intenses et peu résolus. Le meilleur compromis entre une désolvatation des ions et une transmission efficaces et la conservation des interactions non-covalentes correspond à une tension d'accélération de 180V. Pour des tensions d'accélération trop élevées (supérieures à 200V), le complexe se fragmente et seuls les pics correspondant aux chaînes α et β apparaissent (sans augmentation de l'intensité des pics correspondant à l'hémoglobine seule) : soit les interactions non-covalentes du tétramère et l'interaction hémoglobine/BPG sont rompues simultanément, soit la fragmentation du tétramère provoque la rupture de l'interaction hémoglobine/BPG.



Figure 29 : Spectres de masse en mode positif du complexe l'hémoglobine/BPG dans AcONH₄ 50mM au ratio 0.8 (a.) ou au ratio 1 (b). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (Hb) (○), l'hémoglobine + 1 BPG (ً]), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (☆).



Figure 30 : Spectres de masse en mode positif du complexe l'hémoglobine/BPG dans AcONH₄ 50mM au ratio 1 à une tension d'accélération de 100V (a.), de 180V (b.) ou de 240V (c). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (○), l'hémoglobine + 1 BPG (X), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (★), la chaîne α (◆) et la chaîne β (✦).

4.2.2.3. Le complexe hémoglobine/ITPP

L'ITPP, synthétisé sous forme d'un sel de sodium, est passé sur une cartouche échangeuse d'ions dans l'acétate d'ammonium. Le pH de cette solution est ajusté à pH neutre à l'aide d'une petite quantité d'hydroxyde de sodium.

Les conditions d'analyse sont les mêmes que pour l'observation du complexe hémoglobine/IHP : l'hémoglobine est dessalée seule avant d'être additionnée d'ITPP et le temps d'incubation est fixé à 10 minutes à température ambiante (21°C). Les paramètres instrumentaux utilisés pour l'observation du complexe hémoglobine/ITPP sont les mêmes que pour l'observation de l'hémoglobine seule.

Plusieurs ratios de concentration ITPP/hémoglobine ont été testés pour vérifier la spécificité de leur l'interaction (Figure 31). Dès le ratio 0,01, des pics très peu intenses correspondant au complexe hémoglobine/ITPP sont observés. Au ratio 1, jusqu'à 6 ITPP sont fixés sur l'hémoglobine. Aux ratios supérieurs à 1, les spectres de masse ne sont plus assez résolus pour donner des informations fiables sur le nombre d'ITPP fixés : l'addition d'un volume trop important de solution d'ITPP, qui doit contenir des sels résiduels, dégrade la résolution et la sensibilité. La résolution et la sensibilité décroissent plus rapidement avec l'ajout d'un volume plus important de solution d'ITPP que de solution d'IHP ou de BPG. C'est le ratio 0,6 qui permet d'observer majoritairement l'hémoglobine/1 ITPP tout en minimisant les pics de l'hémoglobine seule et ceux de l'hémoglobine associée à plusieurs effecteurs allostériques.

Cette absence de spécificité de l'ITPP pour l'hémoglobine s'explique par la présence à la surface de l'hémoglobine de nombreux autres sites chargés susceptibles de lier les effecteurs allostériques.

Contrairement à l'IHP, en présence d'ITPP, l'intensité des pics correspondant au dimère et aux chaînes α et β ne diminue pas. L'ITPP ne semble pas renforcer les interactions non-covalentes du tétramère.

Plusieurs tensions d'accélération ont été testées pour étudier la fragmentation du complexe hémoglobine/ITPP (Figure 32). Les conclusions sont les mêmes que pour l'IHP. Pour des tensions d'accélération trop faibles (inférieures à 160V), les pics du complexe sont peu intenses et peu résolus. Le meilleur compromis entre une désolvatation des ions et une transmission efficaces et la conservation des interactions non-covalentes correspond à une tension d'accélération de 180V. Pour des tensions d'accélération trop élevées (supérieures à 200V), le complexe se fragmente et seuls les pics correspondant aux chaînes α et β apparaissent (sans augmentation de l'intensité des pics correspondant à l'hémoglobine seule) : soit les interactions non-covalentes du tétramère et l'interaction hémoglobine/ ITPP sont rompues simultanément, soit la fragmentation du tétramère provoque la rupture de l'interaction hémoglobine/ ITPP.



Figure 31 : Spectres de masse en mode positif du complexe l'hémoglobine/ITPP dans AcONH₄ 50mM au ratio 0.6 (a.) ou au ratio 1 (b). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (Hb) (○), l'hémoglobine + 1 ITPP (X), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (☆).



Figure 32 : Spectres de masse en mode positif du complexe l'hémoglobine/ITPP dans AcONH₄ 50mM au ratio 1 à une tension d'accélération de 100V (a.), de 180V (b.) ou de 240V (c). Sur les spectres sont présents : l'hémoglobine (○), l'hémoglobine + 1 BPG (X), le dimère (▲), la chaîne α + 1 hème (□), la chaîne β + 1 hème (★), la chaîne α (◆) et la chaîne β (✦).

4.2.3. Les expérience de compétition en solution

Comme les trois complexes hémoglobine/effecteur allostérique sont observés par ESI-MS et présentent des pics caractéristiques suffisamment éloignés en masse pour être correctement résolus et donc différenciés, nous avons réalisé une expérience de compétition : les trois effecteurs allostériques sont ajoutés à l'hémoglobine à des concentrations identiques (ratio 0,1) (Figure 33). L'objectif est de déterminer les constantes de stabilité relatives des effecteurs allostériques pour l'hémoglobine. Les conditions de préparation de l'échantillon et les paramètres instrumentaux sont ceux utilisés précédemment. Chaque expérience a été reproduite pour en vérifier sa fiabilité.

La détermination de constantes de stabilité relatives impose de pouvoir relier l'intensité des pics correspondant à chaque espèce à leur concentration en solution. Le spectre de masse doit donc refléter fidèlement la distribution des espèces en solution. Dans le cas de cette étude, comme l'état de charge majoritaire de l'hémoglobine et de l'hémoglobine liée à un effecteur est le même, nous avons supposé que la fixation des effecteurs allostériques sur l'hémoglobine n'influencent pas significativement sa masse ni sa conformation. Nous supposons donc que les complexes hémoglobine/récepteurs allostériques ont le même rendement d'ionisation et de désolvatation et le même facteur de réponse que l'hémoglobine seule. Dans ce contexte, les intensités des pics caractéristiques de chaque espèce peuvent être reliées à leur concentration en solution.



Figure 33 : Expérience de compétition de l'IHP, du BPG et de l'ITPP pour l'hémoglobine (ratio 0,1).

Les intensités des pics caractéristiques de chaque complexe ont été mesurées sur le spectre de masse. A partir de ces valeurs, nous pouvons calculer les proportions de chaque complexe en pourcentage (Tableau 1) :

Complexe	Proportion en solution (%)	
Hémoglobine/IHP	86,3	
Hémoglobine/BPG	7,2	
Hémoglobine/ITPP	6,4	

Tableau 1 : Proportion relative des complexes hémoglobine/IHP, hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP.

Les intensités des pics caractéristiques de chaque complexe pouvant être reliées à leur concentration en solution, ces pourcentages reflètent les valeurs relatives des constantes de stabilité des trois complexes hémoglobine/effecteur allostérique. Comme les biologistes l'avaient évalué de façon indirecte, la constante de stabilité du complexe hémoglobine/IHP est beaucoup plus élevée que celles des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP et ces deux dernières semblent être du même ordre de grandeur.

Afin de mieux évaluer les constantes de stabilité des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP, nous avons réalisé la même expérience de compétition en ajoutant à l'hémoglobine uniquement le BPG et l'ITPP à des concentrations identiques (ratio 1) (Figure 34).



Figure 34 : Expérience de compétition du BPG et de l'ITPP pour l'hémoglobine (ratio 1).

De la même façon, les intensités des pics caractéristiques de chaque complexe ont été mesurées sur le spectre de masse. Nous avons pris en compte les intensités de tous les pics correspondant à l'hémoglobine liée à un ou plusieurs effecteurs allostériques, chaque espèce comprenant au moins l'effecteur allostérique lié au site de fixation spécifique. A partir

de ces valeurs, nous avons calculé les proportions de chaque complexe en pourcentage (Tableau 2) :

Complexe	Proportion en solution (%)
Hémoglobine/BPG	25,8
Hémoglobine/ITPP	74,2

Tableau 2 : Proportion relative des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP.

Les constantes de stabilité des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP sont bien du même ordre de grandeur par rapport à celle du complexe hémoglobine/IHP, toutefois, la constante de stabilité du complexe hémoglobine/ITPP est tout de même presque trois fois plus importante que celle du complexe hémoglobine/BPG.

4.2.4. Conclusions

Nous avons ainsi pu évaluer les stabilités relatives de trois effecteurs allostériques d'intérêt pour l'hémoglobine avec une expérience de compétition suivie par ESI-MS.

Avant de pouvoir réaliser cette expérience de compétition, un travail d'optimisation a été nécessaire: i) tout d'abord sur la solubilisation et le dessalage de l'hémoglobine, ii) puis sur les paramètres instrumentaux, pour lesquels il a fallu trouver le compromis le plus adapté entre une désolvatation et une transmission des ions efficaces et la conservation des interactions non-covalentes. L'hémoglobine, ainsi que son interaction avec les trois effecteurs allostériques, ont pu être étudiés avec succès par ESI-MS.

Les résultats obtenus ont confirmé les hypothèses des biologistes : à savoir la constante de stabilité du complexe hémoglobine/IHP est dix fois plus élevée que celles des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP et ces deux dernières sont du même ordre de grandeur. De plus, une information supplémentaire a pu être apportée sur les constantes de stabilité relative des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP : la constante de stabilité du complexe hémoglobine/ITPP est presque trois fois plus importante que celle de complexe hémoglobine/BPG.

