

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR7178-IPHC

THÈSE

Présentée par :

Johann STOJKO

Soutenue le : 11 Mars 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Nouvelles méthodologies en spectrométrie de
masse native et mobilité ionique pour la
caractérisation structurale de macrobiomolécules
et de leurs complexes associés.**

THÈSE co-dirigée par :

Dr. CIANFERANI Sarah
Dr. VAN DORSSELAER Alain

Directrice de Recherche, Université de Strasbourg
Directeur de Recherche Emérite, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. SCHILTZ Odile
Pr. DE PAUW Edwin

Directrice de Recherche, Université de Toulouse
Directeur de Recherche, Université de Liège

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. ANTOINE Mathias

Chargé de Recherche, Laboratoires Servier

A Anaïs,

A ma famille,

« Nulle pierre ne peut être polie sans friction, nul homme ne peut parfaire son expérience sans épreuve »

Confucius

« Fluctuat nec mergitur »

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg (Département des Sciences Analytiques, UMR7178, IPHC-DSA-LSMBO).

Je tiens tout d'abord à remercier Sarah Cianférani et Alain Van Dorselaer, sans qui ce travail n'aurait aujourd'hui pu être possible. Merci de m'avoir offert la confiance et l'opportunité de réaliser cette thèse dans un environnement scientifique de qualité, tant par les personnes qui le compose que par les instruments dont il dispose. Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à Sarah Cianférani, pour ces 3 années d'enrichissement professionnel et personnel, son investissement et son encadrement. Merci pour ton soutien et ta confiance, qui m'ont permis d'avancer et de m'épanouir dans une discipline que je ne connaissais pas.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Jean Boutin, Gilles Ferry et Mathias Antoine, pour m'avoir permis de concrétiser mon stage de Master 2 à travers cette thèse et pour leur accompagnement scientifique au cours de cette dernière.

Je remercie sincèrement Odile Schiltz, Edwin De Pauw et Mathias Antoine pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie également l'ensemble des collaborateurs, dont les noms sont égrainés au fil de ce manuscrit.

Merci à la team protéomique, peuplant les entrailles du LSMBO : Nina, Marjaux (**J**), Marianne, Aurélie, Leslie, Marion, Pauline, Justine, Georg (NOTOX Kerl), Alisson, Charlotte, Magali, et Luc. Bon courage aux doctorants du groupe, le « Précieux » est à portée de doigt !

Merci à l'équipe qualité du LSMBO, sans qui le fonctionnement de la machine LSMBO ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui : Hélène, Danièle (Mme Sigma), Véronique et Stella. Merci pour votre sympathie, votre patience (ah, ces fiches actions...) et votre disponibilité !

Merci à l'équipe bioinformatique, back-up matriciel du CPU LSMBO: Patrick (penser à équiper le fixe d'un kit main-libre ^^), Alex 1 (Bayesian, What else ?), Fabrice (les soirées de Noël, finissent mal en général 🎵), Alex 2, Aymen et Ibrahim. Merci pour votre bonne humeur au quotidien !

Merci aux hommes de la providence du R5 : Kévin (merci pour ton aide dans toutes ces démarches administratives), Alfred (Elsassisch isch bombisch !), François (A quand des toilettes sèches au LSMBO ?)

Merci au bureau du génie civil: Jean-Marc (interprétation masculine de l'année pour l'Advion, « t'en veux ? ») et Agnès (Appeler Damidot, pour un marouflage des grues de JMS).

Merci aux Sages de la Protéomique, aiguillant le train LSMBO sur les rails des quadripôles: Laurence (merci pour ton soutien psychologique ces dernières semaines), Christine & Christine, et Fabrice Bertile (« pareil » pour un LWBEVPB ? plutôt Zacapa ?)

Merci aux Anciens de l'équipe supramol, toujours disponibles et prêts à éclairer la lanterne des novices : Jean-Michel (animateur des soirées Winckler), François (Tintin et la truffe de Noël mystérieuse), et Julien (« tu penses que la sauce gribiche peut remplacer le DDM ? »)

Merci aux Anciens doctorants du laboratoire, toujours prêts à consacrer un peu de temps à leurs successeurs : Gilles (à quand un match à Dugau ?), Marine (la bienveillance), Sarah (la compassion), Diego (la « bullshitance »), Amandine, Eli (ballon d'or du tournoi 2013) et Anna.

Merci au soldat « Dikkenek », indispensable à l'humeur des troupes chaque midi : Gauthier (qui pensera aux cuillères désormais ?), Seb (tu avais un guide Michelin pendant l'ASMS ? Quel régal !), Maxime de Berck (toujours vérifier l'état « locked »), Benoît Focan (la Twingo subirait-elle le même sort que l'Audi tous les week-ends ?), Stéphane (le soldat du feu), Thomas (la relève ardente), Maxime de Meuse (pas de fumée sans cigare) et Anthony (stagiaire Hipster). Merci à vous pour ces moments passés, et pour les amitiés nées de cette complicité !

Un remerciement spécial à un frère d'armes, Guillaume, ayant commencé simultanément l'aventure supramol en 2012. Après 3 années à se côtoyer, je pense qu'on peut participer au quiz présenté par Tex (un ami, c'est quelqu'un que tu peux appeler à 23h pour déplacer un cadavre...de Fiat 500 du parking de l'ECPM). Bon courage à toi et à ta petite famille pour la suite, et pour cette rédaction.

Un immense merci à ma famille, ma belle-famille et mes amis, toujours présents dans les bons comme dans les mauvais moments. Une pensée à mes grands-parents, aujourd'hui absents.

Merci enfin à celle qui partage ma vie depuis 11 ans, pour sa patience et sa présence, à qui je dédie aujourd'hui ce manuscrit. Merci d'avoir éclairé mes pas dans les moments obscurs.

PLAN GENERAL

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE 1 : LES INTERACTIONS NON-COVALENTES ET LEUR CARACTERISATION EN BIOLOGIE STRUCTURALE.	9
CHAPITRE 2 : APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE STRUCTURALE A L'ETUDE DE COMPLEXES PROTEIQUES NON-COVALENTS.....	21
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	31
PARTIE 2 : APPORT DE LA HAUTE RESOLUTION POUR L'ANALYSE EN MS NATIVE	39
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS.	41
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE METHODES INSTRUMENTALES EN MS NATIVE A HAUTE RESOLUTION.....	49
CHAPITRE 2 : APPLICATION A L'ETUDE DES ANTICORPS MONOCLONAUX ET DES IMMUNOCONJUGUES.	67
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	87
PARTIE 3 : DU CRIBLAGE D'INTERACTION PROTEINE-LIGAND PAR MS NATIVE AU CRIBLAGE PAR IM-MS NATIVE	95
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS.	97
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE METHODES INSTRUMENTALES EN MS NATIVE.	103
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE METHODES INSTRUMENTALES EN IM-MS NATIVE.....	111
CHAPITRE 3 : ETUDE D'UN COMPLEXE ENZYME/SUBSTRAT PAR MS NATIVE : LE SYSTEME PRMT6/SAH/PEPTIDE H4.	133
CHAPITRE 4 : CRIBLAGE DE COMPLEXES ENZYME/LIGAND PAR MS NATIVE : LE SYSTEME TGT/INHIBITEURS.	143
CHAPITRE 5 : CRIBLAGE DE COMPLEXES ENZYME/LIGAND PAR IM-MS NATIVE: LE SYSTEME PDF1B/INHIBITEURS.	159
CHAPITRE 6 : ETUDE D'UN COMPLEXE ENZYME/COFACTEUR/ LIGAND PAR IM-MS NATIVE: LE SYSTEME QR2.	171
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199
PARTIE 4 : INTEGRATION DE DONNEES DE MS NATIVE ET IM-MS NATIVE POUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE DE COMPLEXES MULTI-PROTEIQUES DE HAUTES MASSES	211
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS.	213
CHAPITRE 1 : OPTIMISATIONS INSTRUMENTALES EN IM-MS NATIVE POUR L'ANALYSE DE COMPLEXES DE HAUTES MASSES.....	217
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION STRUCTURALE D'UN COMPLEXE MULTI-PROTEIQUE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE PAR MS NATIVE ET IM-MS NATIVE : LE SYSTEME CF IA.	225
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	243
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	245
CONCLUSION GENERALE	251
PARTIE EXPERIMENTALE	259
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	265

PLAN DETAILLE

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE 1 : LES INTERACTIONS NON-COVALENTES ET LEUR CARACTERISATION EN BIOLOGIE STRUCTURALE	9
1. <i>Les interactions non-covalentes : généralités</i>	9
1.1. Les interactions non-covalentes de type électrostatique.	9
1.1.1. L'interaction ionique.....	9
1.1.2. L'interaction de Van der Waals.....	10
1.1.3. La liaison hydrogène.....	11
1.2. L'effet hydrophobe.....	11
1.3. Equilibre entre forces d'attraction et de répulsion totales	11
2. <i>Les techniques biophysiques appliquées à l'étude de complexes supramoléculaires</i>	12
2.1. Les techniques à résolution moléculaire.....	12
2.1.1. La chromatographie d'exclusion stérique (« Size Exclusion Chromatography », SEC).....	12
2.1.2. L'ultracentrifugation analytique (« Analytical Ultracentrifugation », AUC).....	12
2.1.3. Les techniques de diffusion de lumière (« Static-Dynamic Light Scattering », SLS-DLS).....	13
2.1.4. Les techniques de fluorescence.....	14
2.1.5. Le dichroïsme circulaire.....	15
2.1.6. La résonance plasmonique de surface (SPR).....	16
2.1.7. La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC).....	16
2.1.8. La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS).....	17
2.2. Les techniques à résolution atomique.....	17
2.2.1. La cryo-microscopie électronique (« Cryo-Electron Microscopy », cryo-EM).....	17
2.2.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	18
2.2.3. La cristallographie aux rayons X (RX).....	18
3. <i>Conclusions</i>	18
CHAPITRE 2 : APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE STRUCTURALE A L'ETUDE DE COMPLEXES PROTEIQUES NON-COVALENTS.....	21
1. <i>La spectrométrie de masse structurale : généralités</i>	21
2. <i>Les approches MS en milieu non marqué, couplées à l'analyse supramoléculaire</i>	22
2.1. La spectrométrie de masse native (MS native).....	22
2.2. La spectrométrie de masse native couplée à la mobilité ionique (IM-MS native).....	23
2.3. La spectrométrie de masse native couplée à la fragmentation en phase gazeuse (« Top-Down Native MS »).....	23
3. <i>Les approches MS couplées à l'analyse protéomique</i>	24
3.1. La protéolyse ménagée.....	24
3.2. Le pontage covalent (« Cross-Linking », XL-MS).....	24
3.3. L'échange hydrogène/deutérium (HDX-MS).....	24
3.4. Le marquage radicalaire (HRF-MS, FPOP-MS).....	25
3.5. Les techniques de protéomique quantitative.....	25
4. <i>Conclusions</i>	25
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	31
PARTIE 2 : APPORT DE LA HAUTE RESOLUTION POUR L'ANALYSE EN MS NATIVE	39
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS.....	41
1. <i>Du développement instrumental à la complexité des systèmes protéiques étudiés en MS native : une complémentarité historique</i>	41
2. <i>Nouveaux défis analytiques en MS native: la limitation en résolution instrumentale</i>	43
3. <i>Objectifs</i>	46
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE METHODES INSTRUMENTALES EN MS NATIVE A HAUTE RESOLUTION.....	49

1.	<i>Présentation de l'instrument Orbitrap Exactive Plus EMR (Thermo Fisher Scientific).</i>	49
2.	<i>Influence des paramètres instrumentaux sur la résolution expérimentale R_{eff}.</i>	52
2.1.	Choix de la résolution nominale de l'analyseur (R_{nom}).	52
2.2.	Comparaison instrumentale.	54
3.	<i>Influence des paramètres instrumentaux sur la transmission des ions de hauts rapports m/z.</i>	55
3.1.	Optimisation des tensions appliquées sur les flatapôles injection, inter et bent.	55
3.2.	Comparaison instrumentale.	56
4.	<i>Influence des paramètres instrumentaux sur le maintien de complexes non-covalents.</i>	61
4.1.	Optimisation des énergies de collision en source (CID) et en cellule HCD (CE).	61
4.2.	Comparaison instrumentale.	63
5.	<i>Conclusions.</i>	63
CHAPITRE 2 : APPLICATION A L'ETUDE DES ANTICORPS MONOCLONAUX ET DES IMMUNOCONJUGUES.		67
1.	<i>Contexte de l'étude.</i>	67
2.	<i>Objectifs des travaux.</i>	71
3.	<i>Bilan des résultats.</i>	72
3.1.	Apport de la haute résolution pour la caractérisation de mAbs.	72
3.1.1.	Influence de la résolution nominale R_{nom} sur la justesse de masse mesurée.	72
3.1.2.	Comparaison des performances du Synapt G2 et de l'Orbitrap Exactive Plus EMR.	73
3.2.	Apport de l'Orbitrap Exactive Plus EMR pour la caractérisation d'ADCs Cys.	76
3.2.1.	Influence de l'énergie de collision en source (CID) sur le profil de distribution de drogues associé à l'ADC Cys BV.	76
3.2.2.	Comparaison des performances du Synapt G2 et de l'Orbitrap Exactive Plus EMR.	78
3.3.	Utilisation de la MS native à haute résolution pour l'évaluation de nouvelles chimies de conjugaison appliquées aux ADCs Lys.	80
3.3.1.	Apport de la haute résolution pour la caractérisation d'ADCs Lys.	81
3.3.2.	Application de la haute résolution à l'évaluation d'un nouveau linker spécifique des cystéines du trastuzumab : le MAPN.	82
4.	<i>Conclusions.</i>	83
5.	<i>Valorisation.</i>	83
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.		85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.		87
PARTIE 3 : DU CRIBLAGE D'INTERACTION PROTEINE-LIGAND PAR MS NATIVE AU CRIBLAGE PAR IM-MS NATIVE		95
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS.		97
1.	<i>Le criblage de complexe protéine-ligand par MS native.</i>	97
2.	<i>Le criblage de complexes protéine-ligand par IM-MS native.</i>	99
3.	<i>Objectifs des travaux.</i>	100
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE METHODES INSTRUMENTALES EN MS NATIVE.		103
1.	<i>Présentation du spectromètre de masse Synapt G2 HDMS (Waters).</i>	103
2.	<i>Influence des paramètres instrumentaux.</i>	105
2.1.	Influence de la tension d'accélération à l'interface.	106
2.2.	Stabilité des complexes non-covalents en phase gazeuse (Vc50).	107
2.3.	Influence de la pression à l'interface.	108
2.4.	Influence de la température de la source et de l'intensité du spray.	109
3.	<i>Conclusions.</i>	109
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE METHODES INSTRUMENTALES EN IM-MS NATIVE.		111
1.	<i>Choix de l'état de charge.</i>	111
2.	<i>Optimisation de la résolution de la méthode IM-MS.</i>	114
2.1.	Définition du pouvoir séparateur R_s .	116
2.2.	Influence des hauteurs et vitesses de vague sur la résolution IM-MS.	117
2.3.	Influence du débit en gaz dans la cellule TWIMS sur la résolution IM-MS.	118
3.	<i>Influence de la variabilité instrumentale sur la résolution IM-MS.</i>	119
4.	<i>Optimisation de la sensibilité de la méthode IM-MS.</i>	121
4.1.	Compromis entre transmission et activation conformationnelle des ions.	121

4.2.	Introduction au criblage de la stabilité conformationnelle des ions par IM-MS.....	122
5.	Mesure de la section efficace ^{TW} CCS _{N₂} des ions sur la cellule TWIMS du Synapt G2.....	124
5.1.	Synchronisation de la cellule TWIMS et de l'analyseur TOF.....	124
5.2.	Correction du temps de dérive.....	125
5.3.	Etalonnage de l'instrument et mesure de sections efficaces ^{TW} CCS _{N₂}	126
6.	Calcul de CCSs théoriques à partir de structures de haute résolution.....	128
7.	Conclusions.....	130
CHAPITRE 3 : ETUDE D'UN COMPLEXE ENZYME/SUBSTRAT PAR MS NATIVE : LE SYSTEME PRMT6/SAH/PEPTIDE H4.....		133
1.	Présentation du contexte biologique.....	133
2.	Objectifs de l'analyse.....	135
3.	Résultats.....	135
3.1.	Détermination de l'état oligomérique de la protéine MmPRMT6.....	135
3.2.	Caractérisation des complexes binaires MmPRMT6-SAH et MmPRMT6-H4.....	137
3.3.	Caractérisation des complexes ternaires MmPRMT6-SAH-H4.....	139
4.	Conclusions.....	140
5.	Valorisation.....	141
CHAPITRE 4 : CRIBLAGE DE COMPLEXES ENZYME/LIGAND PAR MS NATIVE : LE SYSTEME TGT/INHIBITEURS.....		143
1.	Présentation du contexte biologique.....	143
2.	Objectifs de mon travail et stratégies analytiques développées.....	144
3.	Résultats.....	145
3.1.	Développements méthodologiques pour une meilleure quantification des rapports monomère / dimère.....	145
3.1.1.	Influence de la concentration en enzyme Tgt sur la stabilité du dimère Tgt.....	145
3.1.2.	Influence de la tension d'accélération (Vc) sur la stabilité du dimère Tgt.....	147
3.1.3.	Apport de l'imidazole sur la séparation d'états de charge superposés.....	148
3.1.4.	Apport de l'IM-MS native dans la séparation d'états de charge superposés.....	149
3.1.5.	Prédictibilité de l'intensité des signaux superposés par simulation spectrale.....	151
3.2.	Criblage de l'efficacité des ligands dans la déstabilisation du dimère Tgt par MS native.....	153
4.	Conclusions.....	156
CHAPITRE 5 : CRIBLAGE DE COMPLEXES ENZYME/LIGAND PAR IM-MS NATIVE: LE SYSTEME PDF1B/INHIBITEURS.....		159
1.	Présentation du contexte biologique.....	159
2.	Objectifs de l'étude.....	161
3.	Résumé des résultats.....	162
3.1.	Criblage des complexes PDF1B:ligand par MS native en temps réel.....	162
3.2.	Criblage des complexes PDF1B:ligand par IM-MS native en temps réel.....	164
4.	Conclusions.....	168
5.	Valorisation.....	168
CHAPITRE 6 : ETUDE D'UN COMPLEXE ENZYME/COFACTEUR/ LIGAND PAR IM-MS NATIVE: LE SYSTEME QR2.....		171
1.	Contexte de l'étude.....	171
2.	Objectifs de l'étude.....	173
3.	Présentation des résultats.....	174
3.1.	Caractérisation de la cinétique d'échange intra-monomère QR2 et inter-monomère QR1-QR2 par MS native... ..	174
3.1.1.	Reconstitution des complexes QR1 / QR2 ^l / QR2 ^h - cofacteurs.....	174
3.1.2.	Suivi cinétique de la formation d'hétérodimères QR2l-QR2h et QR1-QR2 par MS native.....	177
3.2.	Etude des complexes QR2-cofacteur par IM-MS native.....	178
3.2.1.	Etude conformationnelle des complexes QR2-cofacteur par IM-MS native.....	178
3.2.2.	Etude de la stabilité des conformations par IM-MS native (approches CIU).....	184
3.3.	Etude des complexes QR2-FAD-ligand par MS native et IM-MS.....	186
3.3.1.	Etude structurale des complexes QR2-FAD-mélatonine / resvératrol par MS native.....	186
3.3.1.1.	Détermination des stœchiométries d'interaction.....	186
3.3.1.2.	Détermination de la stabilité des complexes en phase gazeuse.....	187
3.3.2.	Etude conformationnelle des complexes QR2-FAD-mélatonine / resvératrol par IM-MS.....	188
3.3.2.1.	Etude des conformations natives QR2-FAD-ligand par IM-MS native.....	188
3.3.2.2.	Etude de la stabilité des conformations par IM-MS native (approches CIU).....	190

4. <i>Conclusions.</i>	192
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199
PARTIE 4 : INTEGRATION DE DONNEES DE MS NATIVE ET IM-MS NATIVE POUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE DE COMPLEXES MULTI-PROTEIQUES DE HAUTES MASSES	211
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS.....	213
1. <i>De l'intégration des données de MS structurale vers la proposition de modèles structuraux.</i>	213
2. <i>Objectifs des travaux.</i>	215
CHAPITRE 1 : OPTIMISATIONS INSTRUMENTALES EN IM-MS NATIVE POUR L'ANALYSE DE COMPLEXES DE HAUTES MASSES.....	217
1. <i>Influence du choix des étalons sur la justesse des ^{TW}CCS_{S_{N2}} mesurées en présence de complexes de hauts poids moléculaires.</i>	218
2. <i>Conclusions.</i>	222
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION STRUCTURALE D'UN COMPLEXE MULTI-PROTEIQUE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE PAR MS NATIVE ET IM-MS NATIVE : LE SYSTEME CF IA.	225
1. <i>Présentation du contexte biologique.</i>	225
2. <i>Objectifs de l'étude.</i>	228
3. <i>Présentation des résultats.</i>	228
3.1. <i>Considérations expérimentales.</i>	228
3.2. <i>Etude des sous-complexes par analyse MS native.</i>	229
3.2.1. <i>Caractérisation du sous-complexe HisRna15p:Rna14p par MS native.</i>	229
3.2.2. <i>Caractérisation du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p par MS native.</i>	231
3.3. <i>Détermination de la stœchiométrie du complexe CF IA entier par MS native.</i>	232
3.4. <i>Suivi conformationnel de l'assemblage du complexe CF IA par IM-MS native.</i>	235
4. <i>Conclusions.</i>	239
5. <i>Valorisation.</i>	240
CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....	243
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	245
CONCLUSION GENERALE	251
PARTIE EXPERIMENTALE	259
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	265

Liste des principales abréviations

AcNH₄: Acétate d'ammonium

ADC: Antibody-Drug Conjugate

Apo: Protéine non liée (sans ligand)

ATD: Distribution du temps de passage d'un ion dans la cellule TWIMS

ARNm: Acide ribonucléique messenger

^{TW}CCS_{N₂}: Section efficace mesurée en azote dans la cellule TWIMS du Synapt G2

CE: Energie de collision en cellule HCD (EMR)

CID: Energie de collision en source (EMR)

CIU: Collision Induced Unfolding

CsI: Iodure de Césium

DAR: Drug to Antibody Ratio

Dn: Anticorps conjugué à « n » drogues

DTIMS: Drift Tube Ion Mobility Spectrometry

EHSS: Exact Hard Sphere Scattering

ESI: Ionisation électrospray

FWHM: Full Width at Half Maximum

HCD: High energy Collision Dissociation

Holo: Protéine liée (à son ligand)

IMS: Spectrométrie de mobilité ionique

IM-MS: Couplage mobilité ionique-spectrométrie de masse

Kd: Constante de dissociation

mAb: Anticorps monoclonal thérapeutique

MS: Spectrométrie de masse

MS/MS: Spectrométrie de masse en tandem

NH₄HCO₃: Bicarbonate d'ammonium

PA: Projection Approximation

Pi: Pression dans la première zone de pompage

P_{IMS}: Pression au sein de la cellule IM

PTM: Modification post-traductionnelle

Q: Quadripôle

Q_{IMS}: Débit en gaz appliqué dans la cellule IM

RF: Radiofréquence

RMN: Résonance magnétique nucléaire

Rs: Pouvoir séparateur en IM-MS

RX: Cristallographie aux rayons X

SRIG: Stacked Ring Ion Guide

STB: Slow Tight Binding

S/N: Rapport signal/bruit

t_D: Temps de passage de l'ion dans la cellule TWIMS

TM: Trajectory Method

TOF: Time-of-flight

TWIMS: Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry

UHV: Ultra High Vacuum

Vc: Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage

WH: Wave Height

WV: Wave Velocity

Transfer CE: Tension appliquée à l'entrée de la cellule de transfert du Synapt G2

Trap CE: Tension appliquée à l'entrée de la cellule de collision du Synapt G2

XL: Cross-Linking

Introduction générale

Introduction générale

La régulation fine et ciblée des fonctions cellulaires repose sur l'existence d'interactions supramoléculaires spécifiques entre biomolécules de nature et complexité variables. L'altération de ces réseaux au sein de certaines pathologies nécessite une connaissance structurale approfondie des espèces impliquées et de leurs complexes non-covalents. Dans ce contexte, la cristallographie et la résonance magnétique nucléaire (RMN) s'imposent comme des techniques de référence, permettant l'obtention d'informations structurales atomiques sur l'assemblage *in vitro* de ces complexes. Néanmoins, la quantité de matériel, la taille ou l'hétérogénéité des analytes, peuvent constituer une limite à ces approches biophysiques.

Développée au début des années 1990, la spectrométrie de masse (MS) native s'inscrit comme une alternative analytique adaptée à la caractérisation d'assemblages non-covalents de composition et taille variables. Son couplage à une source d'ionisation douce, l'électrospray (ESI), permet de préserver l'intégrité des complexes de la solution jusqu'en phase gazeuse. La détection des ions associés assure une détermination de la masse et de l'intensité des espèces présentes à l'équilibre en solution, donnant accès à certaines informations structurales telles que la stœchiométrie, la spécificité, la stabilité et l'affinité relative des interactions. L'application de cette technique à l'étude de systèmes protéiques se révèle prometteuse, permettant l'obtention de données sur la régulation allostérique de complexes enzymatiques, la caractérisation de protéines thérapeutiques, ou encore l'assemblage structural de protéines membranaires. L'automatisation de cette approche à faible consommation d'échantillon a par ailleurs accéléré son implantation dans le secteur biopharmaceutique, révélant son potentiel dans le criblage d'interactions protéine-ligand. Depuis 2006, la MS native peut être couplée à la spectroscopie de mobilité ionique (IM-MS), apportant une dimension de séparation supplémentaire des ions en phase gazeuse, basée sur leur charge et leur forme. Le recours à un étalonnage approprié permet de calculer la section efficace rotationnellement moyennée (CCS) de ces ions, correspondant à une représentation 2D de la structure 3D de l'ion en phase gazeuse. Ces données de basse résolution rendent ainsi l'IM-MS orthogonale à d'autres techniques de biologie structurale (cristallographie, RMN, SAXS). Complétant les données de MS native par une information conformationnelle, le couplage IM-MS a notamment permis d'analyser la topologie de complexes non-covalents lors de leur assemblage, la flexibilité conformationnelle de protéines membranaires, d'étudier des protéines intrinsèquement désordonnées ou de cribler la conformation de systèmes protéine-ligand.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse s'articulent autour de développements méthodologiques en MS native et IM-MS pour la caractérisation d'assemblages de biomacromolécules de complexité et taille croissantes. Plus particulièrement, ces travaux se concentrent sur le développement de méthodes IM-MS permettant une caractérisation conformationnelle fine de systèmes protéine-ligand (Synapt G2 HDMS, Waters) ainsi que sur l'évaluation, l'optimisation et la mise en application d'une technologie récente de MS native à haute résolution (Orbitrap Exactive Plus EMR, Thermo Fisher Scientific). Ces développements instrumentaux apportent un soutien de plus en plus marqué en biologie structurale pour l'étude de complexes biologiques de haute masse faisant intervenir de multiples partenaires. Ce travail de thèse s'articule autour des 4 parties suivantes :

- La première partie constitue un rappel bibliographique des connaissances biologiques et compétences techniques actuelles pour la caractérisation de complexes non-covalents.
- La deuxième partie consiste en l'évaluation de l'apport de la haute résolution en MS native. L'optimisation instrumentale nécessaire à l'analyse de complexes non-covalents est évaluée sur un ensemble de protéines modèles, dont les résultats sont comparés à ceux obtenus sur un instrument de type Q-TOF. Ces optimisations sont ensuite appliquées à une étude approfondie de la nature et hétérogénéité d'anticorps thérapeutiques (mAbs) et de leurs conjugués (ADCs), dont l'utilisation clinique connaît un essor considérable en oncologie mais dont la caractérisation analytique par MS native demeure délicate.
- La troisième partie est consacrée aux développements méthodologiques apportés en MS native et IM-MS native pour le criblage subtil de complexes protéine-ligand. L'application de ces méthodes à l'étude de potentielles cibles thérapeutiques (PRMT6, Tgt, PDF1B, QR2) permet de préciser le mécanisme enzymatique et le mode d'inhibition de ces dernières en présence de leurs cofacteurs, substrats et inhibiteurs, classés selon leurs propriétés de « binding » et leurs impacts conformationnels.
- La quatrième partie porte sur l'établissement de méthodes instrumentales pour la caractérisation de complexes multi-protéiques de hauts poids moléculaires (> 300 kDa) par MS native couplée à l'IM-MS. Les informations accessibles grâce à ces développements et leur combinaison, permettent une caractérisation topologique et dynamique approfondie de l'architecture du complexe CF IA, indispensable à la maturation de l'ARNm eucaryote et réfractaire aux principales approches biophysiques.

Partie 1 : Introduction bibliographique

Cette partie introductive rappelle l'importance des interactions non-covalentes et décrit les principales techniques biophysiques appliquées à leur caractérisation en biologie structurale. L'apport de la spectrométrie de masse dans cette discipline est ici illustré à travers une présentation des différentes approches couplées à cette technique.

Chapitre 1 : Les interactions non-covalentes et leur caractérisation en biologie structurale.

Chapitre 2 : Application de la spectrométrie de masse structurale à l'étude de complexes protéiques non-covalents.

Chapitre 1 : Les interactions non-covalentes et leur caractérisation en biologie structurale.

La régulation fine et dynamique de l'ensemble des fonctions cellulaires repose sur l'établissement d'interactions spécifiques et transitoires entre biomolécules de nature et complexité variables (protéines, acides nucléiques, ligands etc.) [1]. Ces interactions labiles dites non-covalentes, résultent d'une complémentarité stérique et interactionnelle entre fonctions chimiques intra et intermoléculaires, dans des conditions physicochimiques données [2]. Bien qu'impliquant de faibles énergies (10^0 - 10^2 kJ.mol⁻¹), la multiplicité de ces interactions conditionne la structure tridimensionnelle des biomolécules, assurant ainsi leur reconnaissance moléculaire et leur assemblage sous forme de complexes non-covalents [3, 4]. La diversité des interactions non-covalentes, s'appuyant sur différents types de contribution (électrostatique, hydrophobe), est ici présentée.

1. Les interactions non-covalentes : généralités.

Contrairement aux interactions covalentes ($\approx 10^2$ - 10^3 kJ.mol⁻¹), les interactions non-covalentes n'impliquent pas un partage d'électrons entre deux atomes. Ces dernières, s'effectuant à distance, se définissent en 2 catégories : les interactions non-covalentes de type électrostatique (interaction ionique, de Van der Waals et liaison hydrogène) et l'effet hydrophobe (Fig.1).

1.1. Les interactions non-covalentes de type électrostatique.

Ces interactions résultent de l'existence de charges nettes ou partielles, portées par des atomes engagés au sein d'interactions covalentes [5].

1.1.1. L'interaction ionique.

Cette interaction survient entre 2 atomes ionisés, porteurs d'une charge nette de signe opposé. L'énergie de cette interaction est inversement proportionnelle à la distance interatomique (d) et à la permittivité électrique relative du milieu (ϵ). Cette dernière, optimale à courte distance ($d \approx 3\text{\AA}$), est ainsi renforcée lors du passage des ions de la solution ($\epsilon = 80$) vers le vide ($\epsilon = 1$), pouvant atteindre des valeurs proches de 10^2 kJ.mol⁻¹ [3].

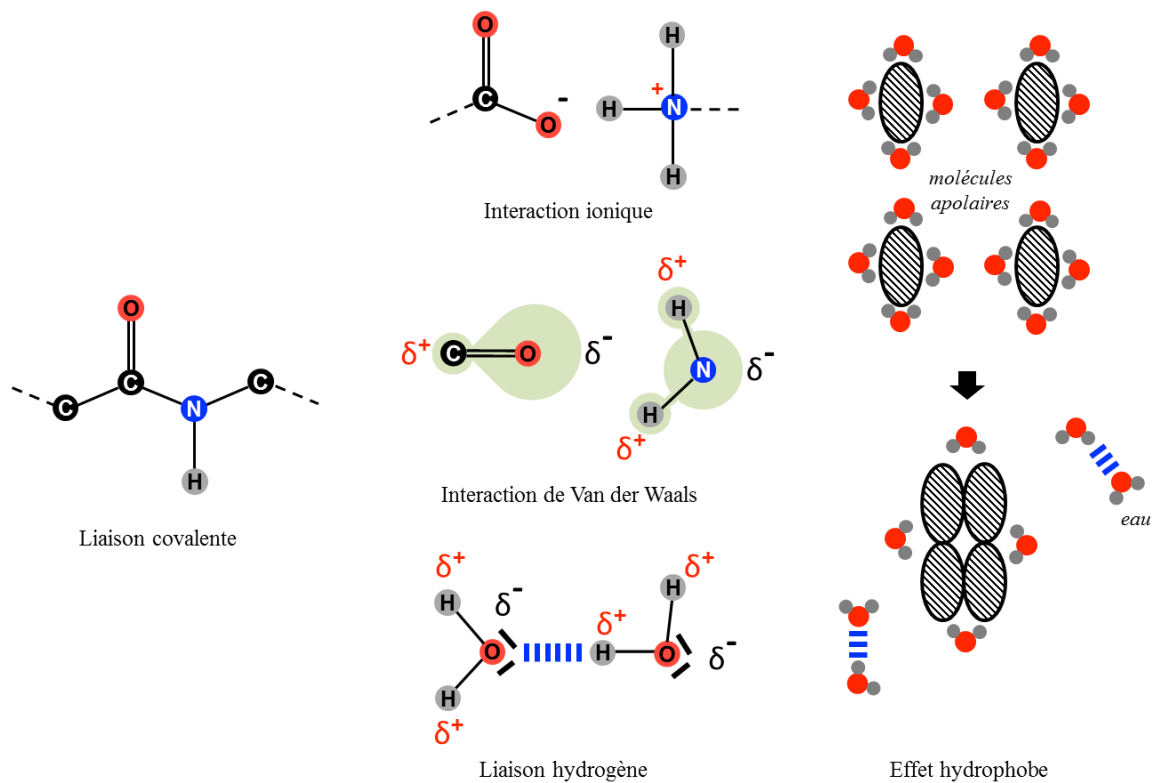


Figure 1 : Présentation des interactions covalentes et non-covalentes. Les interactions non-covalentes se composent des interactions de type électrostatique (interaction ionique, de Van der Waals, liaison hydrogène) et de l'effet hydrophobe.

1.1.2. L'interaction de Van der Waals.

L'interaction de Van der Waals implique 2 atomes porteurs d'une charge partielle de signe opposé, induite par l'existence de moments dipolaires permanents ou induits. La nature de ces dipôles permet de dégrouper cette interaction en 3 contributions [3] :

- Les interactions de Keesom : La différence d'électronégativité entre 2 atomes liés covalamment, entraîne une déformation du nuage électronique en direction de l'atome le plus électronégatif. Cette polarisation de l'interaction s'accompagne de l'apparition d'un moment dipolaire permanent $\vec{\mu}$ et de 2 charges partielles δ^+ et δ^- sur la molécule. Deux molécules polaires sont donc capables d'interagir ensemble à travers une interaction de type dipôle-dipôle.
- Les interactions de Debye : Une molécule polaire peut entraîner une polarisation du nuage électronique associé à une molécule apolaire, permettant une interaction de type dipôle-dipôle induit.
- Les interactions de London : La dissymétrie transitoire du nuage électronique associé à une molécule apolaire peut s'accompagner de la formation d'un dipôle instantané. A nouveau, ce dernier peut entraîner une polarisation du nuage électronique associé à une autre molécule apolaire, permettant une interaction de type dipôle instantané-dipôle induit.

En conséquent, la mise en place d'interactions de Van der Waals est d'autant plus favorisée que le moment dipolaire μ^{D} des molécules polaires est important, et que la polarisabilité des molécules apolaires est élevée. A nouveau, l'énergie de ces interactions est inversement proportionnelle à la distance inter-dipôle (d_{μ}^{D}) et à la permittivité électrique relative du milieu. Bien que cette dernière soit faible (0-10 kJ.mol⁻¹), l'application des interactions de Van der Waals à l'ensemble des molécules (polaires, apolaires) accroît leur contribution énergétique.

1.1.3. La liaison hydrogène.

La liaison hydrogène s'exerce entre un atome porteur d'un doublet électronique non liant et une molécule de type HX, où X correspond à un atome de forte électronégativité (O, N, S ou F) [3]. L'accentuation du caractère électrophile de l'atome d'hydrogène H (charge partielle δ^+) favorise son interaction avec le doublet non liant. Cette interaction, renforcée par l'alignement des groupements donneurs et accepteurs d'hydrogène, présente une énergie voisine de 10-40 kJ.mol⁻¹.

1.2. L'effet hydrophobe.

L'effet hydrophobe ne peut être rigoureusement associé à une interaction, s'assimilant davantage à une incapacité d'interaction vis-à-vis d'un solvant polaire [3]. Cette propriété implique une minimisation des interfaces entre molécules apolaires et molécules d'eau. Pour cela, les molécules apolaires s'associent entre elles selon un processus thermodynamiquement favorable. En effet, la libération des molécules d'eau séquestrées à leur périphérie (couche de solvation), permet à ces dernières de satisfaire un plus grand nombre de liaisons hydrogènes, se traduisant par une augmentation de l'entropie du système [6]. L'énergie d'interaction associée à l'effet hydrophobe apparaît considérablement réduite en phase gazeuse, en raison de l'absence de solvant.

1.3. Equilibre entre forces d'attraction et de répulsion totales.

La contribution de l'ensemble des interactions non-covalentes conduit au rapprochement spatial des molécules. Néanmoins, ces forces d'attraction sont progressivement contrebalancées par l'apparition de forces répulsives opposées, liées à l'impénétrabilité des nuages électroniques. La neutralisation de ces forces s'achève par l'atteinte d'une distance d'équilibre, marquant la formation des complexes supramoléculaires.

2. Les techniques biophysiques appliquées à l'étude de complexes supramoléculaires.

La caractérisation de complexes supramoléculaires repose sur un large éventail de techniques biophysiques, compatibles avec le maintien d'interactions non-covalentes. Bien que complémentaires, ces approches exploitent différentes caractéristiques physicochimiques de ces assemblages, fournissant des informations structurales de nature et résolution variables. Une présentation succincte des principales techniques employées, notamment au cours de ces travaux de thèse en combinaison à la spectrométrie de masse, est ici rapportée (Fig.2).

2.1. Les techniques à résolution moléculaire.

2.1.1. La chromatographie d'exclusion stérique (« Size Exclusion Chromatography », SEC).

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), également appelée filtration sur gel (GF), repose sur une séparation de molécules en solution en fonction de leur taille et de leur forme, ou plus exactement de leur volume hydrodynamique [7]. La séparation chromatographique de ces espèces, introduites dans une phase mobile non dénaturante, s'effectue au contact d'une phase stationnaire polymérique inerte et poreuse, contenue dans la colonne. Le contrôle de cette porosité limite la diffusion des molécules les plus volumineuses au sein de ces pores, accélérant leur élution dans le volume mort interstitiel. Réciproquement, la diffusion intra-pore des molécules de plus petite taille retarde leur progression, augmentant ainsi leur temps d'élution. L'application d'un étalonnage permet de déterminer le volume hydrodynamique de ces biomolécules (rayon de Stokes) en fonction de leur temps de rétention, et d'en extrapoler la masse moléculaire [8]. Cette technique analytique peut également être utilisée pour l'étude de changements conformationnels et la détermination de constantes d'affinité [9, 10]. Néanmoins, sa résolution limitée restreint généralement son application à l'identification de l'état oligomérique et de la stœchiométrie d'interaction entre molécules de taille importante. Pour conclure, cette approche est couramment utilisée à des fins préparatives, achevant la purification d'échantillons biologiques (élimination d'agrégats, d'éluants) et facilitant leur échange de tampon, notamment en spectrométrie de masse native (dessalage) [11].

2.1.2. L'ultracentrifugation analytique (« Analytical Ultracentrifugation », AUC).

L'ultracentrifugation analytique permet de séparer des molécules en solution en fonction de leur masse et/ou de leur coefficient de sédimentation [12]. A de faibles vitesses de rotation angulaire ($\omega \approx 1.10^4$ tours.min⁻¹), les forces de sédimentation et de diffusion exercées sur une molécule s'équilibrent : la concentration de chaque molécule (c) se distribue alors sous forme d'un gradient au sein du tube, augmentant de façon exponentielle avec la distance radiale (r)

parcourue. La détermination de la pente associée à l'équation $\ln(c) = f(r^2)$ de chaque espèce, permet une mesure directe de leur masse moléculaire. A des vitesses de rotation élevées ($\omega > 6.10^4$ tours.min⁻¹), la vitesse de sédimentation (v) de chaque espèce dépend de son coefficient de sédimentation (S) d'après $S = v / (\omega^2.r)$. La détermination expérimentale de S , relié à la masse et au rayon hydrodynamique de la molécule, donne ainsi accès à la forme de cette dernière (rayon de Stokes). A nouveau, ces 2 approches analytiques (équilibre et vitesse de sédimentation) peuvent être appliquées à l'étude de l'état oligomérique, de la stœchiométrie d'interaction, des constantes d'affinité ou de changements conformationnels entre biomolécules [13, 14]. Plus résolutive que la chromatographie d'exclusion stérique, l'ultracentrifugation analytique s'avère particulièrement adaptée pour l'étude de molécules à large distribution de taille (10^3 - 10^9 Da) [12, 15]. Néanmoins, son faible débit analytique (20 échantillons / jour) et son manque d'automatisation restreint son application [16].

2.1.3. Les techniques de diffusion de lumière (« Static-Dynamic Light Scattering », SLS-DLS).

L'irradiation de molécules en solution par un faisceau monochromatique, de longueur d'onde supérieure à la taille de ces particules, s'accompagne d'une diffusion élastique d'une partie de ce rayonnement (diffusion de Rayleigh) [17, 18]. Dans ces conditions, l'intensité du rayonnement diffusé et sa variation au cours du temps, dépendent alors des propriétés structurales des molécules diffuseuses.

- En diffusion statique de la lumière (SLS), l'intensité moyenne de ce rayonnement est mesurée à un ou plusieurs angles de détection (« Multi-Angle (Laser) Light Scattering », MA(L)LS), permettant une détermination directe de la masse et de la forme (rayon de giration, non hydraté) des molécules à partir de l'équation de Rayleigh [17].
- En diffusion dynamique de la lumière (DLS), les fluctuations de cette intensité sur de faibles intervalles de temps (μ s) sont étudiées à angle fixe, donnant accès au rayon hydrodynamique des molécules et à l'indice de polydispersité du milieu (distribution de la taille des espèces en solution) par application de l'équation de Stokes-Einstein [17].

Les informations ainsi obtenues permettent d'identifier la stœchiométrie d'interaction et l'état oligomérique de biomolécules (SLS) mais également de détecter l'agrégation ou l'existence de changements conformationnels importants au sein de ces espèces (DLS) [19-22]. L'approche DLS apparaît aujourd'hui comme une technique de choix pour l'évaluation de la solubilité de biomolécules. Parallèlement, la diffusion statique de lumière (SLS) se retrouve fréquemment couplée à la chromatographie d'exclusion stérique, à des fins analytiques.

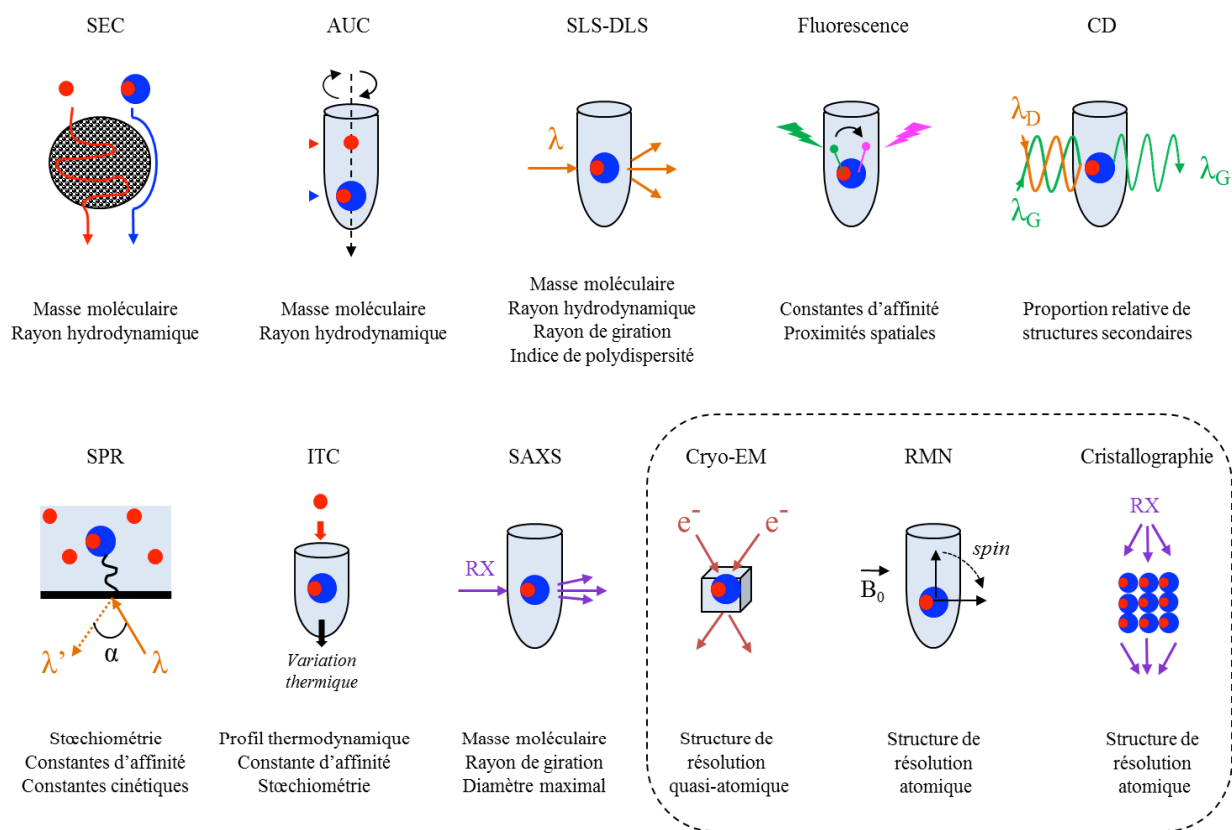


Figure 2 : Présentation schématique des principales techniques biophysiques appliquées à l'étude d'interactions non-covalentes. Les informations structurales majeures pouvant être déduites de ces analyses, sont ici indiquées pour chaque approche. Les techniques à résolution atomique sont regroupées au sein de l'encadré.

2.1.4. Les techniques de fluorescence.

A l'instar des précédentes techniques, l'interaction entre une molécule et un rayonnement incident peut aboutir à l'absorption d'un photon, dont l'énergie est rapidement restituée par émission d'un photon de longueur d'onde plus élevée [23]. Ces propriétés, dites de fluorescence, sont exploitées en biologie structurale à travers 2 approches complémentaires :

- L'anisotropie de fluorescence : cette technique consiste à mesurer le degré de polarisation (anisotropie) du rayonnement fluorescent émis par une molécule préalablement excitée à partir d'une lumière polarisée [24]. En effet, la dépolarisation de fluorescence dépend de l'environnement du fluorophore, et résulte principalement de la rotation de ce dernier par agitation brownienne. L'interaction de cette molécule avec un partenaire de grande taille (protéine, etc.) restreint son degré de liberté rotationnelle, limitant la dépolarisation de sa fluorescence (anisotropie élevée). La mesure de cette grandeur en conditions de titrage, permet ainsi de déterminer l'existence d'interactions non-covalentes entre partenaires et de quantifier les constantes d'affinité associées à leurs complexes [25]. Cette approche, sensible et rapide, est aujourd'hui largement répandue dans le domaine du criblage haut-

débit [26].

- Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET) : deux fluorophores suffisamment proches (1-10 nm) peuvent établir un transfert d'énergie, si le spectre d'émission du fluorophore donneur recouvre le spectre d'excitation du fluorophore accepteur [23]. La quantification de ce transfert d'énergie entre 2 fluorophores, disposés sur deux partenaires ou au sein d'une même molécule, peut ainsi permettre la caractérisation de complexes non-covalents ou l'identification de changements conformationnels [27, 28].

La principale limitation de ces techniques réside dans la capacité de fluorescence intrinsèque des molécules étudiées. L'absence ou le positionnement inadéquat de fluorophores endogènes (ex : acides aminés Trp, Tyr et Phe pour une protéine) nécessite l'introduction de tels groupements, pouvant modifier la structure des molécules ciblées [29]. Néanmoins, ces approches offrent l'avantage unique de pouvoir être exploitées dans un contexte *in vivo* [30].

2.1.5. Le dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'une molécule optiquement active (pourvue de centres de chiralité) à absorber de manière inégale, la lumière polarisée circulairement droite ou gauche à une longueur d'onde donnée [31]. Pour cela, la solution d'échantillon est généralement irradiée au sein d'un spectropolarimètre, délivrant alternativement un rayonnement polarisé circulairement droite et gauche. Le spectre dichroïque (CD) ainsi obtenu correspond à la différence d'absorbance entre ces 2 types de rayonnement en fonction de la longueur d'onde. L'application de cette technique à l'étude des protéines permet ainsi de sonder leur contenu en structures secondaires [32]. En effet, les motifs structuraux de type hélice α , feuillet β et coude, constituant ces dernières, présentent une signature spectrale CD caractéristique dans le domaine de l'ultraviolet lointain (190-250 nm). La déconvolution de ces spectres offre la possibilité de déterminer la proportion relative de chacun de ces 3 motifs au sein de la protéine [33]. Cette technique est couramment utilisée afin de vérifier l'état de repliement de protéines recombinantes, et étudier l'influence de conditions physicochimiques (pH, force ionique, température, agent dénaturant) ou biologiques (ajout d'un partenaire, d'un ligand) sur la structure tridimensionnelle de protéines cibles [33-35]. Bien que peu compatible avec certains tampons (absorptions parasites), la rapidité de cette approche, sa faible consommation d'échantillon, son couplage aux outils de cinétique rapide et son application à une large gamme de masse, soulignent son intérêt en biologie structurale.

2.1.6. La résonance plasmonique de surface (SPR).

L'interaction entre une molécule réceptrice, immobilisée sur un support fonctionnalisé, et son partenaire ligand, circulant en solution, peut être caractérisée par résonance plasmonique de surface [36, 37]. Le support de greffage (biocapteur) se compose d'un substrat en verre recouvert d'une fine couche de métal (ex : or, argent), dont la fonctionnalisation permet l'adsorption covalente du récepteur. L'excitation des électrons libres contenus dans le métal (plasmons de surface) par un faisceau monochromatique polarisé, peut s'accompagner d'une entrée en résonance de ces derniers en fonction de l'angle d'incidence appliqué. Dans ces conditions, le rayonnement réfléchi par ces particules se caractérise par une chute d'intensité, dont l'angle de réflexion dépend de l'indice de réfraction à proximité de l'interface métal/liquide. En modifiant cet indice, l'association/dissociation du complexe récepteur-ligand peut être suivie en temps réel, par détermination de l'angle de résonance associé à l'onde évanescente. La quantification de cette déviation d'angle, proportionnelle à la quantité de ligand fixé, permet de déterminer la constante cinétique d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) du complexe lors des étapes d'association (flux de ligand) et de dissociation (flux de tampon). En plus de la stœchiométrie d'interaction, cette approche permet d'accéder à la constante d'affinité (K_a) entre 2 molécules [37]. Aujourd'hui applicable au criblage haut-débit [38, 39], la résonance plasmonique de surface présente néanmoins certaines limitations. La régénération du biocapteur peut notamment s'avérer délicate en présence de ligands très affins, tandis que l'immobilisation covalente du récepteur requiert une préservation stricte de ses propriétés structurales (accessibilité du site d'interaction, flexibilité du récepteur etc.) [40].

2.1.7. La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC).

En plus de propriétés spectrophotométriques, la formation de complexes non-covalents s'accompagne d'échanges thermiques, résultant d'une absorption (réaction endothermique) ou d'un dégagement de chaleur (réaction exothermique) [41]. La quantité de chaleur émise ou absorbée lors du titrage entre 2 molécules, est ainsi mesurée à l'aide d'un microcalorimètre au sein d'une cellule adiabatique, révélant le profil thermodynamique de l'interaction. Cette approche donne ainsi accès à la stœchiométrie d'interaction et à la constante d'affinité (K_a) entre partenaires, déduites de la mesure directe de la variation d'enthalpie (ΔH) et du calcul des différences d'enthalpie libre (ΔG) et d'entropie (ΔS) de la réaction [42-44]. Sensible et rapide, l'ITC ne nécessite aucun marquage et s'applique à un large panel de biomolécules en solution. Néanmoins, le débit analytique de cette approche reste limité (≈ 25 échantillons par jour) [45].

2.1.8. La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS).

La diffusion de rayons X aux petits angles (« Small Angle X-ray Scattering », SAXS) consiste à mesurer l'intensité (I) des rayons X diffusés par une molécule irradiée en solution, à de faibles angles de diffusion ($\theta \approx 0.1-10^\circ$) [46, 47]. La détermination de la courbe de diffusion $I=f(\theta)$ d'une molécule donne alors accès à certaines informations structurales, dont la masse ($\theta=0$), le rayon de giration et le diamètre maximal ($\theta>0$) au sein de cette dernière. La modélisation de ces données permet la proposition de structures de basse résolution (10-15Å), décrivant l'enveloppe de ces molécules en solution. L'approche SAXS s'avère particulièrement adaptée à l'étude de complexes hétérogènes de haut poids moléculaire (protéines, acides nucléiques etc.) réfractaires à la cristallisation, apportant des informations sur l'état oligomérique et la flexibilité conformationnelle de ces assemblages [48, 49]. Néanmoins, la faible résolution de cette technique limite son application à l'étude de complexes non-covalents impliquant de petites molécules, et nécessite sa combinaison à d'autres approches orthogonales. Notons enfin qu'une alternative à cette approche, basée sur la diffusion de neutrons aux petits angles (« Small Angle Neutron Scattering », SANS), permet l'obtention d'informations structurales similaires en présence de biomolécules [46].

2.2. Les techniques à résolution atomique.

2.2.1. La cryo-microscopie électronique (« Cryo-Electron Microscopy », cryo-EM).

La cryo-microscopie électronique repose sur l'analyse de molécules vitrifiées (« cryo ») et irradiées par un faisceau d'électrons (microscopie électronique) [50]. L'échantillon biologique, purifié dans son tampon de stockage natif, est déposé sous forme d'aliquot sur une grille métallique support, recouverte d'un film fin de carbone. L'échantillon est disposé en une couche mince, avant d'être plongé dans l'éthane liquide (-180°C). Ce procédé permet de figer la structure native des molécules au sein du tampon vitrifié, limitant leur dégradation sous l'impact du faisceau d'électrons et leur déshydratation dans le vide du microscope électronique [51]. L'irradiation de ces molécules par un rayonnement d'électrons est réalisée à différents angles, permettant l'obtention de clichés de diffraction 2D. La combinaison de ces images permet une reconstitution de la structure tridimensionnelle des molécules en phase solide, jusqu'à une résolution proche de l'atome ($\approx 3 \text{ \AA}$) [52]. Cette technique, ne nécessitant pas le marquage, la fixation et la cristallisation de l'échantillon, est aujourd'hui devenue incontournable dans l'analyse structurale de complexes hétérogènes de hautes masses [53, 54].

2.2.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN).

La résonance magnétique nucléaire repose sur l'existence d'une interaction entre un champ magnétique et certains noyaux atomiques de spin non nul (ex : ^1H , ^{13}C , ^{15}N) [55]. L'excitation de ces atomes par un rayonnement électromagnétique s'achève par leur relaxation, dont la fréquence dépend de leur environnement au sein de la molécule. L'analyse de ces fréquences, représentées sous forme de déplacements chimiques au sein des spectres RMN, permet de déterminer la structure tridimensionnelle de biomolécules et de leurs complexes [56, 57]. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être appliquée directement en solution, fournissant des informations dynamiques sur des échelles de temps réduites [58]. Les débits analytiques accessibles (10-1000 échantillons par jour) étendent par ailleurs le potentiel de la RMN au domaine du criblage haut-débit [59-61]. Néanmoins, les limites de taille ($<10^2$ kDa) et quantités de matériel (mg) imposées par cette approche peuvent constituer un écueil à son application.

2.2.3. La cristallographie aux rayons X (RX).

A ce jour, la cristallographie aux rayons X apparaît comme la technique la plus sollicitée en biologie structurale. Cette dernière exploite la capacité de la matière cristalline à diffracter un faisceau de rayons X incident [62]. Pour cela, les molécules contenues dans une solution d'échantillon pure et homogène, doivent pouvoir s'organiser sous forme de cristaux, assemblages réguliers et ordonnés à l'état solide. Les clichés de diffraction obtenus par irradiation du cristal à différents angles, permettent d'identifier la nature et la position de chaque atome contenu au sein de la molécule, dévoilant ainsi sa structure tridimensionnelle. La caractérisation RX de complexes non-covalents permet alors révéler leur stœchiométrie, leur site d'interaction ou encore leur conformation à l'échelle atomique [63-65]. La résolution cristallographique de protéines cibles sert également d'ébauche à la conception rationnelle de ligands (« structure-based drug design ») [66, 67]. Cependant, cette approche est confrontée à 2 difficultés majeures : l'obtention de cristaux à partir des biomolécules étudiées, et l'importante quantité de matériel (mg) exigée pour une telle analyse.

3. Conclusions.

La complémentarité des informations structurales accessibles à partir des différentes techniques présentées, permet une caractérisation approfondie des interactions non-covalentes s'établissant entre biomolécules. Néanmoins, les limitations inhérentes à chacune de ces approches peuvent considérablement restreindre leur mise en application, selon le système biologique étudié. Afin de pallier à ces inconvénients, certaines techniques alternatives ont été développées, notamment dans le domaine de la spectrométrie de masse structurale.

Chapitre 2 : Application de la spectrométrie de masse structurale à l'étude de complexes protéiques non-covalents.

Initialement réservée à la caractérisation de la structure primaire des protéines, l'émergence de la spectrométrie de masse au cours des 20 dernières années a permis d'étendre son potentiel à l'étude des structures secondaires, tertiaires et quaternaires de ces biomolécules [68-70]. Profitant d'un développement instrumental continu, les performances de cette technique (sensibilité, résolution, rapidité, faible consommation d'échantillon, transmission d'ions de hauts rapports m/z , tolérance aux détergents etc.) facilitent son application à l'étude de systèmes non-covalents complexes et hétérogènes [71-73], de taille [74] et insolubilité croissantes [75]. Les perspectives offertes par la MS et ses différents couplages pour la caractérisation structurale et dynamique de ces complexes, sont ici présentées.

1. La spectrométrie de masse structurale : généralités.

Le couplage de la MS à différentes approches séparatives (chromatographie liquide, mobilité ionique) et analytiques (marquage ou pontage covalent en solution, protéolyse ménagée) permet l'obtention d'informations structurales à différents niveaux de caractérisation (protéines intactes, fragments, peptides, acides aminés). Une présentation des principales méthodes de MS structurale et de leurs applications est ici illustrée sur un complexe modèle constitué de 3 partenaires (Fig.3). Ces approches peuvent être regroupées en 2 catégories :

- Les approches MS en milieu non marqué couplées à l'analyse supramoléculaire (MS native, IM-MS native, « Top down native MS »), permettant une analyse directe des complexes non-covalents.
- Les approches MS en milieu non marqué (protéolyse ménagée) ou marqué (échange hydrogène/deutérium ou HDX-MS, marquage covalent radicalaire ou FPOP/HRF-MS, pontage covalent ou XL-MS) couplées à l'analyse protéomique, permettant une étude indirecte des complexes non-covalents.

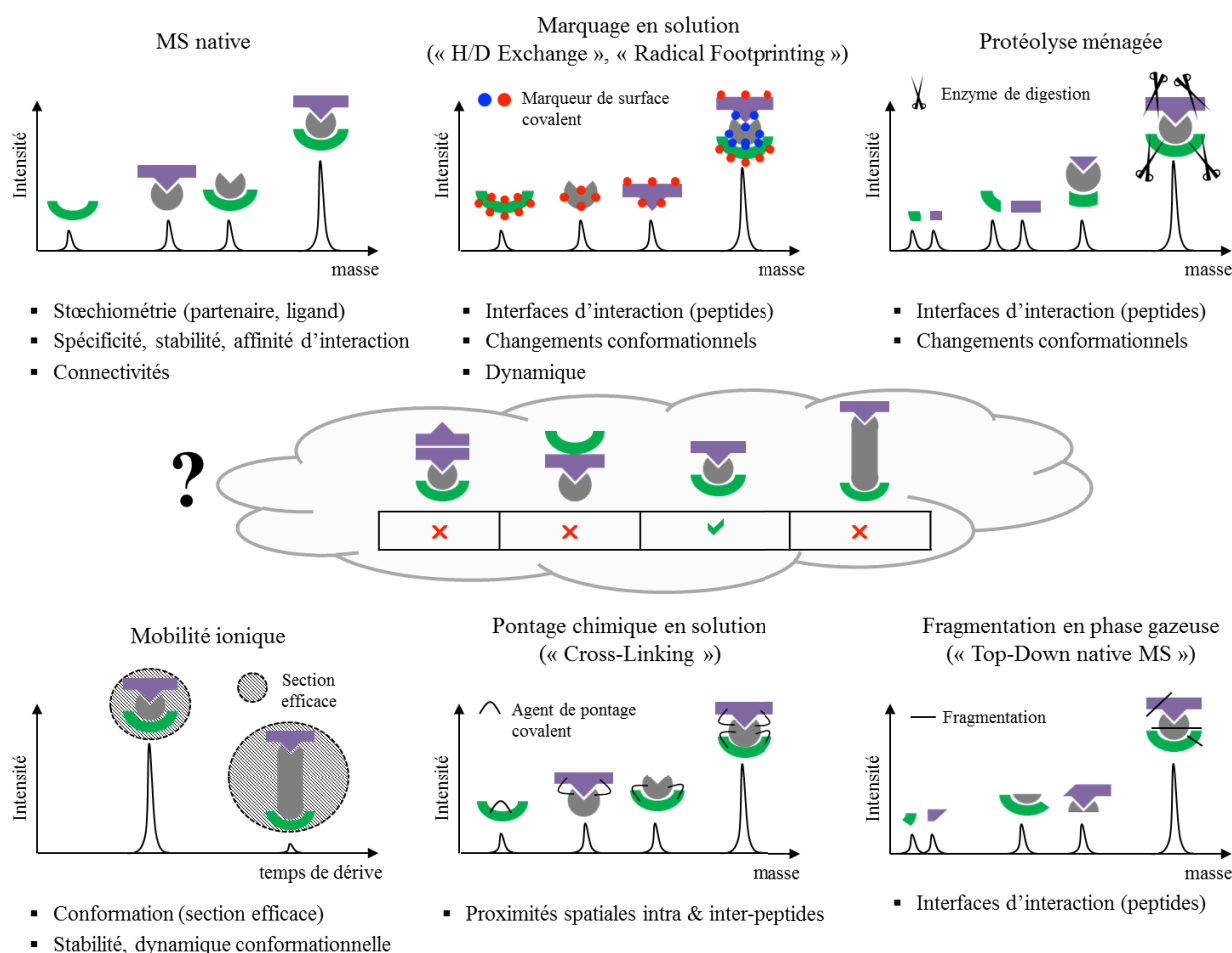


Figure 3 : Présentation des principales méthodes de MS structurale appliquées à la caractérisation de complexes multi-protéiques. L'analyse d'un complexe modèle, constitué de 3 partenaires (vert, gris, violet), peut être adressée à différents niveaux de caractérisation (protéine, peptide, acide aminé) en fonction de la méthode employée. Les informations structurales de basse résolution obtenues à partir de ces différentes approches sont ici indiquées.

2. Les approches MS en milieu non marqué, couplées à l'analyse supramoléculaire.

2.1. La spectrométrie de masse native (MS native).

L'analyse de complexes non-covalents entiers par MS native permet une détermination de leur masse intacte. Cette mesure de masse, dont la justesse peut être améliorée à haute résolution (partie 2) [76, 77], permet d'accéder à la stœchiométrie d'interaction en partenaire et en ligand des complexes [78, 79]. L'analyse des sous-complexes purifiés [80, 81], reconstitués [80, 82] ou générés par dénaturation partielle en solution [83, 84] et dissociation en phase gazeuse [85, 86] du complexe entier, fournit des informations sur les connectivités entre sous-unités [82]. La dynamique d'interaction entre ces espèces peut être explorée par MS native en temps réel [78, 87], tandis que leur titrage en ligand permet une détermination de leur spécificité et affinité d'interaction [88, 89]. Présentant une faible tolérance aux tampons non volatils (ex : NaCl, Na₂HPO₄, Tris, HEPES), la MS native nécessite un dessalage préalable des échantillons dans un tampon volatil (ex : AcNH₄, NH₄HCO₃) aux propriétés physicochimiques optimales (pH,

force ionique) [90]. Le recours à des détergents de faibles CMCs (concentrations micellaires critiques) rend néanmoins possible l'analyse en milieu micellaire, facilitant l'étude de complexes membranaires [91]. Une description approfondie de cette approche et de ses limites est proposée en parties 2, 3 et 4 de ce manuscrit.

2.2. La spectrométrie de masse native couplée à la mobilité ionique (IM-MS native).

Le couplage de la MS native à la mobilité ionique (IM-MS) étend la caractérisation de ces complexes et sous-complexes à leurs conformations globales [92, 93]. La mesure de leurs sections efficaces (CCSs, partie 3) offre une quantification du volume projeté par ces espèces sur une surface 2D, permettant l'identification de conformères [94, 95], le suivi de changements conformationnels associés à l'assemblage de complexes multiprotéiques [81, 82] ou encore la mise en évidence de subtils changements de conformation induits par la fixation de ligands [96, 97]. La nature dynamique de ces informations [98] permet de suivre la flexibilité conformationnelle de tels complexes [99] et d'en étudier les mécanismes de repliement/dépliement (« folding/unfolding ») [100, 101]. Plus récemment, l'activation de ces conformations en phase gazeuse (approches CIU, partie 3) a permis de révéler des différences de stabilité conformationnelle induites par la fixation de ligands [102, 103]. Néanmoins, la détermination de CCSs par mobilité ionique n'est techniquement possible qu'en présence d'un champ électrique faible (« low-field regime », partie 3) [104, 105]. Parmi les interfaces IM-MS actuellement commercialisées, seules les cellules IM de type « Drift Tube » (DTIMS) et « Travelling Wave » (TWIMS) vérifient ce prérequis et disposent d'une application en biologie structurale [93, 98]. *A contrario*, les cellules de type FAIMS (« High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry ») ou DMS (« Differential Mobility Spectrometry »), s'appuyant sur un champ électrique intense, ne fournissent ici « qu'une » dimension de séparation supplémentaire, exploitée notamment en analyse protéomique [106, 107]. Une présentation détaillée de la technologie TWIMS, de son application en IM-MS native et de ses limites, est rapportée en parties 3 et 4 de ce manuscrit.

2.3. La spectrométrie de masse native couplée à la fragmentation en phase gazeuse (« Top-Down Native MS »).

L'analyse de complexes non-covalents par approche « Top-Down Native MS » étend la caractérisation de ces édifices intacts à l'échelle de leurs fragments [108]. Le recours à des techniques de fragmentation en phase gazeuse non ergodiques, comme l'ETD (Electron Transfert Dissociation) ou l'ECD (Electron Capture Dissociation), favorise le maintien d'interactions non-covalentes lors de la fragmentation des complexes intacts [109, 110].

L'assignation des ions fils générés par MS native en tandem permet une détermination des interfaces protéine-protéine [111-113] et protéine-ligand [114-117]. La fragmentation concomitante du squelette protéique offre l'opportunité d'étudier la séquence primaire des partenaires au sein de la même expérience, rendant cette méthode complémentaire aux approches protéomiques de type « bottom-up » couramment utilisées [118-120].

3. Les approches MS couplées à l'analyse protéomique.

3.1. La protéolyse ménagée.

Les informations structurales ainsi obtenues à l'échelle des protéines entières, peuvent être adressées à l'échelle peptidique par protéolyse ménagée. La digestion ménagée de ces assemblages en conditions natives restreint l'activité protéolytique aux sites de coupures accessibles, permettant de distinguer le cœur des complexes des zones périphériques [121]. L'analyse MS des fragments ainsi générés permet d'identifier les interfaces d'interaction entre sous-unités [122, 123] et étudier la dynamique conformationnelle de ces complexes (flexibilité, changements de conformation), par comparaison des profils de digestion obtenus à différents temps de réaction et en présence de différents partenaires [124, 125].

3.2. Le pontage covalent (« Cross-Linking », XL-MS).

Le pontage covalent (encore appelé « Cross-Linking ») des complexes en conditions physiologiques permet leur analyse par approche protéomique XL-MS [126]. La proximité spatiale des acides aminés ciblés permet l'établissement d'une liaison covalente entre leurs chaînes latérales, à partir d'un agent pontant (« cross-linker ») de longueur et spécificité variables [127-130]. La digestion enzymatique du complexe en conditions dénaturantes s'accompagne d'un séquençage peptidique par analyse protéomique LC-MS/MS. La caractérisation des peptides pontés permet ainsi de localiser les proximités inter- et intra-peptides au sein du complexe natif, précisant l'architecture de ces assemblages [131-134].

3.3. L'échange hydrogène/deutérium (HDX-MS).

L'échange hydrogène/deutérium (HDX-MS) permet de sonder l'accessibilité au solvant deutéré des protons amidiques situés sur le squelette carboné des protéines [135, 136]. L'analyse comparative du profil d'incorporation en deutérium de chaque peptide (ou résidu), obtenu à différents temps de marquage ou en présence/absence de différents partenaires, permet d'étudier la dynamique de ces assemblages [137, 138], identifier les interfaces d'interaction entre partenaires [139, 140] ainsi que l'existence de changements conformationnels [141, 142]. De manière alternative, l'échange H/D peut être réalisé en phase gazeuse au sein du

spectromètre de masse, par application d'un gaz enrichi en deutérium (ex : gaz ND₃, CD₃OD) [143, 144]. Cette approche complémentaire, sondant les propriétés conformationnelles des complexes en phase gazeuse, permet notamment d'étudier l'accessibilité des hydrogènes situés sur les chaînes latérales par application de temps de marquage plus courts (0.1-10ms). Néanmoins, la résolution spatiale de ces informations (protéine, fragment, résidu) dépend de l'efficacité de fragmentation des ions intacts en phase gazeuse (approches « Top-Down »), limitant cette application à l'étude de complexes de taille intermédiaire (≈ 25 kDa) [145, 146].

3.4. Le marquage radicalaire (HRF-MS, FPOP-MS).

Le recouvrement spatial des informations précédentes peut être complété par des approches de marquage aspécifiques radicalaires (« Hydroxyl Radical Footprinting » ou HRF-MS, « Fast Photochemical Oxidation of Proteins » ou FPOP-MS) [147, 148] ou spécifiques [149], ciblant les chaînes latérales des résidus. A nouveau, l'analyse différentielle des profils de marquage de chaque peptide ou résidu, obtenus dans différentes conditions, peut être appliquée à l'étude des interfaces d'interaction protéine-protéine [150] et à la dynamique conformationnelle des complexes [151, 152].

3.5. Les techniques de protéomique quantitative.

Ces principales méthodes de MS structurale sont aujourd'hui rejointes par les outils de protéomique quantitative (« Selected Reaction Monitoring » ou SRM, « Label-Free Quantification » ou LFQ). La quantification absolue (SRM-MS) ou relative (Label-Free) des peptides protéotypiques associés à chaque sous-unité d'un complexe, purifié sous forme intacte par immuno-affinité, donne ainsi accès à la composition de ces assemblages et à leur stœchiométrie d'interaction [153, 154].

4. Conclusions.

Le potentiel des différentes techniques de MS structurale offre des perspectives analytiques prometteuses pour la caractérisation dynamique de complexes protéiques non-covalents. La complémentarité de ces approches aux principales techniques biophysiques (chapitre 1) élargit la palette d'outils applicables en biologie structurale, facilitant l'étude d'assemblages supramoléculaires jusqu'alors réfractaires. Néanmoins, chacune de ces techniques présente ses propres inconvénients, associés aux conditions expérimentales (efficacité de pontage en XL-MS, de dessalage en MS native, échange inverse D/H et recouvrement de séquence en HDX-MS, reproductibilité en digestion ménagée), instrumentales (maintien des complexes non-covalents et de leurs conformations natives en MS et IM-MS native, efficacité de fragmentation

en « Top Down Native MS ») et au retraitement informatique des données (identification des peptides pontés en XL-MS, assignation des fragments en protéolyse ménagée, interprétation manuelle en MS native, IM-MS native, « Top-Down Native MS »). D'autre part, ces approches présentent une résolution limitée (résidu) au regard des techniques à résolution atomique disponibles, nécessitant la combinaison de ces données orthogonales.

Conclusion de cette partie

Cette introduction bibliographique rappelle l'importance et la diversité des interactions non-covalentes mises en jeu dans la régulation des processus biologiques. La compréhension fonctionnelle de ces voies de régulation nécessite une caractérisation structurale approfondie de leurs constituants moléculaires, s'assemblant en un réseau de complexes non-covalents.

Les principales techniques biophysiques appliquées à l'étude de ces assemblages se distinguent par la nature des informations structurales obtenues (taille, forme des complexes) et leur résolution (moléculaire ou atomique). Bien que complémentaires, ces outils peuvent se heurter à certains écueils (quantité de matériel, taille et hétérogénéité des espèces), limitant leur application à l'étude structurale des systèmes biologiques concernés.

Afin de contourner ces limitations, des approches alternatives et émergentes ont été développées, notamment dans le domaine de la spectrométrie de masse. Les performances analytiques de cette technique, profitant d'un développement instrumental continu, peuvent aujourd'hui être couplées à de nombreuses approches séparatives et analytiques. Ces approches dites hybrides, permettent une caractérisation structurale dynamique des complexes non-covalents à différents niveaux de résolution (structure quaternaire à l'acide aminé). L'orthogonalité des approches de MS structurale aux techniques biophysiques de référence, contribue à leur essor dans la recherche académique et l'industrie pharmaceutique. Néanmoins, le potentiel de ces techniques reste à ce jour suspendu à 2 défis majeurs : le développement de méthodes expérimentales et instrumentales avancées, ainsi que la combinaison/intégration des données structurales issues de ces approches transversales.

L'optimisation de ces 2 critères réalisée au cours de ce travail de thèse, se focalise sur 2 approches de MS structurale d'intérêt grandissant : la MS native, combinée à l'IM-MS native.

Références bibliographiques

1. Frieden, E., *Non-covalent interactions: key to biological flexibility and specificity*. Journal of chemical education, 1975. **52**(12): p. 754.
2. Lehn, J.M., *Supramolecular Chemistry Scope and Perspectives - Molecules Supramolecules Molecular Devices*. Journal of Inclusion Phenomena, 1988. **6**(4): p. 351-396.
3. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces 2nd edn (New York: Academic)*. 1992.
4. Boehr, D.D., R. Nussinov, and P.E. Wright, *The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition*. Nature chemical biology, 2009. **5**(11): p. 789-796.
5. Nakamura, H., *Roles of electrostatic interaction in proteins*. Quarterly reviews of biophysics, 1996. **29**(01): p. 1-90.
6. Southall, N.T., K.A. Dill, and A. Haymet, *A view of the hydrophobic effect*. The Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(3): p. 521-533.
7. Mori, S. and H.G. Barth, *Size exclusion chromatography*. 2013: Springer Science & Business Media.
8. Winzor, D.J., *Analytical exclusion chromatography*. Journal of biochemical and biophysical methods, 2003. **56**(1): p. 15-52.
9. Batas, B., H.R. Jones, and J.B. Chaudhuri, *Studies of the hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size-exclusion chromatography*. Journal of Chromatography A, 1997. **766**(1): p. 109-119.
10. Winzor, D.J., *Determination of binding constants by analogous procedures in size exclusion chromatography and capillary electrophoresis*. Analytical biochemistry, 2008. **383**(1): p. 1-17.
11. Batas, B. and J.B. Chaudhuri, *Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography*. Biotechnology and bioengineering, 1996. **50**(1): p. 16-23.
12. Cole, J.L., et al., *Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium*. Methods in cell biology, 2008. **84**: p. 143-179.
13. Lebowitz, J., M.S. Lewis, and P. Schuck, *Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review*. Protein Science, 2002. **11**(9): p. 2067-2079.
14. Brown, P.H. and P. Schuck, *Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*. Biophysical Journal, 2006. **90**(12): p. 4651-4661.
15. Balbo, A. and P. Schuck, *Analytical ultracentrifugation in the study of protein self-association and heterogeneous protein-protein interactions*. Protein-Protein Interactions, 2005: p. 253-277.
16. Philo, J.S., *Analytical ultracentrifugation*. Methods for structural analysis of protein pharmaceuticals, 1st edn. AAPS Press, Arlington, 2005: p. 379-412.
17. Brown, W., *Light scattering: principles and development*. Vol. 53. 1996: Oxford University Press.
18. Gast, K., *Dynamic and static light scattering*. Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure And Conformation, 2010: p. 477-524.
19. Murphy, R.M., *Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn?* Current opinion in biotechnology, 1997. **8**(1): p. 25-30.
20. Sciara, G., et al., *A topological model of the baseplate of lactococcal phage Tuc2009*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(5): p. 2716-2723.
21. Moradian-Oldak, J., et al., *Detection of monodisperse aggregates of a recombinant amelogenin by dynamic light scattering*. Biopolymers, 1994. **34**(10): p. 1339-1347.
22. Papish, A.L., L.W. Tari, and H.J. Vogel, *Dynamic light scattering study of calmodulin-target peptide complexes*. Biophysical Journal, 2002. **83**(3): p. 1455-1464.
23. Yan, Y. and G. Marriott, *Analysis of protein interactions using fluorescence technologies*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(5): p. 635-640.
24. Steiner, R.F., *Fluorescence anisotropy: theory and applications*, in *Topics in fluorescence spectroscopy*. 2002, Springer. p. 1-52.
25. Veiksina, S., S. Kopanchuk, and A. Rincken, *Fluorescence anisotropy assay for pharmacological characterization of ligand binding dynamics to melanocortin 4 receptors*. Analytical biochemistry, 2010. **402**(1): p. 32-39.
26. Lea, W.A. and A. Simeonov, *Fluorescence polarization assays in small molecule screening*. Expert opinion on drug discovery, 2011. **6**(1): p. 17-32.
27. Verhalen, B., et al., *Dynamic ligand-induced conformational rearrangements in P-glycoprotein as*

- probed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(2): p. 1112-1127.
28. Banerjee, P., et al., *Fluorescence resonance energy transfer: a promising tool for investigation of the interaction between 1-anthracene sulphonate and serum albumins*. *Journal of Luminescence*, 2011. **131**(2): p. 316-321.
 29. Talukder, P., et al., *Tryptophan-based fluorophores for studying protein conformational changes*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2014. **22**(21): p. 5924-5934.
 30. Ciruela, F., *Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells*. *Current opinion in biotechnology*, 2008. **19**(4): p. 338-343.
 31. Berova, N. and K. Nakanishi, *Circular dichroism: principles and applications*. 2000: John Wiley & Sons.
 32. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005. **1751**(2): p. 119-139.
 33. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. *Nature protocols*, 2006. **1**(6): p. 2876-2890.
 34. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions*. *Nature protocols*, 2006. **1**(6): p. 2527-2535.
 35. Latz, E., et al., *Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9*. *Nature immunology*, 2007. **8**(7): p. 772-779.
 36. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. **377**(3): p. 528-539.
 37. Torrieri, P., et al., *Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology*. *Ann Ist Super Sanita*, 2005. **41**(4): p. 437-441.
 38. Navratilova, I. and A.L. Hopkins, *Fragment screening by surface plasmon resonance*. *ACS medicinal chemistry letters*, 2010. **1**(1): p. 44-48.
 39. Maynard, J.A., et al., *Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins*. *Biotechnology journal*, 2009. **4**(11): p. 1542-1558.
 40. Homola, J., *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. *Chemical reviews*, 2008. **108**(2): p. 462-493.
 41. Lewis, E.A. and K.P. Murphy, *Isothermal titration calorimetry*, in *Protein-Ligand Interactions*. 2005, Springer. p. 1-15.
 42. Velazquez-Campoy, A. and E. Freire, *Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands*. *NATURE PROTOCOLS-ELECTRONIC EDITION-*, 2006. **1**(1): p. 186.
 43. Freyer, M.W. and E.A. Lewis, *Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions*. *Methods in cell biology*, 2008. **84**: p. 79-113.
 44. Duff Jr, M.R., J. Grubbs, and E.E. Howell, *Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2011(55).
 45. Yennawar, N.H., et al., *Chapter Seventeen-A High-Throughput Biological Calorimetry Core: Steps to Startup, Run, and Maintain a Multiuser Facility*. *Methods in Enzymology*, 2016. **567**: p. 435-460.
 46. Svergun, D.I., et al., *Small angle X-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules*. Vol. 19. 2013: Oxford University Press.
 47. Bernadó, P. and D.I. Svergun, *Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering*. *Molecular biosystems*, 2012. **8**(1): p. 151-167.
 48. Mertens, H.D. and D.I. Svergun, *Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering*. *Journal of structural biology*, 2010. **172**(1): p. 128-141.
 49. Jain, R., et al., *Structural insights into yeast DNA polymerase δ by small angle X-ray scattering*. *Journal of molecular biology*, 2009. **394**(3): p. 377-382.
 50. Carroni, M. and H.R. Saibil, *Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes*. *Methods*, 2015.
 51. Dubochet, J., et al., *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. *Quarterly reviews of biophysics*, 1988. **21**(02): p. 129-228.
 52. Zhou, Z.H., *Atomic resolution cryo electron microscopy of macromolecular complexes*. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 2011. **82**: p. 1.
 53. Hashem, Y., et al., *High-resolution cryo-electron microscopy structure of the Trypanosoma brucei ribosome*. *Nature*, 2013. **494**(7437): p. 385-389.
 54. Beck, F., et al., *Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(37): p. 14870-14875.

55. Teng, Q., *Structural biology: practical NMR applications*. 2012: Springer Science & Business Media.
56. Chagot, B. and W.J. Chazin, *Solution NMR structure of Apo-calmodulin in complex with the IQ motif of human cardiac sodium channel NaV1.5*. *Journal of molecular biology*, 2011. **406**(1): p. 106-119.
57. Cierpicki, T., et al., *Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010. **17**(1): p. 62-68.
58. Kleckner, I.R. and M.P. Foster, *An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2011. **1814**(8): p. 942-968.
59. Pellecchia, M., et al., *Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008. **7**(9): p. 738-745.
60. Wu, B., et al., *HTS by NMR of combinatorial libraries: a fragment-based approach to ligand discovery*. *Chemistry & biology*, 2013. **20**(1): p. 19-33.
61. Renaud, J.-P. and M.-A. Delsuc, *Biophysical techniques for ligand screening and drug design*. *Current opinion in pharmacology*, 2009. **9**(5): p. 622-628.
62. Drenth, J., *X-Ray Crystallography*. 2007: Wiley Online Library.
63. Jenner, L., et al., *Crystal structure of the 80S yeast ribosome*. *Current opinion in structural biology*, 2012. **22**(6): p. 759-767.
64. Nishimasu, H., et al., *Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA*. *Cell*, 2014. **156**(5): p. 935-949.
65. Baradaran, R., et al., *Crystal structure of the entire respiratory complex I*. *Nature*, 2013. **494**(7438): p. 443-448.
66. Jacobson, K.A. and S. Costanzi, *New insights for drug design from the X-ray crystallographic structures of G-protein-coupled receptors*. *Molecular pharmacology*, 2012. **82**(3): p. 361-371.
67. Alterio, V., et al., *X-ray crystallography of carbonic anhydrase inhibitors and its importance in drug design*. 2009: Wiley: Hoboken, New Jersey.
68. Benesch, J.L. and B.T. Ruotolo, *Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology*. *Curr Opin Struct Biol*, 2011. **21**(5): p. 641-9.
69. Borch, J., T.J. Jørgensen, and P. Roepstorff, *Mass spectrometric analysis of protein interactions*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005. **9**(5): p. 509-516.
70. Marcoux, J. and S. Cianferani, *Towards integrative structural mass spectrometry: Benefits from hybrid approaches*. *Methods*, 2015.
71. Bensimon, A., A.J. Heck, and R. Aebersold, *Mass spectrometry-based proteomics and network biology*. *Annual review of biochemistry*, 2012. **81**: p. 379-405.
72. Konijnenberg, A., A. Butterer, and F. Sobott, *Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013. **1834**(6): p. 1239-1256.
73. Marcoux, J. and S. Cianferani, *Towards integrative structural mass spectrometry: Benefits from hybrid approaches*. *Methods*, 2015.
74. Sharon, M., *How far can we go with structural mass spectrometry of protein complexes?* *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010. **21**(4): p. 487-500.
75. Barrera, N.P. and C.V. Robinson, *Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: from individual proteins to intact complexes*. *Annual review of biochemistry*, 2011. **80**: p. 247-271.
76. Debaene, F., et al., *Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: high resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment*. *Analytical chemistry*, 2014. **86**(21): p. 10674-10683.
77. Xuan, Y., et al., *Monoclonal Antibody and Related Product Characterization Under Native Conditions Using a Benchtop Mass Spectrometer*.
78. Marcoux, J., et al., *Mass spectrometry reveals synergistic effects of nucleotides, lipids, and drugs binding to a multidrug resistance efflux pump*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(24): p. 9704-9.
79. Stengel, F., et al., *Dissecting heterogeneous molecular chaperone complexes using a mass spectrum deconvolution approach*. *Chemistry & biology*, 2012. **19**(5): p. 599-607.
80. Koschubs, T., et al., *Preparation and topology of the Mediator middle module*. *Nucleic acids research*, 2010. **38**(10): p. 3186-3195.
81. van Duijn, E., et al., *Native tandem and ion mobility mass spectrometry highlight structural and modular similarities in clustered-regularly-interspaced shot-palindromic-repeats (CRISPR)-associated protein complexes from Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012. **11**(11): p. 1430-1441.
82. Saliou, J.M., et al., *Combining native MS approaches to decipher archaeal box H/ACA*

- ribonucleoprotein particle structure and activity*. Proteomics, 2015.
83. Hernández, H., et al., *Subunit architecture of multimeric complexes isolated directly from cells*. EMBO reports, 2006. **7**(6): p. 605-610.
 84. Pukala, T.L., et al., *Subunit architecture of multiprotein assemblies determined using restraints from gas-phase measurements*. Structure, 2009. **17**(9): p. 1235-1243.
 85. Sharon, M., et al., *Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality*. Structure, 2009. **17**(1): p. 31-40.
 86. Zhou, M., C.M. Jones, and V.H. Wysocki, *Dissecting the large noncovalent protein complex groel with surface-induced dissociation and ion mobility–mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **85**(17): p. 8262-8267.
 87. Ebong, I.-o., et al., *Heterogeneity and dynamics in the assembly of the heat shock protein 90 chaperone complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(44): p. 17939-17944.
 88. El-Hawiet, A., E.N. Kitova, and J.S. Klassen, *Quantifying carbohydrate–protein interactions by electrospray ionization mass spectrometry analysis*. Biochemistry, 2012. **51**(21): p. 4244-4253.
 89. Vivat Hannah, V., et al., *Native MS: an'ESI'way to support structure-and fragment-based drug discovery*. Future Medicinal Chemistry, 2010. **2**(1): p. 35-50.
 90. Heck, A.J., *Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology*. Nature Methods, 2008. **5**(11): p. 927-933.
 91. Laganowsky, A., et al., *Mass spectrometry of intact membrane protein complexes*. Nature protocols, 2013. **8**(4): p. 639-651.
 92. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility–mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nature Protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.
 93. Uetrecht, C., et al., *Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(5): p. 1633-1655.
 94. Jenner, M., et al., *Detection of a Protein Conformational Equilibrium by Electrospray Ionisation-Ion Mobility-Mass Spectrometry*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(36): p. 8291-8294.
 95. Smith, D.P., et al., *Monitoring copopulated conformational states during protein folding events using electrospray ionization-ion mobility spectrometry-mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(12): p. 2180-2190.
 96. Atmanene, C.d., et al., *Exploring key parameters to detect subtle ligand-induced protein conformational changes using traveling wave ion mobility mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2012. **84**(11): p. 4703-4710.
 97. Stojko, J., et al., *Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes*. Analyst, 2015. **140**(21): p. 7234-7245.
 98. Lanucara, F., et al., *The power of ion mobility–mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics*. Nature chemistry, 2014. **6**(4): p. 281-294.
 99. Zhou, M., et al., *Ion mobility–mass spectrometry of a rotary ATPase reveals ATP-induced reduction in conformational flexibility*. Nature chemistry, 2014. **6**(3): p. 208-215.
 100. Dickinson, E.R., et al., *The use of ion mobility mass spectrometry to probe modulation of the structure of p53 and of MDM2 by small molecule inhibitors*. Front Mol Biosci, 2015. **2**: p. 39.
 101. Knapman, T., et al., *Ion mobility spectrometry-mass spectrometry of intrinsically unfolded proteins: Trying to put order into disorder*. Current analytical chemistry, 2013. **9**(2): p. 181.
 102. Laganowsky, A., et al., *Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 172-175.
 103. Rabuck, J.N., et al., *Activation state-selective kinase inhibitor assay based on ion mobility–mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **85**(15): p. 6995-7002.
 104. Shvartsburg, A.A., *Differential ion mobility spectrometry: nonlinear ion transport and fundamentals of FAIMS*. 2008: CRC Press.
 105. Mason, E.A. and E.W. McDaniel, *Transport properties of ions in gases*. NASA STI/Recon Technical Report A, 1988. **89**: p. 15174.
 106. Kolakowski, B.M. and Z. Mester, *Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS)*. Analyst, 2007. **132**(9): p. 842-864.
 107. Bonneil, E., S. Pfammatter, and P. Thibault, *Enhancement of mass spectrometry performance for proteomic analyses using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS)*. Journal of Mass Spectrometry, 2015. **50**(11): p. 1181-1195.
 108. Erba, E.B., *Investigating macromolecular complexes using top-down mass spectrometry*. Proteomics, 2014. **14**(10): p. 1259-1270.

109. Kim, M.-S. and A. Pandey, *Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics*. Proteomics, 2012. **12**: p. 530.
110. Zubarev, R.A., *Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry*. Current opinion in biotechnology, 2004. **15**(1): p. 12-16.
111. Benesch, J.L., *Collisional activation of protein complexes: picking up the pieces*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(3): p. 341-348.
112. Li, H., et al., *Native top-down electrospray ionization-mass spectrometry of 158 kDa protein complex by high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **86**(1): p. 317-320.
113. Zhang, H., et al., *Native electrospray and electron-capture dissociation FTICR mass spectrometry for top-down studies of protein assemblies*. Anal Chem, 2011. **83**(14): p. 5598-606.
114. Clarke, D.J., et al., *Mapping a noncovalent protein-peptide interface by top-down FTICR mass spectrometry using electron capture dissociation*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011. **22**(8): p. 1432-1440.
115. Erales, J., et al., *Mapping of a copper binding site on the small CP12 chloroplastic protein, using top down mass spectrometry and site-directed mutageneses*. Biochemical Journal, 2009. **419**(1): p. 75-82.
116. Xie, Y., et al., *Top-down ESI-ECD-FT-ICR mass spectrometry localizes noncovalent protein-ligand binding sites*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(45): p. 14432-14433.
117. Yin, S. and J.A. Loo, *Elucidating the site of protein-ATP binding by top-down mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**(6): p. 899-907.
118. Belov, M.E., et al., *From protein complexes to subunit backbone fragments: a multi-stage approach to native mass spectrometry*. Anal Chem, 2013. **85**(23): p. 11163-73.
119. Lermyte, F., et al., *ETD Allows for Native Surface Mapping of a 150 kDa Noncovalent Complex on a Commercial Q-TWIMS-TOF Instrument*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014. **25**(3): p. 343-350.
120. Zhang, H., et al., *Native electrospray and electron-capture dissociation in FTICR mass spectrometry provide top-down sequencing of a protein component in an intact protein assembly*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(12): p. 1966-1968.
121. Fontana, A., et al., *Probing protein structure by limited proteolysis*. ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION-, 2004. **51**: p. 299-322.
122. Pinkse, M.W., et al., *Probing noncovalent protein-ligand interactions of the cGMP-dependent protein kinase using electrospray ionization time of flight mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. **15**(10): p. 1392-1399.
123. Zhao, Y., et al., *Mapping protein-protein interactions by affinity-directed mass spectrometry*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(9): p. 4020-4024.
124. Shields, S.J., et al., *Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: Confirmation of binding sites and changes in tertiary structure*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 460-470.
125. Spolaore, B., et al., *Protein interactions leading to conformational changes monitored by limited proteolysis: Apo form and fragments of horse cytochrome c*. Biochemistry, 2001. **40**(32): p. 9460-9468.
126. Holding, A.N., *XL-MS: Protein cross-linking coupled with mass spectrometry*. Methods, 2015.
127. Leitner, A., et al., *Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(26): p. 9455-9460.
128. Leitner, A., et al., *Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics*. Molecular & Cellular Proteomics, 2010. **9**(8): p. 1634-1649.
129. Nury, C., et al., *A Novel Bio-Orthogonal Cross-Linker for Improved Protein/Protein Interaction Analysis*. Analytical chemistry, 2015. **87**(3): p. 1853-1860.
130. Paramelle, D., et al., *Chemical cross-linkers for protein structure studies by mass spectrometry*. Proteomics, 2013. **13**(3-4): p. 438-456.
131. Arlt, C., C.H. Ihling, and A. Sinz, *Structure of full-length p53 tumor suppressor probed by chemical cross-linking and mass spectrometry*. Proteomics, 2015.
132. Chen, Z.A., et al., *Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry*. Embo Journal, 2010. **29**(4): p. 717-726.
133. Herzog, F., et al., *Structural Probing of a Protein Phosphatase 2A Network by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry*. Science, 2012. **337**(6100): p. 1348-1352.
134. Nguyen-Huynh, N.T., et al., *Chemical cross-linking and mass spectrometry to determine the subunit interaction network in a recombinant human SAGA HAT subcomplex*. Protein Science, 2015.

135. Konermann, L., J. Pan, and Y.-H. Liu, *Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(3): p. 1224-1234.
136. Pirrone, G.F., R.E. Iacob, and J.R. Engen, *Applications of hydrogen/deuterium exchange MS from 2012 to 2014*. Analytical chemistry, 2014. **87**(1): p. 99-118.
137. Hodkinson, J.P., et al., *HDX-ESI-MS reveals enhanced conformational dynamics of the amyloidogenic protein β 2-microglobulin upon release from the MHC-I*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(2): p. 278-286.
138. Rob, T., et al., *Measuring Dynamics in Weakly Structured Regions of Proteins Using Microfluidics-Enabled Subsecond H/D Exchange Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(8): p. 3771-3779.
139. Faleri, A., et al., *Two cross-reactive monoclonal antibodies recognize overlapping epitopes on Neisseria meningitidis factor H binding protein but have different functional properties*. The FASEB Journal, 2014. **28**(4): p. 1644-1653.
140. Sperry, J.B., et al., *Mapping the protein-protein interface between a toxin and its cognate antitoxin from the bacterial pathogen Streptococcus pyogenes*. Biochemistry, 2011. **50**(19): p. 4038-4045.
141. Marcoux, J., et al., *p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(37): p. 28980-28990.
142. Sowole, M.A., et al., *Activation of ClpP protease by ADEP antibiotics: insights from hydrogen exchange mass spectrometry*. Journal of molecular biology, 2013. **425**(22): p. 4508-4519.
143. Rand, K.D., et al., *Gas-phase hydrogen/deuterium exchange in a traveling wave ion guide for the examination of protein conformations*. Analytical chemistry, 2009. **81**(24): p. 10019-10028.
144. Balbeur, D., et al., *Detection of oligonucleotide gas-phase conformers: H/D exchange and ion mobility as complementary techniques*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(7): p. 938-946.
145. Rand, K.D., M. Zehl, and T.J. Jørgensen, *Measuring the hydrogen/deuterium exchange of proteins at high spatial resolution by mass spectrometry: overcoming gas-phase hydrogen/deuterium scrambling*. Accounts of chemical research, 2014. **47**(10): p. 3018-3027.
146. Rand, K.D., et al., *Site-specific analysis of gas-phase hydrogen/deuterium exchange of peptides and proteins by electron transfer dissociation*. Analytical chemistry, 2012. **84**(4): p. 1931-1940.
147. Hambly, D.M. and M.L. Gross, *Laser flash photolysis of hydrogen peroxide to oxidize protein solvent-accessible residues on the microsecond timescale*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(12): p. 2057-2063.
148. Xu, G. and M.R. Chance, *Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics*. Chemical reviews, 2007. **107**(8): p. 3514-3543.
149. Mendoza, V.L. and R.W. Vachet, *Probing Protein Structure by Amino Acid-Specific Covalent Labeling and Mass Spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(5): p. 785-815.
150. Jones, L.M., et al., *Fast photochemical oxidation of proteins for epitope mapping*. Anal Chem, 2011. **83**(20): p. 7657-61.
151. Gupta, S., et al., *Conformational changes during the gating of a potassium channel revealed by structural mass spectrometry*. Structure, 2010. **18**(7): p. 839-846.
152. Heinkel, F. and J. Gsponer, *Determination of Protein Folding Intermediate Structures Consistent with Data from Oxidative Footprinting Mass Spectrometry*. Journal of molecular biology, 2015.
153. Fabre, B., et al., *Label-free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines*. Journal of proteome research, 2014. **13**(6): p. 3027-3037.
154. Schmidt, C., et al., *Determination of protein stoichiometry within protein complexes using absolute quantification and multiple reaction monitoring*. Analytical chemistry, 2010. **82**(7): p. 2784-2796.

Partie 2 : Apport de la haute résolution pour l'analyse en MS native

Cette partie porte sur l'évaluation des performances d'un nouvel instrument de MS de haute résolution, l'Orbitrap Exactive Plus EMR (Thermo Fisher Scientific), pour l'analyse de systèmes protéiques et de leurs complexes non-covalents par MS native. Une présentation préliminaire de l'état de l'art de l'instrumentation et des objectifs de ces travaux est tout d'abord rapportée. Les développements méthodologiques, réalisés sur un ensemble de protéines modèles, ont ensuite été appliqués à l'étude d'agents thérapeutiques complexes et hétérogènes d'intérêt grandissant: les anticorps monoclonaux (mAbs) et leurs immunoconjugués (« Antibody Drug Conjugates » ou ADCs).

Introduction : Etat de l'art et objectifs.

Chapitre 1 : Développement de méthodes instrumentales en MS native à haute résolution.

Chapitre 2 : Application à l'étude des anticorps monoclonaux et des immunoconjugués.

Introduction : état de l'art et objectifs.

Les travaux pionniers de Chait et Henion marquent les débuts de la MS native en 1991, permettant pour la première fois la détection de complexes non-covalents myoglobine-hème (17.5 kDa) et récepteur-ligand (12.5 kDa) en phase gazeuse à partir d'analyseurs quadripolaires [1, 2]. Progressivement, ces applications ESI-MS vont s'étendre à l'étude de systèmes biologiques de nature [3-6] et de complexité croissantes [7-9], nécessitant des développements instrumentaux menant à une transmission, une sensibilité et une résolution améliorées [10-12].

1. Du développement instrumental à la complexité des systèmes protéiques étudiés en MS native : une complémentarité historique.

Les développements instrumentaux réalisés depuis 1991 ont considérablement élargi le domaine d'application de la MS native en biologie structurale (Fig.1). Dès 1995, Joseph Loo et son équipe démontre la possibilité d'étudier l'état oligomérique de protéines de masse intermédiaire (100-250 kDa) par MS native sur un appareil à secteur magnétique [7]. Parallèlement, le couplage historique d'un analyseur à temps de vol (TOF) à une source d'ionisation ESI continue (1994) permet de repousser la gamme m/z analysable, en théorie infinie et limitée par la seule sensibilité du détecteur [11, 13]. Cette compatibilité est rendue possible par une accélération orthogonale des ions (oa), ces derniers étant accumulés entre chaque cycle TOF puis injectés sous forme de « pulses » au moyen d'un « pusher » [14]. Deux ans plus tard, cette interface bénéficie de l'introduction d'un quadripôle (ESI-Q-TOF), facilitant la sélection préalable d'ions précurseurs pour des approches MS/MS en tandem [12]. La commercialisation de cet instrument versatile, combinée à l'avènement du nanospray [15-17] puis à son automatisation [18], contribue à une diminution des quantités à injecter, une stabilisation du spray, un gain de sensibilité et à une meilleure désolvatation des ions [9, 19, 20]. Ces avancées technologiques favorisent l'étude d'édifices non-covalents plus complexes et hétérogènes par MS native, dont le rapport m/z croît avec la masse [21, 22]. Entre 1999 et 2000, la détection d'ions de rapports m/z supérieurs à 10000 permet aux groupes de Robinson et Heck d'étudier la composition de protéines multimériques proches du MDa, dont la protéine chaperonne GroEL (14-mer, 804 kDa) et la sous-unité 30S du ribosome (21-mer, 850 kDa) [9, 23, 24]. Cette expansion est néanmoins freinée par les limites de transmission des instruments Q-TOF dans des gammes de m/z élevées, s'expliquant par :

- Une gamme m/z restreinte (≤ 4000 Th) du premier analyseur quadripolaire [12].

- Une thermalisation et focalisation insuffisante de ces ions, dont l'excès d'énergie cinétique limite la préservation non-covalente, le transfert et l'extraction orthogonale [25-27].

Dès 2002, une première série d'optimisations instrumentales permet de lever ces barrières [28, 29], la diminution de la radiofréquence du quadripôle (RF) et l'augmentation de la pression dans les premières zones de l'interface (par diminution de l'efficacité de pompage ou introduction de gaz de collision comme l'azote ou l'argon) favorisant la transmission, le maintien et la désolvatation de ces ions [30, 31]. Ces implémentations profitent à la caractérisation de complexes protéiques de poids moléculaire et d'hétérogénéité exponentiels, le groupe de Van Dorsselaer (2003), Loo (2005) puis Robinson (2006) caractérisant l'assemblage de l'hémocyanine (30-mer, 2.2 MDa) et de la sous-unité 20S du protéasome (28-mer, 690 kDa) [32-35]. Une seconde vague d'optimisations instrumentales, menée par l'équipe de Heck en 2006, parachève les gains de performance de ces instruments en MS native [36, 37]. La modification de certains paramètres électroniques (fréquence du pusher, tensions d'accélération applicables) et le recours à des gaz de collision plus lourds (krypton, xénon) à l'issue de ces expériences, a récemment permis la détection de signaux MS jusqu'à 56000 m/z et l'étude de capsides virales supérieures à 10 MDa par MS native [38, 39].

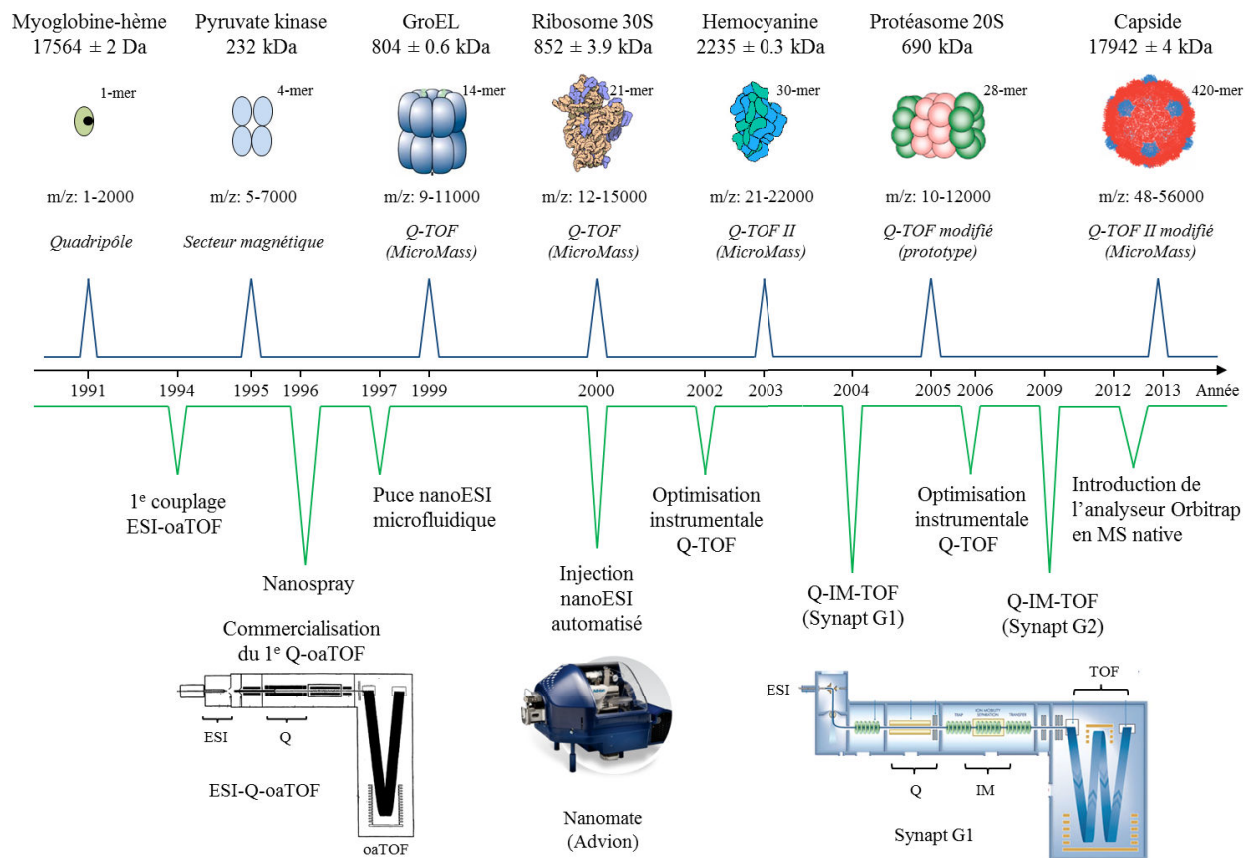


Figure 1 : Historique des (r)évolutions instrumentales et expérimentales en MS native, de 1991 à aujourd'hui.

2. Nouveaux défis analytiques en MS native: la limitation en résolution instrumentale.

L'introduction et le développement permanent des instruments Q-TOF pour l'étude de complexes non-covalents par MS native a permis de « faire voler des éléphants moléculaires au moyen d'ailes électrospray » [40]. Les avantages de l'analyseur TOF (gamme m/z en théorie infinie, sensibilité, rapidité), combinés aux capacités d'isolement de l'analyseur quadripolaire et à l'optimisation de la transmission des ions, permettent à ce jour l'étude d'assemblages non-covalents hétérogènes de plusieurs millions de Daltons [39, 41].

Bien que la sensibilité de ces instruments ne soit plus à démontrer, leur résolution en masse conditionne la nature des informations structurales extraites de l'interprétation des spectres. Cette grandeur traduit la capacité d'un analyseur de masse à séparer deux ions ayant une faible différence de masse, et peut être définie comme le rapport entre la valeur m/z d'un ion et la largeur de son pic mesurée à 50% d'intensité (« full width at half maximum » ou FWHM), [42] (Fig.2).

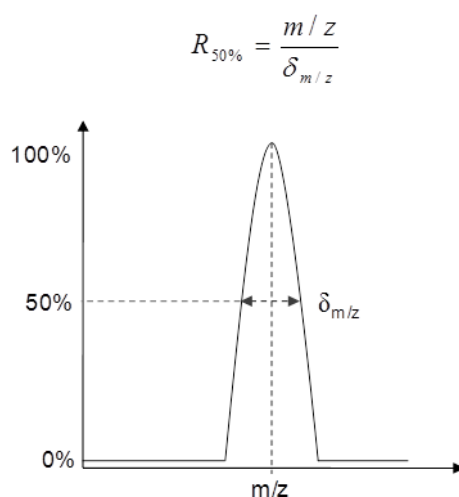


Figure 2 : Détermination de la résolution à mi-hauteur ($R_{50\%}$ ou R) d'un analyseur de masse, d'après [20].

❖ « De quelle résolution en masse a-t-on besoin en MS native ? »

La réponse à cette question varie selon la problématique scientifique posée, et dépend *a priori* de la résolution instrumentale à mi-hauteur ($R_{50\%}$ ou simplement R dans les chapitres suivants) de l'analyseur. Cette dernière doit être suffisamment importante pour permettre:

➤ Une séparation des différents états de charge d'une espèce [39], indispensable à sa mesure de masse expérimentale (Fig.3a,b).

- Une séparation entre deux espèces de masse proche, recherchée [43] (Fig.3c,d) : de quelques dizaines de Daltons (modifications post-traductionnelles covalentes, fixation non-covalente de petites molécules) à plusieurs milliers de Daltons (état oligomérique d'une protéine).

Il est d'ailleurs nécessaire de rappeler que la différence de masse minimale pouvant être mesurée ne dépend pas que de la résolution R de l'analyseur, mais également de la distribution isotopique intrinsèque des espèces étudiées [44]. Ainsi, la séparation à mi-hauteur de 2 espèces en mélange, séparées par une différence de masse inférieure à leur largeur isotopique à mi-hauteur, ne pourra être atteinte, quelle que soit la résolution instrumentale (Fig.3e,f, tracé noir). La prise en compte de cette limitation permet ainsi de prédire la capacité de séparation en masse entre 2 espèces (ici entre les états de charge 26^+ d'un anticorps nu et associé à un adduit NH_4^+ ou Na^+) par simulation de leur distribution isotopique.

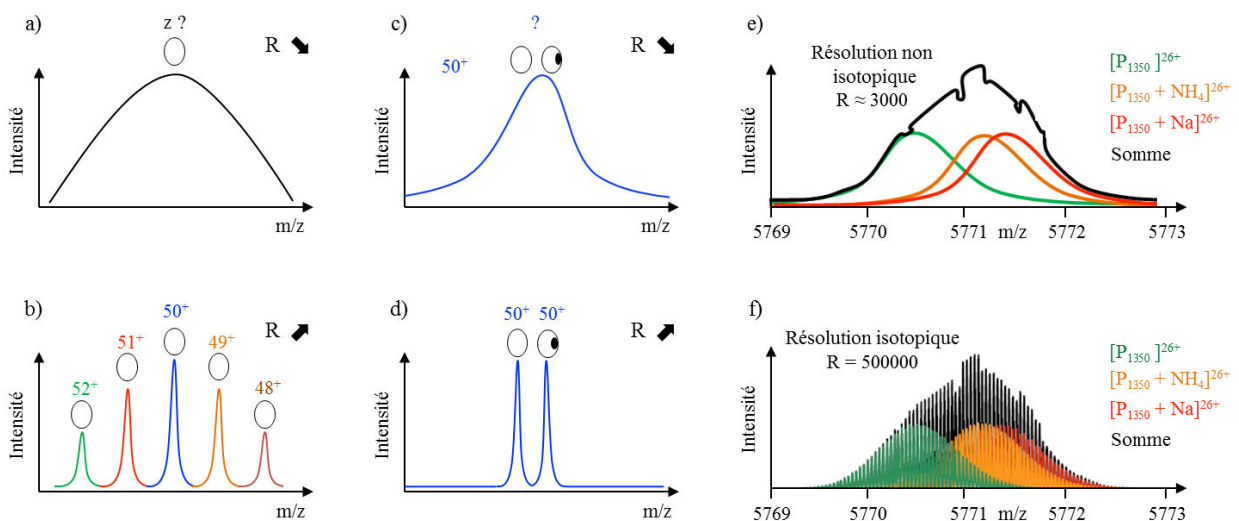


Figure 3 : Objectifs et limites de résolution (R) en MS native. (a-b) Représentation du spectre de masse natif d'une protéine (O) non résolu (a) et résolu (b) pour ses différents états de charge (52 à 48⁺). (c-d) Représentation de l'état de charge 50⁺ de cette même protéine non résolu (c) et résolu (d) pour ses formes apo (O) et holo (●). (e-f) Simulation du signal MS associé aux ions 26⁺ d'une protéine modèle de 150 kDa nue (vert, 1350 résidus aléatoires) et complexée à un adduit NH_4^+ (+18 Da, orange) ou Na^+ (+23 Da, rouge), d'après [43]. La simulation de ces profils est réalisée à partir du logiciel MassLynx 4.1, en considérant une résolution instrumentale non isotopique (e) ou isotopique (f). La largeur de chaque distribution reflète la distribution isotopique de ces espèces. Quelle que soit la résolution instrumentale considérée, la somme de ces 3 signaux (noir) ne permet pas leur séparation en masse.

La résolution nominale théorique (R_{nom}) des analyseurs Q-TOF a profité des développements techniques présentés en figure 1. La commercialisation des instruments Synapt G1 (2006) puis Synapt G2 (2009) par Waters, équipés d'une cellule de mobilité ionique (présentée en partie 3), a notamment permis l'introduction d'analyseurs TOF plus résolutifs [45, 46]. Selon son mode

de fonctionnement (détaillé en partie 3), le Synapt G2 permet d'accéder à une résolution théorique R_{nom} de 10000 en MS native, tout en conservant une sensibilité suffisante. Cette dernière, supposée constante sur ce type d'analyseur [43, 47], devrait concrètement permettre:

- Une résolution à mi-hauteur des états de charge de protéines supérieures à 500 MDa [43].
- Une résolution à la ligne de base des glycoformes (± 162 Da) d'un anticorps (≈ 150 kDa) [48].

En pratique, ces limites de résolution sont atteintes bien avant [39, 49], la résolution effective expérimentale (R_{eff}) diminuant en fonction du rapport m/z . Afin d'illustrer ce phénomène, une comparaison des profils expérimentaux et simulés sur l'état de charge 71^+ du complexe GroEL (≈ 800 kDa) a été rapportée par le groupe de Heck (Fig.4) [43]. Les spectres simulés à partir de résolutions nominales croissantes ($5000 \leq R_{\text{nom}} \leq 40000$) épousent progressivement le signal déduit de la distribution isotopique de cette espèce ($R_{\text{nom}} = 14100$). Néanmoins, le signal expérimental mesuré sur un instrument Q-TOF de R_{nom} égale à 5000 (cyan), s'écarte de celui simulé à la même résolution (rouge) et ne présente qu'une résolution expérimentale R_{eff} de 1300.

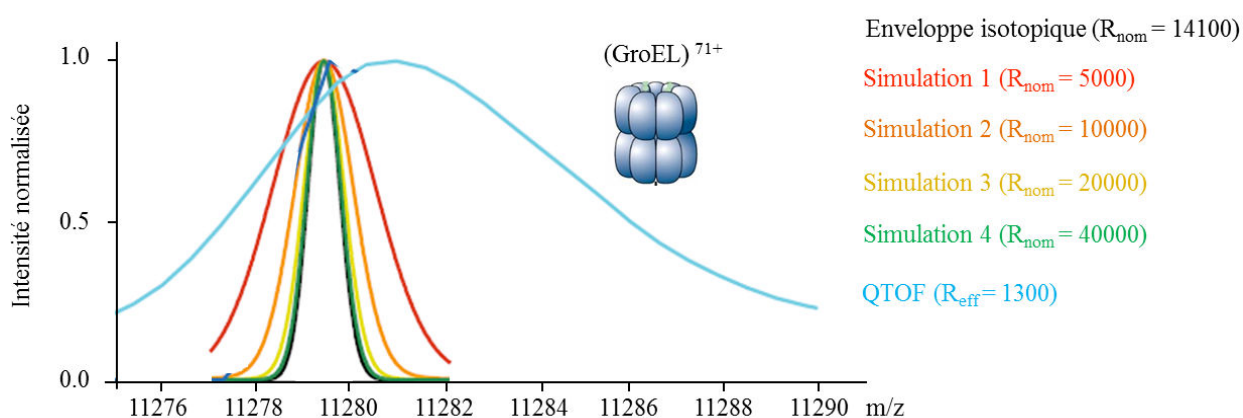


Figure 4 : Comparaison des spectres de masse natifs expérimentaux et simulés à l'état de charge 71^+ du complexe GroEL, d'après [43]. Malgré une résolution nominale (R_{nom}) de 5000, l'instrument Q-TOF utilisé présente une résolution expérimentale R_{eff} de 1300 à m/z 11 280. La comparaison des profils expérimentaux (cyan) et simulés à la même résolution nominale (rouge) souligne un élargissement et décalage du signal expérimental vers de plus hauts rapports m/z .

L'élargissement expérimental des signaux et leur décalage vers de plus hauts rapports m/z restreignent considérablement la justesse de masse (différence entre la masse théorique et mesurée) et la résolution accessible sur des complexes de masse et hétérogénéité croissantes [9, 38]. Ces observations sont en partie attribuées à une désolvatation incomplète des ions et à la persistance de molécules de solvant ou d'ions tampons, accentuées sur des édifices de hauts

poids moléculaires [50, 51]. Afin de contourner ces écueils, certaines stratégies ont été développées, parmi lesquelles :

- L'utilisation de tampons non dénaturants plus volatils, tels que le diacétate éthylène diammonium (EDDA) [52].
- Une optimisation des conditions de désolvatation [53] voire de dissociation des complexes en phase gazeuse, étudiés à travers de plus petites sous-unités mieux désolvatées et résolues (approches « Top-Down ») [35].
- Une optimisation de l'interprétation des spectres, à partir d'algorithmes améliorant l'assignation des états de charge [54, 55] ou prédisant l'excès de masse associé à la persistance d'adduits [56].

3. Objectifs.

Le développement récent (2012) d'un instrument de MS native de haute résolution à analyseur Orbitrap, dédié à l'étude de complexes non-covalents de hauts poids moléculaires, constitue une alternative aux spectromètres de masse Q-TOF jusqu'alors explorés et à leurs limitations [57]. La contribution du laboratoire à l'évaluation de cette nouvelle interface (Orbitrap Exactive Plus EMR, Thermo Fisher Scientific), acquise au cours de ma thèse en 2014, m'a permis d'évaluer l'apport de la haute résolution en MS native. L'objectif de ces travaux se décline en 2 parties, consacrées à:

- L'évaluation des paramètres instrumentaux pour le développement de méthodes sensibles, résolutive et quantitative, adaptés à l'étude de complexes non-covalents. Ces optimisations sont réalisées à partir de protéines modèles, utilisées pour l'évaluation des différents instruments Q-TOFs du laboratoire, dont le Synapt G2 HDMS (Waters).
- L'application de ces développements méthodologiques à l'étude d'anticorps thérapeutiques et de leurs immunoconjugués, dont l'hétérogénéité (modifications post-traductionnelles, profil de distribution en agents conjugués), indissociable de leur fonction, complexifie la caractérisation par MS native.

Chapitre 1 : Développement de méthodes instrumentales en MS native à haute résolution.

L'utilisation de ce nouvel instrument à l'étude de complexes non-covalents de hauts poids moléculaires par MS native, implique certains prérequis d'ordre technique :

- La transmission des ions au sein de l'interface doit être compatible avec le maintien des interactions non-covalentes de stabilité variable en phase gazeuse.
- La détection de complexes de hauts poids moléculaires nécessite une capacité de transmission des ions de hauts rapports m/z.
- L'identification de faibles différences de masse sur de tels édifices et la caractérisation de mélanges hétérogènes nécessitent une résolution expérimentale importante.

Dans ce contexte, une évaluation rigoureuse de l'influence des paramètres instrumentaux (choix de la résolution nominale, optimisation des tensions d'accélération et pressions en gaz) sur ces 3 conditions est ici rapportée à travers l'étude de protéines modèles. L'analyse concomitante de ces différents systèmes non-covalents sur un instrument de type Q-TOF (Synapt G2 HDMS) permet une comparaison des performances de l'Orbitrap Exactive Plus EMR, dont le fonctionnement est présenté au sein de ce chapitre.

1. Présentation de l'instrument Orbitrap Exactive Plus EMR (Thermo Fisher Scientific).

L'Orbitrap Exactive Plus EMR est un spectromètre de masse à analyseur Orbitrap, commercialisé depuis 2013 par Thermo Fisher Scientific et dédié à l'étude de complexes supramoléculaires (Fig.5). L'introduction de cette technologie de haute résolution en MS native, a été rendue possible grâce à certaines modifications instrumentales du modèle Orbitrap Exactive Plus [57, 58]:

- Extension de la gamme m/z analysable jusqu'à 20000 Th, par modification du logiciel de contrôle (mode « Extended Mass Range » ou EMR).
- Optimisation de la transmission des ions de hauts rapports m/z, par augmentation des tensions radiofréquences (RF) appliquées sur l'ensemble des multipôles.

- Modification de la cellule HCD (augmentation des énergies de collision et pressions en gaz applicables), favorisant la thermalisation, focalisation et désolvatation des ions piégés.
- Ajustement manuel des tensions d'accélération appliquées sur les flatapôles, permettant d'affiner la transmission des ions en fonction de leurs rapports m/z.

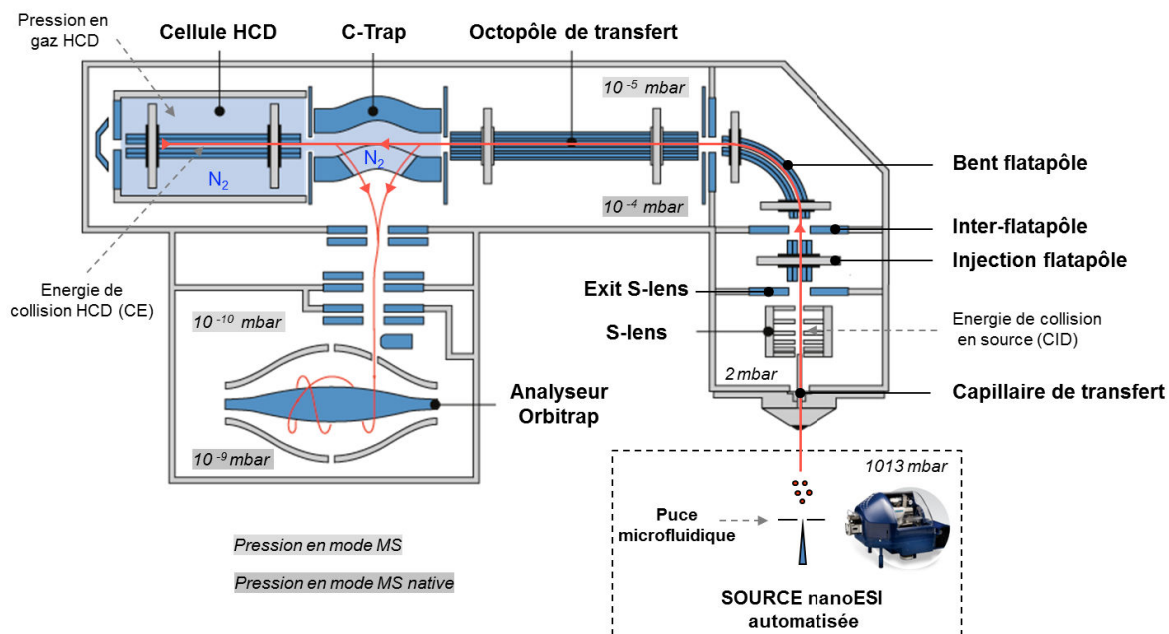


Figure 5 : Représentation schématique du spectromètre de masse Orbitrap Exactive Plus EMR (Thermo Fisher Scientific).