RÉFÉRENCES

1. Fylaktakidou, K. C.; Lehn, J. M.; Greferath, R.; Nicolau, C., Inositol tripyrophosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (6), 1605-1608.

2. Biolo, A.; Greferath, R.; Siwik, D. A.; Qin, F. Z.; Valsky, E.; Fylaktakidou, K. C.; Pothukanuri, S.; Duarte, C. D.; Schwarz, R. P.; Lehn, J. M.; Nicolau, C.; Colucci, W. S., Enhanced exercise capacity in mice with severe heart failure treated with an allosteric effector of hemoglobin, myo-inositol trispyrophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (6), 1926-1929.

3. Kieda, C.; Greferath, R.; Da Silva, C. C.; Fylaktakidou, K. C.; Lehn, J. M.; Nicolau, C., Suppression of hypoxia-induced HIF-1 alpha and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (42), 15576-15581.

4. Sihn, G.; Walter, T.; Klein, J. C.; Queguiner, I.; Iwao, H.; Nicolau, C.; Lehn, J. M.; Corvol, P.; Gasc, J. M., Anti-angiogenic properties of myo-inositol trispyrophosphate in ovo and growth reduction of implanted glioma. *Febs Letters* **2007**, *581* (5), 962-966.

5. Kang, M. J.; Pyun, J. C.; Lee, J. C.; Choi, Y. J.; Park, J. H.; Park, J. G.; Lee, J. G.; Choi, H. J., Nanowire-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry for quantitative analysis of small molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19* (21), 3166-3170.

6. Hatsis, P.; Brombacher, S.; Corr, J.; Kovarik, P.; Volmer, D. A., Quantitative analysis of small pharmaceutical drugs using a high repetition rate laser matrix-assisted laser/desorption ionization source. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17* (20), 2303-2309.

7. Wilkinson, W. R.; Gusev, A. I.; Proctor, A.; Houalla, M.; Hercules, D. M., Selection of internal standards for quantitative analysis by matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, *357* (3), 241-248.

8. Gusev, A. I.; Wilkinson, W. R.; Proctor, A.; Hercules, D. M., Direct quantitative analysis of peptides using matrix assisted laser desorption ionization. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1996**, *354* (4), 455-463.

9. Kang, M. J.; Tholey, A.; Heinzle, E., Application of automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the measurement of enzyme activities. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15* (15), 1327-1333.

10. Peng, J.; Mandal, R.; Sawyer, M.; Li, X. F., Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **2005**, *51* (12), 2274-2281.

11. Griffith, W. P.; Kaltashov, I. A., Protein conformational heterogeneity as a binding catalyst: ESI-MS study of hemoglobin H formation. *Biochemistry* **2007**, *4*6 (7), 2020-2026.

12. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D., Observation of noncovalent enzyme substrate and enzyme product complexes by ion-spray mass-spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7818-7819.

13. Loo, J. A., Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *200* (1-3), 175-186.

14. Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F., Comparative ESI-MS study of similar to 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* (5), 419-429.

15. Pramanik, B. N.; Bartner, P. L.; Mirza, U. A.; Liu, Y. H.; Ganguly, A. K., Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: An emerging technology. *Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *33* (10), 911-920.

Chapitre 5

L'apport de la spectrométrie de masse pour la mesure de constantes de stabilité de complexes protéine/protéine

Nous avons cherché à développer une méthode basée sur la spectrométrie de masse permettant de déterminer des constantes de stabilité absolues de complexes protéine/protéine. Ce travail a été mené en collaboration avec le laboratoire de Biochimie dirigé par Rita Bernhardt à Sarrebruck (Allemagne).

5.1. LE CONTEXTE BIOLOGIQUE

5.1.1. Adx et AdR : leur rôle dans l'organisme

Les ferrédoxines sont une famille de petites protéines (6 à 25kDa) possédant un cluster fersoufre comme groupement redox actif. Elles sont largement présentes chez les bactéries, les plantes et les animaux et participent à de nombreuses réactions de transfert d'électrons.

L'adrénodoxine (Adx), notamment, appartient à la famille des ferrédoxines. Elle est impliquée dans le transfert d'électron entre l'adrénodoxine réductase (AdR) et le cytochrome P (CYP)¹. Adx fait partie du système mitochondrial de biosynthèse des stéroïdes chez les vertébrés. Dans cette étude, nous nous focaliserons sur le complexe Adx/AdR (Figure 1).

Actuellement, le mécanisme d'interaction entre ces partenaires redox lors du transfert d'électron n'est pas clairement établi. L'étude d'Adx tronqués ou mutants offrent l'opportunité de mieux comprendre ce mécanisme^{2,3} : l'influence des mutations sur l'affinité entre les partenaires redox peut permettre par exemple d'identifier les sites d'interactions. Une mesure fiable des constantes de stabilité des complexes formés à partir des Adx tronqués ou mutants est par conséquent nécessaire.

Nous nous sommes intéressés, en plus du complexe formé avec Adx 1-128 (l'Adx wild type), aux Adx tronqués ou mutants suivant : Adx 4-108, Adx 4-114, Adx S112W, Adx T54S D113Y et Adx D76E.



Figure 1 : Structure RX du complexe Adx/AdR.

5.1.2. La mesure des constantes de stabilité en biologie

Le laboratoire de Biochimie avec lequel nous avons collaboré pour cette étude utilise deux techniques différentes pour déterminer les constantes de stabilité de complexes protéine/protéine.

5.1.2.1. La résonnance plasmonique de surface (SPR)

La résonnance plasmonique de surface est une méthode physique qui mesure directement la force de liaison entre deux partenaires. La SPR permet la visualisation en temps réel de l'interaction entre Adx et AdR. Adx est immobilisée sur un support recouvert d'une fine couche métallique (greffage par biotinylation via une couche de steptavine). Un flux continu de solution d'AdR circule au contact de ce support métallique sur lequel un faisceau lumineux est envoyé. L'association d'Adx et d'AdR entraîne une modification de l'indice de réfraction du support qui altère l'angle avec lequel le faisceau lumineux est réfléchi. Les constantes d'association et de dissociation du complexe Adx/AdR sont directement déduites de cette expérience.

Les constantes de stabilité des complexes Adx/AdR déterminées par SPR sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Adx/AdR	Kd (nM)
Adx 1-128 (Wild type)/AdR	860 ⁴
Adx 4-108/AdR	530
Adx S112W/AdR	600
Adx T54S D113Y/AdR	720

Tableau 1 : Les constantes de dissociation des complexes Adx/AdR déterminées par SPR.

5.1.2.2. La méthode du Cytochrome C

Cette méthode fonctionnelle mesure les transferts d'électron entre AdR, Adx et CYP. L'activité du complexe Adx/AdR est évaluée dans des conditions où elle est fonction de la concentration en Adx : les concentrations d'AdR et de CYP sont maintenues constantes alors que la concentration d'Adx varie. La réduction de CYP est estimée par la mesure de l'absorbance à 550nm. Comme l'étape limitante est le transfert d'électron entre Adx et AdR, cette mesure permet de remonter à l'affinité du complexe Adx/AdR.

Les constantes de stabilité des complexes Adx/AdR déterminées par la méthode du Cytochrome C sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Adx/AdR	Kd (nM)
Adx 1-128 (Wild type)/AdR	5900 ⁵
Adx 4-108/AdR	7300 ⁵
Adx 4-114/AdR	3400 ⁵
Adx D76E/AdR	~ 590*

Tableau 2 : Les constantes de dissociation des complexes Adx/AdR déterminées par laméthode du Cytochrome C.

*La valeur de la constante de dissociation du complexe Adx D76E/AdR est estimée être dix fois mois élevée que celle d'Adx 1-128/AdR.

5.1.3. La spectrométrie de masse : une technique alternative pour la mesure de constantes de stabilité

La fiabilité des mesures effectuées par SPR et par la méthode du Cytochrome C est parfois remise en question :

 La SPR est parfois limitée pour les constantes de stabilité trop faibles. En effet, pour certains complexes Adx/CYP, la méthode du Cytochrome C démontre qu'un transfert d'électron a bien lieu, mais la SPR ne permet de déterminer aucune valeur;

- Pour les mesures par SPR, si les constantes d'association ou de dissociation des complexes sont trop élevées, l'association d'AdR à Adx sur le support peut être plus rapide que la diffusion d'AdR dans la solution jusqu'à Adx. Les valeurs de constantes de stabilité calculées ne reflètent alors pas les affinités en solution.
- Pour les mesures par SPR, l'immobilisation d'Adx sur le support peut restreindre ces propriétés de diffusion et de rotation et altérer la mesure des constantes de stabilité des complexes Adx/AdR. Par ailleurs, il est possible que les Adx wild type, tronqués ou mutants soient affectés différemment par le greffage, en fonction de leur mutation.
- La méthode du Cytochrome C est très utile pour détecter un transfert d'électron mais les biologistes considèrent les valeurs obtenues comme peu fiables.
- Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont dépendants de la solution tamponnée utilisée. Or les tampons ne sont pas les mêmes pour les mesures par SPR (tampon Hepes 0,01M à pH 7,4 + 0,15M de solution de chlorure de sodium + 0,005% de surfactant P20) ou par la méthode du Cytochrome C (tampon phosphate de potassium 50mM à pH 7,5 + 0,1% de Tween 20). La comparaison des résultats obtenus par ces deux méthodes est donc difficile.

Dans ce contexte, nous avons évalué les possibilités de la spectrométrie de masse pour la détermination des constantes de stabilité des complexes Adx/AdR. A plusieurs reprises, l'ESI-MS a déjà été utilisé avec succès pour le calcul de constantes de stabilité^{6,7}. Nous avons choisi de réaliser des titrages thermodynamiques plutôt que des expériences de compétition. Contrairement aux expériences de compétition, les titrages thermodynamiques permettent en effet le calcul des valeurs absolues des constantes de stabilité, sans nécessiter de complexe de référence dont la constante de stabilité est connue. De plus, nos conditions d'analyses sont axées sur la conservation des interactions non-covalentes et la transmission des ions de m/z élevé. Ainsi, la résolution maximale obtenue en conditions natives est de 2300 soit une précision de mesure de (1/2300x100=) 0,04%. La différence de masse entre deux complexes formés à partir d'Adx différents doit donc être d'au moins 32Da pour qu'ils soient identifiés sans ambiguïté (à 50% de hauteur de pic et sachant que la masse des complexes Adx/AdR est d'environ 64000 Da). Les expériences de compétition ne sont par conséquent pas adaptées à la mesure des constantes de stabilité des complexes Adx/AdR.

5.2. L'OPTIMISATION DES CONDITIONS ESI-MS

Toutes les analyses enregistrées lors de cette étude ont été réalisées par ESI-MS. Cette technique analytique a en effet déjà prouvé sa capacité à analyser des complexes de type protéine/protéine⁸,⁹.

Avant de réaliser les expériences de titrages thermodynamiques permettant le calcul des constantes de stabilité, les conditions analytiques doivent être optimisées pour la détection du complexe Adx/AdR.

5.2.1. La préparation de l'échantillon

5.2.1.1. La solubilisation des protéines

Il est nécessaire de travailler avec un solvant compatible avec le processus d'ionisation/désorption électrospray, c'est-à-dire un solvant volatil. Ce solvant doit également favoriser le maintien des édifices non-covalents en solution. Dans le cas de protéine, ce solvant doit reproduire au mieux les conditions physiologiques : il doit être aqueux, proche du pH physiologique et de force ionique contrôlée. Les sels d'ammonium, comme le citrate d'ammonium ou l'acétate d'ammonium^{10,11,12}, répondent à ces critères. C'est ce dernier solvant, l'acétate d'ammonium, que nous avons utilisé à 20mM pour diluer les protéines étudiées.

La concentration de la protéine doit quant à elle, être suffisamment élevée pour favoriser la détection du complexe et suffisamment faible pour être compatible avec l'analyse ESI-MS et éviter la formation d'agrégats non spécifiques. Pour cette étude, les protéines ont été diluées à une concentration de l'ordre de 5µM.

2.2.1.2. L'étape de dessalage

Les biologistes utilisent généralement des tampons salins (NaCl, KCl, Tris...) à des concentrations de l'ordre du millimolaire pour stabiliser les protéines et conserver ainsi leurs structures tertiaire et quaternaire. Ces tampons sont peu volatils et défavorables à une analyse ESI-MS de bonne qualité. Les sels présents dans ces tampons interagissent de façon aléatoire avec la protéine, entrainant la formation de nombreux adduits et donc une baisse conséquente de la sensibilité et de la résolution de l'analyse ESI-MS (Figure 2). Les tampons salins doivent par conséquent être systématiquement échangés contre un tampon compatible avec l'analyse de protéine par ESI-MS, comme les sels d'ammonium.

Plusieurs techniques de dessalage, comme le passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique (ou gel filtration) ou la dialyse sur membrane, sont utilisées pour échanger le tampon d'une protéine. Dans le cadre de cette étude, nous avons opté pour des systèmes d'ultracentrifugation, simples à mettre en œuvre et permettant un dessalage efficace : plusieurs cycles de dilution/concentration par centrifugation permettent d'échanger convenablement le tampon biologique par le tampon d'analyse. Le nombre de cycles optimal doit être déterminé pour chaque protéine. Un nombre trop faible de cycles entraine un dessalage insuffisant alors qu'un nombre trop élevé provoque la dénaturation de la protéine.

Le nombre de cycles de dessalage optimal n'est pas le même pour Adx et AdR. C'est en grande partie la masse de la protéine qui influence le nombre de cycles nécessaires : en général, plus la masse de la protéine est élevée, plus le nombre d'adduits de sel non spécifique est grand, donc plus le dessalage doit être long. Ainsi, il faut six cycles pour dessaler Adx et huit cycles pour dessaler AdR.

Les protéines se dégradent beaucoup plus rapidement une fois qu'elles sont dessalées. Il est donc fortement conseillé de réaliser le dessalage la veille ou le jour même de l'analyse.



Figure 2 : Spectre de masse en mode positif d'Adx non dessalée à 5μM dans AcONH₄ 20mM. La formation d'adduits de sels provoque l'élargissement des pics multichargés. La sensibilité et la résolution sont alors diminuées de façon significative.

5.2.2.2. L'optimisation des paramètres instrumentaux

Tout d'abord, les débits des gaz de nébulisation et de séchage doivent être réglés de façon à stabiliser le spray et à favoriser une bonne désolvatation des ions. Une désolvatation efficace est indispensable pour obtenir un spectre de masse de bonne qualité : les molécules de solvant interagissent de façon aléatoire avec la protéine, entrainant la formation de nombreux adduits et donc une baisse conséquente de la sensibilité et de la résolution de l'analyse ESI-MS.

Ensuite, le transfert des ions à travers l'interface (entre la source à pression atmosphérique et l'analyseur à pression réduite) doit être finement contrôlé pour conserver les interactions non-covalentes en phase gazeuse. En effet, si l'énergie interne des ions devient trop importante, les interactions non-covalentes sont susceptibles de se rompre. Différents paramètres sont à optimiser :

- La température des gaz de nébulisation et de séchage : ces températures doivent être suffisamment élevées pour permettre une désolvatation efficace, mais l'énergie thermique augmente l'énergie interne des ions. En général, ces températures sont ajustées en fonction du solvant utilisé et gardées constantes pendant les analyses. Nous avons fixé ces températures à 150°C pour l'analyse de protéines en solvant aqueux afin d'éviter leur dissociation.
- La tension d'accélération (Capillary Exit) : c'est la différence de potentiel entre la sortie du capillaire de désolvatation et le premier skimmer du MicrOTOF. La tension d'accélération assure la transmission des ions jusqu'à l'analyseur en leur communiquant une certaine énergie cinétique. Cette énergie cinétique détermine en grande partie l'énergie interne qui leur est transmise lors des collisions avec les molécules résiduelles (gaz ou solvant) dans l'interface. Ainsi, plus la tension d'accélération est élevée, plus l'énergie interne transmise aux ions lors des collisions est importante. Des collisions énergétiques favorisent la désolvatation des ions en les dissociant de leurs adduits non spécifiques de solvant ou de sels mais peuvent induire la rupture des liaisons non-covalentes. Des courbes de fragmentation

(« break down curves »), où l'intensité du signal des édifices non-covalents est tracée en fonction de la tension d'accélération, ont été établies pour le complexe Adx/AdR afin de déterminer la tension d'accélération optimale assurant une bonne transmission des ions sans induire de fragmentation. Dans le cas des complexes Adx/AdR, et ceci quelque soit l'Adx, cette valeur est de 260V.

La transmission à travers l'interface d'ions de rapport masse sur charge (m/z) élevé nécessite également l'optimisation particulière de certains paramètres :

- La tension d'accélération : les ions de rapport m/z élevés, dont l'inertie est plus grande, requièrent une énergie cinétique plus importante pour qu'ils soient transmis jusqu'à l'analyseur. La tension d'accélération optimale du complexe Adx/AdR est déterminée à l'aide de courbes de fragmentation. La valeur du Capillary Exit optimale pour observer le complexe Adx/AdR (260V) est la même pour observer AdR holo.
- L'hexapôle et le ion funnel ont pour rôle de refocaliser le faisceau d'ions qui tend à diverger. Ces guides d'ions augmentent la transmission des ions et améliore la résolution de l'appareil. Pour favoriser la transmission des ions lourds, l'amplitude du voltage appliqué sur l'hexapôle doit être augmentée à 400V dans le cas du MicrOTOF, ce qui améliore son pouvoir de refocalisation mais dégrade la transmission des ions plus légers. Dans le cas du MicrOTOF Q, le voltage appliqué sur l'hexapôle est de 800V et ceux appliqués sur les ion funnel 1 et 2 sont respectivement de 350V et 600V.

L'optimisation des paramètres instrumentaux est un compromis entre une désolvatation efficace, la conservation des interactions non-covalentes et une bonne transmission des ions de m/z élevé jusqu'à l'analyseur. Ils doivent être finement ajustés pour que le spectre de masse reflète les espèces présentes en solution.

5.3. L'ANALYSE DU COMPLEXE ADX/ADR

Avant de pouvoir analyser le complexe Adx/AdR, il est indispensable de vérifier que les protéines seules sont observées correctement par ESI-MS.

5.3.1. L'analyse d'Adx 1-128 (wild type)

Adx 1-128 est une protéine acide possédant un cluster fer-soufre (Figures 3 et 4).

GSSEDKITVH FINRDGETLT TKGKIGDSLL DVVVQNNLDI DGFGACEGTL ACSTCHLIFE QHIFEKLEAI TDEENDMLDL AYGLTDRSRL GCQICLTKAM DNMTVRVPDA VSDARESIDM GMNSSKIE

Figure 3 : La séquence d'Adx.



Figure 4 : Le cluster fer-soufre lié aux cystéines d'Adx.

L'analyse d'une protéine se déroule en deux étapes :

5.3.1.1. Analyse d'Adx 1-128 en conditions dénaturantes

Adx 1-128 est tout d'abord analysée dans un solvant légèrement acidifié (typiquement eau/acétonitrile 50/50 et 1% d'acide formique). Dans ces conditions, appelées conditions dénaturantes, les liaisons non-covalentes sont rompues en solution et la protéine perd alors sa structure tertiaire (tout en gardant se structure primaire) : la protéine est dénaturée. Adx 1-128 est alors observée sans son cluster fer-soufre.