Cet instrument se compose de 5 parties, dont les pressions sont régulées à l'aide d'une pompe primaire et de 2 pompes turbomoléculaires:

- La région « S-Lens », connectée au capillaire de transfert, constitue le point d'entrée des ions dans l'instrument. Ces derniers, ici générés à pression atmosphérique par une source nanoESI automatisée (Nanomate, Advion), sont aspirés axialement au sein du capillaire de transfert chauffé (250°C) à l'aide d'un gradient de pression décroissant. Le bloc S-Lens, constitué de lentilles annulaires progressivement espacées, s'assimile à un guide d'ion (SRIG). L'application d'une radiofréquence (RF), d'amplitude croissante et en opposition de phase entre chaque électrode, permet de focaliser et transmettre les ions jusqu'au flatapôle d'injection à travers une lentille annulaire de sortie (« Exit S-Lens ») [59]. Lors de ce déplacement, les ions poursuivent leur désolvatation par collision avec des molécules de gaz résiduelles. Bien que la pression dans ce compartiment ne puisse être régulée ($\approx 2\text{ mbar}$), la différence de potentiel DC appliquée entre le bloc S-Lens et la lentille Exit S-Lens (énergie de collision en source ou CID) permet néanmoins de contrôler l'accélération des ions entre 2 chocs consécutifs.

➤ La région « Ion Optics », constituée des flatapôles « injection », « inter », « bent » et d'un octopôle de transfert, assure la focalisation et transmission des ions jusqu'à la trappe linéaire « C-Trap ». Les 3 flatapôles, isolés du bloc S-Lens et de l'octopôle, matérialisent une zone de plus faible pression. L'injection flatapôle, constitué de 4 barreaux plats soumis à un potentiel RF, focalise les ions en son axe. La superposition d'un potentiel DC ajustable, entre ce flatapôle et la lentille de sortie S-Lens, permet de contrôler l'énergie cinétique des ions lors de leur progression. De façon similaire, l'ajustement du potentiel DC s'exerçant entre l'injection et l'inter-flatapôle permet aux ions de franchir ce dernier, assimilable à une lentille annulaire plate. Le bent flatapôle, formé de 4 barreaux plats, focalise et transmet les ions en direction de l'octopôle de transfert. Sa courbure à 90° favorise l'élimination des particules neutres et gouttelettes de solvant aspirées. A nouveau, une superposition d'un potentiel RF et DC y est appliquée, l'optimisation de ce dernier (DC) impactant particulièrement la gamme de m/z transmise. L'injection contrôlée de ces ions sur la C-Trap s'achève via l'octopôle de transfert, fonctionnant en mode « RF-only » à une pression comprise entre 10^{-4} et 10^{-5} mbar, selon la pression délivrée en cellules HCD et C-Trap [57].

➤ La trappe linéaire « C-Trap » et la cellule de collision « HCD » (High energy Collision Dissociation) fonctionnent de façon synchronisée et assurent le piégeage, la thermalisation et la fin de la désolvatation des ions injectés [58]. Non isolée de la cellule HCD, la C-Trap est approvisionnée en gaz depuis cette dernière (généralement de l'azote). La collision des ions incidents contre ces molécules permet de dissiper leur énergie cinétique (thermalisation), tandis qu'un potentiel RF les confine au centre de la C-Trap. Une différence de potentiel DC entre la C-Trap et la cellule HCD permet leur extraction rapide vers la cellule de collision. La nature (azote, xénon) et pression en gaz appliquées en cellule HCD modulent le libre parcours moyen des ions ainsi stockés et focalisés, permettant la poursuite de leur désolvatation. L'optimisation du gradient de potentiel appliqué entre l'entrée et la sortie de cette cellule HCD (énergie de collision HCD ou CE) permet de contrôler l'accélération de ces ions entre 2 collisions. L'inversion du potentiel DC entre la cellule HCD et la C-Trap permet un renvoi des ions sur la C-Trap, assurant leur extraction orthogonale vers l'analyseur de masse Orbitrap. Il est important de signaler que la pression en gaz de la cellule HCD ne peut être directement mesurée, bien que son effet soit répercuté à travers la pression « UHV » mesurée sur l'analyseur Orbitrap (10^{-10} à 10^{-9} mbar).

➤ L'analyseur de masse « m/z » Orbitrap se compose d'une électrode centrale de forme fuselée, encapsulée par 2 électrodes externes jouant le rôle de détecteur [60, 61]. L'attraction

électrostatique des paquets d'ion envoyés vers l'électrode centrale est compensée par leur force centrifuge, à l'origine de leur oscillation harmonique suivant l'axe de cette électrode. Ces oscillations axiales s'effectuent à une fréquence ω dépendant du rapport m/z de l'ion :

$$[1] \quad \omega = \sqrt{\frac{k}{\left(\frac{m}{z}\right)}}, \text{ où } k \text{ est une constante instrumentale}$$

L'oscillation simultanée de l'ensemble des ions génère un courant induit global, mesuré par chacune des électrodes externes. La déconvolution de ce signal par Transformée de Fourier [62] permet de caractériser les fréquences et amplitudes individuelles de chaque onde discrète, reliées au rapport m/z et à l'intensité des ions correspondants. La résolution de cet analyseur est proportionnelle au nombre de mesures de la valeur ω par temps de scan. La fréquence de ces mesures, s'effectuant de part et d'autre de chaque demi-électrode externe, dépend donc de la fréquence d'oscillation ω même des ions. Cette dernière diminue pour les ions de rapports m/z élevés, oscillant plus lentement et nécessitant une accumulation de signal plus importante. La relation entre ces grandeurs, décrite par l'équation [1], se traduit donc par une diminution de la résolution théorique R_{nom} en fonction de l'augmentation du rapport m/z . Conjointement, la résolution de l'analyseur Orbitrap augmente en fonction du temps de scan, quel que soit le rapport m/z . Dans ce contexte, l'Orbitrap Exactive Plus EMR offre la possibilité de travailler à 5 temps de scan différents (32, 64, 128, 256 et 512 ms), associés à des résolutions théoriques R_{nom} de 8750, 17500, 35000, 70000 et 140000 à m/z 200. L'équation [2] permet de calculer la résolution théorique R_{nom} de n'importe quel rapport m/z , à partir de celle fixée à m/z 200 [47]:

$$[2] \quad R_{nom}(x, y) = y \times \sqrt{\frac{200}{x}}$$

x correspondant au rapport m/z considéré, et y à la résolution R_{nom} fixée à m/z 200 (8750-140000).

2. Influence des paramètres instrumentaux sur la résolution expérimentale R_{eff} .

2.1. Choix de la résolution nominale de l'analyseur (R_{nom}).

La résolution R_{nom} de l'analyseur Orbitrap, définie à m/z 200, peut être ajustée à 5 valeurs (8750 à 140000) par modulation du temps de scan, soit de la fréquence analytique (24 à 1.3 Hz). Afin d'évaluer l'influence de ce paramètre sur la résolution expérimentale R_{eff} d'un signal protéique ($m/z > 200$), une analyse de l'enzyme PDF1B (5 μ M) à différentes résolutions R_{nom} est ici présentée (Fig.6). En conditions natives, cette protéine monomérique fixe un atome de nickel (PDF1B-Ni), et présente une masse théorique monoisotopique et moyenne de 21919.30 et 21933.6 Da, respectivement. Le calcul de ces masses est ici réalisé à partir de la formule

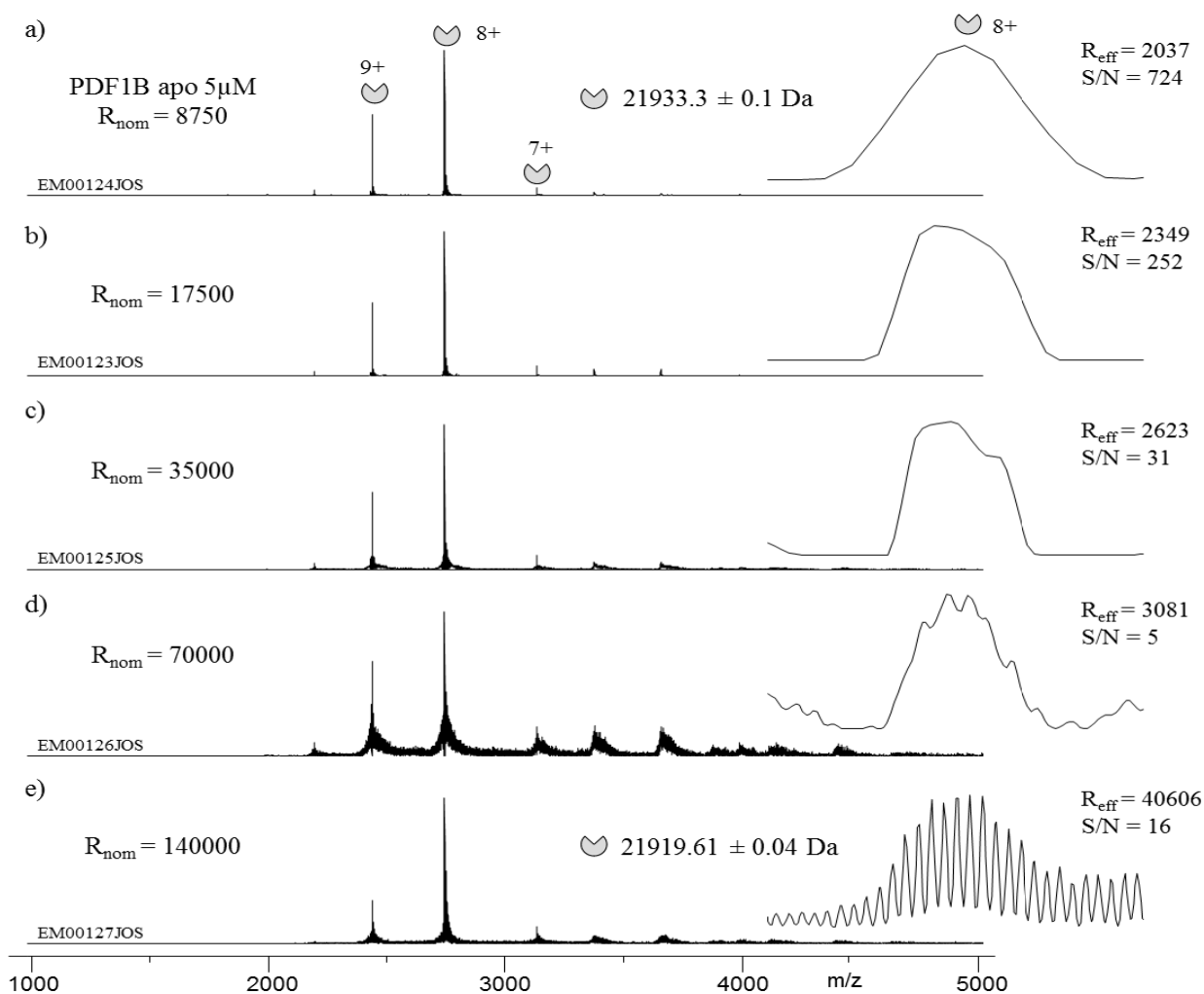


Figure 6 : Influence du choix de la résolution R_{nom} de l'analyseur sur la résolution expérimentale R_{eff} . La métalloprotéine PDF1B ($5\mu\text{M}$) est analysée par MS native (CID, CE = 10eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6V, $P_{UHV} = 9.2 \cdot 10^{-10}$ mbar) à différentes résolutions R_{nom} : (a) 8750, (b) 17500, (c) 35000, (d) 70000 et (e) 140000 (e). L'impact de ce paramètre sur la résolution expérimentale et l'intensité (S/N, en nombre de coups) du signal 8^+ est ici représenté.

brute du complexe et d'un logiciel considérant une abondance isotopique définie pour chaque atome (Data Analysis, Bruker). Le spectre de masse natif généré à la plus faible résolution (Fig.6a, $R_{nom} = 8750$) révèle 3 états de charge (7^+ à 9^+). La déconvolution de ces signaux (Protein Deconvolution 3, Thermo Fisher Scientific) permet une mesure de masse moyenne de 21933.3 ± 0.1 Da, en accord avec la préservation du complexe PDF1B-Ni. Un zoom sur l'état de charge 8^+ ($m/z = 2742$) permet de mesurer la résolution expérimentale (R_{eff}) de ce signal, égale à 2037. Cette valeur, inférieure à celle définie à m/z 200 (R_{nom} , 8750), illustre la diminution de résolution théorique de l'analyseur en fonction du rapport m/z . Néanmoins, la résolution expérimentale ici mesurée s'approche de celle attendue à ce rapport m/z (2363, d'après l'équation [2]), dénotant une désolvatation optimale des ions. L'analyse de cette protéine à une résolution R_{nom} croissante de 17500, 35000 et 70000 (Fig.6b-d), s'accompagne d'une augmentation progressive de la résolution R_{eff} à l'état de charge 8^+ (2349, 2623 et 3081,

respectivement). A la résolution la plus élevée (Fig.6e, $R_{\text{nom}} = 140000$), une séparation des isotopes est atteinte ($R_{\text{eff}} = 40606$), permettant une mesure de masse monoisotopique de 21919.61 ± 0.04 Da. Bien que la résolution expérimentale R_{eff} soit optimale en présence de résolutions R_{nom} élevées, le gain de résolution obtenu s'effectue au détriment de la sensibilité. En effet, le rapport signal/bruit (S/N) mesuré à l'état de charge 8^+ décroît significativement en fonction de la résolution R_{nom} , passant de 724 (Fig.6a) à 16 coups (Fig.6e). Cette atténuation du signal, d'autant plus marquée à haut rapport m/z [63], implique un compromis entre résolution et sensibilité expérimentale.

2.2. Comparaison instrumentale.

La pertinence des comparaisons instrumentales présentées au sein de ce chapitre nécessite une analyse simultanée des échantillons dans des conditions expérimentales et instrumentales comparables. Ainsi, les expériences réalisées sur l'instrument Q-TOF (Synapt G2 HDMS) s'appuient sur :

- une source d'ionisation nanoESI identique (Nanomate, Advion).
- Le recours à des échantillons, tampons d'analyse et concentrations similaires.
- L'application de méthodes instrumentales optimisées au regard du critère comparé.

Ce dernier point se traduit ici par une analyse de l'échantillon sur la même gamme m/z et sur des temps d'acquisition identiques. Bien que le traitement informatique des spectres MS diffère entre le Synapt G2 (somme des scans TOF) [45] et l'Orbitrap Exactive Plus EMR (moyenne des scans Orbitrap) [64], la comparaison des performances liées à la sensibilité repose sur l'exploitation de rapports signaux/bruits, moins sensibles. Par ailleurs, la comparaison des performances liées à la résolution s'appuie sur le mode sensibilité de l'analyseur TOF, moins résolutif ($R_{\text{nom}} = 10000$) que les modes résolution (20000) et haute-résolution (40000) mais beaucoup plus utilisé et répandu en MS native [65, 66].

Dans ce contexte, la protéine PDF1B-Ni a également été analysée par MS native sur l'instrument Synapt G2 afin d'en comparer les performances de résolution (Fig.7a). Les résultats ainsi obtenus sur analyseur Q-TOF démontrent l'absence de résolution isotopique, la résolution expérimentale R_{eff} mesurée à l'état de charge 8^+ se limitant à 1714, et son rapport signal S/N à 25. A sensibilité similaire (S/N = 16 coups), l'analyseur Orbitrap peut ici fonctionner à une résolution maximale ($R_{\text{nom}} = 140000$) et fournir une résolution isotopique des états de charge de cette protéine (Fig.7b). Par ailleurs, les erreurs de masse relevées démontrent

une justesse plus importante sur l'Orbitrap (14 ppm) que sur le Q-TOF (65 ppm). Ce gain, davantage marqué sur des complexes de plus hauts poids moléculaires (chapitre 2), ne se limite pas à des protéines de tailles intermédiaires isotopiquement résolubles (jusqu'à 30-35 kDa d'après des travaux internes).

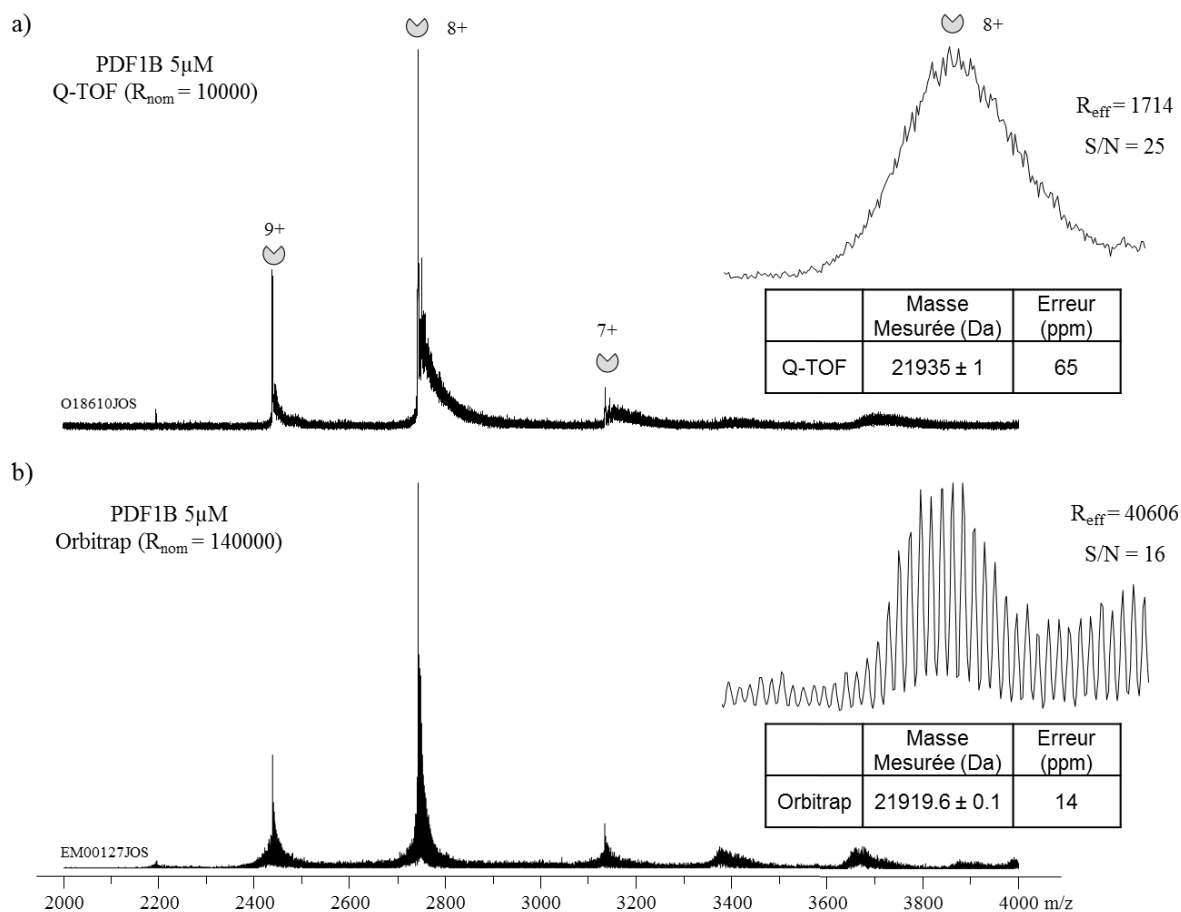


Figure 7 : Comparaison des performances de résolution en MS native entre analyseurs Q-TOF (Synapt G2 HDMS) et Orbitrap (Orbitrap Exactive Plus EMR). La métalloprotéine PDF1B-Ni (5µM) est ici analysée en conditions natives (AcNH₄ 100mM pH 7.5) sur Synapt G2 ($V_c = 40V$, $P_i = 6$ mbar) et Orbitrap Exactive Plus EMR (CID, CE = 10 eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6V, $P_{UH\bar{V}} = 9.2 \cdot 10^{-10}$ mbar, $R_{nom} = 140000$) durant 1 minute entre 500 et 5000 m/z.

3. Influence des paramètres instrumentaux sur la transmission des ions de hauts rapports m/z.

3.1. Optimisation des tensions appliquées sur les flatapôles injection, inter et bent.

Afin de limiter la perte de sensibilité précédemment décrite, l'optimisation de la transmission des ions est ici rapportée pour des résolutions R_{nom} inférieures ou égales à 17500. Dans ce contexte, l'iodure de césium CsI (2g/L) est analysé par MS native à différentes tensions de flatapôles (Fig.8). Ce sel, utilisé comme étalon en MS native, présente l'avantage de s'assembler sous forme de clusters non-covalents $(CsI)_nCs^{1+}$ monochargés de masses hétérogènes, couvrant ainsi une large gamme de m/z [67, 68]. L'application d'une tension de

8V sur l'ensemble des 3 flatapôles s'accompagne d'une transmission des ions restreinte (Fig.8a). En effet, les clusters majoritaires ($n=6$ et 13) sont détectés dans une gamme m/z comprise entre 1000 et 8000, la transmission des ions n'excédant pas 10000. La diminution des tensions appliquées sur ces flatapôles favorise néanmoins la transmission des ions de plus hauts rapports m/z (Fig.8b-c). A une tension de 4V (Fig.8b), un décalage du signal vers des rapports m/z croissants est observé. Les clusters sont alors détectés dans une gamme m/z de 3000 à 12500, centrée aux alentours de 8000 ($n=30$). Une tension de 1V (Fig.8c) accentue cette transmission, permettant la détection de clusters $(CsI)_{35}Cs^{1+}$ majoritaires dans une gamme de m/z s'étirant de 7000 à 14000. Cependant, la transmission ne semble plus linéaire, les ions de rapports m/z compris entre 1000 et 7000 disparaissant progressivement des spectres de masse lors de la diminution des tensions appliquées (Fig.8b-c). Cet effet de filtre, déjà rapporté dans la littérature [57], nécessite un compromis entre transmission optimale et linéaire. Cet inconvénient peut constituer une limitation à la caractérisation et quantification relative d'espèces en mélange, se répartissant sur une large gamme de masses et de rapports m/z .

3.2. Comparaison instrumentale.

L'analyse comparative de l'iodure de césium par MS native sur le Synapt G2 et l'Orbitrap Exactive Plus EMR permet de comparer la capacité de transmission de ces instruments à hauts rapports m/z (Fig.9). Le spectre de masse obtenu sur le Q-TOF (Fig.9a) met en évidence une transmission décroissante des clusters en fonction du rapport m/z , centrée sur un intervalle [1000-7500] et s'étirant jusqu'à 10000 m/z . Ces limites de transmission sont significativement repoussées sur l'Orbitrap (Fig.9b), assurant une détection des ions de 7000 jusqu'à 16000 m/z , centrée sur l'espèce $(CsI)_{39}Cs^{1+}$ ($m/z = 10265$). Néanmoins, cette optimisation s'accompagne d'une perte de transmission des ions inférieurs à 7000 m/z , précédemment rapportée.

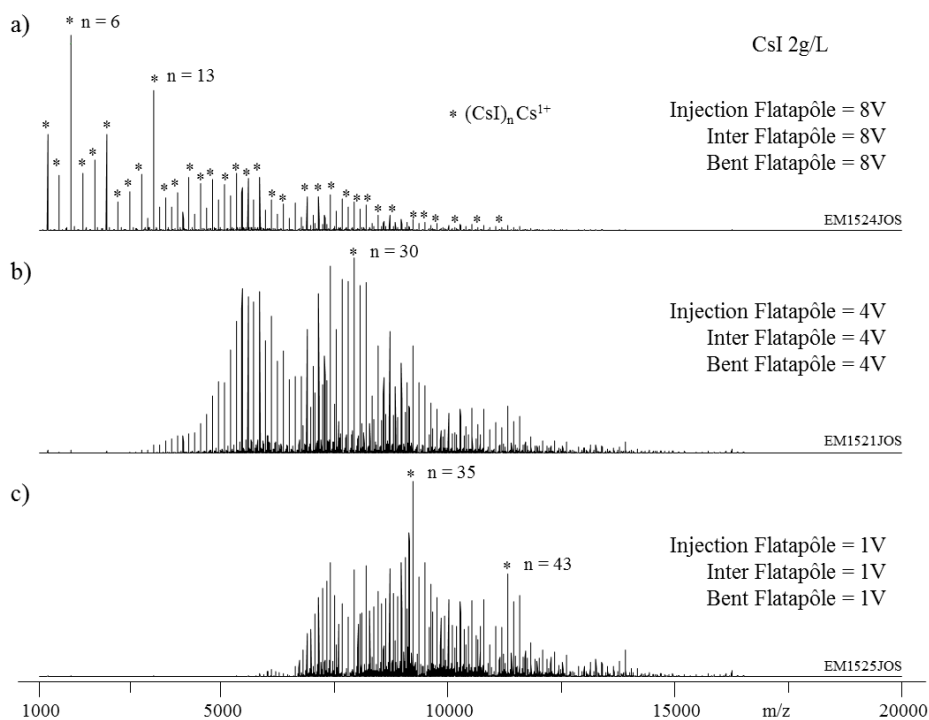


Figure 8 : Influence des tensions de flatapôles sur la transmission des ions. L'iodure de césium (CsI, 2g/L), s'assemblant en clusters monochargés $(\text{CsI})_n\text{Cs}^{1+}$ de masses variables, est ici analysé par MS native (CID = 20eV, CE = 100eV, $P_{\text{UHV}} = 1.1.10^{-9}$ mbar, $R_{\text{nom}} = 17500$) à différents couples de tension injection-inter-bent flatapôle : (a) 8-8-8V, (b) 4-4-4V et (c) 1-1-1V. L'impact de ces paramètres sur la transmission des ions est ici suivi à travers la gamme m/z des ions détectés.

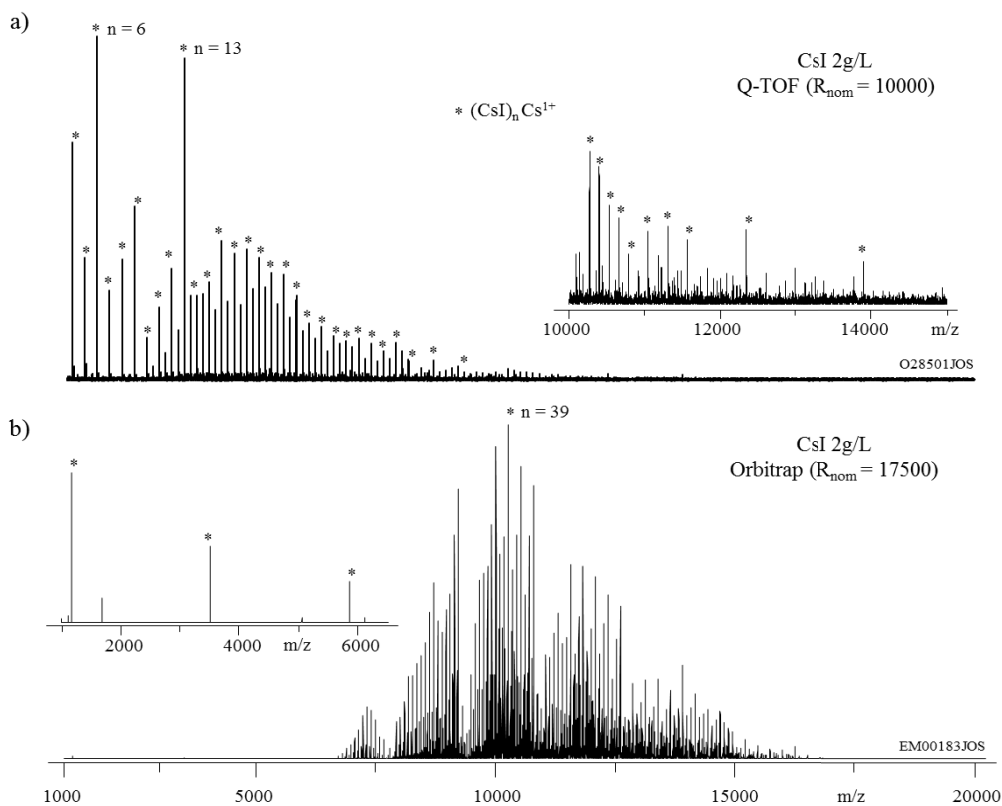


Figure 9 : Comparaison des performances de transmission en MS native entre analyseurs Q-TOF (Synapt G2 HDMS) et Orbitrap (Orbitrap Exactive Plus EMR). Les clusters de CsI (2g/L) sont ici analysés en conditions natives a) sur Synapt G2 ($V_c = 200\text{V}$, $P_i = 7$ mbar) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 20eV, CE = 100 eV, injection-inter-bent flatapôles = 1-0.5-2V, $P_{\text{UHV}} = 1.1.10^{-9}$ mbar, $R_{\text{nom}} = 17500$) durant 2 minutes entre 1000 et 20000 m/z.

Cette capacité de transmission s'applique également aux espèces protéiques multichargées de hauts poids moléculaires, comme en témoigne l'analyse comparative du tétradécamère non-covalent GroEL (Fig.10). La détection du complexe sur le Synapt G2 (Fig.10a, 802281 ± 61 Da) et sur l'Orbitrap Exactive Plus EMR (Fig.10b, 802114 ± 62 Da) confirme la préservation de cet assemblage non-covalent sur l'Orbitrap. Bien que la faible résolution R_{nom} (8750) fixée sur l'Orbitrap limite la résolution expérimentale mesurée à l'état de charge 68^+ (R_{eff} de 563 sur l'Orbitrap, 502 sur le Q-TOF), cette dernière permet de disposer d'un rapport S/N 300 fois plus important sur les états de charge majoritaires (S/N de 1450 coups sur l'Orbitrap, 4 coups sur le Q-TOF) et d'une résolution à la ligne de base de ces signaux.

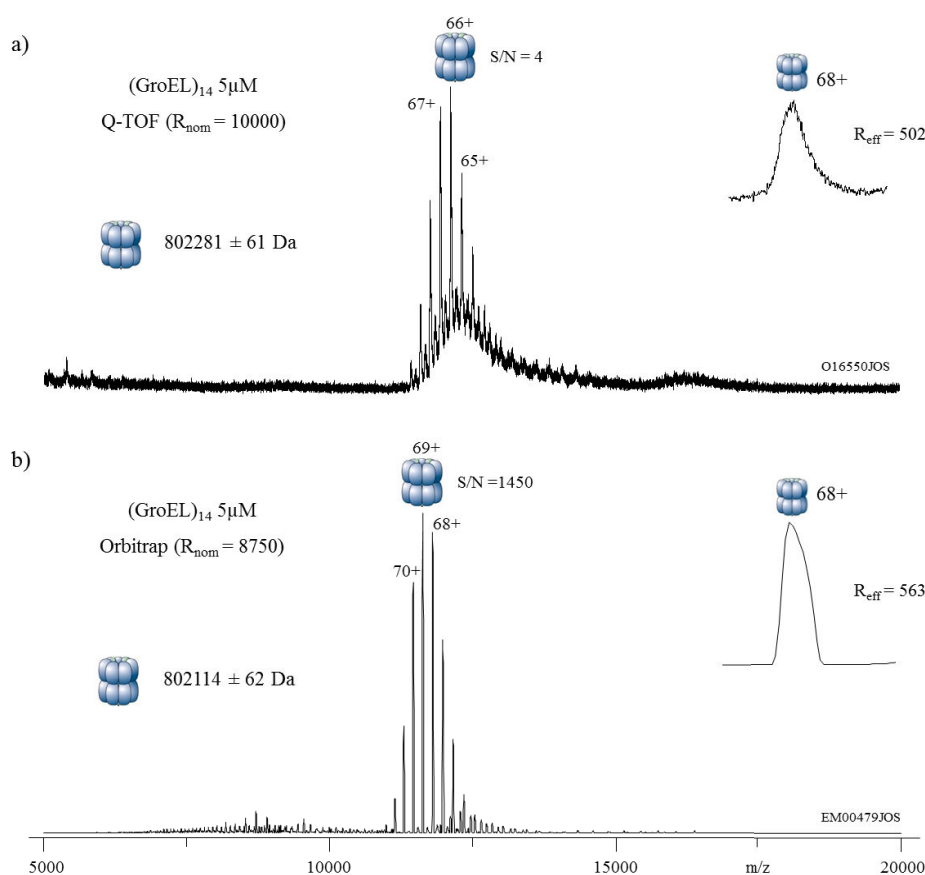


Figure 10 : Comparaison des performances de transmission en MS native entre analyseurs Q-TOF (Synapt G2 HDMS) et Orbitrap (Orbitrap Exactive Plus EMR). Le tétradécamère GroEL ($5\mu\text{M}$, AcNH_4 200mM pH 6.9) est ici analysé sur a) Synapt G2 ($V_c = 200\text{V}$, $P_i = 7$ mbar) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 25eV , CE = 100 eV, injection-inter-bent flatapôles = 4-4-4V, $P_{UH\text{V}} = 1.0 \cdot 10^{-9}$ mbar, $R_{nom} = 8750$) durant 1 minute entre 1000 et 20000 m/z.

En l'absence de complexes protéiques commerciaux de plus hauts poids moléculaires, une analyse « Top-Down Native MS » du 14-mer GroEL partiellement dissocié en phase gazeuse (CID) est réalisée, permettant de comparer les performances de transmission instrumentale au-delà de la gamme de m/z présentée (Fig.11). En effet, la dissociation de complexes non-covalents induite par collision avec des molécules de gaz (CID) s'effectue principalement de façon asymétrique [69-71]. La faible quantité d'énergie interne accumulée par les ions à l'issue

de chaque collision favorise, selon la charge et la flexibilité conformationnelle de ces derniers, le déploiement progressif de l'une des sous-unités, s'accompagnant d'une redistribution de la densité de charge et du relargage de cette particule. Ce mécanisme permet ici de dissocier le tétradécamère GroEL en un monomère déstructuré très chargé et un complexe 13-mer de plus faible densité de charge, fournissant un signal MS dans une gamme de m/z plus élevée [72]. Une comparaison de la transmission de ce signal sur le Synapt G2 (Fig.11a) et l'Orbitrap Exactive Plus EMR (Fig.11b) est ici présentée. L'identification du complexe $(\text{GroEL})_{13}$ à travers 2 distributions de charge différentes sur chaque instrument (27 à 42^+ sur le Q-TOF, 32 à 48^+ sur l'Orbitrap), limite une comparaison rigoureuse des rapports S/N mesurés. Cette observation pourrait s'expliquer par une différence d'énergie interne accumulée au sein de ces interfaces (tensions d'accélération, nature et pression des gaz de collision différentes), disposant ainsi d'une efficacité de dissociation CID potentiellement distincte. Bien que l'intensité des signaux $(\text{GroEL})_{13}$ ne puisse ainsi être comparée, la détection aisée de cette espèce majoritaire, entre 15000 et 22000 Th (S/N de 995 coups, à l'état de charge 42^+) sur l'Orbitrap, confirme la capacité de transmission des ions de hauts rapports m/z de cet instrument. Par ailleurs, l'absence de signal dans une gamme de m/z inférieure (1000-5000), ne permet pas de détecter le monomère dissocié, en accord avec une transmission non linéaire.

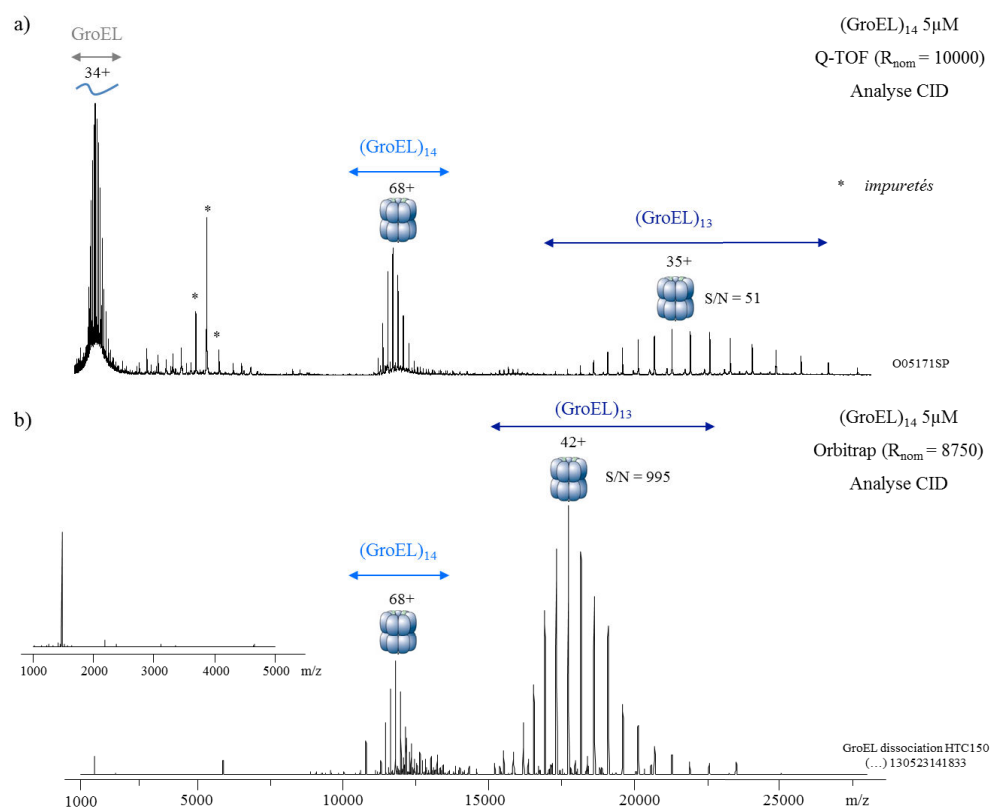


Figure 11 : Comparaison des performances de transmission en MS native entre analyseurs Q-TOF (Synapt G2 HDMS) et Orbitrap (Orbitrap Exactive Plus EMR). Le 14-mer GroEL ($5\mu\text{M}$, AcNH_4 200mM pH 6.9) est ici analysé après dissociation par collision en phase gazeuse (CID) sur a) Synapt G2 ($V_c = 200\text{V}$, $P_i = 7\text{ mbar}$) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 25eV, CE = 150 eV, injection-inter-bent flatapôles = 4-4-4V, $P_{\text{UH}} = 1.1 \cdot 10^{-9}\text{ mbar}$, $R_{\text{nom}} = 8750$) durant 1 minute (1000 - 28000 m/z).

Pour conclure ces comparaisons et mieux évaluer l'impact d'une transmission non linéaire, une analyse comparative de l'albumine humaine (HSA) est ici présentée (Fig.12). Cette protéine monomérique de 66 kDa, porteuse de nombreuses modifications post-traductionnelles, peut être retrouvée sous forme de dimères et trimères en fonction de son état d'agrégation [73, 74]. L'analyse de cette protéine (5 μ M de monomère) par MS native sur le Q-TOF (Fig.12a) permet de mettre en évidence une distribution en oligomères de HSA. La protéine est majoritairement détectée sous forme de monomères (66626 ± 18 Da), et dans de moindres proportions, sous forme dimérique (133230 ± 4 Da) et trimérique. Une quantification relative de l'intensité de ces signaux permet d'estimer la proportion P en monomères ($87 \pm 1\%$), dimères ($11 \pm 1\%$) et trimères ($2 \pm 0\%$) du mélange. L'analyse de ce même échantillon sur l'Orbitrap (Fig.12b) ne permet plus qu'une détection majoritaire du monomère (66561 ± 3 Da, $P > 99\%$), malgré une optimisation de la transmission sur l'ensemble de la gamme m/z étudiée. Ces résultats illustrent la transmission non linéaire des ions sur l'Orbitrap en fonction de leurs rapports m/z et de la méthode instrumentale appliquée. L'optimisation de la transmission des ions ne semble applicable que sur une fenêtre m/z restreinte, et doit être prise en compte lors de l'analyse qualitative et quantitative de mélanges à larges distributions de m/z.

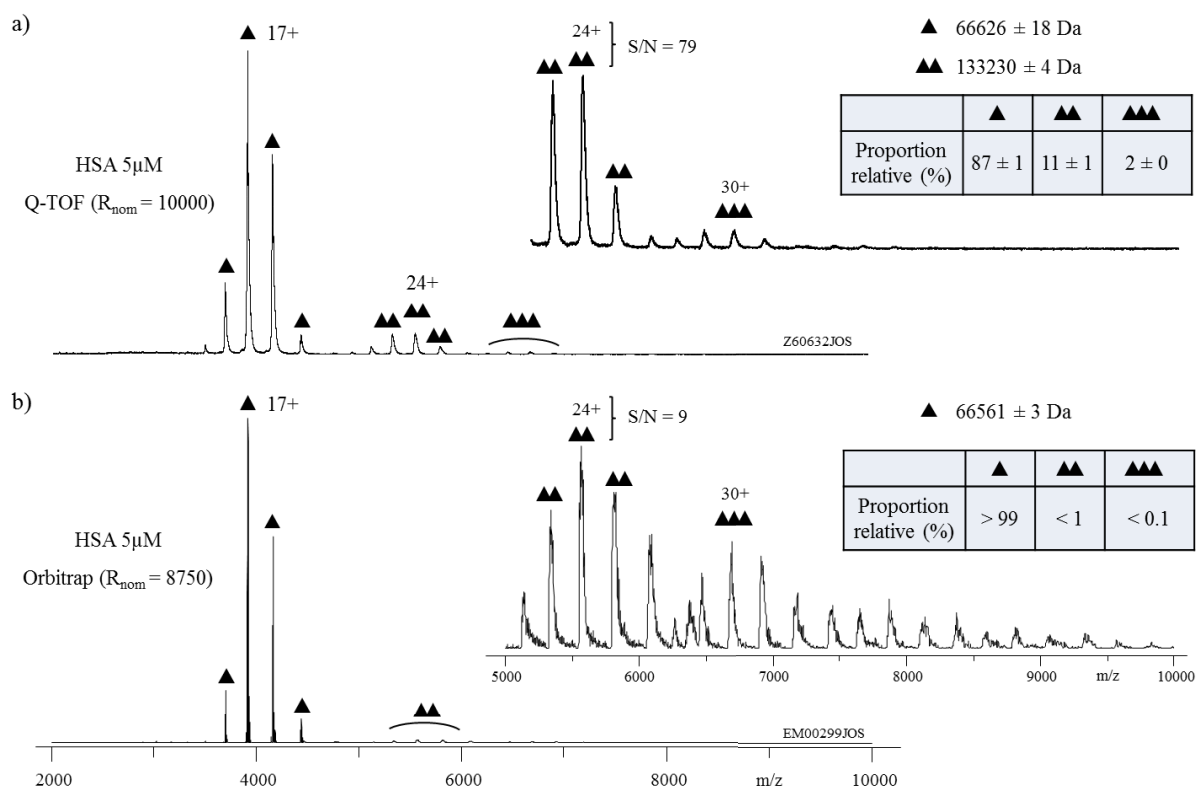


Figure 12 : Influence de la transmission des ions sur la nature et proportion relative des espèces détectées. La protéine HSA (5 μ M monomère), présente sous différents états oligomériques, est ici analysée en conditions natives (AcNH₄ 200mM pH 7.0) sur a) Synapt G2 (V_c = 120V, P_i = 7 mbar) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 50eV, CE = 10 eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6V, P_{UHV} = 1.0.10⁻⁹ mbar, R_{nom} = 8750) durant 2 minutes entre 1000 et 10000 m/z. La quantification relative des signaux associés à chaque oligomère permet une comparaison des proportions relatives obtenues entre chaque instrument.

4. Influence des paramètres instrumentaux sur le maintien de complexes non-covalents.

4.1. Optimisation des énergies de collision en source (CID) et en cellule HCD (CE).

La détection de systèmes non-covalents sur l'Orbitrap dépend de la stabilité des complexes en phase gazeuse et de leur thermalisation au sein de l'instrument [57, 66]. Cette dernière condition nécessite de contrôler l'énergie interne des ions lors de leurs collisions avec des molécules de gaz, survenant principalement dans les cellules S-Lens et HCD (Fig.5).

Dans ce contexte, l'influence des énergies de collision CID et CE appliquées dans ces régions est évaluée à travers l'étude d'un complexe non-covalent labile, constitué de la métalloprotéine PDF1B-Ni (nommée simplement PDF1B) et de son ligand actinonine (Fig.13-14). Le complexe PDF1B-actinonine formé par titrage de l'enzyme (5 μ M) en présence de 2 excès de ligand (10 μ M) est tout d'abord analysé par MS native à différentes énergies de collision CID (Fig.13). Le spectre de masse obtenu à énergie de collision nulle (Fig.13a) permet la détection d'une espèce de 22318.0 \pm 0.2 Da, en accord avec la préservation du complexe holo PDF1B-actinonine (masse moyenne théorique: 22319.1 Da). L'augmentation de l'énergie CID à 24eV (Fig.13b) s'accompagne de l'apparition d'une nouvelle espèce, dont la différence de masse mesurée (-385.3 Da) correspond à la dissociation du ligand actinonine (masse moyenne théorique : 385.5 Da). Cette dissociation du complexe est d'autant plus marquée à une énergie de 48eV (Fig.13c), l'espèce PDF1B apo devenant majoritaire sur l'ensemble des états de charge détectés (7⁺ à 10⁺). Par analogie, ce même complexe est analysé par MS native à différentes énergies de collision CE (Fig.14). Le recours à une énergie de collision CE nulle (Fig.14a) permet la préservation du complexe PDF1B-actinonine. A nouveau, une augmentation progressive de l'énergie de collision CE à 12eV, puis 24eV (Fig.14b-c) se traduit par la dissociation du complexe en phase gazeuse.

En conclusion, l'accélération des ions entre 2 collisions successives peut être contrôlée dans le bloc S-Lens et dans la cellule HCD par ajustement des énergies de collision CID et CE. Bien que le libre parcours moyen des ions ne puisse être optimisé dans le bloc S-Lens (pression non ajustable, proche de 2 mbar), le recours à une énergie de collision CID nulle suffit ici à minimiser l'énergie interne des ions et maintenir le complexe PDF1B-actinonine. Conjointement à l'optimisation de l'énergie de collision CE, la régulation de la pression en azote dans la cellule HCD permet de moduler le libre parcours moyen des ions, soit leur accélération entre chaque choc (données non présentées). L'optimisation fine de ces 3 paramètres sur cet instrument, doit permettre un compromis entre désolvatation optimale et maintien des complexes non-covalents.

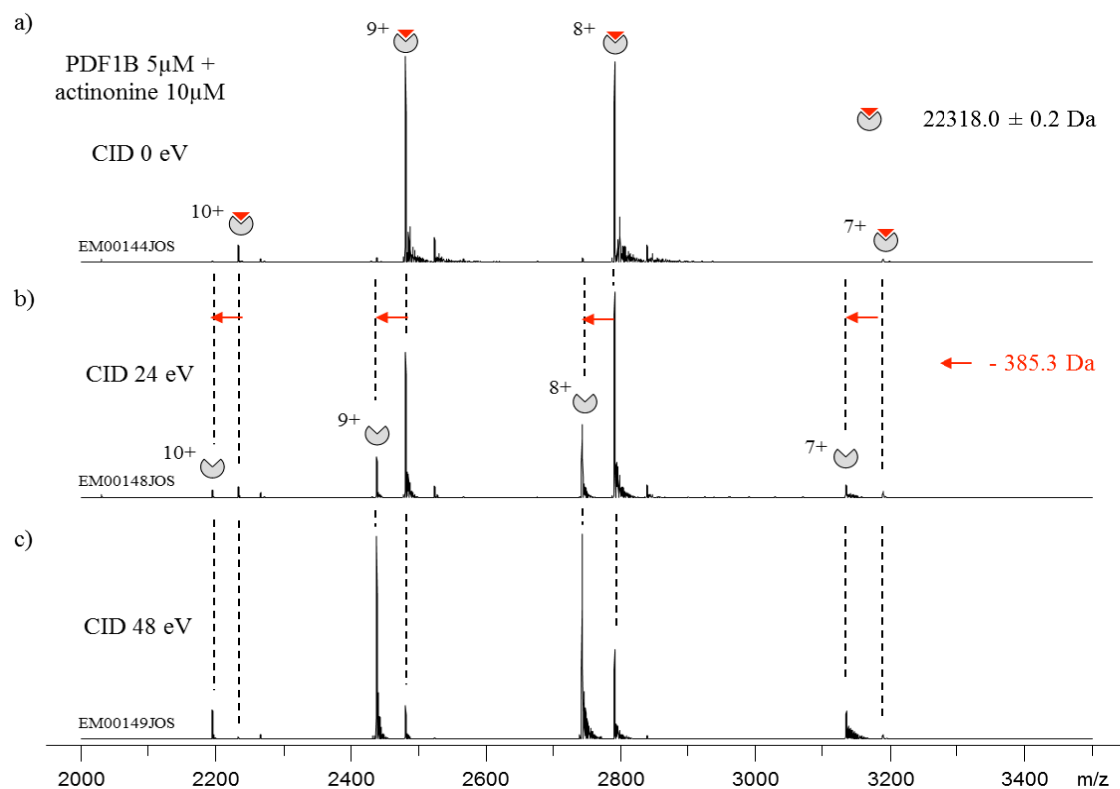


Figure 13 : Influence de l'énergie de collision CID appliquée dans le bloc S-Lens sur la préservation de complexes non-covalents. Le complexe formé entre la protéine PDF1B ($5\mu\text{M}$) et son ligand actinonine ($10\mu\text{M}$) est ici analysé par MS native ($\text{CE} = 0\text{eV}$, $P_{\text{UHV}} = 1.5 \cdot 10^{-10}$ mbar, $R_{\text{nom}} = 8750$) à différentes énergies de collision CID : a) 0 eV, b) 24 eV et c) 48 eV.

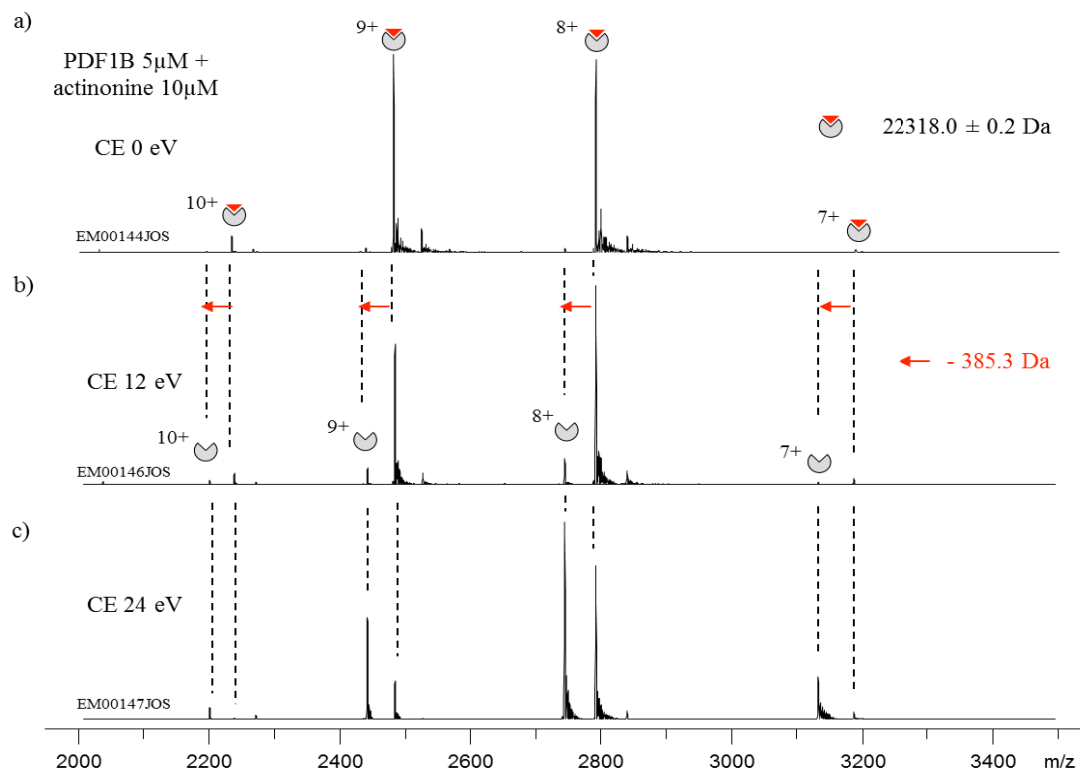


Figure 14 : Influence de l'énergie de collision CE appliquée dans la cellule HCD sur la préservation de complexes non-covalents. Le complexe formé entre la protéine PDF1B ($5\mu\text{M}$) et son ligand actinonine ($10\mu\text{M}$) est ici analysé par MS native ($\text{CID} = 0\text{eV}$, $P_{\text{UHV}} = 1.5 \cdot 10^{-10}$ mbar, $R_{\text{nom}} = 8750$) à différentes énergies de collision CE : a) 0 eV, b) 12 eV et c) 24 eV.

4.2. Comparaison instrumentale.

Afin d'évaluer le degré de préservation de tels complexes sur cet instrument, une analyse de l'échantillon PDF1B-actinonine par MS native est réalisée sur l'instrument Synapt G2 HDMS (Fig.15). Les méthodes instrumentales appliquées sur chaque interface sont optimisées de manière à préserver au maximum les complexes protéine-ligand. Ce critère est ici évalué par une quantification relative de la proportion de complexe PDF1B-actinonine détectée sur le Q-TOF (Fig.15a) et l'Orbitrap (Fig.15b). La détection d'une proportion de complexe similaire entre le Synapt G2 (97%) et l'Orbitrap Exactive Plus EMR (98%) permet ici de confirmer la relative « douceur » instrumentale de ce dernier.

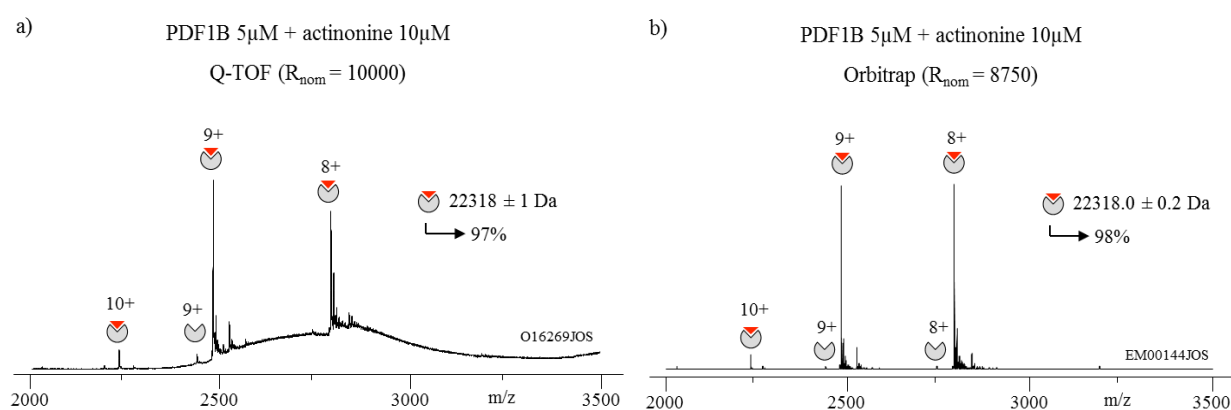


Figure 15 : Comparaison de la capacité de préservation de complexes non-covalents en MS native entre les instruments Synapt G2 et Orbitrap Exactive Plus EMR. Le complexe formé entre la protéine PDF1B (5 μ M) et son ligand actinonine (10 μ M) est analysé en conditions natives (AcNH₄ 100mM pH 7.5) sur a) Synapt G2 ($V_c = 40V$, $P_i = 6.5mbar$) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID, CE = 0 eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-6-7V, $P_{UH\bar{V}} = 9.2 \cdot 10^{-10}$ mbar, $R_{nom} = 8750$) durant 1 minute entre 500 et 5000 m/z. Une quantification relative de la proportion d'espèces apo / holo (intensité des signaux 7⁺ à 10⁺) est ici présentée.

5. Conclusions.

L'évaluation des performances de l'Orbitrap Exactive Plus EMR ici réalisée, permet de conclure que l'Orbitrap dispose des conditions nécessaires à l'étude de complexes non-covalents de hauts poids moléculaires, listées au début de ce chapitre:

- La capacité de préservation de systèmes non-covalents arborant diverses stabilités en phase gazeuse (protéine, ligand, métaux) élargit le domaine d'application de cet instrument en MS native. Néanmoins, l'incapacité de régulation de la pression dans le bloc S-Lens semble constituer une limite à la détection de systèmes non-covalents plus labiles, tels que les complexes récepteurs nucléaires:lipides (« Liver Receptor Homolog-1 », LRH-1 et « RAR-Related Orphan Receptor β », ROR β) principalement maintenus par effet hydrophobe (Debaene F., communication personnelle).

- La capacité de transmission accrue de cette interface facilite l'étude de complexes de hauts poids moléculaires, associés à des rapports m/z élevés. Néanmoins, la transmission non linéaire des ions semble limiter l'application de cet outil à la quantification relative d'espèces à large distribution de m/z (oligomères, mélanges hétérogènes).
- Le gain de résolution apporté par cet instrument accroît le pouvoir résolutif dans la dimension m/z et permet une mesure de masse plus juste et fidèle (minimisation des erreurs de masse). Néanmoins, les limites de ce gain sont conditionnées par l'intensité du signal, l'augmentation de la résolution s'effectuant au détriment de la sensibilité.

Les développements méthodologiques présentés ont ainsi pu être appliqués à la caractérisation d'agents thérapeutiques complexes et hétérogènes, dont l'analyse par MS native demeure cruciale et délicate : les anticorps monoclonaux et leurs immunoconjugués.

Chapitre 2 : Application à l'étude des anticorps monoclonaux et des immunoconjugués.

1. Contexte de l'étude.

Depuis leur introduction clinique en 1986, les anticorps monoclonaux (mAbs) constituent la première classe d'agents thérapeutiques chez l'Homme [75, 76]. Parmi les 57 molécules approuvées à ce jour par les autorités américaines et européennes, plus de 80% sont destinées aux domaines de l'oncologie et de l'auto-immunité [77-79]. Ces protéines de 150 kDa, constituées de 2 chaînes lourdes (50 kDa) et légères (25 kDa) identiques reliées entre elles par des ponts disulfures et des interactions non-covalentes, assurent la reconnaissance et l'élimination *in vivo* d'antigènes par le système immunitaire [80, 81]. Leurs propriétés biochimiques (spécificité, affinité d'interaction) et cytotoxiques (induction de l'apoptose, phagocytose et lyse cellulaire) ont été exploitées par l'industrie pharmaceutique, permettant l'élaboration d'anticorps à façon dirigés contre de nombreuses cibles thérapeutiques, dont les cellules tumorales [82-84]. Ces fonctions, portées par les parties variables (CDR) et constantes (Fc) de l'anticorps, s'avèrent néanmoins sensibles à la nature des modifications post-traductionnelles (PTMs) du mAb [85] (Fig.16a). Cette microhétérogénéité est ici illustrée sur le mAb commercial trastuzumab (HerceptinTM, Genentech), indiqué dans le traitement du cancer du sein [86, 87]. La modification spontanée ou enzymatique de certains résidus par oxydation (M, +16 Da), cyclisation (E, -18 Da), déamidation (N, +1 Da), clivage (K, -128Da), pontage disulfure (C-C, -2 Da) ou glycosylation (N, + 1241 à 1769 Da selon la ramification) s'accompagne d'une déclinaison de l'anticorps en de nombreux variants, dont l'efficacité clinique peut être différente [88, 89]. Cette hétérogénéité, variable selon le système d'expression recombinant employé [90, 91] nécessite une caractérisation fine de la nature et distribution de ces espèces.

Plus récemment, ce degré de complexité s'est accentué par l'administration synergique de cocktails d'anticorps [92], et l'émergence d'immunoconjugués (« Antibody-Drug Conjugates » ou ADCs) [93]. Ces derniers sont générés par couplage chimique de drogues à la surface d'un anticorps monoclonal internalisable, permettant d'accroître considérablement l'effet thérapeutique. Dans ce contexte, la spécificité de l'anticorps est utilisée pour acheminer la drogue, inactive sous forme conjuguée, jusqu'à la cellule cible [94]. La formation du complexe immun et l'internalisation de l'ADC précède le relargage de l'agent cytotoxique dans le milieu

intracellulaire, contribuant à la mort de la cellule [95]. Le recours à un agent bifonctionnel (linker) permet le couplage spécifique entre les chaînes latérales des résidus ciblés (cystéines : ADC Cys, lysines : ADC Lys, ou acides aminés non naturels) et la drogue [96-98]. L'efficacité des anticorps ainsi « armés » dépend particulièrement du nombre de drogues arrimées à sa surface, et par suite de la nature et stabilité du linker, des sites de conjugaison accessibles et de l'efficacité de la réaction de couplage [99-102]. Le contrôle de cette distribution conditionne les propriétés pharmacocinétiques de l'ADC, un nombre moyen de drogues par anticorps (« Drug to Antibody Ratio » ou DAR) trop faible atténuant son efficacité, trop élevé limitant sa solubilité et accélérant son élimination [103-105]. L'hétérogénéité de cette distribution est ici illustrée sur l'ADC Lys commercial trastuzumab emtansine T-DM1 (Kadcyla™, Genentech), également indiqué dans le traitement du cancer du sein (Fig.16b). Les fonctions maléimides et esters portées par le linker SMCC assurent respectivement le chargement de la drogue mertansine et la conjugaison aux chaînes latérales des lysines de l'anticorps [106]. Cette réaction de couplage s'accompagne d'une distribution d'anticorps porteurs de 0 à 8 drogues (« Drug number » ou Dn, avec $0 \leq n \leq 8$), centrée sur un DAR moyen de 3.5 [107, 108]. L'identification et quantification relative de ces populations en mélange implique le recours à des méthodes sensibles et résolutive, capables d'évaluer cette hétérogénéité.

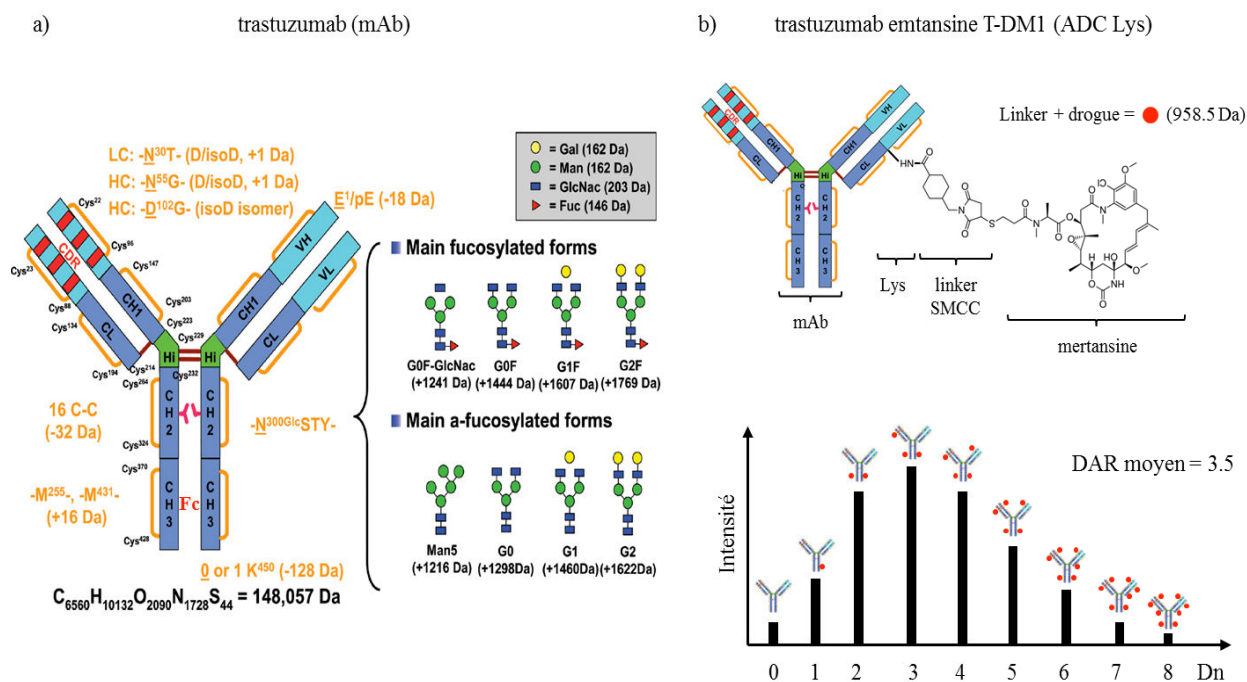


Figure 16 : Représentation schématique a) d'un anticorps monoclonal (mAb), d'après [87] et b) de son immunoconjugué (ADC Lys). a) L'anticorps thérapeutique trastuzumab présente une microhétérogénéité intrinsèque, liée à la présence de nombreuses modifications post-traductionnelles. b) Sa conjugaison à un composé cytotoxique (mertansine) en présence d'un agent de couplage ou « linker » (SMCC) ciblant les lysines du mAb (ADC Lys) contribue à l'accroissement de son hétérogénéité (nombre, position des drogues couplées).

Le couplage de différentes techniques séparatives (chromatographie liquide, électrophorèse) et analytiques (spectrophotométrie, fluorimétrie, spectrométrie de masse) permet d'étudier ces biomolécules à partir de nombreuses approches orthogonales [109-111] (Tableau 1).

	Technique séparative	Principe de séparation	Niveau de caractérisation	Technique analytique	Caractéristiques	Inconvénients
Chromatographie liquide	Phase inverse (RPLC)	Hydrophobicité	Protéine Peptide Glycane	UV, MS UV, MS MS, LIF	Caractérisation de la séquence primaire Identification, localisation, quantification des PTMs (mAb) et des peptides conjugués (ADC)	Adsorption (« carry-over ») Faible rétention des peptides très hydrophiles
	Interaction hydrophobe (HIC)	Hydrophobicité	Protéine	UV, MS	Identification des PTMs affectant l'hydrophobicité (oxydation, isomérisation, clivage de résidus) Conditions non-dénaturantes : préservation, séparation, quantification des espèces conjuguées Dn et du DAR moyen d'ADCs non-covalents (Cys)	Compatibilité MS des sels utilisés en phase mobile
	Interaction hydrophile (HILIC)	Hydrophilicité	Peptide Glycane	UV, MS MS, LIF	Identification, localisation, quantification des glycoformes (nature, isomères)	Marquage fluorescent des glycanes extraits
	Echange d'ion (IEX)	Charge ou point isoélectrique	Protéine	UV, MS	Identification des PTMs à variation de charge (cyclisation, déamidation, cystéinylation, clivage) Séparation, quantification des espèces conjuguées Dn & du DAR moyen d'ADCs à chimie de couplage Lys	Compatibilité MS des sels utilisés en phase mobile Temps d'optimisation et de régénération
	Exclusion de taille (SEC)	Rayon hydrodynamique	Protéine	UV, MS	Conditions non-dénaturantes : caractérisation d'agrégats, d'oligomères, de complexes non-covalents immuns (structures quaternaires)	Résolution limitée Débit analytique, quantité injectée
Électrophorèse capillaire	De zone (CZE)	Charge & rayon hydrodynamique	Protéine Peptide Glycane	UV, MS UV, MS MS, LIF	Caractérisation de la séquence primaire Identification, localisation, quantification des PTMs à variation de charge (cyclisation, déamidation, cystéinylation, clivage, glycosylation)	Compatibilité MS des additifs Marquage fluorescent des glycanes extraits
	Focalisation isoélectrique (cIEF)	Point isoélectrique & rayon hydrodynamique	Protéine	UV (MS)	Identification des PTMs à variation de charge (cyclisation, déamidation, cystéinylation, clivage)	Incompatibilité MS des ampholytes non volatils utilisés
	sur gel (CGE)	Rayon hydrodynamique	Protéine Peptide Glycane	UV UV LIF	Identification, quantification des variants de taille (substitution, troncation de résidus) Identification, localisation, quantification des glycoformes	Incompatibilité MS

Tableau 1: Présentation des principales technologies analytiques appliquées à la caractérisation des anticorps thérapeutiques. UV : Spectrophotométrie d'absorption ultraviolet-visible, MS : Spectrométrie de masse, LIF : Fluorimétrie par excitation laser.

L'hétérogénéité des mAbs et ADCs (PTMs, conjugaisons) peut ainsi être adressée à différents niveaux de caractérisation (protéine, peptide, glycane). Les propriétés biochimiques des modifications analysées (charge, taille, hydrophobicité) et l'application recherchée (identification, localisation, quantification) conditionnent le choix des techniques de préfractionnement et de détection utilisées, chacune présentant ses avantages et inconvénients [111, 112]. Ainsi, bien que la détection UV combinée à différentes techniques séparatives (HIC, IEX) soit particulièrement adaptée à la caractérisation du profil de distribution en drogues d'ADCs Cys et Lys intacts [113-115], la photosensibilité de certaines drogues, linkers ainsi que la persistance de drogues fixées non-covalamment, peuvent affecter la quantification du DAR moyen [103, 104]. De même, la caractérisation de glycanes par CGE-LIF nécessite un

marquage fluorescent homogène des fractions déglycosylées et le recours à des étalons de structures connues, pouvant limiter la détection et l'assignation de ces PTMs [116, 117].

Dans ce contexte, la spectrométrie de masse constitue une alternative analytique à l'étude de ces espèces ionisables, combinant sensibilité et résolution et ne nécessitant pas de marquage (Fig.17).

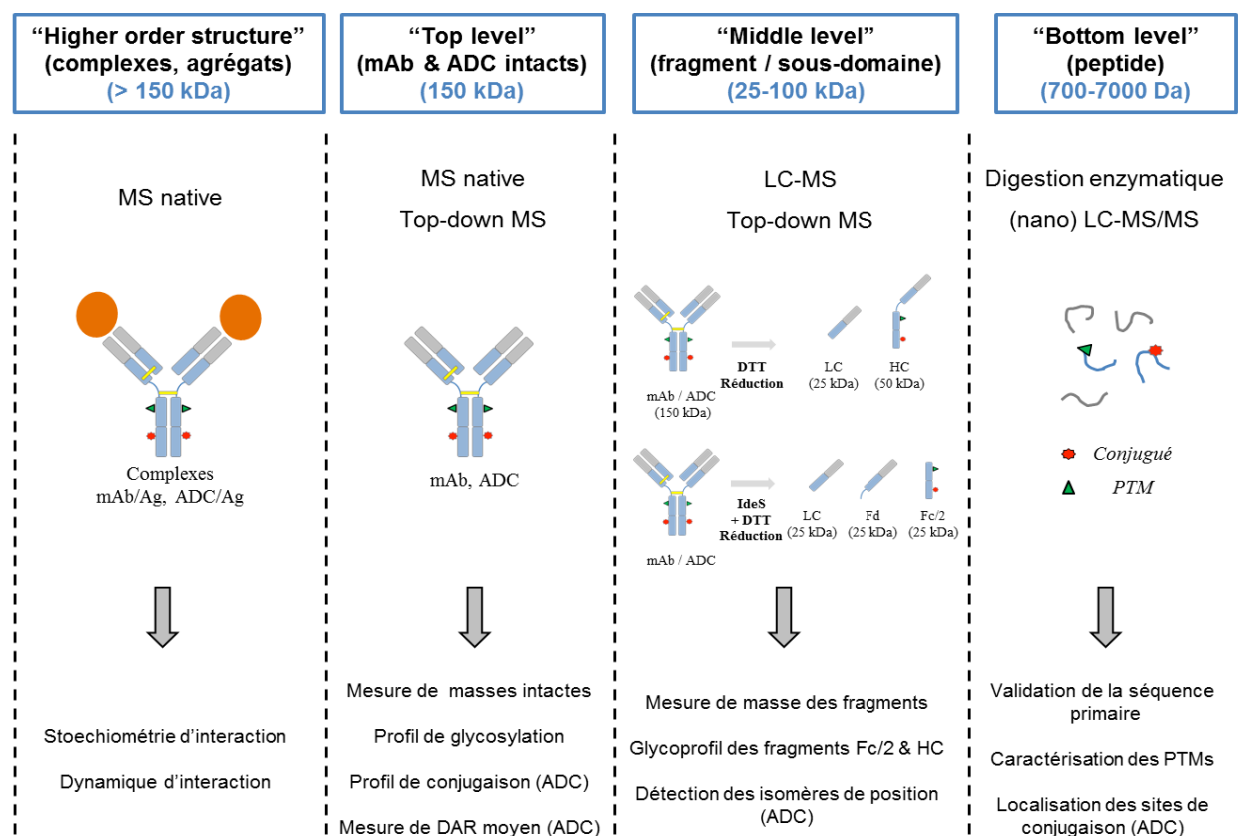


Figure 17 : Caractérisation multi-niveau des anticorps thérapeutiques par spectrométrie de masse, adaptée de [104].

L'analyse protéomique des peptides (« bottom level ») générés par digestion de l'anticorps entier (« top level ») ou de ses fragments (« middle level ») permet une validation de la séquence primaire ainsi que l'identification, localisation et quantification des modifications post-traductionnelles et des sites de conjugaison [111, 118-121]. Plus récemment, l'analyse de ces protéines intactes par MS native a permis la caractérisation de leurs profils de glycosylation et de distribution en drogues, ainsi que l'étude de leurs complexes non-covalents [49, 122-125]. Cependant, l'hétérogénéité cumulée par la présence de modifications post-traductionnelles et de drogues en mélange, se traduit par des variations de masse comprises entre 0.01 et 5% de la masse de l'anticorps entier. Cette subtilité constitue un défi analytique en MS native, pouvant limiter l'interprétation des données [43]. Parmi les stratégies analytiques envisagées [126-129], l'accès à une résolution expérimentale étendue constitue à ce jour un moyen de contournement de cet écueil [104, 128, 130-132].

2. Objectifs des travaux.

L'objectif de ces travaux se décline en 2 parties, relatives à :

- L'évaluation des performances instrumentales de l'Orbitrap Exactive Plus EMR pour l'analyse de mAbs, ADCs et de leurs complexes par MS native. Cette étude, initiée avant la commercialisation de l'instrument (2013), en collaboration avec le constructeur Thermo Fisher Scientific (Brême, Allemagne) et l'équipe du Dr. Alain Beck (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois), porte sur :
 - L'apport de la haute résolution sur la justesse de masse relevée en présence du mAbs commercial trastuzumab (erreurs de masse, résolutions expérimentales).
 - La capacité de résolution d'un mélange hétérogène de 11 mAbs déglycosylés, utilisé comme modèle de cocktail thérapeutique.
 - La capacité de caractérisation et de quantification des différents Dn associés à un ADC Cys commercial déglycosylé, le brentuximab vedotin BV (AdcetrisTM, Seattle Genetics).
 - La capacité de préservation et de caractérisation de complexes mAb:antigène, formés entre le mAb déglycosylé J10.4 et son antigène JAM-A.

- L'application de cet outil pour la caractérisation par MS native à haute résolution, d'une chimie de couplage alternative entre le mAb trastuzumab et sa drogue mertansine, commercialisés sous forme d'ADC Lys (T-DM1, Fig.16b). Ces travaux, réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Alain Wagner et la société Syndivia (Strasbourg, France), portent sur l'introduction d'un nouvel agent hétéro-bifonctionnel à chimie de couplage thiol-thiol stable, le MAPN, ciblant les cystéines du mAb. La comparaison des profils de conjugaison générés à partir du linker MAPN (ADC Cys T-MAPN-DM1) et du linker de référence SMCC (ADC Lys T-DM1) permet d'évaluer l'apport de cette nouvelle chimie de conjugaison sur l'homogénéité des espèces Dn générées et sur le DAR moyen obtenu.

3. Bilan des résultats.

3.1. Apport de la haute résolution pour la caractérisation de mAbs.

3.1.1. Influence de la résolution nominale R_{nom} sur la justesse de masse mesurée.

L'assignation non équivoque des mAbs et de leur hétérogénéité par MS native implique une mesure de masse intacte juste (erreur entre la masse théorique attendue et la masse mesurée) et fidèle (écart-type de la mesure sur les différents états de charge considérés). Afin de réunir ces conditions, une optimisation de la résolution nominale (R_{nom}) appliquée sur l'Orbitrap s'avère nécessaire. L'influence de ce paramètre est illustrée à travers l'analyse du mAb glycosylé trastuzumab (5 μ M) en conditions natives (Fig.18). Les masses mesurées à différentes résolutions R_{nom} sur la glycoforme G0F/G0F sont ici comparées à la masse moyenne théorique attendue pour cette espèce (148056.2 Da) et exprimées sous forme d'erreurs. L'application d'une résolution R_{nom} croissante de 8750, 17500, 35000 et 70000 (Fig.18a-d) s'accompagne d'une optimisation progressive de la justesse de masse, l'erreur associée passant de 80 ppm ($R_{nom} = 8750$, Fig.18a) à 6 ppm ($R_{nom} = 70000$, Fig.18d). Quelle que soit la résolution fixée, la fidélité des mesures de masse apparaît optimale et constante, les écarts-types associés n'excédant pas 1 Da, soit 7 ppm. Ces performances, compatibles avec l'assignation de nombreuses PTMs sur des espèces pures et homogènes, s'accompagnent néanmoins d'une dégradation de la sensibilité du signal. Un zoom sur l'état de charge 25⁺ permet de suivre le rapport S/N de la glycoforme majoritaire G1F/G0F en fonction de la résolution R_{nom} (Fig.18a-d). Bien que la résolution expérimentale R_{eff} mesurée sur le signal G1F/G0F 25⁺ ($m/z \approx 5930$) soit élargie en présence de résolutions R_{nom} croissantes (R_{eff} de 1638 et 5895 pour une R_{nom} de 8750 et 70000, Fig.18a,d), l'intensité de ce signal décroît significativement (S/N de 2749 et 151 coups pour une R_{nom} de 8750 et 70000, Fig.18a,d). L'application d'une résolution R_{nom} maximale de 140000 (Fig.18e) se traduit par une extinction de ce signal (S/N = 21 coups) et une perte de sensibilité marquée sur l'ensemble des états de charge du mAb, ne permettant plus une mesure de masse de ses glycoformes. En conclusion, l'optimisation du paramètre R_{nom} doit satisfaire un compromis entre pouvoir résolutif (R_{eff}), justesse de masse et sensibilité du signal mesuré. Cet équilibre, déjà rapporté sur certaines protéines modèles (chapitre 1), s'avère d'autant plus crucial au sein d'expériences de quantification relative, portant notamment sur les ADCs (quantification relative des espèces conjuguées Dn, calcul du DAR moyen).

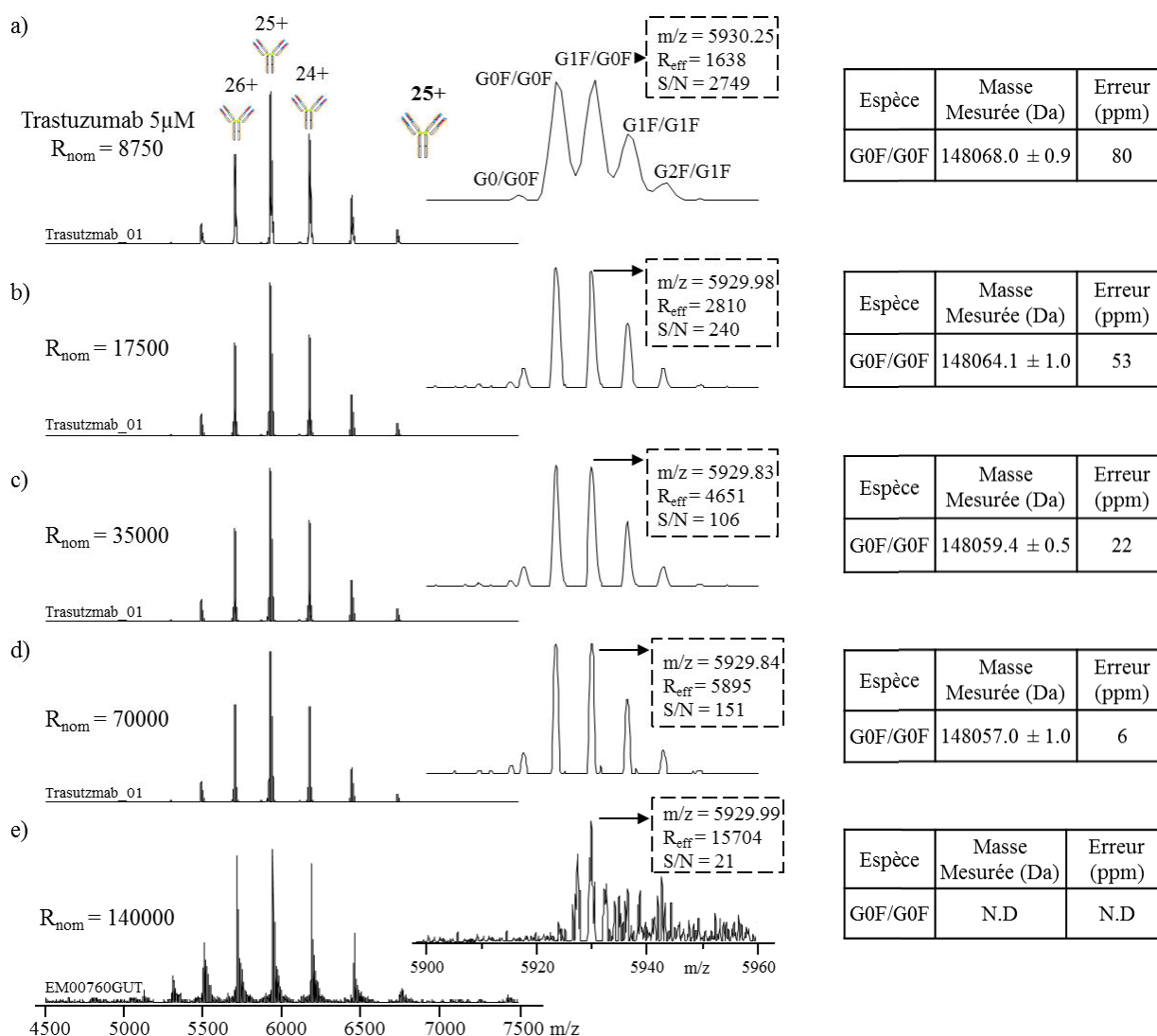


Figure 18 : Influence de la résolution nominale (R_{nom}) sur la justesse de masse mesurée par MS native. Les spectres de masse générés en conditions natives (AcNH_4 150mM pH7.5) à partir du mAb trastuzumab glycosylé ($5\mu\text{M}$) sur Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 200eV, CE = 0eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6V, $P_{UHV} = 2.4 \cdot 10^{-10}$ mbar) sont ici présentés à différentes résolutions nominales : a) 8750 b) 17500 c) 35000 d) 70000 et e) 140000. Un zoom sur l'état de charge 25^+ permet d'évaluer l'effet de ce paramètre sur la résolution effective R_{eff} et le rapport S/N du signal G1F/G0F majoritaire. La justesse de masse mesurée sur l'espèce G0F/G0F (masse moyenne théorique : 148056.2 Da) est indiquée sous forme d'erreur.

3.1.2. Comparaison des performances du Synapt G2 et de l'Orbitrap Exactive Plus EMR.

L'optimisation instrumentale précédemment décrite permet une exploitation optimale du pouvoir résolutif de l'Orbitrap pour la caractérisation de mAbs, à une résolution R_{nom} de 70000. Afin d'illustrer l'apport de ce nouvel instrument, une comparaison des spectres de masse natifs obtenus sur le Synapt G2 (Fig.19a) et l'Orbitrap (Fig.19b, $R_{nom} = 70000$) à partir du même échantillon (mAb trastuzumab glycosylé $5\mu\text{M}$) est ici présentée.

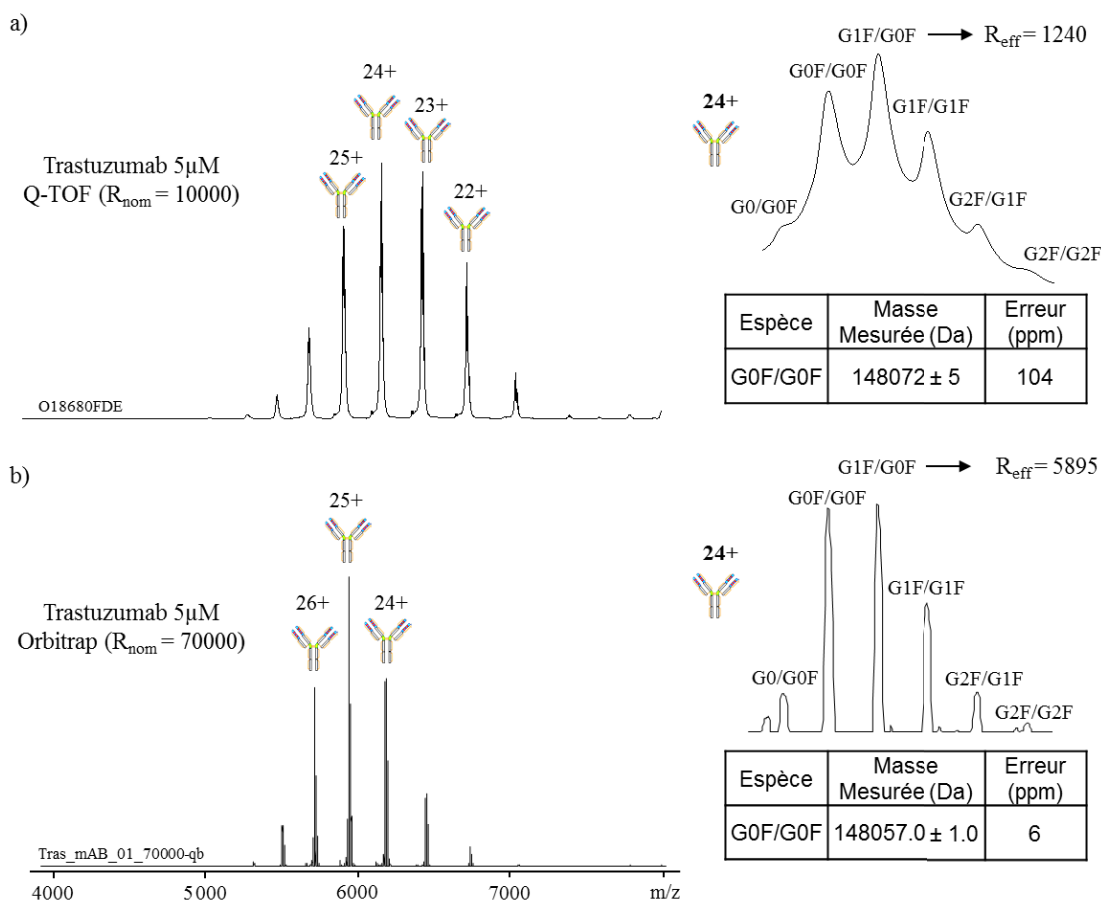


Figure 19 : Apport de la haute résolution pour la caractérisation d'anticorps thérapeutiques (mAbs) par MS native. Les spectres de masse générés en conditions natives (AcNH_4 150mM pH7.5) à partir du mAb trastuzumab glycosylé (5 μ M) sur les instruments a) Synapt G2 ($V_c = 180\text{V}$, $P_i = 6\text{mbar}$) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 200eV, CE = 0eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6V, $P_{UH\text{V}} = 2.5 \cdot 10^{-10}$ mbar, $R_{nom} = 70000$) sont ici présentés. Une résolution à la ligne de base des glycoformes (G0/G0F à G2F/G2F) ainsi qu'une justesse de masse inférieure à 10 ppm (masse moyenne théorique G0F/G0F : 148056.2 Da) sont obtenues sur l'Orbitrap.

Un zoom sur l'état de charge 24⁺ du mAb permet une comparaison du profil de glycosylation obtenu sur chaque instrument. La résolution expérimentale R_{eff} mesurée sur le signal 24⁺ de l'espèce majoritaire G1F/G0F ($m/z \approx 5930$) met en évidence un gain de résolution proche d'un facteur 5 sur l'Orbitrap (R_{eff} de 1240 sur le Q-TOF, 5895 sur l'Orbitrap), permettant une résolution à la ligne de base des glycoformes du mAb. D'autre part, la comparaison des masses mesurées sur l'espèce G0F/G0F souligne une mesure de masse plus juste et fidèle sur l'Orbitrap (erreur = 6 ppm, écart-type sur la mesure = 1 Da) que sur le Q-TOF (104 ppm et 5 Da, respectivement). Ces performances élargissent le degré de confiance des assignations et facilitent l'identification de modifications post-traductionnelles plus subtiles sur l'Orbitrap.

Afin de mieux évaluer le potentiel de cet instrument, une analyse comparative par MS native d'un mélange beaucoup plus complexe, constitué de 11 mAbs déglycosylés (5 μ M) mimant un cocktail d'anticorps thérapeutiques [133, 134], est ici réalisée (Fig.20).

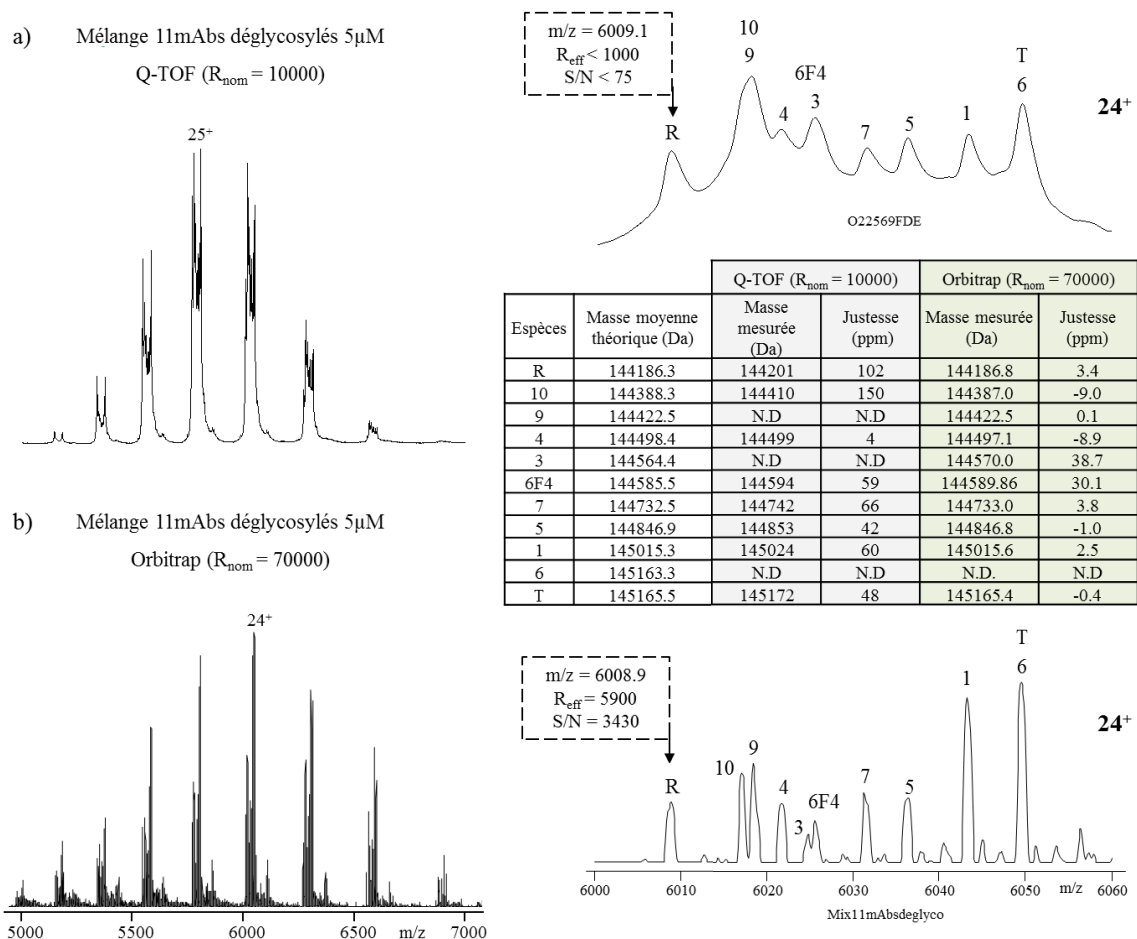


Figure 20 : Apport de la haute résolution pour la caractérisation de mAbs en mélange par MS native. Les spectres de masse obtenus en conditions natives (AcNH₄ 150mM pH7.5) en présence d'un mélange de 11 mAbs déglycosylés (5 μ M) sur les instruments a) Synapt G2 ($V_c = 180V$, $P_i = 6mbar$) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 100eV, CE = 0eV, injection-inter-bent flatapôles = 4-4-4V, $P_{UH\bar{V}} = 5.8.10^{-10}$ mbar, $R_{nom} = 70000$) sont ici présentés. 10 mAbs sont identifiés sur l'Orbitrap, contre 8 sur le Q-TOF, à travers des justesses de masse moyennes de 10 et 66 ppm, respectivement. Les espèces R, 10, 9, 4, 3, 6F4, 7, 5, 1, 6, T correspondent respectivement aux mAbs rituximab, 6F4-2 v10, v9, v4, v3, WT, v7, v5, v1, v6, trastuzumab.

Ces mAbs s'étendent sur une gamme de masses moyennes théoriques restreinte, comprise entre 144186.3 (espèce R) et 145165.5 Da (espèce T). Certains anticorps diffèrent par de faibles différences de masse, comme les espèces 9 / 10 (34.2 Da), 6F4 / 3 (21.1 Da) et T / 6 (2 Da). La comparaison des spectres de masse obtenus sur le Synapt G2 (Fig.20a) et l'Orbitrap (Fig.20b, $R_{nom} = 70000$) permet de souligner le pouvoir résolutif de l'Orbitrap. Un zoom sur l'état de charge 24⁺ de ces espèces met en évidence une identification non ambiguë de 10 mAbs sur l'Orbitrap, contre 8 sur le Q-TOF. La résolution expérimentale R_{eff} accrue de l'Orbitrap (R_{eff} à m/z 6009 < 1000 sur le Q-TOF, 5900 sur l'Orbitrap) permet une identification des espèces 9 et 10, 6F4 et 3, confondues sur le Q-TOF. Comme attendu, la différence de masse théorique entre les espèces 6 et T, bien inférieure à la largeur isotopique à mi-hauteur d'un anticorps (≈ 25 Da, d'après des simulations internes de distribution isotopique réalisées au laboratoire sur le logiciel MassLynx, Waters), ne permet pas leur séparation, quels que soit l'instrument utilisé et

la résolution R_{eff} accessible [43]. Par ailleurs, la comparaison des erreurs de masse mesurées confirme une justesse de masse plus importante sur l'Orbitrap (erreur moyenne = 10 ppm) que sur le Q-TOF (66 ppm). L'apport de la haute résolution s'avère particulièrement adaptée à l'analyse de tels mélanges par MS native, délivrant une étude approfondie de leur hétérogénéité et une meilleure justesse de masse.

3.2. Apport de l'Orbitrap Exactive Plus EMR pour la caractérisation d'ADCs Cys.

Les 2 ADCs approuvés à ce jour par les autorités sanitaires, reposent sur une chimie de couplage différente : l'ADC Lys T-DM1 s'appuie sur une conjugaison des lysines du mAb trastuzumab (Fig.16b), l'ADC Cys BV sur une conjugaison des cystéines du mAb brentuximab (Fig.21). Ce dernier, indiqué dans le traitement de certains lymphomes, résulte du couplage entre le mAb brentuximab et la drogue auristatine E à partir du linker valine citrulline [104, 135]. Les fonctions carbonyles et maléimides portées par ce linker assurent respectivement le chargement de la drogue et la conjugaison aux chaînes latérales des cystéines de l'anticorps [96]. La réduction partielle des 4 ponts disulfures inter-chaînes du mAb libère jusqu'à 8 cystéines, dont le couplage s'accompagne d'une distribution d'espèces D_n paires ($0 \leq n \leq 8$), centrée sur un DAR moyen de 4.0 [132, 136]. Contrairement aux ADCs Lys, la conjugaison des ADCs Cys par réduction-alkylation conduit à la formation d'espèces D_n non-covalentes, impliquant certaines précautions instrumentales indispensables à leur détection par MS native.

3.2.1. Influence de l'énergie de collision en source (CID) sur le profil de distribution de drogues associé à l'ADC Cys BV.

En plus d'une optimisation de la résolution nominale R_{nom} , nécessaire à l'identification non ambiguë et à la quantification relative de l'ensemble des espèces D_n (décrite dans le paragraphe 3.1.1 précédent), la préservation de ces complexes non-covalents en phase gazeuse requiert certaines considérations instrumentales supplémentaires. Plus particulièrement, les énergies de collision appliquées en source (CID), en cellule HCD (CE), ainsi que la pression en gaz de la cellule HCD doivent être optimisées de manière à limiter la dissociation des espèces D_n non-covalentes induite par collision avec des molécules de gaz (chapitre 1). Dans ce contexte, une illustration de l'influence de l'énergie de collision en source (CID) sur le profil de distribution en drogues et le DAR moyen de l'ADC Cys BV déglycosylé ($5\mu\text{M}$) est ici rapportée (Fig.22, $R_{\text{nom}} = 17500$). L'application d'une énergie CID de 40 eV (Fig.22a) permet une détection de l'ensemble des espèces D_n (D_0, D_2, D_4, D_6, D_8) entre 5500 et 7000 m/z, dans des proportions

brentuximab vedotin BV (ADC Cys)

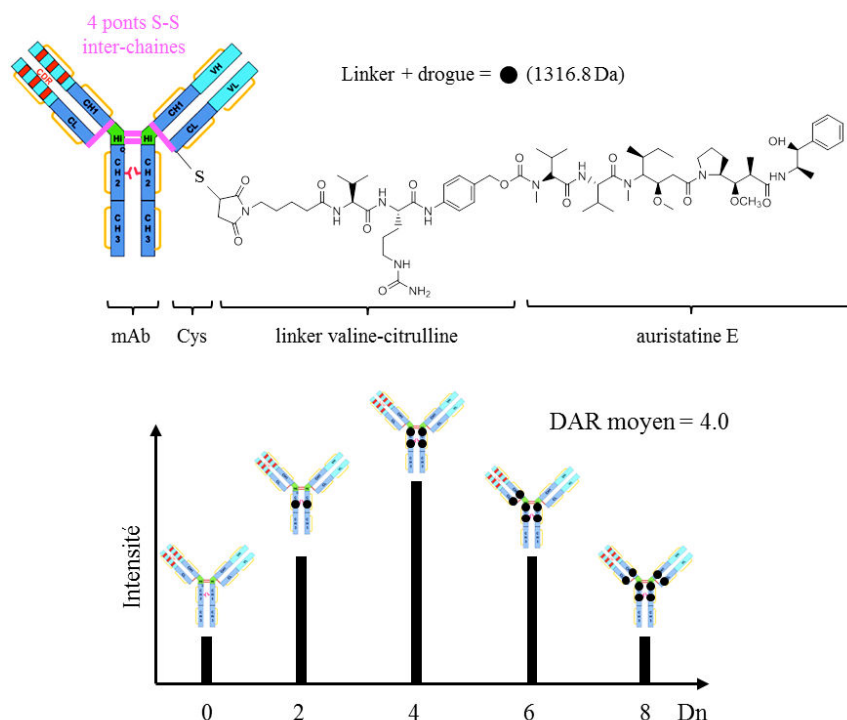


Figure 21 : Représentation schématique de l'ADC Cys brentuximab vedotin (BV). La conjugaison du mAb brentuximab à sa drogue (auristatine E) s'effectue à partir du linker valine-citrulline, ciblant les cystéines du mAb (ADC Cys). La réduction partielle des 4 ponts disulfures inter-chaînes du mAb, permet la fixation de 0 à 8 drogues par alkylation au linker conjugué. Cette chimie de couplage contribue ainsi à la formation d'espèces Dn paires, dont la distribution se traduit par un DAR moyen de 4. Ces espèces Dn peuvent être de nature non-covalente, en fonction du nombre et de la position des cystéines conjuguées.

(6.3, 26.4, 37.4, 22.0 et 7.9 %) associées à un DAR moyen de 4.0, en accord avec la littérature [132, 136]. L'augmentation de cette énergie (140 eV, Fig.22b) se traduit par l'apparition de signaux supplémentaires entre 4000 et 5250 m/z, dont les masses mesurées (75580.8 et 78216.3 Da) correspondent à des demi-anticorps conjugués (DAR4, 6, 8) porteurs de 2 à 4 drogues (masses moyennes théoriques : 75579.1 et 78214.4 Da). Cette dissociation partielle induit une distorsion artificielle dans la distribution des espèces Dn, la proportion d'espèces D8, D6 et D4 diminuant (-3.5, -3.1 et -1.4 %) au profit des espèces D0 et D2 (+2.3 et +5.8 %). Ces variations s'accompagnent d'une sous-estimation du DAR moyen, passant de 4.0 à 3.5. L'optimisation concomitante de ce paramètre, de l'énergie de collision (CE) et de la pression appliquée en cellule HCD, limite ainsi l'impact des conditions instrumentales sur la distribution des populations Dn non-covalentes, permettant une quantification précise et non biaisée du DAR moyen des ADCs Cys.

La transposition de ces développements méthodologiques à l'étude de complexes non-covalents mAb:antigène a par ailleurs permis de confirmer la stoechiométrie d'interaction 1:2 du complexe immun J10.4:JAM-A par MS native à haute résolution [137], élargissant le domaine d'application de cet instrument.

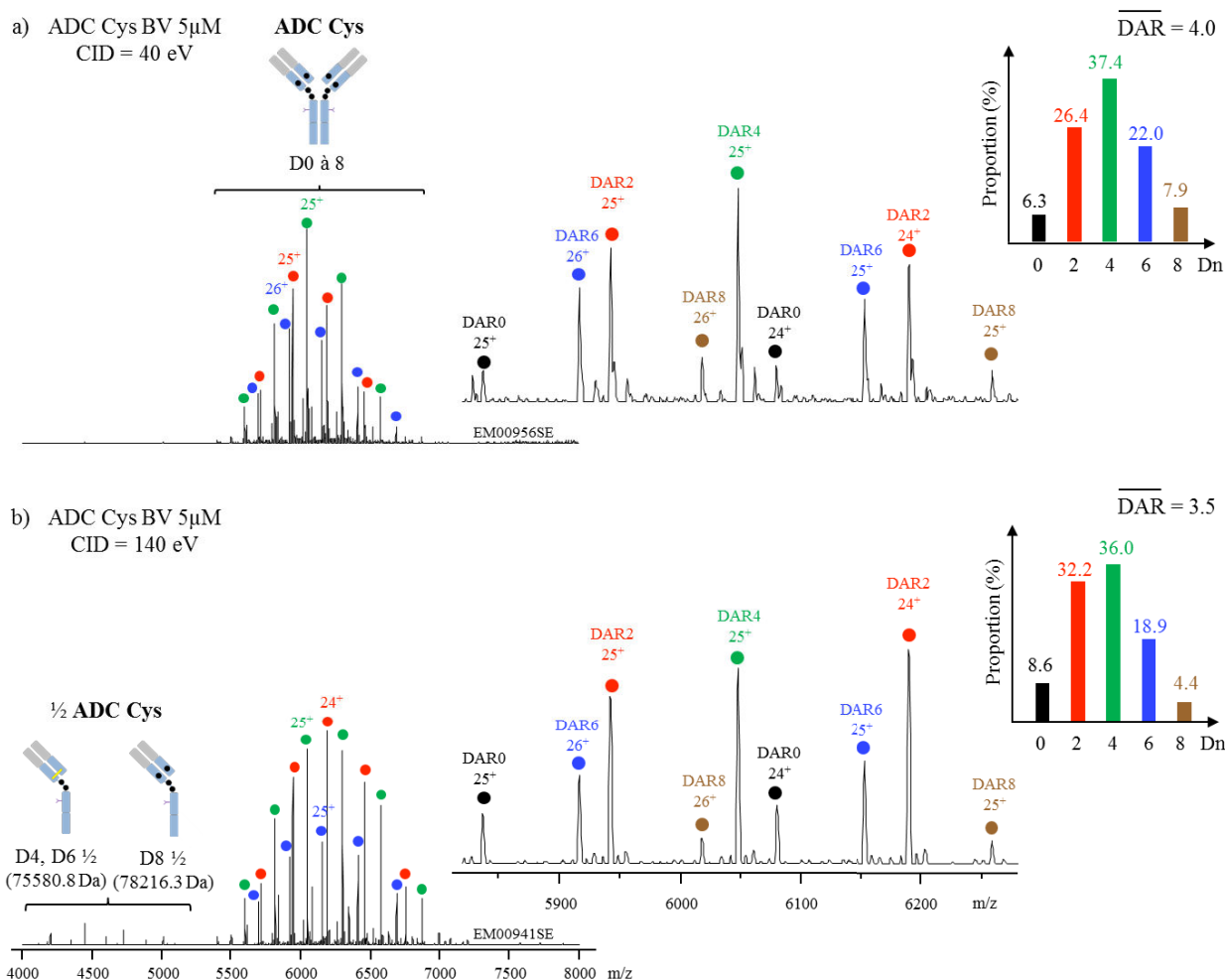


Figure 22 : Influence de l'énergie de collision en source (CID) sur le profil de distribution en drogues et le DAR moyen de l'ADC Cys BV. Les spectres de masse générés en conditions natives (AcNH₄ 150mM pH7.5) à partir de l'ADC déglycosylé (5 μ M) sur Orbitrap Exactive Plus EMR (CE = 0 eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6V, P_{UHV} = 1.2.10⁻⁹ mbar, R_{nom} = 17500) sont ici présentés à différentes énergies de collision CID : a) 40 eV b) 140 eV. Un zoom sur les états de charge 25⁺ permet d'évaluer l'effet de ce paramètre sur la distribution d'espèces conjuguées Dn. La quantification relative de ces espèces (états de charge 21⁺ à 29⁺) permet une détermination du DAR moyen associé.

3.2.2. Comparaison des performances du Synapt G2 et de l'Orbitrap Exactive Plus EMR.

Une analyse comparative de l'échantillon BV déglycosylé (5 μ M) par MS native sur le Synapt G2 (Fig.23a) et l'Orbitrap Exactive Plus EMR (Fig.23b, R_{nom} = 35000) permet d'évaluer l'apport de cette nouvelle interface pour la caractérisation d'ADCs Cys. Un zoom sur l'état de charge 25⁺ des différentes espèces Dn permet de confirmer une différence de résolution expérimentale R_{eff} entre les 2 instruments, les signaux apparaissant plus larges et moins résolus sur le Q-TOF. Néanmoins, cette résolution semble suffisante pour distinguer l'ensemble des états de charge associés à chaque espèce Dn. Bien que les DARs moyens calculés sur le Synapt G2 (3.9 \pm 0.1) et l'Orbitrap Exactive Plus EMR (4.0 \pm 0.1) soient similaires à celui déduit de la méthode de référence HIC-UV (4.0), l'abondance relative mesurée pour chaque population Dn

sur ces 2 instruments révèle certaines différences. En effet, les proportions d'espèces D0, D2, D4, D6 et D8 mesurées sur l'Orbitrap (6.9, 23.4, 38.6, 23.6 et 7.5 %) se rapprochent davantage des données HIC-UV (6.1, 25.2, 34.8, 24 et 8.3 %) [132] que celles mesurées sur le Synapt G2 (9.6, 26.7, 32.6, 21.3 et 9.9 %). Cette observation peut ici s'expliquer par le gain de résolution accessible sur l'Orbitrap, facilitant l'assignation et la quantification des signaux de m/z relativement proches.

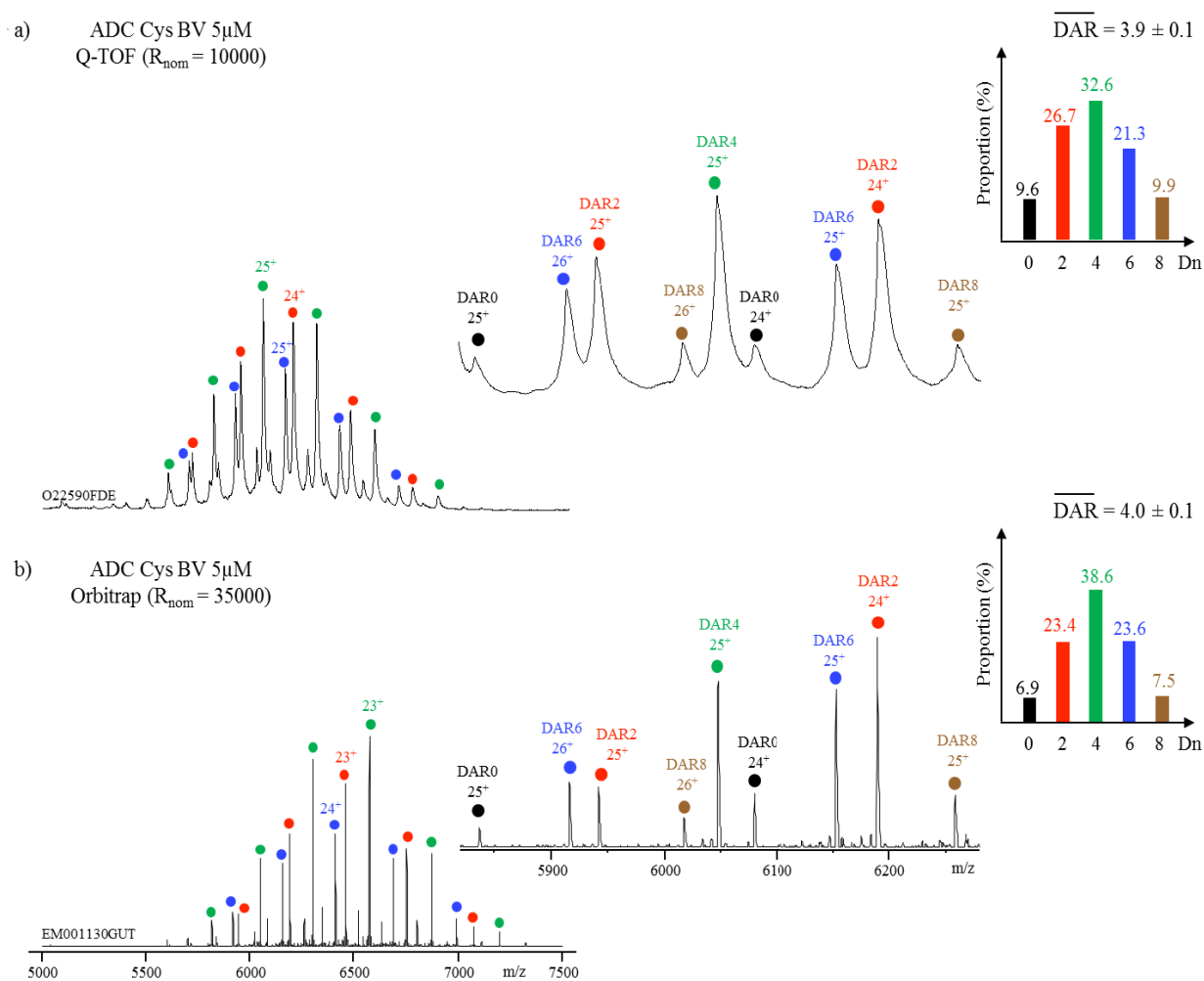


Figure 23 : Application de la haute résolution à la caractérisation de l'ADC Cys BV par MS native. Les spectres de masse obtenus en conditions natives (AcNH₄ 150mM pH7.5) à partir de l'ADC Cys BV déglycosylé (5 μ M) sur les instruments a) Synapt G2 ($V_c = 80V$, $P_i = 6mbar$) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 75 eV, CE = 0 eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-7-6 V, $P_{UH_V} = 1.1.10^{-9}$ mbar, $R_{nom} = 35000$) sont ici présentés. Un zoom sur les états de charge 25⁺ permet de comparer les performances entre ces instruments. La quantification relative des espèces Dn (états de charge 21⁺ à 29⁺) permet une détermination du DAR moyen associé à chaque acquisition (triplicats analytiques).

3.3. Utilisation de la MS native à haute résolution pour l'évaluation de nouvelles chimies de conjugaison appliquées aux ADCs Lys.

La bioconjugaison des lysines (ADC Lys) ou des cystéines (ADC Cys) d'un anticorps se distingue par son nombre de sites de conjugaison accessibles, affectant l'hétérogénéité (nombre d'espèces Dn, d'isomères de position pour chaque espèce Dn) du profil de distribution en drogues généré (Fig.24). Contrairement aux ADCs Cys (Fig.24a, BV), dont les 8 cystéines accessibles 2 à 2 circonscrivent le nombre d'espèces Dn (5) et de combinaisons (12), la présence de 40 lysines accessibles à la surface du trastuzumab élargit considérablement l'hétérogénéité de l'ADC Lys (Fig.24b, T-DM1). La fixation de 0 à 8 drogues à travers la formation de 9 espèces covalentes Dn, paires (D0, D2, D4, D6, D8) et impaires (D1, D3, D5, D7), s'accompagne d'un nombre de combinaisons supérieur à 10^{13} . Concrètement, l'introduction de Dn impairs en présence d'ADCs Lys multiplie le nombre d'espèces détectables par MS native, élevant la probabilité de superposition de certains signaux et pouvant justifier le recours à une résolution expérimentale plus importante [128].

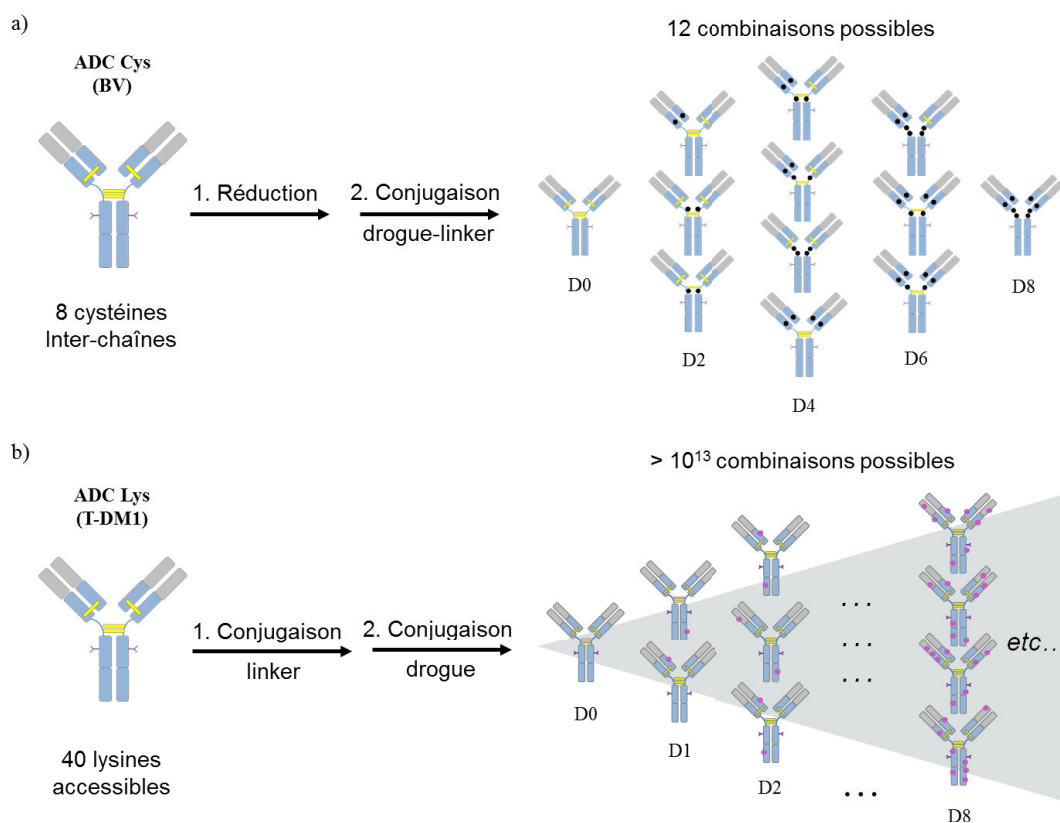


Figure 24 : Représentation schématique de l'hétérogénéité associée aux ADC a) Cys (BV) et b) Lys (T-DM1). a) Le nombre restreint de ponts disulfures inter-chaînes réductibles et conjugables (4) limite le nombre de sites de conjugaison (8) et l'hétérogénéité des espèces Dn paires ($0 \leq n \leq 8$) générées (12 combinaisons) au sein de l'ADC Cys. b) La présence de 40 lysines accessibles et conjugables à la surface de l'ADC Lys, élargit considérablement l'hétérogénéité des espèces Dn paires et impaires ($0 \leq n \leq 8$) générées (10^{13} combinaisons).

3.3.1. Apport de la haute résolution pour la caractérisation d'ADCs Lys.

Afin d'évaluer l'hétérogénéité de ces molécules et l'apport de la haute résolution pour leur caractérisation, une analyse comparative de l'ADC Lys T-DM1 déglycosylé (5 μ M) par MS native sur le Synapt G2 (Fig.25a) et l'Orbitrap Exactive Plus EMR (Fig.25b, $R_{nom} = 35000$) est ici rapportée. Contrairement aux ADCs Cys, la nature covalente des ADCs Lys permet l'application d'énergies de collision (CID et CE) et de pressions en gaz HCD plus flexibles, n'affectant pas la distribution de drogues mesurée. Une superposition préliminaire des spectres de masse obtenus sur l'ADC Lys T-DM1 (Fig.25) et l'ADC Cys BV (Fig.23) met en évidence l'accroissement d'hétérogénéité lié à la conjugaison des lysines. En l'absence d'une résolution expérimentale R_{eff} suffisante, certains états de charge associés aux différentes espèces D_n peuvent se superposer, comme en témoignent les signaux 24^+ à 26^+ mesurés sur le Q-TOF (Fig.25a, simples flèches) La résolution de ces signaux sur l'Orbitrap (Fig.25b, doubles flèches) clarifie l'identification des espèces D_n impactées, limitant les biais de quantification relative de ces espèces et du DAR moyen associé.

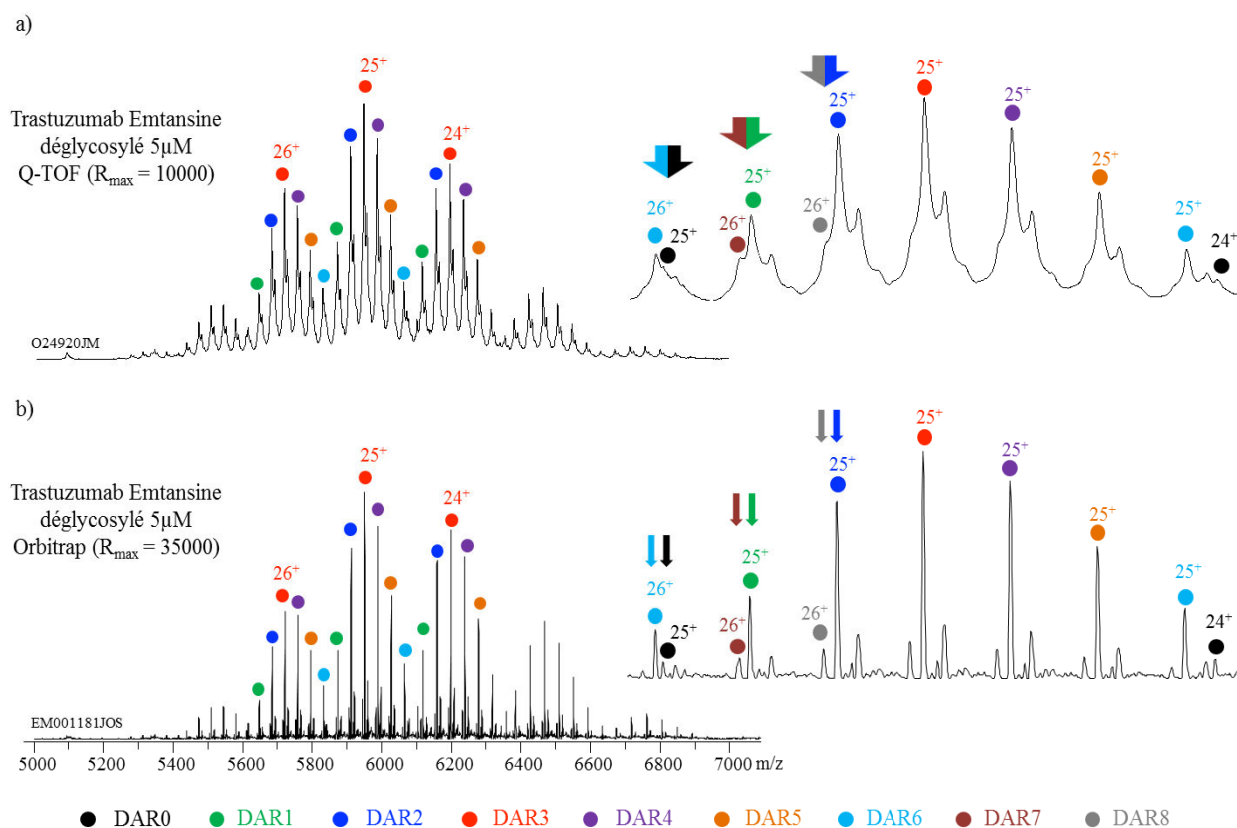


Figure 25 : Apport de la haute résolution pour la caractérisation d'ADCs Lys par MS native. Les spectres de masse générés en conditions natives (AcNH₄ 150mM pH7.5) à partir de l'ADC Lys T-DM1 (5 μ M) sur les instruments a) Synapt G2 ($V_c = 180V$, $P_i = 6mbar$) et b) Orbitrap Exactive Plus EMR (CID = 75eV, CE = 10eV, injection-inter-bent flatapôles = 8-6-7V, $P_{UH_V} = 1.1.10^{-9}$ mbar, $R_{nom} = 35000$) sont ici présentés. La superposition de signal observée sur Synapt G2 entre certaines espèces D_n , est levée sur Orbitrap Exactive Plus EMR.

3.3.2. Application de la haute résolution à l'évaluation d'un nouveau linker spécifique des cystéines du trastuzumab : le MAPN.

L'hétérogénéité de l'ADC Lys T-DM1 (Fig.24-25) peut impacter ses propriétés pharmacocinétiques, sollicitant le développement de nouvelles chimies de couplage associées à un profil de conjugaison plus homogène [138-140]. L'introduction d'un nouveau linker (MAPN, Syndivia) à chimie de couplage thiol-thiol (ADC Cys T-MAPN-DM1), constitue une alternative au linker de référence SMCC (ADC Lys T-DM1, chimie de couplage amine-thiol). Afin d'évaluer son apport, une comparaison des profils de distribution en drogues et du DAR moyen mesurés par MS native sur l'Orbitrap ($R_{nom} = 35000$) a été réalisée entre l'ADC Lys T-DM1 référent (Fig.26a) et son analogue Cys T-MAPN-DM1 (Fig.26b). Ce dernier présente un DAR moyen (3.3 ± 0.2) identique à l'ADC Lys T-DM1 commercial (3.4 ± 0.1), indispensable à l'efficacité du composé [112]. Néanmoins, le nombre restreint de cystéines conjuguables à la surface de l'anticorps réduit (4) et la différence de réactivité entre fonctions maléimides (M) et arylpropionitriles (APN) du MAPN, s'accompagnent d'un profil de distribution en drogues plus homogène, composé uniquement d'espèces D_n paires (Fig.26b). Ces propriétés étendent les perspectives d'application de ce nouveau linker dans le domaine de la bioconjugaison.