Sous sa forme dénaturée, la protéine est dépliée. Ses sites basiques sont plus accessibles et donc plus facilement protonés (en mode d'ionisation positif). Les spectres de masse ESI-MS présentent une distribution des états de charge étendue et des états de charge plus élevés (déplacés vers des m/z plus faibles) (Figure 5).

Les conditions dénaturantes permettent d'obtenir une grande sensibilité et une bonne précision de mesure : ici, la résolution est égale à 1900, soit une précision sur la mesure de masse de 0,05%. Elles sont donc utilisées pour vérifier la qualité de l'échantillon, c'est-à-dire la séquence de la protéine (à l'aide de la masse mesurée), l'homogénéité et la pureté de l'échantillon. Ici, la masse d'Adx 1-128 mesurée sur le spectre de masse (14017,5Da) est en accord avec la masse calculée à partir de sa séquence (14017,7Da). D'autres pics très peu intenses sont présents sur le spectre de masse : ils correspondent à des protéines tronquées obtenues par protéolyses (coupure d'une liaison peptidique) lors de l'expression d'Adx 1-128.



Figure 5 : Spectre de masse électrospray en mode positif d'Adx 1-128 à 5µM dans AcONH₄ 20mM - six cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions dénaturantes. Les pics supplémentaires correspondent à des protéines tronquées obtenues par protéolyses lors de l'expression d'Adx 1-128.

5.3.1.2. Analyse d'Adx 1-128 en conditions natives

Adx 1-128 est ensuite analysée dans des conditions les plus proches possible des conditions physiologiques, c'est-à-dire dans une solution tamponnée à pH physiologique et dont la force ionique est contrôlée (ici l'acétate d'ammonium à 20mM et pH 6,7). Ces conditions dites natives permettent de conserver les interactions non-covalentes, sous réserve d'optimiser les paramètres instrumentaux. La protéine est sous sa forme native. Adx 1-128 est alors observée avec son cluster fer-soufre.

Sous sa forme native, la protéine est repliée. Ses sites basiques sont moins accessibles et donc moins facilement protonés (en mode d'ionisation positif). Les spectres de masse ESI-MS présentent une distribution des états de charge étroite et des états de charge moins élevés (déplacés vers des m/z plus élevés) (Figure 6).

Les conditions natives permettent d'observer les édifices non-covalents en solution avec suffisamment de précision pour déterminer leur stœchiométrie : la résolution est égale à 1600, soit une précision sur la mesure de masse de 0,06%. Ici, la masse mesurée sur le spectre de masse (14194,0Da) est en accord avec la masse théorique d'Adx associée à un cluster fer-soufre (14193,5Da).



Figure 6 : Spectre de masse en mode positif d'Adx 1-128 à 5µM dans AcONH₄ 20mM - six cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions natives. Les pics supplémentaires (*) correspondent à des protéines tronquées obtenues par protéolyses lors de l'expression d'Adx 1-128.

5.3.2. L'analyse des Adx mutants et tronqués

Les Adx mutants et tronqués sont tous analysés dans les mêmes conditions qu'Adx 1-128 en conditions dénaturantes et natives. Les masses mesurées sur les spectres de masse en conditions dénaturantes sont en accord avec les masses calculées à partir de leur séquence (Tableau 3).

Adx	Masses mesurées (Da)	Masses théoriques (Da)
Adx 4-108	11780,3	11780,4
Adx 4-114	12337,9	12339,0
Adx S112W	12351,7	12351,9
Adx T54S D113Y	14051,2	14051,8
Adx D76E	14031,7	14031,7

Tableau 3 : Masses expérimentales et théoriques des Adx mutants et tronqués en conditions dénaturantes.

En conditions natives, les masses mesurées sur les spectres de masse correspondent aux masses théoriques des Adx associées à un cluster fer-soufre (Figure 7 et Tableau 4).



Figure 7 : Spectres de masse en mode positif des Adx tronqués et mutants à 5µM dans AcONH₄ 20mM : Adx 1-108 (a.), Adx 1-114 (b.), Adx S112W (c.), Adx T54S D113Y (d.), Adx D76E (e.) - six cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions natives. Les pics supplémentaires correspondent à des protéines tronquées obtenues par protéolyses lors de l'expression des Adx.

Adx	Masses mesurées (Da)	Masses théoriques (Da)
Adx 4-108	11954,2	11956,2
Adx 4-114	12512,3	12514,8
Adx S112W	12525,8	12527,7
Adx T54S D113Y	14225,4	14227,6
Adx D76E	14205,6	14207,5

Tableau 4 : Masses expérimentales et théoriques des Adx mutants et tronqués en conditions natives.

5.3.3. L'analyse d'AdR

AdR est une protéine basique associée par des interactions non-covalentes avec un cofacteur : le FAD (le sel de flavine adenine dinucleotide) (Figures 8 et 9).

STQEQTPQICVVGSGPAGFYTAQHLLKHHSRAHVDIYEKQLVPFGLVRFGVAPDHPEVKNVINTFTQTARSDRCAFYGNVEVGRDVTVQELQDAYHAVVLSYGAEDHQALDIPGEELPGVFSARAFVGWYNGLPENRELAPDLSCDTAVILGQGNVALDVARILLTPPDHLEKTDITEAALGALRQSRVKTVWIVGRRGPLQVAFTIKELREMIQLPGTRPMLDPADFLGLQDRIKEAARPRKRLMELLLRTATEKPGVEEAARRASASRAWGLRFFRSPQQVLPSPDGRRAAGIRLAVTRLEGIGEATRAVPTGDVEDLPCGLVLSSIGYKSRPIDPSVPFDPKLGVVPNMEGRVVDVPGLYCSGWVKRGPTGVITTTMTDSFLTGQILLQDLKAGHLPSGPRPGSAFIKALLDSRGVWPVSFSDWEKLDAEEVSRGQASGKPREKLLDPQEMLRLLGHFF

Figure 8 : La séquence d'AdR.



Figure 9 : Le cofacteur d'AdR, FAD.

5.3.1.1. Analyse d'AdR en conditions dénaturantes

AdR est tout d'abord analysée en conditions dénaturantes dans un solvant légèrement acidifié (typiquement eau/acétonitrile 50/50 et 1% d'acide formique). AdR est alors observée sans FAD (Figure 10).

La masse d'AdR mesurée sur le spectre de masse (50296,6Da) est en accord avec la masse calculée à partir de sa séquence (50296,5Da). La résolution est égale à 1500, soit une précision sur la mesure de masse de 0,07%.



Figure 10 : Spectre de masse en mode positif d'AdR à 5µM dans eau/acétonitrile/1% d'acide formique - huit cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions dénaturantes.

5.3.1.2. Analyse d'AdR en conditions natives

AdR est ensuite analysée dans des conditions les plus proches possibles des conditions physiologiques, c'est-à-dire dans une solution tamponnée à pH physiologique et dont la force ionique est contrôlée (ici l'acétate d'ammonium 20mM et pH 6,7). AdR doit donc être associée à son cofacteur FAD (Figure 11).

Le spectre de masse présente deux massifs distincts : l'un correspondant à AdR associé à FAD (masse mesurée : 51083,5Da, masse théorique : 51082,1Da, la résolution est égale à 2200, soit une précision sur la mesure de masse de 0,05%), l'autre à AdR seul (masse mesurée : 50296,7Da, masse théorique : 50296,5Da). Quel que soit le lot d'AdR étudié, nous avons rencontré à chaque fois le même phénomène : AdR n'est pas associé entièrement à FAD. Le taux de fixation de FAD sur AdR varie en fonction du lot, ce qui indique que ce problème n'est pas dû à la fragmentation d'AdR lors de l'analyse ESI-MS. Les biologistes supposent qu'une partie du FAD est perdue lors de la purification d'AdR. Or AdR apo (sans FAD) ne permet pas de former le complexe Adx/AdR. Nous avons donc intégré dans nos calculs des constantes de stabilité le pourcentage d'AdR holo (avec FAD).



Figure 11 : Spectre de masse en mode positif d'AdR holo à 5µM dans AcONH₄ 20mM - huit cycles de dessalage le jour de l'analyse - conditions natives. Des pics correspondants à AdR apo (*) sont également présents sur le spectre.

5.3.4. L'analyse des complexes Adx/AdR

Un mélange équimolaire d'Adx et d'AdR, dessalés séparément (six et huit cycles respectivement), est préparé et incubé à 4°C pendant vingt minutes. Les complexes sont analysés en conditions natives.

La tension d'accélération optimale, permettant de conserver les interactions non-covalentes tout en assurant une désolvatation efficace et une bonne transmission des ions de m/z élevé jusqu'à l'analyseur, est déterminée à l'aide de courbes de fragmentation. L'intensité des pics correspondant au complexe intact est tracée en fonction de la tension d'accélération (Figure 12). Jusqu'à 260V, l'intensité des pics correspondant au complexe intact augmente avec la tension d'accélération : la désolvatation et la transmission des ions sont de plus en plus efficaces. Au-delà de 260V, cette intensité chute : la tension d'accélération, et donc l'énergie interne des ions, sont devenues trop importantes, provoquant la rupture des interactions non-covalentes. La tension d'accélération optimale correspond à la tension pour laguelle la désolvatation et la transmission des ions est la plus efficace sans rupture des liaisons noncovalentes, c'est-à-dire 260V pour le complexe Adx 1-128/AdR. Les courbes de fragmentation des complexes formés à partir d'Adx trongués ou mutants conduisent au même résultat. Il est intéressant de noter que tous les complexes Adx/AdR se fragmentent en phase gazeuse à la même valeur de Capillary Exit alors que leurs affinités en solution sont a priori différentes : cette observation prouve que la solvatation des protéines joue un important sur les affinités protéine/protéine. L'optimisation des rôle paramètres instrumentaux est donc la même quelque soit le complexe Adx/AdR.



Figure 12 : Courbe de fragmentation du complexe Adx 1-128/AdR.

Les spectres de masse, obtenus après l'optimisation des conditions de préparation de l'échantillon et des paramètres instrumentaux, confirment la stœchiométrie 1:1 du complexe Adx/AdR pour tous les Adx (Tableau 5, Figure 13). La résolution est égale à 2300, soit une précision sur la mesure de masse de 0,05%.

Il est à noter que, quel que soit l'Adx à partir duquel le complexe est formé, le même état de charge (15+) est majoritaire. La nature de la mutation n'induit a priori pas de changement de conformation du complexe qui aurait pu aboutir à une protonation différente.

Complexe	Masses mesurées (Da)	Masses théoriques (Da)
Adx 1-128/AdR	65264.4	65271.6
Adx 4-108/AdR	63031.2	63038.9
Adx 4-114/AdR	63585.7	63596.9
Adx S112W/AdR	63599.9	63609.8
Adx T54S D113Y/AdR	65301.1	65309.7
Adx D76E/AdR	65277.6	65289.6

Tableau 4 : Masses expérimentales et théoriques des complexes Adx/AdR.



Figure 13 : Spectres de masse en mode positif des complexes Adx 1-128/AdR (a.), Adx 4-108/AdR (b.), Adx 4-114/AdR (c.), Adx S112W/AdR (d.), Adx T54S D113Y/AdR (e.) et Adx D76E (f.), à 5µM dans AcONH₄ 20Mm, ratio 1 - incubation à 4°C pendant 20 minutes - conditions natives. Sur les spectres sont présents : le complexe Adx/AdR (○), AdR holo (▲), et Adx holo (□).

5.3.5. La validation des résultats

Il est indispensable de s'assurer que l'association observée par ESI-MS est bien spécifique et ne correspond donc pas à des agrégats formés en phase gazeuse. Nous avons réalisé ce contrôle en comparant les spectres de masse obtenus en conditions natives et dénaturantes. Si le complexe Adx/AdR préexiste en solution, les conditions dénaturantes, éloignées des conditions physiologiques, doivent le dissocier¹³. Or le spectre de masse du complexe Adx/AdR en conditions natives présente majoritairement un massif caractéristique du complexe intact alors que seules Adx et AdR apo (sans cluster fer-soufre ou cofacteur) sont observées sur le spectre de masse en conditions dénaturantes (spectre non présenté).

Par ailleurs, lorsque la tension d'accélération est augmentée (les paramètres instrumentaux favorisent donc la fragmentation des complexes), le complexe Adx/AdR se fragmente en Adx et AdR (confère les courbes de fragmentation).

5.4. LE TITRAGE THERMODYNAMIQUE SUIVI PAR ESI-MS

Lors de la détermination de constantes de dissociation par ESI-MS, la réaction de complexation a lieu en solution. L'ESI-MS est utilisé comme un détecteur des espèces formées en solution. C'est pourquoi les paramètres instrumentaux doivent être optimisés pour que le spectre de masse reflète l'image de la solution.

5.4.1. Les prérequis

Nous avons tout d'abord vérifié la solubilité des Adx et d'AdR dans l'acétate d'ammonium à 20mM à l'aide d'expériences de Bradford car une mauvaise solubilité des protéines dans la solution tamponnée entrainerait une sous-estimation de la concentration du complexe en solution. L'expérience Bradford mesure la concentration des protéines en solution par un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance à 595nm du bleu de Coomassie avant et après sa fixation sur certains acides aminés des protéines. Ces expériences ont montré que tous les Adx et AdR étaient solubles dans l'acétate d'ammonium à 20mM.

Le calcul des constantes de dissociation nécessite de connaître précisément la concentration initiale d'Adx et d'AdR en solution. Or lors de l'étape de dessalage, une partie des protéines est éliminée à travers la membrane. Pour connaitre exactement le pourcentage de perte en protéine, des expériences de Bradford sont également réalisées sur Adx et AdR après dessalage. La concentration d'AdR nécessite une deuxième correction : il faut prendre en compte uniquement la concentration d'AdR susceptible de former un complexe, c'est-à-dire la concentration d'AdR holo (associé à son cofacteur FAD).

La détermination de constantes de dissociation absolues impose de pouvoir relier l'intensité des pics correspondant à chaque espèce à leur concentration en solution. Le spectre de masse doit donc refléter fidèlement la distribution des espèces en solution :

• Les paramètres instrumentaux ont été optimisés afin d'éviter toute fragmentation du complexe qui entrainerait une sous-estimation de sa concentration en solution.

- La concentration d'Adx et d'AdR doit être suffisamment élevée pour favoriser la formation du complexe et suffisamment faible pour être compatible avec l'analyse ESI-MS et éviter la formation d'agrégats non spécifiques. Nous avons choisi la même concentration que pour les analyses d'Adx et d'AdR (5µM), pour lesquelles les interactions non-covalentes avec leur cluster ou leur cofacteur étaient formées, sans observer la présence d'agrégat non spécifique.
- AdR (51082.1Da) et le complexe (65275.6Da) sont relativement proches en masse. Nous posons donc l'hypothèse que leur rendement d'ionisation et de désolvatation et leur facteur de réponse sont similaires. Les intensités relatives des pics caractéristiques de chaque espèce peuvent alors être reliées à leur concentration en solution. La masse d'Adx (14193.5Da) par contre est trop éloignée de celle du complexe pour faire la même hypothèse. C'est pourquoi nous avons titré AdR par Adx et non pas l'inverse.

5.4.2. La mise en œuvre expérimentale et le calcul des constantes de dissociation

Adx et AdR sont dessalés séparément (six et huit cycles respectivement). Différentes solutions contenant une concentration constante d'AdR (5μ M) et une concentration variable d'Adx (entre 0.5 et 15 μ M) sont préparées et incubées à 4°C pendant vingt minutes (informations données par les biologistes).

Les intensités de tous les pics correspondant au complexe et à AdR sont mesurées directement sur les spectres de masse, obtenus en conditions natives pour chaque solution. Chaque spectre de masse est moyenné sur trois minutes d'enregistrement minimum. Le rapport R a été défini égal à la concentration du complexe sur celle d'AdR (confère l'Etude Bibliographique, section 2.2.3.1.7.). Comme on considère que les intensités relatives des pics correspondant au complexe et à AdR reflètent les concentrations de ces deux espèces en solution, le rapport R se calcule en divisant l'intensité des pics du complexe sur celle des pics d'AdR. (1/R) est ensuite tracé en fonction de la concentration d'Adx initiale en solution (Figure 14).

Une régression non linéaire est effectuée sur les points obtenus à l'aide d'une équation adaptée de celle de Daniel et coll.¹⁴ dont la démonstration à été faite précédemment (confère l'Etude Bibliographique, section 2.2.3.1.7.) (Figure 15). La valeur de la constante de dissociation K_d du complexe est calculée en résolvant cette équation pour des concentrations d'Adx et d'AdR initiales connues. Nous avons opté pour cette équation plutôt que pour le Scatchard Plot car cette régression non linéaire est plus robuste par rapport aux erreurs expérimentales.

Chaque titrage est répété trois fois sur des lots d'Adx et d'AdR différents et des jours différents.



Figure 14 : Courbe obtenue à la suite du titrage d'AdR par Adx 1-128 : le ratio des concentrations d'AdR et du complexe est tracé en fonction de la concentration initiale d'Adx.

$\frac{I(AdR)}{I(Adx.AdR)} = -\frac{\left(-Kd + [Adx]i - [AdR]i - \sqrt{4 Kd [Adx]i + (Kd - [Adx]i + [AdR]i)^2}\right)}{2 [Adx]i}$

Figure 15 : L'équation de Jecklin et coll.¹⁵ utilisée pour la régression non linéaire. [Adx]_i et [AdR]_i sont les concentrations initiales d'Adx et d'AdR, K_d, la constante de dissociation et R le rapport des concentration du complexe et d'AdR.

5.4.3. Les résultats obtenus pour le complexe Adx 1-128/AdR

Etant donné que les constantes de dissociation les plus fiables déterminées par SPR et par la méthode du Cytochrome C sont celles du complexe Adx 1-128/AdR, ce complexe est utilisé comme référence pour valider notre approche.

Expérimentalement, nous avons obtenu la courbe ci-dessus pour le complexe Adx 1-128/AdR (Figure 14). La valeur moyenne de la constante de dissociation obtenue à partir de trois titrages différents est de 1740nM. Cette valeur doit être comparée avec les valeurs obtenues par SPR et par la méthode du Cytochrome C, respectivement de 860nM et 5900nM.

La valeur de la constante de dissociation du complexe Adx 1-128/AdR calculée à la suite du titrage suivi par ESI-MS étant en accord raisonnable avec les valeurs obtenues par les deux autres méthodes (la SPR et la méthode du Cytochrome C), la même expérience de titrage est réalisée dans les mêmes conditions analytiques sur les complexes formés à partir d'Adx tronqués ou mutants.

5.4.4. Les résultats obtenus pour les complexes formés à partir d'Adx tronqués ou mutants

Le tableau suivant résume les valeurs moyennes des constantes de dissociation calculées suite au titrage suivi par ESI-MS, effectué dans les mêmes conditions analytiques que le titrage d'Adx 1-128/AdR. La précision de nos résultats est évaluée à l'aide du RSD (Relative Standard Deviation). Les courbes de titrages expérimentales sont regroupées dans la Figure 16).

Adx/AdR	Kd (nM)	RSD (%)
Adx 1-128 (Wild type)/AdR	1740	2,8
Adx 4-108/AdR	2430	10,2
Adx 4-114/AdR	6690	4,8
Adx S112W/AdR	10990	10,1
Adx T54S D113Y/AdR	32710	9,6
Adx D76E/AdR	3780	11,3

Tableau 5 : Les constantes de dissociation des complexes Adx/AdR déterminées par ESI-MS.