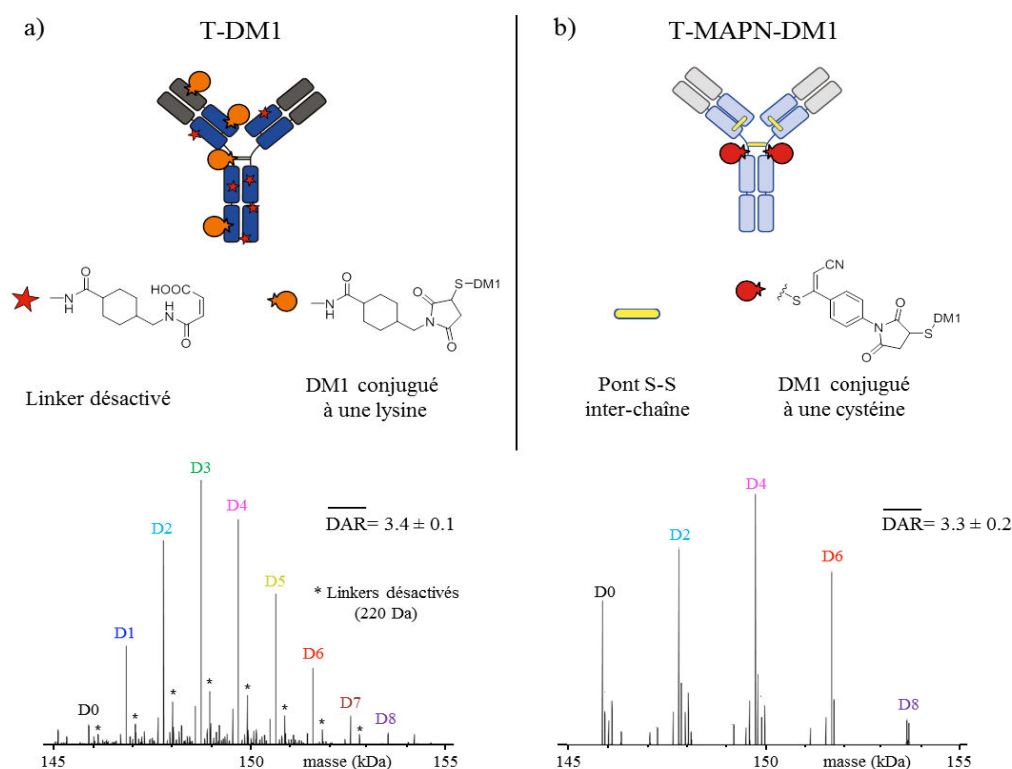


Figure 26 : Comparaison des profils de conjugaison entre l'ADC Lys T-DM1 et son analogue Cys T-MAPN-DM1. Les spectres de masse générés en conditions natives (AcNH_4 150mM pH7.5, $5\mu\text{M}$) sur l'instrument Orbitrap Exactive Plus EMR à partir a) de l'ADC Lys T-DM1 déglycosylé (CID = 75 eV, CE = 0 eV, flatapôles = 8-6-7V, $P_{UH\text{V}} = 1.1 \cdot 10^{-9}$ mbar, $R_{nom} = 35000$) et b) de l'ADC Cys T-MAPN-DM1 déglycosylé (CID = 50 eV, CE = 0 eV, flatapôles = 8-6-7V, $P_{UH\text{V}} = 1.1 \cdot 10^{-9}$ mbar, $R_{nom} = 35000$) sont présentés après déconvolution (Protein Deconvolution 3.0, Thermo Fisher Scientific). La quantification relative des espèces D_n ($20^+ \leq z \leq 28^+$) permet une détermination du DAR moyen associé à chaque linker (triplicats analytiques).

4. Conclusions.

Les performances analytiques offertes par l'Orbitrap Exactive Plus EMR rendent cet instrument particulièrement adapté à l'étude des anticorps thérapeutiques et des molécules de la même famille. Compatible avec le maintien d'interactions non-covalentes et la transmission d'ions de rapports m/z élevés, cet instrument repousse les limites de résolution expérimentale accessibles. Cet apport de résolution améliore la justesse de masse mesurée et facilite la caractérisation de mélanges hétérogènes, assurant une quantification relative plus fiable des espèces distribuées et une meilleure approximation du DAR moyen.

5. Valorisation.

L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre a fait l'objet des communications suivantes :

Publication:

Xuan Y, Debaene F, Stojko J, Beck A, Van Dorsselaer A, Cianférani S, Bromirski M. Monoclonal antibody and related product characterization under native conditions using a benchtop Exactive Plus EMR MS. *Thermo Fisher Scientific* (2014), *Application Note 597*.

Koniev O, Kolodych S, Baatarkhuu Z, Stojko J, Eberova J, Bonnefoy JY, Cianférani S, Van Dorsselaer A, Wagner A. MAPN: First-in-class reagent for kinetically resolved thiol-to-thiol conjugation. *Bioconjugate Chem.* (2015), 26, 1863-1867

Communication par affiche:

Stojko J, Debaene F, Xuan Y, Bromirski M, Van Dorsselaer A, Beck A, Cianférani S. High resolution Orbitrap native MS for mAbs and related products characterization. 9th annual European Antibody Congress (EAC), November 2013, Geneva.

Monoclonal Antibody and Related Product Characterization Under Native Conditions Using a Benchtop Mass Spectrometer

Yue Xuan¹, François Debaene², Johann Stojko², Alain Beck³, Alain Van Dorsselaer², Sarah Cianféroni² and Maciej Bromiski¹

¹Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany

²Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), University of Strasbourg, Strasbourg, France

³Centre d'Immunologie Pierre Fabre (CIPF), Saint Julien En Genevois, France

Key Words

Orbitrap native MS, extended mass range MS, monoclonal antibody (mAb), monoclonal antibody-drug-conjugate (ADC), monoclonal antibody antigen complexes (mAb/Ag)

Goal

Demonstrate the characterization of mAbs, antibody-drug conjugates (ADC), mAb/antigen (mAb/Ag) complexes, and a mixture of mAbs under their native conditions by using a high-resolution, accurate-mass (HRAM) benchtop mass spectrometer with extended mass range (EMR) in combination with a chip-based electrospray ionization interface.

Introduction

Native mass spectrometry (MS) has emerged as a valuable technique for characterization of intact noncovalent protein complexes, reaching a high level of reliability within the last ten years.¹ For the analysis of intact monoclonal antibodies (mAbs), native MS yields accurate mass measurements of the molecules, glycoform identification, and assessment of higher-order structures (dimer, trimer, tetramer), thus providing a robust, fast, and reliable first-line analytical characterization tool.^{2,3} This approach can now be applied to the routine characterization of heterogeneous therapeutic monoclonal antibodies. Native MS has gained interest not only for analysis of intact mAb, but also for analysis of antibody-drug conjugates (ADCs), bispecific mAbs, antibody-antigen complexes, and characterization of antibody mixtures. It benefits from simplified data interpretation due to the presence of fewer charge states compared to classical denaturing MS.

This application note describes the use of a new Orbitrap mass spectrometer with an extended mass range of up to m/z 20,000 and improved detection of high-mass ions for the characterization of mAbs, ADCs, mAb/Ag, and mAb mixtures under native conditions.



Figure 1. Exactive Plus EMR mass spectrometer equipped with a TriVersa NanoMate chip-based electrospray ionization interface

Experimental

Sample Preparation

The intact trastuzumab (Herceptin[®], Roche), the monoclonal antibody-drug conjugate brentuximab vedotin (ADC, Adcetris[®], Seattle Genetics), the mAb/antigen complexes of J10.4 mAb/JAM-A, and one mixture of eleven distinct IgG antibodies were introduced using the TriVersa NanoMate[®] (Advion, USA) onto the Thermo Scientific[™] Exactive[™] Plus EMR Orbitrap[™] mass spectrometer.

Brentuximab vedotin was deglycosylated using EndoS endoglycosidase (IgGZERO™, Genovis). Titration experiments involving J10.4 mAb and JAM-A were monitored by native MS in order to determine the binding stoichiometry. The fixed amount of J10.4 (5 μM) was incubated with increasing amounts (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) of JAM-A up to 40 μM. The mixture of eleven distinct deglycosylated humanized IgG antibodies included two marketed therapeutic mAbs (rituximab and trastuzumab) and nine point mutation variants of the Hz6F4-2 mAb [4, 5]. They were mixed together prior to PNGase-F deglycosylation.

Finally, all the samples were buffer exchanged against 150 mM ammonium acetate (AcONH₄) pH 7.5. Trastuzumab, deglycosylated Brentuximab vedotin, and the mAb/antigen complexes of J10.4 mAb/JAM-A were injected at 5 μM, and the deglycosylated IgG mixture was injected at 1 μM on the Exactive Plus EMR Orbitrap mass spectrometer.

Direct-Infusion Native MS Conditions

Chip-based infusion conditions

Instrumentation	TriVersa NanoMate® (Advion, USA) system
Ionization voltage (kV)	1.6–1.8
Gas pressure (psi)	0.3–0.6

The ESI Chip® consists of an array of 400 nanoelectrospray emitters with 5 μm inner diameters.

MS conditions

Instrumentation	Exactive Plus EMR Orbitrap MS system (Figure 1)
EMR mode	ON
Mass range (<i>m/z</i>)	350–20,000
Resolution	17,500 to 140,000, depending on spectral complexity
Target value	3×10^6
Microscans	10
Max injection time (ms)	300
Insource CID energy (eV)	60 to 150, manually tuned for optimized desolvation
S-lens level (%)	100 to 200, manually tuned for optimized transmission and avoiding in-source fragmentation
Injection flatapole DC (V)	8
Inter flatapole lens (V)	7
Bent flatapole DC (V)	6
C-Trap entrance lens tune offset (V) EMR	0
Trapping gas pressure setting factor	4
Spectra average	Enabled (10 to 50 scans are averaged to achieve S/N ratio of >100)

Data Processing

Software	Thermo Scientific™ Protein Deconvolution software version 2.0 SP2 and version 3.0
----------	---

Deconvolution parameters

Number of iterations	4
Noise compensation	On
Minimum adjacent charges	1 to 3

Results and Discussion

High-Resolution Native MS Analysis of Intact Monoclonal Antibody Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin®) is a humanized IgG1 mAb, approved for HER2-overexpressing breast cancer treatment since 1998. Several mechanisms of action are thought to contribute to trigger the tumor-inhibitory effect of this protein therapeutic. Among them, trastuzumab can mediate the effector functions of immune cells through its constant region (Fc) by binding to the Fc gamma receptor III (FcγRIII) and triggering antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity (ADCC).

Based on the published amino acid sequence of both the light and heavy chain of trastuzumab, the calculated mass of this protein is $C_{6560}H_{10132}O_{2090}N_{1728}S_{44} = 148,057$ Da. This calculation includes 16 disulfide bridges (–32 Da), two main glycoforms (G0F; +1445 Da), and near 99% cleavage of two heavy chain C-terminal lysines (–128 × 2 Da). Partial cyclization of one or two N-terminal glutamic acids (–18 Da) may also occur as well as methionine oxidations (+16 Da). Three Asn deamidation/Asp isomerization hot spots have also been described in the CDRs and shown to negatively impact HER2 antigen binding when degraded (Figure 2A).

Trastuzumab was analyzed on the Exactive Plus EMR MS with resolution set at both 17,500 and 35,000. The deconvoluted mass spectrum calculated using Protein Deconvolution software version 2.0 SP2 represents the classical glycosylation pattern of a mAb with baseline-resolved glycan peaks. Figure 2B shows the complete mass spectrum at resolution of 35,000 and a zoom of the corresponding 23⁺ charge state of trastuzumab acquired with the resolution set at both 17,500 and 35,000 in native conditions. Compared to the raw spectrum acquired at 17,500 resolution, an interference peak can be resolved by using a resolution of 35,000 or higher. The high resolution can resolve the analyte from the interferences, therefore, ensuring the low ppm mass accuracy. Molecular weights of each trastuzumab glycoform were measured with good mass accuracy in the low ppm range, as shown in Figure 2C. The mass differences between species are +146 Da and +162 Da, corresponding to a fucose or to the addition of multiple hexose units, respectively.

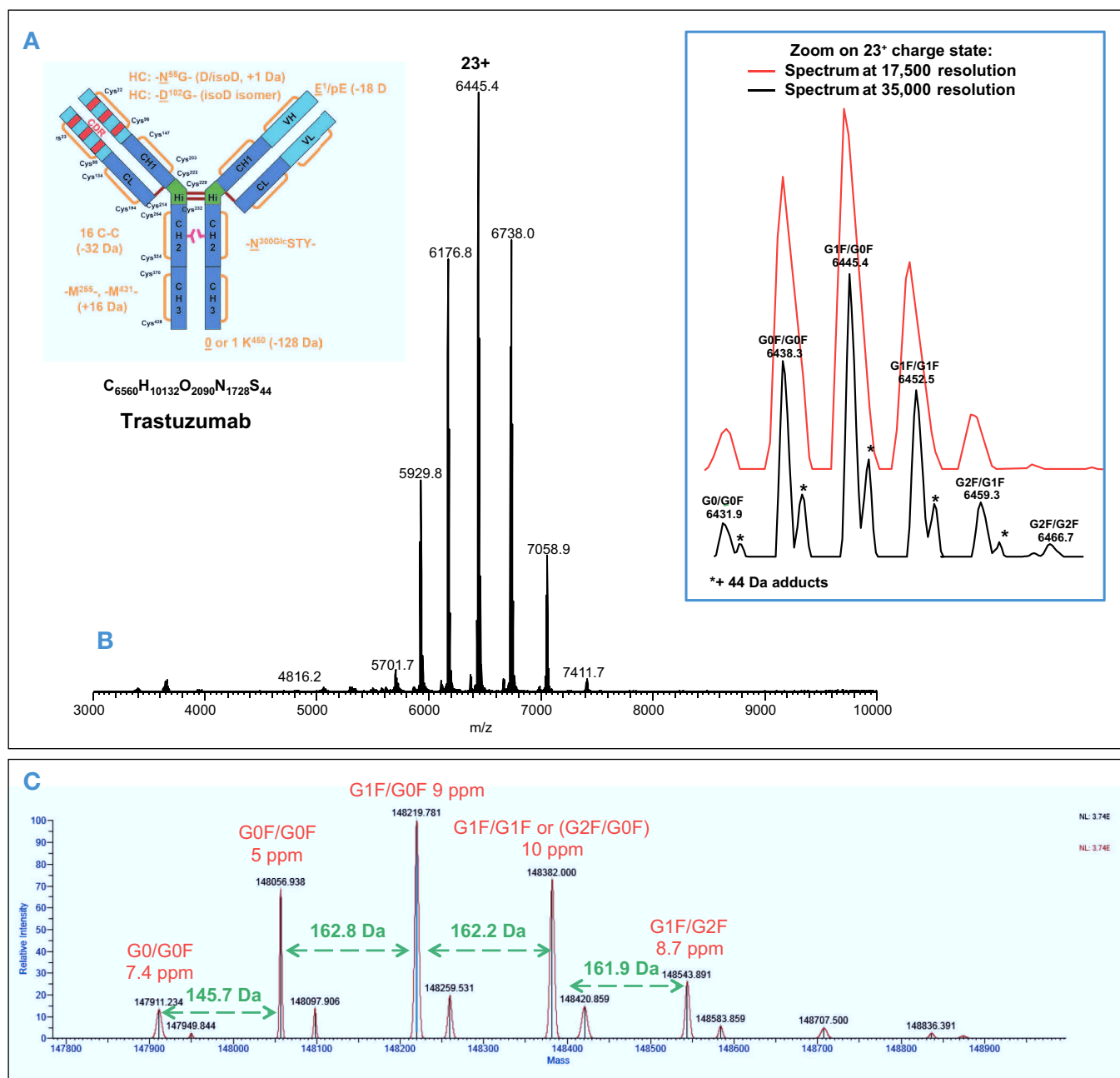


Figure 2. Orbitrap native MS detection of intact monoclonal antibody trastuzumab. A. Intact mAb trastuzumab. B. High-resolution, native MS showing complete mass spectrum and zoom of corresponding 23⁺ charge state. C. Deconvoluted spectrum showing molecular weights of each trastuzumab glycoform with low ppm mass accuracy.

Orbitrap Native MS Analysis of a Monoclonal Antibody-Drug-Conjugate (ADC) Brentuximab Vedotin

Antibody-drug conjugates (ADCs) are an increasingly important modality for treating several types of cancer. The impact of ADCs in this field is due to the exquisite specificity of antibodies that deliver the conjugated cytotoxic agent to targeted tumor cells preferentially, thus reducing the systemic toxicity associated with traditional chemotherapeutic treatments. ADCs are differentiable on the basis of the drug, linker, and also the amino acid residue of attachment on the antibody. Recently, two ADCs were approved by the FDA (Adcetris[®], brentuximab vedotin, and Kadcyla[®], trastuzumab emtansine) and 35 more are being investigated in clinical trials.

The brentuximab vedotin mass spectrum was recorded at a resolution of 35,000 and in-source CID voltage was set to 75 eV. Figure 3A shows the native deconvoluted mass spectrum of the deglycosylated ADC. Populations with zero (grey), two (black), four (blue), six (red), and eight (green) molecules loaded onto the antibody (payloads) were detected with a mass difference between peaks corresponding to the addition of two payloads (+2,634 Da). The drug loading clearly increases in steps of two, which corresponds to binding of one payload to the two accessible cysteine amino acids after disulfide bridge reduction. For each set of peaks, the drug-to-antibody ratio (DAR) can be determined. Relative ratios of each detected compound were determined using MS peak intensities and served to estimate the mean DAR (4.2), which is in agreement with hydrophobic chromatography data (data not shown). Figure 3B shows the corresponding raw mass spectrum with the entire charge state distribution of brentuximab vedotin under native conditions.

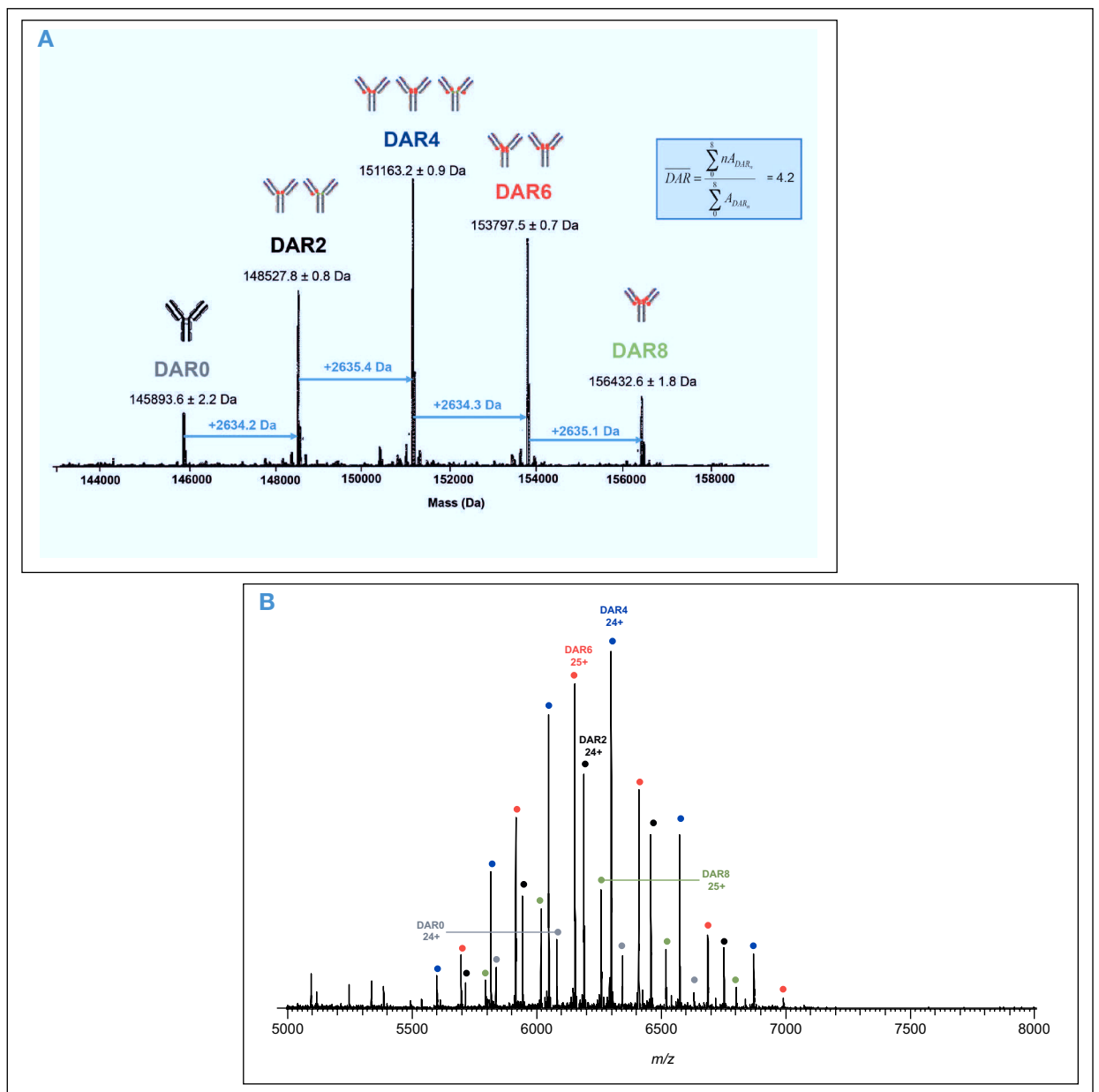


Figure 3. Orbitrap Native MS analysis of a monoclonal Antibody-Drug-Conjugate (ADC). A. Native deconvoluted mass spectrum showing the determination of drug-to-antibody ratio (DAR). B. Raw mass spectrum with the entire charge state distribution of ADC under native conditions.

Orbitrap Native MS Analysis of Immune mAb/Antigen Complexes

Native MS can also be used to analyze mAb/antigen (mAb/Ag) complexes, providing additional information including mAb/antigen binding stoichiometries, specificities and affinities.⁴ These properties are essential for originator and biosimilar candidates comparison studies. ESI-MS presents the advantage to allow the direct observation of noncovalent immune complexes without any chemical modification. J10.4 is a commercial mouse monoclonal IgG1 raised against recombinant JAM fusion protein of human origin that is recommended for detection of JAM-A by western blotting and immunopurification techniques. JAM-A, used here as antigen, is a single transmembrane protein belonging to the immunoglobulin superfamily. JAM-A localizes in tight junctions in normal epithelial and endothelial cells where homophilic JAM-A interactions have been shown to be important for regulation of epithelial barrier function.^{4,5} This newly identified target is over-expressed in many tumor tissues and therefore is of prime

interest as a target in oncology. Two JAM-A molecules are expected to bind to one J10.4 mAb.

The native mass spectrum of mAb/antigen complexes was recorded at a resolution of 35,000 with the in-source CID voltage set to 150 eV. As shown in Figure 4A, when an 4-fold excess of JAM-A (20 μ M) is added to J10.4 mAb (5 μ M), three species are detected: the intact free mAb (MW 150237.1 ± 1.1 Da, black), 1:1 (MW 174304.4 ± 2.0 Da, blue) and 1:2 (MW 198369.6 ± 2.3 Da, red) mAb:JAM-A complexes. Native MS thus confirmed that two JAM-A molecules can bind to J10.4 mAb. MWs correspond to the main G0F/G0F glycoforms. Relative abundances were estimated from MS peak intensities and proportions of mAb:Ag complexes at 1:1 and 1:2 stoichiometries were observed to be 37% and 30%, respectively, while free mAb represents 33%. Figure 4B shows the corresponding mass spectrum with the entire charge state distribution in native conditions.

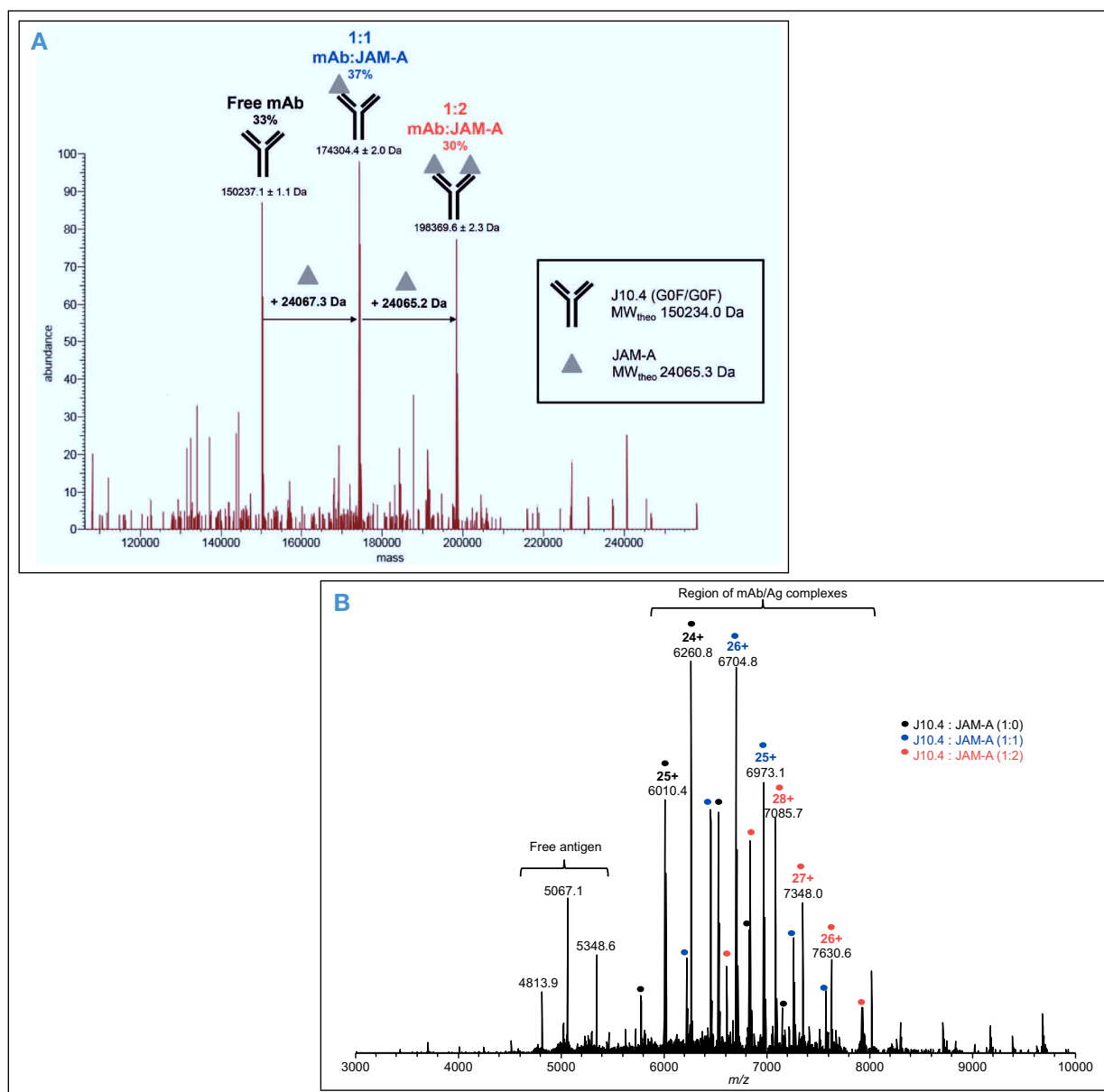


Figure 4. Orbitrap native MS detection of immune mAb/antigen complexes. A. Deconvoluted mass spectrum showing mAb/antigen binding stoichiometries. B. Charge state distribution in native conditions.

Native MS Analysis of a Mixture of Eleven N-deglycosylated Humanized Antibodies

Analysis of mAb mixtures is of utmost interest for high-throughput screening purposes and for therapeutic use to block simultaneously multiple epitopes. Indeed cocktails of mAbs with additive or synergic effects are increasingly foreseen as potential new therapeutic entities.

Figure 5A presents a convoluted mass spectrum of a mixture of eleven distinct deglycosylated humanized IgG antibodies. This mix includes two marketed therapeutic mAbs (rituximab and trastuzumab) and nine point mutation variants of the Hz6F4-2 mAb.^{4,5} Figure 5B shows a full native mass spectrum of the mAb mix with an in-source CID energy set to 100 eV.

The well-resolved ion signals at a detection resolution of 140,000 and accurately measured masses enable the unambiguous assignment of ten out of the eleven compounds. Trastuzumab and Hz6F4-2v6 could not be differentiated due to very close molecular weights (2 Da). Peaks corresponding to Hz6F4-2 and Hz6F4-2v3, which differ by only 21 Da in mass, are clearly distinguished on the mass spectrum. However, they are not baseline resolved, and when combined with the low signal-to-noise (S/N) ratio ($S/N < 20$), that causes a relatively low mass accuracy for Hz6F4-2. However, with a good signal-to-noise ratio ($S/N > 50$), even without baseline-resolved peaks, for example, peaks of Hz6F4-2v9 and 6F4-2v10, the mass accuracies are achieved in the low ppm range for both species. The measured and theoretical masses for the mixture of eleven N-deglycosylated humanized antibodies are listed in Table 1.

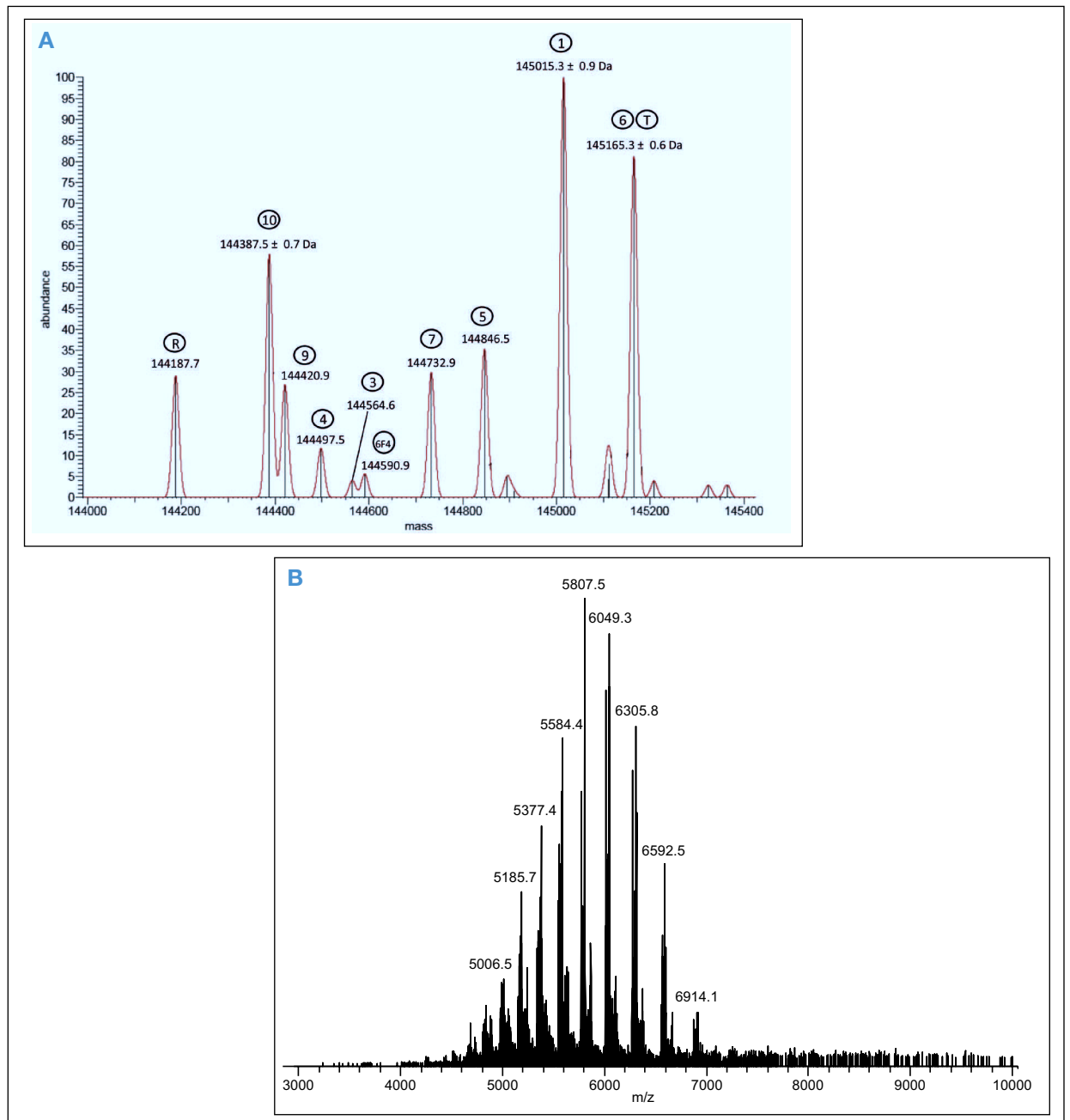


Figure 5. Native MS analysis of a mixture of eleven N-deglycosylated humanized antibodies. A. Deconvoluted mass spectrum. B. Charge state distribution in native conditions.

Table 1. Measured and theoretical masses for the mixture of eleven N-deglycosylated humanized antibodies at an Orbitrap detection resolution of 140,000

	Species	Theoretical Masses (Da)	Measured Masses (Da)	Mass Accuracy (ppm)
R	Rituximab	144186.3	144187.7	9.7
10	6F4-2 v10	144388.3	144387.5	5.5
9	6F4-2 v9	144420.5	144420.9	2.8
4	6F4-2 v 4	144498.4	144497.5	6.2
3	6F4-2 v3	144564.4	144564.6	1.4
6F4	6F4-2	144585.5	144590.9	37.3
7	6F4-2 v7	144732.5	144732.9	2.8
5	6F4-2 v5	144846.9	144846.5	2.8
1	6F4-2 v1	145015.3	145015.3	0
6	6F4-2 v6	145163.3	N.D	N.D
T	Trastuzumab	145165.5	145165.3	1.4

Conclusion

In the analysis (0.3–5 min) using the Exactive Plus EMR MS, molecular weight measurements of mAb and related products in the low ppm mass deviation range allowed the identification of all species simultaneously present in solution. The number of DAR and relative abundance of mAb/Ag complexes was also assessed with the peaks intensities serving for relative quantification of the detected species.

- The high resolving power of the Orbitrap mass analyzer can baseline resolve a native mAb's glycan peaks, as well as the interference peaks, ensuring an excellent mass accuracy in the low ppm range.
- The Exactive Plus EMR MS is able to sensitively characterize ADC complexes with mass differences between peaks corresponding to different additional number of payloads/drugs. For each set of peaks, the drug-to-antibody ratio (DAR) can be determined as well as the relative ratio of each detected compound in order to assess the mean DAR value.
- Native Orbitrap MS can reveal the number of antigens bound to mAbs. Relative abundances of mAb/Ag complexes at different stoichiometries can be achieved from MS peak intensities.
- The Exactive Plus EMR MS enables the high throughput screening of mAb mixtures, ensuring an excellent mass accuracy for each individual mAb.

Acknowledgements

This work was in part supported by the OptimAbs network bioclusters (LyonBiopole and Alsace Biovalley) and sponsors (DGCIS, Oséo, Feder, Régions Rhône- Alpes and Alsace, Communauté Urbaine de Strasbourg, CNRS, University of Strasbourg).

References

1. Heck, A. J. *Nat. Methods* 2008, 5, 927-933.
2. Beck, A. *et al.*, *TrAC* 2013, 48, 81-95.
3. Beck, A. *et al.*, *Anal. Chem.* 2013, 85, 715-36.
4. Atmanene, C. *et al.*, *Anal Chem* 2009, 81, 6364-73.
5. Debaene, F. *et al.*, *Anal Chem* 2013, 85, 9785-92.

www.thermoscientific.com

©2014 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. ISO is a trademark of the International Standards Organization. NanoMate and ESI Chip are registered trademarks of Advion, Inc. Herceptin and Kadcyca are registered trademarks of Genentech, Inc. Adcetris is a registered trademark of Seattle Genetics, Inc. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries. This information is presented as an example of the capabilities of Thermo Fisher Scientific products. It is not intended to encourage use of these products in any manners that might infringe the intellectual property rights of others. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.



Thermo Fisher Scientific,
San Jose, CA USA is
ISO 9001:2008 Certified.

Africa +43 1 333 50 34 0	Denmark +45 70 23 62 60	Japan +81 45 453 9100	Singapore +65 6289 1190
Australia +61 3 9757 4300	Europe-Other +43 1 333 50 34 0	Latin America +1 561 688 8700	Spain +34 914 845 965
Austria +43 810 282 206	Finland +358 9 3291 0200	Middle East +43 1 333 50 34 0	Sweden +46 8 556 468 00
Belgium +32 53 73 42 41	France +33 1 60 92 48 00	Netherlands +31 76 579 55 55	Switzerland +41 61 716 77 00
Canada +1 800 530 8447	Germany +49 6103 408 1014	New Zealand +64 9 980 6700	UK +44 1442 233555
China 800 810 5118 (free call domestic) 400 650 5118	India +91 22 6742 9494	Norway +46 8 556 468 00	USA +1 800 532 4752
	Italy +39 02 950 591	Russia/CIS +43 1 333 50 34 0	

Thermo

SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific

MAPN: First-in-Class Reagent for Kinetically Resolved Thiol-to-Thiol Conjugation

Oleksandr Koniev,^{#,†,§} Sergii Kolodych,^{#,†,§} Zoljargal Baatarkhuu,[†] Johann Stojko,^{‡,⊥} Jitka Eberova,[†] Jean-Yves Bonnefoy,[§] Sarah Cianfèrani,^{‡,⊥} Alain Van Dorsseleer,^{‡,⊥} and Alain Wagner^{*,†}

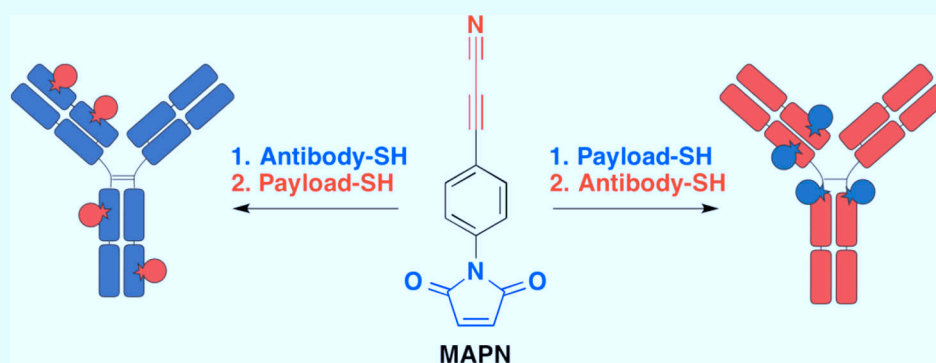
[†]Laboratory of Functional ChemoSystems (UMR 7199), Labex Medalis, University of Strasbourg, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch-Graffenstaden, France

[§]Syndivia SAS, 4 Rue Boussingault, 67000 Strasbourg, France

[‡]BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, University of Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

[⊥]IPHC, CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

S Supporting Information



ABSTRACT: Thiols are among the most frequently used functional groups in the field of bioconjugation. While there exists a variety of heterobifunctional reagents that allow for coupling thiols to other functions (e.g., amines, carboxylic acids), there is no specific reagent for creating heteroconjugates using two different thiols. In response to the ever-increasing demand for bioconjugation tools, we have developed *p*-(maleimide)-phenylpropionitrile (MAPN)—an efficient reagent for kinetically resolved thiol-to-thiol coupling. In a comparative study with its closest commercially available analogue, *p*-phenylenedimaleimide, MAPN has shown substantial advantages for the preparation of thiol–thiol heteroconjugates. Namely, an antibody–drug conjugate (ADC) with mertansine (DM1), conjugated to the cysteine residues of Trastuzumab, was prepared for the first time.

INTRODUCTION

Heterobifunctional reagents are comprehensively applied in biological research for linking biological molecules to the functional entities of interest.^{1,2} Among the functional groups used for coupling, sulfhydryl groups are of paramount importance³ for three primary reasons. First, their high nucleophilicity allows for specific reactions with many reactive electrophiles.⁴ Second, these groups have low abundance⁵ but omnipresence in biological molecules, which allows for the preparation of well-defined bioconjugates. Free sulfhydryl functions on proteins can for instance be obtained through the reduction of disulfide bonds,⁶ naturally present in most proteins, or introduced via lysine modification with SATA⁷ or Traut's reagent.⁸ Third, many molecular tags (dyes, linkers, drugs, DNA, RNA, tracers, lipids) are available as sulfhydryl derivatives. Therefore, thiol-to-thiol coupling appears as a highway for the preparation of bioconjugates.

Most commonly, two thiols are coupled through the formation of disulfide bonds.⁹ While this strategy is widely applied, it has some significant drawbacks, which limits the

scope of its application. The drawbacks include the instability of the conjugate in reducing media and in exchange with other thiols.¹⁰ The stability issue is, for instance, of crucial importance in the development of antibody–drug conjugates (ADC), since the extremely potent cytotoxic payload conjugated to the antibody should not be lost before the ADC reaches the target cell. In order to create a stable bond, thiol-containing drugs such as mertansine are usually conjugated to the lysine residues of the antibody, using amine-to-thiol heterobifunctional coupling reagents such as SMCC¹¹ or CBTF.¹² However, these conjugation strategies provide highly heterogeneous ADCs, due to the presence of more than 60 lysine residues in the antibody backbone.

One successful way to decrease heterogeneity is through the cysteine modification, using the reduction-alkylation strategy. Indeed, IgG1 antibodies contain only four solvent-exposed

Received: January 29, 2015

Revised: August 29, 2015

Published: September 3, 2015

Scheme 1. Synthesis of MAPN

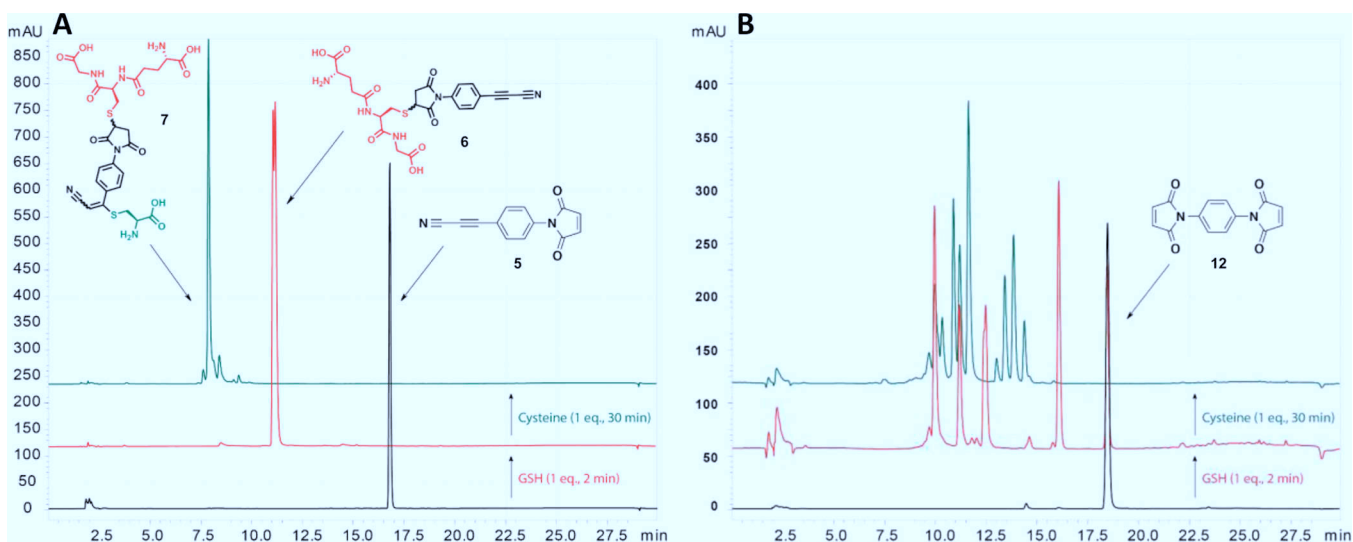
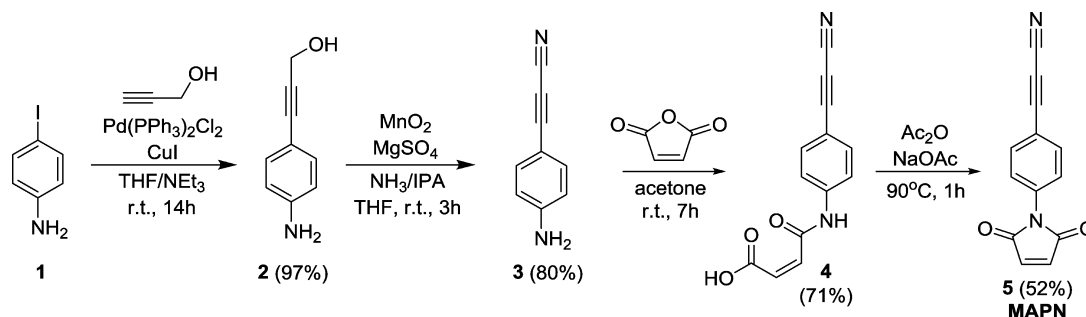


Figure 1. Heteroconjugation of glutathione and cysteine using MAPN (A) and *p*-phenylenedimaleimide (B). HPLC traces of MAPN and *p*-phenylenedimaleimide prior to conjugation are indicated in black; HPLC traces after 2 min of incubation of the reagents with glutathione are indicated in red; HPLC traces after a subsequent 30 min of incubation with cysteine are shown in green.

interchain disulfide bonds that can be reduced in order to yield free thiol residues. Selective alkylation of these nucleophilic residues was shown to yield a much cleaner mixture of conjugate. It therefore seems appealing to combine this reduction-alkylation strategy with a thiol-to-thiol heterocoupling reagent in order to access well-defined conjugates using readily available sulfhydryl molecules.

Herein, we describe the development and application of *p*-(maleimide)-phenylpropionitrile (MAPN, 5), a ready-to-use reagent that allows for the covalent heterocoupling of two thiol-containing entities. MAPN contains two thiol-specific reactive groups, an APN¹³ and a maleimide, exhibiting distinctive reaction rates. This feature allows for the selective formation of monoadduct upon coupling of the more reactive group with the first thiol, leaving the second reactive group intact for the subsequent reaction with the second thiol.

RESULTS AND DISCUSSION

Recently, we described a 3-arylpropionitrile (APN) group as an efficient reactive function for the selective and irreversible labeling of thiols.¹³ Given the at least 10-fold higher reaction rate of maleimide ($k > 50 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) compared to APN ($k = 3.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), we hypothesized that combining these two functions into a heterobifunctional reagent will allow for kinetically resolved thiol-to-thiol coupling.

We synthesized MAPN 5 with a 29% overall yield from 4-iodoaniline 1 in a four-step reaction sequence (Scheme 1).

Briefly, 4-iodoaniline reacted with propargylic alcohol under standard Sonogashira coupling conditions to yield intermediate 2, which was oxidized with MnO_2 in the presence of ammonia to form 3-(4-aminophenyl)propanenitrile 3.¹⁴ This intermediate reacted with maleic anhydride to yield product 4. Finally, MAPN was obtained by dehydrative cyclization of 5 in the presence of acetic anhydride and sodium acetate.

In order to confirm the applicability of MAPN for thiol-to-thiol heterocoupling, we carried out a reaction between two model substrates: glutathione and cysteine. The reaction was conducted in PBS/DMSO (9:1, pH 7.4) in a sequential manner (Figure 1A). First, 1 equiv of MAPN 5 was added to 1 equiv of the reduced glutathione (1 mM solution). After 2 min of incubation at 25 °C, HPLC analysis showed full conversion into the single adduct 6. To the resulting solution, we added 1 equiv of cysteine and incubated the mixture for 30 min to allow for clean formation of the glutathione-cysteine adduct 7. Compounds 6 and 7 were isolated and characterized in order to confirm the order of thiol addition to the maleimide and APN functions. A side-by-side comparison with the closest commercially available thiol-to-thiol coupling reagent, *p*-phenylenedimaleimide, was carried out under the same conditions (Figure 1B). As expected, following the addition of 1 equiv of glutathione, *p*-phenylenedimaleimide yielded a mixture with four main products: the adduct, the homocoupling product, the hydrolysis product, and the starting compound.

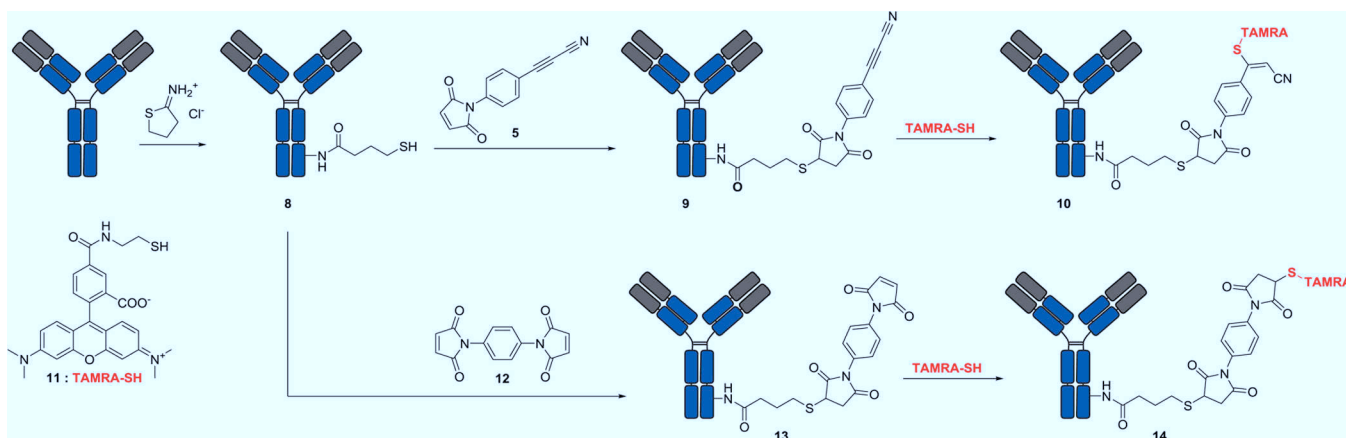


Figure 2. Conjugation of the antibody with TAMRA-SH using MAPN and *p*-phenylenedimaleimide.

Subsequent addition of 1 equiv of cysteine resulted in a highly complex mixture.

Encouraged by these results, we decided to test the MAPN reagent in the heterocoupling of a biomolecule and a fluorescent tag (Figure 2). Again, a side-by-side comparison with *p*-phenylenedimaleimide was carried out in the coupling of the Trastuzumab with a thiol-containing fluorophore 11.

Trastuzumab was first reacted with 10 equiv of Traut's reagent to form the modified antibody 8 with a number of solvent-exposed thiol groups. The resulting conjugate was incubated with 10 equiv of either MAPN or *p*-phenylenedimaleimide yielding conjugates 9 and 13, respectively. After 1 h of incubation at 25 °C, 10 equiv of TAMRA-SH 11 was added to the mixtures. Following overnight incubation, the mixtures were purified by size-exclusion chromatography.

The resulting conjugates 10 and 14 were analyzed by SDS-PAGE (Figure 3). Gel fluorescence showed that MAPN (lane 6) allowed for the fluorescent labeling of the antibody, in contrast to *p*-phenylenedimaleimide (lane 4). We hypothesized that the lack of antibody labeling in the case of *p*-phenylenedimaleimide 5 was due to the lower hydrolytic stability of maleimides, compared to APN. To verify this hypothesis, we prepared the *p*-phenylenedimaleimide-glutathione monoadduct 12a and the MAPN-glutathione monoadduct 6 and tested their stability in PBS. Indeed, the maleimide function of 12a underwent 50% hydrolysis in PBS (pH 7.4) within 1 h, yielding the unreactive maleic acid derivative (Supporting Information Figure S1). The APN function of 6 remained stable in the PBS solution for 24 h.

We performed a series of control experiments to confirm the absence of false positives that might be related to an unspecific conjugation process. Thus, the unmodified antibody was incubated with TAMRA-SH and showed no formation of the antibody–fluorophore conjugate (lane 1), nor was formation of the conjugate observed upon incubation of the activated antibody 8 with TAMRA-SH (lane 2). The unmodified antibody was also incubated with MAPN and *p*-phenylenedimaleimide 11 (lanes 3 and 4), followed by reaction with TAMRA-SH. In this case, gel fluorescence did not reveal any unspecific conjugation product.

To further demonstrate the utility of the MAPN reagent, we carried out the preparation of an ADC by coupling mertansine (DM1) to Trastuzumab via a reduction-alkylation strategy. In the commercial ADC (T-DM1, trade name: Kadcyla), mertansine is conjugated to lysine residues using SMCC

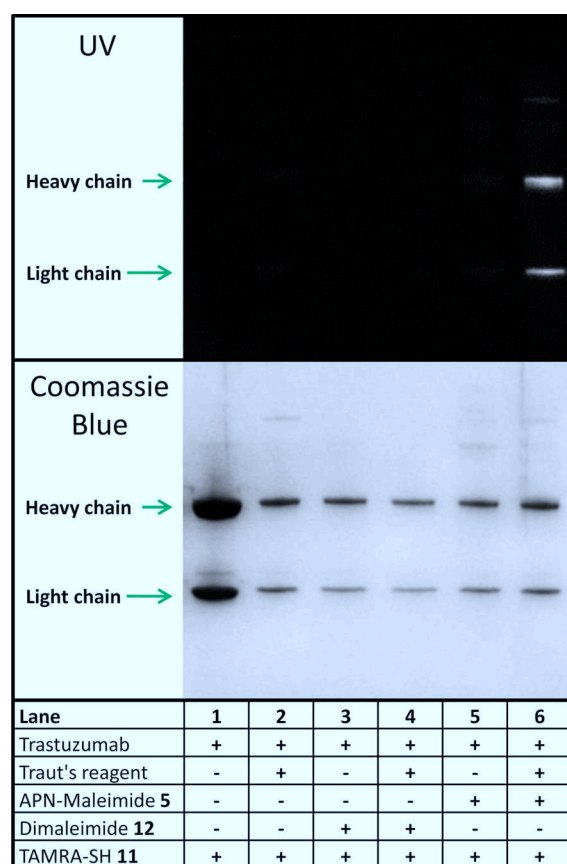


Figure 3. SDS-PAGE analysis of antibody–dye conjugates. Control experiments were carried out on the unmodified antibody without the use of a bifunctional reagent (lane 1), with the addition of 12 (lane 3) and 5 (lane 5). The activated antibody was reacted with TAMRA-SH directly (lane 2) as a negative control. The reaction of the activated antibody with 12 and then 11 (lane 4) yielded no fluorescent labeling. Reaction of the activated antibody with MAPN and then 11 (lane 6) allowed for efficient fluorescent labeling.

reagent. Random conjugation to nearly 30 surface-exposed lysines provides a highly heterogeneous mixture of different coupling species. In contrast, the reduction-alkylation strategy offered only eight attachment points. This strategy resulted in more defined ADCs with a narrower distribution of species and with mostly even drug-to-antibody ratios (Figure 4).

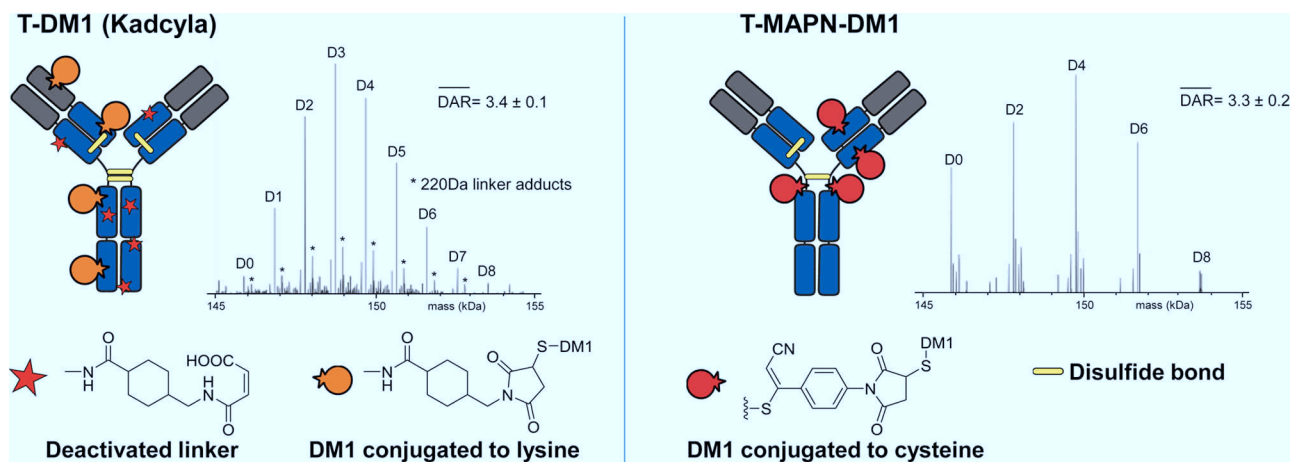


Figure 4. Representative structures and MS spectra of T-DM1 (Kadcyla) and T-MAPN-DM1.

T-MAPN-DM1 was prepared via a two-step process. First, mertansine was reacted with 1 equiv of MAPN to yield the thiol reactive payload. The payload was conjugated to the partially reduced antibody by incubating the components in the PBS buffer. The conjugate was purified by size exclusion chromatography and the average DAR was determined by native ESI-TOF-MS. T-MAPN-DM1 was shown to have the average DAR of 3.3 ± 0.2 , which was comparable with the average DAR of 3.4 ± 0.1 measured for T-DM1.

Finally, *in vitro* cytotoxicity of the T-MAPN-DM1 conjugate was evaluated on SK-BR-3 (HER2⁺⁺⁺) and MDA-MB-231 (HER2⁻) cells. Similar to T-DM1, the new conjugate showed high toxicity on HER2 positive cells and significantly lower toxicity on HER2 negative cells (Figure 5).

CONCLUSION

In conclusion, we developed MAPN—a first-in-class reagent for the efficient kinetically resolved coupling of thiols. The reagent was applied for conjugation of a thiol-activated antibody and a thiol-containing fluorophore. A side-by-side

comparison with its closest commercial analog showed superior efficiency on the part of MAPN for bioconjugation applications. The MAPN reagent was further applied to conjugate mertansine and the cysteine residues of Trastuzumab, providing a more homogeneous analog of Trastuzumab emtansine (T-DM1). Considering the vast use of thiol groups in biological research, we believe that this reagent will be of great utility in the area of bioconjugation. Through an agreement with Syndivia, MAPN is now commercially available.¹⁵

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00440.

Materials and instrumentation, experimental procedures, analytical data (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: alwag@unistra.fr.

Author Contributions

#Oleksandr Koniev and Sergii Kolodych contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by SATT Conectus “BioReLiable” project, CNRS, University of Strasbourg, Région Alsace, and GIS IBiSA. The International Center for Frontier Research in Chemistry (icFRC) is also acknowledged for financial support. J.S. acknowledges the Institut de Recherche Servier for funding of his PhD fellowship.

REFERENCES

- Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques*, 1996.
- Koniev, O., and Wagner, A. (2015) Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5495–5551.
- Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L., Lin, Y. A., and Davis, B. G. (2009) Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem. - Asian J.* 4, 630–40.

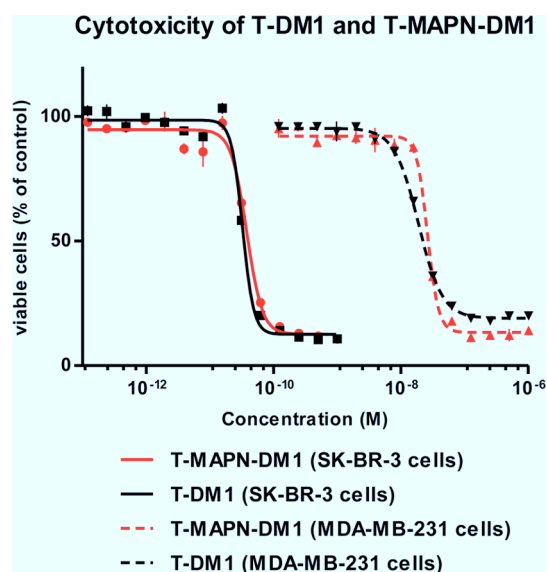


Figure 5. *In vitro* evaluation of T-DM1 and T-MAPN-DM1 on HER2 positive cell line (SK-BR-3) and HER2 negative cell line (MDA-MB-231).

- (4) Brotzel, F., and Mayr, H. (2007) Nucleophilicities of amino acids and peptides. *Org. Biomol. Chem.* 5, 3814–20.
- (5) McCaldon, P., and Argos, P. (1988) Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 4, 99–122.
- (6) Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J., and Whitesides, G. M. (1991) Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.* 56, 2648–2650.
- (7) Duncan, R. J. S., Weston, P. D., and Wigglesworth, R. (1983) A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Anal. Biochem.* 132, 68–73.
- (8) Traut, R. R., Bollen, A., Sun, T.-T., Hershey, J. W. B., Sundberg, J., and Pierce, L. R. (1973) Methyl 4-mercaptobutyrimidate as a cleavable crosslinking reagent and its application to the Escherichia coli 30S ribosome. *Biochemistry* 12, 3266–3273.
- (9) Witt, D. (2008) Recent Developments in Disulfide Bond Formation. *Synthesis* 2008, 2491–2509.
- (10) Fava, A., Iliceto, A., and Camera, E. (1957) Kinetics of the Thiol-Disulfide Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 833–838.
- (11) Yoshitake, S., Yamada, Y., Ishikawa, E., and Masseyeff, R. (1979) Conjugation of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* and Rabbit Antibodies Using N-Hydroxysuccinimide Ester of N-(4-Carboxycyclohexylmethyl)-Maleimide. *Eur. J. Biochem.* 101, 395–399.
- (12) Kolodych, S., Koniev, O., Baatarkhuu, Z., Bonnefoy, J.-Y., Debaene, F., Cianférani, S., Van Dorsselaer, A., and Wagner, A. (2015) CBTF: New Amine-to-Thiol Coupling Reagent for Preparation of Antibody Conjugates with Increased Plasma Stability. *Bioconjugate Chem.* 26, 197–200.
- (13) Koniev, O., Leriche, G., Nothisen, M., Remy, J.-S., Strub, J.-M., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Baati, R., and Wagner, A. (2014) Selective irreversible chemical tagging of cysteine with 3-arylpropionitriles. *Bioconjugate Chem.* 25, 202–6.
- (14) McAllister, G. D., Wilfred, C. D., and Taylor, R. J. (2002) Tandem Oxidation Processes: The Direct Conversion of Activated Alcohols into Nitriles. *Synlett*, 1291–1292.
- (15) <http://syndivia.com/>.

Conclusion de cette partie

Le développement et l'optimisation permanente des instruments de MS native ont progressivement permis l'étude de systèmes protéiques de masse et complexité croissantes. Leur préservation sous forme intacte en phase gazeuse et la transmission de leurs ions de hauts rapports m/z , rendent à ce jour possible la caractérisation d'édifices non-covalents supérieurs à 10 MDa [39]. Néanmoins, les défis analytiques actuels nécessitent également de disposer d'une résolution expérimentale avancée dans ces gammes de m/z . Cette exigence, constituant une limitation aux principaux instruments Q-TOF disponibles, a favorisé l'émergence de nouvelles interfaces. En 2013, l'introduction d'un instrument à analyseur Orbitrap dédié à l'étude de complexes non-covalents par MS native a permis d'étendre ce potentiel. Les développements méthodologiques réalisés au cours de ces travaux sur l'Orbitrap Exactive Plus EMR démontrent l'apport de cet outil en MS native. Les performances de transmission et de résolution expérimentale offertes par cet instrument assurent une caractérisation plus fine de la masse et de l'hétérogénéité des complexes non-covalents étudiés, préservés au sein de l'interface. L'application de cet outil à l'étude des anticorps monoclonaux et des immunoconjugués se révèle particulièrement prometteuse. L'analyse de ces agents thérapeutiques complexes par MS native à haute résolution permet une détermination approfondie de leur microhétérogénéité et de leur profil de distribution en drogues. Ces performances assurent une quantification relative plus précise de ces espèces en mélange et de la valeur de DAR moyen, indispensables à l'évaluation de ces composés [128].

Malgré ces avantages, la mise en évidence d'une transmission non linéaire des ions sur une gamme de m/z étendue, limite l'application de cette approche à l'étude de mélanges à large distribution de m/z . Par ailleurs, l'incapacité de régulation de la pression au sein de la première zone d'interface (bloc S-Lens) restreint l'analyse de complexes non-covalents labiles, maintenus par effet hydrophobe. Ces limitations démontrent la complémentarité de l'Orbitrap Exactive Plus EMR aux instruments de type Q-TOF, et nécessiteront une évaluation approfondie. Pour conclure, la différence de résolution expérimentale R_{eff} entre ces interfaces, davantage reliée à la capacité de désolvatation des ions qu'à la résolution nominale R_{nom} de l'analyseur, tend progressivement à s'estomper [43]. L'optimisation des performances de désolvatation des principaux instruments à analyseurs TOF et Q-TOF utilisés en MS native, constitue une alternative en cours d'application [39, 127].

Références bibliographiques

1. Katta, V. and B.T. Chait, *Observation of the heme-globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(22): p. 8534-8535.
2. Ganem, B., Y.T. Li, and J.D. Henion, *Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(16): p. 6294-6296.
3. Light-Wahl, K., et al., *Observation of a small oligonucleotide duplex by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(2): p. 803-804.
4. Rosu, F., et al., *Triplex and quadruplex DNA structures studied by electrospray mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002. **16**(18): p. 1729-1736.
5. Gale, D.C., et al., *Observation of duplex DNA-drug noncovalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(13): p. 6027-6028.
6. Hofstadler, S.A., et al., *Multiplexed screening of neutral mass-tagged RNA targets against ligand libraries with electrospray ionization FTICR MS: a paradigm for high-throughput affinity screening*. Analytical chemistry, 1999. **71**(16): p. 3436-3440.
7. Loo, J.A., *Observation of large subunit protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 1995. **30**(1): p. 180-183.
8. Tito, M.A., et al., *Electrospray time-of-flight mass spectrometry of the intact MS2 virus capsid*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(14): p. 3550-3551.
9. Rostom, A.A. and C.V. Robinson, *Detection of the intact GroEL chaperonin assembly by mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(19): p. 4718-4719.
10. Chowdhury, S.K., V. Katta, and B.T. Chait, *An electrospray? ionization mass spectrometer with new features*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1990. **4**(3): p. 81-87.
11. Verentchikov, A.N., W. Ens, and K.G. Standing, *Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction*. Analytical chemistry, 1994. **66**(1): p. 126-133.
12. Morris, H.R., et al., *High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1996. **10**(8): p. 889-896.
13. Chen, X., M.S. Westphall, and L.M. Smith, *Mass spectrometric analysis of DNA mixtures: instrumental effects responsible for decreased sensitivity with increasing mass*. Analytical chemistry, 2003. **75**(21): p. 5944-5952.
14. Dawson, J. and M. Guilhaus, *Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1989. **3**(5): p. 155-159.
15. Wilm, M. and M. Mann, *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source*. Analytical chemistry, 1996. **68**(1): p. 1-8.
16. Ramsey, R. and J. Ramsey, *Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping*. Analytical chemistry, 1997. **69**(6): p. 1174-1178.
17. Xue, Q., et al., *Multichannel microchip electrospray mass spectrometry*. Analytical chemistry, 1997. **69**(3): p. 426-430.
18. Schultz, G.A., et al., *A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2000. **72**(17): p. 4058-4063.
19. Chung, E.W., et al., *Probing the nature of interactions in SH2 binding interfaces—evidence from electrospray ionization mass spectrometry*. Protein Science, 1999. **8**(10): p. 1962-1970.
20. Atmanene, C., *Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire*. 2009.
21. Przybylski, M. and M.O. Glocker, *Electrospray mass spectrometry of biomacromolecular complexes with noncovalent interactions—New analytical perspectives for supramolecular chemistry and molecular recognition processes*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1996. **35**(8): p. 806-826.
22. Grandori, R., *Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2003. **38**(1): p. 11-15.
23. Rostom, A.A., et al., *Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(10): p. 5185-5190.

24. Van Berkel, W.J., et al., *Detection of intact megaDalton protein assemblies of vanillyl-alcohol oxidase by mass spectrometry*. Protein Science, 2000. **9**(3): p. 435-439.
25. Krutchinsky, A.N., et al., *Studies of Noncovalent Complexes in an Electrospray Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometer*, in *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*. 2000, Springer. p. 239-249.
26. van den Heuvel, R.H. and A.J.R. Heck, *Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries*. Current Opinion in Chemical Biology, 2004. **8**(5): p. 519-526.
27. Tahallah, N., et al., *The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001. **15**(8): p. 596-601.
28. Sobott, F., et al., *A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies*. Anal Chem, 2002. **74**(6): p. 1402-7.
29. Sobott, F. and C.V. Robinson, *Protein complexes gain momentum*. Current opinion in structural biology, 2002. **12**(6): p. 729-734.
30. Heck, A.J.R. and R.H.H. van den Heuvel, *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 2004. **23**(5): p. 368-389.
31. Schmidt, A., U. Bahr, and M. Karas, *Influence of pressure in the first pumping stage on analyte desolvation and fragmentation in nano-ESI MS*. Analytical chemistry, 2001. **73**(24): p. 6040-6046.
32. Loo, J.A., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry and ion mobility analysis of the 20S proteasome complex*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(7): p. 998-1008.
33. Sanglier, S., et al., *Comparative ESI-MS study of approximately 2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: from protein oligomeric state to biotope*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(5): p. 419-29.
34. Zal, F., et al., *Quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the native hemocyanin of the deep-sea crab *Bythograea thermydron**. Biomacromolecules, 2002. **3**(2): p. 229-231.
35. Sharon, M., et al., *20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(14): p. 9569-9575.
36. Lorenzen, K., et al., *Optimizing macromolecular tandem mass spectrometry of large non-covalent complexes using heavy collision gases*. International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **268**(2): p. 198-206.
37. van den Heuvel, R.H., et al., *Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2006. **78**(21): p. 7473-7483.
38. Shoemaker, G.K., et al., *Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics, 2010. **9**(8): p. 1742-1751.
39. Snijder, J., et al., *Studying 18 MDa virus assemblies with native mass spectrometry*. Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(14): p. 4020-4023.
40. Fenn, J.B., *Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(33): p. 3871-3894.
41. Snijder, J. and A.J. Heck, *Analytical approaches for size and mass analysis of large protein assemblies*. Annual Review of Analytical Chemistry, 2014. **7**: p. 43-64.
42. McNaught, A. and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of chemical terminology ("gold book")*, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML on-line corrected version created by Nic M, Jirat J, Kosata B, 1997.
43. Lossel, P., J. Snijder, and A.J. Heck, *Boundaries of mass resolution in native mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2014. **25**(6): p. 906-17.
44. Li, H., et al., *Native top-down electrospray ionization-mass spectrometry of 158 kDa protein complex by high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **86**(1): p. 317-320.
45. Giles, K., et al. *Enhancements to the ion mobility performance of a travelling wave separation device*. in *Proceedings of the 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry (Philadelphia, PA)*. 2009.
46. Giles, K., et al., *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(20): p. 2401-2414.
47. Marshall, A.G. and C.L. Hendrickson, *High-resolution mass spectrometers*. Annu. Rev. Anal. Chem., 2008. **1**: p. 579-599.
48. Zhang, Z., H. Pan, and X. Chen, *Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies*. Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(1): p. 147-176.

49. Debaene, F.o., et al., *Time resolved native ion-mobility mass spectrometry to monitor dynamics of IgG4 Fab arm exchange and “bispecific” monoclonal antibody formation*. Analytical chemistry, 2013. **85**(20): p. 9785-9792.
50. Sobott, F. and C.V. Robinson, *Characterising electrosprayed biomolecules using tandem-MS—the noncovalent GroEL chaperonin assembly*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004. **236**(1): p. 25-32.
51. Green, B.N., et al., *Observation of Large, Non-covalent Globin Subassemblies in the ~ 3600kDa Hexagonal Bilayer Hemoglobins by Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Journal of molecular biology, 2001. **309**(3): p. 553-560.
52. Dyachenko, A., et al., *Allosteric mechanisms can be distinguished using structural mass spectrometry*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(18): p. 7235-7239.
53. Benesch, J.L., et al., *Quadrupole-time-of-flight mass spectrometer modified for higher-energy dissociation reduces protein assemblies to peptide fragments*. Analytical chemistry, 2008. **81**(3): p. 1270-1274.
54. Tseng, Y.-H., et al., *Interpreting the charge state assignment in electrospray mass spectra of bioparticles*. Analytical chemistry, 2011. **83**(6): p. 1960-1968.
55. Morgner, N. and C.V. Robinson, *Mass ign: An Assignment Strategy for Maximizing Information from the Mass Spectra of Heterogeneous Protein Assemblies*. Analytical chemistry, 2012. **84**(6): p. 2939-2948.
56. McKay, A.R., et al., *Mass measurements of increased accuracy resolve heterogeneous populations of intact ribosomes*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(35): p. 11433-11442.
57. Rose, R.J., et al., *High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies*. Nature Methods, 2012. **9**(11): p. 1084-1086.
58. Rosati, S., et al., *Exploring an Orbitrap Analyzer for the Characterization of Intact Antibodies by Native Mass Spectrometry*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(52): p. 12992-12996.
59. Olsen, J.V., et al., *A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed*. Molecular & Cellular Proteomics, 2009. **8**(12): p. 2759-2769.
60. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Analytical chemistry, 2000. **72**(6): p. 1156-1162.
61. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. Journal of mass spectrometry, 2005. **40**(4): p. 430-443.
62. Michalski, A., et al., *Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(9): p. M111. 011015.
63. Makarov, A. and E. Denisov, *Dynamics of ions of intact proteins in the Orbitrap mass analyzer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(8): p. 1486-1495.
64. Makarov, A., et al., *Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer*. Analytical chemistry, 2006. **78**(7): p. 2113-2120.
65. Becard, S., *Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et en mobilité ionique pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie*. 2012, Université de Strasbourg.
66. Maple, H.J., et al., *Application of the Exactive Plus EMR for automated protein–ligand screening by non-covalent mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2014. **28**(13): p. 1561-1568.
67. Barlak, T., et al., *Secondary ion mass spectrometry of metal halides. 2. Evidence for structure in alkali iodide clusters*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**(5): p. 1212-1215.
68. Galhena, A.S., C.M. Jones, and V.H. Wysocki, *Influence of cluster size and ion activation method on the dissociation of cesium iodide clusters*. International Journal of Mass Spectrometry, 2009. **287**(1): p. 105-113.
69. Jurchen, J.C. and E.R. Williams, *Origin of asymmetric charge partitioning in the dissociation of gas-phase protein homodimers*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(9): p. 2817-2826.
70. Pagel, K., et al., *Alternate dissociation pathways identified in charge-reduced protein complex ions*. Analytical chemistry, 2010. **82**(12): p. 5363-5372.
71. Wysocki, V.H., et al., *Surface-induced dissociation shows potential to be more informative than collision-induced dissociation for structural studies of large systems*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(7): p. 903-913.
72. Zhou, M., C.M. Jones, and V.H. Wysocki, *Dissecting the large noncovalent protein complex groel with surface-induced dissociation and ion mobility–mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **85**(17): p. 8262-8267.

73. Langer, K., et al., *Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation*. International journal of pharmaceutics, 2008. **347**(1): p. 109-117.
74. WETZEL, R., et al., *Temperature behaviour of human serum albumin*. European Journal of Biochemistry, 1980. **104**(2): p. 469-478.
75. Ecker, D.M., S.D. Jones, and H.L. Levine. *The therapeutic monoclonal antibody market*. in *MAbs*. 2015: Taylor & Francis.
76. Reichert, J.M., *Marketed therapeutic antibodies compendium*. MAbs, 2012. **4**(3): p. 413-415.
77. Doig, A.R., D.M. Ecker, and T.C. Ransohoff, *Monoclonal Antibody Targets and Indications*. American Pharmaceutical Review, 2015. **18**(5): p. 2-5; <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/177490-Monoclonal-Antibody-Targets-and-Indications/>.
78. FDA, *U.S. Food and Drug Administration: Drug Approvals and Databases*. <http://www.fda.gov/default.htm>, 2015.
79. EMA, *European Medicines Agency: European public assessment reports*. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/home/Home_Page.jsp&mid=, 2015.
80. Beck, A. and T. Wurch. *6th Annual European Antibody Congress 2010: November 29–December 1, 2010, Geneva, Switzerland*. in *MAbs*. 2011: Taylor & Francis.
81. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(4): p. 278-287.
82. Hudis, C.A., *Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(1): p. 39-51.
83. Weiner, G.J. *Rituximab: mechanism of action*. in *Seminars in hematology*. 2010: Elsevier.
84. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(8): p. 711-723.
85. Walsh, G. and R. Jefferis, *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins*. Nature Biotechnology, 2006. **24**(10): p. 1241-1252.
86. Harris, R.J., et al., *Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **752**(2): p. 233-245.
87. Beck, A., S. Sanglier-Cianferani, and A. Van Dorsselaer, *Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry*. Anal Chem, 2012. **84**(11): p. 4637-46.
88. Jefferis, R., *Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action*. Trends in pharmacological sciences, 2009. **30**(7): p. 356-362.
89. Niwa, R., et al., *IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn 297-linked oligosaccharides*. Journal of immunological methods, 2005. **306**(1): p. 151-160.
90. Durocher, Y. and M. Butler, *Expression systems for therapeutic glycoprotein production*. Current Opinion in Biotechnology, 2009. **20**(6): p. 700-707.
91. Walsh, G., *Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals*. Drug discovery today, 2010. **15**(17): p. 773-780.
92. Logtenberg, T., *Antibody cocktails: next-generation biopharmaceuticals with improved potency*. Trends in biotechnology, 2007. **25**(9): p. 390-394.
93. Chari, R.V., M.L. Miller, and W.C. Widdison, *Antibody–drug conjugates: An emerging concept in cancer therapy*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(15): p. 3796-3827.
94. Casi, G. and D. Neri, *Antibody–drug conjugates: basic concepts, examples and future perspectives*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(2): p. 422-428.
95. Polakis, P., *Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy*. Pharmacological reviews, 2016. **68**(1): p. 3-19.
96. Doronina, S.O., et al., *Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(7): p. 778-784.
97. Phillips, G.D.L., et al., *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DMI, an antibody–cytotoxic drug conjugate*. Cancer research, 2008. **68**(22): p. 9280-9290.
98. Axup, J.Y., et al., *Synthesis of site-specific antibody–drug conjugates using unnatural amino acids*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(40): p. 16101-16106.
99. Alley, S.C., et al., *Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates*. Bioconjugate chemistry, 2008. **19**(3): p. 759-765.
100. Ducry, L. and B. Stump, *Antibody– drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies*. Bioconjugate chemistry, 2009. **21**(1): p. 5-13.

101. Shen, B.-Q., et al., *Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates*. Nature Biotechnology, 2012. **30**(2): p. 184-189.
102. Koniev, O., et al., *MAPN: First-in-Class Reagent for Kinetically Resolved Thiol-to-Thiol Conjugation*. Bioconjugate chemistry, 2015. **26**(9): p. 1863-1867.
103. Hamblett, K.J., et al., *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(20): p. 7063-7070.
104. Beck, A., et al., *Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates*. Expert Rev Proteomics, 2015.
105. Lyon, R.P., et al., *Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index*. Nature Biotechnology, 2015. **33**(7): p. 733-735.
106. Burris, H.A., et al., *Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer*. Clinical breast cancer, 2011. **11**(5): p. 275-282.
107. Kim, M.T., et al., *Statistical modeling of the drug load distribution on trastuzumab emtansine (Kadcyla), a lysine-linked antibody drug conjugate*. Bioconjugate chemistry, 2014. **25**(7): p. 1223-1232.
108. Lazar, A.C., et al., *Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(13): p. 1806-1814.
109. Fekete, S., et al., *Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*. Analytical chemistry, 2015.
110. Sandra, K., I. Vandenheede, and P. Sandra, *Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization*. Journal of Chromatography A, 2014. **1335**: p. 81-103.
111. Beck, A., et al., *Characterization of therapeutic antibodies and related products*. Analytical chemistry, 2012. **85**(2): p. 715-736.
112. Wakankar, A., et al. *Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates*. in *MABs*. 2011: Taylor & Francis.
113. Rao, C., V.S. Rangan, and S. Deshpande, *Challenges in antibody-drug conjugate discovery: a bioconjugation and analytical perspective*. Bioanalysis, 2015. **7**(13): p. 1561-1564.
114. Alley, S.C. and K.E. Anderson, *Analytical and bioanalytical technologies for characterizing antibody-drug conjugates*. Current Opinion in Chemical Biology, 2013. **17**(3): p. 406-411.
115. Fekete, S., et al., *Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2015.
116. Ruhaak, L.R., et al., *Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF*. Journal of proteome research, 2010. **9**(12): p. 6655-6664.
117. Mittermayr, S., J. Bones, and A.s. Guttman, *Unraveling the glyco-puzzle: glycan structure identification by capillary electrophoresis*. Analytical chemistry, 2013. **85**(9): p. 4228-4238.
118. Ayoub, D., et al., *Characterization of the N-Terminal Heterogeneities of Monoclonal Antibodies Using In-Gel Charge Derivatization of α -Amines and LC-MS/MS*. Analytical chemistry, 2015. **87**(7): p. 3784-3790.
119. Wagner-Rousset, E., et al., *The way forward, enhanced characterization of therapeutic antibody glycosylation: comparison of three level mass spectrometry-based strategies*. Journal of Chromatography B, 2008. **872**(1): p. 23-37.
120. Beck, A., et al., *Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins*. Current pharmaceutical biotechnology, 2008. **9**(6): p. 482-501.
121. Janin-Bussat, M.-C., et al., *Structural characterization of antibodies by mass spectrometry*, in *Antibody engineering*. 2010, Springer. p. 613-634.
122. Atmanene, C., et al., *Extending mass spectrometry contribution to therapeutic monoclonal antibody lead optimization: characterization of immune complexes using noncovalent ESI-MS*. Analytical chemistry, 2009. **81**(15): p. 6364-6373.
123. Atmanene, C., et al., *Noncovalent mass spectrometry for the characterization of antibody/antigen complexes*, in *Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals*. 2013, Springer. p. 243-268.
124. Thompson, N.J., S. Rosati, and A.J. Heck, *Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies*. Methods, 2014. **65**(1): p. 11-17.
125. Rosati, S., et al., *Qualitative and semiquantitative analysis of composite mixtures of antibodies by native mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2012. **84**(16): p. 7227-7232.
126. Rosati, S., et al., *Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry*. Nature protocols, 2014. **9**(4): p. 967-976.

127. Jerre van der Horst, et al., *Improving Desolvation on Q-ToF Instruments for Native MS Applications*. 5th Symposium on Structural Proteomics, 2015.
128. Marcoux, J., et al., *Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate*. Protein Science, 2015.
129. Muneeruddin, K., M. Nazzaro, and I.A. Kaltashov, *Characterization of Intact Protein Conjugates and Biopharmaceuticals Using Ion-Exchange Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Top-Down Tandem Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2015. **87**(19): p. 10138-10145.
130. Snijder, J., *Extending the boundaries of native mass spectrometry to study virus structure and assembly*. 2015.
131. Rosati, S., et al. *In-depth qualitative and quantitative analysis of composite glycosylation profiles and other micro-heterogeneity on intact monoclonal antibodies by high-resolution native mass spectrometry using a modified Orbitrap*. in *MAbs*. 2013: Taylor & Francis.
132. Debaene, F., et al., *Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: high resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment*. Analytical chemistry, 2014. **86**(21): p. 10674-10683.
133. Barouch, D.H., et al., *Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys*. Nature, 2013. **503**(7475): p. 224-228.
134. Audet, J., et al., *Molecular characterization of the monoclonal antibodies composing ZMAb: a protective cocktail against Ebola virus*. Scientific reports, 2014. **4**.
135. Senter, P.D. and E.L. Sievers, *The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma*. Nature Biotechnology, 2012. **30**(7): p. 631-637.
136. Sievers, E.L. and P.D. Senter, *Antibody-drug conjugates in cancer therapy*. Annual review of medicine, 2013. **64**: p. 15-29.
137. Goetsch, L., et al., *A novel role for junctional adhesion molecule-A in tumor proliferation: Modulation by an anti-JAM-A monoclonal antibody*. International Journal of Cancer, 2013. **132**(6): p. 1463-1474.
138. Boylan, N.J., et al., *Conjugation site heterogeneity causes variable electrostatic properties in Fc conjugates*. Bioconjugate chemistry, 2013. **24**(6): p. 1008-1016.
139. Pillow, T.H., et al., *Site-specific trastuzumab maytansinoid antibody–drug conjugates with improved therapeutic activity through linker and antibody engineering*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(19): p. 7890-7899.
140. Perez, H.L., et al., *Antibody–drug conjugates: current status and future directions*. Drug discovery today, 2014. **19**(7): p. 869-881.

Partie 3 : Du criblage d'interaction protéine-ligand par MS native au criblage par IM-MS native

Cette partie est consacrée à la caractérisation de systèmes protéine-ligand par MS native et IM-MS native. Une présentation préliminaire de l'état de l'art de cette discipline et des objectifs de ces travaux est tout d'abord rapportée. Les développements méthodologiques réalisés et leurs applications sont ici illustrés à travers l'analyse structurale et conformationnelle de complexes biologiques impliquant une diversité de ligands (substrats, cofacteurs, molécules inhibitrices).

Introduction : Etat de l'art et objectifs.

Chapitre 1 : Développement de méthodes instrumentales en MS native.

Chapitre 2 : Développement de méthodes instrumentales en IM-MS native.

Chapitre 3 : Etude d'un complexe enzyme/substrat par MS native : le système PRMT6/SAH/peptide H4.

Chapitre 4 : Criblage de complexes enzyme/ligand par MS native : le système Tgt/inhibiteurs.

Chapitre 5 : Criblage de complexes enzyme/ligand par IM-MS native: le système PDF1B/inhibiteurs.

Chapitre 6 : Etude d'un complexe enzyme/cofacteur/ligand par IM-MS native : le système QR2.

Introduction : état de l'art et objectifs.

Plus de 80% des agents thérapeutiques approuvés par l'agence américaine du médicament (FDA) au cours des 10 dernières années reposent sur l'utilisation de petites molécules ou ligands, interagissant spécifiquement et réversiblement avec une cible thérapeutique (protéine, acide nucléique) afin d'en moduler l'activité (enzymes) ou la fonction (récepteurs, transporteurs) [1, 2]. L'identification de telles espèces dans le secteur pharmaceutique revêt un intérêt majeur, impliquant le recours à des techniques de criblage robustes et orthogonales telles que la résonance plasmonique de surface (SPR), la dénaturation thermique (TSA) ou encore la thermophorèse à micro-échelle (MST), capables de sonder l'existence d'interactions entre la cible biologique et de larges banques de composés chimiques de taille et hétérogénéité variables [3, 4]. L'identification d'une série restreinte de ligands ou « hits » à l'issue de cette première étape nécessite la validation des interactions, ce qui passe par une caractérisation structurale approfondie des complexes non-covalents formés en présence de ces espèces. Cette seconde étape, plus stringente, s'achève par la proposition de candidats ou « leads » dont les propriétés physicochimiques seront optimisées à des fins cliniques [5, 6].

1. Le criblage de complexe protéine-ligand par MS native.

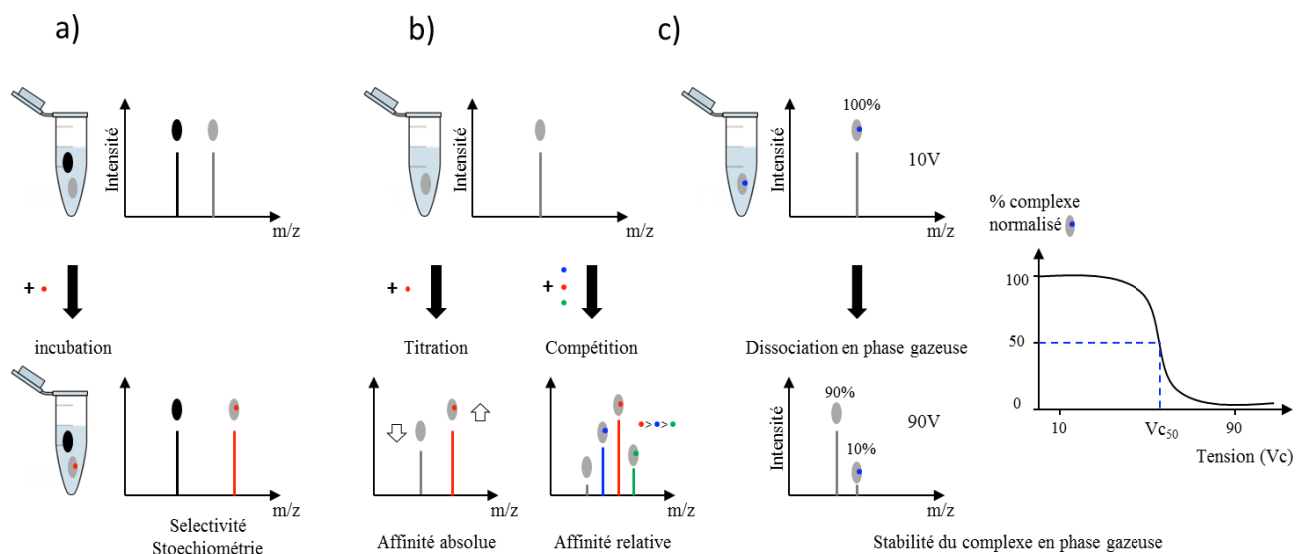
L'apport de la spectrométrie de masse native s'est particulièrement illustré au sein de ces différentes étapes. Couplé à un système d'infusion nanoESI automatisable dès 2003 [7, 8], cet outil s'est révélé compatible à l'analyse haut-débit, permettant le criblage de centaines de composés par jour à partir de faibles quantités de matériel [9, 10]. Le maintien des complexes non-covalents lors de leur transfert en phase gazeuse permet une détection directe de la masse et intensité des espèces à l'équilibre en solution, pouvant donner accès à des informations structurales détaillées [11, 12]:

- L'analyse qualitative des spectres ainsi obtenus permet de déterminer la stœchiométrie et sélectivité d'interaction de ligands pour différentes cibles d'intérêt (Fig.1a), incluant des acides désoxyribonucléiques [13-15], ribonucléiques [16-18] ou encore des protéines [19-21].
- Le développement de méthodes de quantification adaptées, s'appuyant sur des expériences de titrage et/ou de compétition, permet de déterminer la spécificité de ces interactions et

d'en mesurer l'affinité relative ou absolue (K_d) sur une gamme de concentration, s'étendant de 10^{-9} à 10^{-3} M (Fig.1b) [22-25].

- L'analyse de la stabilité de ces complexes en phase gazeuse peut également fournir une information structurale considérable. L'énergie nécessaire à la dissociation par collision de 50% des espèces (V_{c50}) s'avère proportionnelle à la contribution des interactions de type polaire (Fig.1c) [26-28].

La caractérisation de métalloprotéines [29-31], d'enzymes [32, 33], de récepteurs ou de pompes protéiques [34, 35] par MS native a ainsi révélé les propriétés de fixation de métaux, cofacteurs, ligands endogènes [36], lipides, glucides [37] sur leurs complexes associés, permettant une meilleure compréhension structurale de ces assemblages. Fournissant des données comparables à celles obtenues en solution par des approches complémentaires, la MS native s'est avérée prometteuse pour la caractérisation de ligands hydrophobes. Bien que défavorisés en phase gazeuse, certaines optimisations instrumentales et expérimentales permettent néanmoins de préserver ces interactions apolaires, nécessaires à leur caractérisation [38-40].



2. Le criblage de complexes protéine-ligand par IM-MS native.

En dépit des informations structurales apportées, le criblage de complexes protéine-ligand par MS native présente une sensibilité restreinte pour la conformation des espèces. Cette principale limitation restreint le champ d'application de cette technologie, le mode de fixation de certains ligands passant par la reconnaissance d'un conformère protéique particulier et/ou l'induction de changements conformationnels spécifiques [41-43]. Face à cet écueil, la mobilité ionique et sa capacité de séparation conformationnelle des ions en phase gazeuse constitue une alternative prometteuse dans l'analyse de complexes non-covalents [44-46]. Couplée à la MS native depuis 2006, cette approche s'est révélée compatible avec la préservation de la structure tridimensionnelle native des espèces ionisées, soulignant l'intérêt de l'IM-MS native dans le criblage conformationnel de complexes protéine-ligand [47-49].

Malgré ce potentiel, l'application de cette stratégie s'est à ce jour révélée sporadique, réservée à la compréhension des mécanismes d'agrégation amyloïde et au développement d'inhibiteurs spécifiques [50-55], ainsi qu'à l'étude de protéines intrinsèquement désordonnées [56-58].

Des études de criblage conformationnel préliminaires à ces travaux de thèse, réalisées au laboratoire par les Drs. Cédric Atmanene et Stéphanie Petiot-Bécard, avaient permis de révéler de subtils changements de conformation induits par la fixation de ligands (sucres, inhibiteurs) sur certaines protéines cibles thérapeutiques (répresseur transcriptionnel bactérien, protéine anti-apoptotique humaine) [59, 60]. Les différences de CCS (Δ CCS) alors rapportées au cours de ces études et dans la littérature [61] avaient permis de situer les limites de résolution conformationnelle accessibles sur les cellules de mobilité ionique TWIMS dans une gamme de Δ CCSs de 2 à 5 %.

Dans le même temps, des études parallèles menées par les équipes du Pr. Brandon Ruotolo et du Pr. Neil Oldham suggéraient le recours à un criblage basé sur la stabilité conformationnelle des complexes protéine-ligand en phase gazeuse [62, 63]. L'évaluation de ce critère à travers le criblage d'inhibiteurs de la protéine kinase Abl révélait ainsi l'existence de 2 catégories de ligands, confondus sous une conformation globale identique bien que se fixant sur 2 sites différents de l'enzyme [45, 64]. L'identification de 2 profils d'activation conformationnelle induits en présence de ces ligands s'est ici avérée prometteuse, permettant de contourner les limites de résolution instrumentale et d'enrichir le panel d'informations accessibles par criblage IM-MS.

3. Objectifs des travaux.

Les objectifs de ce travail de thèse consistent à développer des approches de criblage conformationnel de systèmes protéine-ligand. Par analogie aux informations structurales accessibles par MS native, ces optimisations devront ainsi permettre d'étendre les critères de criblage à la sélectivité, l'impact et la stabilité conformationnelle associés au recrutement de ligands sur leur cible (Fig.2).

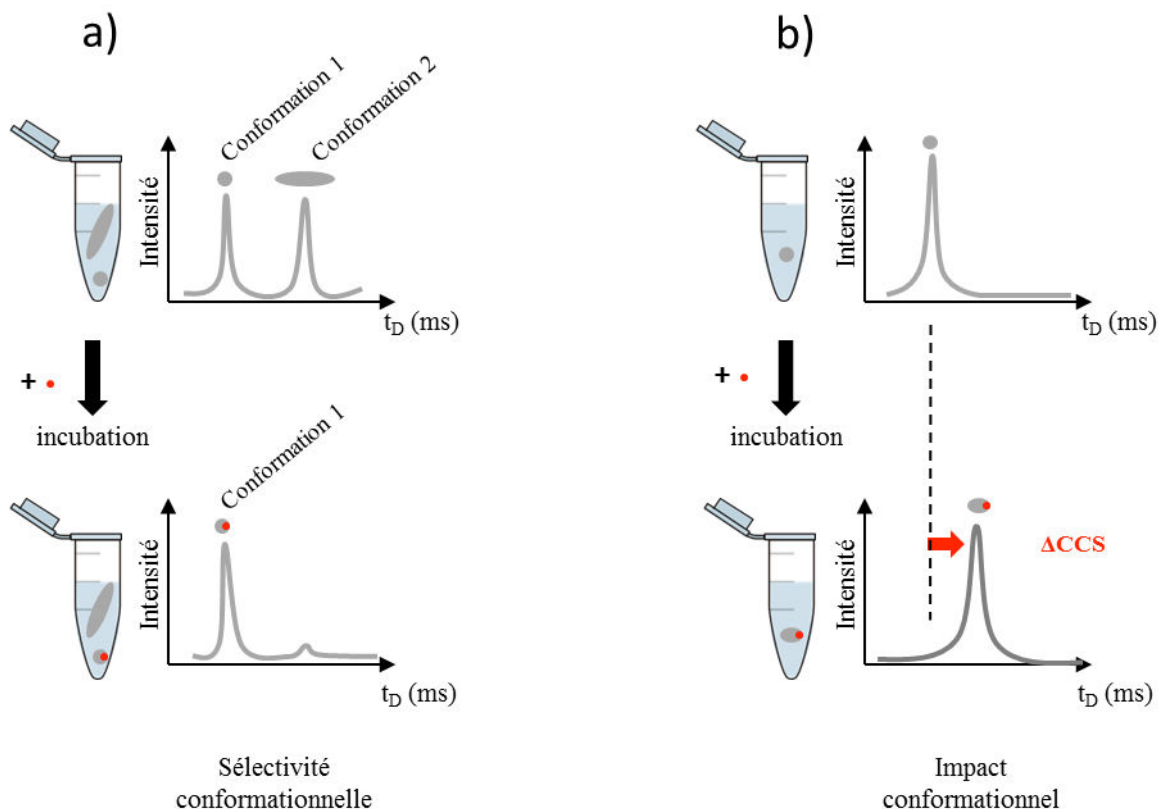


Figure 2 : Représentation schématique des informations conformationnelles accessibles par IM-MS native. La détermination de la section efficace (CCS) des complexes formés en présence de mélanges protéine-ligand doit permettre d'évaluer la sélectivité conformationnelle du ligand pour sa cible (a), ainsi que son impact conformationnel (b).

La mise en place du criblage IM-MS native passe par une optimisation préalable des méthodes instrumentales dans chacune des dimensions. Les développements réalisés en MS native et en IM-MS ainsi que leur application au criblage de systèmes protéine-ligand sont exposés dans les chapitres suivants.

Chapitre 1 : Développement de méthodes instrumentales en MS native.

La pertinence des informations structurales déduites en phase gazeuse implique que la nature et intensité des ions détectés reflètent l'équilibre des espèces en solution [23, 65]. Cette condition requiert tout d'abord que les complexes spécifiquement formés en solution puissent être ionisés efficacement et proportionnellement à leur abondance. Dans un second temps, les complexes non-covalents ainsi ionisés doivent pouvoir être maintenus en phase gazeuse, transmis et détectés selon la même efficacité. Le succès de ces étapes clés repose sur la mise en place d'expériences de contrôle, ainsi que sur une optimisation fine des paramètres expérimentaux et instrumentaux [66]. Dans ce chapitre, l'influence de certains paramètres instrumentaux est discutée à travers l'étude de systèmes protéine-ligand par MS native sur l'instrument Synapt G2 HDMS (High Definition Mass Spectrometry, Waters).

1. Présentation du spectromètre de masse Synapt G2 HDMS (Waters).

Le Synapt G2 HDMS est un spectromètre de masse de type ESI-Q-TOF, pourvu d'une cellule de mobilité ionique de type TWIMS (Fig.3). Cet instrument, constitué de guides d'ion équipés de la technologie T-Wave™, se décline en 5 compartiments, dont le vide est régulé par une pompe primaire et 6 pompes turbomoléculaires:

- Le bloc source de type Z-spray™, orthogonal à la source d'ionisation électrospray, constitue le point d'entrée des ions. L'application d'une différence de potentiel électrique, ici entre la puce microfluidique d'une source nanoESI automatisée (Triversa Nanomate, Advion) et le cône d'échantillonnage, puis le cône d'extraction de l'instrument, permet de drainer les ions générés à pression atmosphérique au sein de l'instrument placé sous vide. L'introduction d'une vanne de fuite dans le circuit de pompage de la pompe primaire permet de contrôler le gradient de pression (2-8 mbar) dans cette première zone d'interface [67]. La trajectoire empruntée par les ions (« Z ») favorise l'élimination des espèces non chargées et élargit la tolérance aux sels non volatils.

- Un premier guide d'ion, constitué d'une succession de lentilles annulaires (SRIG), assure la focalisation et la transmission des ions incidents [68]. La superposition d'un potentiel radiofréquence (RF) et d'une tension continue (DC) entre paires de lentilles permet un

confinement des ions au centre du faisceau et leur drainage sous forme de vagues de potentiel (T-Wave) jusqu'au quadripôle.

- L'analyseur quadripolaire dispose de deux modes de fonctionnement. Dans les expériences présentées, l'application d'un unique potentiel radiofréquence en opposition de phase entre barreaux adjacents (mode « RF only ») assimile le quadripôle à un guide d'ions. Ce dernier permet ainsi la transmission d'ions dans une large gamme de rapports m/z , jusqu'au compartiment TriwaveTM [69]. Cependant, la superposition d'une tension continue permet d'utiliser cet analyseur comme filtre de masse dans le cadre d'applications MS/MS [70].
- Le compartiment Triwave se compose de 3 guides d'ion SRIG de type T-Wave [71]. Les cellules de collision Trap et Transfer, confinées dans la même enceinte, sont alimentées par une pression d'argon proche de 10^{-2} mbar, quelle que soit l'application réalisée (MS native ou IM-MS). L'optimisation de cette pression et de l'énergie de collision communiquée aux ions dans ces cellules (Trap et Transfer CE) permettent d'en contrôler l'énergie interne. Ces paramètres conditionnent ainsi la transmission, préservation ou fragmentation de ces ions. Le fonctionnement de la cellule centrale IMS diffère des 2 précédentes en fonction du type d'application :
 - En mode MS, une pression résiduelle d'argon de 10^{-4} mbar est délivrée dans cette cellule, agissant alors comme un simple guide d'ion à l'image des cellules Trap et Transfer.
 - En mode IMS, cette cellule, subdivisée en 2 sous-compartiments non isolés, est approvisionnée en hélium et en azote (1 à 6 mbar), permettant une séparation des ions selon leur mobilité ionique. Dans ce contexte, la cellule d'hélium assure une thermalisation préalable des ions injectés, dont l'énergie cinétique est régulée par la tension Trap Bias. Le transport de ces ions dans la cellule d'azote se poursuit par leur séparation IM, contrôlée par la nature des potentiels de vague T-Wave appliqués (hauteur, vitesse) et la pression en azote. Les cellules Trap et Transfer assurent alors respectivement le stockage des ions avant séparation IM et le transfert des ions échantillonnés par IM. Une description approfondie du mode de fonctionnement IM-MS est rapportée au chapitre 2.
- Les paquets d'ions, fractionnés ou non par mobilité ionique depuis le compartiment Triwave, sont séparés en fonction de leur temps de vol (proportionnel au rapport m/z) dans un vide poussé (1.10^{-6} mbar) au sein de l'analyseur TOF [72]. La détection de ces espèces permet l'obtention de spectres de masse, dont la résolution dépend du mode du

fonctionnement (haute résolution, résolution, sensibilité). En mode sensibilité et résolution, la distance parcourue par les ions dans l'analyseur décrit un « V », se traduisant par une résolution FMWH respective de 10000 et 20000. Cette distance est doublée en mode haute résolution (« W »), permettant une résolution en masse accrue (FMWH : 40000). Le gain de résolution s'effectuant au détriment de la sensibilité, les études de MS native privilégient le mode résolution pour l'analyse de protéines inférieures à 30 kDa, et le mode sensibilité au-delà de cette masse.

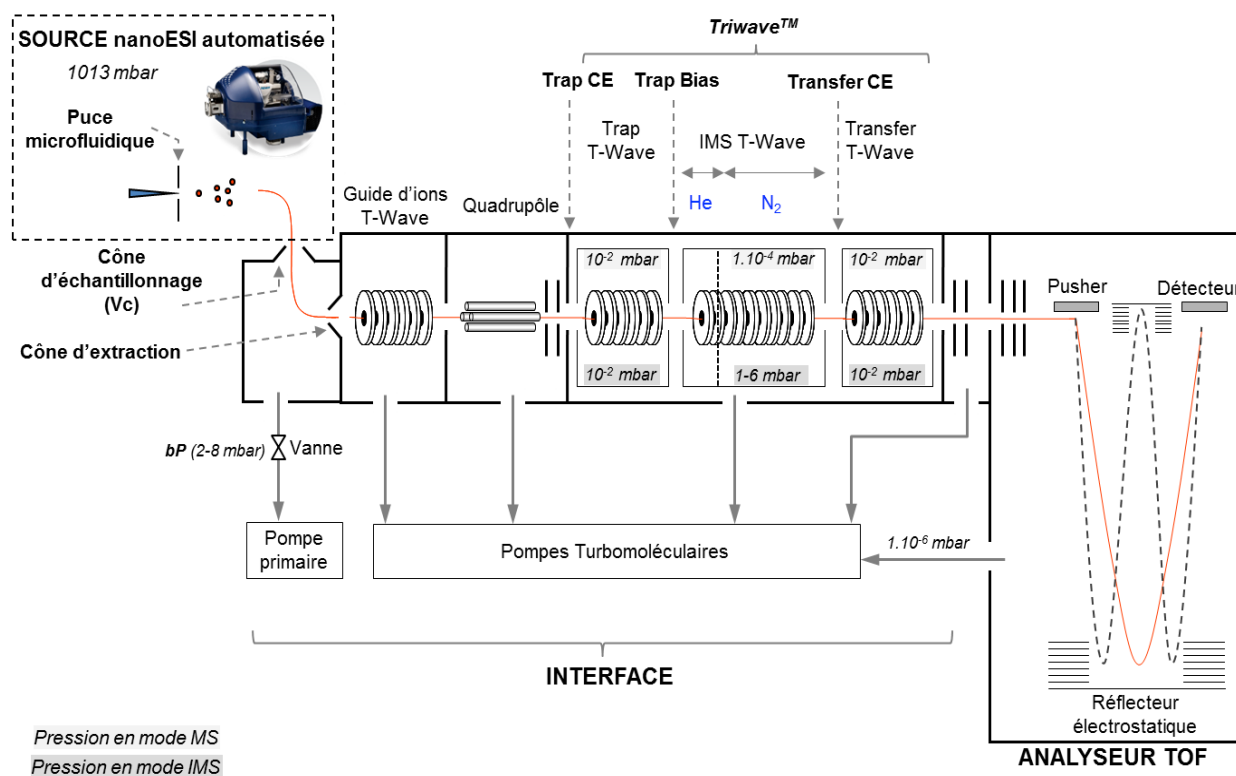


Figure 3 : Représentation schématique du spectromètre de masse Synapt G2 HDMS (Waters) utilisé au cours de ces travaux, adaptée de [73].

2. Influence des paramètres instrumentaux.

Le transfert de complexes non-covalents en phase gazeuse et leur détection par MS native impliquent une préservation de l'intégrité des ions associés tout au long de leur transmission. Une optimisation des conditions instrumentales doit ainsi permettre de contrôler l'énergie interne de ces ions à travers un contrôle de leur énergie cinétique et de leur libre parcours moyen. Dans ce contexte, deux principaux types de paramètres nécessitent d'être ajustés sur l'instrument Q-TOF utilisé : les tensions d'accélération et les pressions en gaz dans l'interface. Bien que l'influence individuelle de ces paramètres soit liée à la géométrie de l'instrument, leur importance s'avère d'autant plus marquée au sein de l'interface. Une discussion de leur impact sur la désolvatation et la préservation de systèmes protéine-ligand est rapportée.

2.1. Influence de la tension d'accélération à l'interface.

Les ions générés à pression atmosphérique par ionisation électrospray dans la source, transitent au sein du spectromètre de masse placé sous vide. En plus d'un phénomène de suction, une différence de potentiel électrique entre la puce microfluidique et le cône d'échantillonnage permet l'accélération des ions en direction de ce dernier. L'influence de la tension de ce cône sur l'analyse d'un complexe non-covalent constitué de l'enzyme (QR2-FAD)₂ et de son ligand mélatonine est ici décrite (Fig.4a-f). A pression en source fixe (8mbar), l'application d'une faible tension de cône (20-40V) restreint l'accélération des ions, limitant le transfert d'énergie par collision avec les molécules de gaz résiduelles. L'élargissement des signaux et la faible intensité de signal traduisent une désolvatation inoptimale et une faible transmission, limitant l'identification des espèces et la persistance d'adduits non volatils. L'augmentation modérée de cette valeur (60-70V) assure une élimination optimale des molécules de solvant sans altérer la composition du complexe, l'affinement des pics permettant une mesure de masse précise et la détermination non ambiguë d'une stœchiométrie unique 2:2 (Fig.4c). Cet équilibre est progressivement rompu à de plus fortes tensions (90V-110V), la conversion d'un excès d'énergie cinétique en énergie interne conduisant à une désolvatation et transmission accrue des ions, mais à la dissociation du ligand.

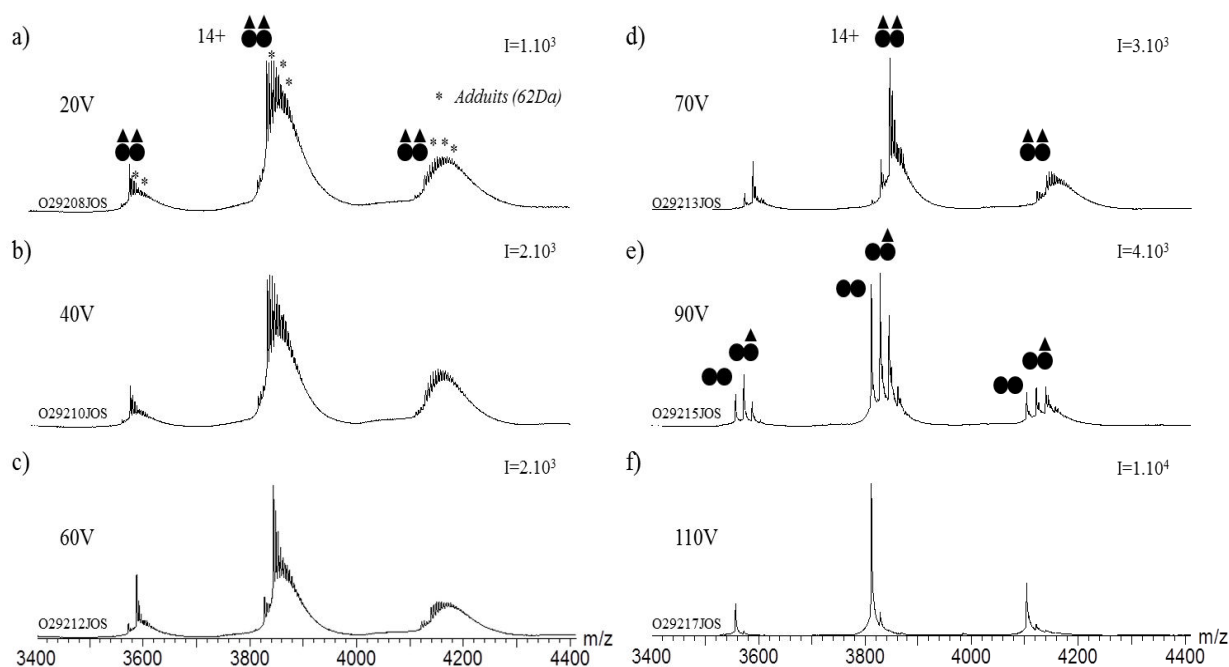


Figure 4 : Influence de la tension d'accélération (V_c) sur la désolvatation et préservation du complexe (QR2-FAD)₂-(mélatonine)₂ par MS native. L'incubation de 5 μ M de dimère QR2 saturé en cofacteur FAD et de 20 μ M de ligand mélatonine en tampon AcNH₄ 200mM pH7.5 est suivie par MS native (Synapt G2, P_i = 8mbar) à une tension de cône de a) 20, b) 40, c) 60, d) 70, e) 90 et f) 110V. L'intensité de l'ion majoritaire 14⁺ est exprimée en nombre de coups sommés (30 scans de 4s).

2.2. Stabilité des complexes non-covalents en phase gazeuse (Vc50).

Cette dissociation induite par collision peut se révéler informative, la stabilité des complexes en phase gazeuse reflétant la contribution des interactions de type polaire [26, 28]. Afin d'illustrer ces propos, une comparaison de la stabilité en phase gazeuse des complexes 2:2 formés entre (QR2-FAD) et ses ligands mélatonine ou resvératrol est ici décrite (Fig.5). Pour cela, une quantification relative de l'intensité des états de charge (13,14 et 15⁺) associés aux espèces apo et holo est réalisée à différentes tensions d'accélération pour chaque ligand. La masse négligeable apportée par ces ligands (< 1% de la masse des complexes) et la conservation de la distribution de charges lors de leur fixation (Fig.4e), permettent de considérer un facteur de réponse identique entre espèces apo et holo lors de ces expériences [22].

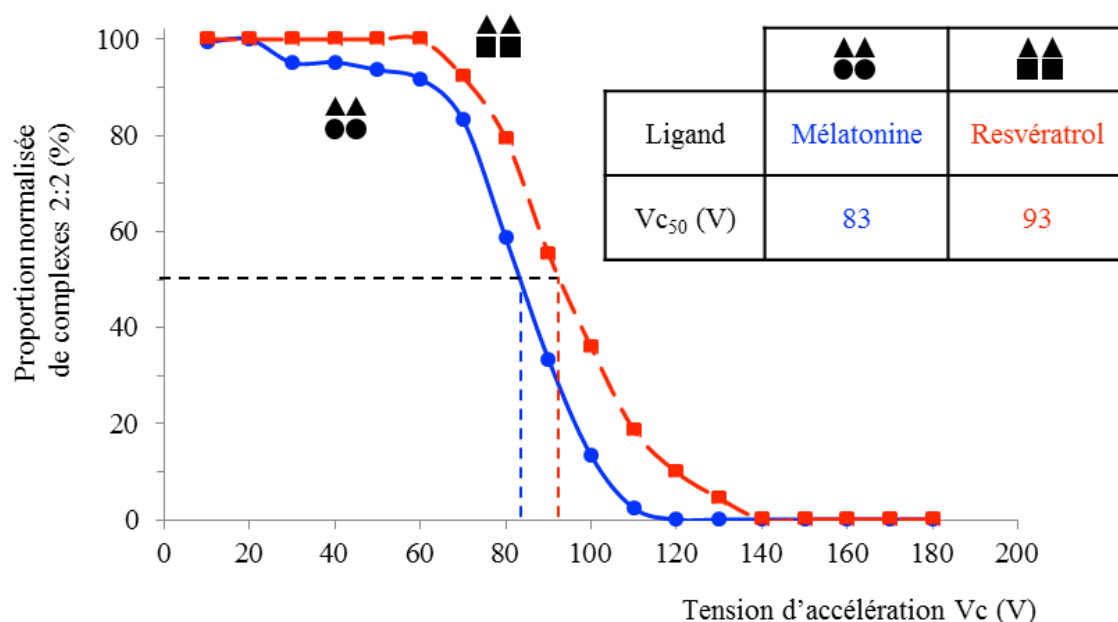


Figure 5 : Comparaison de la stabilité en phase gazeuse des complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂.

La comparaison des proportions de complexes 2:2 mesurées à différentes tensions de cône (Vc) met en évidence une différence de stabilité en phase gazeuse entre complexes associés à la mélatonine ou au resvératrol. En effet, la tension nécessaire à la dissociation de 50% de ces complexes (Vc₅₀) apparaît plus élevée en présence de resvératrol (93V) que de mélatonine (83V). La résolution cristallographique de ces 2 complexes permet de relier cette différence à la nature des interactions supramoléculaires mises en jeu, le resvératrol établissant des interactions électrostatiques supplémentaires avec l'enzyme [74, 75].

2.3. Influence de la pression à l'interface.

L'intégration d'une vanne de fuite dans le circuit de pompage de la pompe primaire permet de moduler la pression dans la première zone de pompage de l'interface. Le contrôle de cette pression, indispensable au maintien des complexes non-covalents, joue un rôle similaire à celui de la tension de cône. Le libre parcours moyen des ions dans la source peut ainsi être modulé. A tension d'accélération fixe, l'augmentation de cette pression diminue le libre parcours moyen des ions. L'augmentation de la fréquence de collision diminue ainsi l'énergie accumulée par les ions entre deux chocs, minimisant leur énergie interne [67, 76, 77]. L'influence de ce paramètre est illustrée dans le cadre d'une caractérisation de l'interaction entre la myoglobine et son hème (Fig.6). L'application d'une pression en source de 7 mbar (Fig.6a) préserve l'intégrité du complexe holo-myoglobine. La diminution de cette valeur (5 à 4 mbar, Fig.6b-c) s'accompagne successivement d'une optimisation de la désolvatation, puis de la dissociation de l'hème, matérialisée par la recrudescence des formes apo-myoglobine.

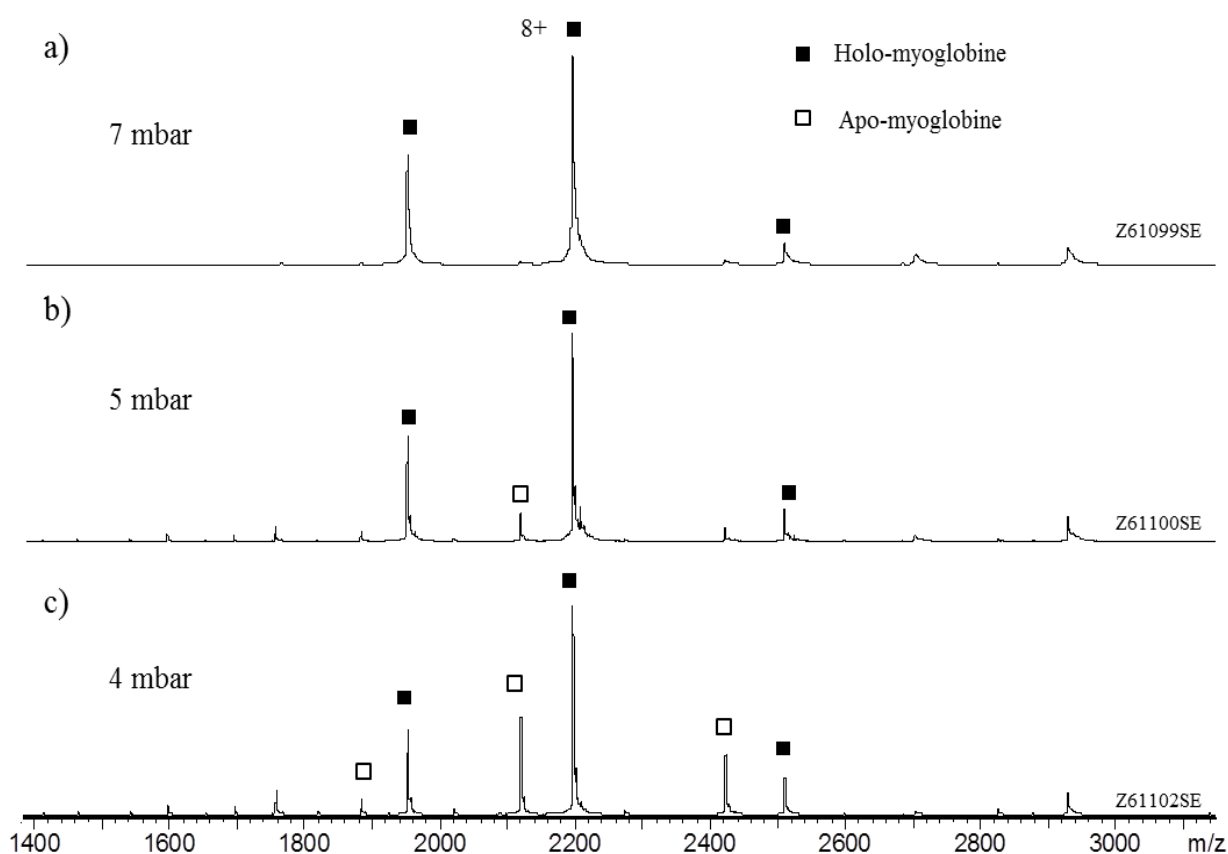


Figure 6 : Influence de la pression en source (P_i) sur la désolvatation et maintien du complexe myoglobine-hème (holo-myoglobine) par MS native. L'infusion de 10 μ M d'holo-myoglobine en tampon AcNH₄ 150mM pH7.5 est suivie par MS native (LCT, $V_c = 100V$) à une pression en source de a) 7, b) 5 et c) 4 mbar.

2.4. Influence de la température de la source et de l'intensité du spray.

Dans de moindres mesures, la température appliquée dans la source et l'intensité du spray généré peuvent affecter la désolvatation des ions [78]. Une illustration de l'effet de l'intensité du spray sur l'analyse d'un mélange sous-stœchiométrique entre la protéine PDF1b et son ligand actinonine est ici décrite (Fig.7). Une augmentation de l'intensité du nanospray, de 50 (Fig.7a) à 200 nA (Fig.7b), diminue la proportion d'adduits fixés, sans modifier la distribution entre espèces apo et holo. L'intensité de spray optimale à une telle désolvatation dépend de la nature des complexes étudiés et de la composition du tampon.

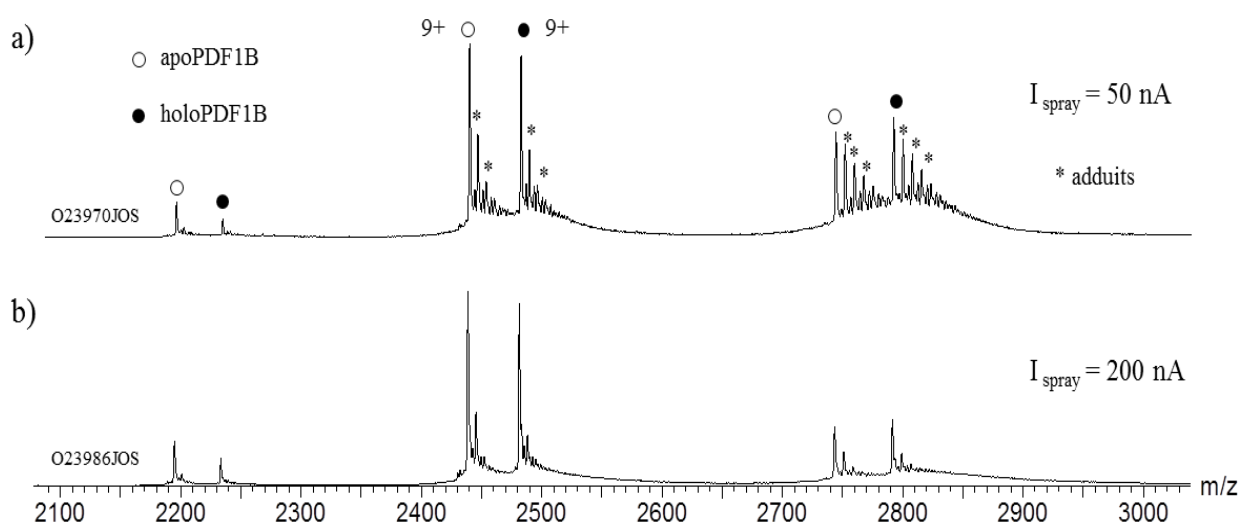


Figure 7 : Influence de l'intensité du nanospray (Nanomate, Advion) sur la désolvatation des complexes apo et holoPDF1B. Les acquisitions obtenues sur le mélange sous-stœchiométrique (Synapt G2, $V_c = 30\text{V}$, $P_i = 6.6\text{mbar}$) sont générées à partir du même spray, dont l'intensité de a) 50 et b) 200 nA, est contrôlée par la tension et la pression appliquée sur la puce microfluidique.

3. Conclusions.

L'optimisation des conditions instrumentales en MS native constitue un prérequis à l'obtention d'informations fiables sur la structure de complexes non-covalents protéine-ligand en solution. La diversité de ces molécules (nature, compatibilité ESI, affinité, stabilité en phase gazeuse) nécessite une optimisation récurrente des paramètres présentés pour chaque système étudié. L'application de ces développements méthodologiques à l'étude de complexes protéine-ligand par MS native est abordée dans les chapitres 3 et 4 suivants.

Chapitre 2 : Développement de méthodes instrumentales en IM-MS native.

L'étude de systèmes protéine-ligand par IM-MS native a pour objectif d'étendre le criblage structural de ces espèces à la conformation globale de leurs ions. La capacité de préservation des propriétés tridimensionnelles adoptées par ces complexes en solution permet d'étudier et comparer l'impact de ligands sur le temps de dérive (t_D) et la section efficace (CCS) des ions correspondants [45, 48, 79]. La pertinence et précision de ces grandeurs accessibles par IM-MS impliquent l'absence de distorsions conformationnelles d'origine technique et instrumentale. Au-delà du maintien des structures natives, le développement de ces méthodes IM nécessite :

- Une préservation des conformations natives à l'échelle des ions étudiés.
- Une résolution conformationnelle maximale, adaptée à l'étude de changements subtils.
- Une sensibilité optimale, permettant la détection et le suivi de conformères minoritaires.
- Une reproductibilité analytique significative.