Figure 16 : Courbes obtenues à la suite des titrage d'AdR par Adx 4-108 (a.), Adx 4-114 (b.), Adx S112W (c.), Adx T54S D113Y (d.), Adx D76E (e) : le ratio des concentrations d'AdR et du complexe est tracé en fonction de la concentration initiale d'Adx.

5.4.5. Reproduction des expériences de titrage suivi par ESI-MS sur le MicrOTOF Q

Nous avons voulu vérifier la répétabilité de nos mesures sur un autre spectromètre de masse, le MicrOTOF Q. L'atout majeur du MicrOTOF Q par rapport au MicrOTOF est l'ajout d'un hexapôle supplémentaire pouvant être utilisé comme cellule de collision et d'un ion funnel. Lors de l'analyse d'édifices non-covalents de haut poids moléculaire, comme le complexe Adx/AdR, l'hexapôle et l'ion funnel sont utilisés pour refocaliser le faisceau d'ions dans l'interface. Ainsi, la sensibilité est nettement améliorée.

A ce jour, seul le titrage de certains complexes a pu être reproduit une unique fois (Tableau 6). Les expériences de titrage sur le MicrOTOF Q sont encore actuellement en cours.
Cependant, les mesures déjà effectuées sur le MicrOTOF Q indiquent une bonne concordance avec les résultats obtenus sur le MicrOTOF.

Adx/AdR	Kd (nM) MicrOTOF	Kd (nM) MicrOTOF Q
Adx 1-128 (Wild type)/AdR	1740	1230
Adx 4-108/AdR	2430	600
Adx 4-114/AdR	6690	9350
Adx D76E/AdR	3780	4340

Tableau 6 : Les constantes de dissociation des complexes Adx/AdR calculées suite aux titrages réalisés sur le MicrOTOF et le MicrOTOF Q.

5.4.6. Comparaison des valeurs de constantes de dissociation obtenues par trois méthodes différentes

Le tableau ci-après résume les valeurs moyennes des constantes de dissociation calculées suite au titrage suivi par ESI-MS ainsi que les constantes de dissociation évaluées par SPR et la méthode du Cytochrome C.

Adx/AdR	Kd (nM) SPR	Kd (nM) Cytochrome C	Kd (nM) ESI-MS
Adx 1-128 (Wild type)/AdR	860	5900	1740
Adx 4-108/AdR	530	7300	2430
Adx 4-114/AdR	/	3400	6690
Adx S112W/AdR	600	/	10990
Adx T54S D113Y/AdR	720	/	32710
Adx D76E/AdR	1	~ 590	3780

Tableau 7 : Les constantes de	dissociation des	complexes	Adx/AdR	déterminées	oar	SPR,
	Cytochrome C	et ESI-MS.				

Il est difficile d'établir une conclusion tranchée sur ces résultats. Les valeurs de constantes de dissociation les plus fiables déterminées par SPR et la méthode du Cytochrome C sont celles du complexe Adx 1-128/AdR, étudié depuis plusieurs années. Or ces deux valeurs diffèrent de presqu'un facteur sept. La valeur calculée par ESI-MS semble plutôt valider la méthode du Cytochrome C. Les valeurs obtenues par SPR ou par la méthode du Cytochrome C pour les autres complexes sont sujettes à controverse pour les biologistes avec lesquels nous avons collaboré : les analyses n'ont pas toutes été conduites dans les mêmes conditions analytiques (notamment concernant le tampon utilisé) et les résultats n'ont pas toujours été vérifiés. De nouvelles analyses SPR et Cytochrome C, utilisant comme tampon l'acétate d'ammonium, sont en cours au laboratoire de Biochimie de Rita Bernhardt.

De même, l'ordre de stabilité des complexes n'est pas le même selon la méthode utilisée : par exemple, les mesures par SPR indiquent que le complexe Adx 4-108/AdR est plus stable que le complexe Adx 1-128/AdR alors que les mesures par la méthode du Cytochrome C indiguent le contraire. Les résultats obtenus par ESI-MS proposent quant à eux un ordre de stabilité des complexes différent de ces deux méthodes. Mais la méthode utilisant l'ESI-MS a l'avantage de distinguer visuellement des constantes de dissociation différentes. Dans ce but, nous avons tracé le rapport des intensités du complexe et d'AdR en fonction de la concentration d'Adx initiale (Figure 17). Les pentes les plus abruptes observées sur ces courbes correspondent aux complexes les plus stables, c'est-à-dire les complexes Adx 1-128/AdR et Adx 4-108/AdR. De même, les pentes les plus douces observées sur ces courbes correspondent aux complexes les moins stables, c'est-à-dire les complexes Adx S112W/AdR et Adx T54S D113Y/AdR. Les complexes Adx/AdR peuvent être alors classés en trois groupes en fonction de leur stabilité : Adx 1-128/AdR et Adx 4-108/AdR sont plus stables que Adx 4-114/AdR et Adx D76E/AdR, eux-mêmes plus stables que Adx S112W/AdR et Adx T54S D113Y/AdR. Ces observations graphiques sont confirmées par le calcul des constantes de dissociation.





Figure 17 : Le rapport des intensités du complexe et d'AdR est tracé en fonction de la concentration d'Adx initiale pour les complexes Adx 1-128/AdR (a.), Adx 4-108/AdR (b.), Adx 4-114/AdR (c.), Adx S112W/AdR (d.), Adx T54S D113Y/AdR (e.), Adx D76E/AdR (f.).

Plusieurs expériences ont été également conduites pour vérifier les résultats déterminés par ESI-MS :

- La vérification de la solubilité des protéines seules dans le tampon acétate d'ammonium. Une mauvaise solubilité des protéines dans la solution tamponnée entrainerait une sous-estimation de la concentration du complexe en solution.
- La vérification des concentrations d'Adx et d'AdR après dessalage par la méthode Bradford, ces valeurs étant indispensables au calcul des constantes de dissociation.
- La vérification de la stabilité des protéines au cours du titrage : des analyses d'Adx et d'AdR seuls ont été enregistrées tout au long du titrage. Les spectres de masse obtenus en début et en fin de titrage sont identiques. Aucune perte de sensibilité et aucune modification des états de charge majoritaire (caractéristique d'une dénaturation de la protéine) n'ont été observées.
- La vérification de la répétabilité de la méthode par ESI-MS sur des lots de protéines différents et des jours différents.

Il reste cependant difficile de conclure quant à la méthode la plus fiable parmi les trois étudiées. Cette étude est toujours en cours, de notre côté comme du côté des biologistes, afin de vérifier les résultats de chacun.

5.5. ETUDE DES COMPLEXES ASSOCIES A DES MODULATEURS

La plupart des processus biologiques sont dépendants de la formation de complexes entre protéines. Par conséquent, la modulation des complexes de protéines et donc de leurs fonctions offre de nouvelles opportunités pour la recherche médicale¹⁶.

Par exemple, la putrescine, la spermidine et la spermine influencent les interactions protéine/protéine entre AdR, Adx et CYP à des concentrations similaires aux concentrations physiologiques¹⁷. Il a été montré que ces polyamines avaient un effet modulateur sur des interactions particulières ainsi que sur le système AdR/Adx/CYP dans son ensemble.

Cependant la recherche de petites molécules spécifiques pouvant jouer le rôle de modulateur est très ardue. Dans ce contexte, nous avons voulu tester l'association du complexe Adx 1-128/AdR avec des foldamères. Ces molécules de synthèse sont sensées mimer le comportement des peptides.

5.5.1. Les foldamères

Le laboratoire « Synthèse Organique et Biostructures » dirigé par Brigitte Jamart (Nancy), avec lequel nous collaborons, synthétise des pseudopeptides. Nous avons tenté d'évaluer l'affinité de ces foldamères pour le complexe Adx/AdR.

Les premiers foldamères (Figure 18) que nous avons testé n'ont montré que peu, voire pas d'affinité pour le complexe Adx 1-128/AdR (Tableau 7). Pour ceux montrant une faible affinité pour le complexe, il est nécessaire d'ajouter 20 équivalents de foldamères pour observer une fixation non spécifique sur le complexe (Figure 19). Les analyses se poursuivent actuellement sur des foldamères de structure différentes.

Foldamères	Affinité	Spécificité
1	Faible	Très faible
2	Très faible	Faible
3	Très faible	Faible
4	Très faible	Faible
5	Nulle	
6	Nulle	
7	Nulle	
8	Nulle	

Tableau 7 : Affinité et spécificité des foldamères testés pour le complexe Adx 1-128/AdR.



Figure 18 : Structure des foldamères testés (Pht correspond à un phtalate).





Figure 19 : Spectres de masse en mode positif du complexe Adx 1-128/AdR à 5µM dans AcONH₄ 20Mm associé au foldamère 1 au ratio 2 (a.), au foldamère 1 au ratio 20 (b.), au foldamère 2 au ratio 20 (c.), au foldamère 3 au ratio 20 (d.), au foldamère 4 au ratio 50 (e.) incubation à 4°C pendant 20 minutes - conditions natives. Sur les spectres sont présents : le complexe Adx/AdR (○), Adx holo (□) et le complexe Adx/AdR associé à un foldamère (☆).

Parmi les foldamères testés jusqu'à présent, aucun ne semble avoir suffisamment d'affinité pour le complexe Adx/AdR pour être un modulateur efficace.

5.5.2. Perspectives

Les constantes de dissociation du complexe Adx 1-128/AdR associé à la putrescine, la spermidine et la spermine sont connues¹⁷. Chacun de ces trois modulateurs renforcent la stabilité du complexe Adx 1-128/AdR.

Ces constantes de stabilité supplémentaires vont nous permettre de poursuivre la comparaison entre les deux méthodes de détermination des constantes de stabilité que sont la SPR et la spectrométrie de masse.

5.6. CONCLUSIONS

Dans cette étude, nous avons optimisé les paramètres expérimentaux (le tampon utilisé, l'étape de dessalage) et instrumentaux pour pouvoir caractériser les différents complexes Adx/AdR et déterminer leur constante de dissociation à l'aide de titrages thermodynamiques suivis par ESI-MS.