L'intégration de ces critères repose sur la mise en place d'une stratégie analytique ciblée et d'une optimisation instrumentale fine, dont les principaux points (choix de l'état de charge, paramètres de séparation IM, variabilité instrumentale, mesure de CCSs expérimentales, calcul de CCSs théoriques) sont illustrés au sein de ce chapitre.

1. Choix de l'état de charge.

La mise en évidence d'une corrélation entre :

- Le nombre et la distribution de charges d'une biomolécule en phase gazeuse.
- Sa surface accessible au solvant en solution (SASA).

Permet, à partir des seules informations de MS native:

- D'estimer l'hétérogénéité conformationnelle de cette espèce [80, 81].
- De relier la réduction du nombre de charges observée en conditions non dénaturantes à la préservation d'ions de conformations compactes et natives [82-84].

Néanmoins, ces états de charge « natifs » ne se révèlent pas systématiquement équivalents en termes de conformation, les répulsions coulombiennes exercées à leur surface dépendant de leur charge et pouvant conduire à leur déploiement partiel [85, 86]. Afin d'illustrer ce phénomène, une comparaison des CCS mesurées par IM-MS sur les états de charge 12, 13 et 14⁺ des complexes QR2-cofacteurs est ici présentée (Fig.8). L'analyse IM-MS d'un mélange entre l'enzyme dimérique (QR2)₂ et ses cofacteurs FMN et FAD (ratio 4:1:1) permet la détection concomitante des complexes (QR2)₂, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ sous 3 états de charge (12, 13 et 14⁺), dont le spectre de masse natif est présenté en figure 47. Les distributions de temps de dérive (ATD) associées au passage de ces ions dans la cellule IM sont ainsi extraites, normalisées et représentées (Fig.8a). Les temps de dérive moyens de ces ATDs (t_D), mesurés en triplicats d'acquisition à l'apex de chaque gaussienne, sont ici indiqués (Fig.8b). L'application de 3 étalonnages indépendants, issus de l'analyse des étalons β -lactoglobuline, transthyréline et avidine à partir de la même méthode IM-MS (triplicats analytiques), permet une quantification de la section efficace de ces ions ($^{TW}CCS_{N_2}$, paragraphe 5) à partir de leurs temps de dérive (t_D). La comparaison de ces valeurs révèle un accroissement systématique de surface en fonction de l'état de charge des ions, quel que soit le complexe considéré (Fig.8c).

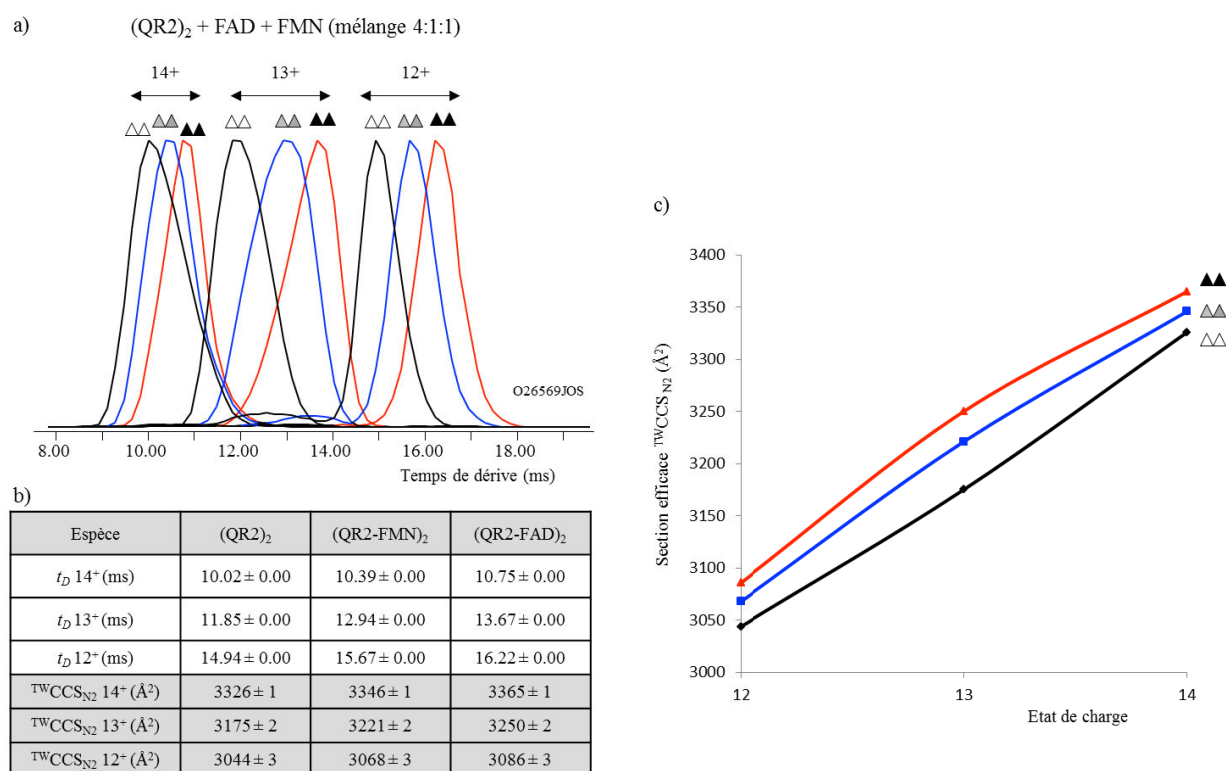


Figure 8 : Influence de l'état de charge sur la section efficace des complexes (QR2)₂, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ mesurée par IM-MS ($V_c = 100V$, $P_i = 7$ mbar). a) Représentation de la distribution des temps de dérive (ATDs) normalisés de chaque espèce aux états de charge 14, 13 et 12⁺. b) Représentation des temps de dérive (t_D) et sections efficaces ($^{TW}CCS_{N_2}$) mesurés pour chaque espèce. Les erreurs de temps de dérive et sections efficaces sont respectivement issues de triplicats d'acquisition (sprays identiques) et d'étalonnages indépendants (sprays différents). c) Suivi de la section efficace en fonction de la charge.

En effet, les ions 12^+ associés aux complexes $(QR2)_2$, $(QR2-FMN)_2$ et $(QR2-FAD)_2$ présentent un degré de compaction maximal (3044 ± 3 , 3068 ± 3 et $3086 \pm 3 \text{ \AA}^2$). La présence d'une à deux charges supplémentaires se traduit par un déploiement progressif de ces conformations, responsable d'une augmentation significative des sections efficaces ($\Delta^{TW}CCS_{N2}$) aux états de charge 13^+ (+4.3, 5.0 et 5.3%, respectivement) et 14^+ (+9.3, 9.1 et 9.0%, respectivement). Cette sensibilité dépend de la nature du système étudié, comme en témoignent des études réalisées en présence d'agents réducteurs ou inducteurs de charge [85, 87, 88]. Malgré ces différences conformationnelles, la préservation d'interactions protéine-ligand en conditions natives suggère une conservation globale des structures tertiaires et quaternaires au sein de ces ions [89]. En conclusion, le choix du ou des états de charge natifs étudiés en IM-MS n'apparaît pas trivial et nécessite de satisfaire 2 compromis :

- Les ions considérés doivent refléter la conformation la plus compacte et native, impliquant une minimisation des répulsions coulombiennes et l'étude d'ions de charge minimale / rapport m/z maximal, pouvant justifier l'introduction d'agents réducteurs de charge (triéthylamine, imidazole) [90].
- Les ions considérés doivent être suffisamment intenses pour pouvoir être détectés puis caractérisés par IM-MS. Dans ce contexte, la perte de sensibilité liée au mode IM-MS (illustrée en figure 30), et l'analyse d'ions de rapports m/z accrus (faible nombre de charges), nécessite une optimisation avancée de la transmission.

Par ailleurs, une contrainte supplémentaire liée à la subtilité des changements conformationnels traqués doit être considérée dans le cas de complexes protéine-ligand. Contrairement aux applications IM-MS dédiées à la caractérisation structurale de systèmes multi-protéiques (partie 4), la variabilité conformationnelle ($\Delta^{TW}CCS_{N2}$) précédemment décrite entre états de charge natifs ($\approx 4-9\%$) peut devenir non négligeable au regard des faibles différences de conformation criblées ($\approx 2\%$) [59, 60]. En d'autres termes, la section efficace moyenne d'une espèce A mesurée par IM-MS (${}^{TW}\overline{CCS}_{N2}(A)$) et exprimée de la façon suivante [91-93]:

$${}^{TW}\overline{CCS}_{N2}(A) = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n {}^{TW}CCS_{N2}(A^{i+})$$

- Où i correspond à l'ensemble des états de charge de l'espèce A observés en MS native.

peut être impactée d'une erreur significative, proportionnelle à l'influence des répulsions coulombiennes sur la section efficace de ces ions. Par conséquent, les erreurs issues de ces

moyennes peuvent « masquer » une différence conformationnelle subtile entre espèces A et A:ligand. Pour s'affranchir de cette variabilité, les sections efficaces mesurées entre ces 2 espèces peuvent être comparées à état de charge identique. Cette stratégie implique néanmoins de disposer d'une distribution de charge chevauchante entre les 2 espèces comparées. Dans ce contexte, la fixation de molécules de petite taille induisant de faibles changements conformationnels, favorise le maintien d'une distribution de charge identique entre protéines et complexes protéine-ligand [23, 32, 36]. Une illustration de cet avantage peut être extrapolée de la figure précédente (Fig.8). En effet, une moyenne des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées sur les états de charge 12, 13 et 14⁺ ne permettrait plus de distinguer les espèces (QR2)₂, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ sur la base de leurs sections efficaces moyennées (3182 ± 141, 3212 ± 139 et 3234 ± 140 Å², respectivement). A l'inverse, une comparaison de ces valeurs à état de charge fixe permet une distinction non ambiguë de ces 3 espèces, le cofacteur FAD induisant un changement conformationnel plus marqué que le FMN, quel que soit l'état de charge considéré (3044 ± 3, 3068 ± 3 et 3086 ± 3 Å² à l'état de charge 12⁺, respectivement).

D'autre part, la considération d'un état de charge identique permet de s'affranchir d'une étape d'étalonnage et de détermination de sections efficaces fastidieuse dans une approche de criblage. En effet, la « simple » analyse des temps de dérive, sensibles à la charge et à la conformation globale des ions, suffit à comparer 2 espèces de charge identique sur l'unique base de leurs conformations [60, 94]. A nouveau, cette stratégie permet de s'affranchir des erreurs liées à l'application de 3 étalonnages indépendants, la précision de tels criblages ne dépendant alors que :

- De la résolution IM de la méthode.
- De la reproductibilité des temps de dérive.

2. Optimisation de la résolution de la méthode IM-MS.

La séparation des ions dans la cellule de mobilité ionique TWIMS s'effectue sous l'effet de collisions entre les molécules de gaz tampons et les ions, drainés au sein de cette cellule par un potentiel électrique sous forme de vagues (« Travelling Waves »). Comme présenté dans le paragraphe 5 de ce chapitre, le temps de passage des ions dans cette cellule (t_D) est inversement proportionnel à la mobilité ionique de l'ion (K), reliée à la charge (z) et la section efficace (Ω ou $^{TW}CCS_{N_2}$) de ce dernier par l'équation de Mason-Schamp [95]. Une séparation optimale des ions implique une maîtrise de leur temps de passage (t_D), conditionnée par 2 compromis :

- L'ion doit être suffisamment ralenti par collision avec les molécules de gaz pour permettre une séparation efficace selon sa mobilité ionique.
- La progression de l'ion dans cette cellule ne doit pas être trop lente, afin de limiter les phénomènes d'activation conformationnelle induits par collision, la diffusion des ions et assurer le vidage de la cellule TWIMS entre 2 cycles de mobilité ionique.

Le principe de fonctionnement de la cellule TWIMS permet de contrôler ce temps de dérive à travers l'optimisation instrumentale de 2 facteurs (Fig.9):

- La probabilité de collision entre molécules de gaz et ions analytes, dépendant du débit de gaz appliqué (Q_{IMS}) dans la cellule de mobilité ionique (Fig.9a).
- Le nombre de phénomènes de retour en arrière (« roll-over ») (Fig.9b). L'application de vagues de potentiel successives permet de drainer les ions dans la cellule IM. En fonction de leur mobilité ionique, les ions subissent un ralentissement par collision plus ou moins marqué, leur permettant ou non de suivre la vague initiale de potentiel n. Un mouvement contraint de retour en arrière ralentit l'ion impacté, dont le drainage se poursuivra à travers les vagues de potentiel suivantes (n+1, n+2...). La fréquence des phénomènes « roll-over » peut ainsi être modulée par optimisation de la hauteur (WH) et de la vitesse (WV) de ces vagues.

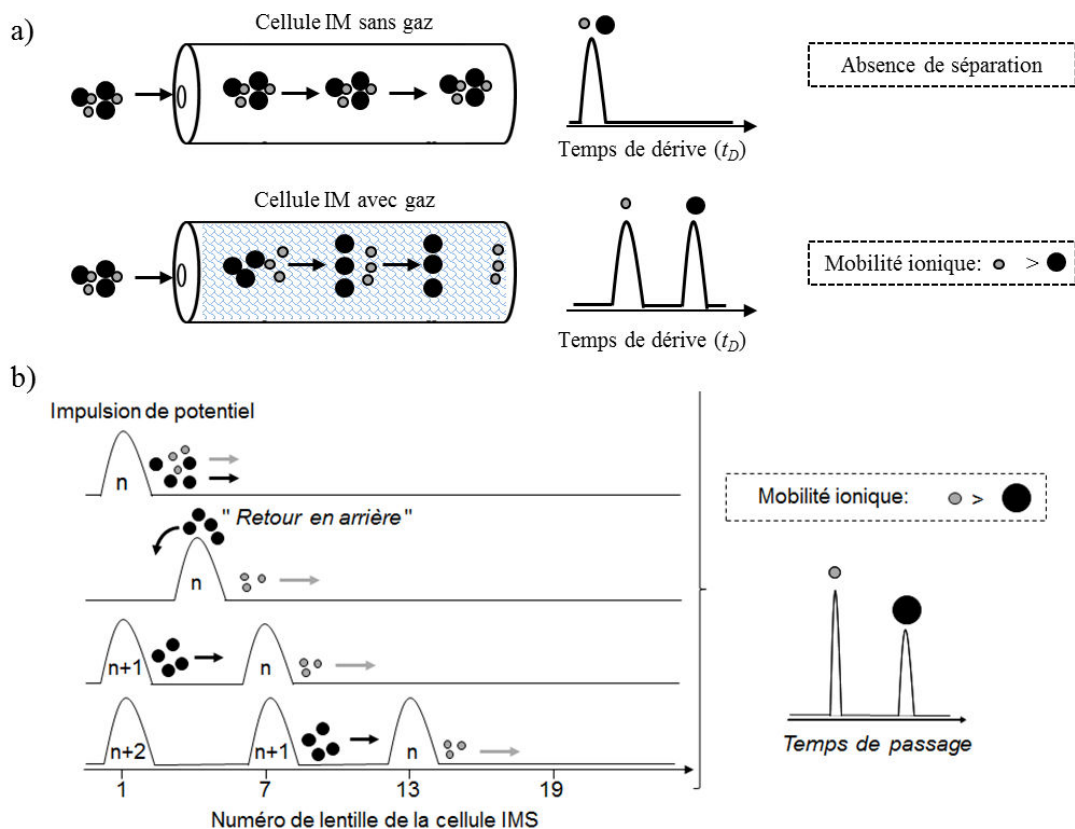


Figure 9: Séparation des ions dans la cellule TWIMS. a) Influence du gaz de mobilité ionique sur la séparation des ions. b) Influence des vagues de potentiel sur la séparation des ions, d'après [96].

2.1. Définition du pouvoir séparateur R_s .

Afin d'évaluer l'influence des paramètres IM (Q_{IMS} , WH , WV) sur la résolution conformationnelle de la méthode, une détermination du pouvoir séparateur R_s est ici rapportée. Ce facteur, proposé au laboratoire par les Drs. Cédric Atmanene et Stéphanie Petiot dans le cadre de systèmes protéine-ligand, s'appuie sur une comparaison des temps de dérive (t_D) mesurés entre 2 espèces de charge identique [60, 97]. Cette différence, uniquement liée à la conformation de ces espèces, est exprimée en fonction de la largeur à mi-hauteur des distributions de temps de dérive associées (ATDs), comme l'illustre la figure 10.

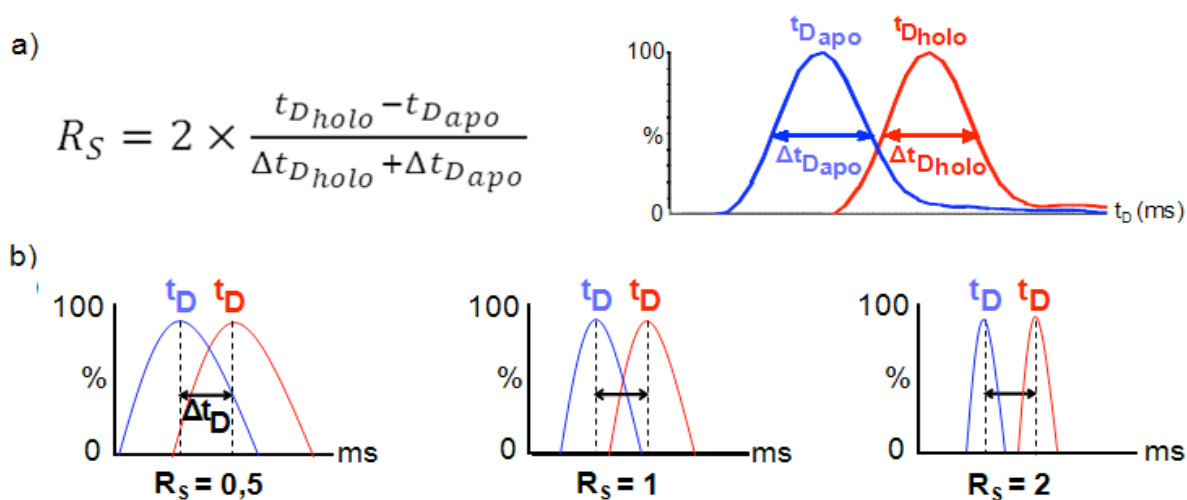


Figure 10 : Suivi de la résolution conformationnelle de la méthode IM-MS à partir du pouvoir séparateur R_s , d'après [97]. a) Expression du pouvoir séparateur R_s . b) Relation entre la différence de temps de dérive des ions (Δt_D), la largeur à mi-hauteur de leurs distributions (ATDs) et le pouvoir séparateur (R_s).

En effet, le pouvoir séparateur (R_s) accessible par IM-MS entre 2 espèces de même charge (ici apo et holo) est d'autant plus important que (Fig.10a):

- La différence de temps de dérive entre ces 2 ions est importante.
- La largeur à mi-hauteur des distributions de temps de dérive associées est minimale.

Ce facteur reflète ainsi la vallée de séparation entre 2 distributions de temps de dérive (ATDs): une valeur de 0.5 se traduit par une séparation conformationnelle à 25% de vallée, une valeur de 2 par une résolution à la ligne de base des distributions (Fig.10b).

L'identification de changements conformationnels subtils par IM-MS nécessite le développement de méthodes résolutive, pouvant être optimisées en fonction de ce facteur.

2.2. Influence des hauteurs et vitesses de vague sur la résolution IM-MS.

L'analyse IM-MS des ions 9^+ associés à la protéine PDF1B seule ou complexée à son ligand actinonine, permet de mieux comprendre l'influence des paramètres de vague sur le temps de dérive des ions et la résolution conformationnelle de la méthode (Fig.11-12).

Ces 2 espèces, détectées de façon concomitante en présence d'un mélange PDF1B:actinonine 2:1 sous-stœchiométrique, sont tout d'abord analysées par IM-MS à différentes vitesses de vague (Fig.11). La comparaison des temps de dérive obtenus à des vitesses de vague croissantes de 800 (Fig.11a), 1225 (Fig.11b) et 1440 m.s^{-1} (Fig.11c) met en évidence une augmentation globale du temps de passage des ions dans la cellule IM, quelle que soit l'espèce considérée (2.54, 8.60 et 13.45 ms pour l'espèce PDF1B apo 9^+ , respectivement). En effet, l'augmentation de cette vitesse s'accompagne d'une augmentation du nombre de vagues par cycle IMS, soit de mouvements « roll-over », retardant la progression des ions dans la cellule IM et favorisant leur séparation.

Par ailleurs, la différence de temps de dérive entre ces 2 espèces croît (0, 0.44 et 0.66 ms, respectivement) tandis que leurs distributions ATDs s'élargissent (0.53, 0.72 et 1.60 ms pour l'espèce PDF1B apo 9^+ , respectivement), synonymes d'une séparation et diffusion conformationnelle dans la cellule IM. Un compromis idéal entre ces 2 phénomènes est atteint à une vitesse de vague intermédiaire de 1225 m.s^{-1} , corroboré par une résolution conformationnelle maximale entre PDF1B apo et son complexe ($R_s = 0.59$).

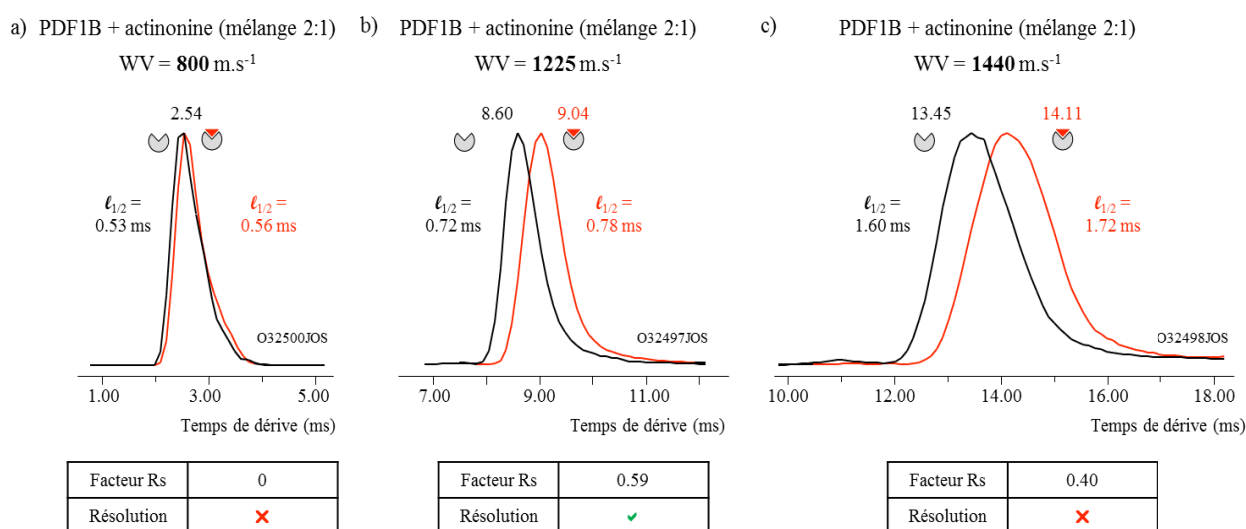


Figure 11 : Influence des vitesses de vague sur la séparation des espèces PDF1B apo et PDF1B:actinonine par IM-MS (WH : 34V, Q_{IMS} : 20 mL.min^{-1}). Les distributions de temps de dérive associées aux ions 9^+ de l'enzyme PDF1B apo (noir) et de son complexe PDF1B:actinonine 1:1 (rouge) sont ici représentées à des vitesses de vague de a) 800, b) 1225 et c) 1440 m.s^{-1} . La détermination du pouvoir séparateur R_s permet de comparer la résolution conformationnelle entre ces 3 méthodes instrumentales.

Des expériences similaires, réalisées à différentes hauteurs de vague, permettent d'évaluer l'influence de ce paramètre (Fig.12). Contrairement à la vitesse de vague, une augmentation de la hauteur de vague, de 25 (Fig.12a) à 34V (Fig.12b) s'accompagne d'une diminution globale du temps de passage des ions dans la cellule IM, quelle que soit l'espèce considérée (15.77 et 8.60 ms pour l'espèce PDF1B apo⁹⁺, respectivement). Réciproquement, l'augmentation de cette hauteur entraîne une diminution de mouvements « roll-over » par cycle IMS, favorisant la progression des ions dans la cellule IM.

Bien que les différences de temps de dérive soient plus importantes à 25 (0.77 ms) qu'à 34V (0.44 ms), l'élargissement des distributions mesurées à plus faible hauteur de vague (1.61 ms pour l'espèce PDF1B apo⁹⁺) restreint le pouvoir séparateur de la méthode ($R_s = 0.47$) et justifie le recours à une hauteur de vague de 34V.

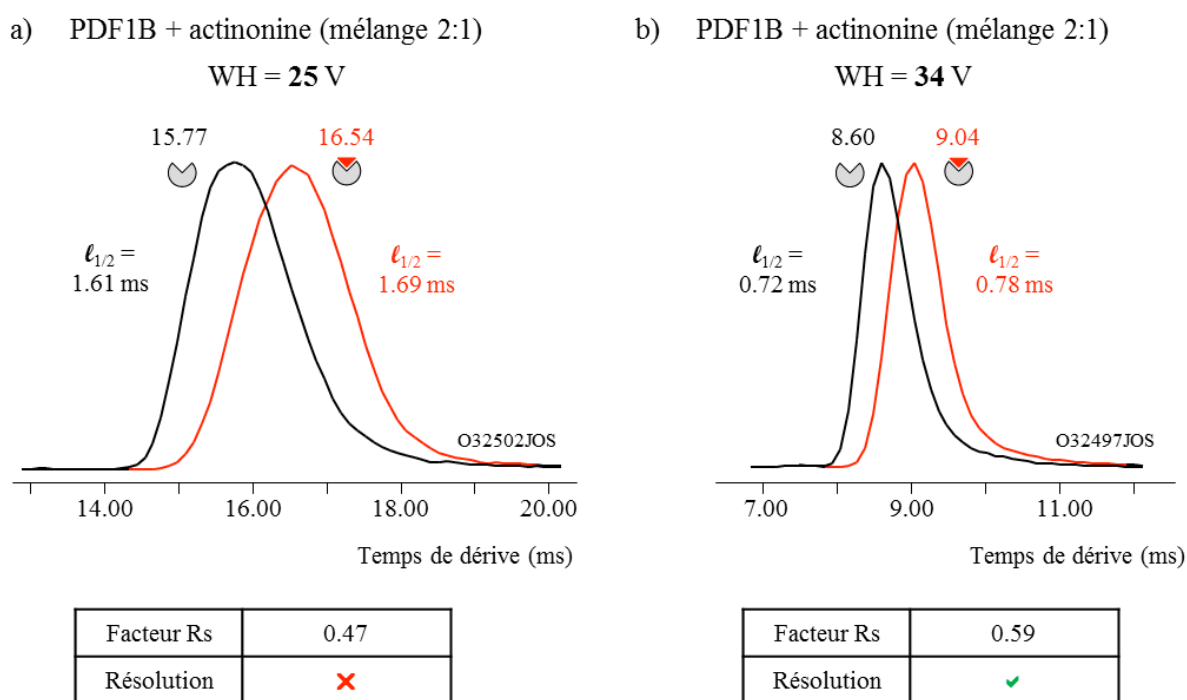


Figure 12 : Influence des hauteurs de vague sur la séparation des espèces PDF1B apo et PDF1B:actinonine par IM-MS (WV : $1225\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Q_{IMS} : $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Les distributions de temps de dérive associées aux ions 9^+ de l'enzyme PDF1B apo (noir) et de son complexe PDF1B:actinonine 1:1 (rouge) sont ici représentées à des hauteurs de vague de a) 25 et b) 34V. La détermination du pouvoir séparateur R_s permet de comparer la résolution conformationnelle entre ces 2 méthodes.

2.3. Influence du débit en gaz dans la cellule TWIMS sur la résolution IM-MS.

Parallèlement aux paramètres de vague (WV, WH) modulant la séparation IM des ions à travers le nombre de mouvements « roll-over », le débit en gaz de la cellule TWIMS (Q_{IMS}) conditionne la probabilité de collision entre ions analytes et molécules de gaz. Afin d'illustrer l'impact de ce paramètre, une analyse IM-MS du système PDF1B:actinonine précédemment

décrit est réalisée à différents débits d'azote (Q_{N_2}), gaz de mobilité ionique utilisé au cours de ces travaux (Fig.13). Afin d'éviter toute activation conformationnelle des ions, un débit d'hélium (Q_{He}) 4 fois supérieur à celui de l'azote est maintenu en amont de la zone de séparation IM, favorisant la thermalisation des ions [98]. Dans ce contexte, une augmentation du débit d'azote de 15 (Fig.13a) à 40 mL.min⁻¹ (Fig.13c) s'accompagne d'une augmentation du temps de dérive des espèces (8.82 à 11.36 ms pour l'espèce PDF1B apo⁹⁺, respectivement), en accord avec une fréquence de collision accrue et un ralentissement des ions. A nouveau, une comparaison du pouvoir séparateur de ces méthodes révèle une résolution conformationnelle optimale en présence d'un débit d'azote de 20 mL.min⁻¹ (Fig.13b, $R_s = 0.59$)

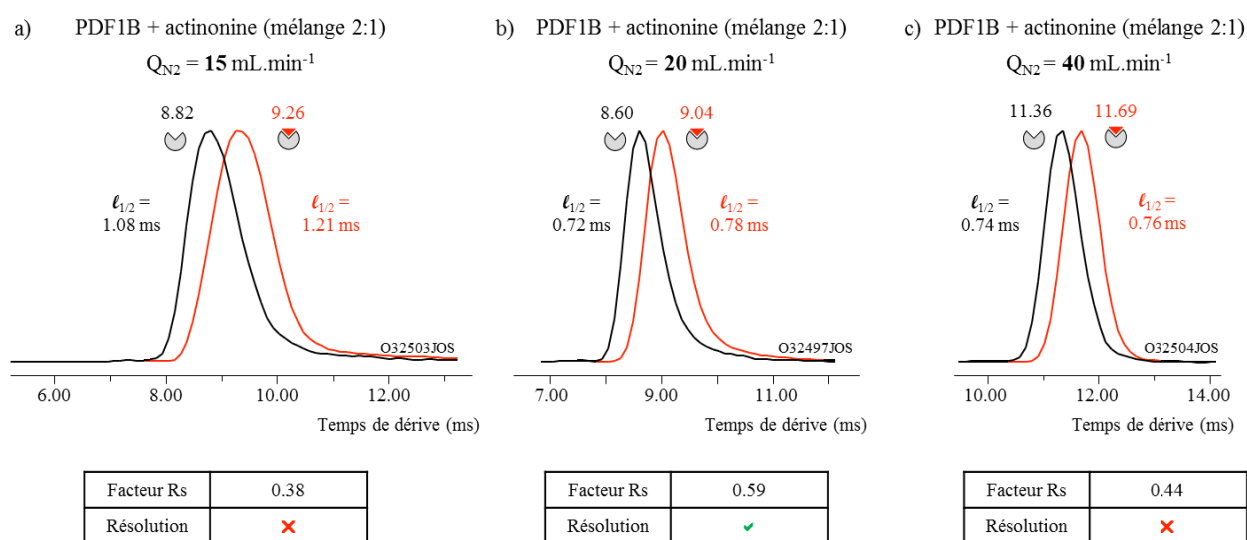


Figure 13 : Influence du débit de gaz IM (N_2) sur la séparation des espèces PDF1B apo et PDF1B:actinonine par IM-MS (WV : 1225m.s⁻¹, WH : 34V). Les distributions de temps de dérive associées aux ions 9⁺ de l'enzyme PDF1B apo (noir) et de son complexe PDF1B:actinonine 1:1 (rouge) sont ici représentées à des débits d'azote de a) 15, b) 20 et c) 40mL.min⁻¹. La détermination du pouvoir séparateur R_s permet de comparer la résolution conformationnelle entre ces 2 méthodes. Un rapport Q_{He} / Q_{N_2} de 4 est maintenu constant au sein de ces expériences afin d'éviter un « échauffement » conformationnel des ions.

3. Influence de la variabilité instrumentale sur la résolution IM-MS.

La résolution conformationnelle décrite par le pouvoir séparateur R_s , implique une reproductibilité des temps de dérive t_D mesurés entre 2 espèces de même charge, soit de la différence Δt_D . En effet, les erreurs associées à ces valeurs sont inversement proportionnelles à la résolution du criblage IM-MS basé sur l'exploitation des temps de dérive. Cette reproductibilité implique une faible variabilité d'ordre instrumentale, se traduisant par :

- Une stabilité électronique et l'application de potentiels électriques constants (WH, WV).
- Une stabilité des pressions au sein de la cellule IM-MS (P_{IMS}).
- Une stabilité de spray et la production d'ions de désolvatation et conformation identiques.

Afin d'évaluer cet impact, une comparaison des temps de dérive mesurés en triplicats analytiques (sprays différents, temps différents) entre les espèces 9^+ associées à PDF1B apo et holo est ici présentée (Fig.14). Le criblage IM-MS réalisé porte sur 2 mélanges sous-stœchiométriques individuels, permettant une détection concomitante :

- Des espèces 9^+ associées à PDF1B apo et au complexe PDF1B:actinonine 1:1 (Fig.14a).
- Des espèces 9^+ associées à PDF1B apo et au complexe PDF1B:2I 1:1 (Fig.14b).

Les temps de dérive mesurés en triplicats analytiques (#1 à 3) sur le premier mélange (Fig.14a) donnent des moyennes inter-réplicats de 8.67 ± 0.06 et 9.11 ± 0.06 ms pour les espèces PDF1B apo 9^+ et PDF1B:actinonine 9^+ . Les erreurs mesurées sur ces valeurs absolues (0.06 ms) sont le reflet de cette variabilité instrumentale. La détection concomitante de ces 2 espèces au sein de chaque réplicat permet néanmoins de s'affranchir de cette variabilité (même spray, même acquisition) en ne considérant que la différence relative de temps de dérive Δt_D holo / apo. Cette différence apparaît conservée, quels que soit le réplicat considéré et les temps de dérive absolus mesurés (0.44 ± 0.00 ms).

Afin de comparer les changements de conformation induits par les ligands actinonine et 2I, des expériences similaires sont menées en présence du second mélange à partir de la même méthode IM-MS (Fig.14b). Les temps de dérive mesurés en triplicats analytiques (#1 à 3) donnent des moyennes inter-réplicats de 8.67 ± 0.06 et 9.00 ± 0.06 ms pour les espèces PDF1B apo 9^+ et PDF1B:2I 9^+ . En conséquent, une comparaison des temps de dérive moyens entre les espèces PDF1B:actinonine 9^+ (9.11 ± 0.06 ms) et PDF1B:2I 9^+ (9.00 ± 0.06 ms) ne révèle pas de différences conformationnelles significatives entre ces espèces.

Néanmoins, la différence relative de temps de dérive Δt_D holo / apo apparaît reproductible entre chaque réplicat (0.33 ± 0.00 ms) et s'avère significativement inférieure à celle mesurée sur le premier mélange (0.44 ± 0.00 ms). En conclusion, la variabilité instrumentale s'exprimant à travers les erreurs mesurées sur les temps de dérive absolus (± 0.06 ms) ne peut être négligée devant la subtilité des changements conformationnels traqués. L'avantage d'une détection concomitante d'espèces holo et apo permet ainsi un gain de résolution en limitant l'impact de cette variabilité. La conservation des différences relatives de temps de dérive (0.44 ± 0.00 ms et 0.33 ± 0.00 ms pour les couples PDF1B:actinonine 9^+ /PDF1B apo 9^+ et PDF1B:2I 9^+ /PDF1B apo 9^+) au sein de chaque réplicat analytique, souligne l'existence de 2 types de changement conformationnel subtils, induits en présence des ligands actinonine et 2I.

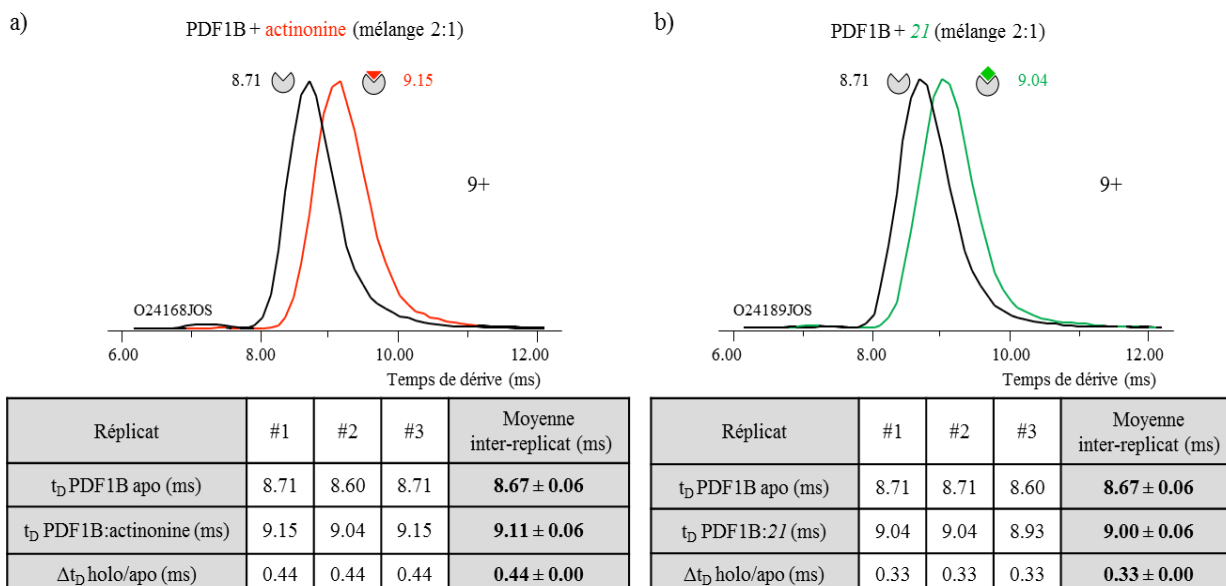


Figure 14: Influence de la variabilité instrumentale sur la reproductibilité des temps de dérive t_D . L'analyse IM-MS des mélanges individuels a) PDF1B:actinonine et b) PDF1B:2I (titrage 2:1) permet une détection concomitante des espèces PDF1B apo et holo 9^+ . Une mesure de leurs temps de dérive absolus (t_D) et de leurs différences relatives (Δt_D holo / apo) au sein de triplicats analytiques permet d'évaluer l'impact de la variabilité instrumentale sur la résolution conformationnelle accessible par IM-MS.

4. Optimisation de la sensibilité de la méthode IM-MS.

La mise en évidence d'une perte de sensibilité liée au passage du mode MS native au mode IM-MS (Fig.30), nécessite une (ré)optimisation de la transmission des ions [99]. Dans cette optique, certaines tensions d'accélération (voltage de cône Vc, énergie de collision Trap CE, voltage Trap Bias) et pressions (pression en source Pi, pression en cellule Trap, pression en gaz de thermalisation He) appliquées en amont de la région de séparation TWIMS, doivent être ajustées afin :

- De garantir une sensibilité suffisante à l'analyse IM-MS.
- De ne pas altérer la conformation native et compacte des ions étudiés.

4.1. Compromis entre transmission et activation conformationnelle des ions.

Pour illustrer ce compromis, l'impact de l'énergie de collision Trap (Trap CE) sur l'intensité et le profil de distribution de temps de dérive (ATD) des ions 9^+ associés au complexe PDF1B:2I 1:1 est ici rapporté (Fig.15). L'application d'une faible énergie de collision (4V, Fig.15a) se traduit par un profil ATD gaussien, centré sur un temps de dérive de 11.14 ms. Néanmoins, cette distribution présente une intensité limitée (3.10^4 coups combinés sur 29 scans). L'application d'une tension optimale de 12V (Fig.15b) permet de multiplier cette intensité par un facteur 3 (9.10^4 coups), sans modifier le profil de distribution ATD.

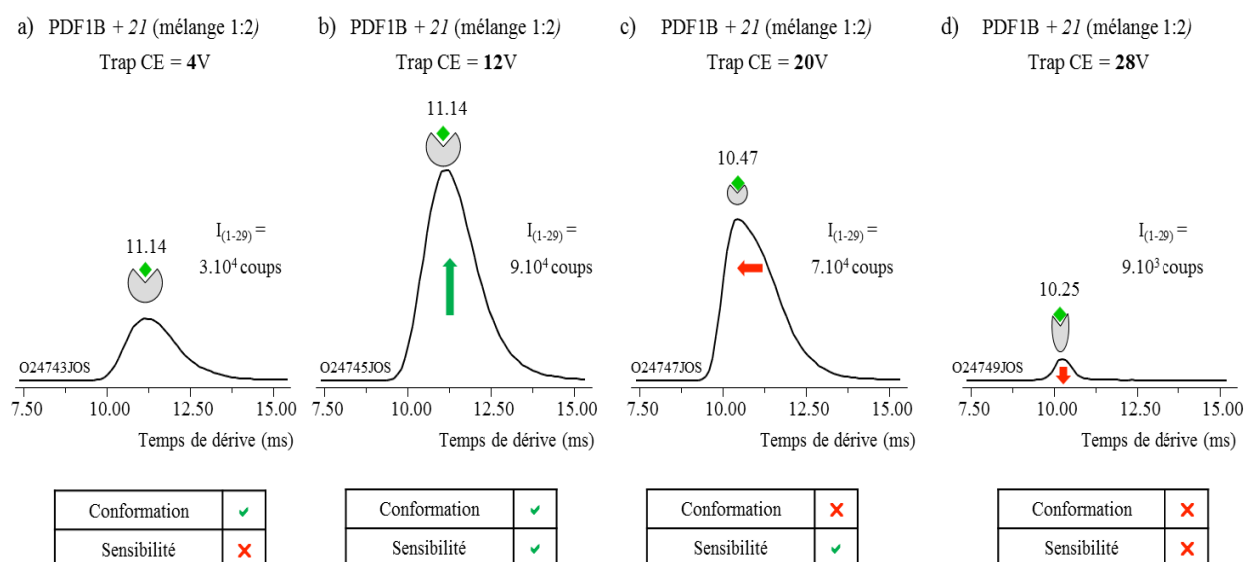


Figure 15 : Influence de l'énergie de collision Trap (Trap CE) sur la transmission et activation conformationnelle des complexes PDF1B:2I (WV : 1225m.s⁻¹, WH : 34V, Q_{N2} : 20mL.min⁻¹, Q_{He}/Q_{N2} : 4). La distribution des temps de dérive associée aux ions 9⁺ du complexe PDF1B:2I 1:1 (ATD) est ici représentée à des énergies de collision Trap de a) 4, b) 12, c) 20 et d) 28V. Le temps de dérive moyen et l'intensité de ces ATDs sont ici mesurés à l'apex des signaux (total de 29 scans).

Au-delà de cette tension, une déformation progressive du profil ATD et une diminution de son intensité sont observées. A 20V (Fig.15c), un décalage du profil ATD vers des temps de dérive inférieurs est rapporté ($t_D = 10.47$ ms), suggérant une activation conformationnelle des espèces PDF1B:ligand 9⁺, à l'origine de leur compaction. Cette compaction artefactuelle est exacerbée à 28V (Fig.15d), le temps de dérive des ions continuant à décroître ($t_D = 10.25$ ms). Par ailleurs, une diminution drastique de l'intensité du signal ATD est observée ($9 \cdot 10^3$ coups), s'expliquant par une dissociation partielle du complexe, à l'issue de son activation conformationnelle. Cet équilibre fragile souligne l'importance de ces paramètres dans « l'échauffement » conformationnel des ions, également mise en évidence par l'étude d'ions thermomètres dans la littérature [98, 100, 101].

4.2. Introduction au criblage de la stabilité conformationnelle des ions par IM-MS.

Bien que de telles distorsions conformationnelles soient à proscrire des expériences d'IM-MS native, certaines informations structurales peuvent néanmoins être extraites de ces profils d'activation [45, 102]. En effet, l'étude de la stabilité conformationnelle des ions en phase gazeuse offre une perspective de contournement des limites de résolution IM-MS, pouvant permettre de cribler 2 structures tertiaires partageant la même « enveloppe » conformationnelle (t_D et $^{TW}CCS_{N_2}$ identiques) [64]. Ces expériences reposent sur une détermination du profil d'activation conformationnel des ions, initié en amont de la cellule de mobilité ionique par collision avec des molécules de gaz. Cette activation, généralement

réalisée en cellule Trap, est provoquée par une accélération des ions en présence d'argon. Les collisions résultantes contribuent ainsi à une augmentation de l'énergie interne des ions, pouvant conduire à une activation conformationnelle et/ou à une dissociation du complexe non-covalent [103]. Le suivi IM-MS de ces phénomènes permet d'étudier le profil d'activation conformationnel des ions, dont la nature (compaction, décompaction) est reliée à la stabilité des structures tertiaires et à la charge portée par ces espèces [48, 104]. La comparaison de ces empreintes peut ainsi permettre un criblage de ligands, basé sur la stabilité conformationnelle induite au sein des complexes [62, 63].

Une illustration de cette approche est ici proposée en figure 16. Le complexe $(\text{QR2-FAD})_2$ formé entre l'enzyme QR2 et son cofacteur FAD est analysé par IM-MS à différentes énergies de collision Trap. La distribution des temps de dérive associée à l'ion 14^+ est ainsi extraite entre 20 et 70V. La comparaison des profils ATDs révèle l'existence d'une conformation compacte et unique (vert) à de faibles énergies (20, 30V), associée à un faible temps de dérive ($t_D \approx 15$ ms). L'augmentation de cette énergie (40 à 60V) s'accompagne d'un élargissement puis d'un décalage de la distribution vers des temps de dérive supérieurs ($t_D \approx 16.5$ ms), relatifs au déploiement de la conformation compacte et à l'apparition d'un intermédiaire conformationnel (bleu). Ce phénomène de déploiement se poursuit à des énergies supérieures (60, 70V), déplaçant l'équilibre vers une forme décompactée (rouge), de temps de dérive accru ($t_D \approx 17.5$ ms). Cette signature, propre à l'espèce $(\text{QR2-FAD})_2 14^+$, peut ainsi être comparée en fonction de la nature du cofacteur, à état de charge identique et dans des conditions instrumentales similaires. La recherche de différences qualitatives (nature des conformères) et quantitatives (énergies de transition conformationnelle, intensité relative des conformères) entre de telles empreintes permet d'étendre les criblages IM-MS à la stabilité des conformations.

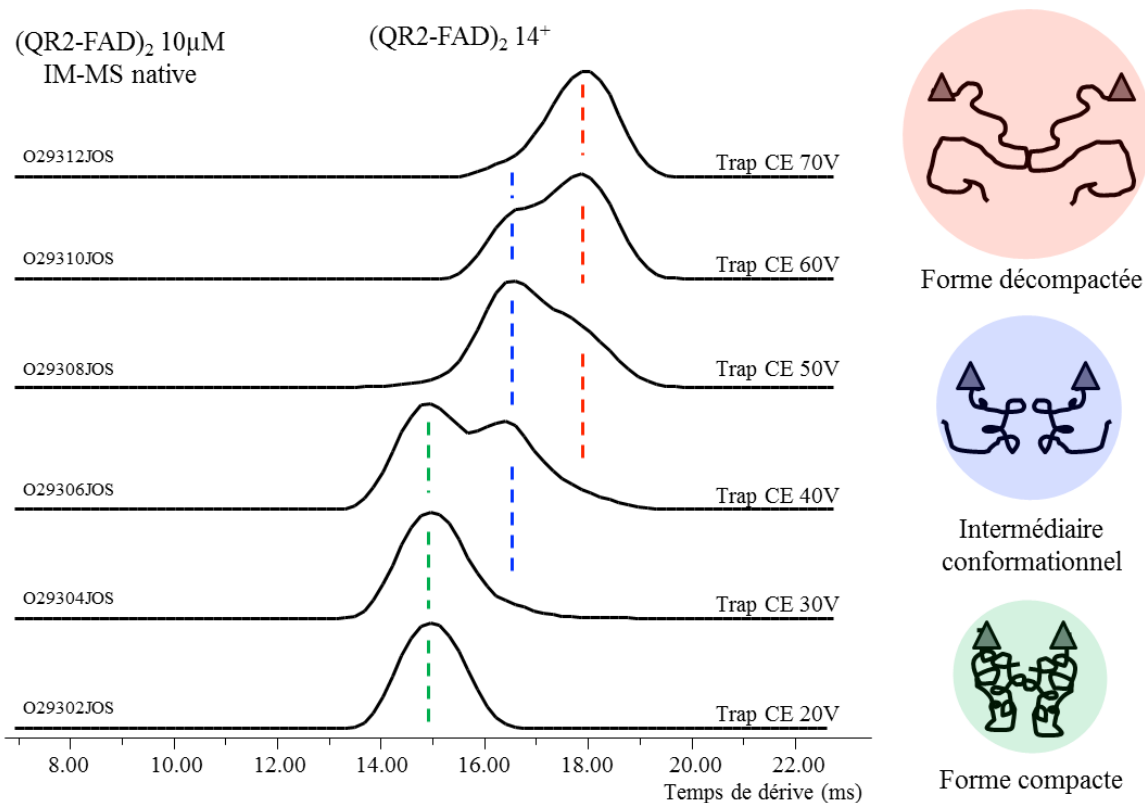


Figure 16 : Détermination de la stabilité conformationnelle du complexe $(QR2-FAD)_2$ en phase gazeuse. L'analyse IM-MS de ce complexe à différentes énergies de collision Trap (20 à 70V) permet un suivi de la distribution des temps de dérive (ATD) associée à l'espèce 14^+ . La comparaison des profils obtenus met en évidence un déploiement conformationnel de l'ion, transitant d'une forme compacte (vert) à une forme décompactée (rouge) à travers la formation d'un intermédiaire conformationnel de compaction intermédiaire (bleu).

5. Mesure de la section efficace $^{TW}CCS_{N_2}$ des ions sur la cellule TWIMS du Synapt G2.

5.1. Synchronisation de la cellule TWIMS et de l'analyseur TOF.

Le fonctionnement synchronisé de la cellule TWIMS et de l'analyseur TOF du Synapt G2 en mode IM-MS, permet un couplage entre ces 2 dimensions de séparation (Fig.17a). L'analyseur TOF, situé en aval de la cellule TWIMS, présente un temps de cycle ($t_{TOF} = 30-200\mu s$, selon la gamme m/z analysée) inférieur à celui de la cellule TWIMS ($t_{IM} = 5-40ms$) [73]. Cette différence d'échelle de temps permet un échantillonnage des ions au sein des cycles TOF consécutifs, au fur et à mesure de leur « élution » de la cellule de mobilité ionique. Chaque cycle IM se compose d'un nombre fixe de 200 cycles TOF (Fig.17b). Les ions, accumulés dans la cellule Trap, sont injectés de manière contrôlée au sein de la cellule TWIMS, initiant le décompte de ces 200 cycles TOF [105]. Le temps de dérive t_D des ions peut ainsi être calculé par identification des cycles TOF conduisant à leur détection en masse (m/z). Le temps de cycle t_{TOF} étant connu, le temps de dérive t_D d'un ion détecté dans le spectre de masse associé au 100^e cycle TOF est donc égal au produit de ces 2 grandeurs ($t_D = 100 \times t_{TOF}$). Cette synchronisation

permet l'utilisation d'un unique détecteur, en mode MS comme IM-MS. L'achèvement du 200^e et dernier cycle TOF marque la fin du cycle IM en cours, s'accompagnant d'une réinitialisation du comptage et de l'injection d'un nouveau paquet d'ions dans la cellule TWIMS. Il est important de préciser que la séparation des ions obtenue en sortie de cellule TWIMS, est préservée jusqu'à leur arrivée sur le détecteur [105].

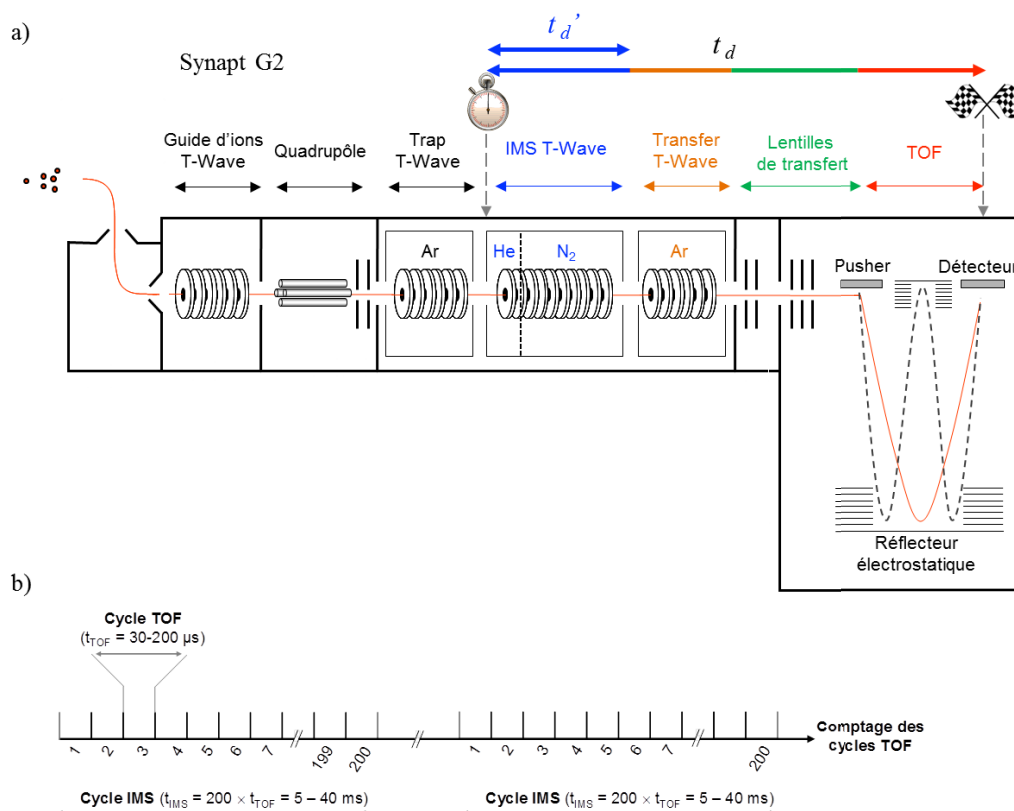


Figure 17 : Synchronisation a) spatiale et b) temporelle entre la cellule TWIMS et l'analyseur TOF de l'instrument Synapt G2, adaptée de [73]. Le temps de dérive t_D , défini à partir du nombre de cycles TOF écoulés et de leur durée (t_{TOF}), correspond au temps passé par l'ion depuis son injection dans la cellule TWIMS jusqu'à sa détection en masse (m/z). La correction de cette valeur permet de retrancher le temps passé par l'ion en aval de la cellule TWIMS, donnant accès à son temps de dérive réel t_D' .

5.2. Correction du temps de dérive.

Le temps de dérive t_D' réellement parcouru par les ions au sein de la cellule TWIMS, nécessite de retrancher à la valeur t_D précédemment définie, le temps passé par ces ions dans la cellule Transfer, entre la cellule Transfer et le « pusher » (lentilles de transfert), ainsi que dans l'analyseur TOF (Fig.17a) [99]. Ces 3 contributions peuvent être évaluées expérimentalement :

- Le temps de passage de l'ion dans la cellule Transfer ($t_{Transfer}$) est relié à la vitesse de déplacement de la vague T-Wave ($WV_{Transfer}$) drainant cet ion en l'absence de phénomènes « roll-over » et à la longueur de cette cellule ($L_{Transfer}$, 10cm), selon l'équation (1):

$$t_{Transfer} = \frac{L_{Transfer}}{WV_{Transfer}} \quad (1)$$

- Le temps passé par l'ion entre la cellule Transfer et le « pusher » ($t_{Transfer-Pusher}$) dépend du rapport m/z de l'ion et d'une constante instrumentale « c », égale à 1.41 pour une gamme m/z n'excédant pas 5000 Th ou 1.57 au-delà de cette limite [97]. Ce dernier est défini par l'équation (2):

$$t_{Transfer-Pusher} = c \times \frac{\sqrt{m/z}}{1000} \quad (2)$$

- Le temps de passage de l'ion dans l'analyseur TOF ($t_{TOF\ m/z}$) est proportionnel à la racine carré de son rapport m/z [106], et peut être calculé à partir de l'équation (3) :

$$t_{TOF\ m/z} = 0.044 \times \frac{\sqrt{m/z}}{1000} \quad (3)$$

5.3. Etalonnage de l'instrument et mesure de sections efficaces ^{TW}CCS_{S_{N2}}.

Dans une cellule de mobilité ionique conventionnelle de type « Drift Tube » ou DTIMS, la mobilité ionique d'un ion (K , exprimée en $m^2.V^{-1}.s^{-1}$) est donnée par le rapport entre sa vitesse de dérive au sein de la cellule (v_D , $m.s^{-1}$) et le champ électrique appliqué dans cette dernière (E , $V.m^{-1}$) [107]. La vitesse v_D peut être déterminée expérimentalement à partir du temps de dérive mesuré (t_D , s) et de la longueur de la cellule de mobilité (L , m) (équation 4) :

$$K = \frac{v_D}{E} = \frac{L}{E \times t_D} \quad (4)$$

La comparaison de cette grandeur K entre différents instruments, nécessite sa normalisation en fonction de la température (T , en Kelvin) et de la pression (P , en Torr) appliquées dans la cellule IM [107]. Cette normalisation permet une expression de K sous forme de mobilité réduite K_0 , corrigée à partir des valeurs de pression ($P_0 = 760$ Torr) et de température ($T_0 = 273.15$ K) standards [108] (équation 5) :

$$K_0 = K \times \frac{P}{P_0} \times \frac{T_0}{T} = K \times \frac{P}{760} \times \frac{273.15}{T} = \frac{L}{E \times t_D} \times \frac{P}{760} \times \frac{273.15}{T} \quad (5)$$

La détermination de la mobilité réduite K_0 d'un ion permet de remonter à sa section efficace ou CCS à partir de l'équation de Mason-Schamp (6) [109-111]. Cette dernière relie la mobilité réduite K_0 de l'ion à la charge de l'électron ($e = 1.6.10^{-19}$ C), la constante de Boltzmann ($k_b = 1.38.10^{-23}$ J.K⁻¹), la température de la cellule de mobilité ionique (T , en K), la densité de

nombre (N, m^{-3}) et la masse molaire ($M_{gaz}, kg.mol^{-1}$) du gaz de mobilité utilisé, la masse molaire ($M_{ion}, kg.mol^{-1}$) et le nombre de charge (z) de l'ion, et sa section efficace (Ω, m^2) :

$$K_0 = \frac{3 \times e \times z}{16N} \times \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T} \times \left(\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}} \right)} \times \frac{1}{\Omega} \quad (6)$$

La combinaison des équations (5) et (6) fournit une expression directe de la section efficace de l'ion (Ω) en fonction de son temps de dérive (t_D'), de sa masse (M_{ion}) et de sa charge (z) (équation 7). La mesure de ces 3 variables par IM-MS permet de résoudre cette équation, dont les constantes physiques (e, k_b, Π) et les paramètres expérimentaux (N, T, P, M_{gaz}, E, L) sont connues :

$$\Omega = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T} \times \left(\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}} \right)} \times \frac{z \times t_D' \times E}{L} \quad (7)$$

L'équation de Mason-Schamp ici décrite (7) n'est applicable qu'en présence de champs électriques E réduits, et nécessite que ces derniers soient linéaires et uniformes [110, 112]. Contrairement à une cellule DTIMS, le champ électrique E appliqué dans la cellule TWIMS, bien que réduit, s'avère non linéaire et varie dans le temps ainsi que dans l'espace [105, 113]. La détermination de sections efficaces en azote par TWIMS ($^{TW}CCS_{N_2}$) s'effectue donc à l'aide d'un étalonnage, en présence de protéines étalons dont les CCSs ont été préalablement mesurées par DTIMS, généralement en hélium ($^{DT}CCS_{He}$) [107]. Il est important de préciser que le choix de ces étalons n'est pas trivial, et conditionne la justesse des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées sur l'analyte [60, 114]. Une illustration de cette influence est rapportée en partie 4 de ce manuscrit. La génération de courbes d'étalonnage s'effectue par une analyse IM-MS concomitante des étalons et de l'analyte, dans des conditions instrumentales identiques. Concrètement, l'objectif consiste :

- A établir une relation mathématique entre les temps de dérive t_D' mesurés par TWIMS sur les ions étalons, et leurs CCSs déterminées par DTIMS ($^{DT}CCS_{He}$).
- A appliquer cette relation (« étalonnage ») aux t_D' mesurés par TWIMS sur les ions analytes, permettant une mesure de leurs $^{TW}CCS_{N_2}$.

Pour cela, l'équation de Mason-Schamp (7) est tout d'abord exprimée à partir de Ω' , défini par:

$$\Omega' = \frac{\Omega}{z \times \sqrt{\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}}} = A \times \frac{t_D' \times E}{L} \quad (8)$$

Avec :

$$A = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \quad (9)$$

L'équation (8) permet une expression de la section efficace corrigée des ions étalons (Ω' , DTIMS) en fonction de leur temps de dérive mesuré ($t_{D'}$, TWIMS). Cette relation, de type $\Omega' = f(t_{D'})$, est ajustable à une fonction mathématique de type puissance (équation 10) [105, 107]:

$$\Omega' = a \times t_{D'}^b \quad (10)$$

D'expression logarithmique :

$$\ln(\Omega') = \ln(a) + b \times \ln(t_{D'}) \quad (11)$$

L'équation (11) permet une détermination graphique des constantes mathématiques a, b et R^2 , où a correspond à un facteur correctif de la température, b à un facteur correctif de la non linéarité de la cellule TWIMS, et R^2 au coefficient de corrélation de cette droite [105]. Connaissant a et b, la combinaison des équations (10) et (8) s'achève par l'obtention d'une droite d'étalonnage, définie par :

$$\Omega = a \times t_D'' \quad (12)$$

Avec :

$$t_D'' = t_{D'}^b \times z \times \sqrt{\left(\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}\right)}$$

La droite d'étalonnage (12) permet ainsi de mesurer la section efficace Ω de l'ion analyte ($^{TW}CCS_{N_2}$), dont la masse, la charge et le temps de dérive sont extraits de l'analyse IM-MS.

6. Calcul de CCSs théoriques à partir de structures de haute résolution.

Les structures de haute résolution disponibles sur les biomolécules étudiées (cristallographie, RMN, cryo-microscopie électronique) peuvent être utilisées dans une approche de simulation, permettant d'en prédire la CCS théorique. En effet, la section efficace rotationnellement moyennée d'une molécule ionisée (CCS), se définit mathématiquement comme l'intégrale de collision (Ω) s'exerçant entre atomes de l'ion et atomes de gaz au sein de la cellule IM, définie par l'équation (13) suivante [111, 115]:

$$\Omega(T) = k \int_0^\infty d\varepsilon \int_0^\pi d\alpha f(\varepsilon, T) \sigma(\varepsilon, \alpha) (1 - \cos \alpha) \quad (13)$$

Où k correspond à une constante, α l'angle de déviation de l'ion après collision, $f(\varepsilon, T)$ la distribution d'énergie cinétique ε dans un gaz de température T , et $\sigma(\varepsilon, \alpha)$ la probabilité de distribution de l'angle α pour des trajectoires d'ion d'énergie cinétique ε . En d'autres termes, la

section efficace Ω d'un ion peut être calculée par simulation et intégration des collisions (énergies, géométries) entre le gaz tampon et ses atomes, dont les coordonnées cartésiennes (x,y,z) sont fournies par la structure de haute résolution. Cette simulation, facilement applicable à des molécules sphériques, se complexifie en présence de géométries plus irrégulières, et repose sur l'application de différents algorithmes. Le logiciel Mobcal, développé par l'équipe de Jarrold et modifié selon les propositions de Ruotolo *et al.* [99], est ici utilisé au cours de ces travaux. Ce dernier permet un calcul de CCS théorique selon 3 algorithmes [116, 117]:

- L'algorithme « Projection Approximation » (PA) assimile les atomes de la molécule à des sphères dures, et la géométrie de cette dernière à une sphère. Cette considération facilite la simulation, la section efficace Ω pouvant être définie comme l'aire projetée de la sphère sur un plan, moyennée sous différentes orientations [118]. La méthode PA, n'intégrant pas les collisions entre atomes, s'avère la plus rapide mais sous-estime généralement la CCS des protéines [119]. En effet, la concavité de ces molécules non planes n'est ici pas prise en compte. Une version optimisée de cet algorithme, appelée « Projection Super Approximation », a récemment été développée, corrigeant cette erreur par la détermination d'un facteur de concavité [120, 121].
- L'algorithme « Exact Hard Sphere Scattering » (EHSS) propose une meilleure estimation de la section efficace Ω , ce dernier simulant les trajectoires de collision entre atomes [117]. Néanmoins, l'assimilation des atomes à des sphères dures conduit à occulter de potentielles interactions entre atomes d'ions et de gaz par effet de dipôles induits, pouvant affecter les trajectoires simulées, soit la valeur Ω .
- L'implémentation d'un potentiel de Lennard-Jones plus réaliste au sein de l'algorithme « Trajectory Method » (TM), permet une estimation plus fidèle de Ω [116]. Cette méthode, reposant sur une simulation des trajectoires de collision, fournit les valeurs de CCS les plus fiables. Cependant, la complexité de cet algorithme nécessite un temps de calcul plus important que les méthodes PA et EHSS.

L'application de ces 3 méthodes, aujourd'hui complétées par de nouveaux algorithmes (PSA, IMPACT) [120, 122], permet une comparaison entre CCSs théoriques et $^{TW}CCS_{S_{N_2}}$ expérimentales. Néanmoins, la pertinence de ces comparaisons implique de considérer l'état physique de la structure simulée (solide, liquide), son nombre d'atomes, le type d'atome et la nature du gaz exploités par l'algorithme [60, 123, 124].

En l'absence de structures de haute résolution, une estimation grossière de la CCS d'une protéine à partir de sa masse reste possible, par application de l'équation (14) suivante [99] :

$$\Omega = 2.435 \times M^{2/3} \quad (14)$$

Néanmoins, cette approximation suppose une conformation sphérique ainsi qu'une densité atomique constante au sein de la protéine.

7. Conclusions.

L'optimisation des conditions instrumentales en IM-MS native conditionne l'obtention d'informations fiables sur la conformation de complexes non-covalents en solution et leur stabilité conformationnelle en phase gazeuse. La subtilité des changements conformationnels suivis nécessite une optimisation récurrente des paramètres présentés, propre à chaque système étudié. L'application de ces développements méthodologiques au criblage de complexes protéine-ligand par IM-MS native, est abordée dans les chapitres 5 et 6 suivants.

Chapitre 3 : Etude d'un complexe enzyme/substrat par MS native : le système PRMT6/SAH/peptide H4.

1. Présentation du contexte biologique.

La méthylation des arginines constitue une modification post-traductionnelle répandue chez les mammifères, modulant la reconnaissance et l'activité biologique de nombreuses protéines cytoplasmiques et nucléaires [125]. Cette réaction, catalysée par une classe ubiquitaire d'enzymes appelées protéines arginine méthyltransférase (PRMTs) et constituée de 9 membres (PRMT 1 à 9), se décline en 3 classes (I, II, III), distinctes par le nombre et la position du ou des groupement(s) méthyles transférés [126] (Fig.18). Chaque classe catalyse la monométhylation du groupement guanidine (MMA) au sein de motifs riches en glycine et arginine (GAR). A l'exception de la classe III (PRMT 7), cet intermédiaire sert à nouveau de substrat aux enzymes de classe I (PRMT 1, 3, 4, 6, 8) et II (PRMT 5), assurant respectivement la diméthylation asymétrique (ADMA) ou symétrique (SDMA) de la chaîne latérale.

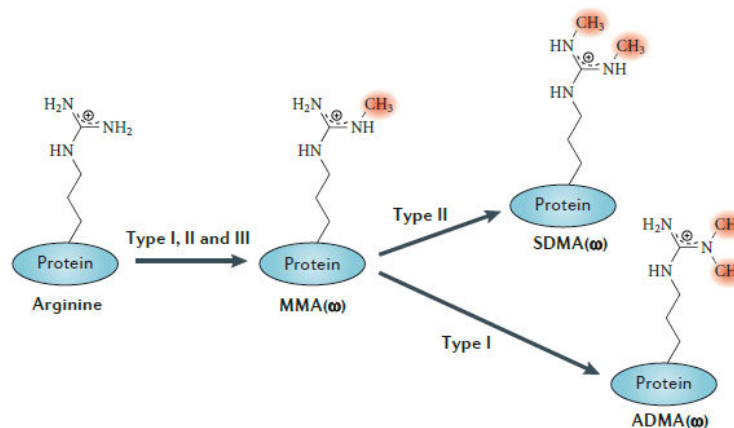


Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes de méthylation catalysés par les 3 classes d'enzymes PRMT, d'après [126]. Les enzymes de classe I, II et III catalysent conjointement la formation de monométhylarginine (MMA) sur l'un ou l'autre des azotes situés en position ω , chimiquement équivalents. L'ajout d'un second groupement méthyle est observé en présence des enzymes de type I (PRMT 1, 2, 3, 6, 8) et II (PRMT 5 et 7), assurant respectivement la diméthylation asymétrique ou symétrique de la chaîne latérale.

Le large spectre de protéines substrats recouvert par chacune de ces enzymes implique les PRMTs dans la régulation de nombreux processus biologiques, dont l'activation et répression de la transcription, l'épissage alternatif, la réparation de l'ADN ou encore la transduction du signal [127-130]. Plus récemment, la mise en évidence d'une surexpression de ces enzymes dans certains types de cancer, dont l'isoforme nucléaire PRMT6 (classe II), a souligné le

potentiel thérapeutique de cette cible, nécessitant une compréhension approfondie de sa structure et de son mécanisme enzymatique [131, 132]. Dans cette optique, des études structurales et enzymatiques menées sur le variant humain (HsPRMT6) en présence de différents cosubstrats donneurs (S-Adénosylméthionine, SAM et son analogue inactif S-adénosyl-L-homocystéine, SAH) et substrats accepteurs (peptides de l'histone H4 et de la fibrillarine, non méthylés ou monométhylés) de groupement méthyle, ont été réalisées [133-136]. Ces résultats supportent une homodimérisation de la protéine favorisée par le recrutement du cosubstrat SAM, chaque monomère constituant une sous-unité catalytique active composée de 2 sites de fixation distincts pour le donneur et l'accepteur. Néanmoins, le mécanisme enzymatique de cette réaction demeure controversé. En effet, deux modèles antagonistes ont été proposés (Fig.19):

- Le premier (Fig.19a) impliquerait une fixation et un relargage ordonnés des (co)substrats et produits. Dans ce schéma, le recrutement du cosubstrat SAM précéderait le recrutement du substrat peptidique monométhylé, le relargage du SAH succéderait à la libération du peptide asymétriquement diméthylé [133].
- Le second (Fig.19b) reposerait sur une fixation aléatoire des 2 (co)substrats, médiée par leurs affinités respectives. La catalyse effectuée, les produits de réaction seraient également relargués du complexe ternaire de façon aléatoire [134].

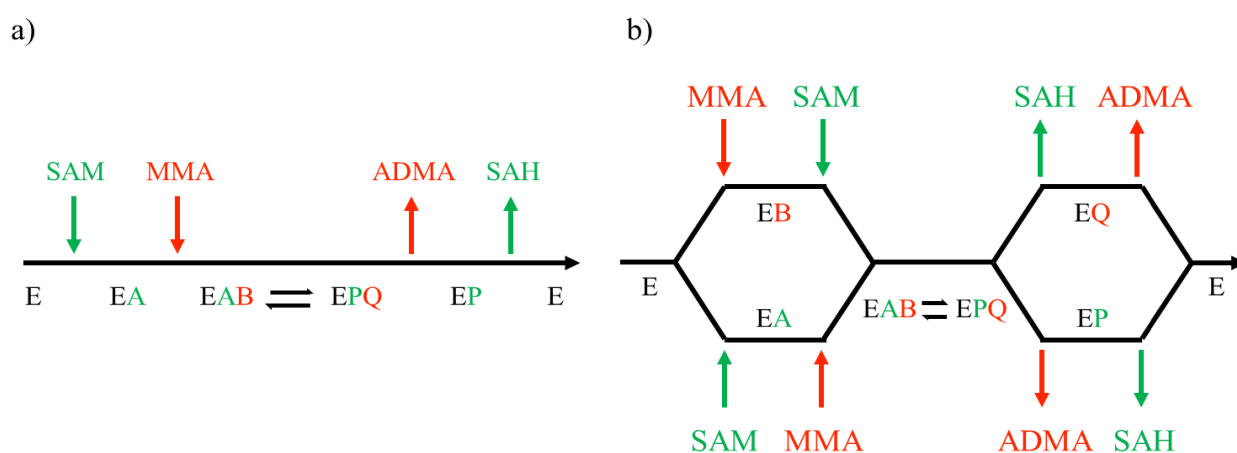


Figure 19 : Description des mécanismes enzymatiques séquentiels ordonnés (a) et aléatoires (b) proposés pour PRMT6. a) Dans le modèle ordonné, PRMT6 (E) recrute tout d'abord son cosubstrat SAM (A), indispensable à la fixation de son substrat peptidique monométhylé MMA (B). Le transfert de groupement méthyle au sein du complexe ternaire s'achève par le relargage séquentiel du produit asymétriquement diméthylé ADMA (Q), suivi du produit SAH (P). b) Dans le modèle aléatoire, la fixation aléatoire du cosubstrat SAM et substrat MMA génère un complexe ternaire, dont la catalyse s'accompagne du relargage aléatoire des produits SAH et ADMA.

Dans ce contexte, une collaboration avec l'équipe du Pr. Jean Cavarelli (IGBMC, Strasbourg) s'est articulée autour de la caractérisation du variant PRMT6 murin (MmPRMT6), présentant une homologie de séquence (92% d'identité) et de structure (rmsd $C\alpha \approx 0.51-0.60$) importante avec HsPRMT6. La purification et cristallisation relativement aisée de cette protéine ont ainsi permis l'obtention de structures de très haute résolution (jusqu'à 1.3Å), co-cristallisées ou non en présence de l'analogue de cosubstrat SAH. L'exploitation de ces structures homologues à HsPRMT6 a ainsi nécessité une analyse structurale comparative des complexes binaires et ternaires formés entre MmPRMT6, le SAH et un peptide substrat de l'histone H4 par MS native.

2. Objectifs de l'analyse.

L'objectif de ces travaux consiste en une meilleure compréhension du mécanisme enzymatique catalysé par l'enzyme MmPRMT6, à travers l'étude structurale de ses complexes formés en présence de (co)substrats. D'autre part, l'identification d'un dimère covalent au sein de certaines structures cristallographiques de MmPRMT6 et HsPRMT6 (entrées PDB 4HC4 et 4QQP), aux conséquences structurales dramatiques (déploiement de l'hélice αX nécessaire à la catalyse), interroge sur la pertinence biologique de ce pont disulfure [137]. Afin de répondre à ces questions, une détermination :

- De l'état oligomérique de MmPRMT6
- Des stœchiométries d'interaction entre: a) MmPRMT6 et l'analogue de cosubstrat SAH
b) MmPRMT6 et un peptide substrat (histone H4)
- Des stœchiométries d'interaction entre les complexes binaires MmPRMT6-SAH et le peptide substrat de l'histone H4

est ici réalisée par MS native.

3. Résultats.

3.1. Détermination de l'état oligomérique de la protéine MmPRMT6.

Dans un premier temps, une analyse de la protéine MmPRMT6 seule a été réalisée (Fig.20). Les résultats obtenus en conditions dénaturantes (Fig.20a) ont permis la mise en évidence de 2 espèces majoritaires (42028.3 ± 0.5 et 42055.4 ± 0.2 Da), correspondant au monomère MmPRMT6 (masse théorique : 42026.6 Da) associé ou non à un excès de masse de 28.8 Da.

Une analyse protéomique par nanoLC-MS/MS après digestion trypsique a révélé une diméthylation du résidu arginine en position 7, à l'origine de l'excès de masse retrouvé sur l'espèce principale, et en accord avec la description de phénomènes d'autométhylation [138]. La caractérisation de cet échantillon (5 μ M) en conditions natives (AcNH₄ 150mM pH8.2) met en évidence l'existence d'une espèce majoritaire de 84111 \pm 2 Da, correspondant à la masse d'un dimère non-covalent de MmPRMT6 (Fig.20b). L'identification d'une espèce minoritaire de 84491 \pm 1 Da, associée à la masse d'un dimère fixant partiellement une molécule de SAH (384 Da), révèle la présence de cofacteur d'origine endogène. L'observation de dimères covalents en cristallographie semblent donc artefactuelle et serait vraisemblablement liée à l'existence des contraintes cristallographiques.

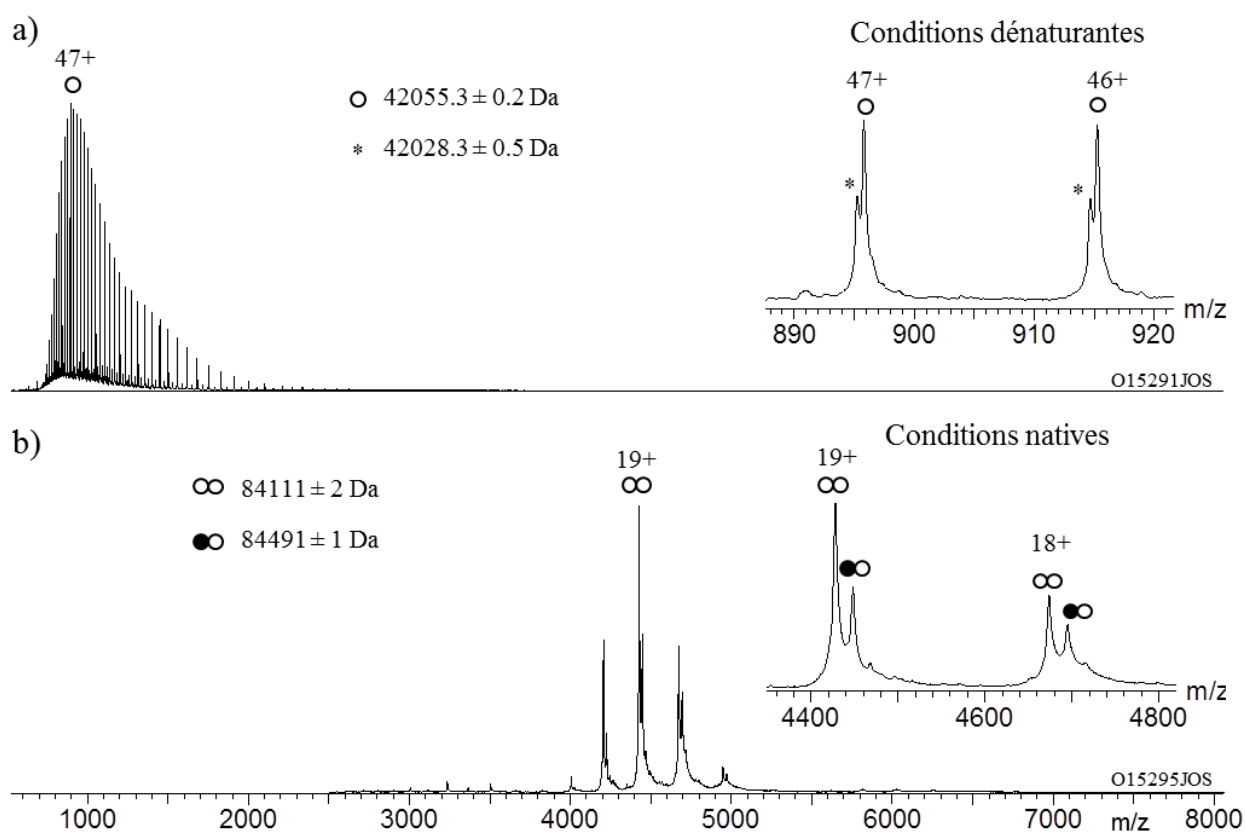


Figure 20 : Analyse de la protéine MmPRMT6 en conditions dénaturantes (a) et natives (b). a) L'analyse de la protéine dénaturée à 2 μ M dans un tampon ACN:H₂O:HCOOH 50:50:1 révèle la présence de 2 espèces majoritaires, correspondant au monomère MmPRMT6 (O) plus ou moins diméthylé (*). b) L'analyse de cet échantillon à 5 μ M en conditions natives (AcNH₄ 150mM pH8.2, V_c = 120V, P_i = 6 mbar) met en évidence une dimérisation de MmPRMT6 (∞), partiellement associée à une molécule de SAH d'origine endogène (●).

3.2. Caractérisation des complexes binaires MmPRMT6-SAH et MmPRMT6-H4.

Afin de mieux comprendre le mécanisme enzymatique catalysé, une détermination de la stœchiométrie d'interaction entre l'enzyme et ses (co)substrats individuels (SAH ou peptide H4) a été menée (Fig.21, 22).

Dans un premier cas, un titrage de l'enzyme (5 μ M de monomère) en présence de concentrations croissantes de l'espèce SAH (5 à 25 μ M) a été suivi par MS native (Fig.21 a-d). En conditions équimolaires (Fig.21b), un déplacement de l'équilibre vers la formation de complexes binaires spécifiques (MmPRMT6)₂-(SAH)₂ de 84891 \pm 8 Da confirme une stœchiométrie d'interaction monomère:SAH 1:1. Cette interaction s'avère spécifique, aucune distribution statistique de stœchiométries d'ordre supérieur n'étant observée. La persistance de formes insaturées à cette concentration semble en accord avec l'affinité mesurée entre cette espèce et le variant humain [134]. Une fixation aspécifique de molécules de SAH est observée à des concentrations de substrat plus élevées (Fig.21c, d), limitant la saturation spécifique du dimère MmPRMT6 en SAH.

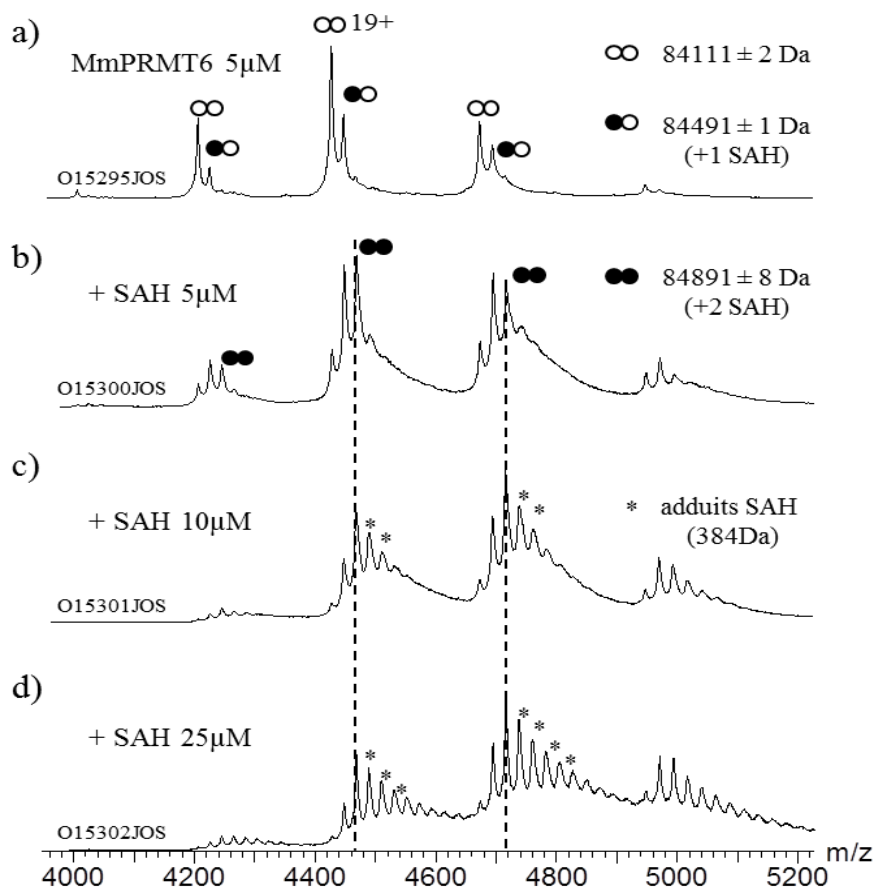


Figure 21 : Caractérisation des complexes binaires formés entre l'enzyme MmPRMT6 et l'analogue de cosubstrat SAH (Vc = 120V, Pi = 6 mbar). a) Le titrage de 5 μ M de monomère MmPRMT6 en présence de b) 5, c) 10 et d) 25 μ M de SAH, permet une détermination de la stœchiométrie des complexes formés par MS native.

Des expériences similaires ont été réalisées à partir du peptide substrat H4, incubé à différentes concentrations (5 à 20 μ M) en présence de 5 μ M d'enzyme libre (Fig.22a-d). La mise en évidence de la formation de complexes (MmPRMT6)₂-peptide H4 (86421 \pm 1 Da) suggère une fixation du substrat accepteur indépendante de la présence du cosubstrat donneur, soutenant l'existence d'un mécanisme séquentiel aléatoire proposé par l'équipe de P.R Thompson [134]. Par ailleurs, l'identification d'une stœchiométrie de fixation unique, quelle que soit la concentration de peptide utilisée, suggère le recrutement spécifique d'une seule molécule de peptide H4 par dimère MmPRMT6. La compétition à l'ionisation du peptide H4 non complexé et la relative incompatibilité de son tampon de stockage, responsables d'une extinction et d'un élargissement des signaux, ont limité le recours à des concentrations plus élevées.

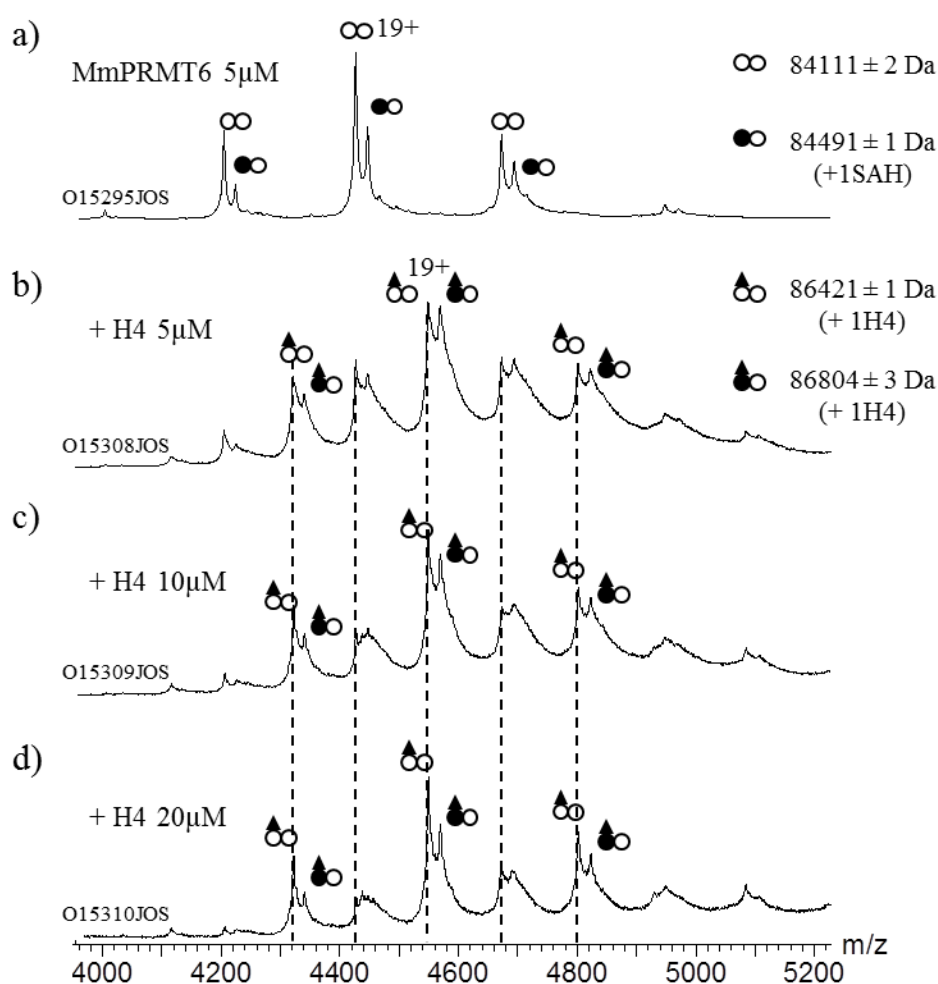


Figure 22 : Caractérisation des complexes binaires formés entre l'enzyme MmPRMT6 et le peptide substrat H4 ($V_c = 120V$, $P_i = 6$ mbar). a) Le titrage de 5 μ M de monomère MmPRMT6 en présence de b) 5, c) 10 et d) 20 μ M de peptide H4, permet une détermination de la stœchiométrie des complexes formés par MS native.

3.3. Caractérisation des complexes ternaires MmPRMT6-SAH-H4.

Afin de vérifier l'influence de la saturation du dimère MmPRMT6 en SAH sur sa stœchiométrie d'interaction en peptide H4, un titrage de complexes binaires MmPRMT6-SAH préformés en présence de concentrations croissantes de peptide H4 a été analysé (Fig.23a-d). Les conditions de préformation des complexes binaires (MmPRMT6-SAH)₂ ont été ici fixées de façon à limiter la fixation aspécifique de SAH précédemment décrite (Fig.21). A nouveau, une stœchiométrie d'interaction unique d'une molécule de peptide H4 par dimère MmPRMT6 est observée, malgré la saturation de l'enzyme en SAH (87189 ± 3 Da, Fig.23b). L'absence de complexes ternaires (MmPRMT6)₂-(SAH)₂-(H4)₂ en dépit d'un excès de substrat H4 (Fig.23c,d) pourrait se traduire par l'existence d'un mécanisme processif déjà décrit pour certaines PRMTs de type I, dont la HsPRMT6 [139, 140], dans lequel le produit monométhylé par le premier monomère serait successivement diméthylé au sein du second monomère, potentiellement sans relargage (Fig.24). Néanmoins, ces informations demeurent insuffisantes dans la proposition d'un mécanisme processif ou distributif, nécessitant une caractérisation structurale et biochimique approfondie de ces complexes.

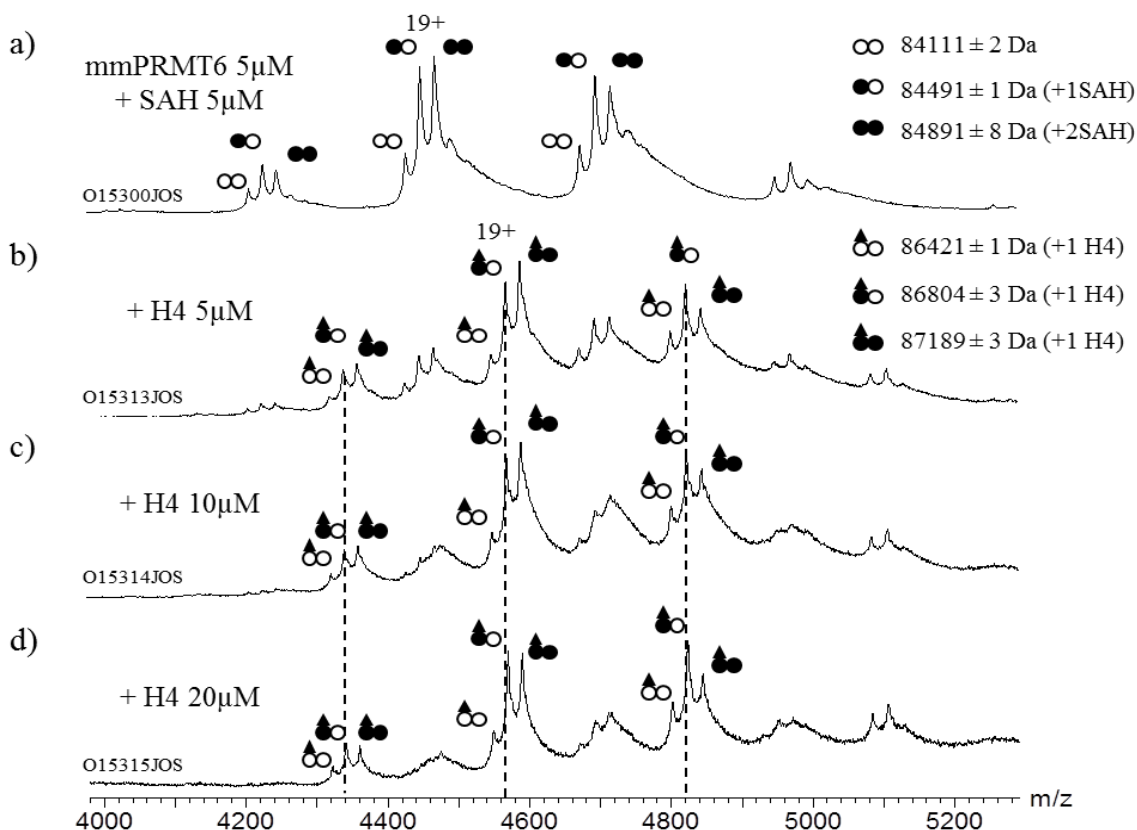


Figure 23 : Caractérisation des complexes ternaires formés entre les complexes binaires MmPRMT6-SAH et le peptide substrat H4 ($V_c = 120V$, $P_i = 6$ mbar). a) Les complexes binaires préformés entre $5\mu M$ d'enzyme MmPRMT6 et $5\mu M$ de SAH sont ici titrés en présence de b) 5, c) 10 (c) et d) $20\mu M$ de peptide H4. L'analyse des mélanges par MS native permet de déterminer la stœchiométrie de ces complexes.

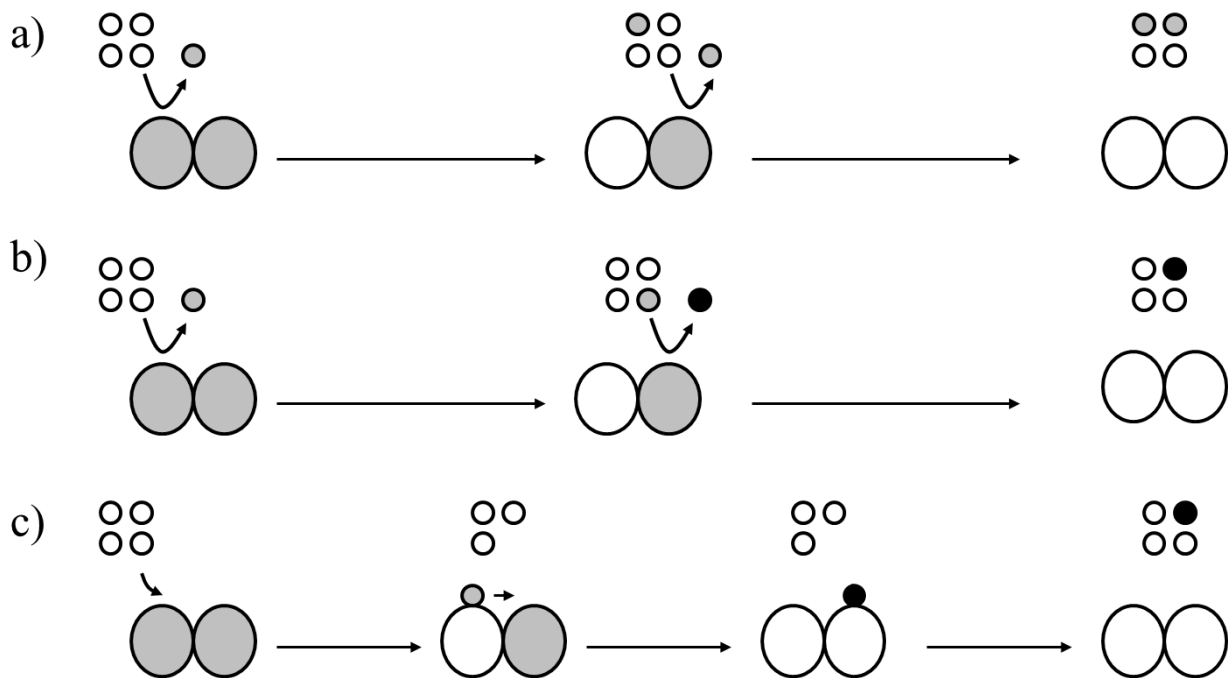


Figure 24 : Représentation schématique des mécanismes distributifs (a) et processifs (b, c) proposés pour l'enzyme MmPRMT6. a) Dans un mécanisme distributif, la nature du substrat méthylé par chaque monomère (○) dépend de sa concentration et de son affinité. b-c) Dans un mécanisme processif, le substrat monométhylé par le premier monomère (◐) devient successivement le substrat du second monomère, générant un produit asymétriquement diméthylé (●). L'étape de diméthylation peut impliquer b) le relargage c) ou non du substrat monométhylé.

4. Conclusions.

La caractérisation des complexes formés entre MmPRMT6, un analogue de cosubstrat catalytiquement inactif SAH et le peptide substrat modèle de l'histone H4 par MS native, soutient l'existence d'une analogie structurale et fonctionnelle entre MmPRMT6 et HsPRMT6. Les résultats obtenus confirment :

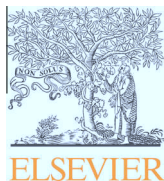
- Une homodimérisation non-covalente de la protéine. La formation d'un pont disulfure entre les cystéines C53 (domaine de fixation SAM) et C232 (domaine de dimérisation) de chaque monomère, observé dans les structures Hs/MmPRMT6, semble donc résulter de contraintes cristallographiques.
- La fixation d'une molécule de cosubstrat donneur (SAH) par monomère, en accord avec les données structurales et enzymologiques générées sur le variant murin et disponibles sur le variant humain [134-136].
- Une fixation du peptide H4 sur le dimère MmPRMT6 indépendante de la présence de cosubstrat SAH, à raison d'une copie par monomère.

Ces informations soutiennent l'existence d'un mécanisme enzymatique de type séquentiel aléatoire et processif, proposé dans la littérature pour le variant humain [134, 139], qui nécessiterait une confirmation structurale et enzymatique approfondie. En conclusion, la combinaison des données structurales générées par cristallographie et MS native au cours de ces travaux, témoignent de l'intérêt de l'utilisation du modèle MmPRMT6 pour le criblage rationnel d'inhibiteurs de HsPRMT6.

5. Valorisation.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont donné lieu à la publication suivante :

Bonnefond L, [Stojko J](#), Mailliot J, Troffer-Charlier N, Cura V, Wurtz JM, Cianféran S, Cavarelli J. Functional insights from high resolution structures of mouse protein arginine methyltransferase 6. *J. Struct. Biol.* (2015), *191*, 175-183.



Functional insights from high resolution structures of mouse protein arginine methyltransferase 6



Luc Bonnefond^a, Johann Stojko^b, Justine Mailliot^a, Nathalie Troffer-Charlier^a, Vincent Cura^a, Jean-Marie Wurtz^a, Sarah Cianférani^b, Jean Cavarelli^{a,*}

^a Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, CNRS UMR7104, INSERM U964, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, F-67404, France

^b Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, Strasbourg 67087, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2014

Received in revised form 19 March 2015

Accepted 18 June 2015

Available online 18 June 2015

Keywords:

Methyltransferase

PRMT6

Epigenetics

Protein structure

S-adenosyl-L-methionine

ABSTRACT

PRMT6 is a protein arginine methyltransferase involved in transcriptional regulation, human immunodeficiency virus pathogenesis, DNA base excision repair, and cell cycle progression. Like other PRMTs, PRMT6 is overexpressed in several cancer types and is therefore considered as a potential anti-cancer drug target. In the present study, we described six crystal structures of PRMT6 from *Mus musculus*, solved and refined at 1.34 Å for the highest resolution structure. The crystal structures revealed that the folding of the helix αX is required to stabilize a productive active site before methylation of the bound peptide can occur. In the absence of cofactor, metal cations can be found in the catalytic pocket at the expected position of the guanidinium moiety of the target arginine substrate. Using mass spectrometry under native conditions, we show that PRMT6 dimer binds two cofactor and a single H4 peptide molecules. Finally, we characterized a new site of *in vitro* automethylation of mouse PRMT6 at position 7.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

PRMTs catalyze the transfer of the methyl group from S-adenosyl-L-methionine (SAM or AdoMet) to the side-chain N atoms of arginine residues of a target protein substrate to form methylated arginines and S-adenosyl-L-homocysteine (SAH or AdoHcy). The target arginine residues, mainly located within glycine- and arginine-rich patches, can be mono- or dimethylated. At least nine members of PRMTs (PRMT1 to PRMT9) have been identified and classified into three main classes. All classes catalyze the formation of monomethylarginine. In a second step, type I PRMTs (PRMT1, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6 and PRMT8) further form asymmetric dimethylarginine, whereas type II (PRMT5) form symmetric dimethylarginine. With few exceptions such as PRMT7 (Miranda et al., 2004), PRMTs are active as homodimer with each monomer containing a structurally conserved catalytic core

module to which additional domains may be added (Antonysamy et al., 2012; Cheng et al., 2011; Cura et al., 2014a,b; Hasegawa et al., 2014; Ho et al., 2013; Sun et al., 2011; Troffer-Charlier et al., 2007; Wang et al., 2014b; Weiss et al., 2000; Yue et al., 2007; Zhang and Cheng, 2003; Zhang et al., 2000).

PRMT6 is a nuclear protein that typically targets glycine and arginine rich (GAR) motifs (Frankel et al., 2002). PRMT6 is involved in transcriptional regulation, human immunodeficiency virus pathogenesis, DNA base excision repair, and in cell cycle progression (Kleinschmidt et al., 2012; Phalke et al., 2012; Stein et al., 2012). It is responsible for the *in vitro* methylation of the arginine 2 residue of the histone H3 tail (H3R2) and of the arginine 3 of histone H4 (H4R3) (Guccione et al., 2007; Hyllus et al., 2007; Iberg et al., 2008). Several other PRMT6 targets have been identified including histones H2AR29 (Waldmann et al., 2011) and H3R42 (Casadio et al., 2013) the high mobility group protein HMGA1a and HMGA1b (Miranda et al., 2005; Sgarra et al., 2006), HIV-1 trans-activator of transcription (Tat), regulator of virion (Rev) and nucleocapsid proteins (Boulanger et al., 2005; Invernizzi et al., 2007; Xie et al., 2007), and the DNA polymerase α (El-Andaloussi et al., 2006). Like other PRMTs, PRMT6 is overexpressed in several cancer types, such as bladder and lung cancers (Yoshimatsu et al., 2011). It is therefore considered as a potential anti-cancer drug

Abbreviations: PRMT, protein arginine methyltransferase; SAM, S-adenosyl-L-methionine; SAH, S-adenosyl-L-homocysteine; SFG, sinefungin; PDB, Protein Data Bank; rmsd, root square mean deviation; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry.

* Corresponding author.

E-mail address: cava@igbmc.fr (J. Cavarelli).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.06.017>

1047-8477/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

target. So far only one specific inhibitor has been reported, AMI1, that can inhibit PRMT6 to block arginine methylation of Rev (Invernizzi et al., 2006). The catalytic mechanism of PRMT6 has been thoroughly studied and two mechanisms have been proposed: a sequential ordered mechanism (Lakowski and Frankel, 2008) and a rapid equilibrium random mechanism (Obianyo and Thompson, 2012). Dissociation constant (K_d) for PRMT6 dimer dissociation has been measured by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and isothermal calorimetry (ITC) in the absence and presence of SAH (Thomas et al., 2010). Crystal structures of *Trypanosoma brucei* PRMT6 (TbPRMT6) have been reported recently (Wang et al., 2014a). They revealed Trypanosoma-specific structural features, as well as subtle active site rearrangement upon SAH binding. Crystals structures of human PRMT6 (HsPRMT6) are also available (PDBID 4HC4, 4QQK, and 4QPP). In the present study, we described six crystal structures of PRMT6 from *Mus musculus*, solved and refined at 1.34 Å for the highest resolution structure.

2. Material and methods

2.1. PRMT6 cloning, expression and purification

The *M. musculus* gene *prmt6* (UP Q6NZB1) was cloned in the pNEA-vHis vector (Romier et al., 2006) between the *NdeI* and *XhoI* restriction sites and used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3) pRARE2 cells. The resulting recombinant protein harbors an amino-terminal hexahistidine tag followed by a Tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site. The protein also contains a F315L point mutation, reported for the entry as a natural variant. The protein expression was induced for 4 h at 37 °C, with 0.1 mM IPTG in LB medium. The cells were harvested by centrifugation and resuspended in 10 ml per pellet g of buffer A [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 7 mM 2-Mercaptoethanol (2-ME), 20 mM imidazole] supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]. After sonication, the lysate was centrifuged at 40,000×g for 25 min at 4 °C. The supernatant was mixed with 0.5 ml of NiNTA superflow resin (Qiagen) per liter of culture, incubated for 1 h at 4 °C, and then loaded on an Econo column (Bio-Rad). After washing the column with 10 column volumes (c.v.) of buffer A, the bound protein was eluted with 5 c.v. of buffer A supplemented with 500 mM imidazole. The fractions containing the recombinant protein were detected by a Bradford assay, pooled and supplemented with TEV protease. The sample was then dialyzed in a 10,000 MWCO dialysis membrane (Spectrum) against 1 l of buffer B [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 7 mM 2-ME and 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid] for 16 h at 4 °C. The dialyzed sample was loaded onto a HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade column (GE Healthcare), equilibrated in buffer C [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT)]. The protein was finally concentrated on an Amicon Ultra-4 10,000 MWCO filter (Millipore) to a 5 mg ml⁻¹ final concentration. Samples were either directly used for crystallization or flash-frozen as 25 µl aliquots in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.2. PRMT6 crystallization

Crystallization conditions were screened using commercially available kits by the sitting-drop vapor-diffusion method in 96-well MRC2 plates (Swissci), and employing a Mosquito robot (TTP Labtech) with 200 nl protein solution + 200 nl mother liquor drops. The plates were placed in a Rock Imager (Formulatrix) at 293 K and monitored periodically. The PACT and JCSG+ screens (Qiagen) were tested for MmPRMT6 concentrated from 3 to

4 mg ml⁻¹. Initial hits were obtained for several conditions in both screen with mother liquor composed of a buffer at pH 7.0–8.0, a salt at 200 mM and PEG as a precipitant, mostly PEG 6000 and PEG 8000. These conditions were refined using the hanging drop diffusion method with 2 µl drops (1 µl + 1 µl). Large crystals (0.4 × 0.2 × 0.2 mm³) of bipyramidal habit were obtained within 3 weeks from drops with crystallization solution containing either 100 mM of Tris-HCl, pH 7.5 or HEPES-NaOH, pH 8.0 for the buffer, 200 mM MgCl₂ or CaCl₂ as a salt and 20% PEG 1500, PEG 3350 or PEG 6000 as a precipitant. Co-crystallizations were performed with S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) and sinefungin (SFG) at 1 mM final concentration. For the reduced form of PRMT6, the concentration of DTT in the protein solution was increased to 5 mM, changing the shape of the crystals to thin plates.

2.3. Data collection and structure solution

Crystals were soaked in the crystallization solution supplemented with 10–20% PEG 400 and flash-frozen in liquid nitrogen. Datasets were collected either at the SOLEIL PROXIMA1 beamline, using a PILATUS 6 M detector (Dectris) or at the ESRF ID23-2 beamline, using a MAR CCD-225 detector (Mar Research) and processed with autoPROC (Vornrhein et al., 2011), XDS (Kabsch, 2010) and HKL-2000 (Otwinowski and Minor, 1997). Six structures have been solved and refined. The crystals belong to the *I*₄ space group with one PRMT6 molecule in the asymmetric unit forming a disulfide bond with the symmetric molecule, or to the *P*₂₁₂₁₂ space group with two PRMT6 molecules in the asymmetric unit and all cysteine residues reduced. The structures were solved by molecular replacement using mouse CARM1 structure (PDBID 3B3F), deprived of its dimerization arm, as the search model. Iterative cycles of model building and refinement were carried out using Coot (Emsley et al., 2010), PHENIX (Adams et al., 2010) and Buster (Bricogne et al., 2011). A summary of the data statistics for the six solved and refined structures is provided in Table 1 and S1. The atomic coordinates and experimental data (PDBID 4C03, 4C04, 4C05, 4C06, 4C07 and 4C08) are available in the Protein Data Bank. All structure figures were prepared with Cuemol (<http://www.cuemol.org>).

2.4. Native mass spectrometry analysis

The H4₁₋₂₁ peptide and the SAH cofactor were prepared in 150 mM ammonium acetate (NH₄Ac), pH 8.0. Prior to any mass spectrometry experiment, MmPRMT6 buffer was exchanged twice against a 150 mM NH₄Ac solution at pH 8.2 using gel filtration columns (NAP-5 columns, GE Healthcare Life Sciences). Protein concentration was determined spectrophotometrically after buffer exchange. NanoESI-MS measurements were carried out on an electrospray quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Synapt G2 HDMS, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoESI source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY) operating in the positive ion mode. External calibration was performed with the multiply charged ions produced by a 2 µM horse heart myoglobin solution diluted in a 1:1 (v:v) water:acetonitrile mixture acidified with 1% formic acid. Purity and homogeneity of samples were first assayed in denaturing conditions by diluting the proteins to 2 µM in a 1:1 (v:v) water:acetonitrile mixture acidified with 1% formic acid. Analyses in native conditions were then performed by diluting analytes in NH₄Ac buffer 150 mM, pH 8.2 (adjusted with ammonia) after 10 min of incubation. Experiments were realized following careful optimization of instrumental parameters. Particularly, the pressure in the first pumping stage was raised up to 6 mbar using a throttling valve and the acceleration voltage applied on the sample cone was set to 120 V. Data analyses were performed with

Table 1
Data statistics of the mouse PRMT6 structures.

	SFG-red	SAH	apo-Ca
PDBID	4C03	4C05	4C08
<i>Crystallization</i>			
Reservoir	100 mM HEPES pH 7.0 200 mM MgCl ₂ 25% PEG 1500	100 mM HEPES pH 7.0 200 mM MgCl ₂ 20% PEG 3350	100 mM Tris pH 8.0 200 mM CaCl ₂ 19% PEG 1500
Volume	1 + 1 μl	1 + 1 μl	2 + 2 μl
Temperature	16 °C	24 °C	16 °C
Cryoprotectant	10% PEG 400	20% PEG 400	20% PEG 400
<i>Data processing</i>			
Wavelength (Å)	0.9537	0.9801	0.984
Resolution range (Å)	39.56–1.58 (1.64–1.58)	40.43–2.19 (2.27–2.19)	33.98–1.34 (1.39–1.34)
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	I4 ₁	I4 ₁
Unit cell	118.72 143.3 41.96 909090	78.43 78.43 118.13 909090	79.33 79.33 118.41 909090
Total reflections	616,463 (39,436)	84,288 (4244)	477,717 (21,419)
Unique reflections	98,190 (8988)	17,706 (1420)	81,559 (7711)
Multiplicity	6.3 (4.4)	4.8 (3.0)	5.9 (2.8)
Completeness (%)	99.0 (90.72)	97.0 (78.63)	99.3 (93.77)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	8.7 (0.99)	13.5 (1.37)	17.0 (1.20)
Wilson B-factor (Å ²)	20.9	35.8	19.8
<i>R</i> _{meas}	0.117 (1.04)	0.093 (0.89)	0.052 (0.72)
CC _{1/2} [†]	0.995 (0.64)	0.998 (0.564)	0.999 (0.57)
Limit for <i>I</i> /σ(<i>I</i>) > 2 [†]	1.68	2.28	1.39
<i>Refinement</i>			
<i>R</i> -work	0.160	0.146	0.141
<i>R</i> -free	0.191	0.185	0.164
Number of atoms	11,339	2603	5615
Protein	5380	2530	2619
Ligands	54	26	22
Water	591	73	314
Protein residues	337 + 328	318	325
RMS (bonds)	0.010	0.010	0.008
RMS (angles)	1.28	1.05	1.23
Ramachandran favored (%)	99	98	99
Ramachandran outliers (%)	0	0	0
Average B-factor (Å ²)	31.1	34.4	27.2
Macromolecules	30.1	34.2	25.9
Ligands	21.3	33.0	35.0
Solvent	39.6	39.8	37.6

*R*_{meas} is the redundancy-independent merging *R* factor.

[†] According to (Karplus and Diederichs, 2012). The highest resolution using the criteria CC_{1/2} > 0.5 and *I*/σ(*I*) > 2 are reported.

MassLynx 3.5 (Waters, Manchester, UK). Experiments involving SAH or H4₁₋₂₁ peptide were done by adding to a 5 μM MmPRMT6 solution, 5 μM of SAH and increasing concentrations of H4₁₋₂₁ (from 5 to 20 μM), followed by 15 min incubation at room temperature before native MS analysis.

3. Results

3.1. MmPRMT6 structures: covalent and non-covalent dimers

We have determined six crystal structures of the full-length PRMT6 from *M. musculus* (MmPRMT6), alone and in complex with *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) or the natural inhibitor sinefungin (SFG), at resolutions ranging from 2.2 to 1.34 Å (Table 1 and S1). In all structures the 41 first residues and the last residue (378) are not visible in the final electron density map. This observation was confirmed by a mass spectrometry analysis that highlighted a polypeptide of 40 kDa assigned as MmPRMT6 residues 42 to 378 (data not shown). MmPRMT6 is composed of three modules: an N-terminal SAM-binding domain (residues 41–188), a C-terminal β-barrel domain (residues 190–378) and a 60 residues dimerization arm inserted between β6 and β7 of the β-barrel domain (residues 200–236). The SAM-binding and the β-barrel domains are connected by a conserved proline residue that adopts

a cis conformation (Pro189). The four PRMT signature motifs surround the cofactor and target arginine residue binding pockets (Figs. 1–2a). MmPRMT6 shares 91.5% and 29% sequence identity with HsPRMT6 and TbPRMT6, respectively (Fig. S1). Mouse and human PRMT6 dimer structures are virtually identical with root-mean-squared deviation (rmsd) values ranging from 0.51 to 0.60 over the Cα residues. TbPRMT6 is farther with rmsd values around 2.0 (Table 2).

Five structures present disulfide bonds bridging C53 (helix αX) in the SAM-binding domain of one monomer to C232 in the dimerization arm of the symmetric monomer (helix αG), resulting in the unfolding of the αX helix (Fig. 2b and c). The same state was observed for HsPRMT6 structures, crystallized under similar condition and in the same I4₁ space group (PDBID 4HC4, 4QQP). These structures with a covalent dimer are highly similar with rmsd values between 0.17 and 0.32 over the aligned Cα positions (Table 2). TbPRMT6 structures are deprived of disulfide bond since the corresponding cysteine residues are not conserved in this gender (Wang et al., 2014a). Mass spectrometry analysis under denaturing conditions revealed that the MmPRMT6 covalent dimer is a minor species in solution (Fig. S2a). Crystals of covalent dimers were soaked in a solution containing a higher concentration of reducing agent (5 mM DTT). The resulting crystal structure was solved at 1.75 Å resolution, and showed that the disulfide bond has been reduced, but the proper folding of the helix αX did not occur.

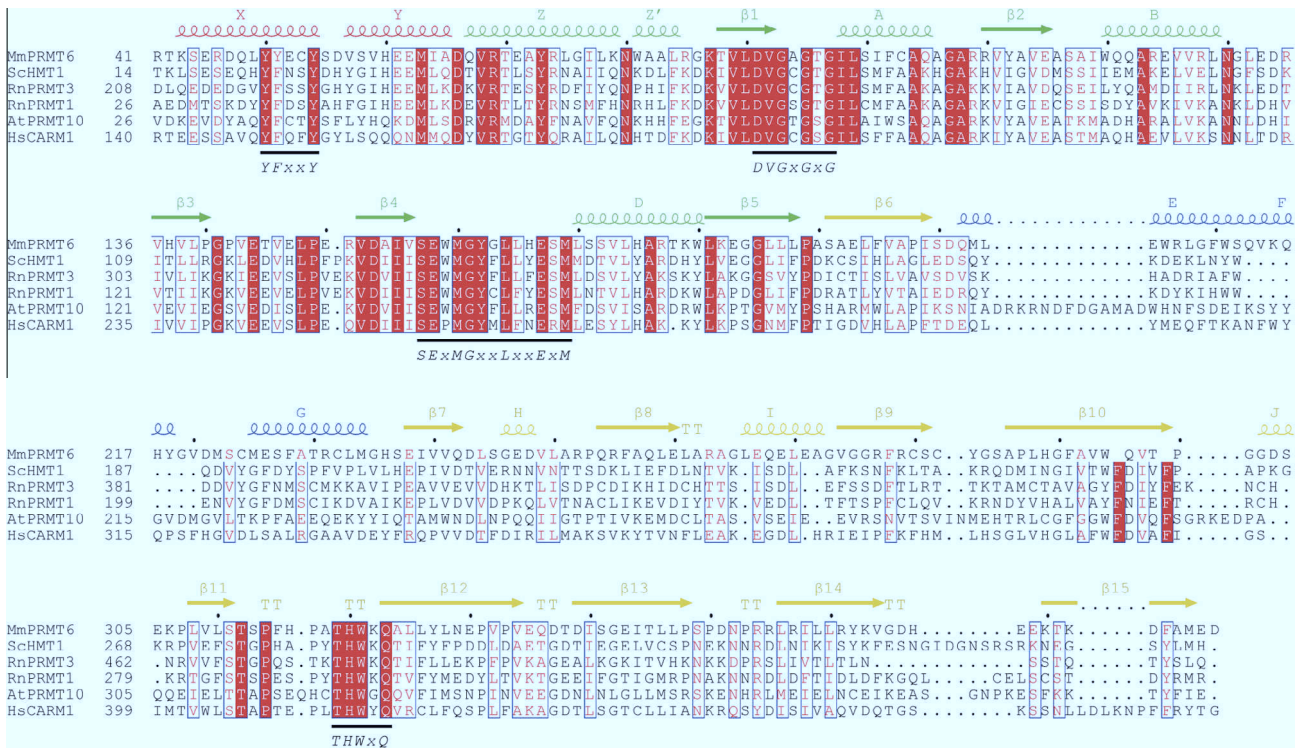


Fig. 1. Structure-based alignment of selected type I PRMTs. Six type I PRMTs structures have been aligned based on their crystal structures. The alignment is restricted to the catalytic core. The secondary structure of MmPRMT6 (PDBID 4C03) is drawn above the alignment with color. The SAM-binding domain, the β -barrel domains, and the dimerization arm are colored green, yellow and blue, respectively. The four signature sequences are localized and their consensus written below. Strictly conserved residues are highlighted in red; equivalent residues are written in red and framed. Abbreviations are as follow: *Mm*/*Mus musculus*, *Hs*/*Homo sapiens*, *Sc*/*Saccharomyces cerevisiae*, *Rn*/*Rattus norvegicus*, and *At*/*Arabidopsis thaliana*. The figure was drawn with Espript (Gouet et al., 1999) and further edited.

This is due to the crystal packing interactions in the $I4_1$ crystals that are incompatible with the conformation of the helix observed in the reduced dimer structure solved in the $P2_12_12$ space group (Fig. S3).

3.2. Proper folding of the first helix is critical for catalysis

We have determined one structure of MmPRMT6 (MnPRMT6 in complex with SFG) in the absence of disulfide bond by increasing the DTT concentration in the buffer to 5 mM. Although the enzyme crystallized under a different space group (Table 1), the rmsd between the monomers of each form is of 0.59 (Table 2). The N-terminal residues released from the disulfide bond fold into the α X helix that locks and buries the cofactor in place and allow the Y50 and Y54 pair to position the E167 in an active conformation (Fig. 3a). This residue acts as an anchor for the target arginine residue in the methylation reaction. Therefore, the proper folding of the α X helix is critical for catalysis but not for initial cofactor binding. Similar conformational changes have been observed in PRMT1 and CARM1 crystal structures (Troffer-Charlier et al., 2007; Zhang and Cheng, 2003), also members of the type I PRMT family. The folding of the α X helix also induces subtle conformational changes: in the SAM-binding domain (i) the loops between sheet β 2 and helix α B and (ii) between sheets β 3 and β 4, as well as (iii) the ESM residues at the end of motif III (also known as double-E loop) move slightly away from the sinefungin molecule, while (iv) the loop between sheets β 13 and β 14 in the β -barrel domain moves toward helix α X (Fig. 3b). The reduced dimer interface buries a surface area of 3368 \AA^2 (10.6% of the total surface area) with most intermolecular interactions occurring between the dimerization arm of one monomer (residues 203 to 233) and the SAM-binding of the other monomer (Fig. 2c).

3.3. Canonical cofactor binding mode

The MmPRMT6 structures support previous knowledge of SAM-binding for type I PRMTs. The SFG molecule, buried in a pocket located between the carbonyl end of the β -strands and the amino terminal helices, is surrounded by the four PRMTs signature motifs (Fig. 4a). For the methionine moiety, the carboxylate atoms interacts with R69 directly and H60 and T96 via a water molecule. The amino group interacts with G93 directly and with D91, V92, G93, A94 and L99 in motif 2 via two water molecules. For the ribose moiety, E115 recognizes both hydroxyls. For the adenine ring moiety, nitrogens N3, N1 and N6 interact with A116, V143, and E144 and S172, respectively. In addition, the SFG amino group, that mimics the methyl group of SAM, interacts with E158 and M160 directly and with E158, M160, E167 and H320 via two water molecules. The interaction pattern is highly similar to that observed in the crystal structure of CARM1 in complex with SFG and an inhibitor of the indole class (Sack et al., 2011) (Fig. S4). The extensive coordination of the SFG amino group might explain its potency as a PRMT inhibitor.

In the structure of MmPRMT6 complexed with SAH, the methionine moiety of the SAH molecule adopts a non-canonical conformation in the cofactor pocket (Fig. S4b). In particular, the carboxyl group of the methionine moiety is not held in place by R69, and E158 (from the catalytic double-E loop), is shifted as observed in others PRMTs (Troffer-Charlier et al., 2007) (Yue et al., 2007). Finally, in the structures obtained in the absence of cofactor, metal ions were found in the catalytic pocket at the expected position of the guanidinium moiety of the target arginine substrate, facing E158, the residue that acts as a pump in the methylation reaction (Cura et al., in preparation). Magnesium or calcium ions were identified, depending on the crystallization

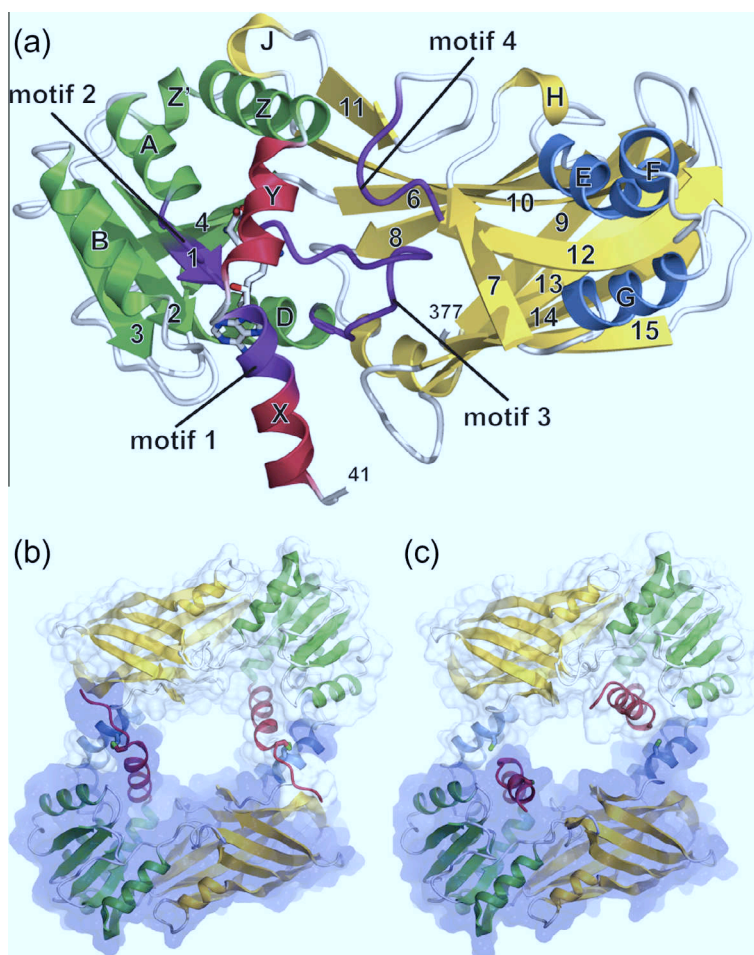


Fig. 2. Mouse PRMT6 structure. Cartoon representation of the MmPRMT6 monomer (a). The helices and sheets are labeled with letters and numbers, respectively, and according to previous PRMT6 labeling (see Fig. 1). The SAM-binding domain, the β -barrel domains, and the dimerization arm are colored in green, yellow and blue, respectively. The amino-terminal helices αX and αY are colored in red, and coils are colored in white. The four PRMT conserved motifs are colored in purple. The SFG molecule is represented as a stick model. The structure is that from the non-covalent dimer of PRMT6 (PDBID 4C03). Cartoon models of covalent (b) and non-covalent (c) MmPRMT6 dimers and their semi-transparent surface volume are shown. For clarity one monomer surface volume is colored in blue.

Table 2
RMSD values among PRMT6 structures.

	SFG-oxy	SAH	apo-Ca	<i>H. sapiens</i>	<i>T. brucei</i>
SFG-red	0.59	0.65	0.62	0.54	1.99
SFG-oxy		0.31	0.17	0.51	2.00
SAH			0.32	0.60	2.08
apo-Ca				0.55	2.00
<i>H. sapiens</i>					2.05

The rmsd values were calculated on the equivalent C α positions of one monomer with PDBeFold (Krissinel and Henrick, 2004). *H. sapiens* and *T. brucei* monomer structures used are chain A from PDBID 4HC4 and 4LWP, respectively.

conditions (Fig. S5). This may explain the inhibition of PRMTs activity by metals such as magnesium, calcium or zinc as recently observed for PRMT7 (Feng et al., 2014).

3.4. MmPRMT6 binds one peptide per dimer

The kinetic parameters for the methylation of a target peptide consisting of H4 residues 1 to 21 (H4₁₋₂₁) were determined for the wild-type PRMT6 and the C53S mutant (Table 3). The catalytic efficiency determined for the wild-type MmPRMT6 is slightly better than that measured by (Obianyo and Thompson, 2012) with a similar peptide (K_M 5.53 μM and k_{cat} 0.16 min^{-1}), mainly due to a better affinity. This might be due to the small differences in the last

residues of the peptide or the origin of the PRMT6 enzymes used (human vs mouse). The C53S mutation, involving one residue part of the disulfide bond observed in some crystal forms, induced a fivefold decrease in the catalytic efficiency as compared to the wild-type enzyme. This results from a slightly lower affinity and a slower turnover, and suggests that the disulfide bond is rather a crystallization artefact rather than a biological feature of PRMT6 from mammals.

Titration of the H4₁₋₂₁ peptide and the SAH cofactor fixation was analyzed using mass spectrometry under native conditions. Native MS and its ability to provide direct information on binding stoichiometries is now routinely used in most structural biology programs for characterization of noncovalent multiprotein assemblies (Schmidt and Robinson, 2014). The purified protein already contains residual SAH cofactor in one of the two catalytic sites (Fig. 5). Titration with increasing concentration of SAH showed the fixation of two SAH molecules per PRMT6 dimer. Titration of the H4₁₋₂₁ peptide was performed in the absence or presence of cofactor. In both cases fixation of one peptide to MmPRMT6 non-covalent dimer was the major event (Fig. 5).

3.5. MmPRMT6 is automethylated in vitro at R7

Automethylation of PRMT6 has been reported (Frankel et al., 2002; Lakowski and Frankel, 2008; Singhroy et al., 2013) and the

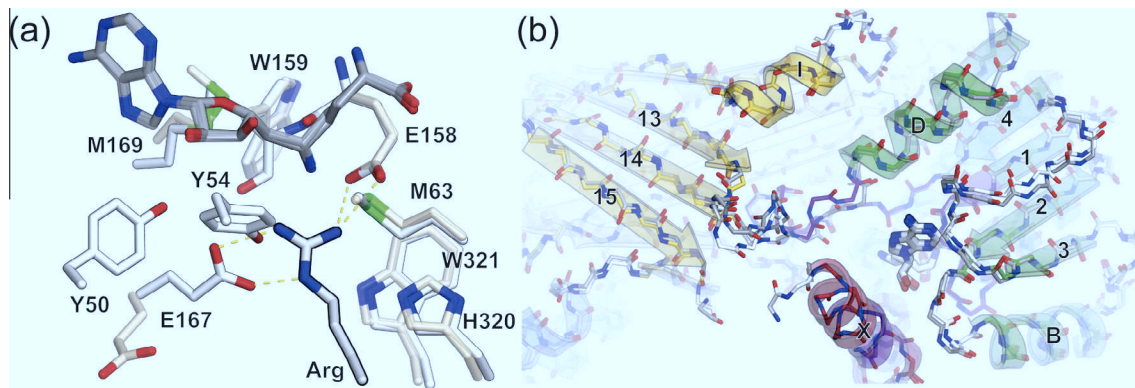


Fig. 3. Proper folding of the α X helix. (a) Caption of the catalytic pocket from the SFG-bound structures emphasizing the differences at the level of functionally conserved residues represented as stick models. Residues from the non-covalent dimer are in white and those from the covalent dimer are in beige and slightly transparent. A model of the target arginine residue is drawn as a semi-transparent stick model. Hydrogen bonds are drawn as yellow dotted lines. (b) Superposition of covalent (gray) and non-covalent (Fig. 1 colors) MmPRMT6 monomers drawn as stick models. A semi-transparent cartoon representation of the monomers is also drawn and the secondary elements are labeled (see Fig. 1) for clarity.

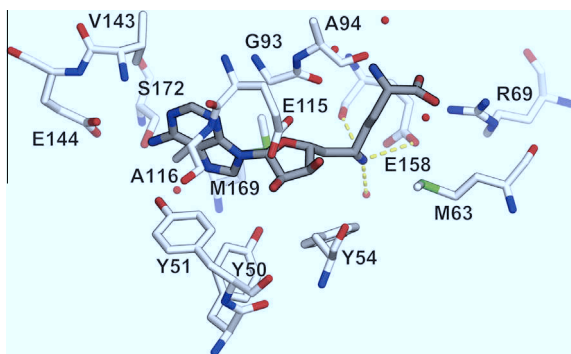


Fig. 4. MmPRMT6 cofactor binding pocket. The cofactor binding pocket of the SFG bound (PDBID 4C03) MmPRMT6 structure is drawn as a ball and stick model. Water molecules are drawn as red spheres. Hydrogen bonds involving the SFG nitrogen are drawn as yellow dotted lines. Only residues involved in hydrogen bonds through their side chain are labeled.

Table 3
Kinetic parameters for wild type MnPRMT6 and C53S mutant.

Mutant	k_{cat} (10^{-3} min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($10^3 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	Loss (\times fold)
WT	32.5 ± 3.5	0.33 ± 0.01	98.5	1
C53S	21 ± 3	1.08 ± 0.22	19.4	5.08

site of methylation has been identified to be R35 (Singhroy et al., 2013). Automethylation was confirmed *in vitro* by our methylation assays control performed in the absence of peptide substrate (Fig. S6) and by denaturing mass spectrometry analysis with a +28 Da shift (compatible with a dimethylation) as compared to the theoretical molecular weight. However, nanoLC–MS/MS analysis revealed the presence of a single dimethylated arginine at position 7 of MmPRMT6 (Fig. S2b) and not position 35. About 70% of MmPRMT6 is already automethylated during production in *E. coli*. This site is not visible in our structures as it is located within the missing 41 amino-terminal residues.

4. Discussion

Structure-based drug design using X-ray crystallography is a key player to speed up the drug discovery process starting from fragment-screening tool or larger compounds library screening.

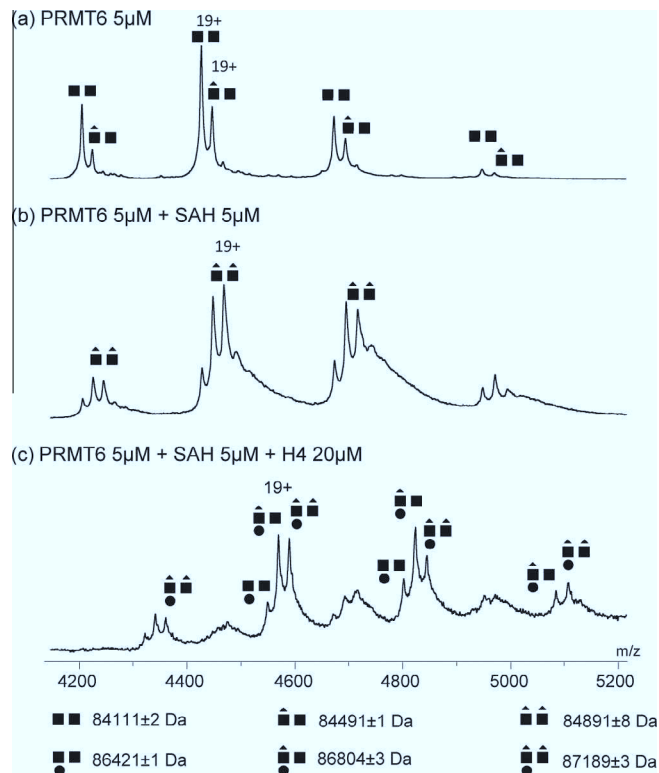


Fig. 5. Detection of MmPRMT6:H4₁₋₂₁ complexes by native MS. Native mass spectra of MmPRMT6 WT (■) titrated with different concentrations of cofactor SAH (▲) and peptide H4₁₋₂₁ (●). Analysis of MmPRMT6 alone evidences the binding of endogenous SAH on non-covalent MmPRMT6 dimers (a). Addition of SAH ensures the formation of MmPRMT6:SAH 2:2 species (b), while H4 titration leads to PRMT6:SAH:H4 2:2:1 complexes (c).

Despite extensive progress in all steps of the structure determination process, large-scale protein purification and high resolution diffracting crystals remain key bottlenecks. The relative ease to produce and crystallize MmPRMT6 as described here may facilitate the screening library of potential inhibitors using MmPRMT6 as an initial probe. Among the six structures of MmPRMT6 reported here, five have been refined to resolution better than 1.6 Å. The calcium-containing MmPRMT6 structure determined in this study reached the highest resolution (1.34 Å) determined so far for a PRMT structure. Such high-resolution structures will greatly help the rational design of potential anti-cancer drugs.

The correct folding of helix αX , as observed in MmPRMT6 reduced form, is required to stabilize the productive conformation of E167 (in the double-E loop) for methylation of the bound peptide substrate. Among the PRMT6 residues C53 and C232, responsible for the formation of inter-domain disulfide bonds, are only conserved in mammals. These disulfide bonds may thus be involved in a regulation mechanism of PRMT6 activity. Further evidence will be necessary to test this hypothesis. The ease to obtain the PRMT6 covalent dimer crystal form over the reduced dimer one may be due to the stronger interdomain interaction for the covalent dimer (15% of the total surface versus 10% for the reduced dimer).

The classical scheme is the PRMT field is that dimers are necessary to produce dimethylated arginine in protein substrates in a two-step process (Gary and Clarke, 1998; Lee et al., 1977), monomethylation occurring in one monomer followed by a second methylation event occurring in the second active site, possibly without release of the protein substrate. The dimer interface will be involved in the formation of a binary complex with the protein substrate. As methylated sites of PRMT substrates are usually located on flexible or unfolded terminal extensions, small conformation changes may be required to translocate the target peptide from one active site to the other. Whether PRMT-catalyzed dimethylation results from a distributive or a processive mechanism remains controversial and requires more structural and biochemical data (Antonysamy et al., 2012; Gui et al., 2013; Kolbel et al., 2009; Lakowski and Frankel, 2008; Obianyo and Thompson, 2012; Obianyo et al., 2008; Osborne et al., 2007; Rust et al., 2011). Using mass spectrometry under native conditions, we have shown that MmPRMT6 is a non-covalent dimer that preferentially binds 2 SAH cofactor and one H4 peptide molecules. This result supports the rapid equilibrium random mechanism proposed for PRMT6 (Obianyo and Thompson, 2012). In the absence of structures involving peptide substrates, the functional analysis provided here is too limited to distinguish between the proposed sequential ordered mechanism (Lakowski and Frankel, 2008) and rapid equilibrium random mechanism (Obianyo and Thompson, 2012), which is anyway beyond the scope of this article.

Automethylation of PRMTs has been reported for PRMT1, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6, PRMT7, PRMT8 and PRMT10 (Feng et al., 2013; Frankel et al., 2002; Guo et al., 2014; Lakowski et al., 2010; Niu et al., 2012; Sayegh et al., 2007; Xu et al., 2001). Except for PRMT1, PRMT3 and PRMT7, the locations of the methylated arginines have been identified by mass spectrometry. Most residues are located in the N-terminal extension of PRMTs: R29, R35 and R37 for PRMT6 (Singhroy et al., 2013), R58 and R73 for PRMT8 (Sayegh et al., 2007) and R13 for Arabidopsis PRMT10 (Niu et al., 2012). In this study, we revealed that MmPRMT6 can be also automethylated at R7, located in the N-terminal extension of the protein before the conserved PRMT catalytic core module. Automethylation on the C-terminal domain have been only observed at R551 in mouse CARM1 (Kuhn et al., 2011) and R485 in *Anopheles gambiae* CARM1 (Kuhn et al., 2009). In agreement with their activities, the target arginine are in most cases asymmetrically dimethylated, but monomethylarginine have also been identified for PRMT3, PRMT6 and PRMT8. The reaction has been described to occur either in *cis* (Dillon et al., 2013) or *trans* (Kuhn et al., 2009) in the PRMT homodimer, and to proceed during production in heterologous systems. The fact that these PRMTs are mostly to completely automethylated during the expression/purification (70% in the case of MmPRMT6 R7) explains the low levels of automethylation measured later on in assays with radiolabeled SAM, and automethylation of other PRMTs might even get unnoticed. Automethylation has little to no effect on the enzyme methylation activities, but can modulate secondary activities such as transcription and mRNA-splicing for CARM1 (Kuhn

et al., 2011) and anti-HIV-1 activity for PRMT6 (Singhroy et al., 2013). In the case of MmPRMT6, automethylation (R7) might not have the same impact on the enzyme behavior as for HsPRMT6 (R35). A more systematic approach is required for all PRMTs to identify the automethylated arginine residues and measure their effects on the enzyme activities.

5. Accession numbers

Coordinates and structure factors for the MmPRMT6 structures described herein are available in the Protein Data Bank with accession codes 4C03, 4C04, 4C05, 4C06, 4C07, 4C08.

Acknowledgments

The authors acknowledge J.-M. Strub and C. Atmanene (LSMBO) for their contribution in dimethylation site identification by mass spectrometry. This work was supported by institutional support from CNRS, Université de Strasbourg, Inserm, the Region Alsace, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the GIS IBISA, Instruct, part of the European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI) supported by national member subscriptions as well as the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) [ANR-10-INSB-05-01] and grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-PCVI-0037-01), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (n°A09/4/5005, n°SFI20121205902). J.S. acknowledges the Institut de Recherches Servier (Croissy-sur-Seine, France) for PhD financial support. The authors are indebted to the baculovirus common resources of the IGBMC for recombinant virus production; thank the members of the IGBMC common services and the members of the structural biology platform of IGBMC, especially Pierre Poussin-Courmontagne and Alastair G. McEwen, for technical assistance. The authors thank members of SOLEIL Proxima1 beamlines, the Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland and the European Synchrotron Radiation Facility–European Molecular Biology Laboratory joint Structural Biology groups for the use of beamlines facilities and for help during data collection.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.06.017>.

References

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221.
- Antonysamy, S., Bonday, Z., Campbell, R.M., Doyle, B., Druzina, Z., Gheyi, T., Han, B., Jungheim, L.N., Qian, Y., Rauch, C., Russell, M., Sauder, J.M., Wasserman, S.R., Weichert, K., Willard, F.S., Zhang, A., Emtage, S., 2012. Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17960–17965.
- Boulanger, M.-C., Liang, C., Russell, R.S., Lin, R., Bedford, M.T., Wainberg, M.A., Richard, S., 2005. Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* 79, 124–131.
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vornrhein, C., Womack, T.O., 2011. BUSTER Version 2.10.0. Global Phasing Ltd., Cambridge, United Kingdom.
- Casadio, F., Lu, X., Pollock, S.B., LeRoy, G., Garcia, B.A., Muir, T.W., Roeder, R.G., Allis, C.D., 2013. H3R42me2a is a histone modification with positive transcriptional effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 14894–14899.
- Cheng, Y., Frazier, M., Lu, F., Cao, X., Redinbo, M.R., 2011. Crystal structure of the plant epigenetic protein arginine methyltransferase 10. *J. Mol. Biol.* 414, 106–122.
- Cura, V., Troffer-Charlier, N., Wurtz, J.M., Bonnefond, L., Cavarelli, J., 2014a. Structural insight into arginine methylation by the mouse protein arginine methyltransferase 7: a zinc finger freezes the mimic of the dimeric state into a single active site. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 2401–2412.

- Cura, V., Troffer-Charlier, N., Lambert, M.A., Bonnefond, L., Cavarelli, J., 2014b. Cloning, expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of mouse protein arginine methyltransferase 7. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 70, 80–86.
- Dillon, M.B., Rust, H.L., Thompson, P.R., Mowen, K.A., 2013. Automethylation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) regulates activity by impeding S-adenosylmethionine sensitivity. *J. Biol. Chem.* 288, 27872–27880.
- El-Andaloussi, N., Valovka, T., Touelle, M., Steinacher, R., Focke, F., Gehrig, P., Covic, M., Hassa, P.O., Schar, P., Hubscher, U., Hottiger, M.O., 2006. Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol. Cell* 22, 51–62.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501.
- Feng, Y., Maity, R., Whitelegge, J.P., Hadjikyriacou, A., Li, Z., Zurita-Lopez, C., Al-Hadid, Q., Clark, A.T., Bedford, M.T., Masson, J.Y., Clarke, S.G., 2013. Mammalian protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) specifically targets RXR sites in lysine- and arginine-rich regions. *J. Biol. Chem.* 288, 37010–37025.
- Feng, Y., Hadjikyriacou, A., Clarke, S.G., 2014. Substrate specificity of human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7): the importance of acidic residues in the double E loop. *J. Biol. Chem.* 289, 32604–32616.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T.L., Clarke, S., Bedford, M.T., 2002. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 277, 3537–3543.
- Gary, J.D., Clarke, S., 1998. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 65–131.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., Metz, F., 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305–308.
- Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlantz, H., Luscher, B., Amati, B., 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449, 933–937.
- Gui, S., Woederchak-Donahue, W.L., Zang, T., Chen, D., Daly, M.P., Zhou, Z.S., Hevel, J.M., 2013. Substrate-induced control of product formation by protein arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* 52, 199–209.
- Guo, H., Wang, R., Zheng, W., Chen, Y., Blum, G., Deng, H., Luo, M., 2014. Profiling substrates of protein arginine N-methyltransferase 3 with S-adenosylmethionine analogues. *ACS Chem. Biol.* 9, 476–484.
- Hasegawa, M., Toma-Fukai, S., Kim, J.-D., Fukamizu, A., Shimizu, T., 2014. Protein arginine methyltransferase 7 has a novel homodimer-like structure formed by tandem repeats. *FEBS Lett.* 588, 1942–1948.
- Ho, M.C., Wilczek, C., Bonanno, J.B., Xing, L., Seznec, J., Matsui, T., Carter, L.G., Onikubo, T., Kumar, P.R., Chan, M.K., Brenowitz, M., Cheng, R.H., Reimer, U., Almo, S.C., Shechter, D., 2013. Structure of the arginine methyltransferase PRMT5-MEP50 reveals a mechanism for substrate specificity. *PLoS One* 8, e57008.
- Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., Bauer, U.M., 2007. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev.* 21, 3369–3380.
- Iberg, A.N., Espejo, A., Cheng, D., Kim, D., Michaud-Levesque, J., Richard, S., Bedford, M.T., 2008. Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *J. Biol. Chem.* 283, 3006–3010.
- Invernizzi, C.F., Xie, B., Richard, S., Wainberg, M.A., 2006. PRMT6 diminishes HIV-1 Rev binding to and export of viral RNA. *Retrovirology* 3, 93.
- Invernizzi, C.F., Xie, B., Frankel, F.A., Feldhammer, M., Roy, B.B., Richard, S., Wainberg, M.A., 2007. Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function. *AIDS (London, England)* 21, 795–805.
- Kabsch, W., 2010. Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Karplus, P.A., Diederichs, K., 2012. Linking crystallographic model and data quality. *Science* 336, 1030–1033.
- Kleinschmidt, M.A., de Graaf, P., van Teeffelen, H.A., Timmers, H.T., 2012. Cell cycle regulation by the PRMT6 arginine methyltransferase through repression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *PLoS One* 7, e41446.
- Kolbel, K., Ihling, C., Bellmann-Sickert, K., Neundorff, I., Beck-Sickinger, A.G., Sinz, A., Kuhn, U., Wahle, E., 2009. Type I arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3 act distributively. *J. Biol. Chem.* 284, 8274–8282.
- Krissinel, E., Henrick, K., 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 2256–2268.
- Kuhn, P., Xu, Q., Cline, E., Zhang, D., Ge, Y., Xu, W., 2009. Delineating *Anopheles gambiae* coactivator associated arginine methyltransferase 1 automethylation using top-down high resolution tandem mass spectrometry. *Protein Sci.* 18, 1272–1280.
- Kuhn, P., Chumanov, R., Wang, Y., Ge, Y., Burgess, R.R., Xu, W., 2011. Automethylation of CARM1 allows coupling of transcription and mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 39, 2717–2726.
- Lakowski, T.M., Frankel, A., 2008. A kinetic study of human protein arginine N-methyltransferase 6 reveals a distributive mechanism. *J. Biol. Chem.* 283, 10015–10025.
- Lakowski, T., Hart, P., Ahern, C., Martin, N., Frankel, A., 2010. Neta-substituted arginyl peptide inhibitors of protein arginine N-methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* 5, 1053–1063.
- Lee, H.W., Kim, S., Paik, W.K., 1977. S-adenosylmethionine: protein-arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme. *Biochemistry* 16, 78–85.
- Miranda, T.B., Miranda, M., Frankel, A., Clarke, S., 2004. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 279, 22902–22907.
- Miranda, T.B., Webb, K.J., Edberg, D.D., Reeves, R., Clarke, S., 2005. Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMG1a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 831–835.
- Niu, L., Lu, F., Zhao, T., Liu, C., Cao, X., 2012. The enzymatic activity of Arabidopsis protein arginine methyltransferase 10 is essential for flowering time regulation. *Protein Cell* 3, 450–459.
- Obiany, O., Thompson, P.R., 2012. Kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6). *J. Biol. Chem.* 287, 6062–6071.
- Obiany, O., Osborne, T.C., Thompson, P.R., 2008. Kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* 47, 10420–10427.
- Osborne, T.C., Obiany, O., Zhang, X., Cheng, X., Thompson, P.R., 2007. Protein arginine methyltransferase 1: positively charged residues in substrate peptides distal to the site of methylation are important for substrate binding and catalysis. *Biochemistry* 46, 13370–13381.
- Otwinski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Carter, C.W., Sweet, R.M. (Eds.), *Macromolecular Crystallography*. Academic Press, New York, pp. 307–326.
- Phalke, S., Mzoughi, S., Bezi, M., Jennifer, N., Mok, W.C., Low, D.H., Thike, A.A., Kuznetsov, V.A., Tan, P.H., Voorhoeve, P.M., Guccione, E., 2012. P53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic Acids Res.* 40, 9534–9542.
- Romier, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H., Christodoulou, E., De Marco, V., van Gerwen, S., Knipscheer, P., Lebbink, J.H., Notenboom, V., Poterszman, A., Rochel, N., Cohen, S.X., Unger, T., Sussman, J.L., Moras, D., Sixma, T.K., Perrakis, A., 2006. Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 1232–1242.
- Rust, H.L., Zurita-Lopez, C.L., Clarke, S., Thompson, P.R., 2011. Mechanistic studies on transcriptional coactivator protein arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* 50, 3332–3345.
- Sack, J.S., Thieffine, S., Bandiera, T., Fasolini, M., Duke, G.J., Jayaraman, L., Kish, K.F., Klei, H.E., Purandare, A.V., Rosettani, P., Troiani, S., Xie, D., Bertrand, J.A., 2011. Structural basis for CARM1 inhibition by indole and pyrazole inhibitors. *Biochem. J.* 436, 331–339.
- Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M.T., Clarke, S.G., 2007. Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 282, 36444–36453.
- Schmidt, C., Robinson, C.V., 2014. Dynamic protein ligand interactions—insights from MS. *FEBS J.* 281, 1950–1964.
- Sgarra, R., Lee, J., Tessari, M.A., Altamura, S., Spolaore, B., Giancotti, V., Bedford, M.T., Manfioletti, G., 2006. The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J. Biol. Chem.* 281, 3764–3772.
- Singhroy, D.N., Mesplede, T., Sabbah, A., Quashie, P.K., Falgout, J.P., Wainberg, M.A., 2013. Automethylation of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) regulates its stability and its anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 10, 73.
- Stein, C., Riedl, S., Ruthnick, D., Notzold, R.R., Bauer, U.M., 2012. The arginine methyltransferase PRMT6 regulates cell proliferation and senescence through transcriptional repression of tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Res.* 40, 9522–9533.
- Sun, L., Wang, M., Lv, Z., Yang, N., Liu, Y., Bao, S., Gong, W., Xu, R.M., 2011. Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20538–20543.
- Thomas, D., Lakowski, T.M., Pak, M.L., Kim, J.J., Frankel, A., 2010. Förster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization. *Protein Sci.* 19, 2141–2151.
- Troffer-Charlier, N., Cura, V., Hassenboehler, P., Moras, D., Cavarelli, J., 2007. Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J.* 26, 4391–4401.
- Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T., Bricogne, G., 2011. Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 293–302.
- Waldmann, T., Izzo, A., Kamierniarz, K., Richter, F., Vogler, C., Sarg, B., Lindner, H., Young, N.L., Mittler, G., Garcia, B.A., Schneider, R., 2011. Methylation of H2AR29 is a novel repressive PRMT6 target. *Epigenet. Chromatin* 4, 11.
- Wang, C., Zhu, Y., Chen, J., Li, X., Peng, J., Zou, Y., Zhang, Z., Jin, H., Yang, P., Wu, J., Niu, L., Gong, Q., Teng, M., Shi, Y., 2014a. Crystal structure of arginine methyltransferase 6 from *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* 9, e87267.
- Wang, C., Zhu, Y., Caceres, Tamar B., Liu, L., Peng, J., Wang, J., Chen, J., Chen, X., Zhang, Z., Zuo, X., Gong, Q., Teng, M., Hevel, Joan M., Wu, J., Shi, Y., 2014b. Structural determinants for the strict monomethylation activity by *Trypanosoma brucei* protein arginine methyltransferase 7. *Structure* 22, 756–768.
- Weiss, V.H., McBride, A.E., Soriano, M.A., Filman, D.J., Silver, P.A., Hogle, J.M., 2000. The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1165–1171.
- Xie, B., Invernizzi, C.F., Richard, S., Wainberg, M.A., 2007. Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region. *J. Virol.* 81, 4226–4234.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M., Evans, R.M., 2001. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294, 2507–2511.
- Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Hayami, S., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H.J., Kelly, J.D., Neal, D.E., Maehara, Y., Ponder, B.A.J., Nakamura, Y., Hamamoto, R., 2011.

- Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int. J. Cancer* 128, 562–573.
- Yue, W.W., Hassler, M., Roe, S.M., Thompson-Vale, V., Pearl, L.H., 2007. Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *EMBO J.* 26, 4402–4412.
- Zhang, X., Cheng, X., 2003. Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* 11, 509–520.
- Zhang, X., Zhou, L., Cheng, X., 2000. Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J.* 19, 3509–3519.

Chapitre 4 : Criblage de complexes enzyme/ligand par MS native : le système Tgt/inhibiteurs.

1. Présentation du contexte biologique.

La dysenterie bacillaire est une infection bactérienne de l'intestin causée par les bactéries du genre *Shigella*, affectant 170 millions de personnes par an et responsable d'au moins 1 million de décès, principalement dans des pays en voie de développement [141]. Chez l'Homme, la colonisation puis l'invasion des cellules épithéliales par l'agent pathogène, généralement associées à l'espèce *S.flexneri*, s'accompagne d'une destruction de la muqueuse intestinale, à l'origine de diarrhées aiguës et de complications inflammatoires [142, 143]. Le développement de traitements basés sur l'utilisation de vaccins et d'antibiotiques semble aujourd'hui atteindre ses limites, l'apparition de souches multi-résistantes nécessitant le recours à de nouvelles stratégies [144, 145]. Dans ce contexte, une analyse des facteurs de virulence de la bactérie (invasives) a souligné l'importance de certains régulateurs transcriptionnels dont *VirF*, contrôlant l'expression de ces protéines indispensables à la pathogénicité [146]. L'expression même de ces régulateurs transcriptionnels implique une maturation des ARNs de transfert (ARNt) spécifiques des résidus Tyr, His, Asn et Asp au sein de la bactérie, intervenant dans la traduction de ces protéines. Cette maturation est assurée par l'enzyme Tgt (tRNA-guanine transglycosylase), catalysant l'échange de la guanine 34 de ces ARNt par une base nucléique non canonique appelée 7-aminométhyl-7-deazaguanine (PréQ1) [147] (Fig.25).

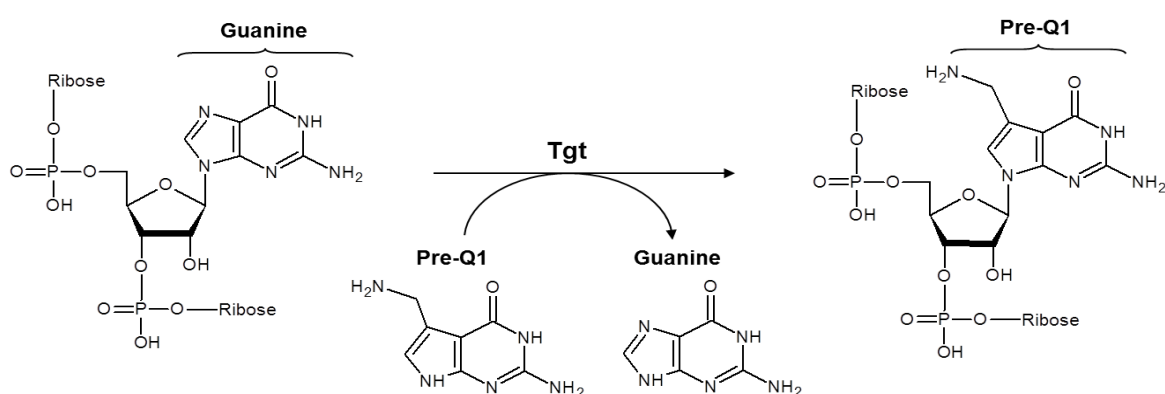


Figure 25 : représentation schématique de la réaction catalysée par l'enzyme Tgt bactérienne, d'après [73].

La perte de virulence observée lors de l'inactivation du gène *tgt* a révélé le potentiel thérapeutique de cette cible [148], uniquement active sous forme de dimères [149-151]. L'ubiquité de cette enzyme, catalytiquement conservée chez les Eucaryotes, mais présentant

certaines particularités structurales et une spécificité de cosubstrat différente, implique le développement d'inhibiteurs sélectifs des isoformes bactériens [152, 153].

Les difficultés de cristallisation associées aux enzymes Tgt du genre *Shigella*, ont orienté les recherches de l'équipe du Pr. Klebe (Philipps-Universität, Marburg) vers la caractérisation d'un homologue structural retrouvé chez *Zymomonas mobilis* [154]. Un développement rationnel d'inhibiteurs, s'appuyant sur les données cristallographiques obtenues, a ainsi été réalisé selon 2 stratégies :

- Inhiber l'activité de l'enzyme à partir de ligands compétitifs du substrat ARNt, capables de se fixer au site actif [151].
- Inhiber la dimérisation de l'enzyme, essentielle à son activité, à partir de ligands de déstabilisation capables de se fixer à l'interface [149].

Le criblage d'inhibiteurs du site actif par MS supramoléculaire, initié au laboratoire par le Dr. Cédric Atmanene, a ainsi permis de valider l'efficacité de certaines molécules dans la déstabilisation des complexes Tgt-ARNt [151]. Néanmoins, la proximité catalytique entre Tgt eucaryotes et procaryotes restreint le développement de tels composés à une drastique sélectivité [153]. Cette principale limitation a ainsi privilégié la focalisation des travaux autour de la seconde stratégie. *A contrario*, l'organisation hétérodimérique des formes eucaryotes génère une interface de dimérisation structurellement différente des homodimères procaryotes, simplifiant la conception d'inhibiteurs spécifiques [155, 156]. L'intégration d'une approche mutationnelle à l'étude de la stabilité du dimère procaryote, a ainsi permis une meilleure compréhension de l'interface de dimérisation, orientant le développement *in silico* d'inhibiteurs spécifiques. La combinaison de ces informations structurales aux données de criblage par MS native, obtenues par les Drs. Stéphanie Petiot-Bécard et François Debaene, a ainsi souligné :

- L'importance de 4 résidus aromatiques et d'un motif boucle-hélice dans l'homodimérisation de Tgt [157, 158].
- L'efficacité de certains dérivés *lin*-benzoguanine dans la déstabilisation de cette interface [159, 160].

2. Objectifs de mon travail et stratégies analytiques développées.

La mise en évidence de l'efficacité de 2 dérivés *lin*-benzoguanine dans la déstabilisation du dimère Tgt a servi de support à la modélisation *in silico* et synthèse de nouvelles molécules [159]. Une approche intégrative, combinant l'analyse des complexes Tgt-ligand associés par

cristallographie, radiomarquage et MS native, est ici proposée pour l'évaluation de l'efficacité de ces ligands. L'objectif de ces travaux consiste :

- En la mise en place d'un criblage fin par MS native, reposant sur une quantification relative des ratios monomère / dimère en présence de ces ligands. La mise en évidence d'une influence de la concentration en Tgt sur la capacité de déstabilisation des ligands et de la superposition d'états de charge monomère/dimère a nécessité une optimisation préliminaire des conditions de criblage par MS native [151, 159].
- L'application de cette méthode à l'étude de 11 inhibiteurs potentiels a permis une comparaison des données de criblage fonctionnel adressées par MS native aux données de criblage issues de la cristallographie et du radiomarquage.

3. Résultats.

3.1. Développements méthodologiques pour une meilleure quantification des rapports monomère / dimère.

Le développement d'un test de criblage basé sur la quantification relative de l'état oligomérique de la protéine en présence de ligands, implique une évaluation préalable :

- De la stabilité de ces oligomères en l'absence de ligand, à une concentration définie et dans des conditions instrumentales optimisées.
- Des limites de quantification imposées par la technique.

La détermination de ces paramètres, indispensable à une interprétation pertinente des résultats, est ici présentée sur l'instrument Synapt G2.

3.1.1. Influence de la concentration en enzyme Tgt sur la stabilité du dimère Tgt.

L'analyse de la protéine Tgt extraite de *Z.mobilis* en conditions natives a été réalisée à 2 concentrations différentes, en accord avec les conditions utilisées lors de précédents travaux [159] (Fig.26). Le choix de ces concentrations (2.5 et 5 μ M de monomère) est ici conditionné par la relative incompatibilité de certains tampons de ligand, à l'origine d'une extinction du signal et d'une sensibilité insuffisante à faible concentration (1 μ M). Une optimisation préliminaire des paramètres instrumentaux (Vc : 80V, Pi : 6 mbar) a permis de confirmer l'état d'oligomérisation de l'enzyme (Fig.26a). L'identification d'une espèce minoritaire de 43078 \pm 1 Da témoigne de la fixation d'un atome de Zn (65 Da) sur le monomère Tgt, dont la masse

mesurée en conditions dénaturantes (43012.6 ± 0.2 Da) s'apparente à la masse théorique (43013.2 Da). Par ailleurs, la détection d'une espèce majoritaire de 86159 ± 3 Da confirme une dimérisation non-covalente de Tgt, chaque monomère fixant un atome de métal [151, 159].

Afin d'évaluer l'influence de la concentration sur la stabilité du dimère, une quantification relative basée sur l'intensité des états de charge associés aux formes monomériques et dimériques, a été réalisée en présence de 2.5 (Fig.26a) et $5\mu\text{M}$ (Fig.26b) de monomère Tgt. Cette quantification relative, ne nécessitant pas une détermination du facteur de réponse de chaque espèce [22], a permis de révéler une proportion de monomère non nulle mais similaire en présence de $2.5\mu\text{M}$ ($3.3 \pm 0.7\%$) et $5\mu\text{M}$ ($3.1 \pm 0.4\%$) d'enzyme. La reproductibilité de ces valeurs, obtenues à partir de triplicats analytiques, souligne la sensibilité et robustesse de l'approche. De façon intéressante, ces résultats témoignent d'une absence d'influence de la concentration sur la stabilité du dimère, dans la gamme de concentration étudiée (2.5 - $5\mu\text{M}$). Afin de favoriser la déstabilisation du dimère en présence de ligand (déplacement de l'équilibre vers les formes monomériques), le recours à de faibles concentrations en enzyme peut ainsi être envisagé jusqu'à $2.5\mu\text{M}$ de monomère.

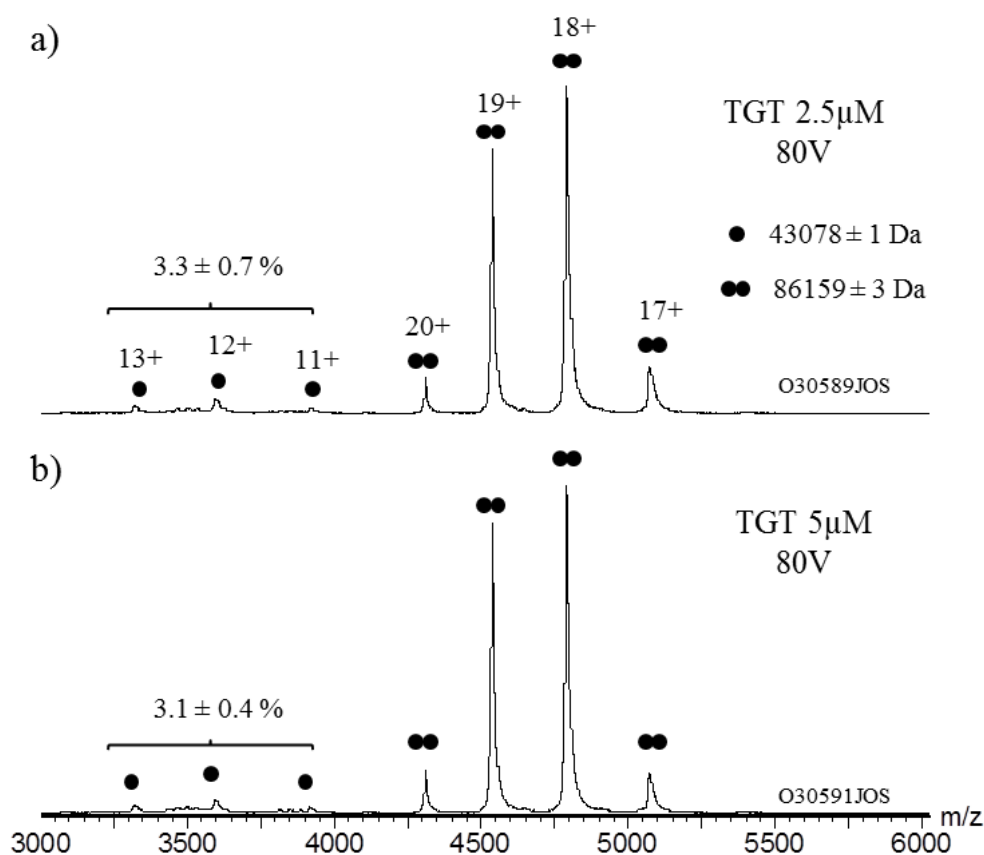


Figure 26 : Influence de la concentration en Tgt sur la stabilité de l'homodimère. L'analyse de a) 2.5 et b) $5\mu\text{M}$ de monomère Tgt est ici suivie par MS native (V_c : 80V , P_i : 6mbar). Une quantification relative basée sur l'intensité des signaux monomériques est rapportée. Les erreurs indiquées sont issues de triplicats analytiques.

3.1.2. Influence de la tension d'accélération (Vc) sur la stabilité du dimère Tgt.

La modeste déstabilisation du dimère attendue en présence des 11 précurseurs moléculaires testés, implique une quantification fiable et subtile des espèces monomériques minoritaires générées [151, 159]. Pour cela, le recours à de faibles concentrations en enzyme, favorables à une déstabilisation (2.5µM), doit pouvoir être compensé par une transmission des ions optimale, indispensable à la détection / quantification des monomères. Dans ce contexte, une augmentation de la tension d'accélération appliquée sur le cône d'échantillonnage, a été envisagée. Afin d'évaluer l'influence de ce paramètre sur la stabilité du dimère, une quantification relative des ratios monomère / dimère mesurés à des tensions de 80 et 120V en présence de l'enzyme seule (2.5µM de monomère) est ici présentée (Fig.27). La mise en évidence d'une augmentation de la proportion de monomères (+5.3%) en présence d'une tension de 120V (Fig.27b) révèle une dissociation partielle du dimère, liée aux conditions instrumentales. Cet artefact illustre la nécessité d'un compromis entre transmission efficace, sensibilité et préservation des interfaces non-covalentes. La prise en compte de ce paramètre et le maintien d'une tension de 80V, permettent ici une interprétation non biaisée de l'efficacité des différents ligands criblés.

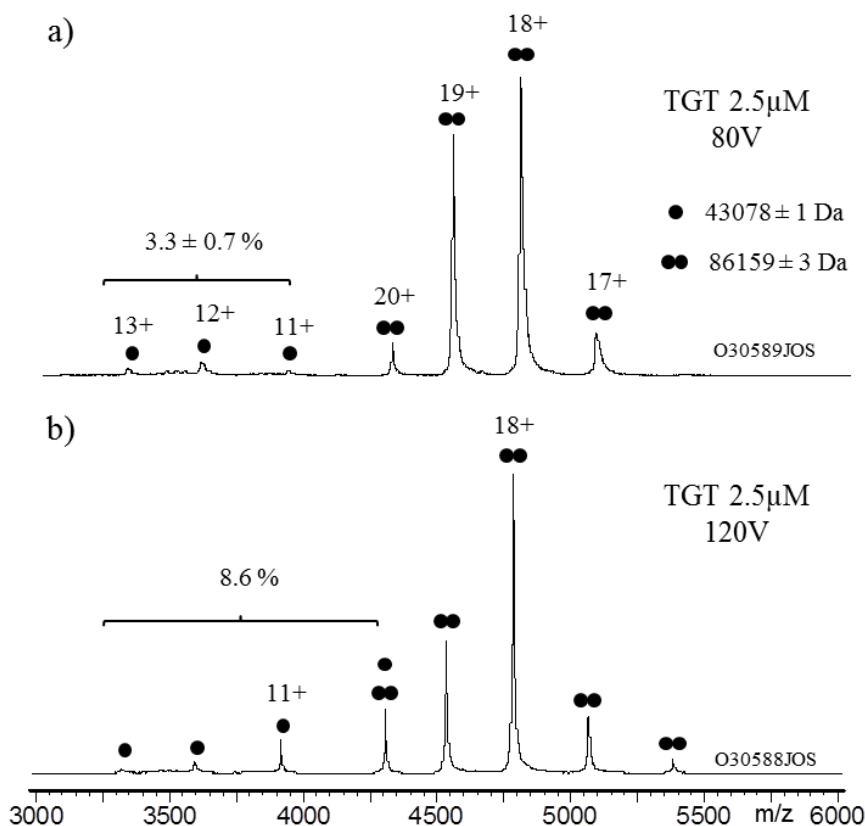


Figure 27 : Influence de la tension de cône sur la stabilité de l'homodimère (Pi : 6mbar). L'analyse de 2.5µM de monomère Tgt a été suivie par MS native en présence d'une tension de cône de a) 80 et b) 120V. Une quantification relative basée sur l'intensité des signaux monomériques est rapportée. Les erreurs indiquées sont issues de triplicats analytiques.

3.1.3. Apport de l'imidazole sur la séparation d'états de charge superposés.

Les expériences précédemment décrites suggèrent l'existence d'une superposition entre l'état de charge 10^+ du monomère et l'état de charge 20^+ du dimère Tgt (Fig.27b), pouvant impacter la quantification relative de ces oligomères. Bien que la distribution de charge du monomère puisse présager d'une intensité négligeable à cet état de charge 10^+ , les subtiles proportions de monomère quantifiées (< 10% du signal total) nécessitent ici la prise en compte de ce signal, soit un degré d'optimisation supplémentaire dans la méthode de quantification.

Face à ce défi, une complémentation des mélanges en présence d'un agent réducteur de charge, l'imidazole, a tout d'abord été envisagée [161, 162]. Dans cette étude, l'effet recherché consiste en une réduction de charge différentielle des 2 oligomères, qui permettrait d'en séparer les distributions de charge. Un titrage de l'enzyme ($2.5\mu\text{M}$) en présence de concentrations croissantes en imidazole a ainsi été réalisé dans des conditions instrumentales identiques (Fig.28). Une diminution globale des états de charge est progressivement observée en présence de concentrations croissantes en imidazole, permettant jusqu'à la détection du dimère chargé 12^+ (Fig.28d). Néanmoins, cette réduction de charge s'avère partielle, une partie des signaux observés en l'absence d'imidazole (Fig.28a) persistant malgré un excès d'imidazole (Fig.28b-d). De plus, la réduction de charge induite semble autant affecter les formes monomériques que dimériques, contribuant à un accroissement global du nombre de signaux superposés. Ces résultats corroborent un mécanisme de réduction de charge par compétition, médié par une différence d'affinité au proton entre l'additif basique ajouté au tampon et les protéines multichargées à l'issue de la désolvation [85, 163]. Bien que présentant des surfaces accessibles au solvant (SASA) différentes, une affinité au proton similaire entre oligomères pourrait ici expliquer une réduction de charge similaire.

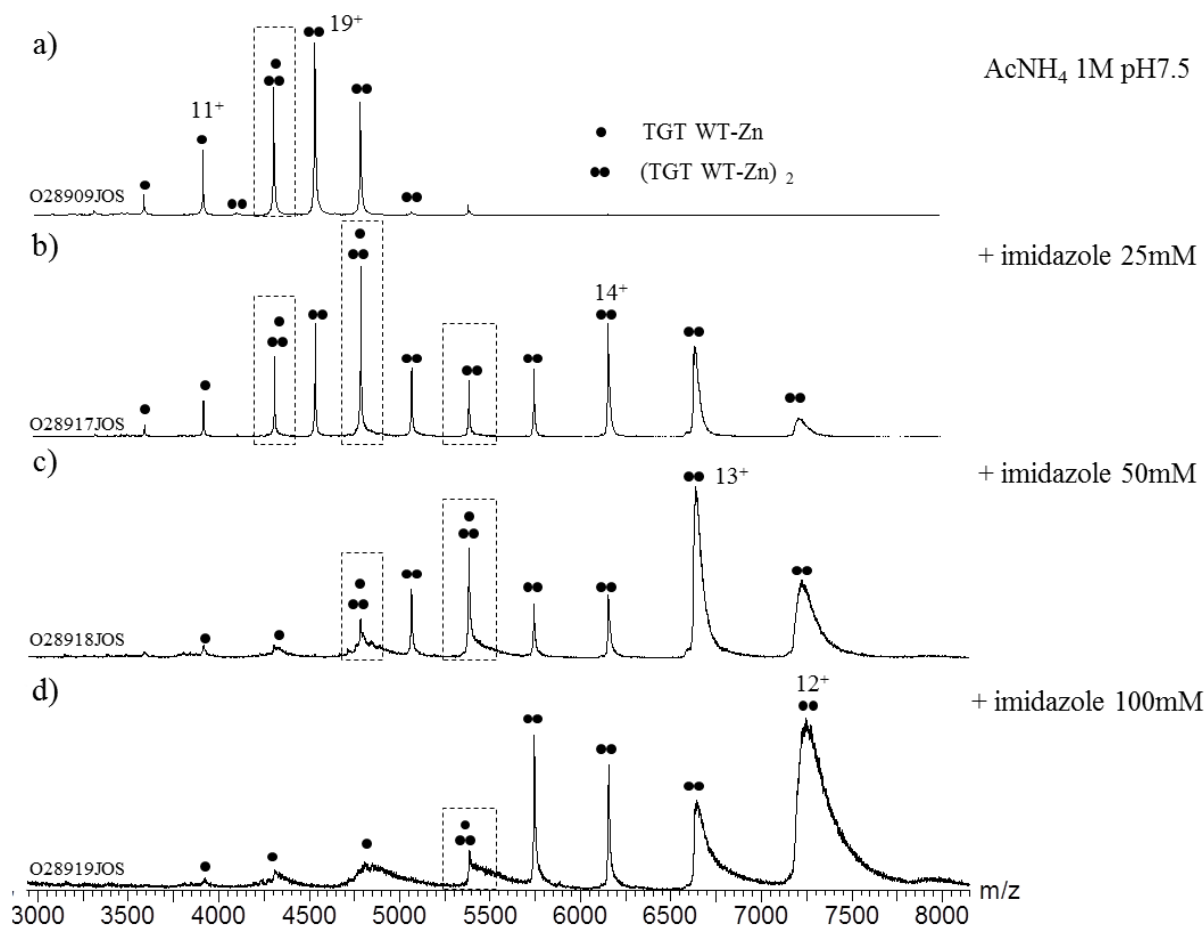


Figure 28 : Influence de l'imidazole sur la distribution de charge des oligomères Tgt (V_c : 120V, P_i : 6mbar). a) La protéine Tgt ($2.5\mu\text{M}$) est analysée par MS native en tampon AcNH_4 1M pH7.5 b) supplémenté de 25, c) 50 et d) 100mM d'imidazole. La persistance de superpositions d'états de charge monomère / dimère est matérialisée par un encadrement des signaux concernés.

3.1.4. Apport de l'IM-MS native dans la séparation d'états de charge superposés.

Face à cet écueil, une autre stratégie basée sur l'utilisation de l'IM-MS native a été envisagée (Fig.29). La différence de conformation attendue entre monomères et dimères et la différence de charge des signaux superposés justifie ici le recours à ce couplage, sensible à la section efficace et à la charge des ions [44, 45]. Cette approche s'est révélée particulièrement adaptée à l'étude de protéines amyloïdes, dont la large distribution oligomérique peut s'accompagner de signaux superposés [164]. L'analyse de la protéine par IM-MS native dans des conditions expérimentales ($2.5\mu\text{M}$ de monomère, tampon AcNH_4 1M pH7.5) et instrumentales ($V_c = 80\text{V}$) optimales (Fig.29a,d) est tout d'abord réalisée. Les paramètres de mobilité ionique sont ici optimisés afin d'assurer une résolution IM optimale des signaux superposés ($m/z \approx 4309$). La distribution des temps de dérive (ATDs) associée au signal d'intérêt ($10^+ / 20^+$), à l'état de charge 12^+ du monomère et 18^+ du dimère, s'avère gaussienne, suggérant une homogénéité de conformation et de charge sous chacun des signaux. Afin d'évaluer les limites de résolution de

notre méthode IM, l'analyse est reproduite à des tensions de cône plus élevées, dans l'optique de promouvoir la proportion de monomère Tgt, soit la superposition des signaux 10^+ / 20^+ . Les spectres de masse extraits des expériences IM-MS menées à 120 puis 180V (Fig.29b,c) confirme une dissociation progressive du dimère, la distribution de charge du monomère s'intensifiant et s'élargissant. Parallèlement, les ATDs extraits de ces mêmes expériences (Fig.29e,f) suggèrent une activation conformationnelle des 3 espèces suivies, matérialisée par une augmentation globale de leur temps de passage dans la cellule IM. Contrairement aux espèces exclusivement monomériques (12^+) ou dimériques (18^+), l'ATD du signal superposé perd progressivement son caractère gaussien pour un dédoublement de distribution, imputable à un déplacement d'équilibre du dimère 20^+ vers le monomère 10^+ . Ces données soulignent la capacité de résolution de ces espèces par IM-MS. Néanmoins, l'absence de séparation à de plus faibles tensions de cône impliquerait une restriction des limites de sensibilité en IM-MS, incompatible avec la détection d'espèces de faible intensité.

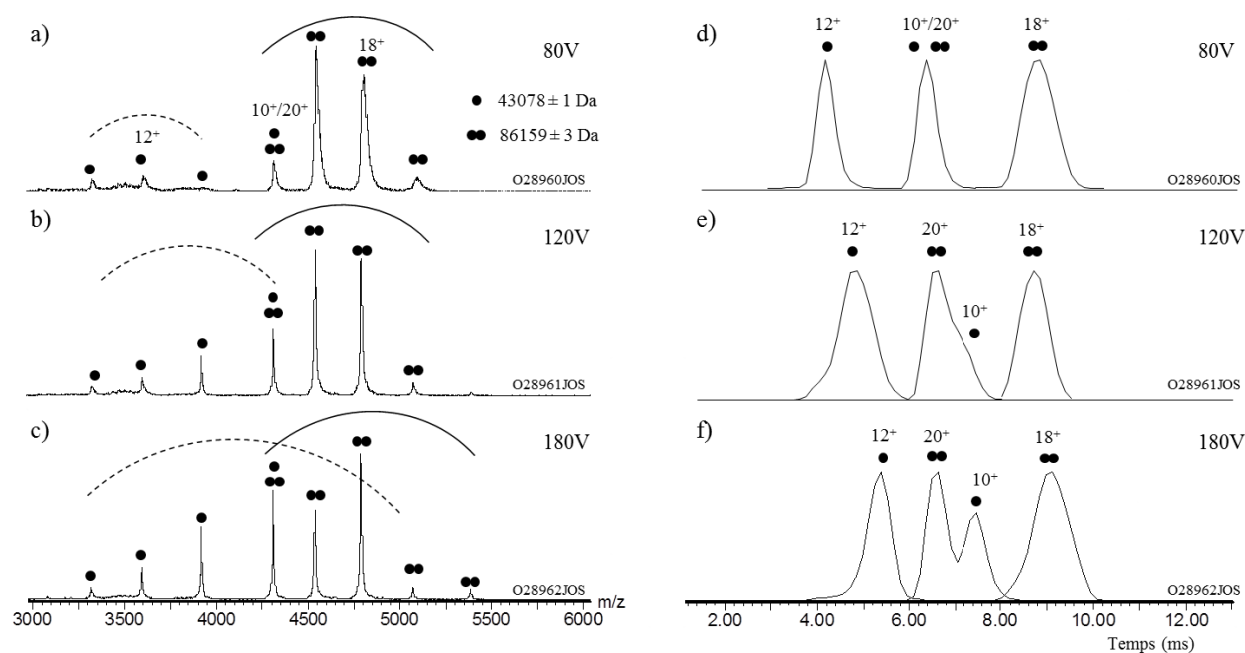


Figure 29 : Analyse de la protéine Tgt par IM-MS native à différentes tensions de cône (Pi : 6mbar). L'analyse de $2.5\mu\text{M}$ de monomère en conditions natives (AcNH_4 1M pH7.5) est suivie dans la dimension masse (a-c) et mobilité ionique (d-f) à 80 (a, d), 120 (b, e) et 180V (c, f). L'analyse des spectres de masse permet de souligner une dissociation de l'homodimère induite en phase gazeuse, la distribution des états de charge du monomère et du dimère apparaissant en traits pointillés et pleins, respectivement. La distribution des temps de dérive associée à certaines espèces monomériques (ion 12^+ et 10^+) et dimériques (20^+ et 18^+), est représentée après normalisation de leur intensité.

Pour illustrer la perte de sensibilité inhérente au mode IM-MS, une comparaison de l'intensité des signaux mesurés par MS native et IM-MS native dans des conditions expérimentales et instrumentales strictement identiques (à l'exception de la cellule IM) est proposée (Fig.30). La

détermination de l'intensité absolue des ions 12^+ et 19^+ assignés au monomère et dimère Tgt sur un nombre de scans identiques révèle une perte de sensibilité en IM-MS native (Fig.30b, 9 et 9.10^1 coups respectivement), l'intensité de ces ions en MS native étant 5 à 10 fois supérieure en fonction du rapport m/z (Fig.30a, 34 et 1.10^3 coups respectivement). La restriction de la gamme dynamique accessible en IM-MS s'est ici révélée incompatible avec les limites de sensibilité exigées par la quantification relative des signaux suivis.

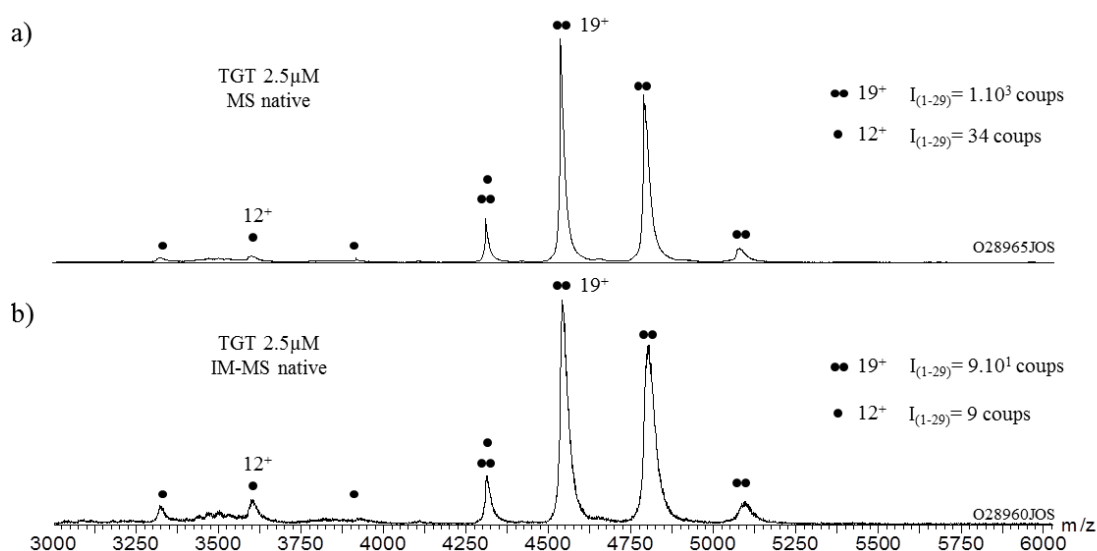


Figure 30 : Influence du mode IM-MS sur l'intensité des signaux MS. Une comparaison des spectres de masse de la protéine Tgt (2.5 μM de monomère, AcNH₄ 1M pH7.5) obtenus par a) MS native et b) IM-MS native dans des conditions instrumentales identiques (Vc = 80V, Pi = 6 mbar), permet de comparer l'intensité absolue des espèces dimériques 19^+ et monomériques 12^+ (nombre de coups sur 29 scans de 4s, gamme m/z : 1000-8000).

3.1.5. Prédicibilité de l'intensité des signaux superposés par simulation spectrale.

Une dernière approche a consisté en une simulation du spectre de masse individuel de chaque oligomère présent en mélange. Dans ce contexte, le logiciel Amphitrite, développé pour l'extraction automatisée des temps de dérive en IM-MS, génère une déconvolution préalable des spectres de masse, nécessaire à l'assignation des distributions de charge de chaque espèce [165]. Parmi les fonctions proposées, un ajustement des distributions de charge identifiées à un modèle gaussien, permet une simulation du signal MS de chaque espèce présente en mélange. La qualité de ces simulations est optimisée à travers une comparaison quantitative entre le spectre expérimental et le spectre reconstruit. Afin d'évaluer cet outil, une simulation du spectre de masse obtenu à 120V en présence de 5 μM de Tgt est ici rapportée (Fig.31). La proportion non négligeable de monomère quantifiée (10.6%) fait de ce spectre un modèle de distribution en oligomères Tgt. La mise en évidence expérimentale d'une distribution de charge étroite et unique des monomères Tgt [158] valide la pertinence du modèle d'ajustement gaussien appliqué.

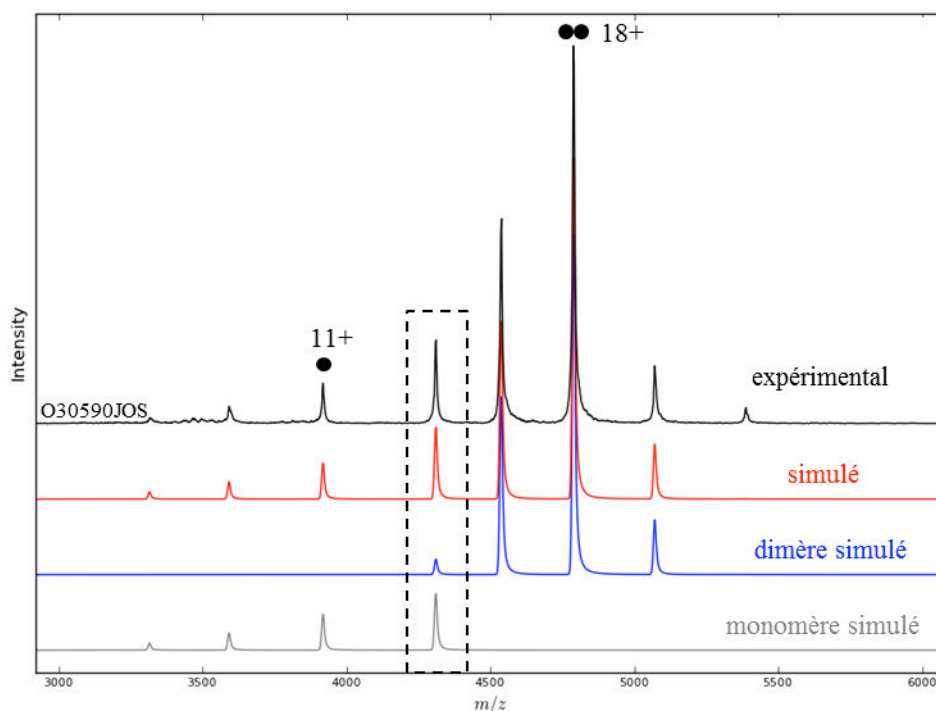


Figure 31 : Simulation de signal à partir du logiciel Amphitrite. L'ajustement gaussien des distributions de charge identifiées au sein du spectre de masse native (Tgt 5 μ M, 120V) permet une simulation des signaux individuels associés aux monomères (gris) et dimères Tgt (bleu). La minimisation des erreurs entre spectre global simulé (rouge) au spectre expérimental (noir) conditionne la qualité de l'ajustement. Les états de charge 10⁺ et 20⁺ confondus au sein du spectre MS sont ici encadrés.

La simulation du signal monomérique (10 à 13⁺) générée par le logiciel s'avère non gaussienne, suggérant une surestimation de l'intensité du signal 10⁺. Par ailleurs, la distribution de charge simulée pour le dimère n'intègre pas l'état de charge 16⁺, pourtant assigné à cette espèce (16 à 20⁺). L'obtention de résultats similaires par ajustement manuel des intensités exportées au format Excel semble confirmer la difficulté d'une telle prédiction. Le nombre limité d'états de charge par oligomère, favorisé en conditions natives, pourrait ici expliquer l'inadaptation de tels ajustements.

En conclusion, l'ensemble de ces optimisations a permis de définir les conditions expérimentales (Tgt 2.5 μ M, AcNH₄ 1M pH7.5) et instrumentales (MS native, Vc = 80V) nécessaires à la réalisation d'un criblage de ligands par MS native, combinant une déstabilisation optimale du dimère Tgt en présence de ces molécules [159] et une quantification relative robuste et reproductible. Bien que limitée, la superposition de certains états de charge constitue une contrainte de quantification n'ayant pu être ici contournée à partir des stratégies présentées. Néanmoins, l'influence de la fixation des ligands sur la superposition des enveloppes de charge monomère / dimère s'est avérée restreinte, limitée à un seul état de charge (Fig.33). Une détermination manuelle de l'intensité des oligomères confondus sous ce signal, basée sur l'intensité des états de charge adjacents, a ainsi été systématiquement

appliquée pour chaque ligand au cours du criblage présenté, limitant les biais de quantification associés.

3.2. Criblage de l'efficacité des ligands dans la déstabilisation du dimère Tgt par MS native.

La substitution de ligands *lin*-benzoguanines par des groupements de type ethinyl, s'est révélée particulièrement efficace dans la déstabilisation du dimère Tgt [159]. Contrairement aux suppositions, la fixation de ces ligands n'implique pas une perturbation directe de la tétrade hydrophobe formée par les résidus W326/Y330/H333/F92, indispensable à la cohésion de l'interface dimérique [158]. L'analyse du complexe co-cristallisé en présence du ligand LJB142 (Fig.32a) révèle une perturbation inattendue d'un motif boucle-hélice $\alpha_1\beta_1$ adjacent, induite par le ligand et responsable d'une intrusion déstabilisatrice de molécules d'eau. L'efficacité de ce ligand a ainsi inspiré la synthèse de 10 nouveaux ligands, regroupés en 3 familles distinctes par la nature de leurs substituants (Fig.32b).

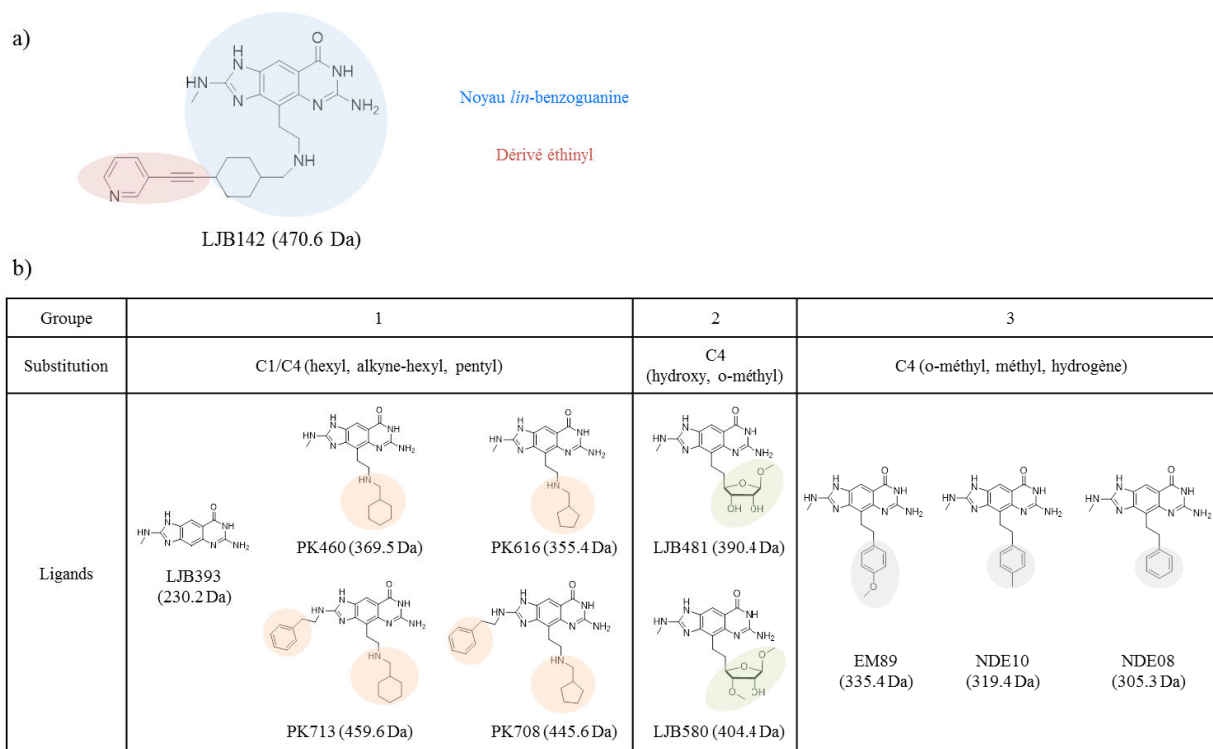


Figure 32 : Présentation des 11 ligands de déstabilisation caractérisés par MS native. La structure du ligand LJB142 (a) a servi d'ébauche à la conception rationnelle de dérivés inhibiteurs par modélisation moléculaire (b).

Le potentiel de déstabilisation de ces 11 molécules a ainsi été évalué par MS native en présence de l'enzyme Tgt. La mise en évidence d'une influence de la concentration en dimère sur l'efficacité du ligand LJB142 a justifié le recours à une concentration monomérique minimale de 2.5 μ M, en accord avec les limites de sensibilité précédemment décrites [159]. De même, la tension de cône appliquée au cours de ce criblage a été fixée à 80V afin d'éviter une

déstabilisation du dimère d'origine instrumentale. Dans un souci de reproductibilité, le criblage individuel de chaque ligand a été réalisé sous 25 μ M (ratio monomère:ligand 1:10) à partir de triplicats analytiques. Les spectres obtenus en présence d'un représentant de chaque famille de ligand sont ici représentés (Fig.33a-e).

Dans un premier temps, la comparaison de ces données suggère une déstabilisation modeste de l'homodimère Tgt dans les conditions appliquées, quelle que soit la nature du ligand. La faible proportion de monomères détectée contraste avec la persistance de formes dimériques majoritaires, dont la caractérisation permet d'identifier la stœchiométrie d'interaction en ligand. Malgré un élargissement des signaux lié à la relative incompatibilité de certains tampons de ligand, les différences de masse mesurées s'avèrent suffisamment importantes pour permettre une identification non ambiguë de ces stœchiométries. A l'instar du ligand de référence LJB142 (470.6 Da), les ligands PK713 (459.6 Da) et LJB580 (404.4 Da) se fixent préférentiellement au dimère (86159 ± 3 Da) à raison d'une molécule par monomère (Fig.33b-d, masses mesurées respectives de 87103 ± 1 Da, 87079 ± 3 Da et 86970 ± 3 Da), en accord avec la littérature [159]. Contrairement au ligand NDE08 (Fig.33e, 86771 ± 1 Da), cette stœchiométrie d'interaction monomère:ligand 2:2 n'est néanmoins pas totale, une fraction de dimères ne fixant pas ou 1 seule molécule de ligand étant également observée (Fig.33b-d, masses mesurées respectives de 86630 ± 1 Da, 86620 ± 2 Da et 86583 ± 14 Da). Des résultats similaires ont été obtenus en présence des ligands PK460, PK616, PK708, LJB481, EM89, NDE10 et LJB393, seul ce dernier assurant une saturation du dimère Tgt (stœchiométrie 2:2) dans les conditions testées.

La quantification des ratios monomère / dimère au sein de ces expériences a permis, dans un second temps, de cribler l'efficacité de chaque molécule dans la déstabilisation du dimère Tgt (Tableau 1). Les résultats obtenus soulignent tout d'abord la reproductibilité des quantifications, les erreurs obtenues à partir de triplicats analytiques étant voisines de 1%, à l'exception du ligand NDE08 (2.8%). Par ailleurs, les différentes proportions de monomère induites par chaque ligand permettent de regrouper arbitrairement ces molécules en 4 groupes d'efficacité relative (Fig.34a). La détermination d'un facteur de déstabilisation, correspondant au rapport entre la proportion de monomère détectée en présence ou absence de chaque ligand, suggère l'existence :

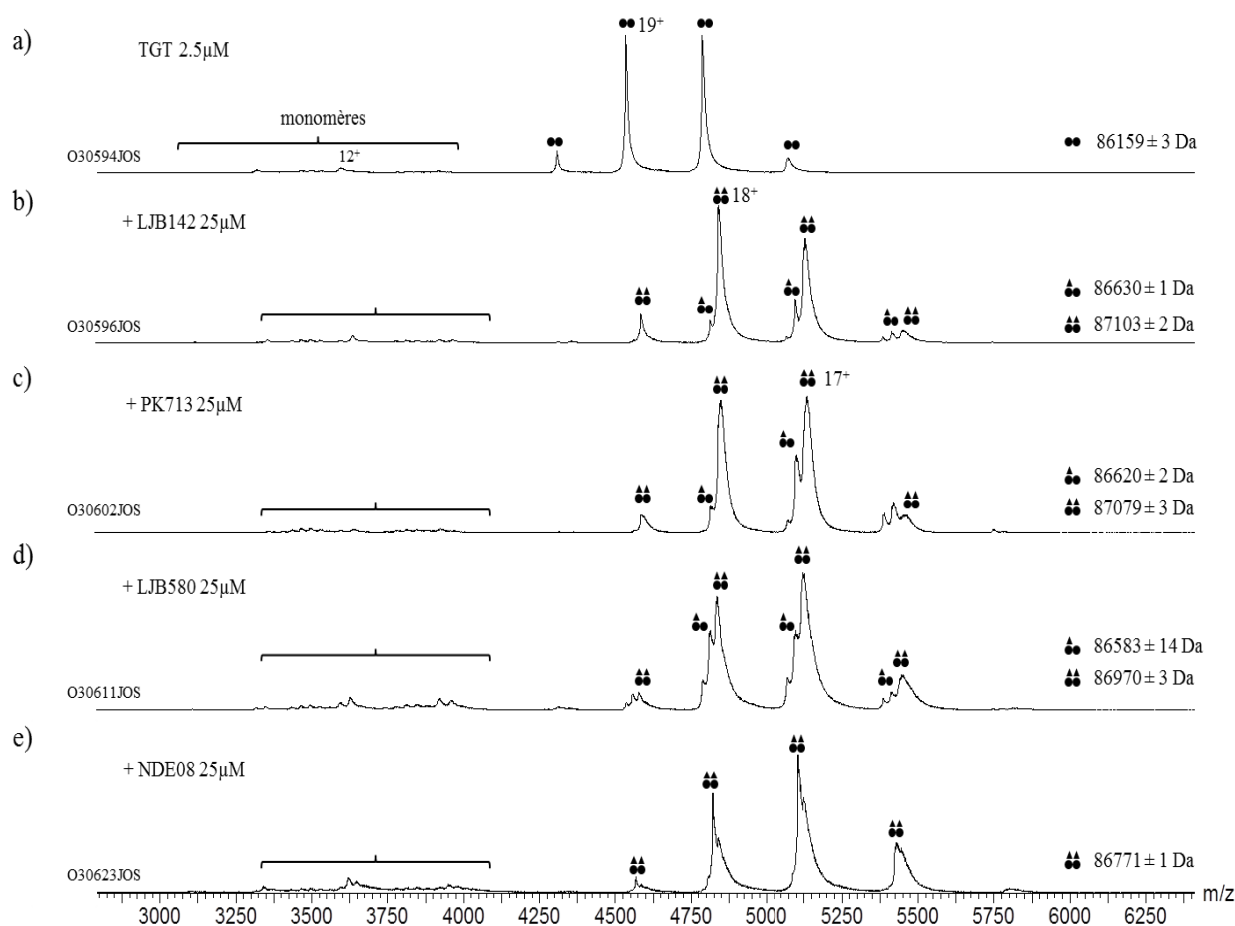


Figure 33 : Déstabilisation de l'homodimère Tgt par un titrage en ligands (Vc : 80V, Pi : 6mbar). a) La protéine Tgt (2.5µM de monomère) est analysée par MS native en tampon AcNH₄ 1M pH7.5 b-e) après 10 minutes d'incubation en présence de 10 excès de ligand b) LJB142, c) PK713, d) LJB580 et e) NDE08, dans des conditions expérimentales et instrumentales identiques.

Ligand	Proportion relative d'espèces monomériques (%)											
	Aucun	LJB142	LJB393	PK460	PK713	PK616	PK708	LJB481	LJB580	EM89	NDE10	NDE08
Ratio 1:10	3.3 ± 0.7	5.6 ± 1.3	3.4 ± 1.2	2.5 ± 0.4	2.9 ± 1.4	4.2 ± 0.5	4.7 ± 0.9	5.3 ± 1.1	9.6 ± 1.1	9.4 ± 1.0	7.1 ± 1.5	12.6 ± 2.8

Tableau 1 : Criblage de l'efficacité des ligands dans la déstabilisation du dimère Tgt par MS native. Une quantification relative du ratio monomère / dimère, basée sur l'intensité des états de charge, a été réalisée à partir de mélanges individuels 1:10 entre la protéine Tgt (2.5µM de monomère) et chaque molécule (25µM). Les molécules appartenant aux ligands de groupe 1, 2 et 3 apparaissent respectivement en orange, vert et bleu. Les erreurs indiquées sont issues de triplicats analytiques.

- D'un premier groupe, constitué des ligands LJB393, PK460 et PK713, n'induisant pas une déstabilisation significative du dimère Tgt (facteur ≤ 1).
- D'un second groupe, composé des ligands PK616, PK708 et LJB481, induisant une faible déstabilisation du dimère Tgt ($1 < \text{facteur} < 2$).
- D'un troisième groupe, regroupant les ligands LJB142 et NDE10, responsable d'une déstabilisation intermédiaire du dimère Tgt ($2 \leq \text{facteur} < 3$).
- D'un quatrième groupe, incluant les ligands LJB580, EM89 et NDE08, assurant une déstabilisation importante du dimère Tgt (facteur ≥ 3).

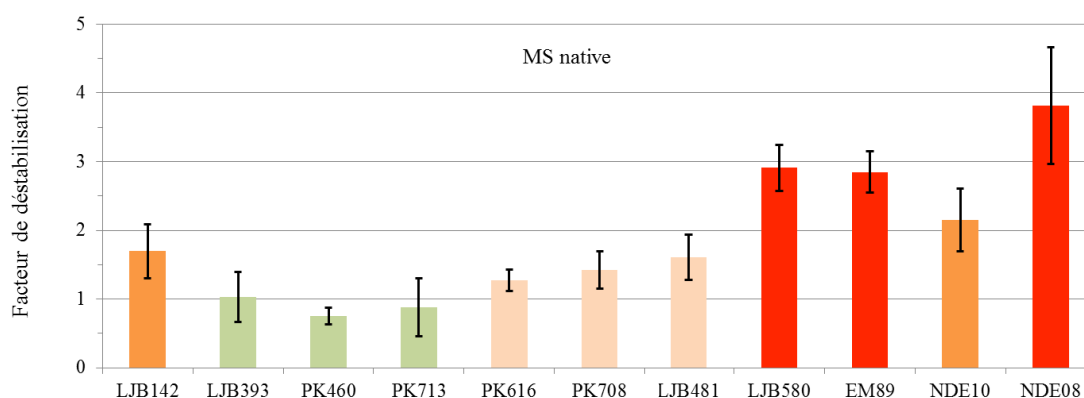
Ces résultats confirment l'impact du composé LJB142 dans la déstabilisation de l'interface dimérique, corroborant de précédents travaux réalisés au laboratoire [159]. L'absence d'influence en présence du ligand LJB393, non substitué en position C4, souligne l'importance des groupements C4 du ligand LJB142. De façon intéressante, certaines des 9 nouvelles molécules conçues *in silico* à partir de ce ligand, semble présenter des propriétés d'inhibition accrues. Il s'agit des ligands NDE10, EM89, LJB580 et NDE08, appartenant aux groupes de substituants 2 et 3 de ces ligands (Fig.32).

4. Conclusions.

Les résultats préliminaires de ce criblage par MS native ont pu être intégrés aux données orthogonales de radiomarquage et de cristallographie générées en présence de ces mêmes molécules (Fig.34b). La comparaison de l'efficacité de déstabilisation de ces composés (MS native) et de leur influence sur la conformation de la boucle $\beta_1\alpha_1$ (structures co-cristallisées) semble corrélée, à l'exception des ligands PK460 et PK713. En effet, les ligands responsables d'une déstabilisation intermédiaire à importante du dimère Tgt (LJB142, NDE10, EM89, LJB580, NDE08) induisent un changement conformationnel notable de la boucle $\beta_1\alpha_1$, recouvrant la tétrade hydrophobe W326/Y330/H333/F92 indispensable à l'homodimérisation [151]. De la même façon que le ligand LJB142 [159], la flexibilité de la boucle induite par ces ligands s'accompagnerait d'une pénétration de molécules d'eau au niveau de la poche hydrophobe, déstabilisant indirectement cette dernière. *A contrario*, l'efficacité de ces ligands (MS native) ne semble pas liée à leur affinité, comme en témoigne les constantes de dissociation (Kd) mesurées par radiomarquage. Une nouvelle détermination de la solubilité et affinité de certains ligands sera prochainement réalisée afin de valider ou non cette observation. Par ailleurs, les complexes Tgt-ligands criblés font actuellement l'objet d'une caractérisation par microcalorimétrie de titration, dont la thermodynamique d'interaction devrait permettre de

mieux comprendre le rôle de ces inhibiteurs dans l'hydratation de la tétrade hydrophobe. En conclusion, ces travaux soulignent le potentiel d'une nouvelle génération d'inhibiteurs, dont le développement et l'optimisation impliqueront une évaluation de leur innocuité en présence de l'enzyme eucaryote. D'un point de vue analytique, les difficultés rencontrées lors de la quantification relative des ratios monomère / dimère (superposition d'états de charge) pourraient bénéficier d'un nouveau couplage entre chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et spectrométrie de masse native, permettant une séparation préalable des oligomères avant leur analyse et quantification relative par MS native [166].

a)



b)

Cristallographie (boucle $\beta 1\alpha 1$)	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Radiomarquage (Kd en nM)	5	58	4	15	2	1	217	353	3700	6900	1000

Figure 34: Intégration des données de MS native, cristallographie et de radiomarquage pour le criblage de ligand de déstabilisation du dimère Tgt. a) L'évaluation du facteur de déstabilisation F de chaque ligand (rapport entre la proportion de monomères mesurée en présence ou absence de cette molécule) par MS native permet une classification arbitraire de ces espèces en fonction de leur efficacité (vert, $F \leq 1$; rose, $1 < F < 2$; orange, $2 \leq F < 3$; rouge, $F \geq 3$). b) L'analyse des complexes par cristallographie et radiomarquage permet d'évaluer l'impact de ces ligands sur la flexibilité de la boucle $\beta 1\alpha 1$ (orange, positif ; vert, nul), ainsi que leur affinité (vert, $K_d \geq 1 \mu\text{M}$; rose, $100 < K_d < 1000 \text{ nM}$; orange, $10 < K_d < 100 \text{ nM}$; rouge, $K_d < 10 \text{ nM}$).

Chapitre 5 : Criblage de complexes enzyme/ligand par IM-MS native: le système PDF1B/inhibiteurs.

1. Présentation du contexte biologique.

Au cours des 20 dernières années, l'administration massive d'antibiotiques s'est accompagnée de l'émergence de bactéries multi-résistantes, pressant la recherche au développement de nouveaux inhibiteurs et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques [167-169]. La sélection de ces potentiels candidats repose sur certains critères. Entre autre, la cible doit :

- Etre partagée par une large communauté de pathogènes de l'Homme (spectre d'action).
- Intervenir dans un processus essentiel à leur survie (efficacité).
- Etre absente ou suffisamment distincte de ses homologues eucaryotes (spécificité, toxicité).
- Ne pas être inhibée par d'autres molécules (faible pression de sélection, résistance limitée).

Dans ce contexte, une famille d'enzymes appelées peptides déformylases (PDF), s'est révélée particulièrement prometteuse [170, 171]. Ces métalloprotéases interviennent dans le processus d'excision de la méthionine N-Terminale (NME), une modification co-translationnelle majeure affectant 50 à 70% des protéines eucaryotes et procaryotes, et contrôlant leur stabilité / activité [172-174]. Chez les procaryotes, ce mécanisme se décline en 2 étapes (Fig.35).

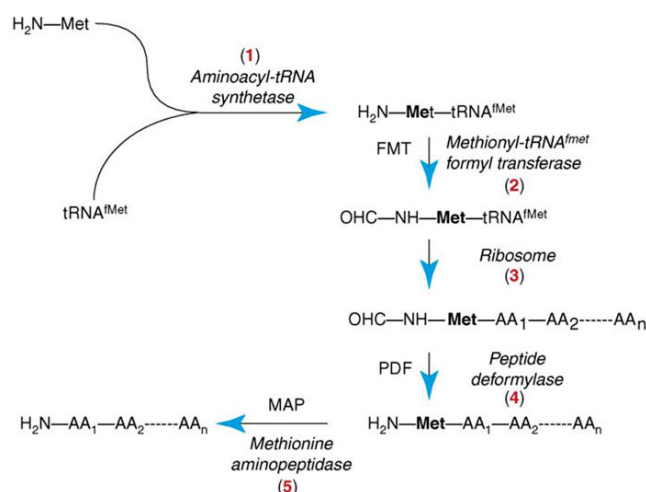


Figure 35: Représentation du cycle d'excision de la méthionine N-Terminale procaryote, d'après [171]. L'intégration d'un ARNt^{fmet} chargé d'une méthionine formylée (1,2) par le ribosome lors de l'initiation de la traduction, permet l'incorporation de ce résidu dans la chaîne polypeptidique naissante (3). Lors de l'élongation peptidique, la déformylation préalable de cette méthionine N-terminale par l'enzyme PDF (4) permet son clivage par l'enzyme méthionine aminopeptidase (MAP, 5).

L'incorporation d'une méthionine formylée en position N-Ter lors de l'initiation de la traduction s'accompagne d'une déformylation puis d'un clivage de ce résidu, successivement catalysés par les enzymes PDF et méthionine aminopeptidases (MAP) lors de l'élongation. Le caractère létal conféré par l'inactivation de gènes PDF procaryotes et eucaryotes, souligne le rôle fondamental joué par ces enzymes [175, 176]. Néanmoins, l'ubiquité de ces enzymes, regroupées en 4 classes de séquences et de structures (PDF1A/B, PDF2, PDF3), implique le développement d'inhibiteurs spécifiques des isoformes non humains (PDF1B, PDF2) [177, 178]. La résolution cristallographique de ces variants a ainsi servi d'ébauche à la conception rationnelle d'inhibiteurs spécifiques, dont le potentiel a pu être évalué par analyse fonctionnelle [177, 179]. De telles études ont permis de souligner l'efficacité d'un inhibiteur peptidique naturel, l'actinonine [180]. Cependant, la toxicité relative de ce composé sur certaines cellules humaines a nécessité la poursuite de ces travaux [181]. Dans ce contexte, de nouveaux inhibiteurs non peptidiques ont été développés par l'équipe du Dr. Meinel [182]. Une caractérisation structurale et enzymatique approfondie de l'enzyme PDF1B d'*Arabidopsis thaliana*, modèle d'étude bactérien, a relié l'efficacité de certains inhibiteurs à leur mode de fixation dit de « Slow Tight Binding » (STB) [42, 167, 183] (Fig.36).

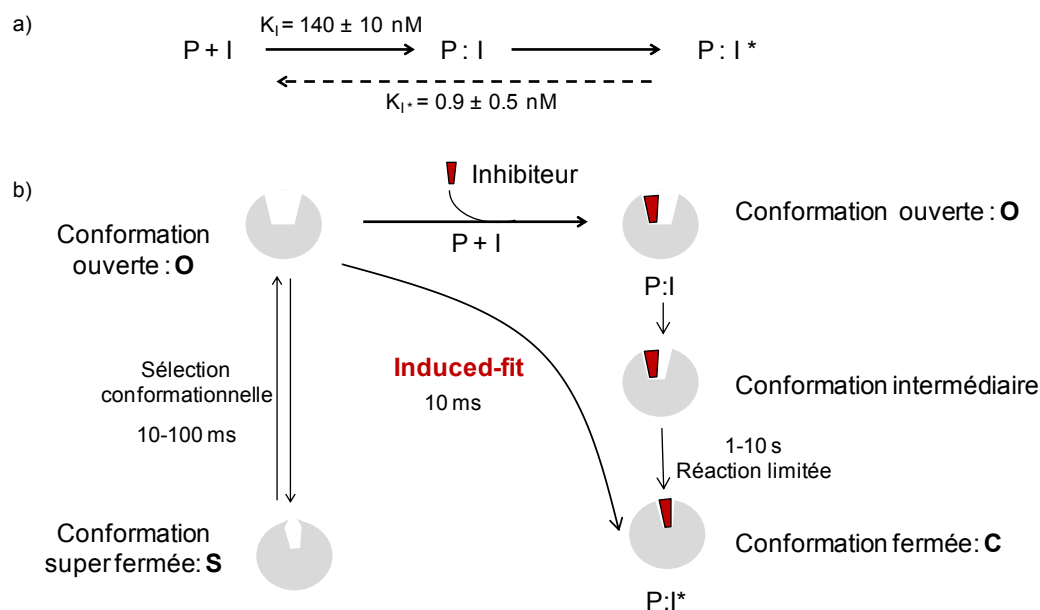


Figure 36: Description du mécanisme « Slow Tight Binding » (STB), d'après [184]. a) L'inhibition enzymatique de la protéine PDF1B (P) par certaines molécules (I) suggère un mécanisme en 2 étapes, le complexe initial P:I formé ($K_i > 100\text{nM}$) pouvant évoluer vers un complexe P:I* quasi irréversible ($K_i^* < 1\text{nM}$). b) L'analyse cristallographique de ces complexes supporte une liaison des inhibiteurs à la conformation ouverte (O) du site actif de l'enzyme, en équilibre avec une conformation superfermée (S). La formation rapide de ces complexes (P:I) s'accompagne d'un changement conformationnel, responsable de la fermeture partielle du site actif (conformation intermédiaire). Cette étape s'achève par une fermeture plus lente mais complète de ce site (conformation fermée C), stabilisant les complexes ainsi formés (P:I*). Le changement conformationnel induit par la fixation de ces ligands STB (O vers C) est caractéristique d'un mécanisme de type « induced-fit ».

Dans ce schéma, l'inhibiteur STB (I) reconnaît la conformation ouverte du site actif de l'enzyme (P) et s'y fixe, formant rapidement un complexe non-covalent P:I d'affinité modérée. Cette interaction non-covalente s'accompagne d'une fermeture partielle du site actif (conformation intermédiaire), évoluant plus lentement vers une fermeture totale (conformation fermée), stabilisant ces complexes quasi-irréversibles (P:I*). Ce passage d'une forme ouverte à une forme fermée de la protéine s'effectuerait ainsi en plusieurs étapes, en accord avec l'existence d'un mécanisme « Induced Fit » [185]. Ces propriétés remarquables et responsables de l'effet prolongé de l'actinonine, constituent un critère de choix dans le criblage de nouvelles molécules, impliquant une caractérisation conformationnelle fine de leurs complexes associés.

2. Objectifs de l'étude.

L'objectif de ces travaux, initiés au laboratoire par le Dr. Petiot, porte sur une caractérisation dynamique des complexes formés entre l'enzyme PDF1B d'*A.thaliana* et 3 inhibiteurs bactériens: l'actinonine (inhibiteur peptidique STB de référence) ainsi que les composés non peptidiques *21* et *6b*, développés *in silico* par le groupe du Dr. Meinel. Ce criblage, devant apporter des preuves de l'existence du mécanisme STB, se décline en 2 parties :

- Le criblage structural des complexes par MS native doit permettre une détermination des propriétés de « binding » de ces molécules (stœchiométrie, affinité, spécificité, stabilité des complexes en phase gazeuse).
- Le criblage conformationnel des complexes par IM-MS native doit permettre une détermination fine de l'impact de ces inhibiteurs sur la conformation globale des complexes (CCS, stabilité des conformations en phase gazeuse).

La détermination de ces propriétés par MS native et IM-MS est ici observée en temps réel à travers le suivi cinétique :

- De titrages individuels entre la protéine PDF1B et chacun des ligands.
- D'expériences de compétition, impliquant PDF1B et un couple de ligands, incubés simultanément (compétition directe) ou séquentiellement (compétition indirecte).

Les données structurales disponibles sur chaque complexe [42] permettent une détermination de leur CCS théorique, faisant l'objet d'une comparaison aux CCS expérimentales mesurées.

3. Résumé des résultats.

3.1. Criblage des complexes PDF1B:ligand par MS native en temps réel.

Une analyse préliminaire de PDF1B seule en conditions natives (Fig.37a, 21933 ± 1 Da) a tout d'abord permis de confirmer l'état monomérique de cette protéine et la fixation d'un atome de nickel (58.7 Da), en accord avec la masse mesurée en conditions dénaturantes (21876.2 ± 0.1 Da) et la littérature [186]. Afin de vérifier la stœchiométrie et spécificité d'interaction des 3 ligands, un titrage individuel de l'enzyme ($5\mu\text{M}$) en présence de différentes concentrations de chaque ligand (5 à $50\mu\text{M}$) a été réalisé. Dans des conditions de saturation idéales (Fig.37a, PDF1B:ligand 1:2), la détection d'une espèce unique de 22318 ± 1 Da confirme la fixation spécifique d'une molécule d'actinonine (385.5 Da) à raison d'une stœchiométrie 1:1. Des résultats similaires sont obtenus par incubation des ligands *2l* (294.4 Da) et *6b* (269.1 Da), menant à la formation de complexes 1:1 uniques (22227 ± 1 et 22202 ± 1 Da, respectivement).

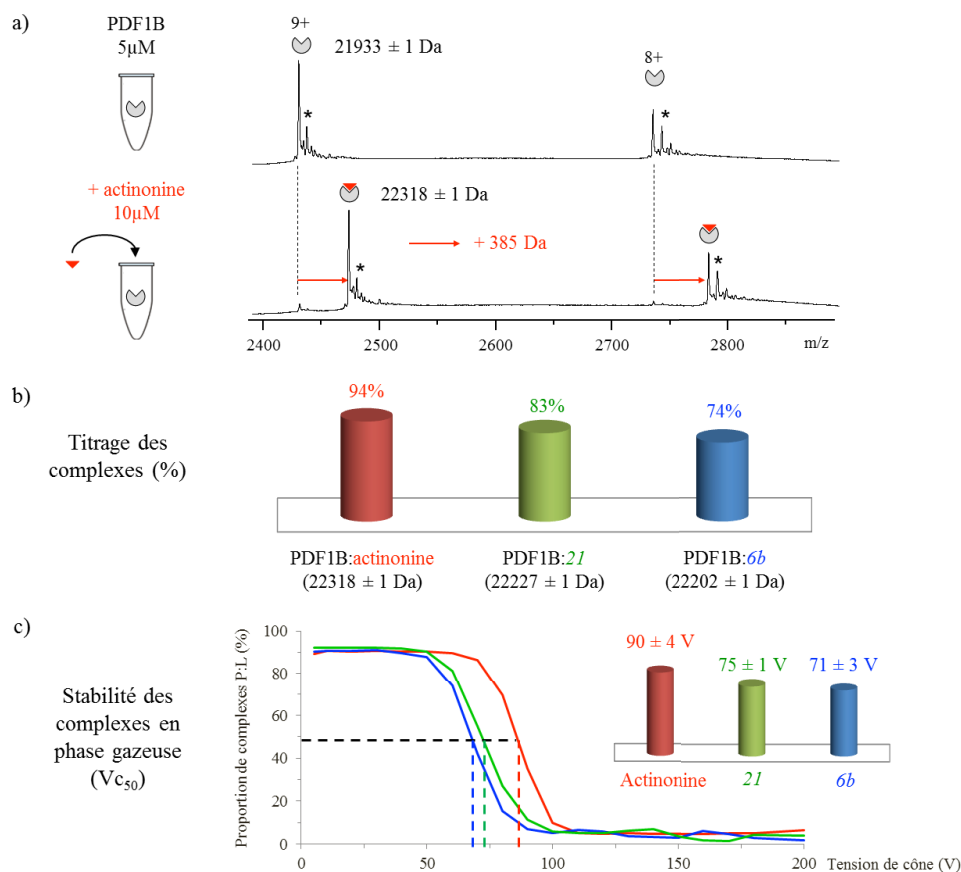


Figure 37 : Caractérisation des interactions PDF1B:ligand par MS native. a) Les spectres de masse natifs de l'enzyme seule (panel haut, $5\mu\text{M}$) et incubée en présence de son ligand actinonine durant 10 minutes (panel bas, titrage 1:2) sont ici présentés. Les astérisques indiquent la présence d'adduits Ni²⁺. b) Proportions de complexes PDF1B:ligand 1:1 formés par titrage individuel entre l'enzyme ($5\mu\text{M}$) et ses ligands ($10\mu\text{M}$). Cette quantification relative s'appuie sur l'intensité des états de charge 8⁺ et 9⁺ mesurée par MS native après 10 minutes d'incubation. c) Proportions de complexes PDF1B:ligand 1:1 détectés en fonction de la tension de cône appliquée. Les traits pointillés correspondent aux valeurs de V_{c50} mesurées en présence des ligands actinonine (rouge), *2l* (vert) et *6b* (bleu).

La quantification relative des signaux PDF1B apo / holo mesurés au cours du temps dans ces conditions de titrage, met en évidence une formation rapide de ces complexes (< 1 minute), ainsi qu'une différence d'affinité entre les ligands (Fig.37b). En effet, les proportions de complexes formés en présence des ligands actinonine (94%), *21* (83%) et *6b* (74%), soulignent une affinité plus marquée pour l'actinonine que pour les ligands *21* et *6b*. Dans ces mêmes conditions, une comparaison de la stabilité des complexes PDF1B:ligand en phase gazeuse a été menée (Fig.37c). A nouveau, la tension de cône nécessaire à la dissociation de 50% de ces complexes (V_{c50}) suggère une stabilité plus importante en présence de l'actinonine ($90 \pm 4V$) qu'en présence des composés *21* ($75 \pm 1V$) et *6b* ($71 \pm 3V$), en accord avec une contribution électrostatique plus marquée au sein du cristal [42, 187].

L'analyse dynamique de la fixation de ces molécules à travers des expériences de compétitions directes et indirectes, démontre la présence d'un site de fixation unique et confirme l'existence de 2 catégories de ligands, d'affinités apparentes différentes. La réalisation de compétitions directes consiste en l'incubation simultanée de 2 ligands (10 μ M) en présence de l'enzyme (5 μ M), suivie par MS native au cours du temps (Fig.38a). La présence d'actinonine au sein des mélanges (Fig.38b-g) se traduit systématiquement par la détection de complexes PDF1B:actinonine majoritaires dès 1 minute d'incubation (81 et 82% en présence des ligands *6b* et *21*), déplaçant complètement la faible proportion (11%) de complexes PDF1B:*6b* (Fig.38b,d) ou PDF1B:*21* (Fig.38e,g) observée, après 30 minutes (Fig.38c-d,f-g). *A contrario*, le mélange des ligands *6b* et *21* (Fig.38h-j) s'accompagne d'une distribution de complexes PDF1B:*21* (31%) et PDF1B:*6b* (56%) dès 1 minute (Fig.38h,j), le déplacement partiel du ligand *6b* par le ligand *21* s'achevant par l'atteinte d'un équilibre (49 et 37%, respectivement) au-delà de 30 minutes (Fig.38i,j). Ces observations sont corroborées au sein d'expériences de compétition indirecte, déclenchées par l'ajout séquentiel d'un second ligand (10 μ M) sur un complexe PDF1B:ligand1 1:1 préformé (5 μ M:10 μ M). Malgré une étape de préincubation, les ligands *21* ou *6b* fixés à la protéine PDF1B sont de nouveau totalement déplacés par l'actinonine en l'espace de 30 minutes. Réciproquement, aucun de ces 2 ligands, quelle que soit sa concentration (10-50 μ M), ne permet un déplacement de l'actinonine préincubée. A nouveau, un déplacement mutuel des complexes PDF1B:*21* ou PDF1B:*6b* préformés est observé par l'ajout respectif des ligands *6b* et *21*, se soldant par un déplacement de l'équilibre vers la formation du complexe PDF1B:ligand2. L'ensemble de ces expériences souligne l'existence d'un site de fixation unique, aucun complexe PDF1B:ligand1:ligand2 1:1:1 spécifique n'étant détecté. Par ailleurs, les profils de compétition relevés confirment l'affinité apparente accrue de l'actinonine, déplaçant entièrement les ligands *21* et *6b*, d'affinités intermédiaires et voisines.

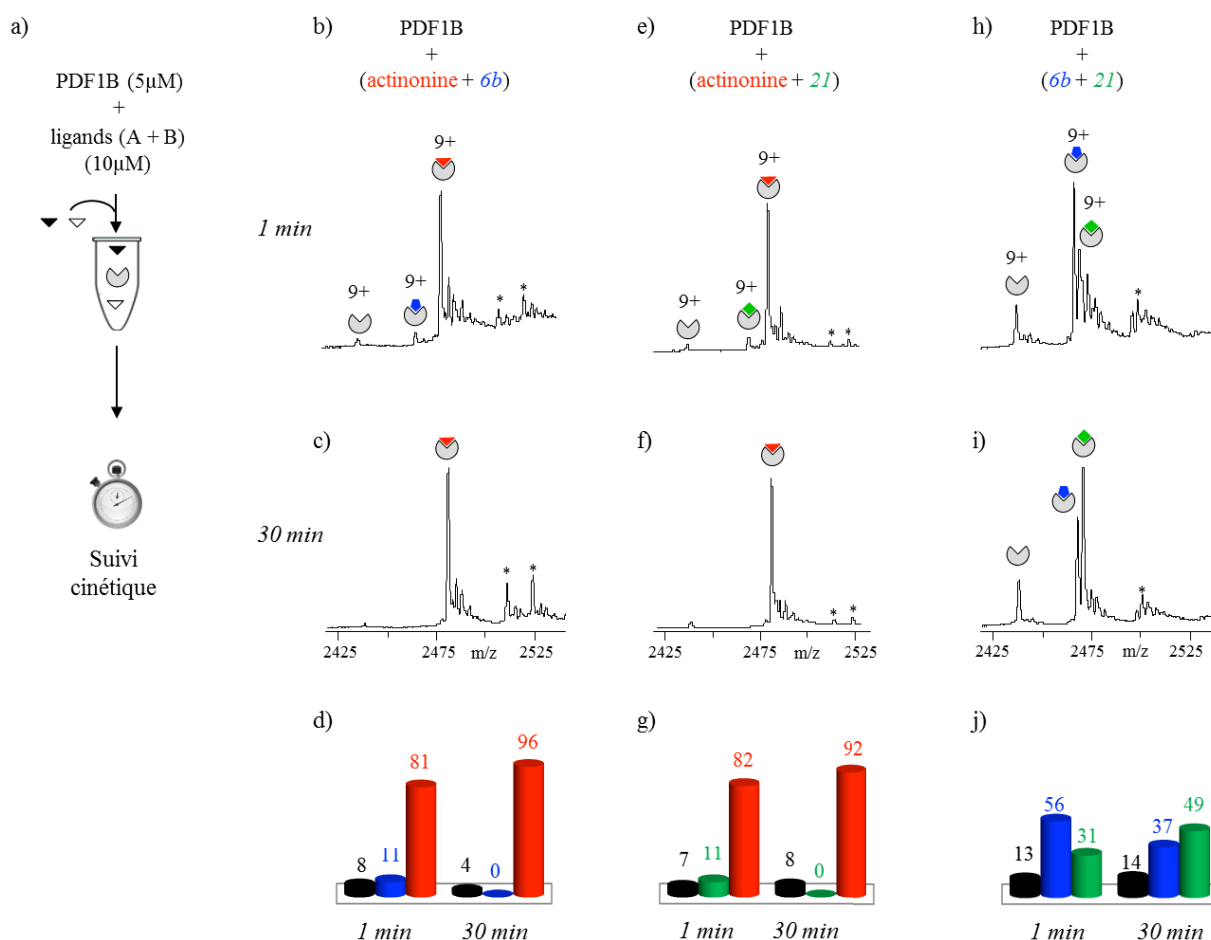
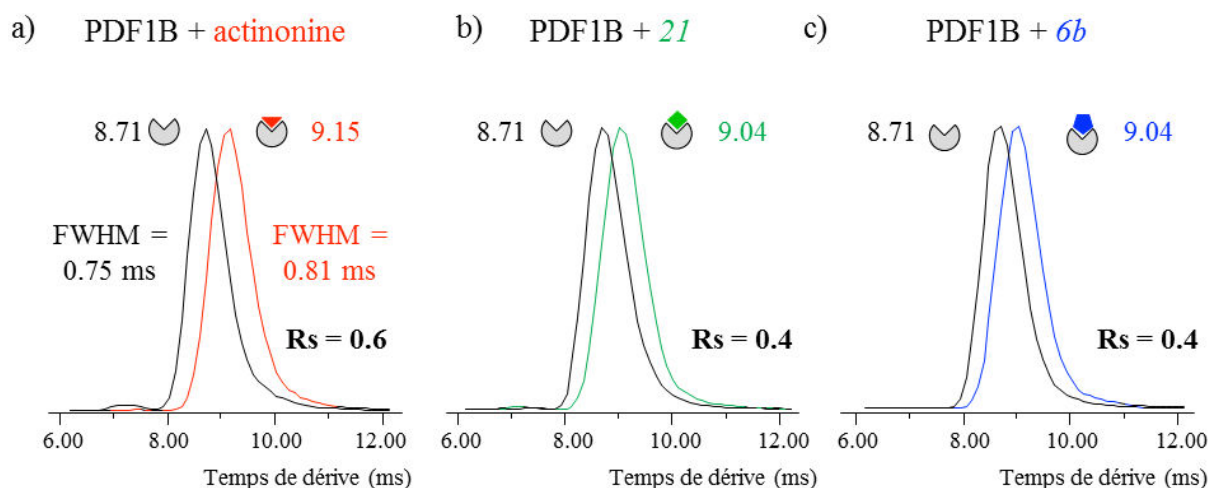


Figure 38: Suivi cinétique des complexes PDF1B:ligand formés en présence de compétitions directes par MS native. a) Présentation schématique des expériences de compétition directe. L'ajout de 5 μM d'enzyme PDF1B à un mélange équimolaire constitué de 2 des 3 ligands testés (10 μM) est suivi en temps réel par MS native. b,c,e,f,h,i) Spectres de masse natifs (zooms sur l'état de charge 9⁺) obtenus après (b,e,h) 1 minute et (c,f,i) 30 minutes d'incubation en présence des couples de ligands (b,c) actinonine/6b, (e,f) actinonine/21 et (h,i) 6b/21. d,g,j) Quantification relative des différentes espèces présentes après 1 et 30 minutes d'incubation en présence des couples de ligands (d) actinonine/6b, (g) actinonine/21 et (j) 6b/21. Les astérisques représentent la fixation non spécifique d'une seconde molécule de ligand.

3.2. Criblage des complexes PDF1B:ligand par IM-MS native en temps réel.

La mise en évidence de 2 classes de ligand par MS native (« actinonine like » et « 21/6b like »), se distinguant par leurs affinités relatives et stabilités en phase gazeuse, conduit à l'interrogation conformationnelle de ces complexes. En effet, le mécanisme STB suggéré par l'étude cristallographique du complexe PDF1B:actinonine implique un faible changement conformationnel, responsable d'une fermeture locale et totale du site de fixation [42]. Dans ce contexte, l'IM-MS native, sensible à la conformation globale des ions, a été appliquée au criblage de subtils changements conformationnels induits par la fixation de ces ligands.

Une caractérisation individuelle de mélanges PDF1B:ligand sous-stœchiométriques (ratio 1:0.5) par IM-MS a ainsi permis l'analyse simultanée des formes PDF1B apo et holo (Fig.39).



d)

	PDF1B apo	PDF1B:actinonine	PDF1B:2I	PDF1B:6b
$t_D^{9^+}$ (ms)	8.67 ± 0.06	9.11 ± 0.06	9.00 ± 0.06	8.97 ± 0.13
$\Delta t_D^{9^+}$ (ms)	0	$+0.44 \pm 0.00$	$+0.33 \pm 0.00$	$+0.33 \pm 0.00$
${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}^{9^+}$ (\AA^2)	1948 ± 7	1971 ± 8	1959 ± 10	1957 ± 5
$\Delta {}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}^{9^+}$ (\AA^2)	0	22 ± 1 (+1.1%)	17 ± 1 (+0.8%)	15 ± 3 (+0.7%)

Figure 39 : Caractérisation IM-MS des changements conformationnels induits par la fixation des ligands sur PDF1B. a,b,c) Les distributions de temps de dérive (ATDs) associées aux ions 9^+ des espèces apo et holo sont extraites de mélanges individuels sous-stœchiométriques entre PDF1B apo ($5\mu\text{M}$) et ses ligands ($2.5\mu\text{M}$) a) actinonine, b) 2I et c) 6b, incubés 10 minutes. Les ATDs correspondant aux espèces PDF1B apo, PDF1B:actinonine, PDF1B:2I et PDF1B:6b sont respectivement représentés en noir, rouge, vert et bleu. La largeur à mi-hauteur (FWHM) et le pouvoir séparateur (Rs) de ces distributions sont ici indiqués. d) Présentation des temps de dérive (t_D) et CCS moyens (${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$) mesurés sur l'état 9^+ de ces espèces. Les erreurs exprimées sont issues de triplicats analytiques.

Une optimisation instrumentale fine, centrée sur la séparation IM des états de charge 9^+ des espèces PDF1B apo et PDF1B:actinonine, a permis de pointer une différence faible mais significative de 0.44 ms associée au temps de dérive (Δt_D) de ces espèces. L'application de cette méthode à l'analyse des complexes PDF1B:2I et PDF1B:6b, présentant une distribution de charge similaire à l'enzyme apo, révèle une augmentation moindre de ce temps de dérive, mais identique entre les 2 ligands ($\Delta t_D = 0.33$ ms). Ce criblage démontre ainsi l'existence de 3 conformations :

- Une conformation correspondant à la forme PDF1B apo.
- Une conformation intermédiaire, semi-compacte, liée aux complexes PDF1B:2I/6b ($\Delta {}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2} = +0.7\text{-}0.8\%$).
- Une conformation compacte, liée au complexe PDF1B:actinonine ($\Delta {}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2} = +1.1\%$).

Afin de confronter l'augmentation de conformation globale mesurée par IM-MS à la compaction locale du site actif observée par cristallographie, un alignement des carbones α des structures PDF1B apo et PDF1B:actinonine a été réalisé. Bien que les déviations les plus marquées concernent les atomes à proximité du site de fixation ($\Delta C\alpha = 1.2\text{\AA}$), la fixation de cet inhibiteur se traduit par des changements conformationnels plus distants, portés par des structures secondaires adjacentes ($0.6 < \Delta C\alpha < 1\text{\AA}$). Ces résultats démontrent la coexistence d'une compaction locale et d'une décompaction globale induite par la fixation de l'actinonine, soulignant la complémentarité des approches de haute et basse résolution.

L'exploitation des structures cristallographiques associées aux espèces PDF1B apo, PDF1B:actinonine et PDF1B:6b a permis d'en prédire les CCS théoriques (Tableau 2). Les résultats obtenus à partir de l'algorithme « Trajectory Method » (TM), particulièrement adapté à de tels complexes, ne révèlent aucune différence de CCS significative entre PDF1B apo ($1972 \pm 33 \text{\AA}^2$) et les complexes PDF1B:6b/actinonine (1937 ± 20 et $1977 \pm 26 \text{\AA}^2$), contrairement aux expériences IM-MS. Parmi les explications à cet échec, la subtilité des différences conformationnelles traquées ($\Delta^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N2}} \leq 1\%$) peut être avancée.

	Méthode	PDF1B apo (PDB: 3PN2)	PDF1B:actinonine (PDB: 3M6P)	PDF1B:6b (PDB: 3O3J)
CCS (\AA^2)	PA ^a	1562 \pm 2	1565 \pm 1	1540 \pm 2
	EHSS ^b	1987 \pm 3	1988 \pm 2	1955 \pm 3
	TM ^c	1972 \pm 33	1977 \pm 26	1937 \pm 20
ΔCCS (\AA^2)	PA	0	N.S. ^d	-22 (-1.4%)
	EHSS	0	N.S.	-32 (-1.6%)
	TM	0	N.S.	N.S.

Tableau 2 : Calcul des sections efficaces théoriques (CCS) associées aux structures cristallographiques, à partir des différentes méthodes du logiciel Mobcal [116, 117]. ^a Projection Approximation. ^b Exact Hard Sphere Scattering. ^c Trajectory Method. ^d Non significatif. Les erreurs indiquées représentent l'écart-type issu de 6 réplicats de calcul indépendants.

Pour conclure, l'identification de 2 types de changements conformationnels subtils et induits par IM-MS (Fig.39), a suscité une évaluation du potentiel de cette approche pour la caractérisation dynamique de ces conformères en mélange. Pour cela, les expériences de compétition directe précédemment décrites (Fig.38) ont été suivies par IM-MS (Fig.40). L'analyse des mélanges actinonine/6b et actinonine/21 après 1 minute d'incubation par MS native (Fig.38b,e), permet une détection concomitante des espèces PDF1B apo, PDF1B:6b/21 et PDF1B:actinonine. Les différences de temps de dérive mesurées à l'état de charge 9^+ par IM-MS entre les espèces PDF1B apo (référence), PDF1B:6b/21 ($\Delta t_D = 0.33\text{ms}$) et PDF1B:actinonine ($\Delta t_D = 0.44\text{ms}$) au sein de ces mélanges (Fig.40a,d) démontrent la séparation

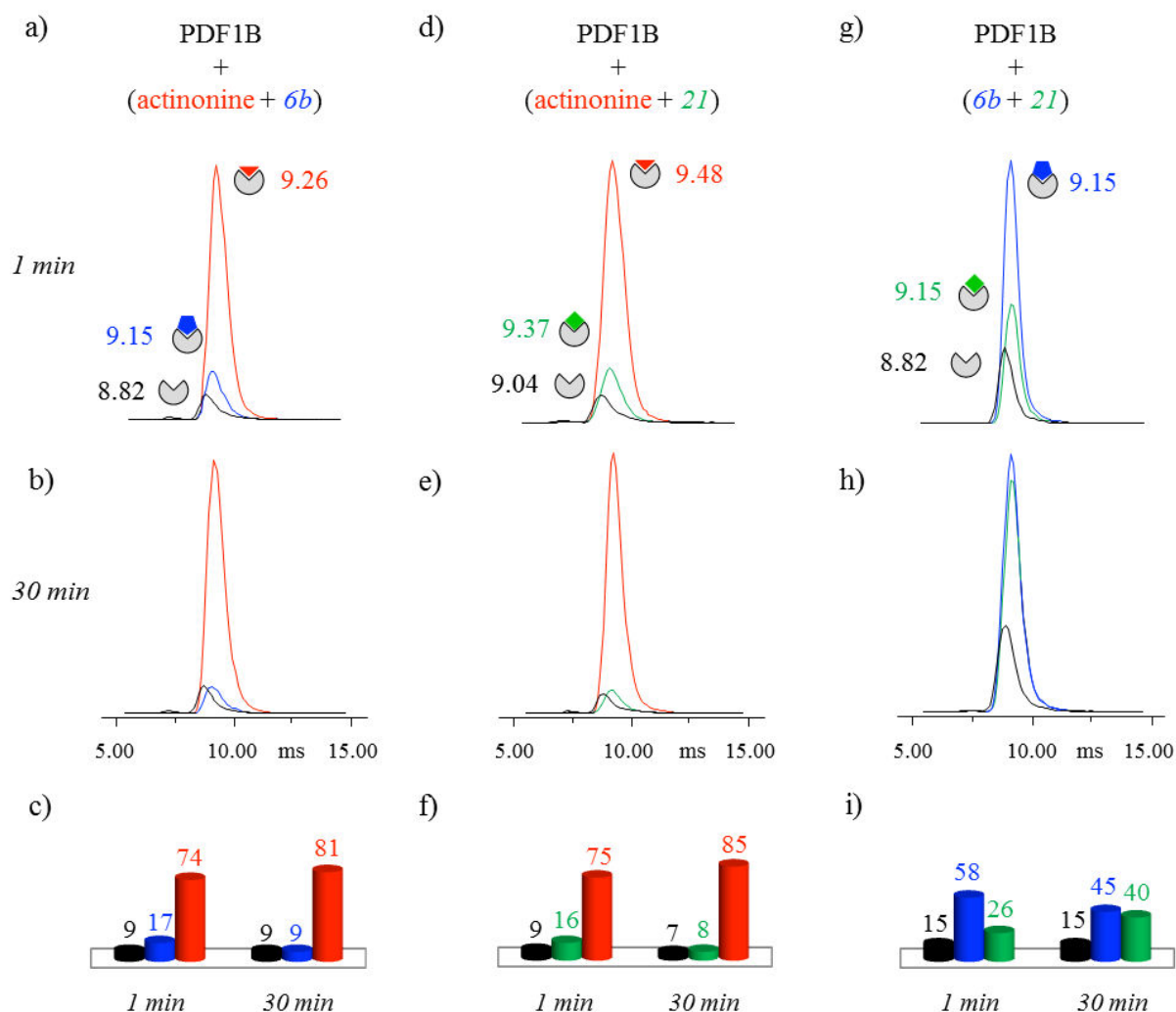


Figure 40: Suivi cinétique des complexes PDF1B:ligand formés en présence de compétitions directes par IM-MS. a,b,d,e,g,h) Les distributions de temps de dérive (ATDs) associées aux ions 9^+ des espèces PDF1B apo (noir), PDF1B:actinonine (rouge), PDF1B:21 (vert) et PDF1B:6b (bleu) sont extraites des mélanges entre les ligands (a,b) actinonine/6b (d,e) actinonine/21 et (g,h) 6b/21. Les proportions relatives de chaque conformère, mesurées à partir de l'intensité de ces ATDs, sont ici représentées après (a,d,g) 1 minute et (b,e,h) 30 minutes d'incubation entre les ligands (c) actinonine/6b, (f) actinonine/21 et (i) 6b/21.

de 3 conformères associés à chacune de ces espèces. Le suivi cinétique du mélange 6b/21 par IM-MS (Fig.40g,h) confirme l'adoption d'une conformation globale similaire entre complexes PDF1B:6b et PDF1B:21, les distributions de temps de dérive (ATDs) associées à leur état de charge 9^+ se superposant et ne permettant pas leur distinction ($t_D = 9.15\text{ms}$). Par ailleurs, la quantification relative de l'ensemble de ces conformères par IM-MS en temps réel (Fig.40c,f,i) corrobore les résultats de quantification obtenus sur leurs complexes respectifs par MS native (Fig.38d,g,j). Cette approche permet ainsi le suivi dynamique en mélange:

- De la formation de ces conformères, induits par la fixation des ligands 6b/21 ou actinonine.
- De leur déplacement par compétition.

4. Conclusions.

L'application du couplage MS native / IM-MS à l'étude du système PDF1B-ligand, a permis un criblage structural et conformationnel en temps réel des complexes formés en présence de 3 inhibiteurs spécifiques. La nature dynamique de ces informations a ainsi complété les données structurales disponibles sur ces complexes.

L'analyse des complexes par MS native en temps réel a ainsi révélé l'existence de 2 catégories de ligand (« actinonine like » et « 21/6b like »). Ces derniers se fixent spécifiquement au même site de la protéine dans une stœchiométrie 1:1, mais avec des affinités et stabilités en phase gazeuse différentes, en accord avec les données d'enzymologie et de cristallographie [42, 182].

Une caractérisation approfondie de ces complexes par IM-MS native en temps réel, a permis de révéler l'existence de 2 types de changements conformationnels globaux induits par les ligands 21/6b ou actinonine. La nature de ces différences ($\Delta^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2} \leq 1\%$) souligne le potentiel de l'approche IM-MS dans le criblage de changements conformationnels très subtils. La dynamique de formation et d'échange de ces conformères suggère que l'actinonine bloquerait PDF1B dans une conformation compacte spécifique, empêchant la fixation et le changement de conformation intermédiaire induit par les ligands 21 et 6b.

L'ensemble de ces résultats apporte une preuve supplémentaire de l'existence d'un mécanisme « Induced Fit » de type « Slow Tight Binding », porté ici par le ligand actinonine.

5. Valorisation.

Les travaux ici présentés ont fait l'objet des communications suivantes :

Publication:

Stojko J, Fieulaine S, Petiot-Bécard S, Van Dorsselaer A, Meinel T, Giglione C, Cianférani S. Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *Analyst* (2015), 140, 7234-7245.

Communication orale:

Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility. Club Jeune de la Société Française Spectrométrie de Masse (CJSFSM), Mars 2014, Dieppe.

Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility. Workshop on Native Mass Spectrometry and Ion Mobility, April 2014, Strasbourg.

Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility., Congrès Français de Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP), Juillet 2014, Lyon.

Communication par affiche:

Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility. International Conference on Isolated Biomolecules and Biomolecular Interactions (IBBI), May 2014, Porquerolles.

Cite this: *Analyst*, 2015, **140**, 7234

Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes†

Johann Stojko,^{a,b} Sonia Fieulaine,^c Stéphanie Petiot-Bécard,^{a,b} Alain Van Dorsselaer,^{a,b} Thierry Meinel,^c Carmela Giglione^{*c} and Sarah Cianf rani^{*a,b}

We evaluate the potential of native mass spectrometry (MS) and ion mobility (IM-MS) for the screening of protein : ligand complexes when very subtle conformational changes are involved. As a proof of concept, we investigate the interactions between a peptide deformylase (PDF1B), a promising target for the development of new antibiotics, and three of its specific inhibitors that bind in different modes. First, real-time native MS reveals two types of ligands, both interacting in a 1 : 1 stoichiometry with PDF1B but with different affinities and gas phase stabilities. Conformational IM-MS screening then highlights two very close but significantly distinct ligand-induced conformations with collision cross sections that differ by less than 1%. Real-time IM-MS is used to monitor not only the dynamics of ligand binding to apoPDF1B but also the switching between *holo* conformations. This study provides additional evidence that the most potent ligands inhibit peptide deformylases through a slow-tight binding mechanism, in agreement with previous structural and enzymology studies. Furthermore, this approach, wherein the characteristics obtained by native MS are combined with IM-MS conformational screening, prove valuable in characterizing extremely subtle dynamic conformational changes induced when ligands bind to protein assemblies. We discuss the promise and limitations of IM-MS in the context of detection of very small conformational changes induced upon ligand binding.

Received 30th June 2015,
Accepted 17th September 2015

DOI: 10.1039/c5an01311a

www.rsc.org/analyst

Introduction

The use of orthogonal biophysical techniques (fluorescence, X-ray, NMR, calorimetry, *etc.*) or enzymatic assays has turned drug research into a multifaceted approach, involving high-throughput screening (HTS) of large libraries of molecules, structure-based drug discovery, and lead optimization or fragment-based drug discovery.^{1,2} Mass spectrometry (MS) and its applications in the pharmaceutical industry have evolved continuously over the past 20 years, mainly through the outstanding instrumental breakthroughs that have been achieved. Mass spectrometry is now routinely used to evaluate the purity of recombinant proteins,³ to characterize monoclonal antibodies^{4,5} and, in proteomics, to identify new candidate bio-

markers.^{6,7} Mass spectrometry is also pivotal throughout the drug-discovery process—for the quality control of compound libraries, the evaluation of compound purity, and for solubility, stability, and ADME-Tox studies.⁸

Subtle changes that occur in response to ligand binding in multiprotein complexes are often difficult to identify without high resolution X-ray analysis. Native MS has nonetheless emerged as a valuable alternative through the insights it provides into the dynamic changes that result from ligand binding.^{9,10} This technique has indeed been incorporated into the drug discovery workflow, notably during the early stages, in structure- or fragment-based approaches. Automation¹¹ and a coupling to high resolution native MS¹² allows the method to be used for the primary screening of focused libraries containing a few thousand molecules. Native MS, which provides information on binding stoichiometries, specificities, affinities^{13,14} and even gas phase stabilities, is now considered robust and reliable enough to validate hit compounds identified by HTS. In this context, native MS provides strong support for the validation and characterization of leads derived from close analogues and virtual screen hits. Native MS has also been used to characterize a variety of protein : ligand

^aBioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France. E-mail: sarah.cianferani@unistra.fr

^bIPHC, CNRS, UMR7178, 67087 Strasbourg, France

^cInstitute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France.