Ainsi, nous avons tout d'abord validé notre approche à l'aide du complexe Adx 1-128/AdR pour lequel les constantes de dissociation déterminées par SPR et la méthode du Cytochrome C sont les plus fiables. Comme les constantes de dissociation obtenues par ESI-MS étaient en accord raisonnable avec celles obtenues par SPR et la méthode du Cytochrome C, le même protocole de titrages thermodynamiques suivi par ESI-MS a été utilisé pour déterminer les constantes de dissociation des complexes Adx/AdR formés à partir d'Adx tronqués ou mutants.

Cependant, les constantes de dissociation obtenues par les trois techniques testées diffèrent significativement : les valeurs sont différentes mais l'ordre de stabilité des complexes est également différent. Plusieurs expériences sont actuellement en cours pour tenter de vérifier ces résultats, notamment la détermination des constantes de dissociation par SPR et la méthode du Cytochrome C en utilisant le tampon acétate d'ammonium et la détermination des constantes de dissociation du complexe Adx 1-128/AdR associé à des modulateurs.

De notre côté, nous avons tenté de vérifier tous les paramètres pouvant influencer notre approche par ESI-MS : i) la solubilité des protéines seules dans le tampon acétate d'ammonium a été vérifiée, ii) les concentrations d'Adx et d'AdR après dessalage ont été mesurées par la méthode Bradford, iii) la stabilité des protéines au cours du titrage a été vérifié, iv) la répétabilité de la méthode par ESI-MS sur des lots de protéines différents et des jours différents a été vérifiée, v) les paramètres instrumentaux ont été optimisés pour que le complexe et AdR holo aient des facteurs de réponse proche permettant de relier l'intensité des pics à leur concentration en solution. A partir du titrage thermodynamique suivi par ESI-MS, nous avons pu différencier graphiquement trois groupes de complexes en fonction de leur stabilité : Adx 1-128/AdR et Adx 4-108/AdR sont plus stables que Adx 4-114/AdR et Adx D76E/AdR, eux-mêmes plus stables que Adx S112W/AdR et Adx T54S D113Y/AdR. Ces observations graphiques sont confirmées par le calcul des constantes de dissociation.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans les PROCEEDINGS OF THE 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics en 2009 (Aurélie Même, Peran Terrier, Frank Hannemann, Rita Bernhardt, Hélène Nierengarten, Noelle Potier, Emmanuelle Leize-Wagner. Mass spectrometry contribution for stability constants measurement of protein/protein complexes.), d'un poster aux 25èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse à Grenoble en 2008, d'un poster à la *57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* à Philadelphie en 2009, d'un poster au Séminaire du GRK 532 à Saarbrücken en 2009 et de deux communications orales au Séminaire du GRK 532 à Saarbrücken en 2008 et à Nancy en 2010.

RÉFÉRENCES

1. Grinberg, A. V.; Hannemann, F.; Schiffler, B.; Muller, J.; Heinemann, U.; Bernhardt, R., Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties. Proteins-Structure Function and Genetics **2000**, 40 (4), 590-612.

2. Schiffler, B.; Kiefer, M.; Wilken, A.; Hannemann, F.; Adolph, H. W.; Bernhardt, R., The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450(scc)) and CYP11B1 (cytochrome P450(11 beta)) - Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (39), 36225-36232.

3. Worrall, J. A. R.; Reinle, W.; Bernhardt, R.; Ubbink, M., Transient protein interactions studied by NMR spectroscopy: The case of cytochrome C and adrenodoxin. *Biochemistry* **2003**, *42* (23), 7068-7076.

4. Schiffler, B.; Zollner, A.; Bernhardt, R., Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (33), 34269-34276.

5. Uhlmann, H.; Kraft, R.; Bernhardt, R., C-Terminal region of Adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron-transfer function to Cytochrome-P-450. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (36), 22557-22564.

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

7. Jecklin, M. C.; Schauer, S.; Dumelin, C. E.; Zenobi, R., Label-free determination of protein-ligand binding constants using mass spectrometry and validation using surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition* **2009**, *22* (4), 319-329.

8. Heck, A. J. R.; van den Heuvel, R. H. H., Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, *23* (5), 368-389.

9. Loo, J. A., Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16* (1), 1-23.

10. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D., Observation of noncovalent enzyme substrate and enzyme product complexes by ion-spray mass-spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7818-7819.

11. Loo, J. A., Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *200* (1-3), 175-186.

12. Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F., Comparative ESI-MS study of similar to 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* (5), 419-429.

13. Pramanik, B. N.; Bartner, P. L.; Mirza, U. A.; Liu, Y. H.; Ganguly, A. K., Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: An emerging technology. *Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *33* (10), 911-920.

14. Daniel, J. M.; McCombie, G.; Wendt, S.; Zenobi, R., Mass spectrometric determination of association constants of adenylate kinase with two noncovalent inhibitors. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14* (5), 442-448.

15. Jecklin, M. C.; Touboul, D.; Bovet, C.; Wortmann, A.; Zenobi, R., Which electrospraybased 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 (vol 19, pg 332, 2008). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19* (8), 1237-1237. Wells, J. A.; McClendon, C. L., Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* 2007, *450* (7172), 1001-1009.
 Berwanger, A.; Eyrisch, S.; Schuster, I.; Helms, V.; Bernhardt, R., Polyamines:

17. Berwanger, A.; Eyrisch, S.; Schuster, I.; Helms, V.; Bernhardt, R., Polyamines: Naturally occurring small molecule modulators of electrostatic protein-protein interactions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104* (2), 118-125.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Lors de ce travail de thèse, nous avons confirmé le potentiel de la spectrométrie de masse pour l'analyse d'édifices non-covalents, sous réserve d'optimiser finement les conditions d'analyse.

Même si l'ESI-MS reste la technique de choix en spectrométrie de masse pour l'étude d'édifices non-covalents, le MALDI-MS est une alternative intéressante lorsque les propriétés de l'analyte ne sont pas favorables à une analyse par ESI-MS. Par exemple, l'analyse de grilles neutres (impossible à ioniser en solution sans les dissocier), de commutateurs insolubles ou de caténanes ou des rotaxanes solubles dans des solvants très volatils (comme le dichlorométhane ou le chloroforme, générant un spray ESI peu stable), est difficile voir impossible à réaliser par ESI-MS. L'approche par MALDI-MS que nous avons développée s'est trouvée être bien adaptée pour l'analyse de grilles neutres et a permis de caractériser avec succès 24 grilles neutres formées à partir de ligands et de cations métalliques variés. De même, les commutateurs insolubles ont pu être caractérisés sans ambiguïté grâce à une méthode originale de dépôt : le dépôt sans solvant. Par contre, bien que les caténanes et les rotaxanes, solubles dans des solvants très volatils comme le dichlorométhane ou le chloroforme, soient clairement identifiés lors d'une analyse MALDI-MS, la présence de fragments sur les spectres de masse rend difficile la vérification de la pureté de l'échantillon. Pour ce type d'analyte, la source cryospray, semble être alors une nouvelle alternative intéressante.

La technique MALDI-MS est aussi très performante pour la détection et la quantification de petites molécules dans un milieu biologique complexe. Nous avons ainsi validé un protocole MALDI-MS permettant la détection et la quantification du myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP), dans les fractions sanguines. Ce protocole a permis i) de détecter de très faibles concentrations d'ITPP : jusqu'à 10⁻⁶M dans le sang total et les globules rouges et jusqu'à 10⁻⁷M dans le plasma, ii) de quantifier de façon fiable et reproductible l'ITPP dans les fractions sanguines, cette information étant indispensable pour les études pharamacocinétiques. Nous avons ainsi pu déterminer les concentrations d'ITPP dans le plasma de souris traitées et démontrer l'influence du mode d'administration sur la biodisponibilité de l'ITPP dans le sang : l'ingestion chronique semble être en effet plus favorable pour la biodisponibilité de l'ITPP

dans le sang qu'une injection unique. De plus, cette étude a démontré que l'ITPP traverse les membranes biologiques, car lorsque l'administration de l'ITPP était réalisée par ingestion orale ou injection intrapéritonéal, l'ITPP était détecté dans le plasma.

La constante de stabilité du complexe hémoglobine/ITPP a également pu être évaluée par rapport aux constantes de stabilité des complexes formés entre l'hémoglobine et deux autres effecteurs allostériques, l'IHP et le BPG à l'aide d'expériences de compétition suivies par ESI-MS. Les résultats obtenus ont confirmé les hypothèses des biologistes : à savoir la constante de stabilité du complexe hémoglobine/IHP est dix fois plus élevée que celles des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP et ces deux dernières sont du même ordre de grandeur. De plus, une information supplémentaire a pu être apportée sur les constantes de stabilité relative des complexes hémoglobine/BPG et hémoglobine/ITPP et ces presque trois fois plus importante que celle de complexe hémoglobine/ITPP est presque trois fois plus importante que celle de complexe hémoglobine/BPG.