E-mail: carmela.giglione@i2bc.paris-saclay.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5an01311a

systems,^{15–17} facilitating the discovery of small modulator molecules for orphan nuclear receptors^{18–20} for instance, or identifying the calixarenes that bind to *Staphylococcus aureus* leucotoxins²¹ and the ligands of transthyretin.²²

However, classical MS screens cannot reveal the subtle changes that occur in response to ligand binding in proteins, being sensitive only to overall changes in binding characteristics. Historically, NMR, high resolution X-ray crystallography, computational studies and kinetic measurements have been used to detect ligand-induced conformational changes in proteins. These are now complemented by emerging techniques such as those involving single molecules²³ and ion mobility MS (IM-MS), the latter offering a combined binding and conformational characterization of the system. In ion mobility experiments, ions are separated according to their charge and collision cross section (CCS) using an electric field in a controlled gas environment.^{24,25} The IM component thereby adds a gas phase separation dimension based on the mass, charge and shape of the ions. Many studies have demonstrated the potential of IM-MS as an integrative tool for structural biology programs.^{26–28} However, this technique is mainly used to assess the global shape of the protein (globular *versus* helical,²⁹ for instance) and only rarely has IM-MS been used to characterize the conformation of protein/ligand systems. Typically indeed, the conformational changes have to be rather large ($\Delta\text{CCS} > 5\%$) to be detected;³⁰ in a recent study however,³¹ the subtle conformational changes ($\Delta\text{CCS} = 2\%$) induced by inhibitor binding were successfully detected by fine tuning the instrumental settings. More recently, Ruotolo and coworkers have outlined new possibilities for IM-MS kinase/ligand screening,³² while Nyong *et al.* have successfully used IM-MS to monitor changes in the conformational dynamics of α 1-antitrypsin upon ligand binding.³³

Here, we report the dynamic characterization of protein : ligand complexes at both binding and conformational levels. Peptide deformylases (PDFs) are promising therapeutic target for the development of antibacterial and anticancer inhibitors.^{34–36} Four subfamilies are usually defined (*viz.* PDF1A, PDF1B, PDF2 and PDF3) according to their sequence and structural singularities.^{37,38} The two very well documented enzymes, *Escherichia coli* PDF and *Arabidopsis thaliana* PDF1B^{39–41} belong to the second of these families, the most common in eubacteria. We have characterized the binding of three bacterial PDF inhibitors (Fig. 1) to *A. thaliana* PDF1B (simply named PDF1B in the following) by IM-MS. This system is interesting because previous enzymatic, biophysical and crystallographic studies⁴² have revealed the slow-tight binding (STB) of a number of potent inhibitors.⁴³ This is consistent with the induced-fit binding model, whereby a ligand induces a conformational change that either enhances substrate catalysis or strengthens inhibitor binding.⁴⁴

According to the binding stoichiometries, specificities and gas phase stabilities obtained by native MS, the PDF inhibitors investigated here are classed as either slow-tight or slow-moderate binders to PDF1B. A comparison of the CCSs derived from crystallography and IM-MS then highlights the existence

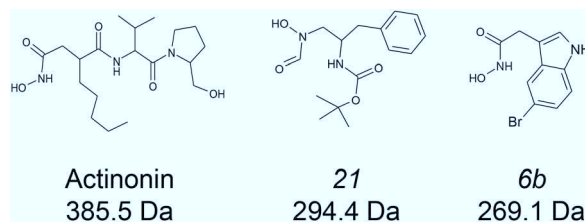


Fig. 1 Chemical structures of the PDF1B ligands used in the present study.

of two distinct conformational changes induced by ligand binding. Altogether, these data further suggest that the STB inhibition of PDFs occurs through an induced-fit mechanism.

Results

Characterization of individual PDF1B : ligand complexes by native MS deciphers binding properties and kinetics

Titration experiments. PDF1B was first studied alone under native and denaturing MS conditions (Fig. S1 in the ESI†). The native mass spectrum shows that PDF1B is a folded monomer containing one nickel atom ($21\,933 \pm 1$ Da, Fig. 2a), in agreement with previous biochemical data.⁴¹ To assess the binding stoichiometries, titration experiments were performed with the three ligands (*viz.* actinonin and the chemically designed compounds **21** and **6b**, see Fig. 1 and the Experimental section), using native MS. The addition of actinonin in two-fold excess and after 10 min incubation shifts the main mass signal to $22\,318 \pm 1$ Da, corresponding to PDF1B + Ni²⁺ + actinonin (Fig. 2b). Similar 1 : 1 binding stoichiometries are obtained in the presence of compounds **21** and **6b** (Fig. 2c). Note also that non-specific ligand multi-addition occurs when the inhibitors are present in large excess (from 1 : 2 to 1 : 10 stoichiometries, Fig. S2 in the ESI†).

To further specify the dynamics and affinity of the PDF1B : ligand interactions, the relative proportions of free and bound forms were quantified by native MS at different protein : ligand ratios and incubation times. For all the molecules and protein : ligand ratios, a 1 : 1 PDF1B : ligand complex forms in a minute (Fig. S2†). The proportion of the bound form at saturation depends on the ligand however, with 94%, 83% and 74% of the signal arising from the 1 : 1 complex under a two-fold molar excess of actinonin and compounds **21** and **6b**, respectively (Fig. 2c; the results are similar with a ten-fold excess, see Fig. S2†). These results show, in agreement with a previous study,⁴³ that the affinity of PDF1B is higher for actinonin than it is for compounds **21** or **6b**.

Gas phase stabilities and Vc50 measurements. The gas phase stabilities of the PDF1B : ligand complexes were investigated by recording the accelerating voltage required to dissociate 50% of the complex (Vc50)⁴⁵ during in source collision-induced dissociation experiments. A clear correlation was found between Vc50 values and the contribution of electro-

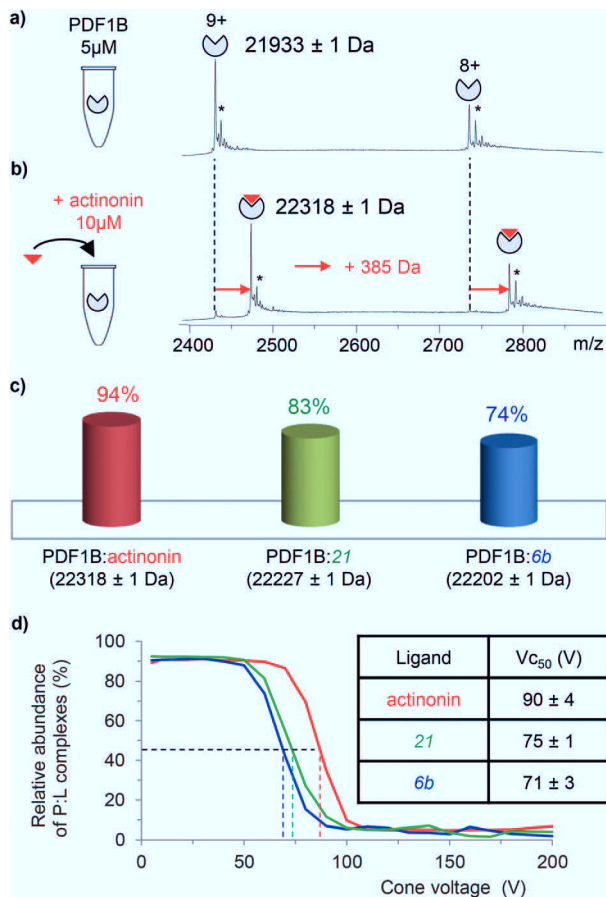


Fig. 2 Native mass spectrometry (MS) characterization of PDF1B : ligand interactions. Native mass spectra of PDF1B (5 μ M) (a) alone or (b) after 10 min incubation with 10 μ M actinonin (the asterisks indicate signals from Ni²⁺ adducts). (c) Relative proportions of the PDF1B : ligand complexes, as determined by native MS from the intensities of the 8+ and 9+ charge states after incubation of 5 μ M PDF1B with 10 μ M ligand. (d) Protein : ligand ratios for PDF1B : actinonin (red), PDF1B : **21** (green) and PDF1B : **6b** (blue) complexes as a function of the cone voltage in the ion source. The dashed lines indicate the corresponding Vc50 values.

static and H-bond based interactions in the total binding energy of the complexes in several studies.^{45,46} Fig. 2d shows that Vc50 is significantly higher for actinonin (90 \pm 4 V) than it is for compounds **21** (75 \pm 1 V) and **6b** (71 \pm 3 V), which indicates that the polar stabilization of PDF1B : actinonin is greater than that of the other two complexes. This is consistent with the interaction networks suggested by the crystal structures. Indeed, while actinonin binds to PDFs through hydrophobic contacts and a number of hydrogen bonds,^{47,48} these are fewer in the complexes formed with **6b**.⁴²

Real-time characterization of PDF1B : ligand mixtures by native MS identifies two ligand affinity classes

The dynamics of ligand binding were investigated further by monitoring pairwise incubations of the ligands over time by

native MS. These competition experiments were performed by mixing the ligands either simultaneously (direct competition) or sequentially (indirect competition) with the enzyme.

Direct competition experiments. As expected from the titration experiments, Fig. 3 shows that in direct competition with compounds **21** and **6b** (at a 1 : 2 : 2 PDF1B : ligand A : ligand B ratio), the major component always corresponds to the 1 : 1 PDF1B : actinonin complex (Fig. 3b and e). After 30 min moreover, the signals from the 1 : 1 PDF1B : **6b** or PDF1B : **21** complexes are no longer observed (Fig. 3c and f). When the two compounds are in direct competition with each other however, both 1 : 1 complexes are present, with initially a significantly higher proportion of PDF1B : **6b** than PDF1B : **21** (56% and 31% respectively, with 13% of the *apo* protein, Fig. 3h and j). The two complexes are found in equal proportions after 10 min, and at 30 min, an equilibrium is reached between 1 : 1 PDF1B : **6b** (37%) and PDF1B : **21** (49%) (Fig. 3i and j). The inversion of relative ligand binding affinities on the minute time scale is quite unusual, but can be explained by the inhibition mode of these two compounds. We know that initially during ligand recognition, the affinity of **6b** for various PDFs is higher ($K_I^{6b} \ll K_I^{21}$, data not shown). However, compound **21** induces a conformational change in the enzyme upon binding, resulting in a final complex of moderate but nonetheless higher affinity than that of the encounter complex ($K_I^{21} < K_I^{6b}$, manuscript in preparation), characterized by a very low dissociation constant. The PDF1B : **21** complex is thereby likely more stable than PDF1B : **6b** is, displacing the equilibrium towards the former as shown in Fig. 3j.

Note furthermore that the direct competition experiments show no signs of simultaneous specific binding of two different ligands, strongly suggesting that actinonin, **21** and **6b** compete for the same binding site, a situation that was not clear in previous crystallographic studies with **21** found in an unusual pocket but was not confirmed by enzymatic assay.^{42,43}

Indirect sequential competition experiments. To confirm this unusual ligand binding behavior, PDF1B was incubated with one ligand before adding a second after 10 min. The binding of the second ligand to pre-formed 1 : 1 complexes was then monitored by real-time native MS (Fig. 4a). As expected from the respective affinities of the ligands, even at high excess (up to 1 : 2 : 10 PDF1B : actinonin : **6b**/**21**, data not shown), the designed compounds do not displace actinonin from PDF1B (Fig. S3 in the ESI[†]). Reciprocally, actinonin readily displaces **6b** and **21** in 1 : 1 complex with PDF1B. For PDF1B : **6b** indeed, ~92% of the detected species are 1 : 1 PDF1B : actinonin after just 1 min of actinonin incubation (Fig. 4c and e), the initial ligand being almost fully replaced after 30 min (~97% 1 : 1 PDF1B : actinonin, Fig. 4d and e). The behavior is similar starting with a PDF1B : **21** complex (Fig. 4g–i). Meanwhile, Fig. 4k–m (Fig. S3g–i in the ESI[†]) shows that compound **6b** (**21**) replaces **21** (**6b**) in complex with PDF1B. Interestingly, the equilibrium after 30 min in both cases involves major (51%, 56%) and minor (34%, 30%) populations of PDF1B : **21** and PDF1B : **6b**, respectively.

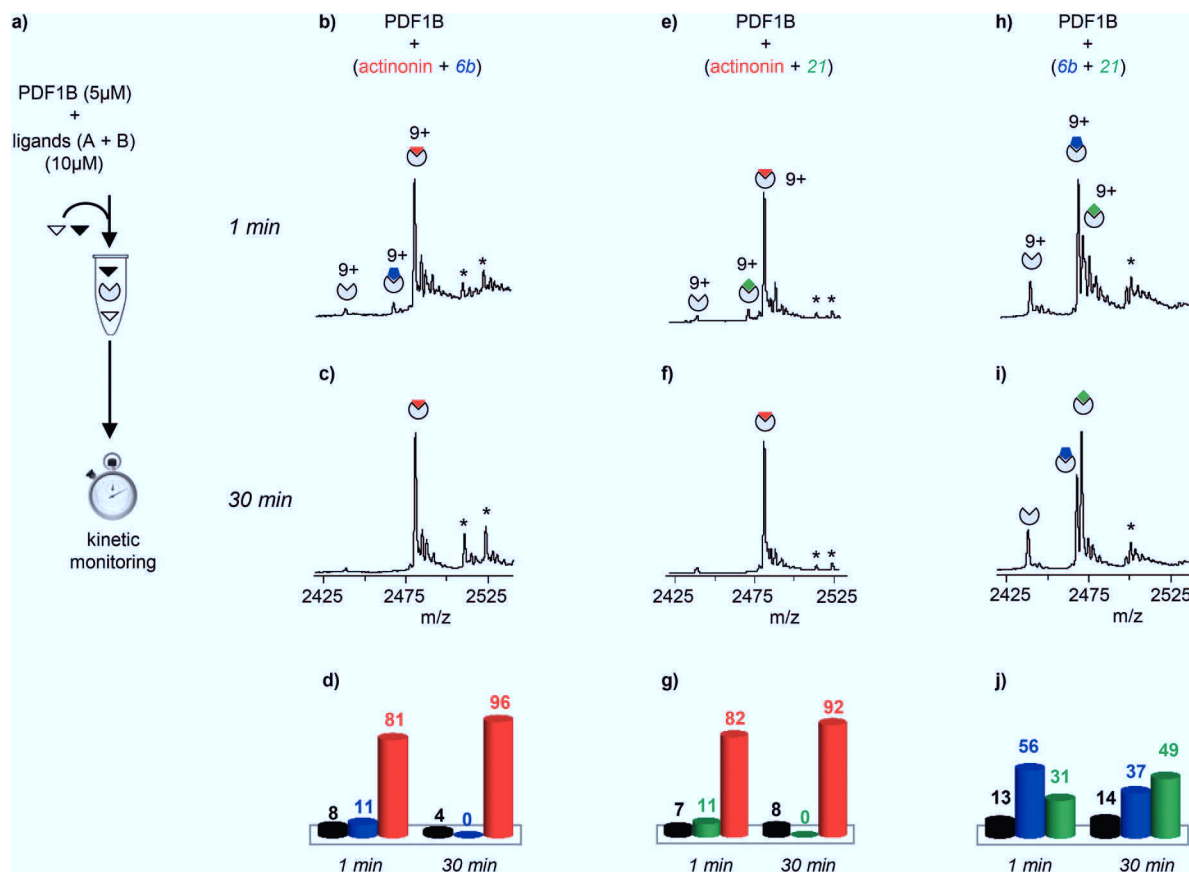


Fig. 3 (a) Schematic outline of the direct competition experiments—5 μM PDF1B is added to equimolar mixtures of two of the three ligands tested here (actinonin and compounds **6b** and **21**, see Fig. 1) at 10 μM—monitored in real time by native mass spectrometry (MS). (b, c, e, f, h, i) Native mass spectra (zoom on the 9+ charge state) obtained after (b, e, h) 1 min and (c, f, i) 30 min pairwise incubation of (b, c) actinonin/**6b**, (e, f) actinonin/**21**, and (h, i) **6b**/**21**. (d, g, j) Relative proportions, as determined by native MS, of the different species present after 1 and 30 min pairwise incubation of (d) actinonin/**6b**, (g) actinonin/**21**, and (j) **6b**/**21**. Asterisks represent non-specific binding of a second ligand molecules.

In summary, this binding screening by real-time native MS shows that actinonin has a much higher affinity for PDF1B than compounds **6b** and **21** do. The actinonin complex is also more stable in the gas phase than the other two because of a more extensive network of polar interactions.

IM-MS characterization of individual PDF1B: ligand complexes identifies two subtly different ligand induced conformations

Actinonin and certain other compounds inhibit PDFs through the STB mechanism. Inhibition proceeds through a competitive mechanism which is indicative of overlapping binding sites. Crystal structures of various complexes indicate indeed that the binding sites are identical and fully overlapping.⁴² The ligand first binds to PDF, inducing next a conformational change that favors further hydrogen bonding between the two partners, thereby locking the complex in a much more stable state.⁴² We used IM-MS to search for conformational changes resulting from actinonin, **6b** or **21** binding. The major difficulty of this analysis consisted in finding instrumental parameters that ensure a high IM resolution and sensitivity

without altering or activating the protein:ligand complexes. The IM-MS settings were fine-tuned using a sub-stoichiometric PDF1B:actinonin mixture (1:0.5 protein:ligand ratio) incubated for 10 min, allowing the simultaneous detection of the *apo* and *holo* forms (Fig. 5). The IM cell parameters (wave height, wave velocity and He/N₂ pressure ratio, see the Experimental section), were optimized to enable the separation of the arrival time distributions (ATDs) of the *apo* and *holo* forms of PDF1B (resolution factor, $R_s = 0.6$, Fig. 5a) in the +9 charge states. The drift time increases upon actinonin binding ($\Delta t_D = +0.44$ ms). Ligands **21** and **6b** were next analyzed using the same IM-MS parameters and under identical experimental conditions (Fig. 5b and c). The drift time also increases when **21** and **6b** bind, with $\Delta t_D = +0.33$ ms recorded for both compounds. Although the absolute values of t_D vary slightly, Δt_D between the *apo* and *holo* forms remains constant from one analysis to the next and from day to day. The drift time shift is thereby a reliable marker of the conformational changes induced by ligand binding.

The corresponding $^{TW}CCS_{N_2S}$ calculated before and after binding for the two main charge states (8+ and 9+) are listed

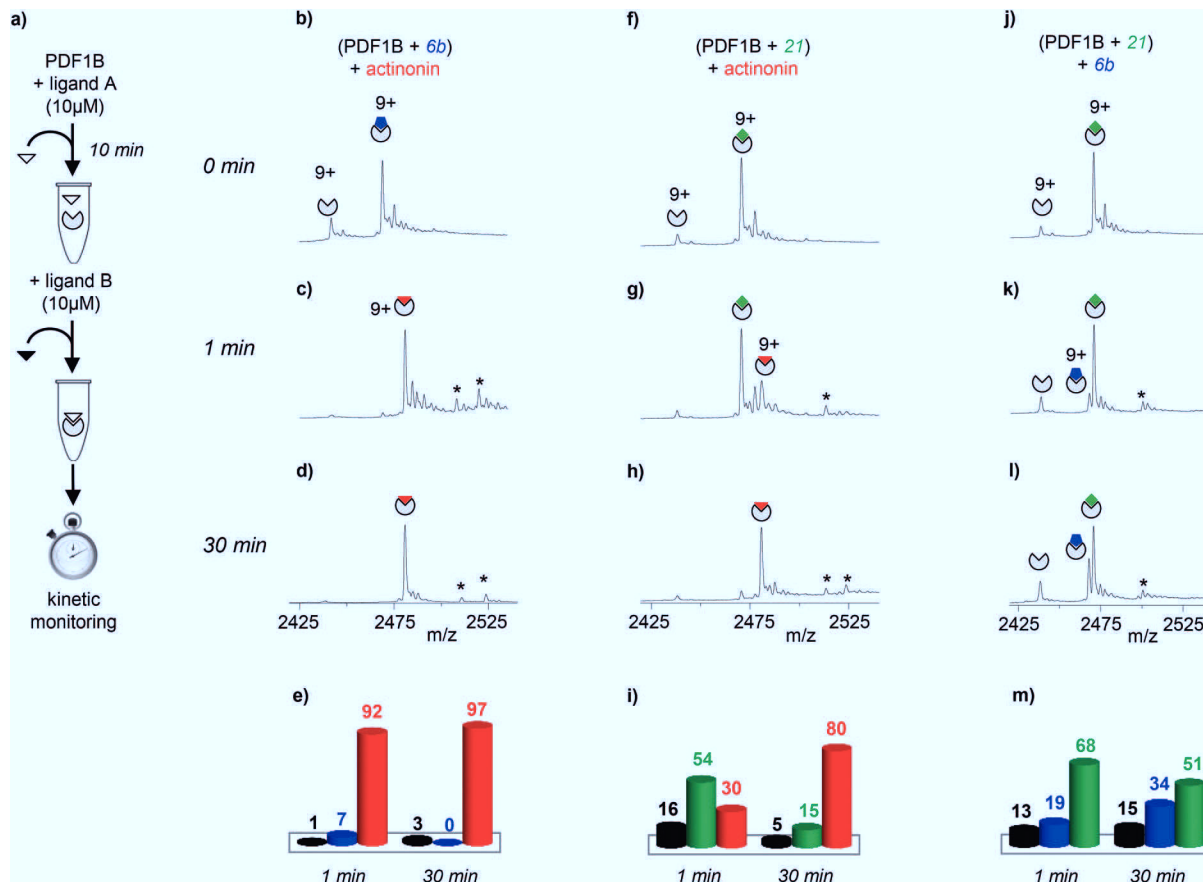


Fig. 4 (a) Indirect competition experiments monitored by real-time native mass spectrometry (MS)—PDF1B is first incubated with ligand A for 10 min before ligand B is added. (b, c, d, f, g, h, j, k, l) Native mass spectra (9+ charge state) of PDF1B incubated with (b, c, d) **6b** and then actinonin, (f, g, h) **21** and then actinonin, and (j, k, l) **21** and then **6b**, in each case (b, f, j) 0 min, (c, g, k) 1 min, and (d, h, l) 30 min after adding the second compound. (e, i, m) Relative proportions, as determined by native MS, of the different species present 1 and 30 min after adding the second ligand in sequential incubations of (e) **6b** and then actinonin, (i) **21** and then actinonin, and (m) **21** and then **6b**. Asterisks represent non-specific binding of a second ligand molecules.

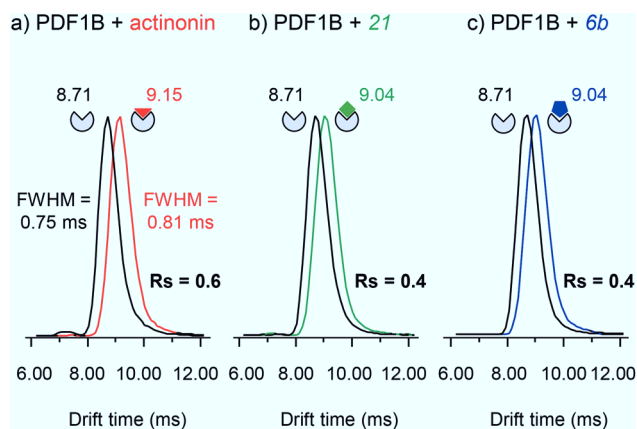


Fig. 5 Ion-mobility mass spectrometry characterization of the conformational changes induced upon ligand binding on PDF1B. Extracted arrival drift time distributions (ATDs) of the 9+ charge states of PDF1B in the presence of sub-stoichiometric (1 : 0.5) (a) actinonin, (b) compound **21**, and (c) compound **6b** after 10 min incubation. The ATDs corresponding to PDF1B, PDF1B : actinonin, PDF1B : **21** and PDF1B : **6b** are shown in black, red, green and blue, respectively.

in Table 1. As for the drift time, each ligand induces a slight but constant and reproducible change in the $^{TW}CCS_{N2}$ for both charge states. The gas phase conformations of *apo*- and *holo*-PDF1B differ little in terms of their $^{TW}CCS_{N2}$ (Table 1 and Fig. 5). The most important change in $^{TW}CCS_{N2}$ is observed upon actinonin binding, $+1.1 \pm 0.1\%$ for the 9+ charge state, compared with $+0.8 \pm 0.1\%$ and $+0.7 \pm 0.1\%$, respectively when compounds **21** and **6b** bind. These very small differences in $^{TW}CCS_{N2}$ are nonetheless significant and reveal the presence of three distinct conformations corresponding to *apo*-PDF1B, a more compact PDF1B : actinonin structure, and the intermediate, semi-compact *holo* forms with **6b** and **21**.

We next attempted to compare our experimentally IM-MS measured $^{TW}CCS_{N2}$ with those predicted from different X-ray crystallography models (Table 2). Several algorithms have been developed in this context,^{49–53} which typically exploit either the hard sphere projection approximation (PA), trajectory method (TM) or exact hard sphere scattering (EHSS). As has already been reported, the PA leads to underestimated CCSs, while the EHSS method yields slight overestimates. Thus TM is most

Table 1 Drift times and collision cross sections measured by IM-MS. Uncertainty values represent the variability (standard deviations) as a result of repeat of injections ($n = 3$)

	<i>apo</i> PDF1B	PDF1B : actinonin	PDF1B : 21	PDF1B : 6b
t_D 9+ (ms)	8.67 ± 0.06	9.11 ± 0.06	9.00 ± 0.06	8.97 ± 0.13
Δt_D 9+ (ms)	0	+0.44 ± 0.00	+0.33 ± 0.00	+0.33 ± 0.00
$^{TW}CCS_{N_2}$ 9+ (\AA^2)	1948 ± 7	1971 ± 8	1959 ± 10	1957 ± 5
Δ $^{TW}CCS_{N_2}$ 9+ (\AA^2)	0	22 ± 1 (+1.1%)	17 ± 1 (+0.8%)	15 ± 3 (+0.7%)
t_D 8+ (ms)	11.40 ± 0.17	12.06 ± 0.13	11.84 ± 0.13	11.69 ± 0.19
Δt_D 8+ (ms)	0	0.66 ± 0.11	+0.40 ± 0.06	+0.37 ± 0.06
$^{TW}CCS_{N_2}$ 8+ (\AA^2)	1844 ± 8	1868 ± 14	1853 ± 14	1846 ± 6
Δ $^{TW}CCS_{N_2}$ 8+ (\AA^2)	0	24 ± 5 (+1.3%)	14 ± 2 (+0.8%)	13 ± 2 (+0.7%)

Table 2 Collision cross sections predicted from crystallographic structures using different methods

	Method	<i>apo</i> PDF1B (PDB: 3PN2)	PDF1B : actinonin (PDB: 3M6P)	PDF1B : 6b (PDB: 3O3J)
CCS (\AA^2)	PA ^a	1562 ± 2	1565 ± 1	1540 ± 2
	EHSS ^b	1987 ± 3	1988 ± 2	1955 ± 3
	TM ^c	1972 ± 33	1977 ± 26	1937 ± 20
Δ CCS (\AA^2)	PA	0	N.S. ^d	-22 (-1.4%)
	EHSS	0	N.S.	-32 (-1.6%)
	TM	0	N.S.	N.S.

^a Projection approximation. ^b Trajectory method. ^c Exact hard sphere scattering. ^d Not significant. Uncertainty values represent the standard deviation as a result of 6 repeated MobCal runs.

reliable for systems with a molecular weight greater than 1.5 kDa.^{54,55} For the PDF1B system, the CCSs predicted *via* any of these algorithms suggest that there is no conformational change upon actinonin binding—the ligand which other data show has the strongest structural effect on PDF1B. Conversely, a significant compaction (1.4% to 1.6%) is predicted for **6b** binding with both PA and EHSS. Finally, the TM method outputs the most variable predictions and suggests that none of the ligands alter the conformation of PDF1B. In summary, the different algorithms tested here for PDF1B ligand binding yield contradictory results and fail to predict the experimentally verified changes in conformation. Several reasons can account for these observations among which: (i) the fact that extremely small conformational changes (<1% in CCS) are expected in PDF1B case; (ii) each algorithm has been developed for particular applications and molecular size ranges and differ in the assumptions and approximations made in modelling the collisions between the protein and the IM gas; (iv) the fact that our $^{TW}CCS_{N_2}$ measurements were performed in N₂ whereas simulation are done in He and maybe also (v) the fact that our simulations does not take into account the presence of a buried Ni²⁺ atom.

Real-time IM-MS characterization of PDF1B : ligand mixtures reveals conformational switches

Having evidenced two different ligand binding-induced conformational changes in the enzyme, we used IM-MS to

study the dynamics of ligand displacement through the same series of direct and indirect competitions as described above.

Direct competition experiments. Fig. 6a, for the PDF1B : actinonin : **6b** 1 : 2 : 2 mixture, reveals the same three conformations as identified in the analysis of individual PDF1B : ligand complexes, namely *apo*PDF1B, PDF1B : **6b** and PDF1B : actinonin, with drift time shifts of +0.33 and +0.44 ms between the latter two and *apo*PDF1B, respectively. The relative populations of the three conformers deduced from the ATDs (Fig. 6c; 9, 17 and 74% for *apo*PDF1B, PDF1B : **6b** and PDF1B : actinonin, respectively) match those measured by native MS (Fig. 3d; 8, 11 and 81%, respectively). Moreover, after 30 min incubation, the intensities of the ATDs reflect the displacement of **6b** by actinonin (Fig. 6b and c), as already revealed by native MS. Similar results are obtained for actinonin and compound **21** in direct competition (Fig. 6d–f).

Since **6b** and **21** both induce a Δt_D of +0.33 ms upon binding, the two conformations are identical in terms of their IM-MS arrival times (Fig. 6g and h). The variation in intensity of the corresponding ATDs nonetheless reveals the displacement over time of **6b** by **21** (Fig. 6i). These IM-MS results confirm that ligands **21** and **6b** have not only similar affinities for PDF1B, but also induce similar global conformational changes in the enzyme.

Indirect sequential competition experiments. Fig. 7a shows that as observed by native MS and in the direct competition IM-MS data, actinonin displaces **6b** from its preformed complex with PDF1B. The results for a pre-formed PDF1B : **21** complex show a similar trend (data not shown). Conversely, pre-formed PDF1B : actinonin remains unaltered by the addition of **6b** (Fig. S4 in the ESI[†]) or **21** (data not shown). These IM-MS results suggest that actinonin blocks PDF1B in a specific conformation that prevents the binding of **21** or **6b** (and the associated changes in conformation).

As for the direct competition experiments, when **21** and **6b** compete, only two conformations are detected (the one corresponding to *apo*PDF1B and the one corresponding to PDF1B : **6b**/**21**). Pre-incubated PDF1B : **21** is gradually replaced by PDF1B : **6b** until an equilibrium is reached after 30 min, when respectively 61% and 28% of the total ATD intensity arises from the two complexes (Fig. 7b). The reverse experiment shows that **21** also displaces **6b**, equilibrium being

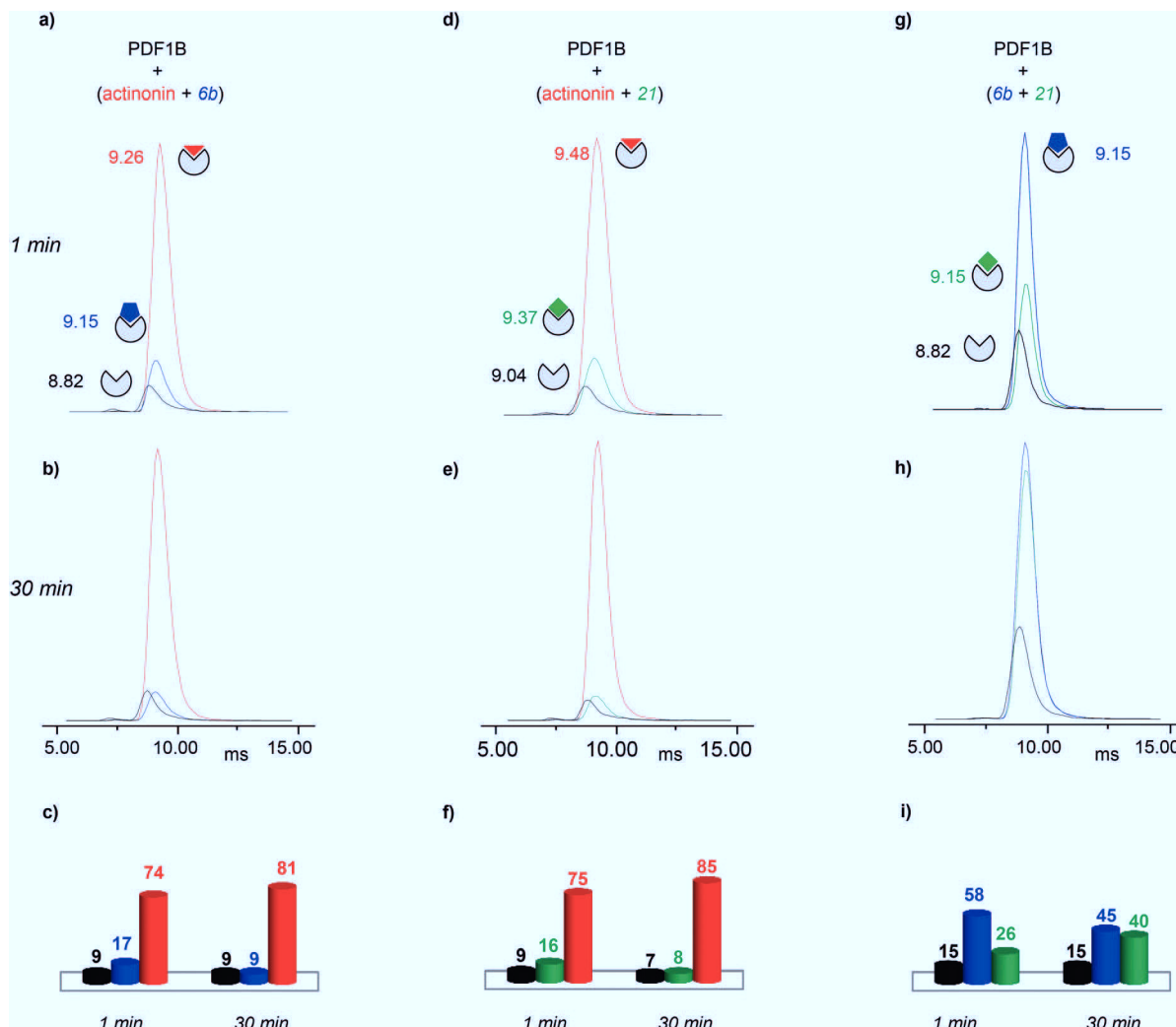


Fig. 6 Direct competition experiments monitored by real-time ion-mobility mass spectrometry. (a, b, d, e, g, h) Arrival time distributions (ATDs) extracted from the 9+ charge state of *apo*PDF1B (black), PDF1B : actininin (red), PDF1B : 21 (green) and PDF1B : 6b (blue) measured for mixtures of (a, b) actininin/6b, (d, e) actininin/21, and (g, h) 6b/21. Relative proportions, calculated from the ATD intensities of the different species present after 1 (a, d, g) and 30 min (b, e, h) pairwise incubation of (c) actininin/6b, (f) actininin/21 and (i) 6b/21.

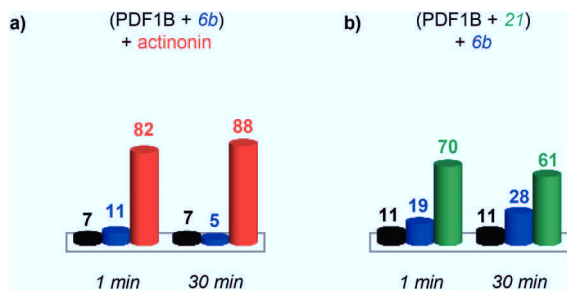


Fig. 7 Indirect sequential competition experiments monitored by real-time ion-mobility mass spectrometry. Relative proportions, calculated from the arrival time distribution intensities of the 9+ and 8+ charge states, of *apo*PDF1B (black), PDF1B : actininin (red), PDF1B : 21 (green) and PDF1B : 6b (blue) 1 and 30 min after adding the second ligand in sequential incubations of (a) 6b and then actininin and (b) 21 and then 6b.

reached at 46% PDF1B : 21 and 40% PDF1B : 6b after 30 min (Fig. S4†).

Discussion and conclusions

IM-MS adds evidence for the existence of slow-tight binding to PDF1B

Enzyme-ligand interactions are often associated with conformational changes that precede and/or follow binding. Such transitions between conformational states are however difficult to capture. Based on a combination of convincing crystallographic and enzymatic data, the conformational changes that PDF1B undergoes upon actininin binding have been explained by an induced-fit mechanism,⁴² whereby ligands bind to the active site of *apo*PDF1B in a locally open conformation (state O, Fig. 8). The binding-induced remodeling of

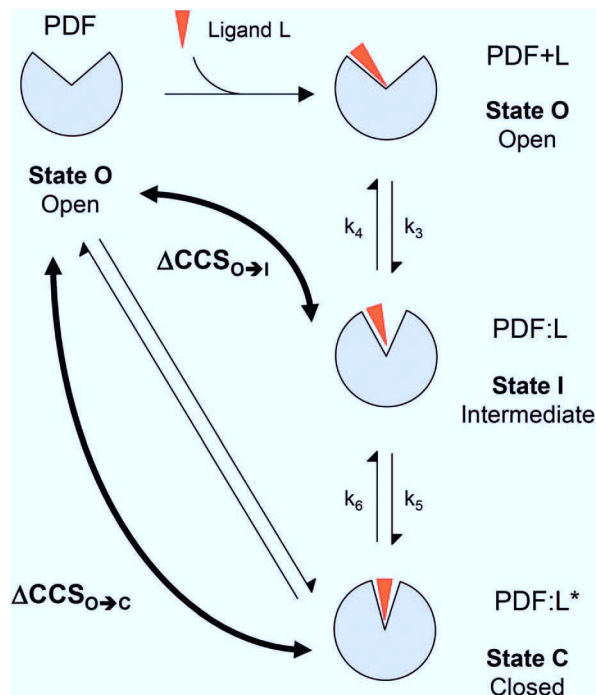


Fig. 8 Schematic representation of the slow tight binding (STB) mechanism for PDF1B. In *apo*PDF1B, the active site is mainly in an open conformation (State O). Upon ligand binding, the active site closes either partially or completely. Non-STB ligands induce a partial locking of the active site (State I) as they bind. Conversely, STB ligands adopt a precise orientation in the catalytic site, leading to its complete closure and to the formation of a more stable complex (PDF1B:L*, state C). $\Delta\text{CCS}_{\text{O}\rightarrow\text{I}}$ and $\Delta\text{CCS}_{\text{O}\rightarrow\text{C}}$ are the differences between the collision cross sections of the open (O) and semi-closed (I), and open and closed (C) conformations, respectively.

the active site yields an intermediate conformation (state I), populated in a concentration/affinity dependent manner (k_3 , k_4 , Fig. 8). Binding to the I state eventually leads to a conformation with a completely closed active site (state C, Fig. 8), with low dissociation rates (k_5 , k_6). Structural snapshots of these very subtle and local conformational transitions have been obtained by X-ray crystallography for rational PDF1B mutants, allowing the sequence of events triggered by ligand binding to be reconstructed (see Movies S1 and S2 in ref 42). First, actinonin binds to the enzyme by aligning its long aliphatic chain in the hydrophobic S1' pocket of PDF1B, triggering a conformation change as key sidechains adjust and reshape the pocket. This local rearrangement is followed by a global closure of the enzyme and the formation of a crucial hydrogen bond. The present paper investigates the putative benefits of native MS and IM-MS in understanding the response of PDFs to ligand binding. Indeed, although enzymatic data suggest that other classes of PDFs bind ligands through induced-fit, the transient nature of the encounter complex means that PDF1B is the only system for which this mechanism has been evidenced at the atomic-scale.

Native MS demonstrates that **21** and **6b** have similar binding stoichiometries, specificities, affinities and gas phase

stabilities, and bind PDF1B more weakly than actinonin does. In addition, the native MS data show no evidence of simultaneous **6b** and **21** binding, strongly suggesting that the two compounds bind to the same active site, in agreement with enzymatic data. The PDF1B:**21** structure in which **21** targets an alternative pocket on the protein surface is thereby most probably a crystallographic artifact.⁴²

The detection here of three distinct conformational states by IM-MS (*apo*PDF1B, PDF1B:**6b/21** and PDF1B:actinonin) proves the ability of this technique to evidence extremely small ligand binding-induced conformational changes, while the nature of the abovementioned states is strong evidence in favor of a binding-induced inhibition mechanism. From our study, PDF1B ligands can be distinguished in two types: (i) actinonin which has higher gas phase stability, affinity and induces a more substantial global conformational change and (ii) **6b/21** with lower stabilities, affinities and smaller conformational changes. So, for PDF1B:ligand systems, the more extensive network of polar interactions that stabilizes actinonin in the gas phase (Fig. 2d) might also confer a higher affinity to PDF1B and further more substantial global conformational change upon binding.

One should note also that IM-MS is sensitive to the change in the global conformation of the protein induced by ligand binding. While X-ray data suggest that the active site contracts upon ligand binding, the slight global extension revealed here by IM-MS (t_{D} and the $^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ increase) is seemingly in contradiction. However, an overall comparison of the X-ray structures of PDF1B bound to either actinonin (PDB code: 3M6P) or **6b** (PDB: 3O3J) highlight other subtle conformational changes away from the active site. The structures of *apo*PDF1B and PDF1B:actinonin differ mainly in the vicinity of the active site (Fig. S5 in the ESI,[†] pairwise alpha carbon deviations of up to 1.2 Å), but also along the adjacent secondary structure elements (pairwise deviations ranging from 0.6 to 1 Å). The latter reflects the slight global extension of PDF1B when actinonin binds. This example illustrates the complementarity of high- and low-resolution biophysical techniques—in this case X-ray diffraction and IM-MS—to decipher global and local conformational changes.

In conclusion, this combination of native and IM-MS offers direct evidence that the inhibition of PDF1B occurs through STB mediated by an induced-fit process. The conformational screening of individual PDF1B:ligand complexes reveals two very subtle but distinct conformational changes, respectively induced by actinonin and **21/6b** binding.

Advantages and pitfalls of IM-MS for ligand screening when subtle conformational changes are targeted

While native MS is now a routine technique for protein:ligand screening in structural biology and drug discovery programs, IM-MS is still in its infancy. Native MS provides a range of valuable information (binding stoichiometries and specificities, gas phase stabilities, solution affinities) through a series of well-established and easy to perform assays (titration, competition, and collision induced dissociation experiments).

Similarly, IM-MS may become established as a primary conformational screening method, the ligands being classified in terms of their respective CCSs. This simple approach may however prove inadequate when extremely subtle conformational changes are expected. The complexity of the system studied here makes it an ideal basis for a discussion of the current limitations of IM-MS.

IM-MS to detect subtle conformational changes. IM-MS has been used here for the first time to reveal extremely small conformational changes ($\Delta\text{CCS} < 1\%$). This is very much the limit of current IM-MS capabilities. Instrumental limitations have to be carefully circumvented, notably the insufficient resolving power of the IM cells and the electronic instabilities that lead to non-reproducible drift times. When accurate $^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ measurements are not necessary, we believe that Δt_{D} that do not require extensive calculations, can also serve as “visual” marker of conformational changes for routine high throughput protein:ligand conformational screening. Since ligand binding does not alter the charge state of PDF1B, differences in the ionic separation for the 9+ state of the *apo* and *holo* forms could be interpreted in terms of changes in conformation. However, because high charge states are susceptible to Coulombic repulsion-induced unfolding,⁵⁶ the IM-MS parameters had to be carefully optimized to maintain the protein in its non-activated conformational state and avoid misinterpretation.

For the PDF1B:ligand system, in contrast with prediction algorithms, IM-MS data can be reliably and unambiguously interpreted in terms of conformational changes.

Collision-induced unfolding experiments as alternatives to protein:ligand screening. Since different proteins can have identical CCSs, the interpretation of IM-MS data becomes more problematic for larger molecules. Similarly, the discriminatory power of IM-MS decreases with the amplitude of the conformational change induced by ligand binding, limiting the effectiveness of this approach for small protein:ligand systems in particular. Collision-induced unfolding (CIU) experiments, in which drift time distributions are recorded as the protein unfolds at increasing internal energies,⁵⁷ offer a potential solution to this problem. Fingerprint distributions have been obtained for the unfolding of reference ligand-binding proteins⁵⁷ and have been proposed as a means of identifying subtle ligand-induced differences in tertiary structure.^{58,59} For the PDF1B:ligand system however, the CIU fingerprints for actinonin, **21** and **6b** binding are indistinguishable (Fig. S6 in the ESI†).

IM-MS to monitor ligand binding dynamics. We recently demonstrated the ability of IM-MS to monitor dynamic processes in real time, characterizing Fab-arm exchange on monoclonal antibodies.⁶⁰ Here, we use IM-MS to distinguish the very small conformational changes induced by different ligands upon binding, but also to follow the switch from one *holo* conformation to another through indirect competition experiments wherein two ligands are sequentially added to PDF1B solutions. When actinonin is bound to PDF1B, the conformational equilibrium remains unaltered in the presence

of **6b** or **21**. Conversely, IM-MS shows the conversion of PDF1B:**21/6b** over time into a predominantly PDF1B:actinonin population after actinonin is added to the mixture. As a complement to real-time native MS, real-time IM-MS thereby constitutes an extra source of information on protein:ligand binding dynamics. Importantly, the conformational populations measured here by IM-MS are in good agreement with those obtained by native MS. Real-time IM-MS should be of broad interest for the study of multi-step binding mechanisms with relatively slow kinetics, on the minute time-scale, in the sensitivity range of native MS.

In conclusion, real-time native MS combined with IM-MS is demonstrated as an alternative and complementary approach to enzymology and crystallography for the structural elucidation of dynamic interaction processes. This approach is amenable to automation and could thereby satisfy the demand for higher throughput screening methods from the biopharmaceutical industry, providing a time-resolved view of binding-induced conformational changes.

Experimental section

Chemicals

Actinonin was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) while compounds **6b** and **21** were chemically synthesized as described in the literature.⁴³ Each component was solubilized to 100 mM in ethanol and then diluted stepwise in a 100 mM ammonium acetate (pH 7.5) buffer. The final ethanol concentration used in the experiments never exceeded 0.25% (v/v).

PDF1B expression and purification

Mature *Arabidopsis thaliana* PDF1B (PDF1B) was expressed and purified as described elsewhere.^{41,42} Briefly, PDF1B expression was induced in JM101Tr cells after IPTG induction. The cells were lysed and the debris removed by centrifugation. The lysis supernatant was applied on a Q-Sepharose anion exchange column (GE Healthcare) previously equilibrated in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM nickel acetate) and elution was performed with buffer B (buffer A + 1 M NaCl). Partially purified protein was then applied on a Superdex 75 column (GE Healthcare Life Sciences) and eluted in buffer C (buffer A + 0.1 M NaCl). The PDF1B-containing fractions were pooled, concentrated and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in buffer C. All purification procedures were performed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Buffer exchange for native MS experiments

Prior to any native MS experiment, PDF1B was exchanged twice against a 100 mM ammonium acetate (NH_4Ac) pH 7.5 buffer using microcentrifuge gel-filtration columns (Zeba 0.5 mL, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). The protein concentration was determined by UV absorption at 280 nm (protein extinction coefficient: $8940\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

Titration experiments

Reactions were triggered by mixing 5 μM PDF1B with 5–50 μM solutions of each ligand separately. Each titration point was monitored by native MS and IM-MS after 1, 5, 10, 15, 30 and 60 min incubation at room temperature (RT). The relative proportions of each species and conformer were deduced from either the relative peak intensities measured from the raw mass spectrum for native MS or from IM-MS ATD intensities (taking into account 8+ to 9+ charge states).

Vc50 experiments

PDF1B (5 μM) was incubated with 2 molar excesses of each ligand (10 μM) for 10 min at RT. In-source collision induced dissociation was achieved by increasing the cone voltage of the instrument from 10 to 200 V. The 1 : 1 PDF1B : ligand population, deduced from native MS peak intensities of the main charge states, was plotted as a function of this voltage, with Vc50 being the value at which 50% of the initial 1 : 1 PDF1B : ligand population is dissociated. Each experiment was performed in triplicate.

Competition experiments

Direct competition experiments were performed by adding 5 μM PDF1B to mixtures of two ligands, each at 10 μM (1 : 2 : 2 molar ratios). Competition experiments were monitored by native MS and IM-MS after 1, 5, 10, 15, 30 and 60 min incubation at RT.

For the indirect competition experiments, a first ligand (10 μM) was pre-incubated with 5 μM PDF1B for 10 min (1 : 2 molar ratio). A second ligand was then added at either 10 or 50 μM (corresponding to 1 : 2 : 2 and 1 : 2 : 10 molar ratios, respectively), and the evolution of the species was monitored by native MS and IM-MS at the abovementioned incubation times.

All direct and indirect competition experiments were performed in triplicates.

Native MS characterization

Native MS analyses were carried out on a hybrid electrospray quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometer (Synapt G2 HDMS, Waters, Manchester, UK) coupled to an automated chip-based nanoESI infusion source (Triversa Nanomate, Advion, Ithaca, NY) operating in positive ion mode. External calibration was performed with the multiply charged ions produced by a 2 μM horse heart myoglobin solution diluted in a 1 : 1 (v/v) water : acetonitrile mixture acidified with 1% (v/v) formic acid. The MS parameters were carefully adjusted to optimize the sensitivity while preserving the non-covalent complex. In particular, the pressure during the first pumping stage was increased to 6.6 mbar using a throttling valve and the acceleration voltage applied on the sample cone was set to 30 V. The data obtained were processed using MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK). The relative quantities of each species were deduced from the peak intensities of the 9+ and 8+ charge states.

IM-MS analysis

The IM-MS experiments were performed on the abovementioned spectrometer. The IM separation parameters had to be fine-tuned to retain the native complexes without extensive ion activation before IM separation, while achieving sufficient conformational resolution and ion desolvation.⁶¹ Specifically, the trap and transfer collision energies were set to 4 V and the trap bias voltage to 20 V. The IM wave height and velocity were adjusted to 34 V and 1225 m s^{-1} , respectively, while the cooling (Q_{He}) and separation (Q_{N_2}) gas flow rates were set to 80 and 20 mL min^{-1} , respectively. The IM resolution factor (R_s) was used to estimate the separation between two extracted conformations (A and B) at a given m/z , with arrival drift times (t_d^A and t_d^B) and half widths ($I_{1/2}^A$ and $I_{1/2}^B$):

$$R_s = \frac{t_d^B - t_d^A}{I_{1/2}^B - I_{1/2}^A}$$

The ion $^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ were determined from calibration values obtained from triplicate IM-MS analyses of native ions of known $^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{He}}$,⁶² namely equine cytochrome C (1767 and 2061 m/z) and bovine β -lactoglobulin (2042, 2297, 2625, 2827, 3063 m/z), performed under conditions similar to those in this study. The IM-MS data were processed using MassLynx 4.0. The drift times of the charge states of individual species were deduced from the IM extraction of these ions. The populations of the conformers were deduced from the absolute intensities (peak apex) of the respective smoothed ATDs corresponding to the 9+ and 8+ charge states.

Conformational studies of crystallographic structures

The crystallographic structures of apoPDF1B (PDB code: 3PN2), PDF1B : actinonin (3M6P) and PDF1B : 6b (3O3J) were visualized using Pymol (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA). The alpha carbons of the apoPDF1B and PDF1B : actinonin structures were aligned using the software Visual Molecular Dynamics.⁶³ The theoretical CCS values reported above were obtained from the same three structures using Mobcal,^{64,65} ignoring solvent and metal atoms and altering the starting coordinates using random seed numbers. The uncertainties quoted correspond to the standard deviations of six Mobcal replicates.

Acknowledgements

The authors would like to thank Julien Marcoux for fruitful discussions and Matteo Degiacomi for the sequence alignments. This work was supported by the French National Research Agency (ANR-10-BLANC-1510), the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Strasbourg (UdS), the "Fondation pour la Recherche Médicale", the Alsace Region, and the GIS IBiSA (funding for a Synapt G2 HDMS mass spectrometer). S. P.-B. was supported by a studentship from the CNRS and NovAliX; J. S. acknowledges the Institut de Recherches Servier for supporting his doctoral fellowship.

References

- R. A. Carr, M. Congreve, C. W. Murray and D. C. Rees, *Drug Discovery Today*, 2005, **10**, 987–992.
- L. Oster, S. Tapani, Y. Xue and H. Kack, *Drug Discovery Today*, 2015, **20**, 1104–1111.
- M. Carini, L. Regazzoni and G. Aldini, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2011, **12**, 1548–1557.
- A. Beck, S. Sanglier-Cianferani and A. Van Dorsselaer, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 4637–4646.
- A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer and S. Sanglier-Cianferani, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 715–736.
- S. Shao, T. Guo and R. Aebersold, *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, **1854**, 519–527.
- A. P. Drabovich, E. Martinez-Morillo and E. P. Diamandis, *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, **1854**, 677–686.
- D. Lebert, G. Picard, C. Beau-Larvor, L. Troncy, C. Lacheny, B. Maynadier, W. Low, N. Mouz, V. Brun, C. Klinguer-Hamour, M. Jaquinod and A. Beck, *Bioanalysis*, 2015, 1–15, DOI: 10.4155/bio.15.56.
- V. Katta and B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 8534–8535.
- B. Ganem, Y. T. Li and J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 6294–6296.
- K. Benkestock, C. K. Van Pelt, T. Akerud, A. Sterling, P. O. Edlund and J. Roeraade, *J. Biomol. Screening*, 2003, **8**, 247–256.
- H. J. Maple, O. Scheibner, M. Baumert, M. Allen, R. J. Taylor, R. A. Garlish, M. Bromirski and R. J. Burnley, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2014, **28**, 1561–1568.
- E. N. Kitova, A. El-Hawiet, P. D. Schnier and J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2012, **23**, 431–441.
- J. M. Daniel, G. McCombie, S. Wendt and R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 442–448.
- V. Vivat Hannah, C. Atmanene, D. Zeyer, A. Van Dorsselaer and S. Sanglier-Cianferani, *Future Med. Chem.*, 2010, **2**, 35–50.
- K. J. Pacholarz, R. A. Garlish, R. J. Taylor and P. E. Barran, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4335–4355.
- C. Schmidt and C. V. Robinson, *FEBS J.*, 2014, **281**, 1950–1964.
- C. Stehlin-Gaon, D. Willmann, D. Zeyer, S. Sanglier, A. Van Dorsselaer, J. P. Renaud, D. Moras and R. Schule, *Nat. Struct. Biol.*, 2003, **10**, 820–825.
- C. Bovet, A. Wortmann, S. Eiler, F. Granger, M. Ruff, B. Gerrits, D. Moras and R. Zenobi, *Protein Sci.*, 2007, **16**, 938–946.
- F. Bitsch, R. Aichholz, J. Kallen, S. Geisse, B. Fournier and J. M. Schlaeppli, *Anal. Biochem.*, 2003, **323**, 139–149.
- B. J. Laventie, C. Potrich, C. Atmanene, M. Saleh, O. Joubert, G. Viero, C. Bachmeyer, V. Antonini, I. Mancini, S. Cianferani-Sanglier, D. Keller, D. A. Colin, T. Bourcier, G. Anderluh, A. van Dorsselaer, M. Dalla Serra and G. Prevost, *Biochem. J.*, 2013, **450**, 559–571.
- S. E. Kolstoe, P. P. Mangione, V. Bellotti, G. W. Taylor, G. A. Tennent, S. Deroo, A. J. Morrison, A. J. Cobb, A. Coyne, M. G. McCammon, T. D. Warner, J. Mitchell, R. Gill, M. D. Smith, S. V. Ley, C. V. Robinson, S. P. Wood and M. B. Pepys, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 20483–20488.
- N. S. Hatzakis, *Biophys. Chem.*, 2014, **186**, 46–54.
- K. Giles, J. P. Williams and I. Campuzano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2011, **25**, 1559–1566.
- Y. Zhong, S. J. Hyung and B. T. Ruotolo, *Analyst*, 2011, **136**, 3534–3541.
- J. L. Benesch and B. T. Ruotolo, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2011, **21**, 641–649.
- S. J. Hyung and B. T. Ruotolo, *Proteomics*, 2012, **12**, 1547–1564.
- Y. Zhong, S. J. Hyung and B. T. Ruotolo, *Expert Rev. Proteomics*, 2012, **9**, 47–58.
- M. F. Jarrold, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 1659–1671.
- C. Atmanene, D. Chaix, Y. Bessin, N. Declerck, A. Van Dorsselaer and S. Sanglier-Cianferani, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3597–3605.
- C. Atmanene, S. Petiot-Becard, D. Zeyer, A. Van Dorsselaer, V. Vivat Hannah and S. Sanglier-Cianferani, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 4703–4710.
- S. Niu, J. N. Rabuck and B. T. Ruotolo, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, **17**, 809–817.
- M. P. Nyon, T. Prentice, J. Day, J. Kirkpatrick, G. N. Sivalingam, G. Levy, I. Haq, J. A. Irving, D. A. Lomas, J. Christodoulou, B. Gooptu and K. Thalassinou, *Protein Sci.*, 2015, **24**, 1301–1312.
- C. Giglione, M. Pierre and T. Meinel, *Mol. Microbiol.*, 2000, **36**, 1197–1205.
- C. T. Supuran, F. Carta and A. Scozzafava, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2013, **23**, 777–788.
- Z. Q. Xu, M. T. Flavin and J. Flavin, *Expert Opin. Invest. Drugs*, 2014, **23**, 163–182.
- C. Giglione, A. Boularot and T. Meinel, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, **61**, 1455–1474.
- C. Giglione, S. Fioulaine and T. Meinel, *Trends Biochem. Sci.*, 2009, **34**, 417–426.
- S. Ragusa, S. Blanquet and T. Meinel, *J. Mol. Biol.*, 1998, **280**, 515–523.
- C. Giglione, A. Serero, M. Pierre, B. Boisson and T. Meinel, *EMBO J.*, 2000, **19**, 5916–5929.
- A. Serero, C. Giglione and T. Meinel, *J. Mol. Biol.*, 2001, **314**, 695–708.
- S. Fioulaine, A. Boularot, I. Artaud, M. Desmadril, F. Dardel, T. Meinel and C. Giglione, *PLoS Biol.*, 2011, **9**, e1001066.
- A. Boularot, C. Giglione, S. Petit, Y. Duroc, R. Alves de Sousa, V. Larue, T. Cresteil, F. Dardel, I. Artaud and T. Meinel, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 10–20.
- D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1958, **44**, 98–104.
- H. Rogniaux, A. Van Dorsselaer, P. Barth, J. F. Biellmann, J. Barbanton, M. van Zandt, B. Chevrier, E. Howard, A. Mitschler, N. Potier, L. Urzhumtseva, D. Moras and A. Podjarny, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999, **10**, 635–647.

- 46 O. El-Kabbani, H. Rogniaux, P. Barth, R. P. Chung, E. V. Fletcher, A. Van Dorsselaer and A. Podjarny, *Proteins*, 2000, **41**, 407–414.
- 47 J. M. Clements, R. P. Beckett, A. Brown, G. Catlin, M. Lobell, S. Palan, W. Thomas, M. Whittaker, S. Wood, S. Salama, P. J. Baker, H. F. Rodgers, V. Barynin, D. W. Rice and M. G. Hunter, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 563–570.
- 48 J. P. Guilloteau, M. Mathieu, C. Giglione, V. Blanc, A. Dupuy, M. Chevrier, P. Gil, A. Famechon, T. Meinnel and V. Mikol, *J. Mol. Biol.*, 2002, **320**, 951–962.
- 49 D. E. Clemmer and M. F. Jarrold, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 577–592.
- 50 C. A. Scarff, V. J. Patel, K. Thalassinou and J. H. Scrivens, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 625–631.
- 51 G. Vonhelden, M. T. Hsu, N. Gotts and M. T. Bowers, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 8182–8192.
- 52 T. Wyttenbach, M. Witt and M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3458–3464.
- 53 A. A. Shvartsburg, R. R. Hudgins, P. Dugourd and M. F. Jarrold, *Chem. Soc. Rev.*, 2001, **30**, 26–35.
- 54 A. A. Shvartsburg, R. R. Hudgins, P. Dugourd and M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 1684–1688.
- 55 C. Uetrecht, I. M. Barbu, G. K. Shoemaker, E. van Duijn and A. J. Heck, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 126–132.
- 56 C. Uetrecht, R. J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen and A. J. Heck, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1633–1655.
- 57 J. T. Hopper and N. J. Oldham, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1851–1858.
- 58 S. J. Hyung, C. V. Robinson and B. T. Ruotolo, *Chem. Biol.*, 2009, **16**, 382–390.
- 59 J. N. Rabuck, S. J. Hyung, K. S. Ko, C. C. Fox, M. B. Soellner and B. T. Ruotolo, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 6995–7002.
- 60 F. Debaene, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, A. Beck and S. Cianferani, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 9785–9792.
- 61 B. T. Ruotolo, J. L. Benesch, A. M. Sandercock, S. J. Hyung and C. V. Robinson, *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 1139–1152.
- 62 M. F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C. V. Robinson and B. T. Ruotolo, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 9557–9565.
- 63 W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 33–38.
- 64 A. A. Shvartsburg and M. F. Jarrold, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **261**, 86–91.
- 65 M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvartsburg, G. C. Schatz and M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 16082–16086.

Chapitre 6 : Etude d'un complexe enzyme/cofacteur/ ligand par IM-MS native: le système QR2.

1. Contexte de l'étude.

Avec plus de 4,6 millions de nouveaux cas identifiés par an, les neuropathologies, favorisées par le vieillissement des populations, représenteront, d'ici 2050, la première cause de mortalité au monde devant le cancer et les maladies cardiovasculaires [188]. Ces maladies se caractérisent par une accumulation anormale du peptide amyloïde A β 40-42 dans le cerveau, dont la relative insolubilité conditionne l'agrégation neuronale [189]. Ce phénomène s'accompagne de la fixation d'ions Cu²⁺ et Fe²⁺ à l'origine d'une réponse inflammatoire pro-oxydante, et d'un influx de calcium dans les neurones, responsable de l'hyperphosphorylation et agrégation délétère de la protéine Tau [190, 191]. Parmi les stratégies thérapeutiques en développement, une approche prometteuse consiste à limiter l'impact du stress oxydant inhérent aux processus neurodégénératifs [192]. Dans ce contexte, la réactivité des quinones et leur exposition aux cellules humaines constitue une menace [193] (Fig.41a). Ces composés d'origine exogène (produits de combustion) et endogène (métabolisme hormonal), constitués d'un noyau benzène substitué par 2 groupements carbonyle en position 1,2 (ortho) ou 1,4 (para), sont catalysés chez l'Homme par 2 mécanismes de réduction en compétition (Fig.41b).

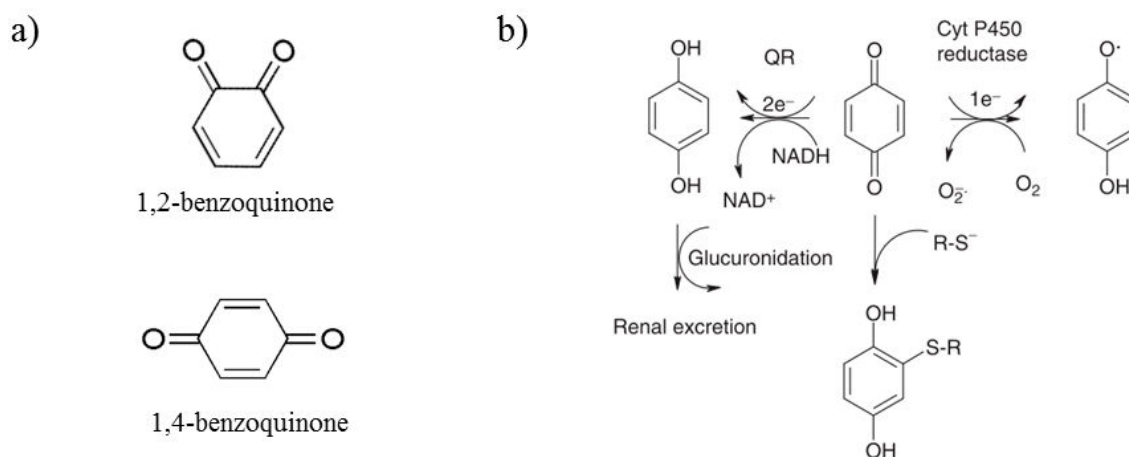


Figure 41 : Représentation schématique des quinones (a) et de leur réduction intracellulaire (b) d'après [194]. L'existence de nombreux centres électrophiles au sein des quinones favorise l'inactivation des enzymes à thiol par addition nucléophile. Chez les Mammifères, deux systèmes enzymatiques en compétition assurent la prise en charge de ces espèces réactives: la réduction à un électron des quinones par la cytochrome P450 réductase, génère des radicaux semi-quinones délétères. A l'inverse, l'action des quinones réductases permet la réduction à deux électrons de ces composés en dihydroquinones facilement conjuguables par les enzymes de détoxication, favorisant ainsi leur élimination.

La réduction à un électron de ces espèces, via la cytochrome P450 réductase, génère des radicaux semi-quinone instables et réoxydables, favorisant l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [194]. A l'inverse, un mécanisme de réduction à deux électrons, catalysé par les enzymes Quinone Réductases (QRs), permet la formation de dihydroquinones plus stables et conjuguables, reconnues par les enzymes de détoxification [195]. Cette dernière classe d'enzymes se décline en 2 isoformes cytosoliques, QR1 et QR2, partageant une forte homologie de séquence mais une spécificité de substrats différente [196-198]. Tandis que le rôle antioxydant de QR1 n'est plus à démontrer [199], de nombreuses études fonctionnelles suggèrent l'implication de QR2 dans l'accroissement de toxicité de certaines quinones, l'amplification du stress oxydant et la neurodégénérescence [200-204]. Ces propriétés révèlent le potentiel thérapeutique de cette enzyme, identifiée comme le récepteur à la mélatonine de type III [205, 206]. Dans ce contexte, une caractérisation biophysique intensive du variant humain a été menée par l'équipe du Dr. Ferry. Ces études ont permis l'identification *in vitro* de cosubstrats (*N-ribosyl*-dihyronicotinamide, ménadione) et inhibiteurs (mélatonine, resvératrol) spécifiques de l'isoforme QR2 ainsi qu'une meilleure compréhension du mécanisme de réduction bi-bi ping-pong catalysé [207-211] (Fig.42).

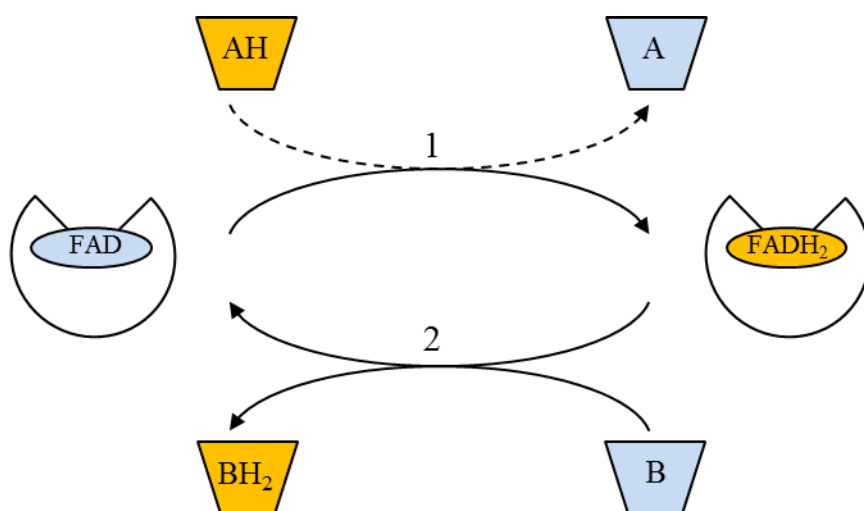


Figure 42 : Représentation schématique du mécanisme enzymatique bi-bi ping-pong catalysé par l'enzyme QR2. Un premier transfert d'électron (1) du cosubstrat donneur (AH) vers le cofacteur accepteur (FAD), permet la réduction de ce dernier (FADH₂). La libération du cosubstrat donneur oxydé (A) du site actif permet la fixation séquentielle du cosubstrat accepteur oxydé de type quinone (B). Un transfert d'électron inverse (2) du cofacteur donneur (FADH₂) vers le cosubstrat accepteur (B), assure la régénération du cofacteur oxydé (FAD) et le relargage du cosubstrat accepteur réduit de type dihydroquinone (BH₂).

Ce dernier repose sur l'enchaînement séquentiel de 2 réactions redox au sein du site actif: la réduction du cofacteur enzymatique (flavine adénine dinucléotide, FAD) par un cosubstrat de type donneur d'électron (AH) s'achève par son relargage sous forme oxydée (A), permettant le recrutement et la réduction d'un cosubstrat accepteur de type quinone (B) selon un transfert

d'électron inverse [212]. La caractérisation enzymatique et structurale des complexes formés entre l'enzyme, ses cofacteurs, cosubstrats et inhibiteurs, a notamment permis de révéler la nature dimérique de QR2, l'affinité du cofacteur FAD ($K_d \approx 48\text{nM}$) et des ligands mélatonine ($1.4\mu\text{M}$) et resvératrol (39nM), dont le mode d'inhibition compétitif vis-à-vis du cosubstrat donneur a pu être démontré [74, 75, 213]. Malgré l'avancement de ces connaissances, de nombreuses questions subsistent :

- Bien que fixant préférentiellement le FAD, la copurification de complexes QR2-flavine mononucléotide (FMN) recombinants interroge sur la nature et l'impact structural du cofacteur [207, 214].
- La nature des couples de cosubstrats (donneurs / accepteurs) endogènes de QR2, modulant l'efficacité même des principaux inhibiteurs [196, 211], demeure méconnue [215], complexifiant la relation structure-fonction associée à ces molécules [216, 217].

2. Objectifs de l'étude.

Afin de répondre à ces problématiques, une caractérisation structurale approfondie de ces complexes a été réalisée par MS native et IM-MS native. Ces travaux s'articulent en 3 parties :

- Une détermination préliminaire de la cinétique d'échange intra-monomère QR2 et inter-monomère QR1-QR2, afin d'évaluer la dynamique d'association / dissociation du dimère QR2 et l'existence d'hétérodimères hybrides QR1-QR2.
- Un criblage conformationnel par IM-MS des complexes QR2-FAD / FMN permet une comparaison de l'impact de ces cofacteurs (Fig.43a) sur l'enzyme QR2 apo.
- Un criblage structural et conformationnel des espèces QR2-FAD-mélatonine / resvératrol permet une comparaison de l'effet de ces ligands (Fig.43b) sur le complexe QR2-cofacteur.

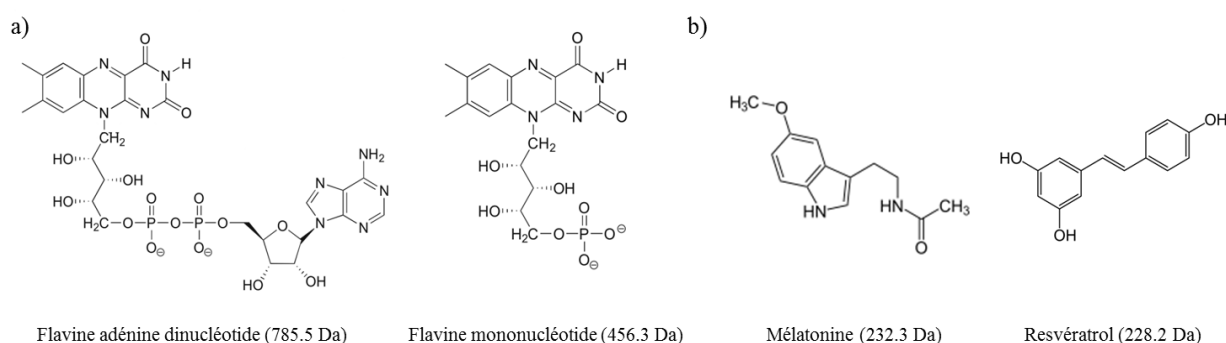


Figure 43 : Présentation des cofacteurs (a) et ligands (b) utilisés au cours de ces travaux.

3. Présentation des résultats.

3.1. Caractérisation de la cinétique d'échange intra-monomère QR2 et inter-monomère QR1-QR2 par MS native.

Les rôles anti et pro-oxydants associés aux isoformes QR1 et QR2 humains, contrastent avec l'homologie de séquence et de structure partagée entre ces enzymes [196, 218]. Par ailleurs, l'identification de QR2 comme récepteur mélatoninergique membranaire de type III (MT3), contraste avec l'expression cytoplasmique de cette enzyme dimérique [205, 217]. Parmi les hypothèses avancées, l'interconversion dynamique des dimères QR2 en monomères, libérant ainsi leur interface de dimérisation hydrophobe, pourrait favoriser leur adressage membranaire [219]. Afin de vérifier cette hypothèse et l'existence d'hétérodimères entre QR2 et QR1, la cinétique d'échange intra et inter-monomère est ici suivie par MS native en présence des construits humains QR1, QR2 non marqués (QR2*l*) et marqués C13/N15 (QR2*h*).

3.1.1. Reconstitution des complexes QR1 / QR2*l* / QR2*h* - cofacteurs.

Une analyse préliminaire de ces 3 protéines recombinantes (*E. coli*) en conditions dénaturantes nous a permis de confirmer la pureté de ces préparations (Tableau 3). Les masses mesurées pour QR1, QR2*l* et QR2*h* vérifient les masses monomériques théoriques attendues en l'absence (QR1) ou présence (QR1, QR2*l*, QR2*h*) d'un clivage de la méthionine N-terminale. Le déficit de masse supplémentaire (-28.2 Da) mesuré en présence de l'échantillon QR2*h* (masse théorique QR2*h* – Met N-Ter : 27299.3 Da) peut être assimilé à un marquage ¹³C / ¹⁵N incomplet de la protéine (≈ 98%).

Espèces	Masse théorique (Da)	Masses mesurées (Da)		Interprétation	
		Conditions dénaturantes	Conditions natives	Conditions dénaturantes	Conditions natives
QR1	30867.6	30737.0 ± 0.2 30868.1 ± 0.1	61737 ± 1 62523 ± 1 63309 ± 1	QR1 – Met N-Ter QR1	(QR1) ₂ (QR1) ₂ - FAD (QR1 - FAD) ₂
QR2 <i>l</i>	25952.5	25821.8 ± 0.1	51775 ± 2 52231 ± 2 52558 ± 1 52685 ± 1 53014 ± 1 53346 ± 4	QR2 <i>l</i> – Met N-Ter	(QR2 <i>l</i> - Zn) ₂ (QR2 <i>l</i> - Zn) ₂ - FMN (QR2 <i>l</i> - Zn) ₂ - FAD (QR2 <i>l</i> - Zn - FMN) ₂ (QR2 <i>l</i> - Zn) ₂ - FMN - FAD (QR2 <i>l</i> - Zn - FAD) ₂
QR2 <i>h</i> (¹³ C- ¹⁵ N)	27425.6	27271.1 ± 0.1	54674 ± 4 55140 ± 5	QR2 <i>h</i> – Met N-Ter (marquage incomplet)	(QR2 <i>h</i> - Zn) ₂ (QR2 <i>h</i> - Zn) ₂ - FMN

Tableau 3 : Comparaison des masses théoriques et mesurées à partir des protéines QR1, QR2*l* et QR2*h* non complémentées en cofacteur, en conditions dénaturantes (2μM) et natives (AcNH₄ 200mM pH 7.5, 5μM).

La caractérisation de ces protéines en conditions natives (AcNH_4 200mM pH 7.5) permet une détermination de leur état oligomérique et de leur stœchiométrie d'interaction en ligand (Fig.44a-c et Tableau 3). L'analyse des spectres QR1, QR2*l* et QR2*h* permet de confirmer la nature dimérique de ces protéines et la fixation d'un atome de zinc (65.4 Da) par monomère QR2, en accord avec la littérature [194, 207]. Ces expériences révèlent par ailleurs la fixation partielle d'une à deux molécules de cofacteur endogène par dimère, se traduisant par une distribution de complexes $(\text{QR1})_2$, $(\text{QR1})_2\text{-FAD}$ et $(\text{QR1-FAD})_2$ en présence de l'enzyme QR1 (Fig.44a). Cette distribution apparaît plus hétérogène en présence de QR2*l*, fixant également 1 à 2 molécules de cofacteur FMN par dimère (Fig.44b). L'analyse de cette protéine s'accompagne de la détection de 6 espèces, associées aux complexes $(\text{QR2}l - \text{Zn})_2$, $(\text{QR2}l - \text{Zn})_2 - \text{FMN}$, $(\text{QR2}l - \text{Zn})_2 - \text{FAD}$, $(\text{QR2}l - \text{Zn} - \text{FMN})_2$, $(\text{QR2}l - \text{Zn})_2 - \text{FMN} - \text{FAD}$ et $(\text{QR2}l - \text{Zn} - \text{FAD})_2$. A l'inverse, le dimère QR2*h* apparaît principalement sous forme apo, fixant de façon résiduelle une molécule de FMN (Fig.44c). Ces sous-stœchiométries, décrites par d'autres groupes, suggèrent un épuisement endogène en cofacteur FAD au sein du système d'expression, à l'origine de ces insaturations et de la fixation du dérivé FMN [207, 214].

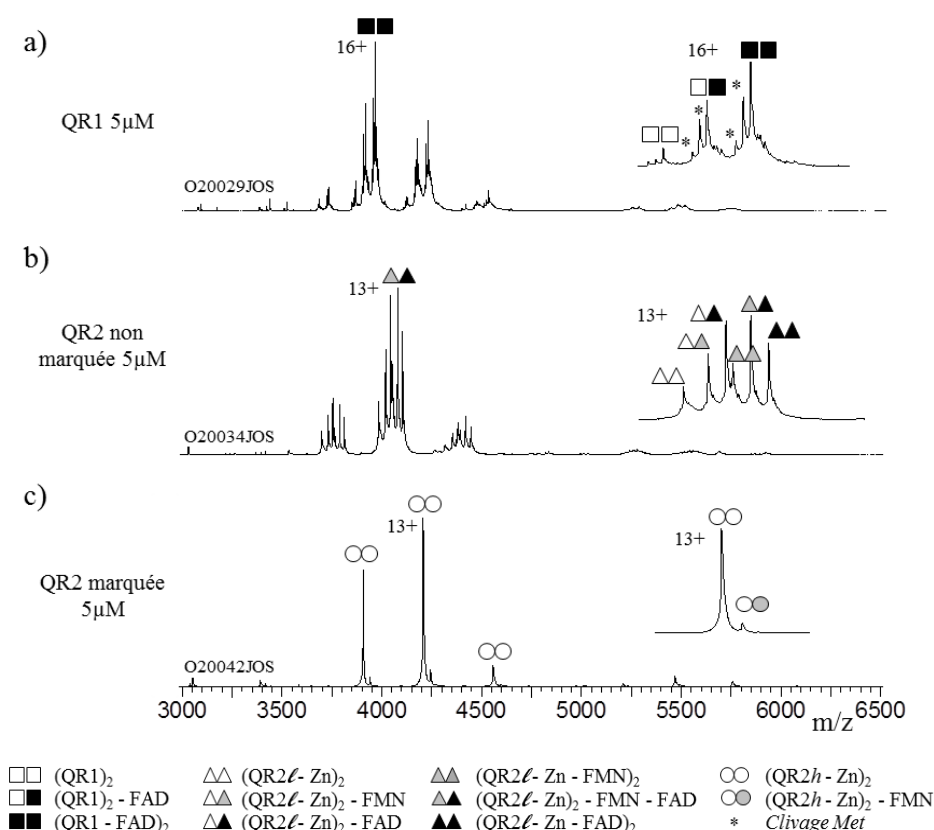


Figure 44 : Caractérisation des protéines QR1, QR2*l* et QR2*h* non complémentées en cofacteur par MS native. L'analyse des protéines a) QR1 b) QR2*l* non marquée et c) QR2*h* marquée (5µM de monomères) par MS native (AcNH_4 200mM pH 7.5, $V_c = 120\text{V}$, $P_i = 6\text{mbar}$) confirme la nature dimérique de ces protéines et la fixation d'un atome de zinc par monomère QR2. Ces espèces apparaissent partiellement saturées en cofacteur FAD (noir) ou FMN (gris), à raison d'une à deux molécules par dimère. Un zoom sur l'état de charge majoritaire est rapporté pour chaque acquisition.

Dans ce contexte, la reconstitution des complexes en cofacteur est ici suivie par MS native (Fig.45a-c). Pour cela, une pré-incubation des protéines (5 μ M de monomère) en présence de 2 excès de FAD exogène est réalisée avant le dessalage et l'analyse des échantillons. Cette étape s'accompagne d'un déplacement de l'équilibre vers la formation de complexes monomère:FAD 2:2, quelle que soit la nature de l'enzyme. Cette stœchiométrie unique confirme la spécificité d'interaction du cofacteur FAD. Par ailleurs, le FAD entraîne un déplacement total du FMN par compétition, suggérant une affinité plus faible entre ce dérivé dépourvu d'adénine et QR2 [207].

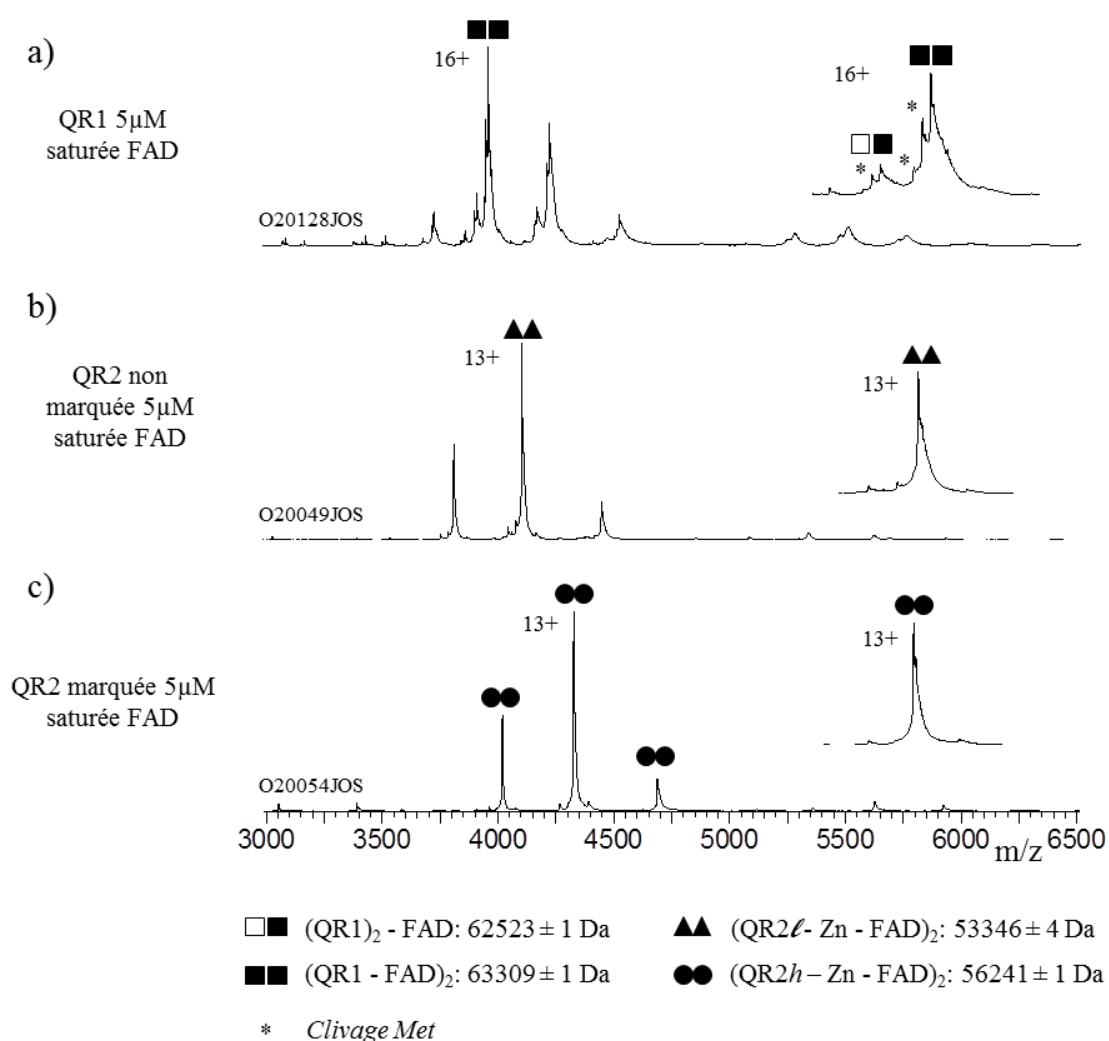


Figure 45 : Caractérisation des protéines QR1, QR2_l et QR2_h saturées en cofacteur FAD par MS native (AcNH₄ 200mM pH 7.5, V_c = 120V, P_i = 6mbar). Une préincubation préalable entre les enzymes (5 μ M de monomère) a) QR1 b) QR2_l c) QR2_h et 2 excès de FAD exogène, permet un déplacement de l'équilibre vers la reconstitution de complexes monomère:FAD 2:2 saturés. Un zoom sur l'état de charge majoritaire est rapporté pour chaque acquisition.

3.1.2. Suivi cinétique de la formation d'hétérodimères QR2I-QR2h et QR1-QR2 par MS native.

Les complexes reconstitués au cours des précédentes expériences ont servi de support à l'étude de la cinétique d'échange intra-monomère QR2 / QR2 et inter-monomère QR2 / QR1. Dans ce contexte, la formation d'hétérodimères QR2I - QR2h et QR2I - QR1 est suivie par MS native au cours du temps, en présence de mélanges entre ces 3 construits (Fig.46).

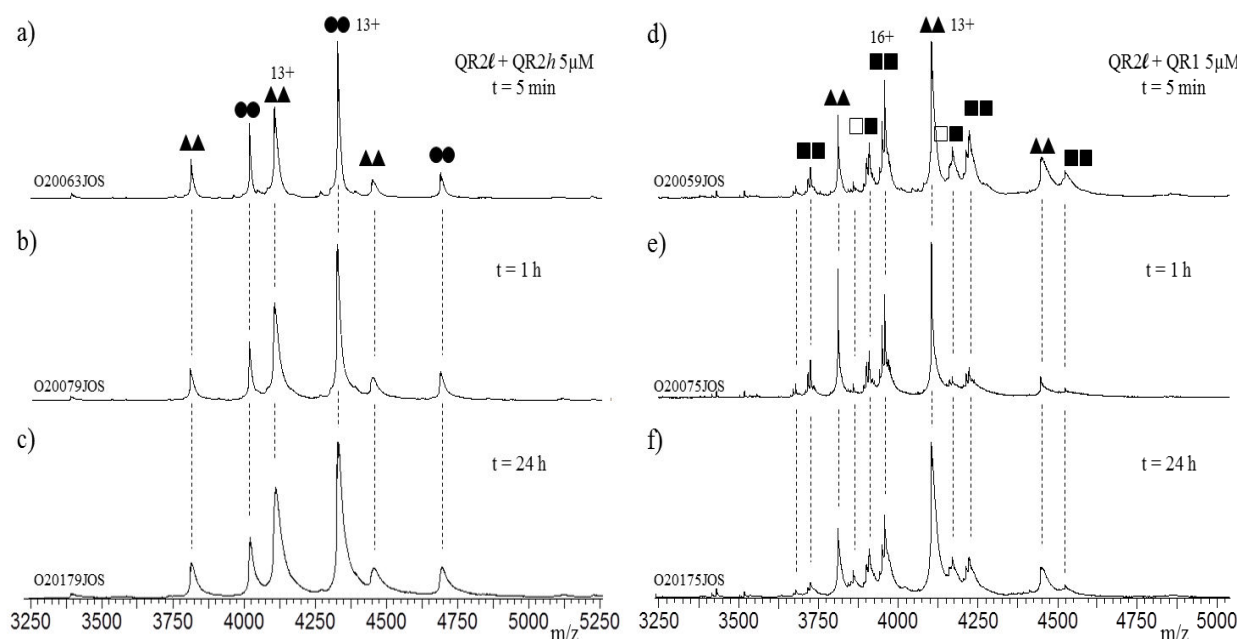


Figure 46 : Suivi cinétique de la dynamique d'échange intra et inter-monomère par MS native (V_c : 120V, P_i : 6mbar). (a-c) La réalisation d'un mélange stœchiométrique ($5\mu\text{M}$ de monomère) entre QR2 non marquée (QR2I) et marquée (QR2h) est suivie à différents temps d'incubation. (d-f) Ces expériences sont également réalisées en présence d'un mélange stœchiométrique ($5\mu\text{M}$ de monomère) entre QR2 non marquée (QR2I) et QR1.

La réalisation d'un mélange stœchiométrique ($5\mu\text{M}$ de monomère) entre QR2I et QR2h est analysée par MS native en temps réel (Fig.46a-c). Les spectres obtenus après 5 minutes, 1 heure et 24 heures d'incubation ne permettent pas la détection d'un hétérodimère QR2I-QR2h, les seuls signaux observés correspondant aux homodimères (QR2I-FAD)₂ et (QR2h-FAD)₂. Des résultats similaires sont obtenus à des temps d'incubation plus avancés (72 heures) et à des concentrations plus élevées (ratios 1:2, 1:5, 1:10), confirmant une faible cinétique d'échange intra-monomère. Des expériences similaires, réalisées à partir d'un mélange QR2I:QR1 1:1, confirment également l'absence de formation d'hétérodimères entre les 2 isoformes (Fig.46d-f), quels que soit le temps d'incubation et la concentration d'enzyme utilisée.

En conclusion, ces expériences réfutent les hypothèses initiales selon lesquelles :

- La dynamique d'échange intra-monomère favoriserait l'adressage monomérique de QR2.

➤ L'homologie structurale entre QR1 et QR2 favoriserait l'hétérodimérisation.

3.2. Etude des complexes QR2-cofacteur par IM-MS native.

La mise en évidence d'une fixation spécifique de FAD et de son dérivé FMN, d'affinités relatives différentes, interroge sur la nature des complexes QR2-cofacteur retrouvés *in vivo*, reliée à la biodisponibilité de ces molécules [220]. Dans ce contexte, une analyse des complexes formés entre le dimère (QR2I - Zn)₂ (appelé simplement QR2 ensuite), le FAD et le FMN par IM-MS, est réalisée afin de comparer l'impact conformationnel de ces cofacteurs.

3.2.1. Etude conformationnelle des complexes QR2-cofacteur par IM-MS native.

L'insaturation de la protéine QR2 en cofacteur FAD / FMN endogène (Fig.44b) permet une analyse concomitante de l'ensemble des complexes au sein d'une même analyse IM-MS, limitant la variabilité liée au spray et à l'électronique (chapitre 2). Afin de pallier la perte de sensibilité liée au mode IM-MS (illustrée au chapitre 4) et disposer d'un signal suffisamment intense pour chaque espèce, une optimisation des conditions de concentration et d'incubation est ici réalisée (Fig.47). L'analyse du spectre de masse obtenu en mode IM-MS à partir d'un mélange QR2:FAD:FMN 4:1:1 (10µM de monomère QR2) vérifie ces prérequis et confirme une distribution de charge identique entre chaque espèce, centrée sur l'état de charge 13⁺.

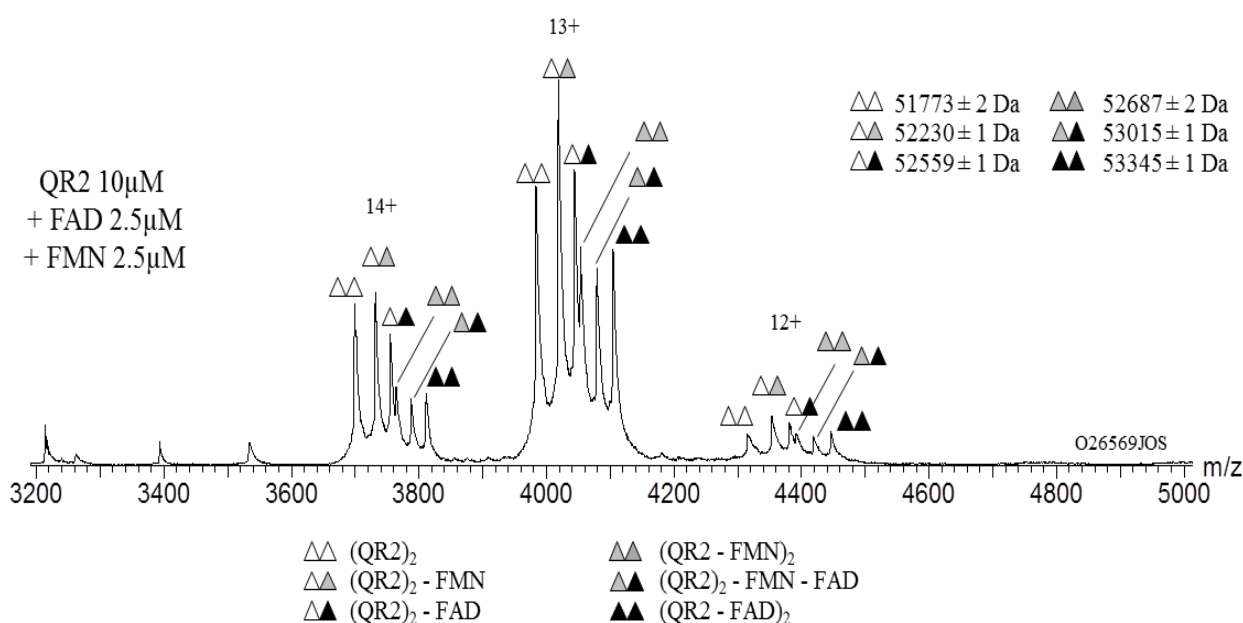
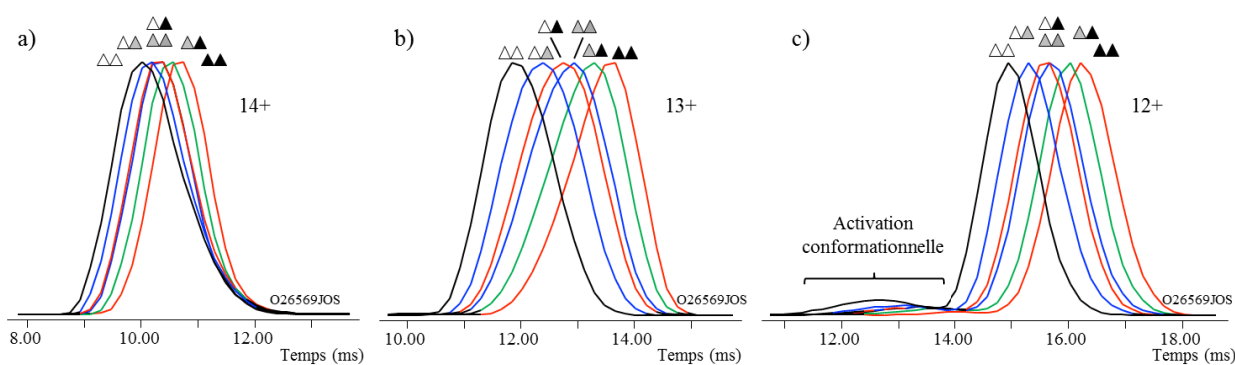


Figure 47 : Spectre de masse natif extrait de l'analyse du mélange QR2:FAD:FMN 4:1:1 (10µM monomère QR2) par IM-MS (Vc : 100V, Pi : 7mbar). Les concentrations utilisées permettent de disposer d'une sensibilité et distribution de complexes QR2:cofacteur optimales.

La proximité conformationnelle entre ces espèces, mise en évidence lors de l'optimisation instrumentale et confirmée par la résolution cristallographique des complexes QR2 apo, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ (entrées PDB : 4QOD, 4QOF, 4QOE ; Serriere *et al.*, non publié) impose une résolution IM maximale. La mobilité ionique séparant les ions en fonction de leur charge et de leur forme, la distribution de charge unique observée permet ici une optimisation instrumentale par état de charge, soit une dépendance stricte du temps de dérive à la conformation des ions [94]. Le caractère « natif » de ces conformations est favorisé par une minimisation des répulsions coulombiennes à la surface des ions, conditionnant le choix des états de charge étudiés [85, 104]. Néanmoins, ce choix est également dicté par l'intensité des signaux, conditionnant leur détection IM-MS. Dans ce souci de compromis, l'état de charge natif 13⁺ majoritaire a servi d'ébauche à l'optimisation de la méthode IM-MS. La distribution des temps de dérive (ATDs) de chaque complexe QR2-cofacteur est ici représentée par état de charge (Fig.48a-c). La comparaison des profils obtenus à partir de cette méthode suggère une séparation conformationnelle non optimale des ions 14⁺, les ATDs se concentrant sur une échelle de temps restreinte (9-12ms, Fig.48a). Bien que cette séparation apparaisse effective à l'état de charge opposé (12⁺), l'apparition d'une seconde distribution conformationnelle plus compacte (12-14ms), non observée aux états de charge 14⁺ et 13⁺, suggère une activation partielle des conformères détectés (14-18ms, Fig.48c). La mise en évidence d'une distribution d'ATDs gaussiens, s'étalant de 11 à 15 ms, suggère un compromis idéal entre séparation et maintien des conformations natives à l'état de charge 13⁺ optimisé (Fig.48b). Ces observations sont confirmées à travers la comparaison des t_D moyens mesurés à l'apex de ces distributions (Fig.48d). En effet, une différence de t_D significative entre chaque espèce est uniquement rapportée à l'état de charge 13⁺. Ainsi, ces résultats soulignent :

- L'existence de faibles différences de conformations globales entre complexes (QR2)₂, (QR2)₂-FMN, (QR2)₂-FAD, (QR2-FMN)₂, (QR2)₂-FAD-FMN et (QR2-FAD)₂.
- La résolution conformationnelle de la méthode IM-MS sur l'état de charge et la gamme de conformation restreinte optimisés (peu transposable à d'autres états de charge).



d)

Espèce	(QR2) ₂	(QR2) ₂ -FMN	(QR2) ₂ -FAD	(QR2-FMN) ₂	(QR2) ₂ -FAD-FMN	(QR2-FAD) ₂
t_D 14 ⁺ (ms)	10.02 ± 0.00	10.21 ± 0.00	10.39 ± 0.00	10.39 ± 0.00	10.57 ± 0.00	10.75 ± 0.00
t_D 13 ⁺ (ms)	11.85 ± 0.00	12.45 ± 0.11	12.82 ± 0.10	12.94 ± 0.00	13.36 ± 0.11	13.67 ± 0.00
t_D 12 ⁺ (ms)	14.94 ± 0.00	15.31 ± 0.00	15.61 ± 0.10	15.67 ± 0.00	16.04 ± 0.00	16.22 ± 0.00

Figure 48 : Criblage conformationnel des complexes formés entre le dimère QR2 et ses cofacteurs FAD et FMN par IM-MS ($V_c = 100V$, $P_i = 7$ mbar). (a-b) Représentation de la distribution des temps de dérive (ATDs) normalisée de chaque espèce à l'état de charge (a) 14⁺, (b) 13⁺ et (c) 12⁺. (d) Représentation des temps de dérive (t_D) moyen mesurés à l'apex des ATDs de chaque espèce. Les erreurs sont issues de triplicats d'acquisition (sprays identiques).

Afin de rapporter ces différences à la surface des ions 13⁺, un étalonnage de la cellule TWIMS a été réalisé dans des conditions instrumentales identiques. Le recours à des étalons protéiques natifs (β -lactoglobuline, transthyréline, avidine) encadrant finement les ions analytes en termes de masse (37 à 60 kDa) et de charge (9⁺ à 16⁺), a ainsi permis une mesure précise de la section efficace ($^{TW}CCS_{N_2}$) de ces ions dans l'azote [221] (Tableau 4). Ces valeurs confirment une augmentation de surface globale induite par la fixation des cofacteurs, dont l'amplitude dépend:

- de la nature du cofacteur (FMN ou FAD).
- de la stœchiométrie du cofacteur (complexes QR2:cofacteur 2:1 ou 2:2).

Néanmoins, l'application de 3 étalonnages indépendants (triplicats d'infusion) ne permet plus de distinguer les conformations globales associées aux complexes (QR2)₂-FAD ($3216 \pm 6 \text{ \AA}^2$) et (QR2-FMN)₂ ($3221 \pm 2 \text{ \AA}^2$). Ces résultats illustrent l'impact de la variabilité instrumentale inter-acquisition (spray, électronique) sur la résolution conformationnelle accessible par IM-MS, présenté en chapitre 2.

Espèce	(QR2) ₂	(QR2) ₂ -FMN	(QR2) ₂ -FAD	(QR2-FMN) ₂	(QR2) ₂ -FAD-FMN	(QR2-FAD) ₂
$^{TW}CCS_{N_2}$ mesurée pour l'état de charge 13 ⁺ (\AA^2)	3175 ± 2	3201 ± 6	3216 ± 6	3221 ± 2	3238 ± 6	3250 ± 2

Tableau 4: Mesure des sections efficaces rationnellement moyennées ($^{TW}CCS_{N_2}$) associées aux ions 13⁺ des complexes. Les erreurs indiquées proviennent de l'application de 3 étalonnages indépendants (triplicats d'infusion).

Afin d'interpréter l'origine des différences de conformation induites par le cofacteur, les $^{TW}CCS_{N_2}$ expérimentales précédemment mesurées sur les complexes (QR2)₂, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ ont été comparées:

- Aux CCSs prédites à partir d'un modèle d'approximation grossier, reliant la section efficace (Ω) de protéines globulaires à leur masse (chapitre 2) [99].
- Aux CCS calculées à partir des structures cristallographiques disponibles sur ces mêmes complexes (entrées PDB: 4QOD, 4QOF, 4QOE). Ces dernières comportent un nombre d'atomes protéiques similaire (3627 ± 2) et complet (nombre d'atomes manquants $< 0.6\%$), assurant une comparaison pertinente aux données expérimentales. Pour cela, une reconstitution atomistique de ces structures et une simulation de leur section efficace dans l'hélium sont réalisées à l'aide des 3 algorithmes (Projection Approximation, PA ; Exact Hard Sphere Scattering, EHSS ; Trajectory Method, TM) compilés dans le logiciel Mobcal [116, 117]. Une correction empirique des valeurs PA (facteur correctif: 1.14) est ici appliquée afin d'intégrer la sous-estimation de CCS inhérente à cet algorithme (chapitre 2) [104].

L'ensemble de ces valeurs est ici présenté pour chacune des 3 espèces (Tableau 5a). Tout d'abord, les $^{TW}CCS_{N_2}$ expérimentales apparaissent inférieures aux CCS calculées et prédites, suggérant une compaction des ions en phase gazeuse [222]. D'autre part, les CCS calculées confirment la non-équivalence des algorithmes, l'algorithme TM s'avérant le plus adapté à l'étude de tels systèmes mais présentant la plus faible reproductibilité [223, 224].

Une comparaison des CCSs apo / holo obtenues par ces différentes approches, permet d'analyser l'impact respectif des cofacteurs FMN et FAD (Tableau 5b). Les différences de $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées par IM-MS, révèlent l'induction d'un changement conformationnel subtil mais distinct entre FMN et FAD. En effet, l'augmentation de $^{TW}CCS_{N_2}$ induite par ces cofacteurs apparaît plus marquée en présence de FAD (+ 2.4 %) que de FMN (+ 1.4 %), en accord avec une augmentation de volume prédite par leurs simples masses (+ 2.0 et 1.2 %, respectivement). Ces résultats s'opposent aux différences de CCS calculées à partir des structures cristallographiques. Alors que l'algorithme TM ne décrit aucune différence de conformation globale entre formes apo et holo, les méthodes PA et EHSS suggèrent un impact conformationnel plus marqué en présence de FMN (+ 1.1 et 1.0 %) qu'en présence de FAD (+ 0.3 et 0.2 %).

a)

Espèces	Masse théorique (Da)	Masse mesurée par MS native (Da)	CCS prédites par la masse (Å ²)	CCS calculées (Å ²)			^{tw} CCS _{N₂} expérimentale (Å ²)
				PA	EHSS	TM	
(QR2) ₂	51774	51775 ± 2	3383	3235 ± 4	3713 ± 3	3685 ± 71	3175 ± 2
(QR2-FMN) ₂	52687	52685 ± 1	3422	3271 ± 6	3751 ± 9	3768 ± 132	3221 ± 2
(QR2-FAD) ₂	53345	53346 ± 4	3451	3245 ± 2	3722 ± 5	3670 ± 85	3250 ± 2

b)

Espèces	ΔCCS prédites par la masse (Å ²)	ΔCCS calculées (Å ²)			Δ ^{tw} CCS _{N₂} expérimentale (Å ²)
		PA	EHSS	TM	
(QR2) ₂	0	0	0	0	0
(QR2-FMN) ₂	39 (+1.2 %)	36 (+1.1 %)	38 (+1.0 %)	NS	46 (+1.4 %)
(QR2-FAD) ₂	68 (+2.0 %)	10 (+0.3 %)	9 (+0.2 %)	NS	75 (+2.4 %)

Tableau 5: Influence de la nature du cofacteur sur la section efficace mesurée, calculée et prédite des complexes. a) Représentation des valeurs de CCS mesurées par IM-MS à l'état de charge 13⁺ (^{tw}CCS_{N₂}), calculées à partir des structures cristallographiques selon 3 algorithmes (PA, EHSS, TM) et prédites en fonction de la masse mesurée. Les erreurs expérimentales et calculées sont respectivement issues de triplicats d'analyse et de simulation. b) Comparaison des CCSs mesurées, calculées et prédites entre les complexes QR2 holo et apo. Les différences rapportées sont exprimées par rapport à la forme apo. NS : non significatif.

De nombreuses explications à cette discordance peuvent être avancées, parmi lesquelles :

- L'implication de subtils changements conformationnels ($\Delta^{\text{tw}}\text{CCS}_{\text{N}_2} \approx 1\text{-}2\%$) et les limites de prédictibilité des algorithmes, initialement développés pour des applications et gammes de conformation diverses, et s'appuyant sur des modèles d'approximation plus ou moins simplifiés des collisions molécule-gaz [94].
- La nature du gaz tampon, les CCSs expérimentales étant mesurées en azote, les CCSs calculées étant simulées en hélium.
- La non-prise en compte des 2 atomes de zinc fixés au dimère QR2 dans les simulations, la librairie d'atomes gérée par Mobcal n'incluant pas cette espèce.
- L'absence de tous les résidus au sein des structures cristallographiques : leur résolution limite ici l'identification des atomes d'hydrogène et de la charge globale de ces structures, dont un faible nombre d'atomes n'est pas observé dans la densité électronique.
- L'existence de différentes conformations en phase gazeuse et solide.

Pour illustrer cette dernière hypothèse, une analyse approfondie des structures d'intérêt par l'équipe du Dr. Ferry, a permis de révéler l'existence de contraintes cristallographiques. Ces dernières sont responsables de la flexibilité d'une boucle sur l'un des monomères de chaque structure, cristallisant dans 3 conformations potentielles (Fig.49).

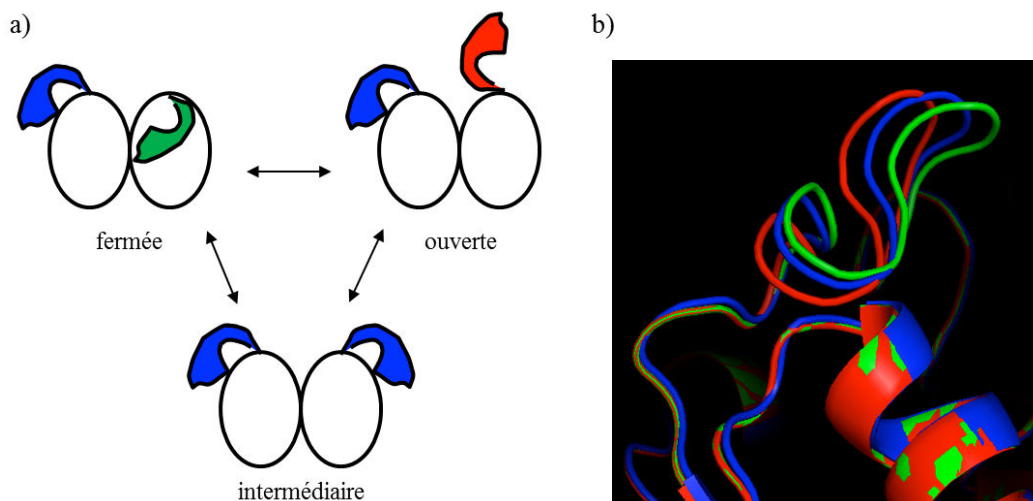


Figure 49 : Influence des contraintes cristallographiques sur la conformation de la boucle 126-136 associée à l'un des monomères QR2. a) Représentation schématique de la conformation fermée (verte), intermédiaire (bleue) et ouverte (rouge) adoptée par la boucle de l'un des monomères au sein des dimères cristallographiques. La boucle située sur l'autre monomère demeure dans une conformation intermédiaire. b) Superposition des structures cristallographiques associées aux 3 conformations de la boucle au sein du monomère impacté (reconstituées d'après la structure de (QR2)₂ apo, PDB : 4QOD).

Contrairement au monomère non affectée (boucle de conformation intermédiaire), la boucle 126-136 associée au monomère impactée présente une densité électronique diffuse, se traduisant par l'adoption d'une conformation intermédiaire, fermée ou ouverte. Afin d'évaluer l'impact de cette hétérogénéité sur les CCS calculées, les structures cristallographiques de (QR2)₂ apo affinées selon ces 3 conformations ont été soumises au logiciel Mobcal (Tableau 6).

	Méthode	(QR2) ₂ boucle intermédiaire	(QR2) ₂ boucle ouverte	(QR2) ₂ boucle fermée
CCS (Å ²)	PA	2851 ± 3	2827 ± 4	2819 ± 5
	EHSS	3732 ± 11	3699 ± 10	3690 ± 10
	TM	3814 ± 97	3667 ± 150	3656 ± 173
ΔCCS (Å ²)	PA	0	-24 (- 0.8%)	-32 (-1.1%)
	EHSS	0	-33 (- 0.9%)	-42 (-1.1%)
	TM	0	N.S	N.S

Tableau 6: Influence de la conformation contrainte de la boucle sur les CCS calculées. Les CCSs calculées à partir des structures cristallographiques de (QR2)₂ (code PDB: 4QOD) présentant l'une de ses boucles (126-136) dans une conformation intermédiaire, ouverte ou fermée, sont ici rapportées. Les valeurs obtenues à partir des conformations ouvertes et fermées sont comparées à celles de la forme intermédiaire. Les erreurs indiquées sont issues de triplicats de simulation. N.S: non significatif.

Bien que l'algorithme TM apparaisse insensible à cette hétérogénéité, les résultats obtenus à partir des méthodes PA et EHSS suggèrent une différence de CCS significative entre conformations ouvertes (-0.8 et -0.9%), fermées (-1.1%) et conformations intermédiaires. Ces différences, d'ordre de grandeur similaire à celles calculées entre les structures (QR2)₂, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ (Tableau 5b), affectent la pertinence de telles comparaisons. Cette hétérogénéité limite ainsi l'exploitation des données cristallographiques au sein de cette étude, et pourrait en partie expliquer la discordance relevée entre CCSs mesurées (IM-MS) et calculées (cristallographie). Néanmoins, ces travaux confirment la complémentarité des approches de haute et basse résolution pour la détection de changements conformationnels globaux et locaux.

En conclusion, les différences de CCS subtiles mesurées entre les complexes (QR2)₂, (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ par criblage IM-MS, démontrent un impact conformationnel distinct en fonction de la nature du cofacteur. Néanmoins, l'origine de ces différences reste à discuter, l'intégration des données de cristallographie, dichroïsme circulaire, SAXS et IM-MS disponibles soulevant une réponse contradictoire entre « simple » effet de masse et réarrangements structuraux distincts induits (Antoine M., communication personnelle).

3.2.2. Etude de la stabilité des conformations par IM-MS native (approches CIU).

Afin de compléter les données de criblage IM-MS présentées et pallier au manque de résolution conformationnelle, une étude alternative et complémentaire, basée sur la stabilité conformationnelle induite par ces cofacteurs, a été réalisée. Cette approche, sensible à la contribution des interactions non-covalentes inter- et intra-moléculaires au sein des complexes, permet d'étudier plus particulièrement l'impact d'un ligand à l'échelle des structures tertiaires [45, 62]. L'analyse IM-MS des ions (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ 13⁺ soumis à des énergies internes croissantes, permet ici une comparaison de leur empreinte de déploiement ou « Collision Induced Unfolding » (CIU, Fig.50). Le suivi des distributions de temps de dérive (ATDs) de ces ions à différentes énergies de collision Trap (cellule située en amont de la cellule IM du Synapt G2), révèle un profil de déploiement similaire. A 20V (Fig.50a), l'identification de 2 profils gaussiens distincts confirme l'existence de 2 conformations homogènes associées à chaque cofacteur. L'augmentation de cette énergie s'accompagne d'un élargissement et déplacement des ATDs vers des temps de dérive plus élevés (Fig.50b, 50V), jusqu'à l'obtention de 2 nouveaux profils gaussiens distincts (Fig.50c, 80V), confirmant une extension conformationnelle de ces ions. Une représentation 3D normalisée des ATDs obtenus pour chaque ion entre 5 et 100V (Fig.50d-e) permet de mieux discerner les zones de transitions

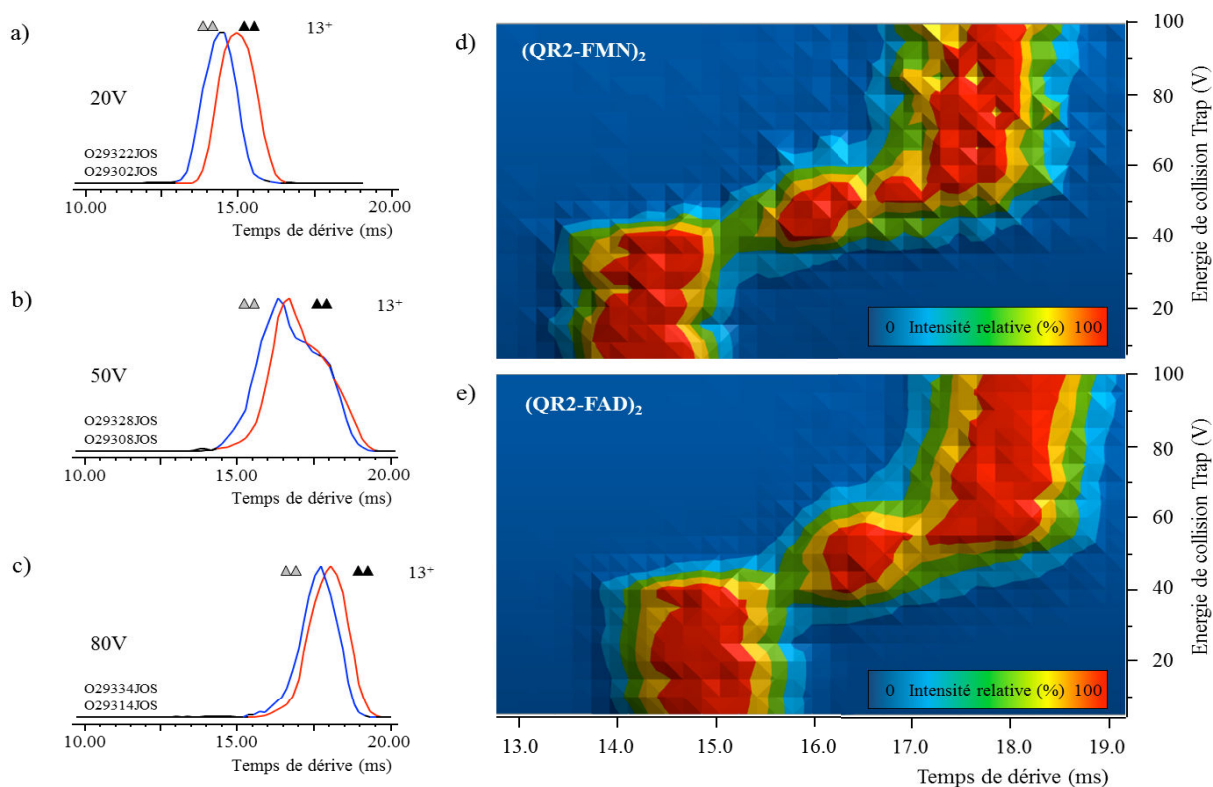


Figure 50: Criblage de la stabilité conformationnelle des complexes (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂ par IM-MS (V_c : 100V, P_i : 7mbar). (a-c) Les distributions de temps de dérive (ATDs) associées aux ions 13⁺ des complexes (QR2-FMN)₂ (bleu) et (QR2-FAD)₂ (rouge) sont extraites à des énergies de collision Trap croissantes de a) 20, b) 50 et c) 80V. (d-e) Une représentation 3D des ATDs obtenus entre 5 à 100V, est proposée pour les ions 13⁺ associés à d) (QR2-FMN)₂ et e) (QR2-FAD)₂.

conformationnelles. La comparaison de ces 2 empreintes révèle tout d'abord la stabilité structurale des complexes (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂, la détection d'un signal ATD jusqu'à 100V confirmant la survie des espèces non-covalentes 13⁺ à ces énergies. De façon similaire, ces espèces transitent d'une conformation compacte ($t_D \approx 14-15$ ms), observée de 5 à 40V, à une conformation étendue ($t_D \approx 17.5-18.5$ ms) persistant de 60 à 100V. Afin de vérifier l'existence d'intermédiaires conformationnels spécifiques aux cofacteurs, une attention particulière est portée sur la gamme d'énergie 40V-60V, concentrant les événements de transition conformationnelle. A nouveau, les profils comparés se révèlent identiques, chacun des complexes semblant transiter par un intermédiaire conformationnel analogue ($t_D \approx 16.5$ ms). En conclusion, l'interprétation qualitative des empreintes CIU ne suggère aucune différence de stabilité conformationnelle induite entre les cofacteurs FMN et FAD. Ces résultats, également rapportés lors de l'analyse CIU des ions 12⁺ et 14⁺, nécessiteraient néanmoins d'être confirmés:

- A des pas d'énergie Trap plus faibles dans la zone de transition conformationnelle.
- Par une comparaison quantitative de ces empreintes, des outils informatiques dédiés à cette approche ayant été récemment développés [64, 225].

3.3. Etude des complexes QR2-FAD-ligand par MS native et IM-MS.

Les fonctions pro-oxydantes et mélatoninergiques attribuées à QR2, nécessitent une compréhension fine des mécanismes de régulation de cette enzyme. Un criblage enzymatique avancé du complexe QR2-FAD a ainsi démontré une modulation et inhibition respective de l'activité par les composés mélatonine ($IC_{50} \approx \mu M$) et resvératrol ($IC_{50} \approx nM$), 2 ligands naturels retrouvés *in vivo* [196, 211]. Afin de mieux comprendre la relation structure-fonction associée à ces ligands, un criblage structural et conformationnel des complexes QR2-FAD-mélatonine / resvératrol par MS native et IM-MS native est ici rapporté.

3.3.1. Etude structurale des complexes QR2-FAD-mélatonine / resvératrol par MS native.

Une comparaison des propriétés de « binding » entre ces 2 ligands est tout d'abord présentée. Ce criblage structural permet une détermination de la stœchiométrie d'interaction et de la stabilité en phase en gazeuse des complexes QR2-FAD-mélatonine / resvératrol formés.

3.3.1.1. Détermination des stœchiométries d'interaction.

Afin de confirmer la stœchiométrie d'interaction entre ces espèces, un titrage individuel des complexes $(QR2-FAD)_2$ préformés ($5\mu M$) en présence d'un excès de ligand ($20\mu M$), est analysé par MS native (Fig.51).

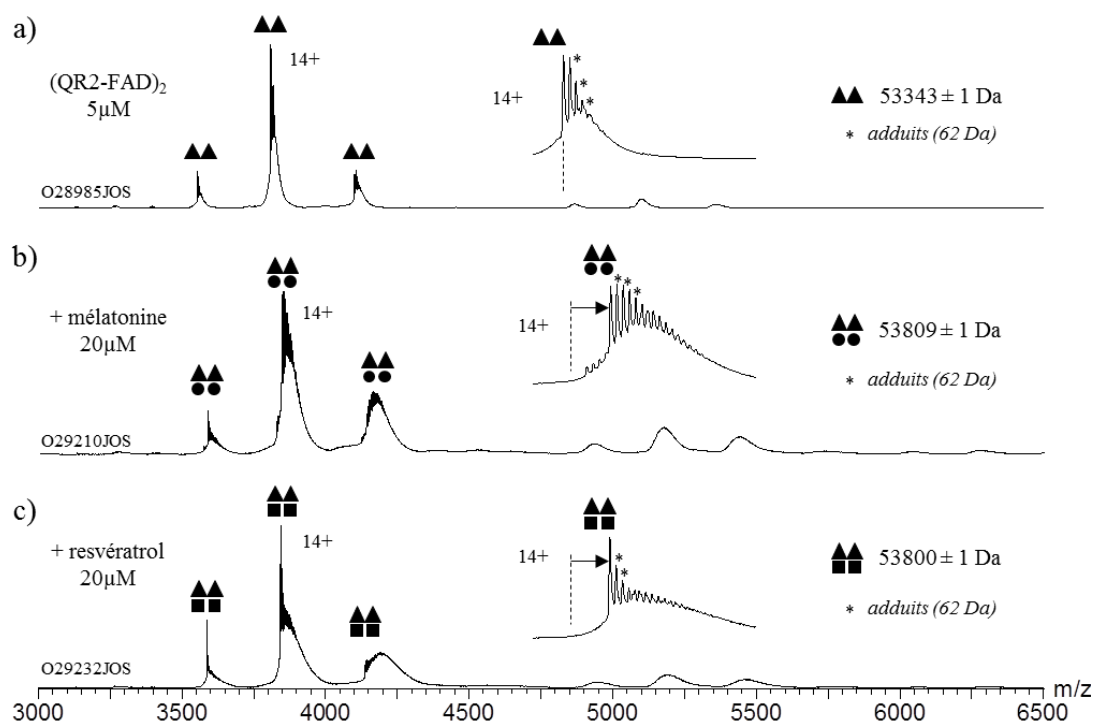


Figure 51: Caractérisation des complexes formés entre le dimère $(QR2-FAD)_2$ et ses ligands par MS native. L'analyse du complexe préformé $(QR2-FAD)_2$ (a) seul ($5\mu M$) et (b-c) titré par un excès ($20\mu M$) de (b) mélatonine et (c) resvératrol en conditions natives ($AcNH_4$ 200mM pH 7.5, $V_c = 40V$, $P_i = 8mbar$), permet l'identification d'une stœchiométrie d'interaction 2:2 entre $(QR2-FAD)_2$ (▲▲) et ses ligands mélatonine (●●) et resvératrol (■).

Le spectre de masse obtenu en l'absence de ligand (Fig.51a) confirme une saturation en FAD du dimère QR2 (53345 Da), seule une espèce de 53343 ± 1 Da étant détectée. Le titrage de cette espèce par un excès de mélatonine (Fig.51b) ou de resvératrol (Fig.51c) s'accompagne d'un déplacement total de l'équilibre vers la formation de complexes de 53809 ± 1 Da et 53800 ± 1 Da, associés à la fixation de 2 molécules de mélatonine (53810 Da) ou de resvératrol (53801 Da). Cette stœchiométrie unique confirme la spécificité d'interaction de ces ligands, se fixant à raison de 2 copies par dimère $(QR2-FAD)_2$, en accord avec la littérature [207]. La persistance de nombreux adduits (62 Da) s'explique ici par une désolvatation partielle des ions à une tension de cône de 40V (inhérente à la préservation de ces complexes en phase gazeuse) et par la présence de sels non volatils dans les tampons de stockage des ligands.