Nous avons développé une deuxième approche ESI-MS pour la détermination de constantes de stabilité : dans le cas des complexes Adx/AdR, les constantes de stabilité ont été déterminées à l'aide de titrages thermodynamiques suivis par ESI-MS. Nous avons tout d'abord validé notre approche avec le complexe Adx 1-128/AdR pour leguel les constantes de dissociation déterminées par SPR et la méthode du Cytochrome C sont les plus fiables. Comme les constantes de dissociation obtenues par ESI-MS étaient en accord raisonnable avec celles obtenues par SPR et la méthode du Cytochrome C, le même protocole de titrages thermodynamiques suivi par ESI-MS a été utilisé pour déterminer les constantes de dissociation des complexes Adx/AdR formés à partir de variants d'Adx. Cependant, les constantes de dissociation obtenues par les trois techniques testées diffèrent significativement. Plusieurs expériences sont actuellement en cours pour tenter de vérifier ces résultats, notamment la détermination des constantes de dissociation par SPR et la méthode du Cytochrome C en utilisant le tampon acétate d'ammonium et la détermination des constantes de dissociation du complexe Adx 1-128/AdR associé à des modulateurs. De notre côté, nous avons déjà vérifié les paramètres pouvant fausser nos résultats à savoir, la solubilité des protéines seules dans le tampon acétate d'ammonium, la stabilité des protéines au cours du titrage, les concentrations d'Adx et d'AdR après dessalage, la répétabilité de la méthode par ESI-MS sur des lots de protéines différents et des jours différents ainsi que l'optimisation des paramètres instrumentaux pour limiter les risques d'artéfacts. Dans ce contexte l'approche par ESI-MS permet donc déjà de différencier graphiquement trois groupes de complexes en fonction de leur stabilité : Adx 1-128/AdR et Adx 4-108/AdR sont plus stables que Adx 4-114/AdR et Adx D76E/AdR, eux-mêmes plus stables que Adx S112W/AdR et Adx T54S D113Y/AdR. Ces observations déduites des courbes de titrage sont confirmées par le calcul des constantes de dissociation. Parallèlement, nous étudions l'interaction de pseudopeptides, les foldamères, avec le complexe Adx/AdR afin de déterminer leur potentiel de modulateur. Jusqu'à présent, les foldamères étudiés n'ont montré que peu d'affinité pour le complexe Adx/AdR.

Ces trois études démontrent les possibilités de la spectrométrie de masse ESI mais aussi MALDI pour la caractérisation et le suivi de la formation d'édifices non-covalents en solution. Comme nous l'avons vu précédemment, la spectrométrie de masse peut être complémentaire ou être la seule alternative aux techniques plus classiques comme la RMN, la cristallographie RX ou la SPR. Cependant, comme pour toutes techniques analytiques, les résultats obtenus par spectrométrie de masse nécessitent d'être confirmés par d'autres techniques analytiques, lorsque cela est possible.

Partie expérimentale

6.1. LE MALDI-MS

Les spectres de masse MALDI-MS ont été réalisés sur un spectromètre de masse temps-devol (MALDI-TOF-TOF Autoflex II TOF-TOF, Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) équipé avec un laser azote (λ = 337 nm) opérant à une fréquence comprise entre 1 Hz et 50 Hz pour les études menées dans le cadre de cette thèse. Les scans ont été enregistrés en mode réflectron avec les paramètres suivants : IS1 à 19kV, reflector à 20 kV, lens à 8.25.

Les paramètres instrumentaux ont été soigneusement optimisés pour préserver les interactions non-covalentes en phase gazeuse et obtenir ainsi des spectres de masse reflétant les espèces en solution. L'irradiance laser notamment a été choisie soigneusement pour éviter la fragmentation, c'est-à-dire légèrement supérieure à l'irradiance laser seuil permettant la désorption. L'augmentation de l'irradiance laser entraine immanquablement la fragmentation des espèces. Les spectres de masse ont été obtenus en moyennant un grand nombre de tirs laser effectués de façon aléatoire sur tout le dépôt.

La détermination des masses a été réalisée sur des spectres non traités pour que la corrélation entre les masses expérimentales et théoriques soit optimale. Afin de confirmer l'identification d'un analyte, les profils isotopiques expérimentaux ont été comparés aux profils isotopiques théoriques lorsque la résolution le permettait.

L'enregistrement des spectres de masse et leur traitement ont été réalisés sur les logiciels FlexAnalysis 3.0.

6.1.1. L'étalonnage

L'étalonnage du MALDI-MS a été réalisé à l'aide de deux calibrants selon l'étude réalisée :

- Un calibrant constitué d'un mélange de peptide (0,4µM solubilisé dans l'eau acidifiée avec 1% d'acide formique, dépôt couche mince avec le HCCA). La gamme de masse étalonnée est comprise entre 400 et 3000 m/z et peut être extrapolée jusqu'à 5000 m/z. Ce calibrant a été utilisé pour la plupart des analyses.
- Les polyéthylènes glycols, utilisés dans le cas de la méthode de dépôt sans solvant. Le dépôt de ce calibrant est préparé dans des conditions identiques à celles de l'analyte, c'est-à-dire broyé avec la matrice (ratio analyte sur matrice de 1:10) puis déposé sur un scotch double-face fixé sur la cible. Les polyéthylènes glycols utilisés permettaient de calibrer une gamme de masse comprise entre 300 et 1500 m/z.

6.1.2. La préparation de l'échantillon

Les échantillons, en général à l'état solide étaient solubilisé dans le solvant adéquat puis déposés sur la cible en utilisant la méthode de dépôt goutte séchée, couche mince ou sans solvant selon l'étude réalisée.

6.2. L'ESI-MS

Les spectres de masse ESI-MS ont été réalisés en mode positif sur deux spectromètres de masse temps-de-vol (MicrOTOF et MicrOTOF Q, Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Ces deux spectromètres de masse comprennent une source orthogonale, d'une interface constituée d'une série de lentilles et de différentes zones de pompage et d'un tube de vol. Dans le cas du MicrOTOF Q, les lentilles sont remplacées par deux ion funnel et un hexapôle supplémentaire est situé avant le tube de vol.

Les paramètres instrumentaux ont été soigneusement optimisés pour préserver les interactions non-covalentes en phase gazeuse et obtenir ainsi des spectres de masse reflétant les espèces en solution. Le Capillary Exit notamment a été choisie soigneusement pour éviter la fragmentation tout en favorisant une désolvatation et une transmission des ions efficaces.

Les spectres de masse ont été obtenus en moyennant au minimum 2,5 minutes d'enregistrement. La détermination des masses a été réalisée sur des spectres non traités pour que la corrélation entre les masses expérimentales et théoriques soit optimale. Afin de confirmer l'identification d'un analyte, les profils isotopiques expérimentaux ont été comparés aux profils isotopiques théoriques lorsque la résolution le permettait.

L'enregistrement des spectres de masse et leur traitement ont été réalisés sur les logiciels MicrOTOF Control et Data Analysis.

6.2.1. L'étalonnage

L'étalonnage du MALDI-MS a été réalisé à l'aide de deux calibrants selon l'étude réalisée :

- La myoglobine de cheval diluée à 2 pmol/µl dans un mélange eau/acétonitrile (1:1 en volume) acidifiée avec 1% d'acide formique. La gamme de masse étalonnée est comprise entre 500 et 2000 m/z et peut être extrapolée jusqu'à 4000 m/z. Ce calibrant a été utilisé pour la plupart des analyses.
- L'iodure de césium (CsI) solubilisé à 1g/mL dans un mélange eau/acétonitrile (1:1 en volume). La gamme de masse étalonnée est comprise entre 2500 et 25000 m/z. Ce calibrant est utilisé pour l'étude d'analytes générant des ions de m/z supérieur à 4000.

6.2.2. La préparation de l'échantillon

Avant d'être analysé par ESI-MS, le solvant des échantillons biologiques étaient échangé contre l'acétate d'ammonium à 20mM (pH 6.7) ou 50mM (pH = 6.9) sur des systèmes d'ultracentrifugation (Amicon, cut off = 10 000 Da Millipore, Bedford MA, USA) à 4°C et 10000 rpm (tour par minute). Le nombre de cycle de dilution/concentration dépend de la protéine dessalée.

Compte tenu de l'omniprésence des interactions non-covalentes en chimie et en biologie, leur étude est devenue incontournable. Les techniques analytiques les plus fréquemment utilisées comme la RMN et la cristallographie RX sont difficiles voire impossibles à mettre en œuvre pour l'analyse de certains édifices non-covalents. De nouveaux outils analytiques sont par conséquent nécessaires pour résoudre ces problématiques. Lors de ce travail de thèse, nous avons donc évalué le potentiel de la spectrométrie de masse et notamment de deux techniques d'ionisation douce : l'ionisation électrospray (ESI-MS) et l'Ionisation/Désorption Laser Assistée par Matrice (MALDI-MS). Ce travail s'est articulé selon trois axes : i) l'analyse d'édifices neutres, insolubles ou solubles dans des solvants très volatils comme le dichlorométhane ou le chloroforme : ces analytes offrent l'opportunité de tester une approche par MALDI-MS comme alternative à l'ESI-MS, ii) l'étude in vivo et in vitro d'une petite molécule à visée thérapeutique, le myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP), dans le sang : cette étude doit permettre de mieux comprendre le mécanisme de régulation de l'ITPP, iii) l'étude du complexe Adx/AdR, impliqué dans la biosynthèse des stéroïdes chez les vertébrés : la mesure des constantes de stabilité des complexes formés à partir de variants d'Adx doit permettre de mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre ces deux partenaires redox lors du transfert d'électron.

Studying the non-covalent interactions in chemistry and biology cannot be ignored, considering their omnipresence. The most frequently used analytical techniques, such as RMN or X-ray crystallography, are difficult or even impossible to implement to the analysis of some non-covalent architectures. New analytical resources are thus required to solve these issues. During this thesis, mass spectrometry potential has been evaluated, especially through two soft ionization techniques: the Electrospray Ionization (ESI-MS) and the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-MS). This work has been based on three axes: i) the analysis of neutral architectures, indissoluble architectures or architectures soluble in high volatile solvents as dichloromethane or chloroform: these analyses give the opportunity to test out a MALDI-MS approach as an alternative to ESI-MS, ii) in vivo and in vitro study of a small therapeutic molecule, named myo-Inositol trispyrophosphate (ITPP), in blood : the goal of this study is to better understand the ITPP regulation mechanism, iii) the study of Adx/AdR complex, involved in vertebrates steroids biosynthesis : the measurement of stability constants of complexes formed from different Adx variants give the opportunity to better understand the interaction mechanism between these two redox partners during the electron transfer.