3.3.1.2. Détermination de la stabilité des complexes en phase gazeuse.

La mise en évidence de la formation de complexes $(QR2-FAD-mélatonine)_2$ et $(QR2-FAD-resvératrol)_2$ interroge sur la nature des interactions non-covalentes mises en jeu entre ces ligands et l'enzyme. Dans ce contexte, une étude de la stabilité de ces complexes en phase gazeuse est ici décrite (Fig.52).

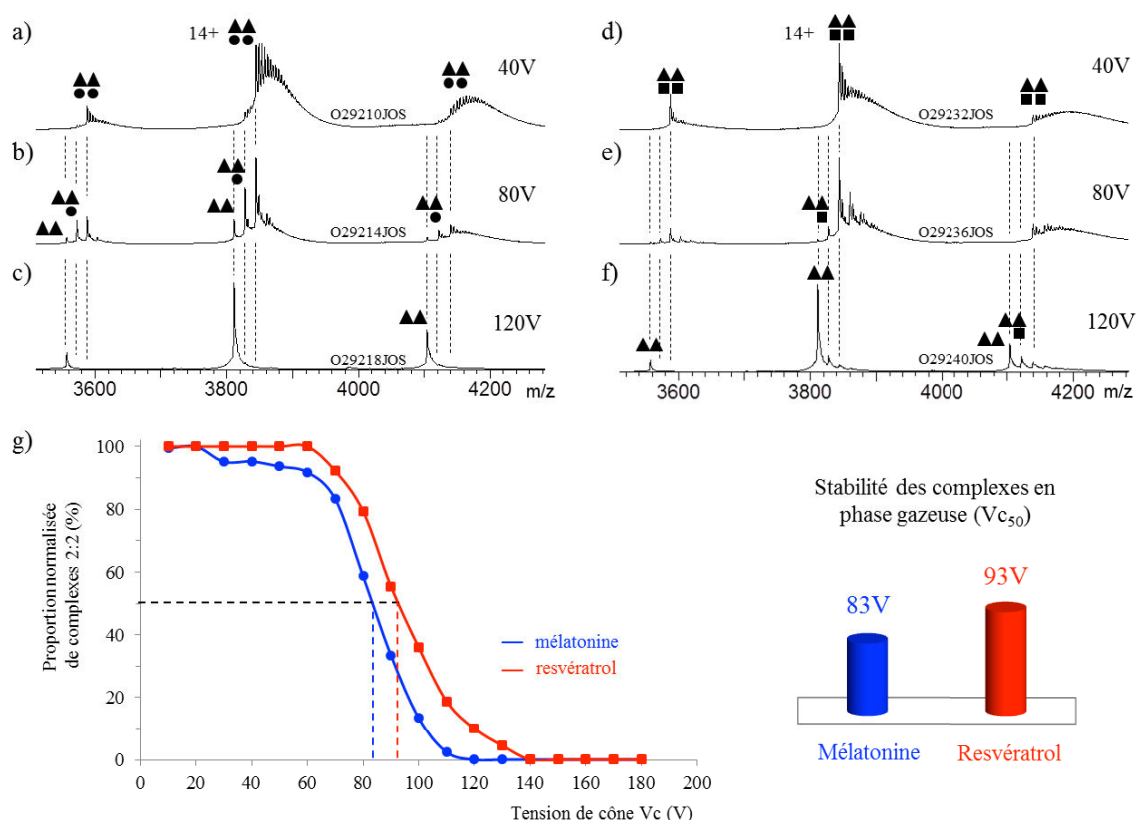


Figure 52: Détermination de la stabilité des complexes QR2-ligand en phase gazeuse (Pi : 8mbar). (a-f) L'analyse des complexes (a-c) $(QR2-FAD-mélatonine)_2$ et (d-f) $(QR2-FAD-resvératrol)_2$ par MS native à des tensions de cône de (a,d) 40, (b,e) 80 et (c,f) 120V permet de suivre la dissociation de ces complexes en phase gazeuse. (g) Une quantification relative de ces espèces en fonction de la tension de cône permet une détermination de leur valeur de V_{c50} .

Les complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂ précédemment formés ont ainsi été analysés par MS native à différentes tensions de cône (Fig.52a-f). Ces complexes, majoritaires à une tension de 40V (Fig.52a,d), subissent une dissociation en source progressive, responsable de l'apparition d'espèces QR2-FAD:ligand de stœchiométrie 2:1 et 2:0 à 80 (Fig.52b,e) et 120V (Fig.52c,f). Une quantification relative des complexes 2:2, basée sur l'intensité des états de charge 15, 14 et 13⁺, est ainsi réalisée pour chaque ligand à différentes tensions d'accélération (Fig.52g). Les profils de dissociation obtenus mettent en évidence une différence de stabilité en phase gazeuse entre les complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂. En effet, la tension d'accélération nécessaire à la dissociation de 50% de ces complexes (V_{c50}), s'avère plus élevée en présence de resvératrol (93V) que de mélatonine (83V). Ces résultats, suggérant un réseau d'interactions polaires plus marqué entre l'enzyme et le resvératrol, corroborent les données cristallographiques et thermodynamiques disponibles sur ces complexes [74, 75]. Bien que se fixant parallèlement au FAD dans la même cavité hydrophobe, la capacité de remplissage de cette poche par le resvératrol favorise l'établissement de liaisons hydrogènes supplémentaires [75]. *A contrario*, la stabilisation de la mélatonine s'effectue principalement par effet hydrophobe, se traduisant par une contribution entropique accrue [74] et une plus faible stabilité en phase gazeuse que le resvératrol.

3.3.2. Etude conformationnelle des complexes QR2-FAD-mélatonine / resvératrol par IM-MS.

Les données obtenues par MS native permettent une classification des ligands mélatonine et resvératrol selon la stabilité de leurs complexes en phase gazeuse. Ces différences, reliées à la nature des interactions non-covalentes mises en jeu, pourraient se traduire par l'adoption de conformations globales distinctes et / ou de stabilité variable entre ces complexes. Afin de vérifier cette hypothèse, un criblage conformationnel des complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂ a été réalisé par IM-MS.

3.3.2.1. Etude des conformations natives QR2-FAD-ligand par IM-MS native.

La mise en évidence d'une distribution de charge identique entre ces complexes par MS native (Fig.51) a permis de focaliser l'optimisation de la méthode IM-MS sur l'état de charge natif 14⁺ majoritaire, par analogie aux expériences présentées sur les complexes QR2-cofacteur. Néanmoins, la différence d'affinité entre ces ligands et l'hétérogénéité spectrale (adduits) liée au maintien de leurs complexes en phase gazeuse, n'ont pas permis une analyse concomitante de ces espèces en mélange. Dans ce contexte, une analyse IM-MS fine des mélanges individuelles (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂ a été réalisée (Fig.53). Les distributions des temps de dérives associées aux ions 14⁺ de ces complexes apparaissent

confondues, suggérant une conformation globale identique entre ces espèces (Fig.53a). En effet, les ions 14^+ associés aux complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ partagent un temps de dérive (14.94 ± 0.00 et 14.88 ± 0.10 ms) et une section efficace (3381 ± 1 et $3378 \pm 4 \text{ \AA}^2$) similaires (Fig.53b). Cette absence de séparation conformationnelle est observée quel que soit l'état de charge étudié, comme en témoignent les valeurs de t_D (12.76 ± 0.00 ms) et ${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ ($3517 \pm 0 \text{ \AA}^2$) mesurées à partir de cette méthode sur les espèces 15^+ .

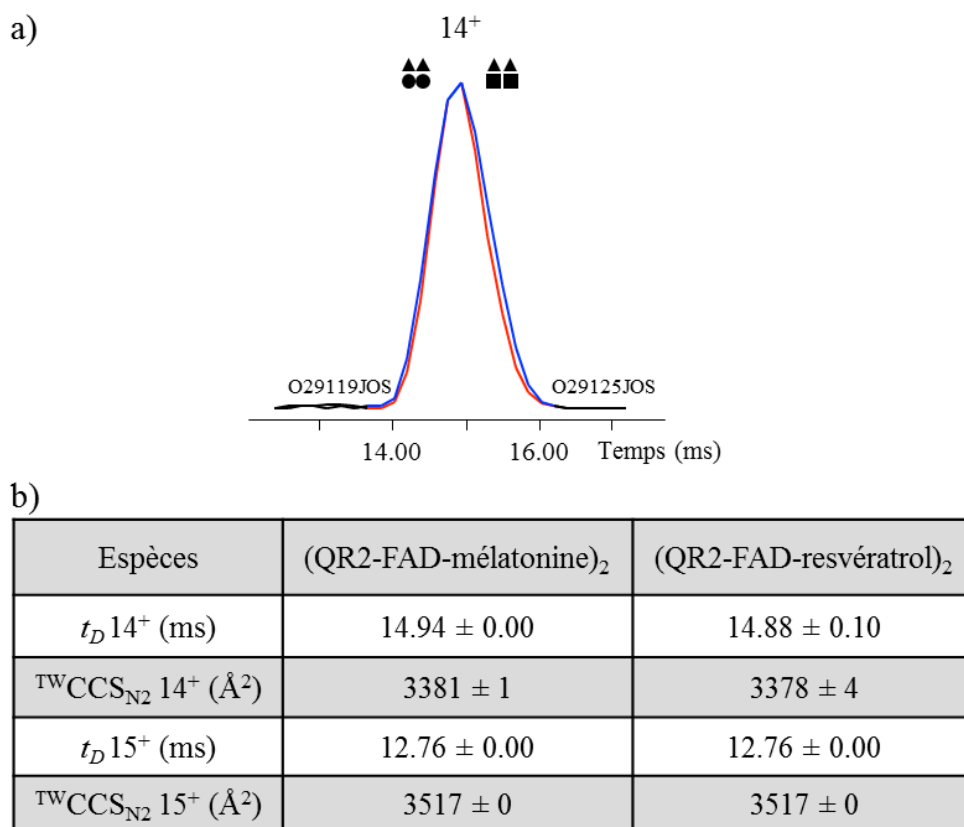


Figure 53 : Criblage conformationnel des complexes formés entre le dimère $(\text{QR2-FAD})_2$ et ses ligands mélatonine et resvératrol par IM-MS ($V_c = 40\text{V}$, $P_i = 8\text{ mbar}$). a) Représentation de la distribution des temps de dérive (ATDs) normalisée des complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ (bleu) et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ (rouge) à l'état de charge 14^+ . b) Représentation des temps de dérive (t_D) et sections efficaces (${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$) moyens mesurés pour les états de charge 14 et 15^+ de ces espèces. Les erreurs de temps de dérive et de sections efficaces sont respectivement issues de triplicats d'acquisition (sprays identiques) et d'étalonnage (étalons utilisés : β -lactoglobuline, transthyrétine, avidine).

Afin de compléter ces données expérimentales, une comparaison des CCSs théoriques calculées à partir de la structure cristallographique des complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ (PDB : 2QX4 et 1SG0) est ici illustrée (Tableau 7). L'absence d'atomes manquants au sein de ces structures (3788 atomes totaux), permet ici une comparaison non biaisée de l'influence de ces ligands [74, 75].

	Méthode	(QR2-FAD-mélatonine) ₂ (PDB: 2QX4)	(QR2-FAD-resvératrol) ₂ (PDB: 1SG0)
CCS (Å ²)	PA	2865 ± 3	2883 ± 5
	EHSS	3746 ± 5	3779 ± 6
	TM	3769 ± 43	3785 ± 50
ΔCCS (Å ²)	PA	0	+18 (+0.6%)
	EHSS	0	+ 33 (+0.9%)
	TM	0	N.S

Tableau 7: Comparaison des CCSs théoriques associées aux structures cristallographiques des complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂. Les CCSs calculées à partir des algorithmes PA, EHSS et TM, sont comparées entre chaque complexe. Les erreurs indiquées sont issues de triplicats de simulation. NS : Non significatif.

Les CCS calculées à partir de l'algorithme de référence TM soutiennent l'existence d'une conformation globale similaire entre les complexes associés à la mélatonine (3769 ± 43 Å²) et au resvératrol (3785 ± 50 Å²). La mise en évidence de faibles différences par les algorithmes PA et EHSS (0.6 et 0.9%, respectivement) ne peut être ici considérée, au regard de l'influence des contraintes cristallographiques s'exerçant sur la boucle.

En conclusion, le criblage IM-MS présenté ne permet pas une distinction des ligands mélatonine et resvératrol sur la base des conformations globales associées à leurs complexes. Ces résultats peuvent s'expliquer :

- Par l'adoption d'une conformation globale similaire entre ces 2 complexes.
- Par l'existence de 2 conformères distincts, partageant néanmoins la même ^{TW}CCS_{N2} globale.

3.3.2.2. Etude de la stabilité des conformations par IM-MS native (approches CIU).

Pour tenter de répondre à cette dernière question, une évaluation de la stabilité conformationnelle des complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂ a été réalisée. Ce criblage, déjà commenté dans les paragraphes précédents, constitue un moyen:

- De contourner les limites de résolution IM actuelles.
- D'étudier l'existence de différentes structures tertiaires, confondues sous une conformation globale identique mais de stabilité conformationnelle distincte [64].

Dans ce contexte, une comparaison des empreintes CIU associées aux complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂ est ici rapportée (Fig.54). La faible stabilité de ces

complexes en phase gazeuse, mise en évidence lors des expériences de V_{c50} , nécessite ici une restriction de la gamme d'énergie Trap explorée (5-31V), permettant leur suivi conformationnel pré-dissociation. La comparaison des ATDs extraits de ces complexes à l'état de charge 14^+ , démontre une superposition de ces distributions, faiblement impactées par l'application d'énergie croissante (Fig.54a-c). La comparaison des empreintes CIU associées confirme la stabilité conformationnelle des complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ dans la gamme d'énergie étudiée (Fig.54d-e). En effet, une distribution conformationnelle unique ($t_D \approx 10.5$ ms) est retrouvée, quelle que soit l'énergie appliquée et la nature du ligand. Ces résultats, corroborés par l'analyse CIU des ions 13^+ et 15^+ , suggère l'adoption d'une conformation globale similaire entre complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ à l'origine d'une stabilité conformationnelle identique.

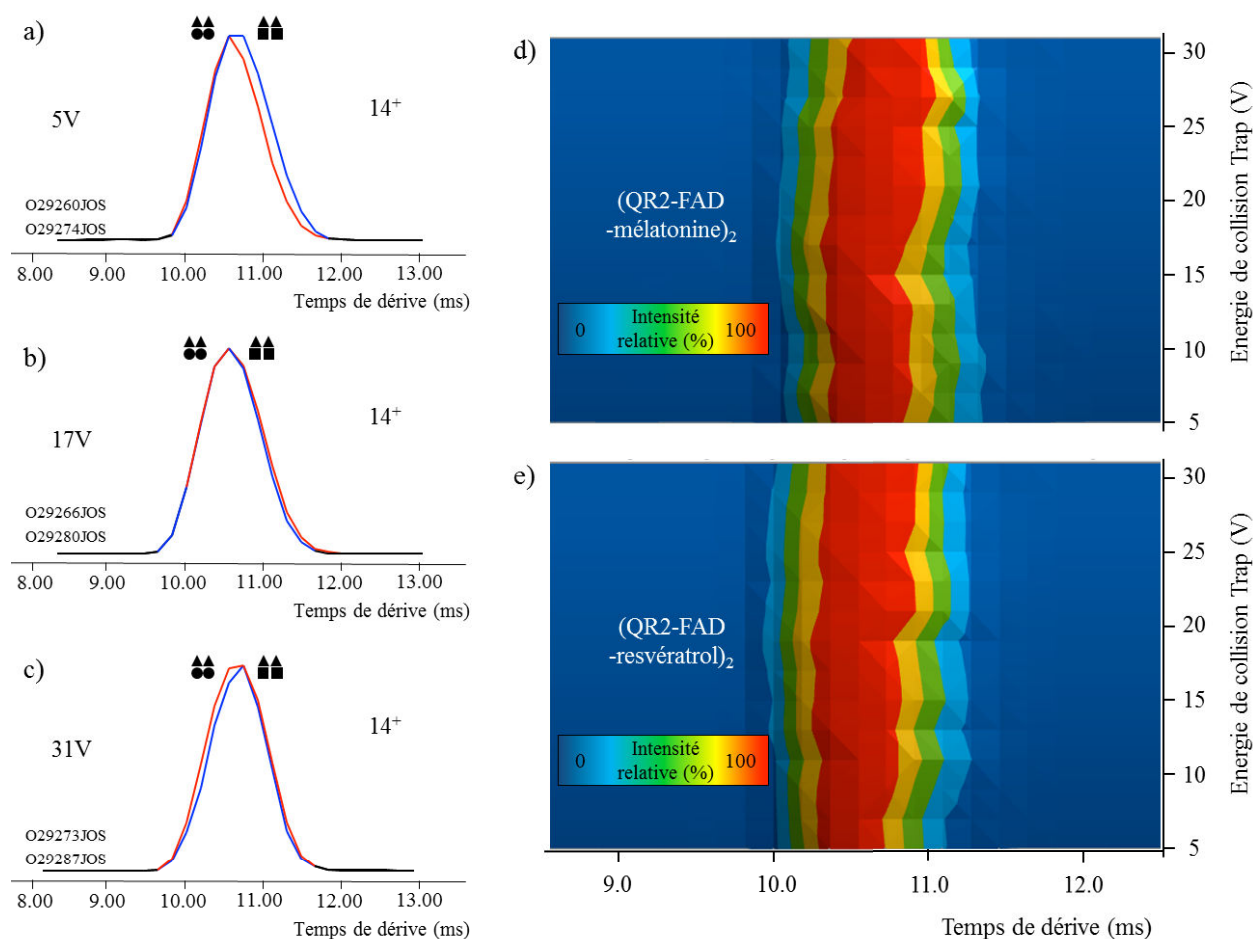


Figure 54: Criblage de la stabilité conformationnelle des complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ par IM-MS ($V_c : 40\text{V}$, $P_i : 8\text{mbar}$). (a-c) Les distributions de temps de dérive (ATDs) associées aux ions 14^+ des complexes $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ (bleu) et $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$ (rouge) sont extraites à des énergies de collision Trap croissantes de a) 5, b) 17 et c) 31V. (d-e) Une représentation 3D de l'ensemble des ATDs obtenus entre 5 à 31V, est proposée pour les ions 14^+ associés à d) $(\text{QR2-FAD-mélatonine})_2$ et e) $(\text{QR2-FAD-resvératrol})_2$.

4. Conclusions.

L'étude du système QR2 par MS native et IM-MS native a permis de compléter les informations structurales et enzymatiques disponibles sur cette cible thérapeutique. Le criblage structural et conformationnel des complexes formés entre l'enzyme QR2, ses cofacteurs (FMN, FAD), certains ligands (mélatonine, resvératrol) et son homologue QR1 a permis de démontrer:

- Une faible dynamique d'échange intra (QR2 / QR2) et inter-monomère (QR1 / QR2).
- L'existence de faibles changements conformationnels (Δ CCS) induits par le recrutement des cofacteurs FMN (+ 1.4%) ou FAD (+ 2.4%) sur le dimère QR2 apo. L'interprétation de ces différences par comparaison des CCSs expérimentales (IM-MS) et calculées (cristallographiques) a permis de souligner l'influence de contraintes cristallographiques, impactant les valeurs de CCS calculées et limitant l'exploitabilité de ces structures dans l'étude de changements conformationnels aussi subtils. La mise en évidence d'une stabilité conformationnelle similaire entre complexes (QR2-FMN)₂ et (QR2-FAD)₂, dont les ^{TW}CCS_{N2} mesurées s'assimilent aux CCS prédites par leurs masses, pourrait expliquer les différences de ^{TW}CCS_{N2} mesurées entre cofacteurs par un simple effet de masse. Néanmoins, la mise en évidence d'une fixation de ces molécules dans une cavité (cristallographie) et d'une proportion de structures secondaires différente en présence de ces 2 molécules (dichroïsme circulaire) réfute cette hypothèse, nécessitant une étude approfondie de cet impact.
- Une stabilité en phase gazeuse différente entre les complexes (QR2-FAD)₂ associés à l'inhibiteur resvératrol ou au modulateur mélatonine, en accord avec la nature des interactions non-covalentes établies par ces molécules [74, 75]. La mise en évidence d'une conformation globale similaire, de stabilité identique entre complexes (QR2-FAD-mélatonine)₂ et (QR2-FAD-resvératrol)₂ est corroborée par les CCSs calculées à partir des structures cristallographiques. Ces résultats soutiennent un mode de fixation identique entre ces ligands, dont l'efficacité ne dépend que de l'occupation du site de fixation, soit du réseau d'interaction non-covalent mis en jeu et criblé par MS native (Vc₅₀).

Conclusion de cette partie

Les développements méthodologiques appliqués à l'étude de systèmes protéine-ligand soulignent le potentiel de la MS native couplée à l'IM-MS dans l'analyse structurale et conformationnelle de ces assemblages. L'identification des propriétés de « binding » d'une large gamme de molécules (cofacteurs, cosubstrats, substrats) a tout d'abord permis une meilleure compréhension des mécanismes enzymatiques catalysés. Par ailleurs, l'automatisation et robustesse de cette interface s'est avérée particulièrement adaptée au criblage d'inhibiteurs thérapeutiques. L'application de cet outil au système Tgt a ainsi révélé l'existence de différentes classes d'efficacité de ligands parmi les 12 molécules étudiées, complétant les données structurales disponibles sur ces complexes. Par ailleurs, ces travaux ont illustré le potentiel dynamique de cette technique, permettant un suivi cinétique de la formation et du déplacement de complexes protéine-ligand sur une échelle de temps compatible (minute).

Le développement majeur associé à ce travail de thèse consiste en l'intégration de la mobilité ionique pour la caractérisation conformationnelle de ligands. Une optimisation instrumentale fine des paramètres de la cellule IM a pour la première fois permis de détecter de subtils changements conformationnels inférieurs à 1% de CCS. Le criblage des complexes PDF1B:inhibiteur par MS native et IM-MS native a ainsi permis de relier l'existence de 2 classes d'affinité de ligand à l'existence de 2 types de changements conformationnels induits, pouvant être suivis en temps réel. En plus d'une étude des conformations natives, ces travaux ont contribué à la mise en place d'un criblage complémentaire, basé sur la stabilité de ces conformations en phase gazeuse. Les informations ainsi extraites de l'analyse des conformations QR2:FAD:ligand accréditent l'existence d'un mode de fixation unique pour ces molécules, en accord avec la cristallographie. L'orthogonalité de cette approche de basse résolution, aux techniques biophysiques actuelles (cristallographie, RMN), fait de l'IM-MS un outil de criblage alternatif et prometteur.

Malgré ce potentiel, l'extraction et l'interprétation des données IM-MS demeurent manuelles, limitant le débit analytique. Le développement récent d'outils bioinformatiques spécifiques devrait contribuer à l'essor du couplage IM-MS comme technique de criblage à haut débit dans l'industrie pharmaceutique [225-227]. Par ailleurs, la résolution instrumentale $R_{IM} (t_D/\Delta t_D)$ des cellules TWIMS actuellement disponibles ($R_{IM} \approx 40$) limite la détection aisée et en routine de subtiles différences conformationnelles ($\Delta CCS < 5\%$) par IM-MS native [60, 71, 94, 228-230].

Parmi les stratégies de contournement de cet écueil, l'introduction de nouveaux instruments équipés de cellules de mobilité ionique plus résolutive [123, 231] et le criblage alternatif des complexes en fonction de leur stabilité conformationnelle en phase gazeuse (approches CIU) apparaissent prometteurs [45, 63, 64]. Néanmoins, cette dernière approche requiert que l'activation CIU des complexes s'effectue à travers l'adoption d'états conformationnels intermédiaires, jusqu'à leur dissociation. La satisfaction de ce prérequis, inhérent à la contribution des interactions non-covalentes intra- et inter-moléculaires au sein des complexes, dépend donc du système étudié. Cette stratégie ne peut ainsi être extrapolée à l'ensemble des complexes protéine-ligand, comme en témoignent les profils CIU obtenus sur les systèmes PDF1B:ligand et QR2:FAD:ligand présentés au cours de ces travaux. D'autre part, le criblage de ligands par approche CIU, implique l'adoption d'états conformationnels intermédiaires et distincts entre leurs complexes associés. Le potentiel de cette approche repose donc sur une comparaison qualitative et quantitative fine entre ces empreintes, nécessitant le recours à des outils informatiques adaptés, seulement en cours de développement [225]. La mise à disposition de ces logiciels permettra une comparaison ultérieure approfondie des profils CIU générés à partir des différents complexes QR2:cofacteurs.

Références bibliographiques

1. Mullard, A., *2014 FDA drug approvals*. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(2): p. 77-81.
2. Swinney, D.C. and J. Anthony, *How were new medicines discovered?* *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011. **10**(7): p. 507-519.
3. Carr, R.A., et al., *Fragment-based lead discovery: leads by design*. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(14): p. 987-92.
4. Schiebel, J., et al., *One Question, Multiple Answers: Biochemical and Biophysical Screening Methods Retrieve Deviating Fragment Hit Lists*. *ChemMedChem*, 2015. **10**(9): p. 1511-1521.
5. Renaud, J.P. and M.A. Delsuc, *Biophysical techniques for ligand screening and drug design*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009. **9**(5): p. 622-628.
6. Hopkins, A.L., et al., *The role of ligand efficiency metrics in drug discovery*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014. **13**(2): p. 105-121.
7. Keetch, C.A., et al., *Use of a microchip device coupled with mass spectrometry for ligand screening of a multi-protein target*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(18): p. 4937-41.
8. Zhang, S., C.K. Van Pelt, and D.B. Wilson, *Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(13): p. 3010-8.
9. Maple, H.J., et al., *Automated Protein-Ligand Interaction Screening by Mass Spectrometry*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012. **55**(2): p. 837-851.
10. Swayze, E.E., et al., *SAR by MS: a ligand based technique for drug lead discovery against structured RNA targets*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002. **45**(18): p. 3816-9.
11. Hofstadler, S.A. and K.A. Sannes-Lowery, *Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(7): p. 585-95.
12. Hannah, V.V., et al., *Native MS: an 'ESI' way to support structure- and fragment-based drug discovery*. *Future Medicinal Chemistry*, 2010. **2**(1): p. 35-50.
13. Ginnari-Satriani, L., et al., *A hydrophilic three side-chained triazatruxene as a new strong and selective G-quadruplex ligand*. *Org Biomol Chem*, 2009. **7**(12): p. 2513-6.
14. Mazzitelli, C.L., et al., *Evaluation of metal-mediated DNA binding of benzoxazole ligands by electrospray ionization mass spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008. **19**(2): p. 209-18.
15. Rosu, F., et al., *Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2006. **253**(3): p. 156-171.
16. Collie, G., et al., *Selectivity in small molecule binding to human telomeric RNA and DNA quadruplexes*. *Chem Commun (Camb)*, 2009(48): p. 7482-4.
17. Cui, X., et al., *Investigation of non-covalent interaction of natural flexible cyclic molecules with telomeric RNA G-quadruplexes by electrospray ionization mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012. **26**(16): p. 1803-9.
18. Sannes-Lowery, K.A., R.H. Griffey, and S.A. Hofstadler, *Measuring dissociation constants of RNA and aminoglycoside antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2000. **280**(2): p. 264-71.
19. Ritschel, T., et al., *An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction*. *J Mol Biol*, 2009. **393**(4): p. 833-47.
20. Bovet, C., et al., *Estrogen receptor-ligand complexes measured by chip-based nanoelectrospray mass spectrometry: an approach for the screening of endocrine disruptors*. *Protein Science*, 2007. **16**(5): p. 938-46.
21. Potier, N., et al., *Study of non-covalent enzyme-inhibitor complexes of aldose reductase by electrospray mass spectrometry*. *Eur J Biochem*, 1997. **243**(1-2): p. 274-82.
22. Gabelica, V., et al., *Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2003. **38**(5): p. 491-501.
23. Kitova, E.N., et al., *Reliable Determinations of Protein-Ligand Interactions by Direct ESI-MS Measurements. Are We There Yet?* *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2012. **23**(3): p. 431-441.

24. El-Hawiet, A., et al., *Quantifying Ligand Binding to Large Protein Complexes Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(9): p. 3867-3870.
25. Wortmann, A., et al., *Binding constant determination of high-affinity protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry and ligand competition*. J Mass Spectrom, 2008. **43**(5): p. 600-8.
26. El-Kabbani, O., et al., *Aldose and aldehyde reductases: correlation of molecular modeling and mass spectrometric studies on the binding of inhibitors to the active site*. Proteins, 2000. **41**(3): p. 407-14.
27. Cousido-Siah, A., et al., *Crystal packing modifies ligand binding affinity: the case of aldose reductase*. Proteins, 2012. **80**(11): p. 2552-61.
28. Rogniaux, H., et al., *Binding of aldose reductase inhibitors: Correlation of crystallographic and mass spectrometric studies*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(7): p. 635-647.
29. De Vriendt, K., et al., *Monitoring the zinc affinity of the metallo-beta-lactamase CphA by automated nanoESI-MS*. J Am Soc Mass Spectrom, 2006. **17**(2): p. 180-8.
30. Selevsek, N., et al., *Studies on ternary metallo-beta lactamase-inhibitor complexes using electrospray ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2006. **17**(7): p. 1000-4.
31. Potier, N., et al., *Ligand-metal ion binding to proteins: investigation by ESI mass spectrometry*. Methods Enzymol, 2005. **402**: p. 361-89.
32. Cubrilovic, D., et al., *Determination of Protein-Ligand Binding Constants of a Cooperatively Regulated Tetrameric Enzyme Using Electrospray Mass Spectrometry*. ACS Chemical Biology, 2014. **9**(1): p. 218-226.
33. Rogniaux, H., et al., *Mass spectrometry as a novel approach to probe cooperativity in multimeric enzymatic systems*. Anal Biochem, 2001. **291**(1): p. 48-61.
34. Sanglier, S., et al., *Monitoring ligand-mediated nuclear receptor-coregulator interactions by noncovalent mass spectrometry*. Eur J Biochem, 2004. **271**(23-24): p. 4958-67.
35. Marcoux, J., et al., *Mass spectrometry reveals synergistic effects of nucleotides, lipids, and drugs binding to a multidrug resistance efflux pump*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9704-9.
36. Atmanene, C., et al., *Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry*. Medical Science Monitor, 2009. **15**(7): p. Br178-Br187.
37. Lin, H., E.N. Kitova, and J.S. Klassen, *Measuring positive cooperativity using the direct ESI-MS assay. Cholera toxin B subunit homopentamer binding to GMI pentasaccharide*. J Am Soc Mass Spectrom, 2014. **25**(1): p. 104-10.
38. Barylyuk, K., et al., *What Happens to Hydrophobic Interactions during Transfer from the Solution to the Gas Phase? The Case of Electrospray-Based Soft Ionization Methods*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011. **22**(7): p. 1167-1177.
39. Cubrilovic, D., et al., *Quantifying Protein-Ligand Binding Constants using Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Systematic Binding Affinity Study of a Series of Hydrophobically Modified Trypsin Inhibitors*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(10): p. 1768-1777.
40. Sharon, M. and C.V. Robinson, *A Quantitative Perspective on Hydrophobic Interactions in the Gas-Phase*. Current Proteomics, 2011. **8**(1): p. 47-58.
41. Bucher, D., B.J. Grant, and J.A. McCammon, *Induced fit or conformational selection? The role of the semi-closed state in the maltose binding protein*. Biochemistry, 2011. **50**(48): p. 10530-9.
42. Fieulaine, S., et al., *Trapping conformational states along ligand-binding dynamics of peptide deformylase: the impact of induced fit on enzyme catalysis*. PLoS Biol, 2011. **9**(5): p. e1001066.
43. Thaimattam, R., et al., *Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(27): p. 2751-65.
44. Pacholarz, K.J., et al., *Mass spectrometry based tools to investigate protein-ligand interactions for drug discovery*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(11): p. 4335-4355.
45. Niu, S., J.N. Rabuck, and B.T. Ruotolo, *Ion mobility-mass spectrometry of intact protein-ligand complexes for pharmaceutical drug discovery and development*. Current Opinion in Chemical Biology, 2013. **17**(5): p. 809-817.
46. Heck, A.J.R., *Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology*. Nature Methods, 2008. **5**(11): p. 927-933.
47. Wytenbach, T. and M.T. Bowers, *Structural stability from solution to the gas phase: native solution structure of ubiquitin survives analysis in a solvent-free ion mobility-mass spectrometry environment*. J Phys Chem B, 2011. **115**(42): p. 12266-75.
48. Ruotolo, B.T. and C.V. Robinson, *Aspects of native proteins are retained in vacuum*. Current Opinion in Chemical Biology, 2006. **10**(5): p. 402-8.

49. Uetrecht, C., et al., *Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(5): p. 1633-1655.
50. Hyung, S.J., et al., *Insights into antiamyloidogenic properties of the green tea extract (-)-epigallocatechin-3-gallate toward metal-associated amyloid-beta species*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(10): p. 3743-3748.
51. Woods, L.A., S.E. Radford, and A.E. Ashcroft, *Advances in ion mobility spectrometry-mass spectrometry reveal key insights into amyloid assembly*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2013. **1834**(6): p. 1257-1268.
52. Young, L.M., et al., *Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(2): p. 660-70.
53. Soper, M.T., et al., *Amyloid-beta-neuropeptide interactions assessed by ion mobility-mass spectrometry*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(23): p. 8952-8961.
54. Bernstein, S.L., et al., *Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease*. Nature Chemistry, 2009. **1**(4): p. 326-31.
55. Woods, L.A., et al., *Ligand binding to distinct states diverts aggregation of an amyloid-forming protein*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(10): p. 730-9.
56. Canon, F., et al., *Folding of a Salivary Intrinsically Disordered Protein upon Binding to Tannins*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(20): p. 7847-7852.
57. Wyttenbach, T., et al., *The Effect of Calcium Ions and Peptide Ligands on the Relative Stabilities of the Calmodulin Dumbbell and Compact Structures*. Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(1): p. 437-447.
58. Nyon, M.P., et al., *An integrative approach combining ion mobility mass spectrometry, X-ray crystallography, and nuclear magnetic resonance spectroscopy to study the conformational dynamics of alpha1 -antitrypsin upon ligand binding*. Protein Science, 2015. **24**(8): p. 1301-12.
59. Atmanene, C., et al., *Combination of Noncovalent Mass Spectrometry and Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry Reveals Sugar-Induced Conformational Changes of Central Glycolytic Genes Repressor/DNA Complex*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(9): p. 3597-3605.
60. Atmanene, C., et al., *Exploring Key Parameters to Detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes Using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(11): p. 4703-4710.
61. Hilton, G.R., et al., *Structural Analysis of Prion Proteins by Means of Drift Cell and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(5): p. 845-854.
62. Hopper, J.T.S. and N.J. Oldham, *Collision Induced Unfolding of Protein Ions in the Gas Phase Studied by Ion Mobility-Mass Spectrometry: The Effect of Ligand Binding on Conformational Stability*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(10): p. 1851-1858.
63. Hyung, S.J., C.V. Robinson, and B.T. Ruotolo, *Gas-Phase Unfolding and Disassembly Reveals Stability Differences in Ligand-Bound Multiprotein Complexes*. Chemistry & Biology, 2009. **16**(4): p. 382-390.
64. Rabuck, J.N., et al., *Activation State-Selective Kinase Inhibitor Assay Based on Ion Mobility-Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(15): p. 6995-7002.
65. Loo, J.A., *Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes*. International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **200**(1-3): p. 175-186.
66. Sanglier, S., et al., *Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries*. Methods Mol Biol, 2008. **484**: p. 217-43.
67. Tahallah, N., et al., *The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001. **15**(8): p. 596-601.
68. Giles, K., et al., *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(20): p. 2401-2414.
69. He, J., et al., *Characteristics and comparison of different radiofrequency-only multipole cooling cells*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(20): p. 3327-3333.
70. Campana, J.E., *Elementary Theory of the Quadrupole Mass Filter*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1980. **33**(2): p. 101-117.
71. Zhong, Y.Y., S.J. Hyung, and B.T. Ruotolo, *Characterizing the resolution and accuracy of a second-generation traveling-wave ion mobility separator for biomolecular ions*. Analyst, 2011. **136**(17): p. 3534-3541.

72. Grix, R., et al., *A time-of-flight mass analyzer with high resolving power*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. **2**(5): p. 83-85.
73. Atmanene, C., *Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire*. 2009.
74. Calamini, B., et al., *Kinetic, thermodynamic and X-ray structural insights into the interaction of melatonin and analogues with quinone reductase 2*. Biochemical Journal, 2008. **413**: p. 81-91.
75. Buryanovskyy, L., et al., *Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol*. Biochemistry, 2004. **43**(36): p. 11417-11426.
76. Sanglier, S., *La Spectrométrie de masse: Un nouvel outil pour l'étude des interactions faibles en Biologie*. 2002, Strasbourg 1.
77. Sobott, F., et al., *The flight of macromolecular complexes in a mass spectrometer*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 2005. **363**(1827): p. 379-389.
78. Kapur, A., et al., *Use of electrospray ionization mass spectrometry to study binding interactions between a replication terminator protein and DNA*. Protein Science, 2002. **11**(1): p. 147-157.
79. Lanucara, F., et al., *The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics*. Nature Chemistry, 2014. **6**(4): p. 281-294.
80. Dobo, A. and I.A. Kaltashov, *Detection of multiple protein conformational ensembles in solution via deconvolution of charge-state distributions in ESI MS*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(20): p. 4763-4773.
81. Kaltashov, I.A. and A. Mohimen, *Estimates of protein surface areas in solution by electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(16): p. 5370-5379.
82. Grandori, R., *Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2003. **38**(1): p. 11-15.
83. Konermann, L., *A minimalist model for exploring conformational effects on the electrospray charge state distribution of proteins*. Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(23): p. 6534-6543.
84. Testa, L., S. Brocca, and R. Grandori, *Charge-Surface Correlation in Electrospray Ionization of Folded and Unfolded Proteins*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(17): p. 6459-6463.
85. Hall, Z. and C.V. Robinson, *Do Charge State Signatures Guarantee Protein Conformations?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(7): p. 1161-1168.
86. Jarrold, M.F., *Peptides and proteins in the vapor phase*. Annual Review of Physical Chemistry, 2000. **51**: p. 179-207.
87. Pagel, K., et al., *Alternate dissociation pathways identified in charge-reduced protein complex ions*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(12): p. 5363-72.
88. Sterling, H.J., et al., *Supercharging protein complexes from aqueous solution disrupts their native conformations*. J Am Soc Mass Spectrom, 2012. **23**(2): p. 191-200.
89. Lomeli, S.H., et al., *Increasing charge while preserving noncovalent protein complexes for ESI-MS*. J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(4): p. 593-6.
90. Hogan, C.J., Jr., et al., *Ion mobility-mass spectrometry of phosphorylase B ions generated with supercharging reagents but in charge-reducing buffer*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(41): p. 13476-83.
91. Saliou, J.M., et al., *Combining native MS approaches to decipher archaeal box H/ACA ribonucleoprotein particle structure and activity*. Proteomics, 2015. **15**(16): p. 2851-61.
92. Hall, Z., A. Politis, and C.V. Robinson, *Structural modeling of heteromeric protein complexes from disassembly pathways and ion mobility-mass spectrometry*. Structure, 2012. **20**(9): p. 1596-609.
93. Politis, A., et al., *Integrative modelling coupled with ion mobility mass spectrometry reveals structural features of the clamp loader in complex with single-stranded DNA binding protein*. J Mol Biol, 2013. **425**(23): p. 4790-801.
94. Stojko, J., et al., *Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes*. Analyst, 2015. **140**(21): p. 7234-7245.
95. Mason, E.A. and H.W. Schamp, *Mobility of gaseous ions in weak electric fields*. Annals of Physics, 1958. **4**(3): p. 233-270.
96. Giles, K., et al., *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(20): p. 2401-14.
97. Becard, S., *Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et en mobilité ionique pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie*. 2012, Université de Strasbourg.
98. Morsa, D., V. Gabelica, and E. De Pauw, *Fragmentation and isomerization due to field heating in traveling wave ion mobility spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2014. **25**(8): p. 1384-93.
99. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nature Protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.

100. Morsa, D., V. Gabelica, and E. De Pauw, *Effective Temperature of Ions in Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(14): p. 5775-5782.
101. Merenbloom, S.I., T.G. Flick, and E.R. Williams, *How Hot are Your Ions in TWAVE Ion Mobility Spectrometry?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(3): p. 553-562.
102. Niu, S. and B.T. Ruotolo, *Collisional unfolding of multiprotein complexes reveals cooperative stabilization upon ligand binding*. Protein Science, 2015. **24**(8): p. 1272-1281.
103. Zhong, Y.Y., L.J. Han, and B.T. Ruotolo, *Collisional and Coulombic Unfolding of Gas-Phase Proteins: High Correlation to Their Domain Structures in Solution*. Angewandte Chemie-International Edition, 2014. **53**(35): p. 9209-9212.
104. Hall, Z., et al., *Charge-State Dependent Compaction and Dissociation of Protein Complexes: Insights from Ion Mobility and Molecular Dynamics*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(7): p. 3429-3438.
105. Smith, D.P., et al., *Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies*. cell [Equation (1)], 2009. **12**(13): p. 13.
106. Cotter, R.J., *Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules*. Analytical chemistry, 1992. **64**(21): p. 1027A-1039A.
107. Bush, M.F., et al., *Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology*. Analytical chemistry, 2010. **82**(22): p. 9557-9565.
108. McNaught, A. and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of chemical terminology ("gold book")*, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML on-line corrected version created by Nic M, Jirat J, Kosata B, 1997.
109. Ahmed, A., et al., *Application of the Mason– Schamp equation and ion mobility mass spectrometry to identify structurally related compounds in crude oil*. Analytical chemistry, 2010. **83**(1): p. 77-83.
110. Eiceman, G.A., Z. Karpas, and H.H. Hill Jr, *Ion mobility spectrometry*. 2013: CRC press.
111. Mason, E.A. and E.W. McDaniel, *Transport properties of ions in gases*. NASA STI/Recon Technical Report A, 1988. **89**: p. 15174.
112. Kanu, A.B., et al., *Ion mobility–mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(1): p. 1-22.
113. Shvartsburg, A.A. and R.D. Smith, *Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry*. Analytical chemistry, 2008. **80**(24): p. 9689-9699.
114. Salbo, R., et al., *Traveling-wave ion mobility mass spectrometry of protein complexes: accurate calibrated collision cross-sections of human insulin oligomers*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012. **26**(10): p. 1181-1193.
115. Bleiholder, C., T. Wyttenbach, and M.T. Bowers, *A novel projection approximation algorithm for the fast and accurate computation of molecular collision cross sections (I). Method*. International Journal of Mass Spectrometry, 2011. **308**(1): p. 1-10.
116. Mesleh, M.F., et al., *Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(40): p. 16082-16086.
117. Shvartsburg, A.A. and M.F. Jarrold, *An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions*. Chemical Physics Letters, 1996. **261**(1-2): p. 86-91.
118. von Helden, G., et al., *Carbon cluster cations with up to 84 atoms: structures, formation mechanism, and reactivity*. The Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**(31): p. 8182-8192.
119. Jarrold, M.F., *Unfolding, refolding, and hydration of proteins in the gas phase*. Accounts of chemical research, 1999. **32**(4): p. 360-367.
120. Wyttenbach, T., et al., *A new algorithm to characterise the degree of concaveness of a molecular surface relevant in ion mobility spectrometry*. Molecular Physics, 2015(ahead-of-print): p. 1-6.
121. Bleiholder, C., et al., *A novel projection approximation algorithm for the fast and accurate computation of molecular collision cross sections (II). Model parameterization and definition of empirical shape factors for proteins*. International Journal of Mass Spectrometry, 2013. **345**: p. 89-96.
122. Marklund, E.G., et al., *Collision Cross Sections for Structural Proteomics*. Structure, 2015. **23**(4): p. 791-799.
123. D'Atri, V., et al., *Linking molecular models with ion mobility experiments. Illustration with a rigid nucleic acid structure*. Journal of Mass Spectrometry, 2015. **50**(5): p. 711-726.
124. Wright, V.E., et al., *Structural studies of metal ligand complexes by ion mobility-mass spectrometry*. International Journal for Ion Mobility Spectrometry, 2013. **16**(1): p. 61-67.
125. Pahlich, S., R.P. Zakaryan, and H. Gehring, *Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2006. **1764**(12): p. 1890-1903.

126. Yang, Y.Z. and M.T. Bedford, *Protein arginine methyltransferases and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**(1): p. 37-50.
127. Boisvert, F.M., et al., *Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing*. Journal of Cell Biology, 2002. **159**(6): p. 957-969.
128. Hou, Z.Y., et al., *The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression*. Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(10): p. 3198-3207.
129. Lee, J., et al., *PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(38): p. 32890-32896.
130. Zhao, X., et al., *Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity*. Genes & Development, 2008. **22**(5): p. 640-653.
131. Yoshimatsu, M., et al., *Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers*. Int J Cancer, 2011. **128**(3): p. 562-73.
132. Nakakido, M., et al., *PRMT6 increases cytoplasmic localization of p21CDKN1A in cancer cells through arginine methylation and makes more resistant to cytotoxic agents*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 30957-67.
133. Lakowski, T.M. and A. Frankel, *A kinetic study of human protein arginine N-methyltransferase 6 reveals a distributive mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(15): p. 10015-25.
134. Obiany, O. and P.R. Thompson, *Kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6)*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(8): p. 6062-71.
135. Schapira, M. and R.F. de Freitas, *Structural biology and chemistry of protein arginine methyltransferases*. MedChemComm, 2014. **5**(12): p. 1779-1788.
136. Thomas, D., et al., *Forster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization*. Protein Science, 2010. **19**(11): p. 2141-51.
137. Troffer-Charlier, N., et al., *Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains*. EMBO J, 2007. **26**(20): p. 4391-401.
138. Singhroy, D.N., et al., *Automethylation of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) regulates its stability and its anti-HIV-1 activity*. Retrovirology, 2013. **10**.
139. Frankel, A., et al., *The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(5): p. 3537-3543.
140. Zhang, X. and X.D. Cheng, *Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides*. Structure, 2003. **11**(5): p. 509-520.
141. Sansonetti, P.J., *Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks*. Fems Microbiology Reviews, 2001. **25**(1): p. 3-14.
142. Marteyn, B., A. Gazi, and P. Sansonetti, *Shigella: a model of virulence regulation in vivo*. Gut Microbes, 2012. **3**(2): p. 104-20.
143. Niyogi, S.K., *Shigellosis*. J Microbiol, 2005. **43**(2): p. 133-43.
144. Levine, M.M., et al., *Clinical trials of Shigella vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(7): p. 540-53.
145. Zhang, W., et al., *Wide dissemination of multidrug-resistant Shigella isolates in China*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(11): p. 2527-35.
146. Klebe, G., *Structure-Based Drug Design to Perturb Function of a tRNA-Modifying Enzyme by Active Site and Protein-Protein Interface Inhibition*, in *Multifaceted Roles of Crystallography in Modern Drug Discovery*. 2015, Springer. p. 209-221.
147. McCarty, R.M. and V. Bandarian, *Biosynthesis of pyrrolopyrimidines*. Bioorganic Chemistry, 2012. **43**: p. 15-25.
148. Durand, J.M.B., et al., *Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of Shigella flexneri: the expression of the virF gene*. Molecular Microbiology, 2000. **35**(4): p. 924-935.
149. Stengl, B., et al., *Crystal structures of tRNA-guanine transglycosylase (TGT) in complex with novel and potent inhibitors unravel pronounced induced-fit adaptations and suggest dimer formation upon substrate binding*. Journal of Molecular Biology, 2007. **370**(3): p. 492-511.
150. Xie, W., X.J. Liu, and R.H. Huang, *Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate*. Nature Structural Biology, 2003. **10**(10): p. 781-788.

151. Ritschel, T., et al., *An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction*. Journal of Molecular Biology, 2009. **393**(4): p. 833-847.
152. Biela, I., et al., *Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine, the Substrate of Its Eucaryotic Counterpart, as Inhibitor*. PLoS One, 2013. **8**(5).
153. Stengl, B., K. Reuter, and G. Klebe, *Mechanism and substrate specificity of tRNA-guanine transglycosylases (TGTs): tRNA-modifying enzymes from the three different kingdoms of life share a common catalytic mechanism*. ChemBiochem, 2005. **6**(11): p. 1926-1939.
154. Brenk, R., et al., *Flexible adaptations in the structure of the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase and their implications for substrate selectivity, reaction mechanism and structure-based drug design*. ChemBiochem, 2003. **4**(10): p. 1066-1077.
155. Boland, C., et al., *Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(27): p. 18218-27.
156. Chen, Y.C., et al., *Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: confirmation of the heterodimeric subunit structure*. RNA, 2010. **16**(5): p. 958-68.
157. Jakobi, S., et al., *What Glues a Homodimer Together: Systematic Analysis of the Stabilizing Effect of an Aromatic Hot Spot in the Protein-Protein Interface of the tRNA-Modifying Enzyme Tgt*. ACS Chemical Biology, 2015. **10**(8): p. 1897-1907.
158. Jakobi, S., et al., *Hot-spot analysis to dissect the functional protein-protein interface of a tRNA-modifying enzyme*. Proteins, 2014. **82**(10): p. 2713-32.
159. Immekus, F., et al., *Launching spiking ligands into a protein-protein interface: a promising strategy to destabilize and break interface formation in a tRNA modifying enzyme*. ACS Chemical Biology, 2013. **8**(6): p. 1163-78.
160. Barandun, L.J., et al., *Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended lin-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)*. Chemistry-a European Journal, 2015. **21**(1): p. 126-135.
161. Marcoux, J., et al., *Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate*. Protein Science, 2015. **24**(8): p. 1210-1223.
162. Mehmood, S., et al., *Charge Reduction Stabilizes Intact Membrane Protein Complexes for Mass Spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(49): p. 17010-17012.
163. Catalina, M.I., et al., *Decharging of globular proteins and protein complexes in electrospray*. Chemistry-a European Journal, 2005. **11**(3): p. 960-968.
164. Kloniecki, M., et al., *Ion Mobility Separation Coupled with MS Detects Two Structural States of Alzheimer's Disease A beta 1-40 Peptide Oligomers*. Journal of Molecular Biology, 2011. **407**(1): p. 110-124.
165. Sivalingam, G.N., et al., *Amphitrite: A program for processing travelling wave ion mobility mass spectrometry data*. International Journal of Mass Spectrometry, 2013. **345**: p. 54-62.
166. Muneeruddin, K., et al., *Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(21): p. 10692-10699.
167. Meinnel, T., *Developing a rational strategy for new antibacterial agents*. Pathologie-biologie, 1999. **47**(8): p. 780.
168. Chopra, I., et al., *Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(2): p. 133-9.
169. Rice, L.B., *Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria*. Cleve Clin J Med, 2007. **74 Suppl 4**: p. S12-20.
170. Giglione, C., M. Pierre, and T. Meinnel, *Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents*. Molecular Microbiology, 2000. **36**(6): p. 1197-205.
171. Leeds, J.A. and C.R. Dean, *Peptide deformylase as an antibacterial target: a critical assessment*. Current Opinion in Pharmacology, 2006. **6**(5): p. 445-452.
172. Giglione, C., A. Boularot, and T. Meinnel, *Protein N-terminal methionine excision*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(12): p. 1455-74.
173. Giglione, C., O. Vallon, and T. Meinnel, *Control of protein life-span by N-terminal methionine excision*. EMBO J, 2003. **22**(1): p. 13-23.
174. Ragusa, S., S. Blanquet, and T. Meinnel, *Control of peptide deformylase activity by metal cations*. Journal of Molecular Biology, 1998. **280**(3): p. 515-523.
175. Li, X. and Y.H. Chang, *Amino-terminal protein processing in Saccharomyces cerevisiae is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(26): p. 12357-12361.

176. Mazel, D., S. Pochet, and P. Marliere, *Genetic-Characterization of Polypeptide Deformylase, a Distinctive Enzyme of Eubacterial Translation*. Embo Journal, 1994. **13**(4): p. 914-923.
177. Fieulaine, S., et al., *The crystal structure of mitochondrial (type 1A) peptide deformylase provides clear guidelines for the design of inhibitors specific for the bacterial forms*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(51): p. 42315-42324.
178. Giglione, C., S. Fieulaine, and T. Meinnel, *Cotranslational processing mechanisms: towards a dynamic 3D model*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(8): p. 417-26.
179. Boularot, A., et al., *Structure-activity relationship analysis and therapeutic potential of peptide deformylase inhibitors*. Curr Opin Investig Drugs, 2004. **5**(8): p. 809-22.
180. Chen, D.Z., et al., *Actinonin, a naturally occurring antibacterial agent, is a potent deformylase inhibitor*. Biochemistry, 2000. **39**(6): p. 1256-1262.
181. Grujic, M. and M. Renko, *Aminopeptidase inhibitors bestatin and actinonin inhibit cell proliferation of myeloma cells predominantly by intracellular interactions*. Cancer Letters, 2002. **182**(2): p. 113-119.
182. Boularot, A., et al., *Discovery and refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**(1): p. 10-20.
183. Blot, S., *Limiting the attributable mortality of nosocomial infection and multidrug resistance in intensive care units*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(1): p. 5-13.
184. Vandijck, D.M., et al., *Dynamics of C-reactive protein and white blood cell count in critically ill patients with nosocomial Gram positive vs. Gram negative bacteremia: a historical cohort study*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 106.
185. Vandijck, D.M., S.I. Blot, and J.I. Poelaert, *Microbiologically documented nosocomial infections after coronary artery bypass surgery without cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **133**(2): p. 590-1; author reply 591.
186. Serero, A., C. Giglione, and T. Meinnel, *Distinctive features of the two classes of eukaryotic peptide deformylases*. J Mol Biol, 2001. **314**(4): p. 695-708.
187. Guilloteau, J.P., et al., *The crystal structures of four peptide deformylases bound to the antibiotic actinonin reveal two distinct types: a platform for the structure-based design of antibacterial agents*. J Mol Biol, 2002. **320**(5): p. 951-62.
188. Organization, W.H., *Dementia: a public health priority*. 2012: World Health Organization.
189. Nunan, J. and D.H. Small, *Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases*. FEBS Lett, 2000. **483**(1): p. 6-10.
190. Miranda, S., et al., *The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease*. Prog Neurobiol, 2000. **62**(6): p. 633-48.
191. Hartigan, J.A. and G.V. Johnson, *Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(30): p. 21395-401.
192. Hwang, O., *Role of oxidative stress in Parkinson's disease*. Exp Neurobiol, 2013. **22**(1): p. 11-7.
193. Bolton, J.L., et al., *Role of quinones in toxicology*. Chemical Research in Toxicology, 2000. **13**(3): p. 135-160.
194. Bianchet, M.A., S.B. Erdemli, and L.M. Amzel, *Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases*. Vitam Horm, 2008. **78**: p. 63-84.
195. Talalay, P., et al., *Chemoprotection against cancer by Phase 2 enzyme induction*. Toxicology Letters, 1995. **82-3**: p. 173-179.
196. Vella, F., et al., *NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries*. Biochem Pharmacol, 2005. **71**(1-2): p. 1-12.
197. Long, D.J., 2nd and A.K. Jaiswal, *NRH:quinone oxidoreductase2 (NQO2)*. Chem Biol Interact, 2000. **129**(1-2): p. 99-112.
198. Wu, K.B., et al., *Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997. **347**(2): p. 221-228.
199. Ross, D., *Quinone reductases multitasking in the metabolic world*. Drug Metabolism Reviews, 2004. **36**(3-4): p. 639-54.
200. Chomarat, P., et al., *Cellular knock-down of quinone reductase 2: a laborious road to successful inhibition by RNA interference*. Biochimie, 2007. **89**(10): p. 1264-75.
201. Long, D.J., et al., *Disruption of dihydronicotinamide riboside : quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(48): p. 46131-46139.

202. Wang, W., et al., *Association of NRH:quinone oxidoreductase 2 gene promoter polymorphism with higher gene expression and increased susceptibility to Parkinson's disease*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008. **63**(2): p. 127-34.
203. Hashimoto, T. and M. Nakai, *Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease*. Neuroscience Letters, 2011. **502**(1): p. 10-12.
204. Benoit, C.E., et al., *Loss of Quinone Reductase 2 Function Selectively Facilitates Learning Behaviors*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(38): p. 12690-12700.
205. Nosjean, O., et al., *Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(40): p. 31311-31317.
206. Nosjean, O., et al., *Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(11): p. 1369-79.
207. Antoine, M., et al., *Characterization of cofactors, substrates and inhibitor binding to flavoenzyme quinone reductase 2 by automated supramolecular nano-electrospray ionization mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2012. **312**: p. 87-96.
208. Cassagnes, L.E., et al., *In cellulo monitoring of quinone reductase activity and reactive oxygen species production during the redox cycling of 1,2 and 1,4 quinones*. Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 126-134.
209. Reybier, K., et al., *Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2*. Free Radical Research, 2011. **45**(10): p. 1184-1195.
210. Boutin, J.A., et al., *Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology*. Chemico-Biological Interactions, 2005. **151**(3): p. 213-228.
211. Ferry, G., et al., *Old and new inhibitors of quinone reductase 2*. Chemico-Biological Interactions, 2010. **186**(2): p. 103-109.
212. Li, R.B., et al., *The 3-Dimensional Structure of Nad(P)H-Quinone Reductase, a Flavoprotein Involved in Cancer Chemoprotection and Chemotherapy - Mechanism of the 2-Electron Reduction (Vol 92, Pg 8846, 1995)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(23): p. 10815-10815.
213. Foster, C.E., et al., *Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein*. Biochemistry, 1999. **38**(31): p. 9881-9886.
214. Leung, K.K., D.W. Litchfield, and B.H. Shilton, *Flavin adenine dinucleotide content of quinone reductase 2: analysis and optimization for structure-function studies*. Anal Biochem, 2012. **420**(1): p. 84-9.
215. Formentini, L., F. Moroni, and A. Chiarugi, *Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) in vitro and in vivo*. Biochemical Pharmacology, 2009. **77**(10): p. 1612-1620.
216. Boutin, J.A., et al., *MT3/QR2 melatonin binding site does not use melatonin as a substrate or a co-substrate*. Journal of Pineal Research, 2008. **45**(4): p. 524-531.
217. Mailliet, F., et al., *Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH : quinone oxidoreductase 2 enzyme*. Biochemical Pharmacology, 2005. **71**(1-2): p. 74-88.
218. Jaiswal, A.K., et al., *Nucleotide and Deduced Amino-Acid-Sequence of a Human Cdna (Nqo2) Corresponding to a 2nd Member of the Nad(P)H - Quinone Oxidoreductase Gene Family - Extensive Polymorphism at the Nqo2 Gene Locus on Chromosome-6*. Biochemistry, 1990. **29**(7): p. 1899-1906.
219. Jockers, R., et al., *Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?* Br J Pharmacol, 2008. **154**(6): p. 1182-95.
220. Powers, H.J., *Riboflavin (vitamin B-2) and health*. American Journal of Clinical Nutrition, 2003. **77**(6): p. 1352-1360.
221. Bush, M.F., et al., *Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(22): p. 9557-65.
222. Ruotolo, B.T., et al., *Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1658-1661.
223. Shvartsburg, A.A., et al., *Structural elucidation of fullerene dimers by high-resolution ion mobility measurements and trajectory calculation simulations*. Journal of Physical Chemistry A, 1997. **101**(9): p. 1684-1688.
224. Uetrecht, C., et al., *Interrogating viral capsid assembly with ion mobility-mass spectrometry*. Nature Chemistry, 2011. **3**(2): p. 126-132.
225. Eschweiler, J.D., et al., *CIUSuite: A Quantitative Analysis Package for Collision Induced Unfolding Measurements of Gas-phase Protein Ions*. Analytical Chemistry, 2015.
226. Marty, M.T., et al., *Bayesian Deconvolution of Mass and Ion Mobility Spectra: From Binary Interactions to Polydisperse Ensembles*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(8): p. 4370-4376.

227. Marklund, E.G., et al., *Collision Cross Sections for Structural Proteomics*. Structure, 2015. **23**(4): p. 791-799.
228. Lermyte, F., et al., *Native Mass Spectrometry Approaches Using Ion Mobility-Mass Spectrometry*. Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry, 2015: p. 81-108.
229. Li, H., et al., *Resolving structural isomers of monosaccharide methyl glycosides using drift tube and traveling wave ion mobility mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(7): p. 3231-3239.
230. Shvartsburg, A.A., et al., *Separation of peptide isomers with variant modified sites by high-resolution differential ion mobility spectrometry*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(19): p. 8327-8334.
231. Kurulugama, R., K. Imatani, and L. Taylor, *The Agilent Ion Mobility Q-TOF Mass Spectrometer System*.

Partie 4 : Intégration de données de MS native et IM-MS native pour la caractérisation structurale de complexes multi-protéiques de hautes masses

Cette partie porte sur la caractérisation structurale de complexes multi-protéiques de hauts poids moléculaires (> 300 kDa) par MS et IM-MS en conditions natives. Une description préalable de l'état de l'art de cette discipline et des objectifs de ces travaux est tout d'abord rapportée. L'optimisation instrumentale nécessaire à l'analyse de ces édifices sur un Q-TOF de type Synapt G2 HDMS (Waters) sera décrite puis appliquée à l'étude d'un système multi-protéique d'intérêt biologique : le complexe entier CF IA, impliqué dans la maturation des ARN messagers, dont l'assemblage et l'architecture demeurent inconnus.

Introduction : Etat de l'art et objectifs.

Chapitre 1 : Optimisations instrumentales en IM-MS native pour l'analyse de complexes de hautes masses.

Chapitre 2 : Caractérisation structurale d'un complexe multi-protéique de haut poids moléculaire par MS native et IM-MS native : le système CF IA.

Introduction : état de l'art et objectifs.

La plupart des voies de régulation cellulaire (transcription, traduction) repose sur une modulation fine et réversible de processus biologiques, rendue possible par l'intégration de nombreux partenaires au sein de machineries moléculaires complexes de hautes masses (plusieurs centaines à plusieurs millions de kDa) [1-6]. L'altération de ces réseaux au sein de nombreuses pathologies nécessite une connaissance structurale approfondie de leurs constituants (protéines, acides nucléiques, ligands) et de leur mode d'assemblage [7-10]. Dans ce contexte, la cristallographie (RX), la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore la cryomicroscopie électronique (cryo-EM) s'imposent comme des techniques biophysiques de référence, permettant l'obtention d'informations structurales uniques et complémentaires à l'échelle atomique [11-15]. Néanmoins, la nature hétérogène et dynamique de certains édifices, combinée à leur taille, leur hétérogénéité (présence de modifications post-traductionnelles, etc.), leur difficulté de purification et leur relative instabilité, peuvent constituer un frein à l'application de telles approches.

1. De l'intégration des données de MS structurale vers la proposition de modèles structuraux.

La diversité d'information accessible par MS structurale (partie 1) constitue une alternative analytique prometteuse pour l'élucidation topologique des complexes les plus réfractaires [16, 17]. Bien qu'aucune méthode individuelle ne puisse apporter une réponse structurale complète, la combinaison de ces approches hybrides accroît considérablement la quantité d'information extraite de ces analyses [18-22]. Néanmoins, ces techniques présentent une résolution spatiale relativement restreinte, limitant l'interprétation tridimensionnelle des données obtenues. L'intégration de ces données à la modélisation structurale constitue un moyen de contournement de cet écueil [17, 23]. Le développement d'outils informatiques dédiés à ces applications [24-26] permet une conversion des données de MS structurale sous forme de contraintes spatiales, guidant la modélisation des complexes analysés. Une illustration de ce processus de modélisation est ici présentée (Fig.1).

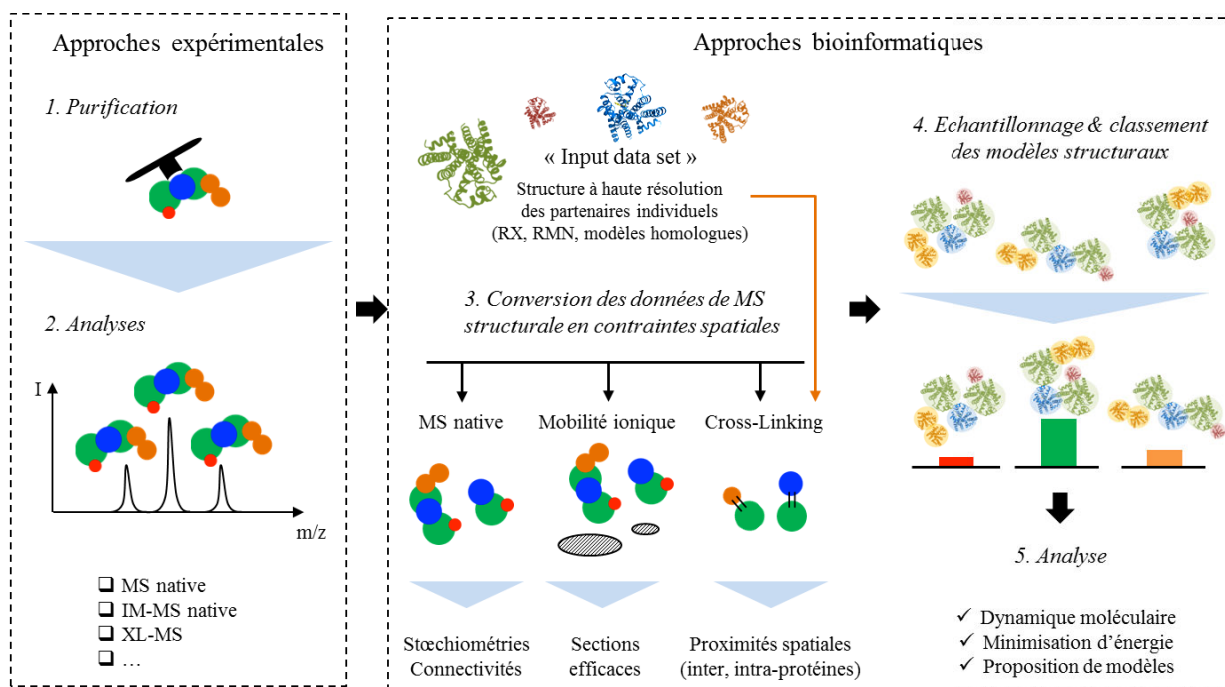


Figure 1 : Présentation du processus de modélisation d'assemblages protéiques à partir de données de MS structurale, d'après [23]. Les données expérimentales générées par MS structurale sont converties sous forme de contraintes spatiales, puis injectées au sein de l'algorithme de modélisation. La disposition de structures de haute résolution sur les partenaires protéiques individuels (RX, RMN, modèles homologues) sert d'ébauche à la modélisation de ces complexes. Les modèles structuraux ainsi générés sont imputés d'un score, reflétant le degré de satisfaction de ces contraintes. Les modèles associés aux meilleurs scores, sont affinés par dynamique moléculaire puis relaxés par minimisation d'énergie.

La disposition de structures à haute résolution sur les partenaires individuels sert généralement de point de départ à cette approche [17, 23]. En leur absence, il est néanmoins possible d'assigner chaque sous-unité à une représentation géométrique (sphère, polyèdre), définie à partir de données expérimentales de plus basse résolution [27-29]. La nature de ces données (résolution, information structurale complète, partielle), issues de la cristallographie, de la RMN, de la cryo-microscopie électronique, du SAXS, de l'IM-MS native ou encore de modèles homologues, conditionne la pertinence des modèles générés [23]. Ces sous-unités « input » sont assemblées *in silico*, par intégration des données de MS structurale. Les informations expérimentales obtenues à l'échelle des complexes et sous-complexes (stœchiométries, sections efficaces, connectivités, proximités spatiales, interfaces d'interaction) sont en effet encodées sous forme de contraintes, puis injectées au sein de l'algorithme de modélisation [17, 27, 30, 31]. La satisfaction de ces contraintes est évaluée par l'assignation d'un score à l'ensemble des modèles échantillonnés, permettant leur classement. Les modèles candidats de score élevé sont ainsi retenus, puis affinés par dynamique moléculaire et minimisation énergétique [23]. Cette approche intégrative permet la proposition de modèles structuraux pseudo-atomiques dans l'étude d'assemblages essentiels, tels que la porine membranaire OmpA [32], le complexe d'initiation traductionnelle eIF3:eIF5 [33] ou l'ADN polymérase III [34].

2. Objectifs des travaux.

L'objectif de ce travail de thèse porte sur le développement d'approches en MS structurale combinant 2 méthodes: la MS native et l'IM-MS native. L'application de ces techniques à l'étude de complexes multi-protéiques de hauts poids moléculaires, nécessite une optimisation instrumentale rigoureuse dans chacune des dimensions étudiées. Ces développements méthodologiques, indispensables à l'obtention d'informations structurales pertinentes, sont ici présentés à travers la caractérisation d'un complexe de haute masse (350 kDa) constitué de 4 partenaires : le complexe entier CF IA, indispensable à la maturation 3' de l'ARN pré-messager de levure et réfractaire aux principales techniques biophysiques.

Chapitre 1 : Optimisations instrumentales en IM-MS native pour l'analyse de complexes de hautes masses.

La caractérisation de (sous-)complexes intacts par MS et IM-MS native nécessite une préservation structurale et conformationnelle des espèces depuis leur ionisation en solution jusqu'à leur détection en phase gazeuse [35]. Cependant, la désolvatation, transmission et séparation conformationnelle des ions associés, doit être suffisamment importante pour assurer une résolution en IM (partie 3) et en MS (partie 2 et 3) optimale sur ces espèces [36, 37]. Ceci nécessite une optimisation instrumentale rigoureuse, décrite en partie 3 et pouvant être ici extrapolée à l'analyse de ces assemblages de hauts poids moléculaires.

Néanmoins, l'analyse concomitante de complexes et sous-complexes en mélange se traduit par une distribution de m/z , d'états de charge et de ${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ élargie (Fig.2) [38, 39]. Contrairement aux complexes protéine:ligand (Fig.2a), les distributions d'états de charge observées entre différents complexes protéine:protéine ne permettent généralement plus de disposer d'états de charge identiques entre ces derniers (Fig.2b). Dès lors, la comparaison conformationnelle entre ces espèces ne peut plus se limiter à la seule interprétation du temps de dérive t_D (partie 3) mais nécessite une détermination expérimentale des ${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ [40].

Ce chapitre décrit l'influence de l'étalonnage de la cellule TWIMS, sur la justesse des ${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ mesurées en présence de mélanges de complexes de hauts poids moléculaires. Cette justesse est ici évaluée en présence d'étalons protéiques natifs, dont les CCSs de référence mesurées en hélium sur « Drift Tube » ou DTIMS (${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{He}}$), peuvent être comparées aux CCSs mesurées sur TWIMS (${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$).

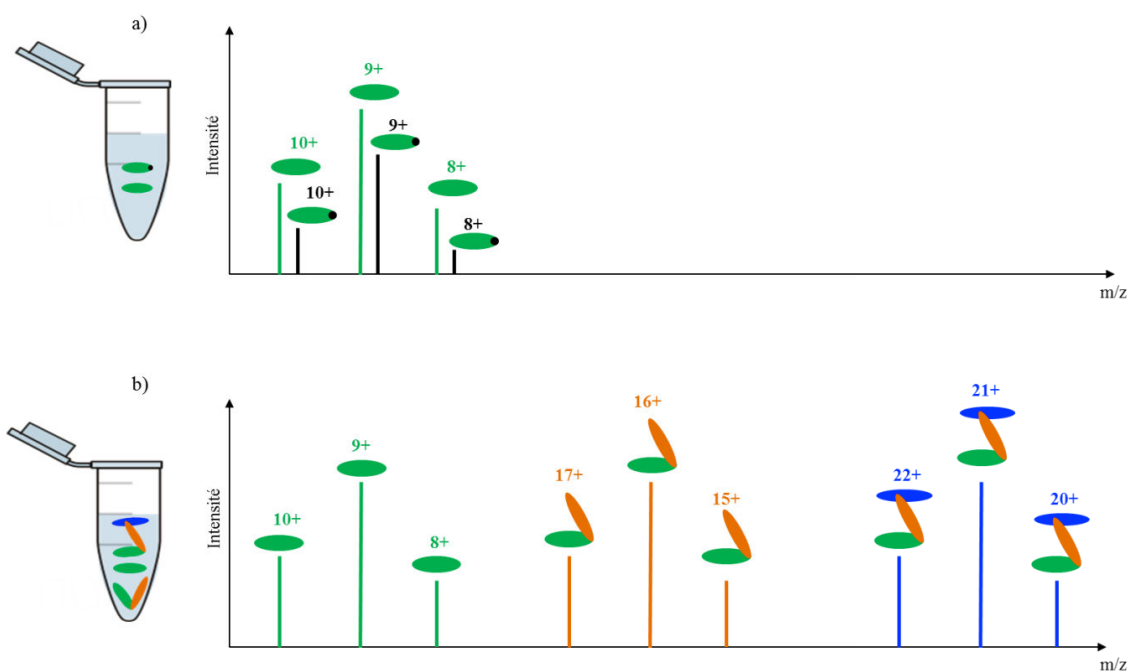


Figure 2 : Illustration de la distribution d'états de charge entre a) complexes protéine:ligand et b) complexes protéine:protéine, analysés en mélange. Généralement, la fixation d'une petite molécule (noir) sur une protéine (vert) ne modifie pas la distribution d'états de charge de cette dernière. En revanche, la fixation de protéines (orange et bleu), disposant de leurs propres sites de protonation (résidus basiques), s'accompagne d'une modification de cette distribution.

1. Influence du choix des étalons sur la justesse des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées en présence de complexes de hauts poids moléculaires.

L'étalonnage de la cellule TWIMS à partir de protéines dénaturées apparaît particulièrement inadapté pour l'étude IM-MS de protéines natives, biaisant les valeurs de $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées et soulignant l'importance du choix des étalons [41-43]. La mise à disposition d'étalons protéiques natifs (caractérisés par DTIMS) se révèle indispensable à la détermination de $^{TW}CCS_{N_2}$ plus justes par IM-MS native, permettant un meilleur encadrement des ions analytes en termes de masse, charge (z) et section efficace (Ω) [41, 44, 45]. Bien que la plupart des données DTIMS disponibles proviennent de mesures en hélium, la mobilité réduite des ions étalons natifs dans ce gaz (K_0He) et dans l'azote (K_0N_2) se révèle linéaire, permettant leur exploitation lors d'analyses TWIMS réalisées en azote [41]. Les $^{TW}CCS_{N_2}$ ainsi mesurées sont assimilables à des valeurs obtenues en hélium, facilitant leur comparaison aux CCSs simulées dans ce même gaz à partir de logiciels dédiés [46-50]. La détermination de $^{TW}CCS_{N_2}$ pertinentes sur des complexes non-covalents de masses, charges et sections efficaces hétérogènes, a longtemps souffert du nombre restreint d'étalons protéiques natifs disponibles [37, 44, 51, 52]. L'enrichissement de cette liste permet aujourd'hui de disposer d'étalons natifs recouvrant une gamme de masse (2.8 à 801 kDa), charge (3^+ à 72^+) et section efficace (5.81 à 207 nm^2) élargie [41, 53]. Néanmoins, l'analyse de complexes et sous-complexes protéiques en

mélange par IM-MS native soulève de nouvelles questions : « quelle(s) espèce(s) doit(vent) être encadré(es) par les étalons ? Combien d'étalons doivent-êtré utilisés ? Quel est l'impact du choix des étalons sur la justesse de $^{TW}CCS_{S_{N_2}}$ mesurées à partir d'espèces non encadrées ? ». La réponse à ces questions réside dans le caractère extrapolable d'un étalonnage TWIMS. Afin d'évaluer cette flexibilité, une analyse d'étalons protéiques natifs en mélange est réalisée par IM-MS sur le Synapt G2. Le recours à ces étalons permet une comparaison entre :

- Leurs $^{DT}CCS_{S_{He}}$ « de référence », déterminées par DTIMS [41].
- Leurs $^{TW}CCS_{S_{N_2}}$ mesurées par TWIMS, à partir de différents droites d'étalonnage (partie 3, chapitre 2, équation 12).

Ces mélanges se présentent sous la forme de 3 familles (I, II, III), composées de 2 à 3 étalons en mélange (5 μ M) analysés simultanément par IM-MS native (Fig.3). La force ionique et le pH du tampon (AcNH₄ 200mM, pH 7.5) sont identiques à ceux ayant permis la caractérisation de ces étalons par DTIMS [41]. Le nombre restreint d'étalons par mélange est ici optimisé afin de limiter la compétition à l'ionisation entre ces espèces [54], facilitant la détection de l'ensemble de leurs ions. La composition de ces familles est quant à elle définie de manière à pouvoir caractériser l'ensemble des ions étalons à partir d'une même et unique méthode IM-MS (partie 3). Pour cela, les étalons sont choisis consécutivement selon leur ordre d'apparition dans la liste des étalons disponibles [41]. Ce regroupement permet de limiter l'hétérogénéité de section efficace (Ω) et de charge (z) entre ions au sein d'une même famille, facilitant leur « élution » au sein d'un même cycle IM [42]. Parallèlement, chacune des 3 méthodes IM-MS appliquée à chaque famille, est optimisée de manière à préserver la conformation native des ions étalons, tout en permettant leur « élution » au sein d'un même cycle IM (partie 3). La faible résolution conformationnelle de ces méthodes est ici indispensable à l'étude d'une large gamme de conformations au sein d'une même analyse IM-MS (partie 3). L'optimisation de ces 3 familles de mélange et de leurs méthodes IM-MS associées, mime ainsi une analyse de complexes et sous-complexes protéiques en mélange par IM-MS native.

L'analyse individuelle de ces 3 familles de mélange par IM-MS native permet une extraction des ATDs et des temps de dérive t_D ' associés aux ions :

- des étalons cytochrome c et β -lactoglobuline (Fig.4a, famille I).
- des étalons β -lactoglobuline et avidine (Fig.4b, famille II).
- des étalons sérum albumine bovine, concanavaleine A et alcool déshydrogénase (Fig.4c, famille III).

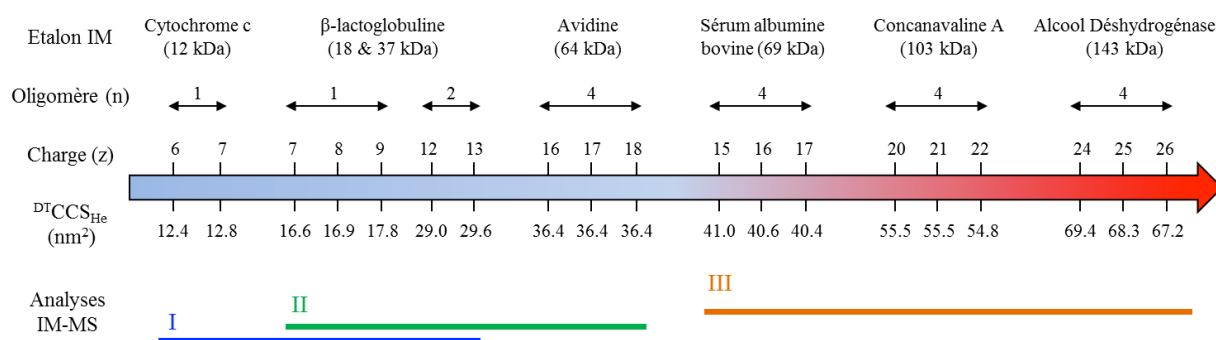


Figure 3 : Présentation des étalons protéiques natifs analysés en mélange par IM-MS sur le Synapt G2. Ces étalons, recouvrant une large gamme de masse, de charge (z) et de section efficace ($^{DT}CCS_{He}$) ont été préalablement caractérisés par DTIMS dans des conditions biochimiques identiques (AcNH₄ 200mM pH7.5) [41]. Le regroupement de ces protéines en 3 familles de mélange (I, II, III) permet une comparaison de leurs $^{DT}CCS_{He}$ « de référence » aux $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées à partir de différentes droites d'étalonnage, au sein de la même acquisition.

La $^{DT}CCS_{He}$ de chacun de ces ions étant connue (Fig.3) [41], il devient possible de générer différentes droites d'étalonnage au sein d'une même acquisition, par combinaison des étalons pris en compte (équation 12). La comparaison des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées à partir de ces différentes droites d'étalonnage aux $^{DT}CCS_{He}$ attendues, permet d'évaluer l'influence du choix des étalons sur la justesse des mesures TWIMS (Fig.4d-f). Les résultats obtenus mettent en évidence une faible capacité d'extrapolation des droites d'étalonnage en dehors de leur gamme de recouvrement. En effet, l'application de droites d'étalonnage ne s'appuyant que sur un seul étalon, comme le cytochrome c (Fig.4d), l'avidine (Fig.4e) ou la sérum albumine bovine (Fig.4f), se traduit par une justesse remarquable des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées sur leurs propres ions (déviations inférieures à 0, 0.5 et 0.4 % par rapport aux $^{DT}CCS_{He}$ attendues, respectivement). Cependant, ces mêmes étalonnages s'accompagnent de $^{TW}CCS_{N_2}$ beaucoup plus approximatives sur les espèces non encadrées, telles que la β-lactoglobuline (Fig.4d, jusqu'à 20.4 % de déviation sur l'état de charge 12⁺), la β-lactoglobuline (Fig.4e, déviations > 17.3 %) et l'alcool déshydrogénase (Fig.4f, déviations > 56.6 %). L'intégration de l'ensemble des étalons au sein des droites d'étalonnage permet de niveler ces justesses au sein de chaque famille de mélange. Bien que les facteurs de corrélation R² associés aux droites d'étalonnage « cytochrome c + β-lactoglobuline » (Fig.4d), «β-lactoglobuline + avidine » (Fig.4e) et « sérum albumine bovine + concanavale A + alcool déshydrogénase » (Fig.4f) puissent être significativement réduits (0.93, 0.04 et 0.52, respectivement), la justesse des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées sur les étalons au sein de ces mélanges se trouve optimisée (Fig.4d-f, déviations maximales < 5.3, 10.3 et 7.2 %, respectivement). En conclusion, le choix des étalons pour l'analyse de complexes et sous-complexes protéiques en mélange par IM-MS native, dépend de l'hétérogénéité de ces échantillons (masse, charge, section efficace) et de la justesse des $^{TW}CCS_{N_2}$ recherchée sur chaque espèce. L'application d'un étalonnage restreint, recouvrant

une gamme étroite de masse, charge et section efficace, permettra une mesure de $^{TW}CCS_{N_2}$ très juste au sein de cette fenêtre, mais rapidement biaisée au-delà de ces limites. *A contrario*, l'application d'un étalonnage étendu, recouvrant une large gamme de masse, charge et section efficace, s'accompagnera d'une justesse moins importante mais beaucoup plus homogène sur l'ensemble des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées. Une alternative à ce compromis consiste à caractériser individuellement chacune des espèces en mélange à l'aide d'une méthode IM-MS dédiée. Cette stratégie, permettant d'étendre la résolution conformationnelle au sein de la fenêtre étudiée [29], se révèle néanmoins beaucoup plus chronophage, multipliant le temps d'optimisation instrumentale et le nombre d'étalonnages.

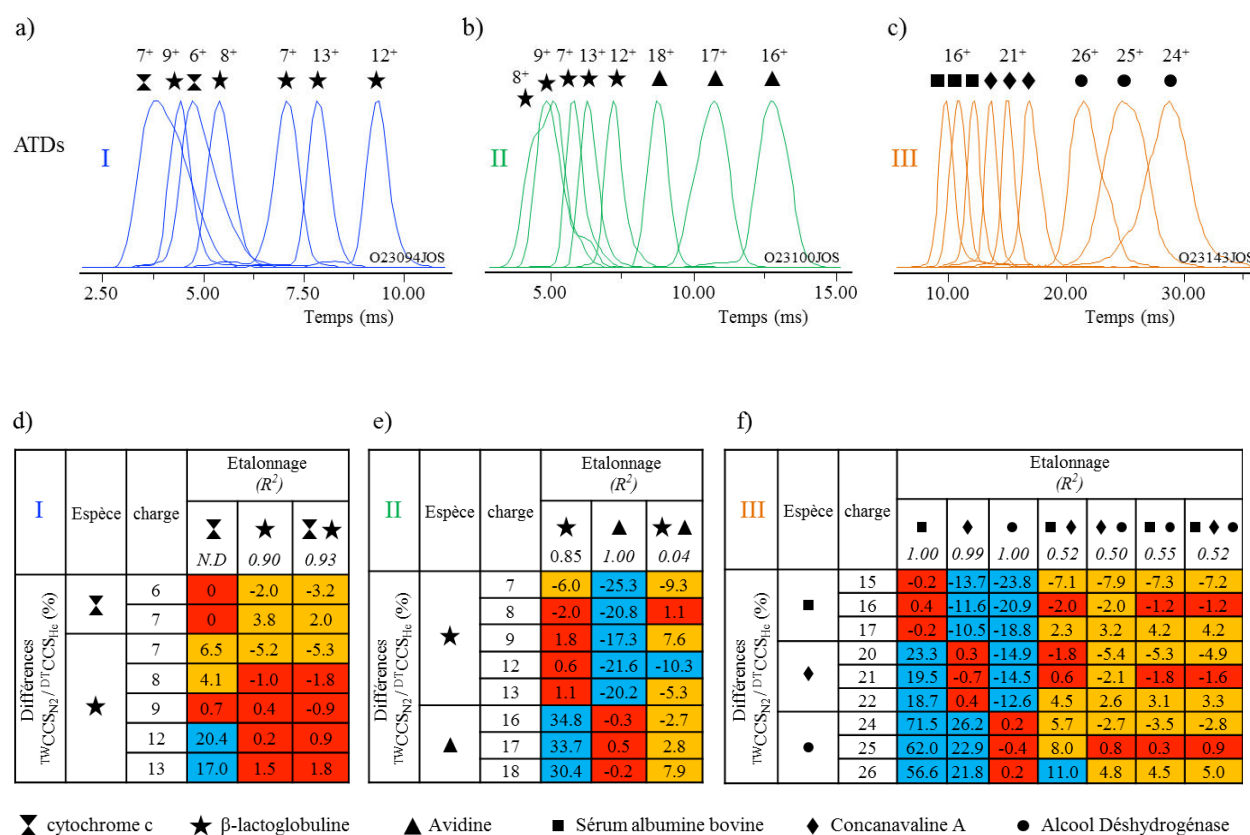


Figure 4 : Influence du choix des étalons sur la justesse des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées par IM-MS native (AcNH₄ 200mM, pH7.5) sur le Synapt G2. (a-c) L'analyse IM-MS individuelle des familles de mélange impliquant a) le cytochrome c et le β-lactoglobuline (Vc = 40V, Pi = 7mbar, WH = 40V, WV = 1235m.s⁻¹, Q_{N2} = 30mL.min⁻¹) b) le β-lactoglobuline et l'avidine (Vc = 80V, Pi = 7mbar, WH = 35V, WV = 1020m.s⁻¹, Q_{N2} = 30mL.min⁻¹) c) la sérum albumine bovine, la concanavaleine A et l'alcool déshydrogénase (Vc = 120V, Pi = 7.5mbar, WH = 38V, WV = 1005m.s⁻¹, Q_{N2} = 35mL.min⁻¹) permet une extraction des ATDs et t_D associés à chacun de leurs ions. (d-f) Les $^{TW}CCS_{N_2}$ moyennes mesurées sur ces ions par TWIMS à partir de différentes combinaisons d'étalonnage, sont comparées aux $^{DT}CCS_{He}$ de référence, mesurées par DTIMS [41]. Ces différences (%) indiquent la justesse des mesures de $^{TW}CCS_{N_2}$ en fonction de l'étalonnage appliqué. Les différences inférieures à 2%, comprises entre 2 et 10%, et supérieures à 10%, sont respectivement indiquées en rouge, orange et bleu. Les écarts-types associés aux mesures des différences $^{TW}CCS_{N_2}/^{DT}CCS_{He}$ ainsi qu'aux facteurs de corrélation R^2 , n'excèdent pas 5% et 0.02, respectivement (triplicats analytiques).

2. Conclusions.

Les optimisations instrumentales liées à l'étalonnage de la cellule TWIMS apparaissent indispensables à la mesure de ^{13}C CCS_{N2} justes et rigoureuses. Le choix des étalons, particulièrement crucial lors de l'analyse IM-MS d'assemblages natifs en mélange, conditionne la pertinence des données conformationnelles extraites. Ces précautions méthodologiques facilitent la comparaison des sections efficaces ainsi mesurées en phase gazeuse, à celles prédites à partir de différentes approches (structures cristallographiques, masses des complexes) [44, 55]. D'autre part, l'encodage d'informations IM-MS robustes sous forme de contraintes en MS structurale, contribue à la proposition de modèles structuraux d'autant plus réalistes [23]. La prise en compte de ces considérations pour la caractérisation du complexe multi-protéique CF IA par MS et IM-MS native, décrite dans le chapitre suivant, permet d'affiner l'interprétation structurale des données obtenues.

Chapitre 2 : Caractérisation structurale d'un complexe multi-protéique de haut poids moléculaire par MS native et IM-MS native : le système CF IA.

1. Présentation du contexte biologique.

La maturation de l'ARN pré-messager eucaryote (pré-ARNm) est un mécanisme essentiel à l'expression contrôlée des gènes au sein d'une cellule [56, 57]. Cet événement co-transcriptionnel se déroule en 3 étapes (Fig.5) : le pré-ARNm en cours de synthèse par l'ARN polymérase II, subit une première modification à son extrémité 5', consistant en l'ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine [58]. Cette maturation se poursuit par le recrutement du spliceosome, assurant l'épissage alternatif des exons du pré-ARNm [59]. Enfin, la terminaison de sa transcription s'achève par le clivage de son extrémité 3' et la synthèse d'une queue polyadénylée [60, 61], s'accompagnant de l'export cytoplasmique de l'ARNm mature en vue de sa traduction. Cette dernière étape de maturation 3', nécessaire à la stabilité, l'export de l'ARNm [61, 62] et impliquée dans certaines pathologies (cancers, dystrophies myotoniques, maladies auto-immunes) [10, 63, 64], repose sur 2 complexes multi-protéiques majeurs de hauts poids moléculaires (Fig.6a).

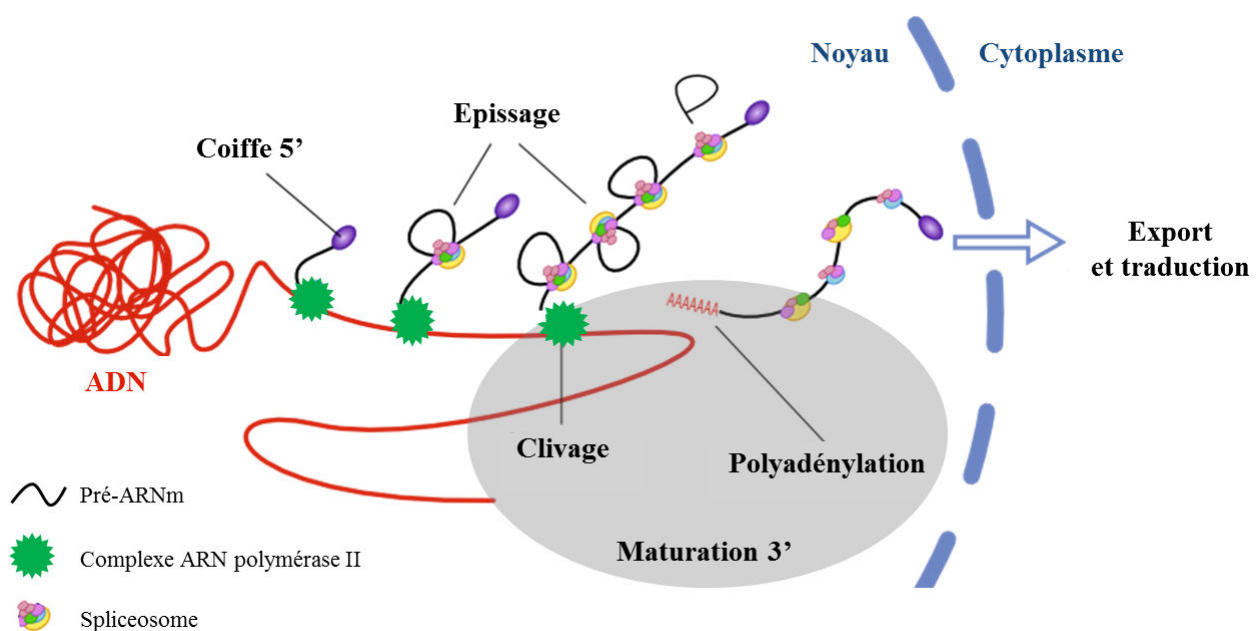


Figure 5 : Processus de maturation de l'ARN pré-messager (pré-ARNm) chez les eucaryotes, adapté de [65]. L'étape de maturation 3' du pré-ARNm est ici représentée en gris.

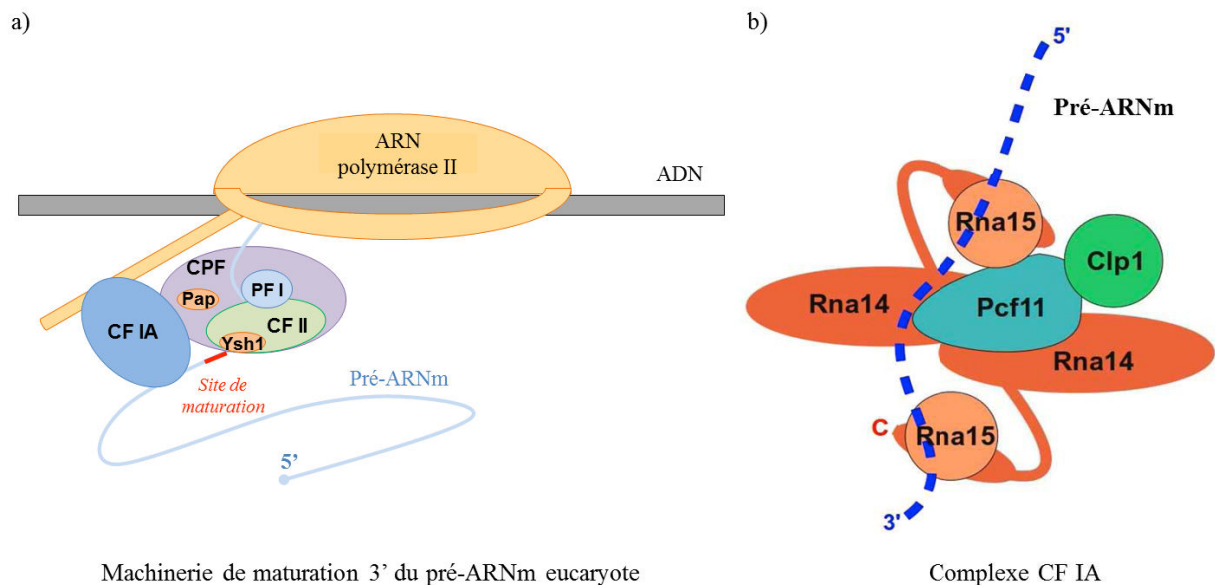


Figure 6 : Présentation schématique de la machinerie moléculaire responsable de la maturation 3' des pré-ARNm de levure, d'après [65] et [66]. a) Chez *S.cerevisiae*, cette machinerie s'organise en 2 assemblages multi-protéiques majeurs : le complexe CPF, portant les activités de clivage et de polyadénylation du pré-ARNm, et le complexe CF IA, assurant le positionnement adéquat du complexe CPF sur le site de maturation 3' cible du pré-ARNm, ainsi que le recrutement de l'ensemble de la machinerie à l'ARN polymérase II. b) L'analyse du complexe CF IA reconstitué et de ses sous-complexes copurifiés, à partir de différentes approches (gel filtration, ultracentrifugation analytique, pontage covalent et gel SDS-PAGE), a permis de proposer un modèle topologique de basse résolution pour cet assemblage, assigné à un hexamère [66].

Chez la levure *S.cerevisiae*, ces complexes correspondent au facteur de clivage et de polyadénylation (CPF), et au facteur de clivage/polyadénylation IA (CF IA). Le complexe CF IA assure le positionnement adéquat de l'assemblage CPF sur le site de maturation 3' du pré-ARNm, ainsi que l'ancrage de l'ensemble de la machinerie de maturation 3' à l'ARN polymérase II [67-69]. Ce complexe, indispensable au processus de maturation 3' [70, 71], à la terminaison [72] et à la réinitialisation de la transcription [73], requiert la présence de 4 partenaires : Rna14p, Rna15p, Clp1p et Pcf11p (Fig.6b) [74]. Parmi ces sous-unités, Pcf11p [75, 76] et Rna14p [67] assurent l'arrimage du complexe CF IA à l'ARN polymérase II, tandis que Rna15p garantit la reconnaissance spécifique des séquences situées en amont du site de maturation 3' du pré-ARNm [77, 78]. Ce réseau d'interconnexion est complété par l'existence d'interactions entre Clp1p [79], Pcf11p [80] et certaines sous-unités du complexe CPF.

La fonction plateforme supportée par CF IA, interroge sur l'organisation structurale des sous-unités Rna14p, Rna15p, Clp1p, Pcf11p au sein même de ce complexe. Dans ce contexte, des études biophysiques préliminaires ont permis de mieux comprendre l'organisation structurale de certains partenaires individuels et de leurs complexes binaires.

En effet, la résolution cristallographique de la sous-unité CstF-77 murine [81] et fongique [82] (homologue de Rna14p), ainsi que du sous-complexe Rna14p:Rna15p de levure [83], a permis de démontrer une homodimérisation de CstF-77/Rna14p, s'assemblant à 2 copies de Rna15p sous forme d'hétérotétramère [84]. Ces données, complétées par une analyse RMN de l'hétérodimère minimale Rna14p:Rna15p [85], révèlent l'existence d'un long domaine déstructuré sur Rna14p (« monkeytail »), responsable du recrutement de Rna15p (Fig.6b). Néanmoins, la flexibilité structurale associée à cette région, limite une identification précise des interfaces d'interaction entre ces partenaires [83].

Parallèlement, la résolution cristallographique d'un hétérodimère minimal Pcf11p:Clp1p a permis d'identifier les zones d'interaction entre ces sous-unités [86], et de mettre en évidence la fixation d'une molécule d'ATP-Mg sur Clp1p, dont la fonction demeure discutée [87].

L'interface d'interaction entre ces 2 sous-complexes a également pu être établie par des expériences de RMN et de purification par affinité [88], démontrant une interaction directe entre le domaine C-terminal de Rna15p et les résidus (288-400) de Pcf11p [89].

L'intégration de certaines de ces données a finalement permis la proposition d'un modèle structural partiel et préliminaire du complexe CF IA, incluant les partenaires Rna14p, Rna15p et le pré-ARNm [90].

En dépit de ces informations structurales, certaines interrogations persistent quant à l'architecture du complexe intact entier. En effet, les connaissances structurales de cet assemblage multi-protéique sont jusqu'ici indirectement déduites de données « mosaïques » obtenues à partir de sous-unités individuelles et de sous-complexes binaires, bien souvent écourtés et tronqués dans leurs séquences primaires [85, 86]. Afin de pallier à cet écueil, une étude récente du complexe CF IA intact et entier, reconstitué *in vitro* à partir de ses sous-complexes Rna14p:Rna15p et Pcf11p:Clp1p purifiés, a été réalisée [66]. Les données structurales ainsi générées par gel filtration, ultracentrifugation analytique (AUC), diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et gel SDS-PAGE, bien que de résolution limitée, ont abouti à la proposition d'un modèle topologique de nature hexamérique, supportant une stœchiométrie Rna14p:Rna15p:Clp1p:Pcf11p 2:2:1:1 (Fig.6b). Néanmoins, la pertinence de cette stœchiométrie, ici déterminée à partir des seules informations obtenues sur gel SDS-PAGE, nécessite d'être confirmée en présence d'approches complémentaires.

2. Objectifs de l'étude.

Afin d'évaluer la pertinence du modèle topologique proposé [66] (Fig.6b) et approfondir la caractérisation structurale de ce complexe, une étude alternative et directe du complexe intact CF IA et de ses sous-complexes par MS structurale est ici proposée. Ces travaux, réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Sébastien Fribourg (IECB, Bordeaux), s'appuient ici sur une combinaison des outils de MS native et d'IM-MS native. La caractérisation dynamique de l'architecture du complexe à partir de ces approches complémentaires, doit notamment permettre :

- De définir la stœchiométrie d'interaction entre sous-unités, par analyse MS native des sous-complexes et du complexe entier.
- De cartographier les connectivités entre sous-unités, par analyse MS native des sous-complexes.
- De suivre l'empreinte conformationnelle du complexe CF IA au cours de son assemblage, par analyse IM-MS native des sous-complexes et du complexe entier.

3. Présentation des résultats.

3.1. Considérations expérimentales.

Les expériences réalisées au cours de cette étude portent sur 3 échantillons : le sous-complexe HisRna15p:Rna14p, le sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p, et le complexe entier CF IA HisPcf11p Δ Q. Les faibles rendements de purification endogènes obtenus chez *S.cerevisiae*, nécessitent une expression recombinante de ces protéines chez *E.coli* [65]. La transformation de ces bactéries en présence de 2 à 4 plasmides, encodant chacune des sous-unités du complexe, permet respectivement la co-expression et co-purification de CF IA sous forme de sous-complexes binaires, et de complexe entier [91, 92]. Contrairement au sous-complexe HisRna15p:Rna14p, le sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p se distingue du complexe entier par la séquence de son construit Pcf11p. Le recours à un variant [454-563] écourté, notamment dépourvu de ses 2 doigts de zinc N-terminaux et C-terminaux (*Fribourg et al.*, article en préparation) s'avère ici indispensable à l'expression et purification d'un sous-complexe Pcf11p:Clp1p stable [65]. Par souci de simplification, ces 2 variants de séquence Pcf11p seront annotés de la même dénomination « P » au sein des spectres, quelle que soit la nature de l'échantillon analysé.

3.2. Etude des sous-complexes par analyse MS native.

Une caractérisation préliminaire des 3 échantillons par LC-MS en conditions dénaturantes, est tout d'abord réalisée afin d'évaluer la pureté et homogénéité de ces préparations (Tableau 1). La comparaison des masses théoriques et mesurées sur chaque sous-unité, permet de vérifier la composition de ces mélanges. A l'exception du partenaire Rna15p issu du complexe entier, chacune des protéines présente un clivage de sa méthionine N-terminale (-131.9 ± 0.6 Da). D'autre part, l'étiquetage histidine des partenaires ciblés (Rna15p, Pcf11p), s'accompagne de leur gluconoylation partielle ($+178.3 \pm 0.3$ Da) [93].

Echantillons	Sous-complexes				Complexe entier			
	HisRna15p:Rna14p		HisPcf11p[454-563]:Clp1p		CF IA HisPcf11pΔQ			
Espèces	HisRna15p	Rna14p	HisPcf11p [454-563]	Clp1p	Rna15p	Rna14p	Clp1p	HisPcf11pΔQ
Masse théorique (Da)	35470.4	79960.4	15260.2	50225.7	32818.7	79960.4	50225.7	72043.3
Masse mesurée (Da)	35339.2 ± 0.3 35517.3 ± 0.4	79828.0 ± 0.7	15127.9 ± 0.2 15306.4 ± 0.3	50093.6 ± 0.4	32818.0 ± 0.3	79828.4 ± 0.6	50093.3 ± 0.3	71912.5 ± 2.2
Interprétation	Clivage Met Gluconoylation	Clivage Met	Clivage Met Gluconoylation	Clivage Met	N.D	Clivage Met	Clivage Met	Clivage Met

Tableau 1 : Présentation des données LC-MS obtenues en conditions dénaturantes sur chaque échantillon (MicroTOF-Q, Bruker). La comparaison des masses théoriques et mesurées pour chaque espèce permet de confirmer l'homogénéité et la pureté des préparations.

3.2.1. Caractérisation du sous-complexe HisRna15p:Rna14p par MS native.

L'analyse du sous-complexe HisRna15p:Rna14p (2 μM) en conditions natives (AcNH₄ 250mM pH7.5) permet l'obtention d'un spectre MS relativement complexe (Fig.7). Tout d'abord, la détection de signaux compris entre 2500 et 3700 m/z, traduit la présence de monomères HisRna15p sous forme libre, partiellement gluconoylés (35340 ± 1 Da et 35518 ± 1 Da, respectivement). L'identification de 2 séries d'ions consécutives dans la gamme m/z [4000-6500] révèle ensuite l'existence de monomères (signal minoritaire, 79830 ± 1 Da) et d'homodimères Rna14p (signal majoritaire, 159683 ± 7 Da) sous forme libre. L'organisation homodimérique de Rna14p corrobore ici les données cristallographiques disponibles sur cette sous-unité [81, 82]. L'interaction entre ces 2 partenaires est enfin vérifiée par assignation des signaux entre 6500 et 9000 m/z, confirmant la formation d'hétérotrimères Rna14p:HisRna15p 2:1 (195198 ± 8 Da) et d'hétérotétramères Rna14p:HisRna15p 2:2 (230706 ± 13 Da). De façon intéressante, aucun hétérodimère Rna14p:HisRna15p 1:1 n'est ici détecté, contrairement à certaines données issues de la littérature [85].

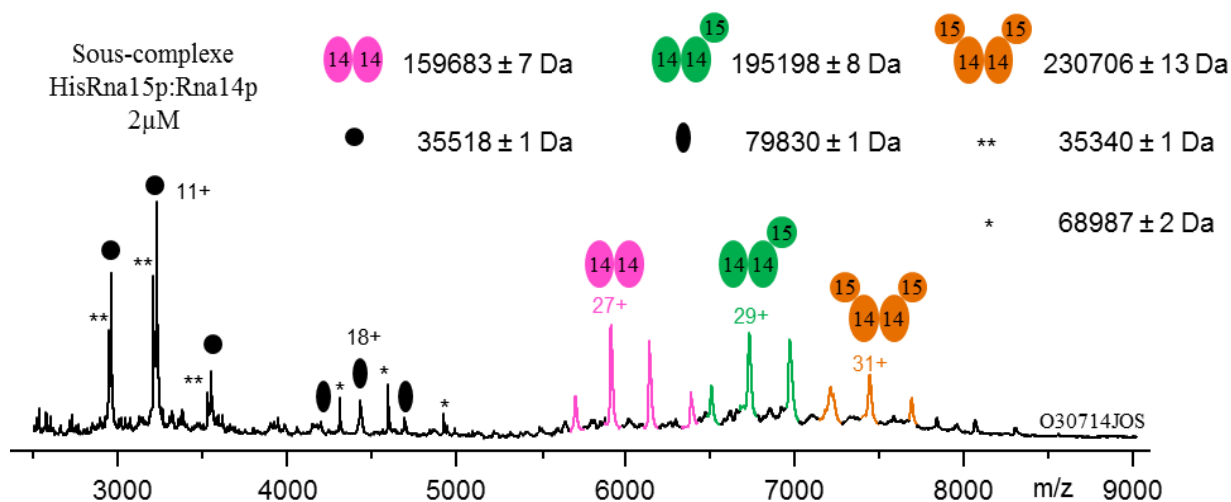


Figure 7 : Caractérisation du sous-complexe HisRna15p:Rna14p par MS native. L'analyse de ce sous-complexe (2 μ M) en conditions natives (AcNH₄ 250mM, pH7.5) sur le Synapt G2 (V_c = 120V, P_i = 7.7mbar) permet d'identifier l'état oligomérique des partenaires Rna14p et HisRna15p libres, ainsi que la stœchiométrie d'interaction de leurs complexes associés.

La mise en évidence d'une insaturation de l'homodimère Rna14p, fixant 1 à 2 copies du monomère HisRna15p, interroge sur l'affinité relative des sites d'interaction entre ces 2 partenaires. Dans ce contexte, des analyses similaires sont réalisées à différentes concentrations de sous-complexe (Fig.8).

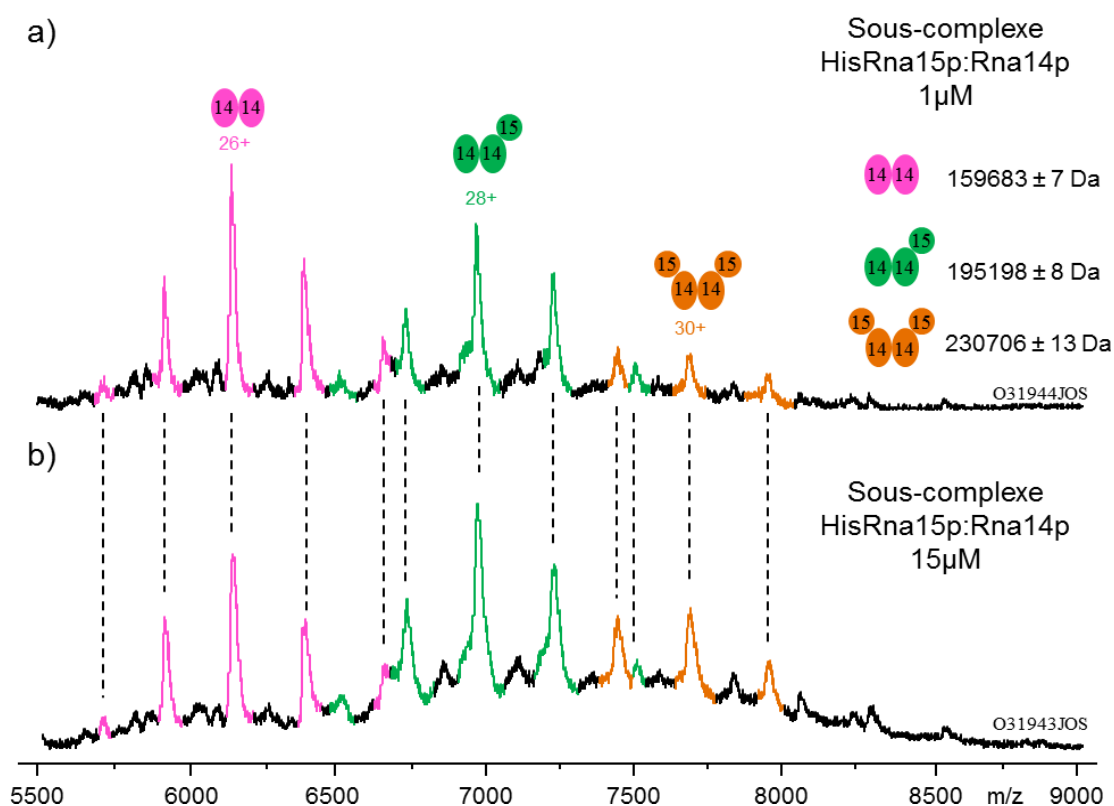


Figure 8 : Influence de la concentration en sous-complexe HisRna15p:Rna14p sur la nature des complexes formés. La comparaison des spectres de MS native obtenus en présence de a) 1 μ M et b) 15 μ M d'échantillon, dans des conditions expérimentales et instrumentales similaires, révèle un déplacement de l'équilibre vers la formation de complexes Rna14p:HisRna15p 2:1 et 2:2. Néanmoins, ces concentrations s'avèrent insuffisantes à la saturation de l'homodimère Rna14p.

La comparaison des spectres obtenus à $1\mu\text{M}$ (Fig.8a) et $15\mu\text{M}$ de sous-complexe (Fig.8b), souligne une diminution de la proportion du signal associé à l'homodimère Rna14p libre, suggérant un déplacement de l'équilibre vers la formation de complexes Rna14p:HisRna15p 2:1 et 2:2. Cependant, aucune saturation en hétérotétramère Rna14p:HisRna15p 2:2 n'est atteinte dans la gamme de concentration testée (μM), en accord avec les affinités relatives rapportées entre ces 2 partenaires dans la littérature [84]. L'absence de stœchiométries d'interaction plus élevées au sein de ces expériences (Fig.7-8), témoigne de la spécificité des complexes 2:1 et 2:2 formés entre l'homodimère Rna14p et chaque monomère HisRna15p.

3.2.2. Caractérisation du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p par MS native.

Le sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p ($5\mu\text{M}$) a été analysé de façon similaire (AcNH_4 250mM pH7.5) par MS native (Fig.9). A nouveau, la détection de signaux compris entre 1800 et 3900 m/z traduit la présence de partenaires HisPcf11p[454-563] et Clp1p sous forme libre. Les mesures de masse associées à ces espèces permettent de révéler sans ambiguïté la nature monomérique de HisPcf11p[454-563] (15129 ± 1 Da, partiellement gluconoylé) et de Clp1p (50096 ± 1 Da). Sous forme libre, une faible proportion de monomères Clp1p est retrouvée associée à une molécule d'ATP-Mg (50624 ± 1 Da), corroborant de précédents travaux [87]. Néanmoins, le signal le plus intense ($3900\text{-}4700$ m/z) correspond à l'hétérodimère HisPcf11p[454-563]:Clp1p 1:1 fixant une molécule d'ATP-Mg (65754 ± 1 Da). Par ailleurs, aucun signal associé à l'hétérodimère dépourvu d'ATP-Mg n'est détecté, pouvant suggérer une contribution de l'ATP-Mg dans l'interaction entre Clp1p et HisPcf11p[454-563].

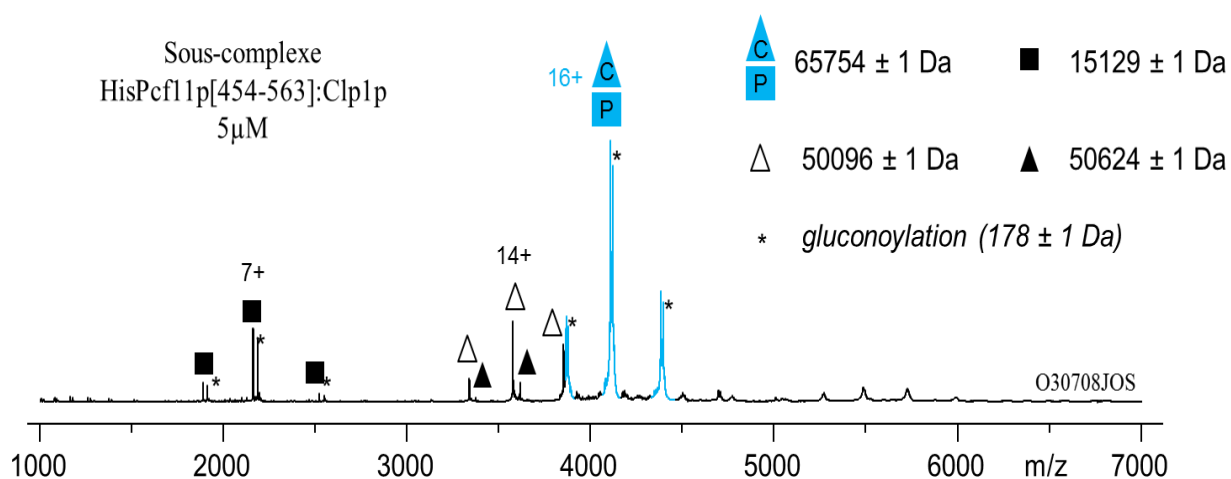


Figure 9 : Caractérisation du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p par MS native. L'analyse de ce sous-complexe ($5\mu\text{M}$) en conditions natives (AcNH_4 250mM, pH7.5) sur le Synapt G2 ($V_c = 80\text{V}$, $P_i = 7\text{mbar}$) permet d'identifier l'état oligomérique des partenaires HisPcf11p[454-563] et Clp1p libres, la stœchiométrie d'interaction de leur complexe associé, ainsi que la fixation d'une molécule d'ATP-Mg au sein de ce dernier, portée par Clp1p.

En résumé, l'analyse de ces 2 sous-complexes par MS native confirme l'existence de connectivités entre d'une part, Rna14p et Rna15p, et d'autre part, entre Pcf11p[454-563] et Clp1p. La caractérisation en masse de ces partenaires, retrouvés sous forme libre et associée au sein des mélanges étudiés, permet de confirmer :

- L'organisation homodimérique de Rna14p, fixant jusqu'à 2 copies de monomères Rna15p sous forme d'hétérotrimères Rna14p:Rna15p 2:1 et d'hétérotétramères Rna14p:Rna15p 2:2.
- L'organisation monomérique de Pcf11p[454-563] et de Clp1p, dont la fixation d'une molécule d'ATP-Mg pourrait contribuer à la formation d'hétérodimères Clp1p-ATP-Mg:Pcf11p[454-563] 1:1.

Ces résultats corroborent ainsi les informations structurales issues de l'analyse de sous-complexes plus ou moins similaires et entiers par cristallographie et RMN, présentées en introduction [81-87]. L'absence de sous-complexes Clp1p:Pcf11p[454-563] apo au sein de ces expériences suggère une influence de l'ATP-Mg dans l'interaction Pcf11p:Clp1p, bien que sa fonction et son hydrolyse chez la levure restent controversés [87, 94, 95]. Enfin, ces données révèlent la présence d'un intermédiaire d'assemblage hétérotrimérique Rna14p:Rna15p 2:1, dont l'existence demeure à confirmer en présence du complexe CF IA entier.

3.3. Détermination de la stœchiométrie du complexe CF IA entier par MS native.

Afin d'étudier la stœchiométrie entre ces partenaires à l'échelle du complexe entier, une analyse du complexe CF IA HisPcf11p Δ Q intact par MS native est ici réalisée (Fig.10). La satisfaction d'un compromis entre préservation du complexe entier non-covalent en phase gazeuse et transmission optimale de ses ions de hauts rapports m/z, impose une optimisation expérimentale et instrumentale particulièrement rigoureuse. Ces prérequis permettent ici la détection d'un signal entre 8500 et 10000 m/z. L'assignation de ce signal à une espèce majoritaire de 348193 ± 12 Da, indique sans ambiguïté l'existence d'un complexe hexamérique de stœchiométrie Rna14p:Rna15p:Clp1p:Pcf11p 2:2:1:1 (masse théorique de 348140.8 Da attendue en présence d'une gluconoylation, de 2 atomes de Zn et d'une molécule d'ATP-Mg), bien que la résolution soit ici insuffisante à une détermination de son contenu en cofacteurs (Zn, ATP-Mg). Néanmoins, la détection d'une espèce minoritaire de 314421 ± 13 Da, assimilable à un complexe pentamérique ne fixant qu'une seule copie de Rna15p, confirme l'insaturation de l'homodimère Rna14p déjà observée à l'échelle du sous-complexe (Fig.7-8).

Complexe CF IA entier 2 μ M

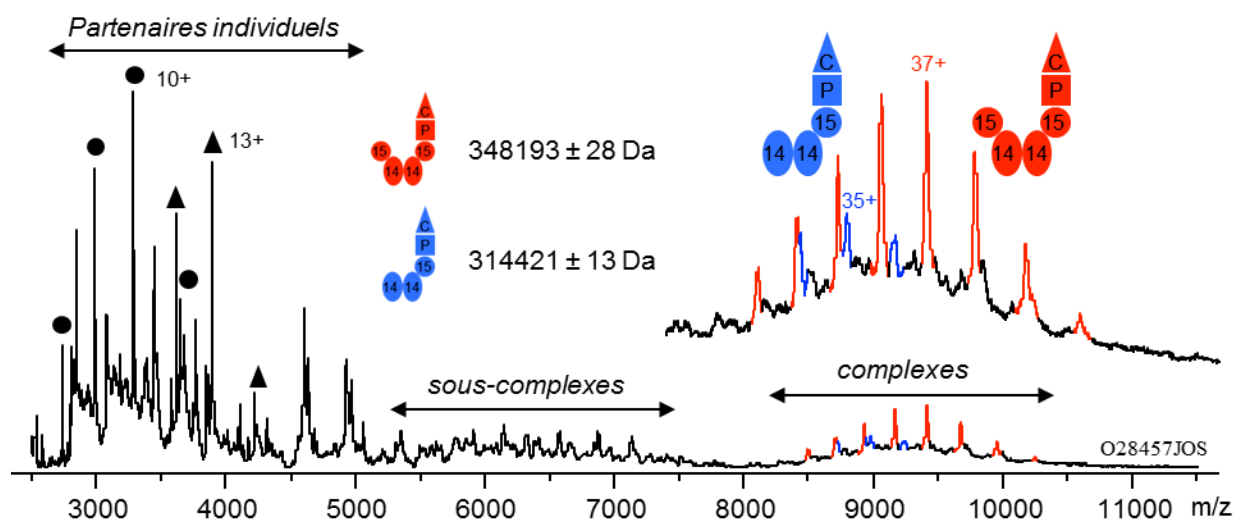


Figure 10 : Caractérisation du complexe entier CF IA HisPcf11p Δ Q par MS native. L'analyse de ce complexe intact (2 μ M) en conditions natives (AcNH₄ 250mM, pH7.5) sur le Synapt G2 (Vc = 200V, Pi = 7.7mbar) démontre l'existence d'un assemblage hexamérique majoritaire, de stœchiométrie Rna15p:Rna14p:Clp1p:Pcf11p 2:2:1:1. En fonction de la préparation analysée, une proportion plus ou moins importante d'assemblages pentamériques (Rna15p:Rna14p:Clp1p:Pcf11p 2:1:1:1) est observée.

L'existence de ce pentamère, dont la proportion varie en fonction du lot analysé, est confirmée par analyse XL-MS du complexe entier « cross-linké », quelles que soient les conditions de pontage (nature et proportion en agent pontant, durée de la réaction) appliquées (Chaignepain S., communication personnelle). Enfin, l'identification de signaux dans la gamme m/z [2000-7500], témoigne de la présence de partenaires libres (Rna15p, Clp1p, homodimère Rna14p) et de sous-complexes (Rna14p:Rna15p 2:1) au sein de ce mélange.

Afin de préciser le mécanisme d'assemblage entre sous-unités, des expériences de dénaturation partielle du complexe CF IA entier, réalisées en présence d'isopropanol, ont été suivies par MS native (Fig.11). Cette approche, facilitant l'interprétation topologique d'assemblages multi-protéiques, consiste en une caractérisation par MS native des sous-complexes induits par une déstabilisation chimique du complexe entier [39, 96, 97]. La comparaison des spectres ainsi obtenus en l'absence (Fig.11a) et en présence de 5% d'isopropanol (Fig.11b), révèle une extinction du signal associé au complexe entier et l'apparition d'un signal correspondant au relargage de l'hétérodimère Clp1p:Pcf11p Δ Q 1:1 (122866 \pm 12 Da). A nouveau, la désolvatation limitée des ions issus de ce signal, ne permet pas de déterminer la stœchiométrie d'interaction en ATP-Mg du sous-complexe éjecté. Le recours à 10% d'isopropanol (Fig.11c) conduit au relargage séquentiel de l'hétérotétramère Rna14p:Rna15p 2:2 (225369 \pm 10 Da), révélant la voie de désassemblage du complexe CF IA.

L'ensemble des résultats obtenus par MS native sur le complexe entier CF IA, corroborent le réseau de connectivité déduit de l'analyse des sous-complexes purifiés, et confirment l'existence de 2 plateformes d'assemblage (« building blocks ») :

- Le « building block » Rna14p:Rna15p 2:2, dans lequel l'homodimère Rna14p sert de plateforme de recrutement à la fixation de deux copies monomériques de Rna15p.
- Le « building block » Pcf11p:Clp1p 1:1, s'assemblant sous forme d'hétérodimère stable.

L'assemblage de ces 2 « building blocks » est ici démontré par détection et dénaturation partielle de l'hexamère CF IA intact, de stœchiométrie Rna14p:Rna15p:Clp1p:Pcf11p 2:2:1:1. Ces données, plus résolutive que celles obtenues par gel 1D, vérifient le modèle topologique initialement proposé par Gordon [66]. L'absence de sous-complexes hybrides stables entre ces 2 plateformes, ne permet cependant pas de compléter le réseau de connectivité à partir des expériences de dénaturation partielle, et de valider l'existence d'une interaction entre Rna15p et Pcf11p [88]. Enfin, la détection d'un pentamère minoritaire confirme l'insaturation du « building block » Rna14p:Rna15p 2:2 déjà rapportée à l'échelle du sous-complexe. La détection de cette espèce par une approche XL-MS complémentaire, suggère l'existence d'un équilibre en solution entre ces 2 stœchiométries. Bien que la pertinence biologique du pentamère nécessite d'être approfondie *in vivo*, cette asymétrie semble supportée par certains modèles structuraux [90].

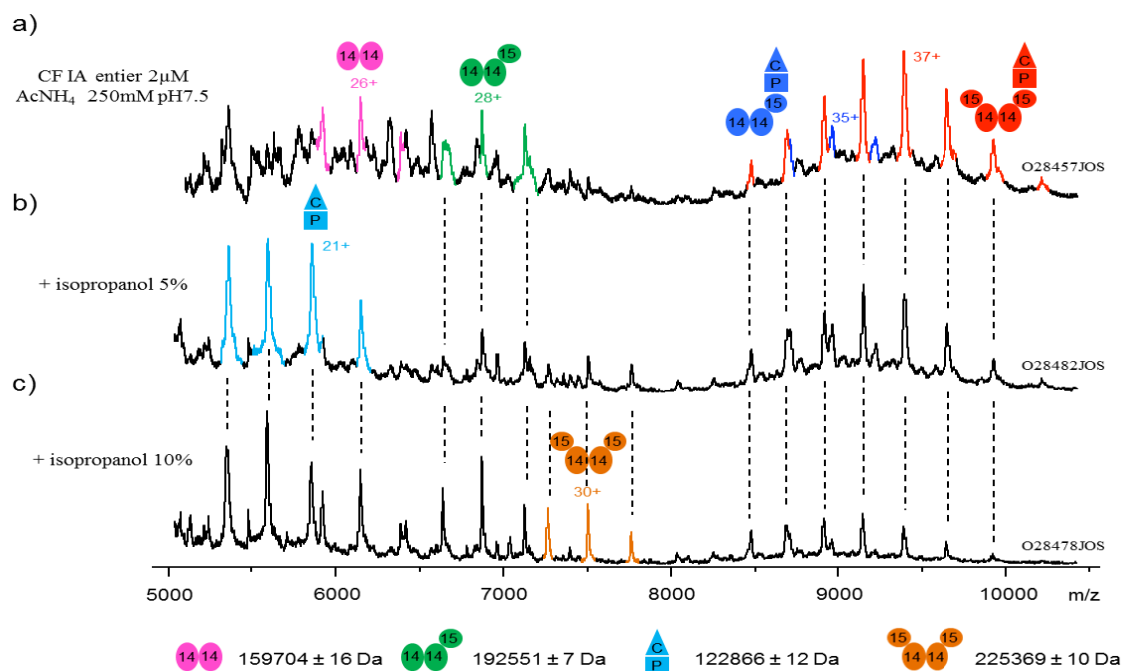


Figure 11 : Caractérisation du complexe entier CF IA HisPcf11pΔQ par MS native en conditions de dénaturation partielle. L'analyse du complexe intact (2µM) est ici réalisée a) en l'absence (AcNH₄ 250m M pH7.5) ou en présence de b) 5% et c) 10% d'isopropanol, sur le Synapt G2 (Vc = 200V, Pi = 7.7mbar). La caractérisation des sous-complexes relargués permet de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de cette particule.

3.4. Suivi conformationnel de l'assemblage du complexe CF IA par IM-MS native.

Afin de compléter les informations structurales obtenues, l'ensemble des espèces identifiées par MS native au sein des 3 échantillons, a été caractérisé par IM-MS native. Cette approche complémentaire permet de mesurer l'empreinte conformationnelle (CCS) des sous-unités depuis leur forme libre jusqu'à leur assemblage sous forme de « building blocks », puis d'hexamères [38, 39]. L'application d'une méthode et d'un étalonnage IM-MS propres à chacune de ces espèces, permet ici d'étendre la résolution conformationnelle accessible ainsi que la justesse des mesures de $^{TW}CCS_{N_2}$ (chapitre 1). Afin de considérer l'impact des répulsions coulombiennes sur la conformation globale des espèces étudiées (partie 3, chapitre 2), les $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées sur chaque état de charge d'une même espèce, sont ensuite moyennées. En l'absence de structures cristallographiques rigoureusement comparables, les $^{TW}CCS_{N_2}$ ainsi mesurées sont ici comparées aux CCSs prédites à partir de la masse de ces espèces (CCS_{Mw} , partie 3, chapitre 6). Ces CCSs expérimentales et prédites sont rapportées sous forme de tableau comparatif (Tableau 2) et représentées en fonction de la masse des espèces mesurée au sein de chaque échantillon (Fig.12a-c).

L'analyse du sous-complexe HisRna15p:Rna14p par IM-MS native révèle une augmentation de $^{TW}CCS_{N_2}$ linéaire lors de la fixation d'une ($87.03 \pm 0.48 \text{ nm}^2$) à deux copies de Rna15p ($101.67 \pm 0.44 \text{ nm}^2$) sur l'homodimère (Rna14p)₂ ($73.17 \pm 0.95 \text{ nm}^2$), démontrant une extension des conformations (Tableau 2 et Fig.12a). Néanmoins, une différence significative de + 11% est rapportée entre la $^{TW}CCS_{N_2}$ expérimentale de l'hétérotétramère Rna14p:Rna15p 2:2 ($101.67 \pm 0.44 \text{ nm}^2$) et la CCS_{Mw} prédite à partir de sa masse ($91.50 - 91.59 \text{ nm}^2$), suggérant une conformation globale plus étendue que celle issue d'un « simple » effet de masse. De façon intéressante, la fixation de chaque copie de Rna15p induit une augmentation de $^{TW}CCS_{N_2}$ reproductible, comprise entre 16.8 et 18.9%. L'extension conformationnelle ainsi mesurée par IM-MS lors de l'assemblage de ce sous-complexe, corrobore le modèle structural déduit de l'analyse cristallographique de l'hétérodimère minimal Rna14p:Rna15p [85]. Dans ce modèle extrapolé à l'hétérotétramère entier, l'interaction Rna14p-Rna15p serait attribuée au domaine « monkeytail » de Rna14p, et au domaine « hinge » de Rna15p (Fig.13). L'entrelacement de ces 2 domaines intrinsèquement déstructurés, s'accompagnerait d'une restructuration de leur interface d'interaction (« tether »), assurant une proximité spatiale étroite entre Rna14p et Rna15p. De façon intéressante, ce modèle prévoit une flexibilité / extension structurale des domaines RRM distaux de Rna15p au sein du sous-complexe Rna14p:Rna15p 2:2, en accord avec une $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurée supérieure à celle prédite à partir de sa simple masse.

Espèces	Masses théorique (Da)	Masse mesurée (Da)	Charge	^{TW} CCS _{N₂} mesurées (nm ²)		CCS _{MW} prédites par la masse (nm ²)	Différences (nm ²) (%)
				Individuelle	Moyenne		
HisPcf11p [454-563]	15129.0	15129 ± 1	6	12.85 ± 0.02	13.90 ± 0.92	14.89	-0.99 N.S
			7	13.89 ± 0.05			
			8	14.96 ± 0.08			
HisRna15p gluconoylé	35517.3	35518 ± 1	10	26.47 ± 0.05	27.36 ± 0.82	26.31	+1.05 N.S
			11	27.26 ± 0.03			
			12	28.35 ± 0.07			
Clp1p	50094.5	50096 ± 1	14	36.42 ± 0.04	36.84 ± 0.46	33.09	+3.75 +11.3
			15	37.27 ± 0.03			
Clp1p-ATP-Mg	50624.0	50624 ± 1	14	36.94 ± 0.15	37.33 ± 0.44	33.32	+4.01 +12.0
			15	37.73 ± 0.01			
HisPcf11p [454-563]:Clp1p-ATP-Mg 1:1	65753.0	65754 ± 1	15	37.06 ± 0.37	37.55 ± 0.44	39.67	-2.12 -5.3
			16	37.65 ± 0.16			
			17	37.93 ± 0.11			
Rna14p	79829.2	79830 ± 1	17	44.51 ± 0.02	44.85 ± 0.37	45.15	-0.30 N.S
			18	45.19 ± 0.04			
			19	45.69 ± 0.07			
(Rna14p) ₂	159658.4	159683 ± 7	25	72.18 ± 0.10	73.17 ± 0.95	71.66	+1.51 N.S
			26	72.99 ± 0.06			
			27	74.34 ± 0.24			
Rna14p: HisRna15p 2:1	[194997.6 - 195175.7] (gluconoylation partielle)	195198 ± 8	28	86.49 ± 0.01	87.03 ± 0.48	[81.88 - 81.93]	[+5.10 - 5.15] [+6.2 - 6.3]
			29	87.07 ± 0.05			
			30	87.52 ± 0.33			
Rna14p: HisRna15p 2:2	[230336.8 - 230693] (gluconoylation partielle)	230706 ± 13	30	101.55 ± 0.51	101.67 ± 0.44	[91.50 - 91.59]	[+10.08 - 10.17] [+11.0 - 11.1]
			31	101.78 ± 0.44			
CFIA entier	[347302.4 - 348140.8] (gluconoylation partielle, 2 Zn & 1 ATP-Mg potentiellement fixés)	348193 ± 28	39	134.29 ± 0.30	134.75 ± 0.56	[120.31-120.50]	[+14.25 - 14.44] [+11.8 - 12.0]
			40	135.20 ± 0.26			
			41	136.75 ± 0.23			

Tableau 2 : Comparaison des CCSs expérimentales (^{TW}CCS_{N₂}) et prédites à partir de la masse de chaque espèce (CCS_{MW}). L'analyse individuelle des 3 échantillons étudiés par IM-MS native (AcNH₄ 250mM pH7.5) sur le Synapt G2 permet une mesure des ^{TW}CCS_{N₂} associées à chaque état de charge de l'ensemble des espèces détectées. Ces mesures, réalisées en triplicats analytiques puis moyennées sur l'ensemble des états de charge d'une même espèce, sont ici comparées aux CCSs prédites à partir de la masse de ces espèces, selon l'équation : $CCS_{MW} = 2.435 \times Mw^{2/3}$ [44]. Les différences ^{TW}CCS_{N₂} / CCS_{MW} excédant 2 fois l'écart-type associé aux ^{TW}CCS_{N₂} moyennées (95% de confiance), sont exprimées sous forme de pourcentage. Les masses mesurées ici indiquées, proviennent de l'analyse MS native de ces échantillons.

La caractérisation du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p par IM-MS native met en évidence une différence significative entre ^{TW}CCS_{N₂} expérimentales et CCS_{MW} prédites lors de la formation de l'hétérodimère HisPcf11p[454-563]:Clp1p-ATP-Mg 1:1 (Tableau 2 et Fig.12b). Alors que les CCS_{MW} prédites prévoient une augmentation de CCS linéaire (+ 19.1%), la fixation de HisPcf11p[454-563] sur Clp1p-ATP-Mg s'opère sans changement significatif de ^{TW}CCS_{N₂} expérimentale au sein de l'hétérodimère formé. Cette observation suggère que le recrutement de HisPcf11p[454-563] sur Clp1p-ATP-Mg intervienne sans changement de conformation global majeur.

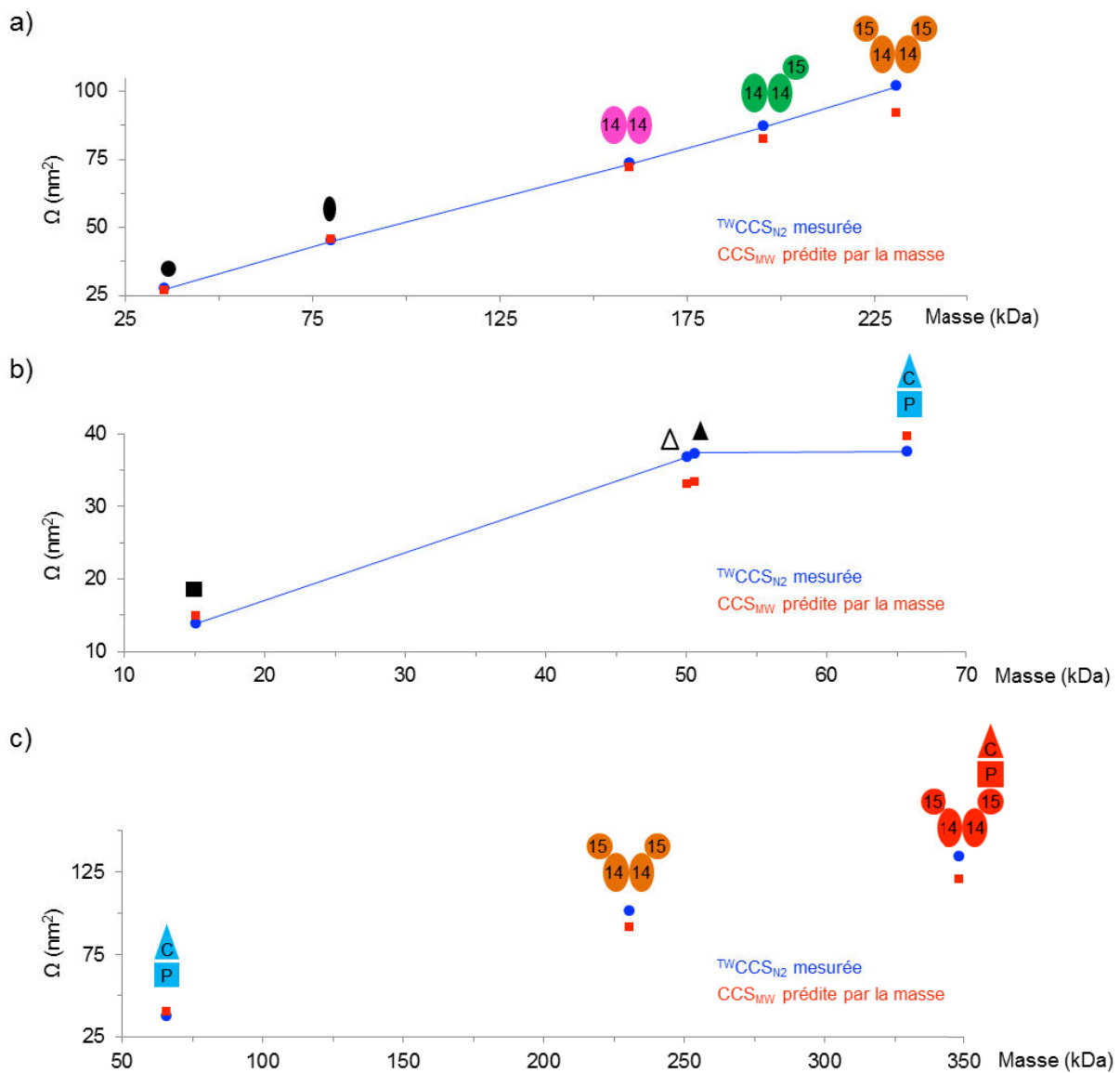


Figure 12 : Suivi conformationnel du complexe CF IA au cours de son assemblage par IM-MS native. Les $^{TW}CCS_{N_2}$ moyennes mesurées et prédites (Tableau 2) sont ici représentées en fonction de la masse mesurée sur chaque espèce par MS native en présence a) du sous-complexe HisRna15p:Rna14p, b) du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p et c) du complexe CF IA entier. Les CCSs expérimentales et prédites indiquées en panel c pour les sous-complexes HisPcf11p[454-563]:Clp1p 1:1 et Rna14p:Rna15p 2:2, proviennent respectivement de leurs analyses IM-MS individuelles (panel a et b), justifiant l'absence d'un tracé entre ces données et celles extraites du complexe CF IA entier.

La $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurée sur l'hétérodimère HisPcf11p[454-563]:Clp1p-ATP-Mg 1:1 ($37.55 \pm 0.44 \text{ nm}^2$) s'avère inférieure de 5.3% à celle prédite à partir de sa masse (39.67 nm^2), et de 26.7% à la somme des $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurées sur les sous-unités Clp1p-ATP-Mg et HisPcf11p[454-563] libres (51.23 nm^2). Ces différences supportent une compaction conformationnelle importante lors de la formation du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p-ATP-Mg 1:1. La résolution cristallographique de ce dernier [86, 87] devra prochainement permettre une comparaison entre sa $^{TW}CCS_{N_2}$ mesurée en phase gazeuse ($37.55 \pm 0.44 \text{ nm}^2$) et sa CCS théorique déduite de ces structures. Cependant, l'absence de structures

cristallographiques associées au partenaire Clp1p-ATP-Mg libre, ne permet pas à ce jour une comparaison entre CCSs théoriques de ces 2 espèces, bien qu'une sous-unité homologue soit résolue chez le métazoaire *C.elegans* [95]. D'autre part, la compaction conformationnelle ici révélée sur ce sous-complexe écourté, devra être confirmée en présence de la sous-unité Pcf1 1p pleine taille.

Pour conclure, l'analyse de l'hexamère CF IA entier par IM-MS native permet sa comparaison conformationnelle aux données IM-MS précédemment décrites en présence de ses sous-complexes (Tableau 2 et Fig.12c). Cependant, la variabilité des construits Pcf1 1p ici exprimés entre le sous complexe Pcf1 1p:Clp1p (HisPcf1 1p[454-563], séquence écourtée) et le complexe entier CF IA (Pcf1 1pΔQ, séquence pleine taille), ne permet pas une comparaison conformationnelle rigoureuse entre ces 2 espèces. Cette variabilité limite ainsi cette comparaison aux données IM-MS issues de l'hexamère entier et du sous-complexe Rna14p:Rna15p. A nouveau, une différence significative de + 12% est observée entre la $^{TW}CCS_{N2}$ expérimentale du complexe entier ($134.75 \pm 0.56 \text{ nm}^2$) et la CCS_{MW} prédite à partir de sa masse ($120.31\text{-}120.50\text{nm}^2$). De façon intéressante, cette différence se révèle similaire à celle préalablement rapportée sur l'hétérotétramère Rna14p:Rna15p 2:2 (+11.0-11.1%). Ces résultats suggèrent que la sous-estimation de CCS_{MW} relevée sur l'hexamère provienne de la flexibilité des domaines RRM proposée à l'échelle du sous-complexe HisRna15p:Rna14p 2:2 (Fig.13).

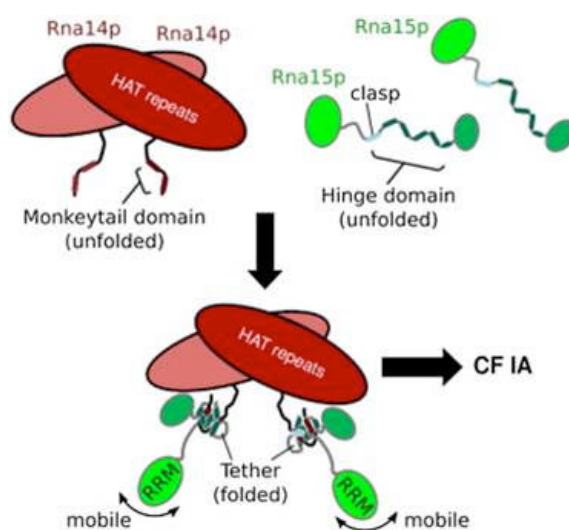


Figure 13 : Présentation du modèle structurel proposé pour le sous-complexe entier Rna14p:Rna15p 2:2, d'après [85]. Ce modèle, dérivé de la structure cristallographique obtenue sur l'hétérodimère minimal Rna14p:Rna15p, suggère une interaction Rna14p-Rna15p médiée par les domaines «monkeytail» et «hinge» déstructurés de Rna14p et Rna15p, respectivement. L'interaction entre ces 2 domaines s'accompagne ici d'une restructuration de cette interface («tether») et de la formation d'hétérotétramères, caractérisés par une flexibilité / extension structurale de leurs domaines distaux RRM.

En résumé, les données d'IM-MS native générées à partir des sous-complexes et du complexe entier CF IA accèdent les modèles structuraux et topologiques jusqu'alors avancés, soutenant notamment l'existence de régions flexibles au sein de l'hétérotétramère Rna14p:Rna15p 2:2 [66, 85]. Pour la première fois, ces expériences suggèrent l'existence d'une compaction conformationnelle importante au sein du sous-complexe HisPcf11p[454-563]:Clp1p-ATP-Mg. Le suivi de ces empreintes IM-MS permet ici de révéler la nature dynamique des changements conformationnels affectant chacun des 2 « building blocks » au cours de leur assemblage.

4. Conclusions.

La caractérisation structurale du complexe entier CF IA et de ses sous-complexes par combinaison des approches de MS native et d'IM-MS native, révèle les propriétés dynamiques d'assemblage de ce facteur de maturation. Les données de MS structurale ici obtenues à l'échelle des protéines entières (connectivité, stœchiométrie d'interaction, conformation), corroborent les structures et modèles de haute résolution disponibles sur les sous-complexes ainsi que le modèle topologique hexamérique de basse résolution proposé pour le complexe entier. L'assemblage de ce dernier serait ici médié par l'interaction de 2 plateformes ou « building blocks », constituées d'un hétérotétramère ou hétérotrimère Rna14p:Rna15p 2:2 ou 2:1, et d'un hétérodimère Clp1p:Pcf11p 1:1. L'analyse de ces espèces par MS et IM-MS native suggère une influence du cofacteur ATP-Mg sur la formation du sous-complexe Clp1p:HisPcf11p[454-563] 1:1, dont l'assemblage s'accompagne d'une compaction conformationnelle notable. De même, ces expériences révèlent une insaturation en hétérotétramère Rna14p:Rna15p 2:2, matérialisée par l'identification de sous-complexes hétérotrimériques Rna14p:Rna15p 2:1 et d'un complexe CF IA entier pentamérique, dont l'origine et la pertinence biologique devront être confirmées. Par ailleurs, l'analyse du complexe entier CF IA par MS native à haute résolution, devra prochainement permettre de confirmer la stœchiométrie en zinc et en ATP-Mg de ce dernier.

Pour conclure, la diversité d'information structurale apportée par MS native et IM-MS native, offre l'opportunité d'étendre l'unique modèle topologique disponible à un modèle structurale de haute résolution. L'identification des peptides d'interface entre sous-unités, actuellement réalisée par analyse protéomique XL-MS du complexe entier par l'équipe du Pr. Schmitter (CBMN, Bordeaux), devra permettre de compléter les données présentées. L'intégration de l'ensemble de ces informations structurales sous forme de contraintes spatiales, combinée aux structures de haute résolution disponibles sur certaines sous-unités / sous-complexes individuels, fournit un support adéquat à la modélisation structurale du complexe entier CF IA.

5. Valorisation.

Les travaux ici présentés ont fait l'objet des communications suivantes :

Publication:

Stojko J, Dupin A, Beaurepaire L, Chaignepain S, Van Dorsselaer A, Schmitter JM, Cianférani S, Minvielle-Sébastien L, Fribourg S. A combination of structural MS approaches to decipher yeast mRNA 3'-end maturation complex CF IA structural characterization. *Article en cours de rédaction pour une soumission dans International Journal of Mass Spectrometry*.

Communication par affiche:

Stojko J, Dupin A, Van Dorsselaer A, Fribourg S, Cianférani S. Native MS characterization of the yeast pre-mRNA 3'-end maturation complex CF IA. 4th Symposium on Structural Proteomics (SSP), November 2014, Antwerp (Belgium).

Stojko J, Dupin A, Beaurepaire L, Van Dorsselaer A, Fribourg S, Cianférani S. Combining native MS & IM-MS for structural elucidation of the yeast mRNA 3'-end maturation complex CF IA. 63rd American Society for Mass Spectrometry (ASMS) conference, June 2015, Saint-Louis (USA).

Stojko J, Dupin A, Beaurepaire L, Van Dorsselaer A, Fribourg S, Cianférani S. Combining native MS & IM-MS for structural elucidation of the yeast mRNA 3'-end maturation complex CF IA., Congrès Français de Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP), Septembre 2015, Ajaccio.

Conclusion de cette partie

L'importance physiologique des complexes multi-protéiques, pivots moléculaires de la régulation cellulaire et impliqués dans de nombreuses pathologies, requiert une caractérisation structurale extensive de ces assemblages. Parmi les techniques de biologie structurale, la cristallographie et la résonance magnétique nucléaire demeurent privilégiées, en raison de leur potentiel de résolution atomique. Néanmoins, la taille, l'hétérogénéité, l'insolubilité et la flexibilité croissante des cibles aujourd'hui étudiées, sont autant de limitations à ces approches.

Plus polyvalente, la spectrométrie de masse constitue à ce jour une alternative analytique prometteuse. Son potentiel instrumental (sensibilité, résolution, transmission de rapports m/z élevés, techniques de fragmentation en phase gazeuse multiples) et sa capacité de couplage à de nombreuses techniques séparatives (chromatographie liquide, électrophorèse capillaire) et analytiques (mobilité ionique, pontage / marquage covalent), étendent la diversité d'informations structurales accessibles par l'analyse de complexes non-covalents. La combinaison de ces multiples approches de MS structurale, permet de reconstituer la topologie de ces complexes, comme le facteur CF IA, à travers l'obtention d'informations structurales complémentaires (stœchiométries, connectivités, sections efficaces, proximités spatiales, accessibilité au solvant) extraites à différents niveaux de caractérisation (structures quaternaires jusqu'à l'acide aminé). Néanmoins, cette résolution s'avère insuffisante à la proposition d'une structure atomique à l'aide des seules données de MS structurale.

Le rapprochement récent de cette discipline au domaine de la modélisation structurale, permet aujourd'hui de contourner cet écueil. Les données de MS structurale, encodées sous forme de contraintes spatiales, servent alors de guide à l'assemblage et l'évaluation *in silico* de modèles structuraux, générés à partir de structures de haute résolution disponibles sur les sous-unités individuelles du complexe. Cette exploitation des informations de MS structurale, nécessite la génération de données justes et fidèles, impactant directement la qualité et le réalisme du modèle structural proposé. Une optimisation instrumentale rigoureuse, ici illustrée à travers la justesse des $^{TW}CCS_{N2}$ mesurées, s'avère indispensable à la proposition de données pertinentes.

Pour conclure, l'essor de cette approche intégrative repose sur la mise à disposition d'outils informatiques, capables d'encoder une large gamme de données de MS structurale, et surtout intuitifs, facilitant leur introduction dans les laboratoires de spectrométrie de masse structurale.

Références bibliographiques

1. Melnikov, S., et al., *One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes*. Nature Structural & Molecular Biology, 2012. **19**(6): p. 560-567.
2. Fromont-Racine, M., et al., *Ribosome assembly in eukaryotes*. Gene, 2003. **313**: p. 17-42.
3. Murata, S., H. Yashiroda, and K. Tanaka, *Molecular mechanisms of proteasome assembly*. Nature reviews Molecular cell biology, 2009. **10**(2): p. 104-115.
4. Will, C.L. and R. Lührmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(7): p. a003707.
5. Hahn, S., *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery*. Nature Structural & Molecular Biology, 2004. **11**(5): p. 394.
6. Liu, Q., J.C. Greimann, and C.D. Lima, *Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1223-1237.
7. Deisenroth, C. and Y. Zhang, *Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway*. Oncogene, 2010. **29**(30): p. 4253-4260.
8. Lecker, S.H., A.L. Goldberg, and W.E. Mitch, *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. Journal of the American Society of Nephrology, 2006. **17**(7): p. 1807-1819.
9. Singh, R.K. and T.A. Cooper, *Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics*. Trends in molecular medicine, 2012. **18**(8): p. 472-482.
10. Danckwardt, S., M.W. Hentze, and A.E. Kulozik, *3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease*. The EMBO journal, 2008. **27**(3): p. 482-498.
11. Yusupov, M.M., et al., *Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution*. Science, 2001. **292**(5518): p. 883-896.
12. Unno, M., et al., *The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution*. Structure, 2002. **10**(5): p. 609-618.
13. Cramer, P., et al., *Structure of eukaryotic RNA polymerases*. Annu. Rev. Biophys., 2008. **37**: p. 337-352.
14. Nickell, S., et al., *Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(29): p. 11943-11947.
15. Li, X., et al., *Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM*. Nature Methods, 2013. **10**(6): p. 584-590.
16. Marcoux, J. and C.V. Robinson, *Twenty years of gas phase structural biology*. Structure, 2013. **21**(9): p. 1541-1550.
17. Walzthoeni, T., et al., *Mass spectrometry supported determination of protein complex structure*. Current opinion in structural biology, 2013. **23**(2): p. 252-260.
18. Pan, Y., et al., *Conformational Dynamics of a Membrane Transport Protein Probed by H/D Exchange and Covalent Labeling: The Glycerol Facilitator*. Journal of Molecular Biology, 2012. **416**(3): p. 400-413.
19. Zhou, M., C. Huang, and V.H. Wysocki, *Surface-induced dissociation of ion mobility-separated noncovalent complexes in a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer*. Anal Chem, 2012. **84**(14): p. 6016-23.
20. Gold, M.G., et al., *Architecture and dynamics of an A-kinase anchoring protein 79 (AKAP79) signaling complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(16): p. 6426-6431.
21. Rozbesky, D., et al., *Chemical cross-linking and H/D exchange for fast refinement of protein crystal structure*. Anal Chem, 2012. **84**(2): p. 867-70.
22. Zheng, X., P.L. Wintrode, and M.R. Chance, *Complementary structural mass spectrometry techniques reveal local dynamics in functionally important regions of a metastable serpin*. Structure, 2008. **16**(1): p. 38-51.
23. Politis, A., et al., *A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes*. Nature Methods, 2014. **11**(4): p. 403-406.
24. Rey, M., et al., *Mass spec studio for integrative structural biology*. Structure, 2014. **22**(10): p. 1538-1548.
25. Karaca, E., et al., *Building macromolecular assemblies by information-driven docking introducing the Haddock multibody docking server*. Molecular & Cellular Proteomics, 2010. **9**(8): p. 1784-1794.
26. Russel, D., et al., *Putting the pieces together: integrative modeling platform software for structure determination of macromolecular assemblies*. 2012.
27. Hall, Z., A. Politis, and C.V. Robinson, *Structural modeling of heteromeric protein complexes from disassembly pathways and ion mobility-mass spectrometry*. Structure, 2012. **20**(9): p. 1596-1609.
28. Baldwin, A.J., et al., *The polydispersity of αB-crystallin is rationalized by an interconverting polyhedral*

- architecture. *Structure*, 2011. **19**(12): p. 1855-1863.
29. Politis, A., et al., *Integrating ion mobility mass spectrometry with molecular modelling to determine the architecture of multiprotein complexes*. 2010.
 30. Hyung, S.J. and B.T. Ruotolo, *Integrating mass spectrometry of intact protein complexes into structural proteomics*. *Proteomics*, 2012. **12**(10): p. 1547-1564.
 31. Politis, A. and A.J. Borysik, *Assembling the pieces of macromolecular complexes: Hybrid structural biology approaches*. *Proteomics*, 2015.
 32. Marcoux, J., et al., *Mass spectrometry defines the C-terminal dimerization domain and enables modeling of the structure of full-length OmpA*. *Structure*, 2014. **22**(5): p. 781-790.
 33. Politis, A., et al., *Topological models of heteromeric protein assemblies from mass spectrometry: application to the yeast eIF3: eIF5 complex*. *Chemistry & biology*, 2015. **22**(1): p. 117-128.
 34. Politis, A., et al., *Integrative modelling coupled with ion mobility mass spectrometry reveals structural features of the clamp loader in complex with single-stranded DNA binding protein*. *Journal of molecular biology*, 2013. **425**(23): p. 4790-4801.
 35. Benesch, J.L. and C.V. Robinson, *Mass spectrometry of macromolecular assemblies: preservation and dissociation*. *Current opinion in structural biology*, 2006. **16**(2): p. 245-251.
 36. Lössl, P., J. Snijder, and A.J. Heck, *Boundaries of mass resolution in native mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014. **25**(6): p. 906-917.
 37. Atmanene, C.d., et al., *Exploring key parameters to detect subtle ligand-induced protein conformational changes using traveling wave ion mobility mass spectrometry*. *Analytical chemistry*, 2012. **84**(11): p. 4703-4710.
 38. Saliou, J.M., et al., *Combining native MS approaches to decipher archaeal box H/ACA ribonucleoprotein particle structure and activity*. *Proteomics*, 2015.
 39. van Duijn, E., et al., *Native tandem and ion mobility mass spectrometry highlight structural and modular similarities in clustered-regularly-interspaced shot-palindromic-repeats (CRISPR)-associated protein complexes from Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012. **11**(11): p. 1430-1441.
 40. Stojko, J., et al., *Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes*. *Analyst*, 2015. **140**(21): p. 7234-7245.
 41. Bush, M.F., et al., *Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology*. *Analytical chemistry*, 2010. **82**(22): p. 9557-9565.
 42. Becard, S., *Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et en mobilité ionique pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie*. 2012, Université de Strasbourg.
 43. Shvartsburg, A.A. and R.D. Smith, *Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry*. *Analytical chemistry*, 2008. **80**(24): p. 9689-9699.
 44. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. *Nature Protocols*, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.
 45. Salbo, R., et al., *Traveling-wave ion mobility mass spectrometry of protein complexes: accurate calibrated collision cross-sections of human insulin oligomers*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2012. **26**(10): p. 1181-1193.
 46. D'Atri, V., et al., *Linking molecular models with ion mobility experiments. Illustration with a rigid nucleic acid structure*. *J Mass Spectrom*, 2015. **50**(5): p. 711-26.
 47. Shvartsburg, A.A. and M.F. Jarrold, *An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions*. *Chemical Physics Letters*, 1996. **261**(1): p. 86-91.
 48. Mesleh, M., et al., *Structural information from ion mobility measurements: effects of the long-range potential*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996. **100**(40): p. 16082-16086.
 49. Wyttenbach, T., et al., *A new algorithm to characterise the degree of concaveness of a molecular surface relevant in ion mobility spectrometry*. *Molecular Physics*, 2015(ahead-of-print): p. 1-6.
 50. Marklund, E.G., et al., *Collision Cross Sections for Structural Proteomics*. *Structure*, 2015. **23**(4): p. 791-799.
 51. Van Duijn, E., *Current limitations in native mass spectrometry based structural biology*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010. **21**(6): p. 971-978.
 52. Clemmer, D.E., *Clemmer Group Cross Section Database*. 2010.
 53. Bush, M.F., *Bush Lab Collision Cross Section Database*. <http://depts.washington.edu/bushlab/ccsdatabase/>, 2015.
 54. Tang, K., J.S. Page, and R.D. Smith, *Charge competition and the linear dynamic range of detection in electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004. **15**(10): p. 1416-1423.
 55. Jurnecko, E. and P.E. Barran, *How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? The relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase*. *Analyst*, 2011. **136**(1): p. 20-28.
 56. Maniatis, T. and R. Reed, *An extensive network of coupling among gene expression machines*. *Nature*,

2002. **416**(6880): p. 499-506.
57. Proudfoot, N.J., A. Furger, and M.J. Dye, *Integrating mRNA processing with transcription*. Cell, 2002. **108**(4): p. 501-512.
 58. Shuman, S., *Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus*. Progress in nucleic acid research and molecular biology, 2000. **66**: p. 1-40.
 59. Nilsen, T.W. and B.R. Graveley, *Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing*. Nature, 2010. **463**(7280): p. 457-463.
 60. Shi, Y., et al., *Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex*. Molecular Cell, 2009. **33**(3): p. 365-376.
 61. Richard, P. and J.L. Manley, *Transcription termination by nuclear RNA polymerases*. Genes & development, 2009. **23**(11): p. 1247-1269.
 62. Wu, X. and G. Brewer, *The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0*. Gene, 2012. **500**(1): p. 10-21.
 63. Michalova, E., B. Vojtesek, and R. Hrstka, *Impaired Pre-mRNA processing and altered architecture of 3'untranslated regions contribute to the development of human disorders*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(8): p. 15681-15694.
 64. Higgs, D., et al., *α -Thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation*. 1983.
 65. Dupin, A., *Etude biophysique des éléments de maturation 3'des ARN pré-messagers*. 2014.
 66. Gordon, J.M., et al., *Reconstitution of CF IA from overexpressed subunits reveals stoichiometry and provides insights into molecular topology*. Biochemistry, 2011. **50**(47): p. 10203-10214.
 67. Barillà, D., B.A. Lee, and N.J. Proudfoot, *Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II in Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(2): p. 445-450.
 68. Chen, J. and C. Moore, *Separation of factors required for cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNA*. Molecular and Cellular Biology, 1992. **12**(8): p. 3470-3481.
 69. Pancevac, C., et al., *Structure of the Rna15 RRM-RNA complex reveals the molecular basis of GU specificity in transcriptional 3'-end processing factors*. Nucleic acids research, 2010: p. gkq002.
 70. Kessler, M.M., et al., *Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast*. Genes & development, 1997. **11**(19): p. 2545-2556.
 71. Minvielle-Sebastia, L., et al., *The major yeast poly (A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(15): p. 7897-7902.
 72. Hammell, C.M., et al., *Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export*. Molecular and Cellular Biology, 2002. **22**(18): p. 6441-6457.
 73. Al Husini, N., P. Kudla, and A. Ansari, *A role for CFIA 3' end processing complex in promoter-associated transcription*. PLoS Genet, 2013. **9**(8): p. e1003722.
 74. Gross, S. and C. Moore, *Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of Saccharomyces cerevisiae cleavage factor I*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(11): p. 6080-6085.
 75. Meinhart, A. and P. Cramer, *Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 223-226.
 76. Noble, C.G., et al., *Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD*. Nature Structural & Molecular Biology, 2005. **12**(2): p. 144-151.
 77. Leeper, T.C., et al., *Novel protein-protein contacts facilitate mRNA 3'-processing signal recognition by Rna15 and Hrp1*. Journal of molecular biology, 2010. **401**(3): p. 334-349.
 78. Takagaki, Y. and J.L. Manley, *RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF*. Molecular and Cellular Biology, 1997. **17**(7): p. 3907-3914.
 79. Holbein, S., et al., *The P-loop domain of yeast Clp1 mediates interactions between CF IA and CPF factors in pre-mRNA 3' end formation*. Plos One, 2011. **6**(12): p. 1-10.
 80. Kyburz, A., et al., *The role of the yeast cleavage and polyadenylation factor subunit Ydh1p/Cft2p in pre-mRNA 3'-end formation*. Nucleic acids research, 2003. **31**(14): p. 3936-3945.
 81. Bai, Y., et al., *Crystal structure of murine CstF-77: dimeric association and implications for polyadenylation of mRNA precursors*. Molecular Cell, 2007. **25**(6): p. 863-875.
 82. Legrand, P., et al., *The structure of the CstF-77 homodimer provides insights into CstF assembly*. Nucleic acids research, 2007. **35**(13): p. 4515-4522.
 83. Paulson, A.R. and L. Tong, *Crystal structure of the Rna14-Rna15 complex*. Rna, 2012. **18**(6): p. 1154-1162.
 84. Noble, C.G., et al., *Rna14-Rna15 assembly mediates the RNA-binding capability of Saccharomyces cerevisiae cleavage factor IA*. Nucleic acids research, 2004. **32**(11): p. 3364-3375.
 85. Moreno-Morecillo, M., et al., *Locked tether formation by cooperative folding of Rna14p monkeytail and Rna15p hinge domains in the yeast CF IA complex*. Structure, 2011. **19**(4): p. 534-545.

86. Noble, C.G., B. Beuth, and I.A. Taylor, *Structure of a nucleotide-bound Clp1-Pcf11 polyadenylation factor*. Nucleic acids research, 2007. **35**(1): p. 87-99.
87. Dupin, A.F. and S. Fribourg, *Structural basis for ATP loss by Clp1p in a G135R mutant protein*. Biochimie, 2014. **101**: p. 203-207.
88. Qu, X., et al., *The C-terminal domains of vertebrate CstF-64 and its yeast orthologue Rna15 form a new structure critical for mRNA 3'-end processing*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(3): p. 2101-2115.
89. Sadowski, M., et al., *Independent functions of yeast Pcf11p in pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination*. The EMBO journal, 2003. **22**(9): p. 2167-2177.
90. Barnwal, R.P., et al., *Structural and biochemical analysis of the assembly and function of the yeast pre-mRNA 3' end processing complex CF I*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(52): p. 21342-21347.
91. Romier, C., et al., *Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2006. **62**(10): p. 1232-1242.
92. Fribourg, S., et al., *Dissecting the interaction network of multiprotein complexes by pairwise coexpression of subunits in E. coli*. Journal of molecular biology, 2001. **306**(2): p. 363-373.
93. Geoghegan, K.F., et al., *Spontaneous α -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): p. 169-184.
94. Hanada, T., et al., *CLPI links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss*. Nature, 2013. **495**(7442): p. 474-480.
95. Dikfidan, A., et al., *RNA specificity and regulation of catalysis in the eukaryotic polynucleotide kinase Clp1*. Molecular Cell, 2014. **54**(6): p. 975-986.
96. Lane, L.A., et al., *Mass spectrometry reveals stable modules in holo and apo RNA polymerases I and III*. Structure, 2011. **19**(1): p. 90-100.
97. Benesch, J.L. and B.T. Ruotolo, *Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(5): p. 641-9.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'introduction bibliographique de ce travail de thèse a permis de rappeler le rôle fondamental des interactions non-covalentes, support moléculaire de la régulation cellulaire. Leur implication dans de nombreuses pathologies nécessite une compréhension structurale approfondie des complexes supramoléculaires gouvernés par ces forces. Bien que l'étude de ces assemblages profite aujourd'hui d'un large éventail de techniques biophysiques, l'évolution de leur complexité (taille, hétérogénéité, solubilité, quantité de matériel disponible) se heurte progressivement aux limitations de ces approches de biologie structurale.

Parmi les stratégies de contournement de ces écueils, l'accès à de nouvelles approches émergentes et alternatives s'est révélé particulièrement prometteur, notamment dans le domaine de la spectrométrie de masse. Les développements instrumentaux apportés à cette discipline durant ces 20 dernières années, ont permis l'extension de ses performances et son couplage à de nombreuses techniques séparatives et analytiques. La déclinaison de cette technique en de nombreuses approches hybrides, orthogonales aux techniques conventionnelles (cristallographie, RMN etc.), promet aujourd'hui la caractérisation de systèmes non-covalents en phase gazeuse par MS structurale. Néanmoins, le potentiel de ces approches relativement récentes reste à ce jour largement sous-exploité, nécessitant le développement de méthodes expérimentales et instrumentales avancées et une meilleure intégration des informations issues de ces différentes techniques.

Ces défis majeurs ont défini les lignes directrices de ce travail de thèse, s'articulant autour de 2 techniques de MS structurale particulièrement sollicitées : la MS native et son couplage à la mobilité ionique (IM-MS native). Les développements méthodologiques réalisés au cours de ce travail, ont ainsi permis de repousser les limites de résolution dans ces 2 dimensions. L'application de ces méthodes à l'étude de systèmes biologiques de composition et complexité variables, souligne le potentiel de la MS native et de l'IM-MS native pour la caractérisation structurale et conformationnelle de ces édifices.

La seconde partie de ce travail de thèse a tout d'abord permis de démontrer l'apport de la haute résolution en MS native, à travers l'évaluation d'un nouvel instrument à analyseur Orbitrap (Exactive Plus EMR, Thermo Fisher Scientific) dédié à cette approche. L'optimisation instrumentale initialement réalisée sur un ensemble de protéines modèles a contribué au

développement de méthodes sensibles et résolutive, adaptées à l'analyse supramoléculaire. La comparaison de ces données à celles obtenues sur un instrument de type Q-TOF (Synapt G2 HDMS, Waters) souligne les performances de transmission et de résolution de cette interface à des rapports m/z élevés. L'application de ces méthodes pour la caractérisation de molécules thérapeutiques essentielles et complexes, les anticorps thérapeutiques et leurs conjugués, illustre le potentiel de cette approche à travers 2 études :

- La première étude porte sur la caractérisation d'un mAb commercial (trastuzumab), d'un mélange de 11 mAbs déglycosylés, de complexes non-covalents anticorps:antigène et d'un ADC Cys commercial (brentuximab vedotin). Les résultats obtenus démontrent l'apport significatif de cette technologie pour l'analyse de mélanges hétérogènes par MS native, améliorant les justesses de masse mesurées (< 10ppm), la séparation d'espèces de masses proches (jusqu'à 21 Da), l'identification des profils de glycosylation (résolution à la ligne de base) et la quantification relative des différentes espèces Dn conjuguées (DAR moyen).
- La seconde étude, basée sur l'évaluation d'un nouveau « linker » dans le domaine de la bioconjugaison d'ADCs (MAPN, chimie de couplage thiol-thiol), a permis de mettre en évidence l'obtention d'un profil de conjugaison similaire entre l'ADC Lys de référence (T-DM1, DAR moyen \approx 3.4) et l'ADC Cys évalué (T-MAPN-DM1, DAR moyen \approx 3.3), l'homogénéité de ce dernier s'avérant néanmoins sensiblement optimisée.

Le travail présenté dans cette seconde partie a ouvert de nouvelles perspectives analytiques pour la caractérisation de complexes non-covalents larges et hétérogènes par MS supramoléculaire à haute résolution. Néanmoins, les limites de performance pointées au cours de ces travaux (transmission non linéaire des ions dans des gammes de m/z étendues, dissociation en phase gazeuse de complexes non-covalents protéine-ligand stabilisés par effet hydrophobe) nécessiteront une évaluation approfondie du potentiel de cet instrument à travers ces applications.

La troisième partie de ce manuscrit a été consacrée au développement de méthodes en MS native et surtout en IM-MS native, applicables au criblage de complexes protéine-ligand. Ces développements ont ici permis d'améliorer la caractérisation et quantification des propriétés de « binding » des ligands, et de repousser les limites de résolution conformationnelle accessibles sur la cellule TWIMS du Synapt G2 HDMS. La mise en place de méthodes instrumentales subtiles, alliant préservation des structures / conformations natives et sensibilité / résolution analytique, est illustrée à travers l'étude de 4 systèmes protéine-ligand :

- La première étude porte sur l'enzyme de méthylation PRMT6, impliquée dans la régulation de l'expression génique et surexprimée dans certains cancers. La caractérisation de son état oligomérique et de sa stœchiométrie d'interaction en cosubstrat / substrat par MS native, a permis de compléter les données structurales et enzymatiques disponibles sur ce système afin d'en préciser le mécanisme enzymatique, supposé « séquentiel aléatoire et processif ».
- La seconde étude est consacrée à l'enzyme dimérique Tgt, responsable de la virulence des bactéries *Shigella*, impliquées dans la dysenterie bacillaire. La mise en place d'une stratégie de quantification relative par MS native a permis le criblage subtil de ligands, capables d'induire une déstabilisation du dimère Tgt en monomères dans de faibles proportions ($\approx 1-5\%$). Le criblage de l'efficacité de ces inhibiteurs par MS native soutient les données structurales (cristallographie) et biochimiques (mesures d'affinité par radiomarquage) obtenues parallèlement sur ces complexes, orientant le développement de nouveaux ligands par approche « structure-based drug design ».
- La troisième étude se rapporte à l'enzyme PDF1B, contrôlant la déformylation des protéines bactériennes et représentant une cible thérapeutique prometteuse. Une caractérisation enzymatique et cristallographique minutieuse de cette protéine suggérait préalablement l'existence d'un mécanisme de « Slow Tight Binding » par lequel l'inhibition de cette potentielle cible thérapeutique surviendrait selon 2 types de conformations induites, dépendant de la nature du ligand. La mise en place d'un criblage fin, combinant caractérisation structurale (MS native) et conformationnelle (IM-MS native) en temps réel des complexes formés entre PDF1B et 3 ligands de référence, a permis de valider cette hypothèse. Pour la première fois, 2 types de changements conformationnels très fins (moins de 1% de différence en CCS entre les formes apo et holo) ont pu être mis en évidence par IM-MS, permettant l'identification de 2 catégories de ligand.
- La dernière étude concerne l'enzyme QR2, impliquée dans la (dé)toxification cellulaire, le stress oxydant et la neurodégénérescence. Une caractérisation fine des complexes formés entre cette cible thérapeutique, deux de ses cofacteurs (FAD, FMN) et inhibiteurs (mélatonine, resvératrol) par MS native couplée à l'IM-MS, a été rapportée. L'impact structural et conformationnel mesuré lors du recrutement différentiel de chaque ligand, a pu être confronté aux structures cristallographiques préexistantes. Cet exemple nous a permis de mettre en évidence les limitations actuelles de l'IM-MS pour le criblage d'interactions protéine-ligand.

Les travaux décrits dans cette troisième partie ont permis le développement de stratégies analytiques combinant MS et IM-MS native, particulièrement adaptées au criblage de systèmes protéine-ligand. Bien que les perspectives d'application de ces méthodes puissent dorénavant s'étendre à l'étude de subtils changements conformationnels induits ($\Delta\text{CCS} \approx 1\%$), leur optimisation chronophage et leur faible automatisation impliqueront de pouvoir être levées à des fins de criblage haut-débit.

La dernière partie de ce manuscrit s'est focalisée sur l'intégration des techniques de MS native et d'IM-MS native pour la caractérisation structurale et conformationnelle de complexes multi-protéiques de hauts poids moléculaires. Les développements méthodologiques réalisés au cours de ces travaux en MS native et plus particulièrement en IM-MS native, donnent ici accès à des mesures de $^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ plus justes par optimisation de l'étape d'étalonnage de la cellule TWIMS (Synapt G2 HDMS, Waters). L'application de ces méthodes à l'étude du complexe multi-protéique CF IA, illustre leur potentiel dans la caractérisation structurale de tels assemblages :

- Le complexe CF IA, acteur clé de la maturation des ARNm eucaryotes constitué de 4 partenaires protéiques, s'avère réfractaire aux principales techniques biophysiques, limitant sa connaissance structurale à certains fragments et domaines de partenaires individuels ou sous-complexes. La caractérisation concomitante des sous-complexes purifiés et du complexe entier par MS native et IM-MS a ainsi permis de confirmer les connectivités entre partenaires déduites des informations partielles de cristallographie. D'autre part, ces expériences ont permis d'identifier la stœchiométrie du complexe entier et de suivre l'évolution conformationnelle de ce dernier au cours de son assemblage. Ces données, prochainement combinées aux informations extraites d'analyses XL-MS, étendent la compréhension structurale du complexe CF IA et pourront servir de support à sa modélisation.

Les travaux décrits dans cette quatrième partie ont ainsi permis le développement et la combinaison de méthodes de MS native et d'IM-MS native applicables à la caractérisation structurale de complexes multi-protéiques. L'élargissement de ces combinaisons à d'autres techniques, et l'exploitation de ces informations en modélisation structurale, passent à ce jour par la mise à disposition d'outils bioinformatiques intuitifs auprès de la communauté MS.

En conclusion, ce travail de thèse s'est articulé autour du développement des approches de MS native et d'IM-MS native pour la caractérisation fine de systèmes non-covalents de nature, taille et hétérogénéité diverses. L'obtention d'informations structurales et conformationnelles fiables, reflétant les propriétés des molécules en solution, a ici impliqué une optimisation instrumentale rigoureuse dans chacune des dimensions analytiques explorées en phase gazeuse. Ces développements méthodologiques ont ainsi permis de démontrer l'apport de la MS native à haute résolution et d'étendre le potentiel du couplage IM-MS, à une large diversité de complexes non-covalents (protéines, ligands, métaux) d'intérêt biologique (complexes multi-protéiques) et pharmaceutique (mAbs, ADCs, protéines cibles thérapeutiques) grandissants.

L'orthogonalité de la MS supramoléculaire aux techniques biophysiques conventionnelles, illustrée à travers l'ensemble des études collaboratives présentées, rend aujourd'hui cette technique incontournable en biologie structurale. Les développements instrumentaux apportés à cette approche depuis 20 ans, permettent un essor permanent de ses performances analytiques, synchronisé avec l'évolution des défis analytiques actuels (protéines membranaires, complexes de plusieurs MDa etc.). L'optimisation concomitante des outils informatiques nécessaires au retraitement et à « l'hybridation » des données de MS structurale, devrait permettre de repousser la plupart des limitations actuellement rencontrées sur chacune de ces approches.

Partie expérimentale

Cette partie décrit les différentes techniques d'échange de tampon, appliquées en MS native. La préparation des échantillons exploités au cours de ce travail de thèse (parties 2,3 et 4), est indiquée sous forme de tableau, rappelant la séquence et la masse moléculaire des protéines caractérisées, ainsi que leurs conditions d'échange de tampon.

Présentation des techniques d'échange de tampon utilisées en MS supramoléculaire :

L'élimination des composés non volatils au sein des échantillons repose sur l'utilisation de techniques séparatives sensibles à la taille des composés et compatibles avec le maintien de structures quaternaires. La filtration sur gel, l'ultrafiltration ainsi que la dialyse constituent 3 méthodes couramment utilisées en MS native.

La filtration sur gel consiste en une chromatographie d'exclusion stérique, reposant sur la capacité de diffusion des espèces au sein d'une phase stationnaire de porosité définie. La différence de volume hydrodynamique entre analytes et solutés favorise la rétention des sels de bas poids moléculaire au sein de billes poreuses, généralement constituées de polyacrylamide ou de dextrane. Les molécules de grande taille sont quant à elles exclues de ces pores, permettant leur élution par centrifugation (colonnes Zeba, Thermo Scientific et Micro Bio-Spin, Bio-Rad) ou gravité (colonnes NAP-5, GE Healthcare), cette dernière s'accompagnant d'une surface d'échange plus importante mais d'une dilution de l'échantillon. Une équilibration préliminaire de la résine en présence du tampon d'échange permet ainsi un remplacement du tampon de stockage.

L'ultrafiltration s'appuie sur l'utilisation d'une membrane semi-perméable, dont le diamètre des pores conditionne la taille des espèces retenues. L'application d'une force centrifuge sur l'échantillon ainsi déposé entraîne l'élution du solvant et des solutés de taille inférieure au seuil de porosité, permettant une rétention sélective des analytes. L'enchaînement successif de cycles de dilution et concentration en présence du tampon d'échange, optimise ainsi le remplacement du tampon de stockage et offre l'avantage de pouvoir concentrer l'échantillon. Le seuil de coupure des membranes de polyethersulfone classiquement employées (colonnes Vivaspin, Sartorius) doit être choisi en fonction du poids moléculaire des espèces étudiées.

L'échange de tampon par dialyse repose sur la mise en place d'un équilibre osmotique de part et d'autre d'une membrane semi-perméable. La différence de composition et de concentration en solutés entre l'échantillon et le tampon d'échange génère un gradient, responsable d'un déplacement lent des électrolytes à travers la membrane. Cette équilibration assure un épuisement progressif des espèces non volatiles contenues dans l'échantillon, s'échangeant avec les ions du tampon d'échange. La taille des solutés échangés est imposée par le seuil de coupure de la membrane de cellulose ici utilisée (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific). La précipitation de certaines protéines au cours de ce processus peut néanmoins constituer une limite à l'utilisation de cette technique.

La concentration des protéines dessalées au cours de ces travaux, est mesurée par suivi de leur absorbance à 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Leur coefficient d'extinction molaire (ϵ , $M^{-1}.cm^{-1}$) à cette longueur d'onde est ici déterminé à partir de leur séquence théorique (ProtParam, Expasy). L'application de la loi de Beer-Lambert donne ainsi accès à leur concentration [1].

Protéine	Masse moléculaire théorique (Da)	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
Trastuzumab	148056.2 (G0F/G0F)	AcNH ₄ 150mM pH7.5	5 cycles de dessalage par ultrafiltration (Vivaspin, MWCO = 30kDa)	Chaîne légère : DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPK GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSRSGTDFTLTISSSLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTQVEIKRTVAAPSVEIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDQSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
ADC Lys T-DM1	148056.2 (DAR0, G0F/G0F)			Chaîne lourde : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELLGG PSVFLFPPPKDRLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
ADC Cys T-MAPN- DM1				Chaîne légère : DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNY QQKPGQPPKVLIIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIH PVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVE IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDQSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
ADC Cys BV	148079.7 (DAR0, G0F/G0F)	Chaîne lourde : CIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYFTFDYIITWVKQK PGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAF MQLSSLTSEDVAVYFCANYGNWFAYWGQGTQVTVSAAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSV FLFPPPKDRLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG		

MmPRMT6	46026.6	AcNH ₄ 150mM pH8.2	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (NAP-5)	GHMSLSKRRKLESGDSGGAGAGGEGAEENGGEQEAPPR PRRTKSERDQLYYEYCYSDVSVHEEMIAQDVRTEAYRLGIL KNWAALRGKTVLDVGAGTGILSIFCAQAGARRVYAVEASA IWQQAREVVRLNGLDRVHVLPGFVEVVELPERVDAIVSE WMGYGLLHESMLSSVLHARTKWLKEGGLLLPASAEFLVAP ISDQMLEWRLGFWQVQKQHYGVDMSCMESFATRCLMGHSE IVVQDLSGEDVLRARQRFQAQLELARAGLEQLEAGVGGRF RCSCYGSAPLHGFAVWFQVTFPPGGDSEKPLVLSTSPHHA THWKQALLYLNEPVPVEQDTDISGEITLLPSPDNPRRLRI LLRYKVG DHEEKTDFAMED
Tgt	43013.2	AcNH ₄ 1M pH7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0.5mL)	GSMVEATAQETDRPRFSFSIAAREGKARTGTIEMKRGVIR TPAFMPVGTAAATVKALKPETVRATGADIILGNTRYHMLRP GAERIAKLGGLHSMFGWDRPILTDSSGYQVMSSLSLTKQS EEGVTFKSHLDGSRHMLS PERSIEIQHLLGSDIVMAFDEC TPYPATPSRAASSMERSMRWAKRSRDAFDSRKEQAENAAL FGIQGGSVFENLRQQSADALAEIGFDGYAVGGLAVGEGQD EMFRVLDVSVPMPLPDDKPHYLMGVGKPDIVGAVERGIDM FDCVLPTRSGRNGQAFWTDGPIINIRNARFSEDLKPLDSEC HCAVCQKWSRAYIHHLIRAGEILGAMLMTEHNI AFYQQLM QKIRDSISEGRFSQFAQDFRARYFARNS
PDF1B	21876.1	AcNH ₄ 100mM pH7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0.5mL)	MEIVEYDPDILRAKNKRIDIFDENLKNLVDAMFDVYKTD GIGLSAPQVGLNVQMLVFNPAGEFEGEKEIVLVNPKIKKY SDKLVPFDEGCLSPFGIYAEVVRPQSVKIDARDITGERFS ISLSSLPARIFQHEYDHLEGLVFFDRMTDQVLDSIREELE ALEKKYEEKTGLPSPERVEARQKRKAGVGFGR
QR1	30867.6	AcNH ₄ 200mM pH7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0.5mL)	MVGRRALIVLAHSERTSFNYAMKEAAAAALKKKGWEVVS DLYAMNFNPIISRKDI TGKLDKDPANFQYPAESV LAYKEGH LSPDIVAEQKLEAADLVIFQFP LQWFGVPAILKGWFERV FIGEFAYTYAAMYDKGPFRRSKAVLSITGGSGMYSLQG IHGDMNVILWPIQSGILHFCGQVLEPQLTYSIGHTPADA RIQILEGWKKRLENIWDETPLYFAPSSFLDNLNFQAGFLMK KEVQDEEKNNKFGLSVGHHLGKSIPTDNQIKARK
QR2 ^l	25952.5			MAGKKVLIVYAHQEPKSFNGSLKNVAVDEL SRQGCTVTVS DLYAMNFEPRATDKDITGTLNSNEPVFN YGVETHEAYKQRS LASDITDEQKVRREADLVIFQFP L YWFSVPAILKGWMDRV LCQGFADFIPGFYDSGLLQGK LALLSVTTGGTAEMYTKTG VNGDSRYFLWPLQHGLHFCGFKVLAPQISFAPEIASEEE RKMVAAWSQRLQTIWKEFIPCTAHWHFGQ
QR2 ^h ¹³ C- ¹⁵ N	27425.6			
Sous-complexe Clp1p:HisPcf1p [454-563]	Clp1p : 50225.7 His HisPcf1p [454-563] : 15260.2	AcNH ₄ 250mM pH7.5	5 cycles de dessalage par ultrafiltration (Vivaspin, MWCO = 10kDa)	Clp1p : MASLPGIDEHTTSEELITGDNEWHKLVIPKGS DWQIDLKA EGKLIVKVN S GIVEIFGTE LAVDDEYTFQNWKFPIYAVEE TELLWKCPDLTNTITVKPNHTMKYIYNLHFMLEKIRMSN FEGPRVIVGGSQTGKTSLSRTLCSYALKFNAYQPLYINL DPQQPIFTVPGCISATPISDILDAQLPTWGQSLTSGATLL HNKQPMVKNFGLERINENKDLYLECISQLGQVVGQRLHLD PQVRRSGCIVDTPSISQLDENLAE LHIIIEKLVNIMLVL CSETDPLWEVKKTFGPELGNNNIFFIPKLDGVS AVDDVY KRSLQRTSIREYFYGSLDTALSPYAIGVDYEDLTIWKPSN VFDNEVGRVELFPVITIPSNLQHAI IAITFAERRADQATV IKSPILGFALITEVNEKRRKRLVLLPVPGR LPSKAMILTS YRYLE His HisPcf1p[454-563] (mutation S485A) : MGSSHHHHHSSSGTGS GENLYFQGHM GSQNTANTGISNSN LNTTTTRKNIQSRNWY LADSQWAAFKDEITSTKHKNDYT DPHANKNIDKSALNIHADENDEGSVDNTLGSDRSNELEIR GKYVVVPETSQDMAFKGS

<p>Sous-complexe Rna14p:HisRna15p</p>	<p>Rna14p : 79960.4 HisRna15p : 35470.4</p>		<p>2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (NAP-5)</p>	<p>Rna14p : MSSSTPDDLlyPSADKVAEPsDNIHGDELRLRERIKDNPTNlLS YFQLIQyleTQESYAKVREvYEQFHNTFPFYSPAWTLQLKGEla RDEFETVEKILAQCLSGKLENNDLsWSTYLDYIRRKNNLIITGG QEARAVIVKAFQLVMQKCAIFEPKSSsFWNEyLNfLEQWkPFNK WEEQQRIDMLREFYKkMLCVPFdNLEKMWNRyTQWEQEINSLTA RKfIGELsAEYMKARSlyQEWLNVTNGLKRASPINLRTANKKNI PQPGTSDSNIQQLIWLNWIKWERENKMLsEDMLsQRISYVYK QGIQYMIFSaEMWYDYSMyISENSDRQNIlyTALLANPDSPsLT FKLSECYELDNDSesVSNCFDKCTQTLLsQYKkIASDVNSGEdN NTEYEQELLYKQREKLTfVFCVYMMNTMKRISGLsAARTVFGKCR KlKRILThdVYVENAYLEfQnQNDYkTAFKvLELGLKYfQNDGV YINKYLDfLIFLNKDSQIKTLfETSVEKvQDlTQLKEIYKkMIS YESKfGNLNVYsLEKRFfERfPQENLIEVFTSRyQIQNSNLIK KLELYMYNEEDSYfSSGNGDGHGSYnMSSsDRKRLMEETfGN NGNfSNKkFKRDSelPTEVLdLLSVIPKRQYfNTNLLDQKLVN FLNDQVEIPtVESTKSG</p> <p>HisRna15p : MGSSHHHHHSSGTGSGENLYFQGHMNRQSGVnAGVQNNPPSRV VYLGSIPYDQTEEQILDLCSNVGPVINLKMfDPQTGRSKGYAF IEFRDLESSASAVRNlNGYQLGSRFLKCGYSSNSDIsGVsQQQ QQYNNINGNNNNNGNNNSNGPFDQNSGNANFLsQKfPELPSG IDVINMTTPAMMISSELAKKPEVQLKfLQKfQEWTRAHPEDA ASLLELCPQLSFVTAELLLTNGICKVDDLIPLASRPQEEASATN NNSVNEVVDPAVLNKQKELLKQVLQlNDSQISILPDDERMAIWD LKQKALRGEFGAF</p>
<p>Complexe CF IA entier</p>	<p>Rna15p : 32818.7 Rna14p : 79960.4 Clp1p : 50225.7 HisPcf11p ΔQ : 72043.3</p>	<p>AcNH₄ 250mM pH7.5</p>	<p>10 cycles de dessalage par ultrafiltration (Vivaspin, MWCO = 10kDa)</p>	<p>Rna15p : MNRQSGVnAGVQNNPPSRVYLGSIPYDQTEEQILDLCSNVGPV INLKMfDPQTGRSKGYAFIEFRDLESSASAVRNlNGYQLGSRF LRcGYSSNSDIsGVsQQQQQYNNINGNNNNNGNNNSNGPFD QNSGNANFLsQKfPELPSGIDVINMTTPAMMISSELAKKPEV QLKfLQKfQEWTRAHPEDAASLLELCPQLSFVTAELLLTNGICK VDDLIPLASRPQEEASATNNSVNEVVDPAVLNKQKELLKQVLQ LNDsQISILPDDERMAIWDLKQKALRGEFGAF</p> <p>Rna14p : Voir « sous-complexe Rna14p:HisRna15p »</p> <p>Clp1p : Voir « sous-complexe Clp1p:HisPcf11p[454-563] »</p> <p>HisPcf11pΔQ : MGSSHHHHHSSGTGSGENLYFQGHMDHDTEVIKDFNSILEEL TFNSRPITTLTKLAEENISCAQYFVDAIESRIEKCMKPKLYA FYALDSICKNVGSPYTIYFSRNLFNLYKRTYLLVDNTRTKLIN MFKLWLNPNdTGLPLfEGSALEKIEQFLIKASALHQNLQAMLP TPTVPLLRDIDKLTCLTSERLKNQPNDEKLKMLLVLsQLKQE LKREKLTlNALKQVQMLRQVFSQDQVQLQERMRyHELYHETKD MVGsYtQNSNAIPLFGNNSDTTNQNSLSSSLFGNIsGVESfQ EIEKkSLNKINNLYASLKAEGLIYTPPKESIVTLyKkLNGHSN YSLDSHEKQLMKNLPKIPLNDILSDCKAYFATVNIIDVlNNSPL QLSEQTLQENPIVQNNLIHLLYRSKPNKCSVCGKRfGNSESEK LLQNEHLDWHFRINTRIKGSQNTANTGISNSNLMTTTRKNIQS RNWYLSDSQWAAFKDDEITSTKHNDYTDPhANKNIDKSALNIH ADENDEGSVDNTLGSDRSNELEIRGKYVVVPETSQDMAFKPCIC KETVTGVYDEESGEVWKNtIEVNGKYfHSTCYHETSQNSsKSN SGKVLGDDLLKkLVTK</p>

Les expériences de titrage réalisées en présence de ligands solubilisés en éthanol (ligands PDF1B, mélatonine, resvératrol) ou en DMSO (inhibiteurs TGT), n'excèdent pas 0.5% de solvant organique final (volume/volume).

Référence:

1. Aitken, A. and M. Learmonth, *Protein determination by UV absorption*, in *The protein protocols handbook*.

1996, Springer. p. 3-6.

*Liste des publications et
communications*

Liste des publications

1. Xuan Y, Debaene F, Stojko J, Beck A, Van Dorsselaer A, Cianfèrani S, Bromirski M. Monoclonal antibody and related product characterization under native conditions using a benchtop Exactive Plus EMR MS. *Thermo Fisher Scientific* (2014), *Application Note 597*.
2. Bonnefond L, Stojko J, Mailliot J, Troffer-Charlier N, Cura V, Wurtz JM, Cianfèrani S, Cavarelli J. Functional insights from high resolution structures of mouse protein arginine methyltransferase 6. *J. Struct. Biol.* (2015), *191*, 175-183.
3. Koniev O*, Kolodych S*, Baatarkhuu Z, Stojko J, Eberova J, Bonnefoy JY, Cianfèrani S, Van Dorsselaer A, Wagner A. MAPN: First-in-class reagent for kinetically resolved thiol-to-thiol conjugation. *Bioconjugate Chem.* (2015), *26*, 1863-1867.
4. Stojko J, Fieulaine S, Petiot-Bécard S, Van Dorsselaer A, Meinnel T, Giglione C, Cianfèrani S. Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *Analyst* (2015), *140*, 7234-7245.
5. Thebault S*, Agez M*, Chi X, Stojko J, Cura V, Telerman S, Maillet L, Gautier F, Billas-Massobrio I, Birck C, Troffer-Charlier N, Karafin T, Honoré J, Senff-Ribeiro A, Montessuit S, Johnson C, Juin P, Cianfèrani S, Martinou JC, Andrews D, Amson R, Telerman A, Cavarelli J. TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. *Scientific Reports* (2016) – *sous presse*.
6. Stojko J*, Dupin A*, Beaurepaire L, Chaignepain S, Van Dorsselaer A, Schmitter JM, Cianfèrani S, Minvielle-Sébastien L, Fribourg S. A combination of structural MS approaches to decipher yeast mRNA 3'-end maturation complex CF IA structural characterization. *Article en cours de rédaction pour une soumission dans International Journal of Mass Spectrometry*.

* contribution équivalente de deux auteurs.

Communications orales


1. Stojko J, Van Dorsselaer A, Cianfèrani S. Ion Mobility Mass Spectrometry: A promising tool for biomolecules characterization. 2nd Student Symposium of the IPHC, May 2013, Strasbourg.
2. Stojko J, Van Dorsselaer A, Cianfèrani S. Ion Mobility Mass Spectrometry: A promising tool for biomolecules characterization. Journée des doctorants de l'Ecole Doctorale (JDD), Novembre 2013, Strasbourg.

3. Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility. Club Jeune de la Société Française Spectrométrie de Masse (CJSFSM), Mars 2014, Dieppe.
4. Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility. Workshop on Native Mass Spectrometry and Ion Mobility, April 2014, Strasbourg.
5. Plumel M, Westermann B, Terral G, Stojko J. Characterization of protein complexes by structural MS. Journée des doctorants de l'IPHC, Juin 2014, Strasbourg.
6. Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility., Congrès Français de Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP), Juillet 2014, Lyon.

Communications par affiche

1. Stojko J, Debaene F, Xuan Y, Bromirski M, Van Dorsselaer A, Beck A, Cianférani S. High resolution Orbitrap native MS for mAbs and related products characterization. 9th annual European Antibody Congress (EAC), November 2013, Geneva.
2. Stojko J, Petiot-Bécard S, Fieulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C, Cianférani S. Real-time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility. International Conference on Isolated Biomolecules and Biomolecular Interactions (IBBI), May 2014, Porquerolles.
3. Stojko J, Dupin A, Van Dorsselaer A, Fribourg S, Cianférani S. Native MS characterization of the yeast pre-mRNA 3'-end maturation complex CF IA. 4th Symposium on Structural Proteomics (SSP), November 2014, Antwerp (Belgium).
4. Stojko J, Dupin A, Beaurepaire L, Van Dorsselaer A, Fribourg S, Cianférani S. Combining native MS & IM-MS for structural elucidation of the yeast mRNA 3'-end maturation complex CF IA. 63rd American Society for Mass Spectrometry (ASMS) conference, June 2015, Saint-Louis (USA).
5. Stojko J, Dupin A, Beaurepaire L, Van Dorsselaer A, Fribourg S, Cianférani S. Combining native MS & IM-MS for structural elucidation of the yeast mRNA 3'-end maturation complex CF IA., Congrès Français de Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP), Septembre 2015, Ajaccio.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL

Received: 15 September 2015

Accepted: 17 December 2015

Published: 27 January 2016

Stéphanie Thébault^{1,2,*}, Morgane Agez^{1,3,*}, Xiaoke Chi^{4,5}, Johann Stojko⁶, Vincent Cura¹, Stéphanie B. Telerman^{7,8}, Laurent Maillat⁹, Fabien Gautier^{9,10}, Isabelle Billas-Massobrio¹, Catherine Birck¹, Nathalie Troffer-Charlier¹, Teele Karafin^{2,3}, Joane Honoré³, Andrea Senff-Ribeiro^{2,3}, Sylvie Montessuit¹¹, Christopher M. Johnson⁸, Philippe Juin^{9,10}, Sarah Cianféran⁶, Jean-Claude Martinou¹¹, David W. Andrews^{4,5}, Robert Amson^{2,3,#}, Adam Telerman^{2,3,#} & Jean Cavarelli^{1,#}

Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) is anti-apoptotic, key in development and cancer, however without the typical Bcl2 family members structure. Here we report that TCTP contains a BH3-like domain and forms heterocomplexes with Bcl-xL. The crystal structure of a Bcl-xL deletion variant-TCTP₁₁₋₃₁ complex reveals that TCTP refolds in a helical conformation upon binding the BH3-groove of Bcl-xL, although lacking the *h1*-subregion interaction. Experiments using *in vitro-vivo* reconstituted systems and TCTP^{+/-} mice indicate that TCTP activates the anti-apoptotic function of Bcl-xL, in contrast to all other BH3-proteins. Replacing the non-conserved *h1* of TCTP by that of Bax drastically increases the affinity of this hybrid for Bcl-xL, modifying its biological properties. This work reveals a novel class of BH3-proteins potentiating the anti-apoptotic function of Bcl-xL.

Members of the Bcl2 family of proteins play a critical role in governing the cell death program¹. This family of Bcl2 proteins can be functionally divided into the pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins. They contain sub-domains that are conserved to variable extent and are called BH domains, because of their homology to Bcl2 (BH: Bcl2 homology domain). As referred to previously², distant cousins of this family are termed BH3-only proteins and share the third homology domain, typically represented by Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa and others as reviewed¹. These BH3-only proteins are pro-apoptotic by either activating other pro-apoptotic proteins (Bax and Bak) or inhibiting the anti-apoptotic proteins (Bcl2, Bcl-xL, Mcl1, Bcl-w and A1). Hitherto, all known BH3-only proteins binding Bcl-xL inhibit its anti-apoptotic function by a well-established mechanism³, yet there are no BH3-proteins described activating Bcl-xL. Intriguingly the binding of these BH3-proteins to a very similar site on Bax results in the activation of its pro-apoptotic function. It remains completely unknown how the anti-apoptotic function of Bcl-xL could be potentiated.

¹Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, CNRS UMR 7104, INSERM U964, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, F-67404 Illkirch, France. ²CNRS-UMR 8113, LBPA, École Normale Supérieure, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France. ³Institut Gustave Roussy, Unité Inserm U981, Bâtiment B2M, 114 rue Édouard-Vaillant, 94805 Villejuif, France. ⁴Sunnybrook Research Institute and Departments of Biochemistry and Medical Biophysics, University of Toronto, 2075 Bayview Ave., Toronto, Ontario, M4N 3M5, Canada. ⁵Department of Chemistry and Chemical Biology, McMaster University, 1280 Main St. W. Hamilton, Ontario, L8N 3Z5, Canada. ⁶Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France. ⁷King's College London Centre for Stem Cells and Regenerative Medicine, Tower Wing, Guy's Hospital, Great Maze Pond, London SE1 9RT, UK. ⁸MRC Laboratory of Molecular Biology, Francis Crick Avenue, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge CB2 0QH, UK. ⁹Center for Cancer Research Nantes-Angers, UMR 892 Inserm - 6299 CNRS/Université de Nantes, IRS-UN, 8 Quai Moncoussu - BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1. ¹⁰Institut de Cancérologie de l'Ouest, Centre René Gauducheau Bd Jacques Monod, 44805 Saint Herblain-Nantes cedex. ¹¹Department of Cell Biology, University of Geneva, 30, quai Ansermet, 1211 Geneva 4, Switzerland. *These authors contributed equally to this work. #These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.T. (email: atelerman@gmail.com) or J.C. (email: cava@igbmc.fr)

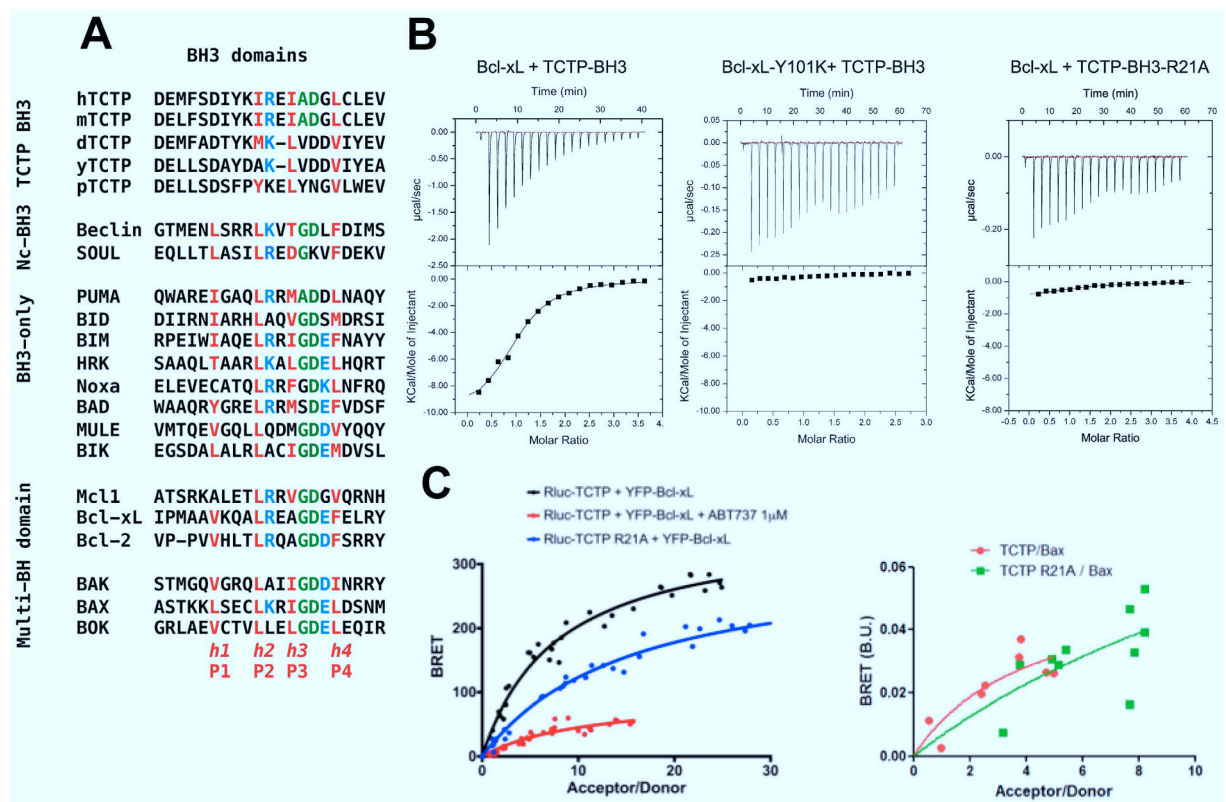


Figure 1. TCTP contains a non-canonical BH3 domain interacting with the BH3 groove of Bcl-xL.

(A) Sequence alignment of the N-terminal region of TCTP (h:human; m:mouse; d:Drosophila; y:yeast; p:plant) with other BH3 domain containing proteins. In red, the conserved hydrophobic residues of the BH3 domain (named *h1* (P1), *h2* (P2), *h3* (P3) and *h4* (P4)). In green, the GD signature of BH3 domains. In blue, the conserved charged residues. (B) Interaction between Bcl-xL and TCTP-BH3 peptides. Calorimetric titration between (left panel) Bcl-xL (0.065 mM) and increasing amount of TCTP-BH3 (1.39 mM); (middle panel) Bcl-xL-Y101K (0.072 mM) and increasing amount of TCTP-BH3 (0.955 mM); (right panel) Bcl-xL (0.065 mM) and increasing amount of TCTP-BH3-R21A (1.26 mM). Each experiment was carried out at 30 °C in 50 mM ammonium bicarbonate pH 9. (C) *In cellulo* BRET analysis between TCTP and Bcl-xL, inhibition by ABT-737, lack of binding for the R21A TCTP to Bcl-xL (left panel) and Bax (right panel).

Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP/tpt1) is a regulator of pluripotency⁴, the cancer stem cell compartment⁵, the tumor reversion program^{5–9}, tumor progression^{5–9} and certain forms of inflammatory diseases¹⁰. It was described as a pro-survival protein by potentiating both Mcl1^{11,12} and Bcl-xL¹³ and antagonizing the P53 tumor suppressor⁵. It remains unknown how TCTP regulates Bcl-xL. The initial structural analysis of TCTP indicated that it was highly conserved through phylogeny and could be related to MSS4 without any link to proteins of the Bcl2 family or any others involved in programmed cell death¹⁴. Given the importance in cancer of the anti-apoptotic proteins of the Bcl2 family¹⁵ of which Bcl-xL is a member and the focus on therapies that inhibit Bcl-xL, it becomes relevant to provide an understanding of any positive regulators of Bcl-xL.

Results

TCTP forms heterotetrameric complexes with Bcl-xL. By using extensive biochemical and biophysical studies (Supplementary Figs 1–6) we show that TCTP forms heterotetrameric complexes with Bcl-xL via crucial interactions between the N-Terminal region of TCTP (TCTP_{11–31}) and the BH3 binding groove of Bcl-xL. Bcl-xL-Y101K mutant, which cannot bind to BH3 domains¹⁶, was unable to form heterocomplexes with TCTP suggesting that the interaction is with the BH3 binding pocket on Bcl-xL. ABT-737, a molecule that specifically, and with high affinity, targets the BH3-groove, abrogated formation of the TCTP/Bcl-xL complexes. There was no complex formation between Bcl-xL and full-length TCTP-R21A N-terminal mutant. These results suggest that the N-terminal part of TCTP has a BH3-like domain that interacts with the BH3-groove of Bcl-xL (Supplementary Figs 1–6).

TCTP contains a BH3-like domain. Surprisingly, aligning the amino-acid sequence of the N-terminal region of TCTP with BH3 domains from Bcl-2 family members revealed a putative BH3 domain in TCTP (Fig. 1A), suggesting that this region might bind Bcl-xL. Although the nature of the amino-acids in the *h1* (P1) sub-region of the BH3 is not conserved in TCTP, the amino-acids in *h2* (P2), *h3* (P3) and *h4* (P4), including I20, I23 and L27 are homologous to residues found in other BH3-domains that bind to the same hydrophobic

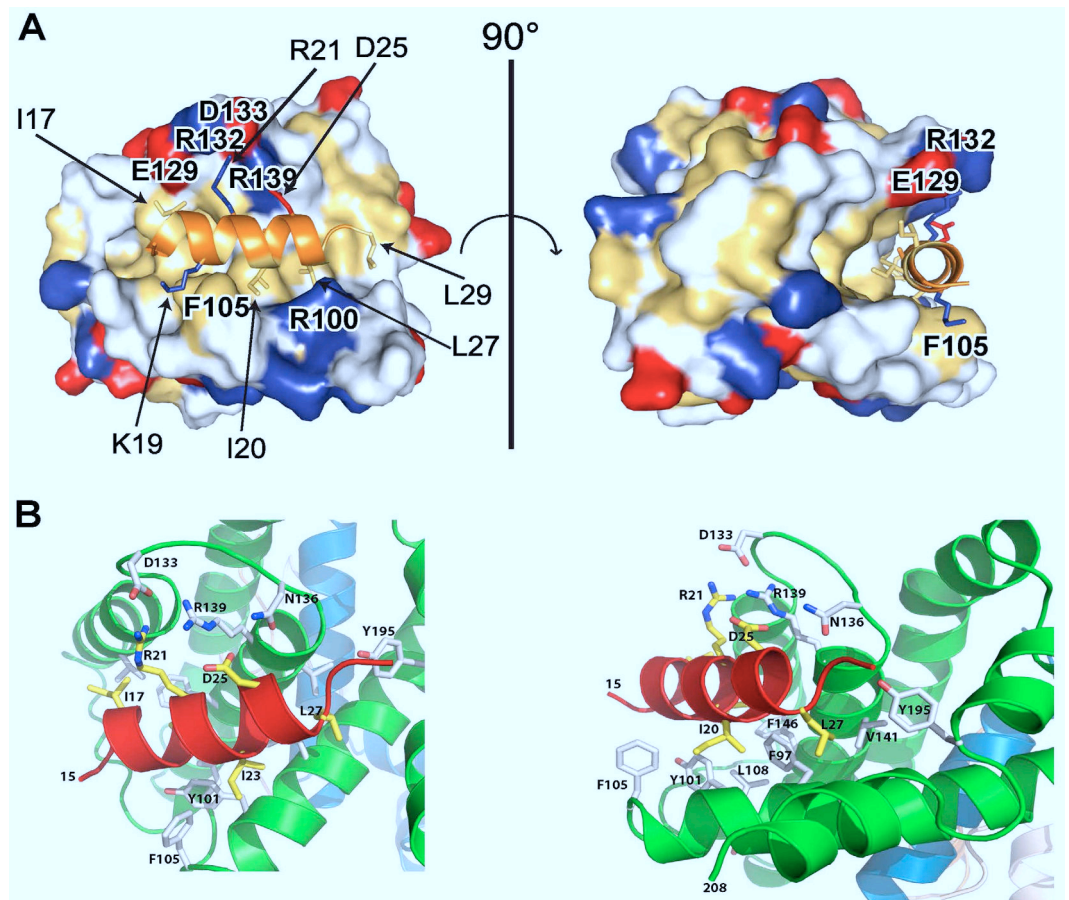


Figure 2. Crystal structure of Bcl-xL: TCTP-BH3 complex. (A) Surface diagram showing the interface between Bcl-xL and the TCTP-BH3 peptide. Bcl-xL is in the surface representation. The hydrophobic residues are drawn in yellow, positively charged residues in blue, the negatively charged residues in red, and other in white. The TCTP-BH3 peptide is represented in cartoon and colored in orange. Side chains of residues involved in the binding interface are represented as stick models. (B) Cartoon representation of truncated Bcl-xL bound to TCTP-BH3 domain. Two close views (left and right panel) of the interactions at the interfaces between one TCTP-BH3 peptide and the canonical BH3 groove of Bcl-xL. Residues involved in the interface are indicated and drawn stick models.

groove of Bcl-xL. This putative Bcl-xL-binding domain of TCTP also contains a signature (Gly/Ala)-Asp motif between the *h3* (P3) and *h4* (P4) positions (Fig. 1A), suggesting that this region of TCTP could interact with the BH3-binding pocket of Bcl-xL.

TCTP₁₁₋₃₁ BH3 domain recognizes the BH3 groove of Bcl-xL. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) (Fig. 1B) shows that TCTP₁₁₋₃₁ peptide, containing the putative BH3-domain, binds to Bcl-xL with a dissociation constant of 12 μ M. As controls for this interaction, we used two mutants: TCTP₁₁₋₃₁-R21A and Bcl-xL-Y101K. TCTP₁₁₋₃₁-R21A does not bind to Bcl-xL, and Bcl-xL-Y101K does not bind TCTP₁₁₋₃₁ (Fig. 1B). To provide evidence that this interaction between full-length TCTP and Bcl-xL occurs at the cellular level, we measured the close proximity between transiently transfected Luciferase-fused TCTP and YFP-fused Bcl-xL by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). As shown in Fig. 1C left panel, saturable BRET signals were observed between donor wild type TCTP and increasing levels of acceptor wild type Bcl-xL, indicative of a specific interaction between these proteins. In contrast, we detected no specific BRET signals between donor TCTP and acceptor, YFP-fused BAX, suggesting a lack of interaction between these two proteins (Fig. 1C right panel). BRET signals between TCTP and Bcl-xL were significantly inhibited by treatment of cells with the BH3 mimetic ABT-737 (Fig. 1C left panel), supporting the notion that the interaction relies on the BH3-binding groove of Bcl-xL. Further consistent with this, the R21A mutation in TCTP abrogated BRET signals between full-length TCTP and Bcl-xL (Fig. 1C left panel). Together these results suggest that BH3-TCTP binds to the BH3 groove of Bcl-xL.

Crystal structure of Bcl-xL bound to BH3 domain of TCTP. To provide structural details of the TCTP/Bcl-xL interaction, the crystal structure of a deletion variant of Bcl-xL (Bcl-xL Δ 27–81 Δ TM) in complex with TCTP₁₁₋₃₁ has been solved and refined at 2.1 Å (Fig. 2A,B, Supplementary Fig. 7 and Table 1). This crystal structure revealed that upon binding to Bcl-xL, the residues 16–27 of TCTP₁₁₋₃₁ completely refold into a 3 turn α -helix conformation that binds to the BH3-binding pocket of Bcl-xL, a hydrophobic groove created by helices α 2- α 5

Data collection	
X-ray source	ESRF ID29
Wavelength (Å)	0.97625
Data collection temperature (K)	100
Detector	Pilatus 6MF
Crystal-detector distance (mm)	383.18
Total rotation range (°)	180
Exposure range (°) and time (s) per image	0.1, 0.04
Mosaicity (°)	0.474
Cell parameters (Å)	a = 100.36, b = 100.36, c = 105.04, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2
Resolution range (outer shell) (Å)	46.50-2.10 (2.23-2.10)
Total number of reflections	404573 (61254)
Number of unique reflections	31973 (4976)
Completeness (%)	99.7 (98.4)
Multiplicity	12.7 (12.2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19.2 (1.1)
Rmerge	0.074 (2.2)
R_{meas}	0.077 (2.320)
$CC_{1/2}$	0.999 (0.436)
Refinement	
Resolution range (Å)	37.45 – 2.10 (2.174 – 2.10)
R-work/R-free	0.185 (0.347)/0.221 (0.361)
Number of atoms	3444
Protein; ligands; water	3377; 10; 57
Protein residues	418
RMS deviations from ideal bond lengths (Å)*	0.003
RMS deviations from ideal bond angles (°)*	0.77
Ramachandran favored (%)	98
Ramachandran outliers (%)	0
Average B-factor (Å ²)	69.10
macromolecules; ligands; solvent	69.2; 88.10; 59.10
Molprobrity Validation	
Rotamer and C-beta outliers	0.3%; 0.
Clashscore and Overall score	2.42; 1.01

Table 1. X-ray Crystallographic Data collection and structure refinement statistics. [‡]mean $I/\sigma(I)$ falls below 2.0 in the outer shell at 2.2 Å. R_{meas} is the redundancy-independent merging R factor. Highest resolution shell is shown in parenthesis.

of Bcl-xL (Fig. 2A,B). In unbound TCTP¹⁷, this N-terminal region stabilizes the β -sheet hydrophobic core of the entire TCTP protein (Supplementary Fig. 9). This suggests that the interaction between the full size Bcl-xL and TCTP induces a substantial reorganization of the known TCTP fold.

The main difference in the binding of TCTP to the Bcl-xL groove as compared to other high affinity BH3 proteins such as Bax is the absence of the first turn of the helix, located just before the canonical *h1* (P1) motif which is non-conserved in TCTP. The functional relevance of this is addressed in the final part of this work in which this region of TCTP was replaced by the *h1* subdomain of Bax.

As observed in complexes of Bcl-xL and other BH3 peptides^{18–24}, the interaction between Bcl-xL and the BH3 domain of TCTP is mediated by both hydrophobic and electrostatic interactions (Fig. 2A,B). The side chain of the hydrophobic residues at the *h2* (P2, I20), *h3* (P3, I23) and *h4* (P4, L27) positions form a network of van der Waals interactions with the Bcl-xL groove (Fig. 2A,B, Supplementary Figs 7,8). Three additional residues, I17, L29 and the side chain of K19 participate in this hydrophobic packing. Of note, since the canonical *h1* (P1) is missing in TCTP, I17 might counterbalance this absence by packing with the hydrophobic residues F97, Y101, F105, L108, V126, V141, F146 and Y195 of Bcl-xL in the target-binding pocket formed by helices $\alpha 2$ - $\alpha 5$. Furthermore several hydrogen bonds and two salt bridge interactions contribute to the recognition process: (i) R21 of TCTP BH3 domain interacts with E129 and D133 in Bcl-xL; and (ii) D25, part of the (Gly/Ala)-Asp motif between the *h3* (P3) and *h4* (P4) positions of BH3 domain (Fig. 2A), interacts with R139 in Bcl-xL. These results explain the lack of binding of the TCTP-R21A mutant described above.

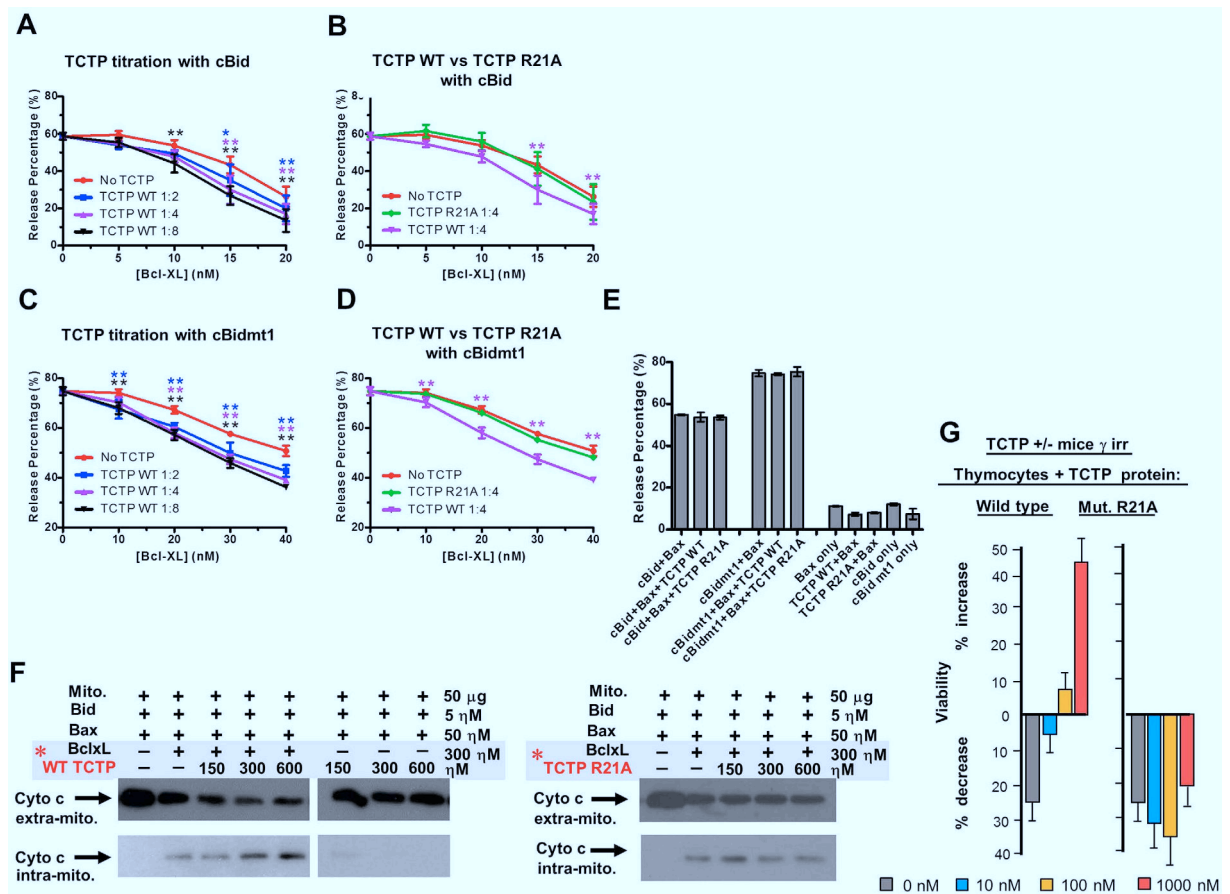


Figure 3. TCTP potentiates Bcl-xL inhibition of Bid/Bax. (A–E) *in vitro* reconstitution assay on liposome permeabilization. Increasing concentrations of Bcl-xL were incubated in different molecular ratios [Bcl-xL:TCTP] with TCTP WT (A,C) or with a fixed amount of TCTP R21A (B,D) at pH 9 for 45 min at 37°C, as specified. The treated Bcl-xL was then added to reactions containing ANTS-DPX liposomes, 100 nM Bax and 20 nM of either cBid (A,B) or cBidmt1 (C,D) at pH 7. Liposome permeabilization was quantified by fluorescence after 5h incubation at 37°C where 100% release was defined as the fluorescence change due to lipid solubilization with 1% Triton X-100. Control reactions demonstrating that TCTP had no measurable effect on the function of any of the proteins other than Bcl-xL contained 320 nM pH9 treated TCTP ANTS/DPX liposomes, 100 nM Bax and 20 nM of cBid or cBidmt1 as indicated (E). Error bars, std. dev. n = 3. To compare between the TCTP treated groups and the Control group statistically, two-way ANOVA test was performed for (A–D) and one-way ANOVA test was performed for (E). Dunnett’s multiple comparisons test was used to calculate the significance of difference between the TCTP treated groups and the corresponding control group (No TCTP for (A–D), cBid+Bax or cBidmt1+Bax for E). Colored asterisks above each data point indicate the statistical significance (*p < 0.05; **p < 0.01, no asterisks if p ≥ 0.05). A complete statistical analysis is provided in Supplementary Table 2–4. (F) Permeabilization assays of mitochondrial membrane by tBid and Bax assessing cytochrome c release. Sub-optimal amounts of Bcl-xL were added as to inhibit only partially Bax mediated cytochrome c release. Bcl-xL and variants of TCTP were pre-incubated (TCTP ranging from 1.5–6 μM and 3 μM Bcl-xL framed in gray with red asterisk to highlight the pre-incubation), pH 9, 30°C then added to the mitochondria at the concentration displayed in the figure. Cyto c intra-mito: mitochondrial fraction. Cyto c extra-mito: in the supernatant, analysed by Western blot. Similar conditions were used for mutant TCTP R21A protein. (G) Rescue of TCTP^{+/-} haploinsufficiency: Thymocytes from TCTP^{+/-} mice were γ-irradiated (γ-irr) (2.5 Gy) and cultured with WT TCTP protein or mutant R21A TCTP at concentrations 0 to 1000 nM.

***In vitro* and *in vivo* relevance of TCTP BH3 in regulating membrane permeabilization and the apoptotic process.** We further tackled the control that TCTP exerts on Bcl-xL in inhibiting Bax, using respectively an *in vitro* reconstituted system (Fig. 3A–E), then purified mitochondria (Fig. 3F) and thymocytes from TCTP^{+/-} haploinsufficient mice (Fig. 3G). To test the hypothesis that TCTP binding directly to Bcl-xL modifies Bcl-xL function, the impact of TCTP on membrane permeabilization was assayed using a well-established *in vitro* system in which purified recombinant proteins are used to permeabilize liposomes (Fig. 3, Supplementary Figs 10,11, Method summary and statistical analysis, Supplementary Table 2–4)^{25,26}. This purified assay system measures direct interactions in which full-length untagged Bcl-xL inhibits permeabilization by binding full-length caspase 8 cleaved Bid (cBid) and/or full-length untagged Bax, thereby preventing Bax oligomerization in membranes²⁶. To assess the effect of TCTP on Bcl-xL binding directly to Bax we used a mutant Bid (cBidmt1)

that binds and activates Bax but does not bind stably to Bcl-xL^{25,26}. In these assays liposome permeabilization by activated Bax releases the entrapped fluorophore/quencher pair 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS)/*p*-xylene-bispyridinium (DPX), resulting in a measurable increase of fluorescence. Recombinant TCTP enhanced Bcl-xL inhibition of both cBid/Bax and cBidmt1/Bax-mediated liposome permeabilization in a dose-dependent manner (Fig. 3A,C). As expected, in control experiments the TCTP R21A mutant protein had no effect on Bcl-xL activity (Fig. 3B,D). In control experiments designed to determine if TCTP affected the activity of cBid/cBidmt1-Bax induced membrane permeabilization, TCTP had no effect in reactions not containing Bcl-xL (Fig. 3E). Similar results were obtained using TCTP₁₁₋₃₁ or TCTP₁₁₋₃₁ R21A mutant peptides demonstrating that the putative BH3 region in TCTP is sufficient to activate Bcl-xL (Supplementary Figs 10, 11, Method summary and statistical analysis, supplementary Table 2–4). Taken together these results suggest that TCTP potentiates Bcl-xL function by increasing its interaction with Bax, and possibly also with Bid, without interfering with Bid-mediated activation of Bax.

To examine whether TCTP potentiates the anti-apoptotic effect of Bcl-xL against Bax at the mitochondrial level, we reconstituted the system with purified mitochondria²⁷. When the release of cytochrome *c* is used as a probe for Bax activity on these mitochondria, we found that wild type TCTP protein (Fig. 3F) and peptide TCTP₁₁₋₃₁ (Supplementary Fig. 12), in the presence of Bcl-xL, inhibit cytochrome *c* release in a concentration-dependent manner (Fig. 3F, Supplementary Fig. 12). TCTP R21A mutant protein (Fig. 3F), TCTP R21A full-length and peptide mutants (Supplementary Fig. 12) or a truncated TCTP peptide (TCTP₁₋₂₀) (Supplementary Fig. 12), do not potentiate Bcl-xL.

TCTP deficient mice were used to investigate the biological relevance of this interaction *in vivo*. TCTP knock out mice are embryologically lethal (E 6.5–7) due to increased cell death^{5,17,28}, however heterozygous animals are viable but haploinsufficient⁵. Typically, the thymocytes of these animals are more sensitive to γ -irradiation⁵. Thymocytes from irradiated TCTP^{+/-} mice were assessed for their viability in complementation assays in which either TCTP protein or peptide were added. Both, WT TCTP protein (Fig. 3G) and TCTP₁₋₃₁ peptide (Supplementary Fig. 13), containing the BH3 domain, rescue completely the TCTP^{+/-} haploinsufficient phenotype, reducing the sensitivity to apoptosis to that found in thymocytes of wild type animals (Fig. 3G, Supplementary Fig. 13). This anti-apoptotic function of TCTP is absent in R21A mutants (Fig. 3G, Supplementary Fig. 13). The above experiments were done by taking advantage of the fact that TCTP contains in its NH₂ terminus a protein transduction domain (PTD) with the amino-acid sequence MIIYRDLISH²⁹⁻³¹. However, all previous experiments were always performed on cell lines and not on cells directly derived from organs. It is therefore completely justified to examine how much of the full-length protein (either WT or mutant) or peptides (WT, mutant and hybrid) are penetrating efficiently irradiated thymocytes directly derived from mice, as it is the case in the present study. In all our constructs, the PTD was placed at the NH₂ end of the peptide to be transduced in order to leave the PTD intact and the FLAG sequence was fused C-terminally. The results are shown in Supplementary Figure 14 and illustrate how efficiently TCTP full-length protein and peptides WT, mutant or hybrid are penetrating the irradiated thymocytes. The concentration used for the imaging necessitated higher amounts of peptides than the biological assays which are clearly much more sensitive. The double labeling using rabbit anti-FLAG revealed by anti-rabbit-FITC (Supplementary Fig. 14D) gives a higher background than direct labeling with anti-FLAG phyco-erythrin (Supplementary Fig. 14E-F), but both methods showed that WT or mutant TCTP peptides are equally efficiently incorporated into γ -irradiated thymocytes.

Thus in different experimental systems such as liposomes, purified mitochondria and in *ex-vivo* cell assays using TCTP^{+/-} haploinsufficient mice, binding of the BH3-region of TCTP to Bcl-xL inhibits more efficiently Bax-mediated membrane permeabilization than does Bcl-xL alone.

Functional regulation of apoptosis by the non-canonical *h1* (P1) sub-region of TCTP's BH3.

Based on the structural data outlined above, it appears that the *h1* (P1) sub-region in the BH3- domain of TCTP is not conserved and is not folded as in some of the other known BH3 proteins. This *h1* (P1) sub-region from different BH3 family proteins was suggested to be functionally important³². We therefore replaced the *h1* (P1) sub-region of BH3-TCTP by that of Bax (Fig. 4A). The Bax peptide binds with relatively high affinity resulting in a measured dissociation constant (Kd) of 200 nM to Bcl-xL, the hybrid TCTP peptide containing the Bax *h1* (P1) sub-region has a similar Kd of 500 nM, both of which are much lower than 10–15 μ M Kd measured for WT TCTP (Fig. 4B).

Replacing the *h1* subdomain of TCTP by the one found in Bax completely abrogated its anti-apoptotic function when used in a complementation assay with irradiated TCTP^{+/-} haploinsufficient thymocytes, suggesting that this region confers, to a large extent, the anti-apoptotic properties of TCTP's BH3 domain (Fig. 4C). Taken together, these results for the affinities measured by ITC for complexes between WT TCTP/Bcl-xL, Bax/Bcl-xL and the hybrid Bax(*h1*)-TCTP/Bcl-xL, underline the relevance of the non-canonical *h1*-subdomain in TCTP.

Discussion

For three decades, there has been converging evidence accumulated for the role played by members of the Bcl2 family in regulating cell death during development, in physiological processes and in diseases, of which most prominently cancer³³⁻⁴⁰. However, the positive regulation and enhancement of the anti-apoptotic function of Bcl-xL remains mostly ignored⁴¹. In the present study, we report biochemical, structural and biological evidence that underlie this positive regulation of Bcl-xL by TCTP. TCTP is a major anti-apoptotic protein that exerts its activity on one side by direct binding to Bcl2 family members Mcl1 and Bcl-xL¹¹⁻¹³ and on the other side by engaging into a reciprocal negative feedback loop with p53⁵. This interaction between the N-terminal region and the BH3 domain of Bcl-xL was previously reported, however it was not anticipated at that time by what mechanism this N-terminus of TCTP binds to Bcl-xL¹³. Thus, at least two major apoptotic pathways are regulated by TCTP, namely the anti-apoptotic Bcl2 family Bcl-xL and Mcl1^{11-13,42}, and the pro-apoptotic p53⁵. In line with this,

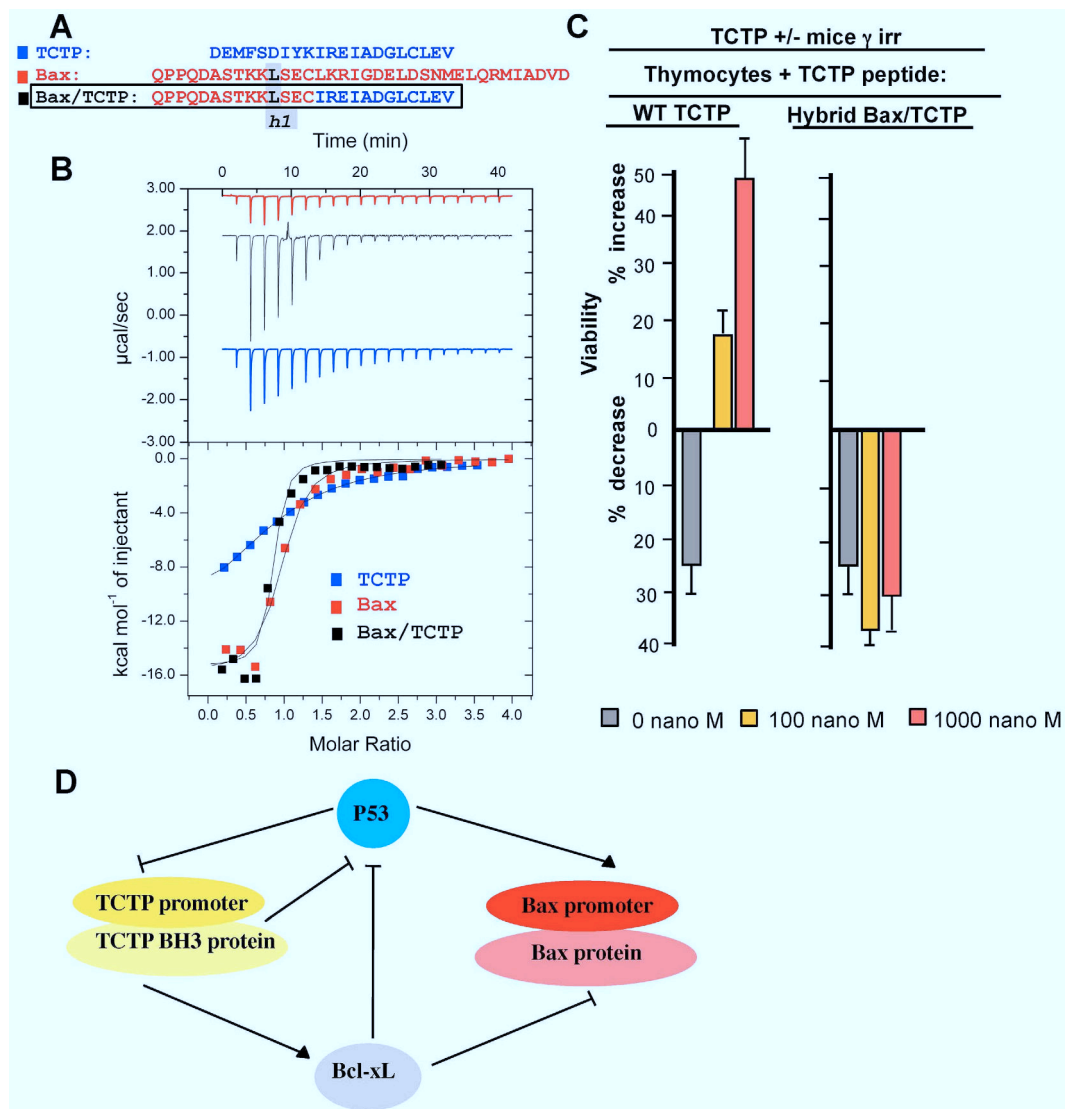


Figure 4. Molecular/functional analysis of the *h1* (P1) subregion of BH3-TCTP. (A) The three BH3 peptides (TCTP in blue, Bax in red and the hybrid Bax/TCTP aligned with the *h1* subregion framed). (B) Interaction between Bcl-xL and TCTP-BH3, or Bax or hybrid Bax/TCTP peptides. Calorimetric titration between Bcl-xL (0.043 mM) and increasing amount of TCTP-BH3 (0.75 mM) (blue curve); Bcl-xL (0.006 mM) and increasing amount of Bax (0.117 mM) (red curve); Bcl-xL (0.043 mM) and increasing amount of hybrid Bax/TCTP (0.65 mM) (black curve); Each experiment was carried at 30°C in 50 mM ammonium bicarbonate pH 9. (C) Thymocytes from TCTP^{+/-} mice were γ -irradiated (γ -irr) (2.5 Gy) and cultured in the presence of WT TCTP₁₋₃₁ peptide, hybrid Bax/TCTP peptide at the indicated concentrations ranging from 0 to 1000 nM. (D) Schematic representation of the TCTP/Bcl-xL interaction in the context of the reciprocal feedback loop between P53 and TCTP, sequestering of P53 by Bcl-xL and the control of Bax.

it was also described that reprogramming of cancer cells into revertants, which lost the malignant phenotype, parallels a drastic decrease of TCTP^{6-9,43}. Also, the most aggressive forms of breast cancer have highly elevated levels of TCTP. Normal and cancer breast stem cells have an elevated level of TCTP that warrants their survival, and knocking down TCTP decreases the mammosphere-forming efficiency⁵. All these processes are closely interconnected with programmed cell death.

In this paper, we show that TCTP forms a heterotetramer with Bcl-xL and we extensively characterized these complexes using biochemical and biophysical methods. We reveal that the formation of the TCTP/Bcl-xL complex is governed by a BH3-like domain present in the N-terminal part of TCTP. The high resolution crystal structure of the purified BH3-TCTP/Bcl-xL complex highlights a substantial refolding/reorganization of the known TCTP fold and reveals at the atomic level how TCTP interacts with the BH3-binding groove of Bcl-xL. Mutational analysis of either the Bcl-xL BH3-binding groove or TCTP supports the structural data and confirms the specificity of this recognition process. Our data suggest that the interaction between the full size Bcl-xL and TCTP proteins should probably induce a substantial reorganization of the known TCTP fold. A reorganization of Bcl-xL folding is also expected, as upon binding to the TCTP BH3 peptide, helix α 2 of Bcl-xL elongates and this elongation is

accompanied by the flipping of F105 outwards to form a hydrophobic groove that can accommodate the binding of the BH3 peptide, while Y101 is completely buried into the core hydrophobic interface with TCTP BH3 peptide. Examples of a change of conformation of Bcl-xL induced by BH3 binding have been reported. Indeed, BH3 mimetic treatment impacts on Bcl-xL localisation²⁵. Moreover, PUMA-BH3 binding to Bcl-xL partially unfolds it in such a way that its interaction with p53 via a second and distinct site is affected²³. Whether this extends to TCTP-BH3 binding to Bcl-xL requires further investigation. In all cases these data and the present work illustrate how secondary structure refolding of proteins, as reported for the widely-known examples of prion proteins⁴⁴ and few others examples, may be a key event in biology, modulating the conformation of proteins in the cell and generating different active and functional states^{45,46}.

This regulation of the anti-apoptotic process by the BH3 domain of TCTP was further corroborated in *in vitro* reconstituted systems, where the sole presence of Bax, Bid or Bim, Bcl-xL and TCTP is clearly sufficient to control membrane permeabilization. This was further confirmed on purified mitochondria and for both of these systems a mutation in the BH3 domain of TCTP abrogated its function. This was ultimately evidenced on TCTP heterozygous haploinsufficient mice in which after γ -irradiation, the apoptosis process is rescued by wild type TCTP protein or peptide but not anymore by the mutant. We also tried to understand where resides the major difference between the binding of a negative pro-apoptotic regulator such as Bax and a positive regulator such as TCTP with regard to their respective interaction to Bcl-xL. Bax binds with a much higher affinity to Bcl-xL than TCTP does, and a hybrid mutant where the h1 subregion of TCTP was replaced by this domain from Bax results in a total loss of the positive regulation of Bcl-xL by TCTP. This hybrid mutant was not able anymore to rescue the haploinsufficient phenotype TCTP^{+/-} murine thymocytes following γ -irradiation.

Our data highlight how subtle changes between two BH3 domains, more specifically here in the h1-subdomain, resulting in only a slight difference in the mode of recognition with the BH3 groove of Bcl-xL, reveal a significant increase in binding affinity, hence completely modifying the biological outcome. Combined with the structural analysis (Fig. 2A,B) where this region folds differently into Bcl-xL, these results might suggest a model wherein a rapid exchange of proteins bound to Bcl-xL occurs in favor of Bax/Bcl-xL complexes and, as such, TCTP could prime and activate Bcl-xL against Bax. It should be borne in mind that in exponentially growing cells or cancer cells where apoptosis is inhibited, TCTP levels are extremely high, even above actin⁴⁷, and that in such conditions low affinity of TCTP/Bcl-xL would be compensated by abundance.

Altogether our results demonstrate that TCTP contains a non-canonical but functional BH3-domain that binds to -and unexpectedly activates- the anti-apoptotic function of Bcl-xL. We speculate that activation is achieved by virtue of the low affinity of the interaction as mutations that increase the affinity of the interaction abolish the activity of TCTP. Perhaps, the BH3-TCTP competes with Bcl-xL H9 for the BH3-binding pocket on Bcl-xL, partially activating Bcl-xL. It would not be surprising if other proteins with non-canonical BH3 peptides potentiating the anti-apoptotic effect of specific Bcl2 family members were identified. That BH3-proteins can either increase or decrease the activity of Bcl-xL increases the complexity of the system but also highlights the potential for identification of new therapeutic targets which would not only “hit” the anti-apoptotic proteins but also positive BH3-like regulators. Our demonstration of the interplay between TCTP and Bcl-xL might also shed a new light on the effects of TCTP on p53, of which Bcl-xL is a binding partner^{5,48}. This might connect Bcl-xL and p53 to the regulation of other processes regulated by TCTP, such as cell shape and migration. Of note, it is known that TCTP interacts with the cytoskeleton⁴⁹, more specifically with centrosomes and indirectly with microtubules⁵⁰. Moreover, the inverse correlation between TCTP/RhoA and p53/cyclin A/actin expression suggests a common regulation for those proteins and their pathways⁵¹. TCTP is also implicated in the epithelial to mesenchymal transition³¹. From a more comprehensive perspective, accumulating knowledge suggest that TCTP functions as a “smart linker” unifying, regulating and ultimately defining the outcome of a wide variety of biological processes ranging from pluripotency to cell shape, cell death, tumorigenicity and tumor reversion. It exerts its function on a range of target-proteins and the data presented here indicate that both TCTP and the target -at least for TCTP/Bcl-xL- undergo major structural modifications which are probably at the basis of such a widespread biological effect of TCTP.

Methods

Constructs expression and mutagenesis. For expression as a GST-fusion protein, TCTP was cloned into a pHGGWA plasmid⁵² using the GatewayTM Technology (Invitrogen). The TCTP gene was amplified by PCR and cloned into a pDONR207 plasmid by BP reaction and then subcloned into pHGGWA plasmid by the LR reaction as described in Busso *et al.*⁵². See Supplementary Information for full details.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). BRET assays were performed as indicated in Bah *et al.*⁴¹. See Supplementary Information for full details.

Protein expression and purification. See Supplementary Information for full details.

Peptides used for *in vitro* assays and *in vivo* assays. See Supplementary Information for full details.

Complementation experiments. In order to complement the haploinsufficient TCTP^{+/-} mice with exogenous TCTP, we took advantage of the fact that the first N-terminal fragment of TCTP functions as a Protein Transduction Domain (PTD), enabling TCTP to penetrate into the cell (Supplementary Figs 13–14D) by a mechanism hitherto not well understood^{30,53–55}. Thymocytes from wild type or TCTP^{+/-} mice were irradiated (2.5 Gy of γ -irradiation) and cultured overnight in the presence of TCTP protein (Wild type or mutant TCTP protein bearing the mutation R21A) or TCTP peptide (wild type TCTP peptide 1–31, mutant TCTP peptide bearing the mutation R21A, or peptide 1–20) at concentrations ranging from 0–1000 nM.

Isothermal Titration Calorimetry experiments. Titrations were done by isothermal titration calorimetry (ITC) assays using an ITC200 calorimeter from GE-Microcal. See Supplementary Information for full details.

Crystallization, X-ray data collection, structure determination, and refinement. High-throughput crystallization screening was performed using a Mosquito liquid transfer robot (TTP Labtech) and the sitting-drop vapor diffusion method. Crystals were obtained at 20 °C by mixing 0.2 μL of reservoir solution (100 mM Pipes pH 7, 1.5 M Tris-sodium citrate) with 0.2 μL of 300 μM of Bcl-xL ($\Delta 27-81\Delta CT$) + 1 mM TCTP₁₁₋₃₁ solution in buffer containing 50 mM ammonium bicarbonate pH 9.3 and by equilibrating the mixture against 40 μL of reservoir solution. A 2.1 Å resolution data set was collected at 100 K on beamline ID29 at the European Synchrotron Radiation Facility with a Pilatus 6M detector. The crystal belongs to space group P4₁2₁2 with unit cell dimensions a = 100.36 Å, b = 100.36 Å, c = 105.04 Å and $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Diffraction data were processed, integrated, and scaled with XDS⁵⁶ and HKL2000⁵⁷. The structure of human Bcl-xL/TCTP₁₁₋₃₁ complex was solved by molecular replacement using the program Phenix⁵⁸ and coordinates from the human Bcl-xL-Beclin complex (Protein Data Bank code 2PIL²⁰) as a search model. The model was built with Coot⁵⁹ and refined with Phenix⁵⁸ and Buster⁶⁰. The statistics are summarized in Table 1. See Supplementary Information for full details. Coordinates of the refined structural model and structure factors have been deposited to the Protein Data Bank (PDB) with the accession code 4Z9V.

Interaction experiments. When not specified, proteins tested for binding experiments were mixed at 100 μM, dialyzed against 10 mM CHES pH 9, 50 mM NaCl, 1 mM DTT or TCEP, depending on the analysis, and heated overnight at 30 °C.

Gel filtration. For binding experiments, 100 to 200PL of protein mixture were loaded on a size exclusion chromatography (S200, GE Healthcare) column, while elution profiles were measured by UV absorption at 280 nm.

Size-Exclusion Chromatography coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). SEC-MALS experiments were performed on a multi-angle light scattering detector (miniDAWN TREOS, Wyatt Technologies) coupled in-line with SEC and an interferometric refractometer (Optilab T-rEX, Wyatt Technologies). See Supplementary Information for full details.

Native mass spectrometry. Prior to any mass spectrometry experiment, protein buffer was exchanged twice against a 50 mM ammonium acetate (NH₄Ac) solution at pH 9.0 using microcentrifuge gel filtration columns (Zeba 0.5 ml, Thermo Scientific, Rockford, IL). Protein concentration was determined spectrophotometrically. NanoESI-MS measurements were carried out on an electrospray quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Synapt G2 HDMS, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoESI source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY) operating in the positive ion mode. See Supplementary Information for full details.

in vitro system. purified recombinant proteins are used to permeabilize liposomes as described before^{25,26}. See Supplementary Information for full details.

Cytochrome c release assay. Mitochondria from mouse liver were purified as described by Eskes *et al.*⁶¹. See Supplementary Information for full details.

All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulation. All experimental protocols described in this paper were approved by CNRS and INSERM. All animal studies were carried out in the restricted facilities provided by the CNRS, INSERM and Institut Gustave Roussy, by authorized personnel following the prescribed rules.

References

1. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47–59 (2008).
2. Czabotar, P. E. *et al.* Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* **152**, 519–531 (2013).
3. Moldoveanu, T., Follis, A. V., Kriwacki, R. W. & Green, D. R. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 101–111 (2014).
4. Koziol, M. J., Garrett, N. & Gurdon, J. B. Tpt1 activates transcription of oct4 and nanog in transplanted somatic nuclei. *Curr. Biol.* **17**, 801–807 (2007).
5. Amson, R. *et al.* Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* **18**, 91–99 (2012).
6. Tuynder, M. *et al.* Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14976–14981 (2002).
7. Telerman, A. & Amson, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 206–216 (2009).
8. Tuynder, M. *et al.* Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15364–15369 (2004).
9. Amson, R., Pece, S., Marine, J. C., Di Fiore, P. P. & Telerman, A. TPT1/TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol.* **23**, 37–46 (2013).
10. MacDonald, S. M., Rafnar, T., Langdon, J. & Lichtenstein, L. M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **269**, 688–690 (1995).
11. Zhang, D., Li, E., Weidner, D., Mnjoyan, Z. H. & Fujise, K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J. Biol. Chem.* **277**, 37430–37438 (2002).
12. Liu, H., Peng, H. W., Cheng, Y. S., Yuan, H. S. & Yang-Yen, H. F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3117–3126 (2005).

13. Yang, Y. *et al.* An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* **24**, 4778–4788 (2005).
14. Thaw, P. *et al.* Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 701–704 (2001).
15. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 455–465 (2013).
16. Minn, A. J. *et al.* Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J.* **18**, 632–643 (1999).
17. Susini, L. *et al.* TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ.* **15**, 1211–1220 (2008).
18. Sattler, M. *et al.* Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983–986 (1997).
19. Petros, A. M. *et al.* Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci.* **9**, 2528–2534 (2000).
20. Oberstein, A., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 13123–13132 (2007).
21. Feng, W., Huang, S., Wu, H. & Zhang, M. Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of Beclin-1. *J. Mol. Biol.* **372**, 223–235 (2007).
22. Ambrosi, E. *et al.* Structural changes in the BH3 domain of SOUL protein upon interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-xL. *Biochem. J.* **438**, 291–301 (2011).
23. Follis, A. V. *et al.* PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 163–168 (2013).
24. Okamoto, T. *et al.* Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity. *ACS Chem. Biol.* **8**, 297–302 (2013).
25. Aranovich, A. *et al.* Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol. Cell* **45**, 754–763 (2012).
26. Billen, L. P., Kokoski, C. L., Lovell, J. F., Leber, B. & Andrews, D. W. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* **6**, e147 (2008).
27. Montessuit, S. *et al.* Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* **142**, 889–901 (2010).
28. Chen, S. H. *et al.* A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell* **18**, 2525–2532 (2007).
29. Kim, H. Y., Kim, S., Pyun, H. J., Maeng, J. & Lee, K. Cellular uptake mechanism of TCTP-PTD in human lung carcinoma cells. *Mol. Pharm.* **12**, 194–203 (2015).
30. Kim, H. Y. *et al.* The cell penetrating ability of the proapoptotic peptide, KLAKLAKLAKLAK fused to the N-terminal protein transduction domain of translationally controlled tumor protein, MIIYRDLISH. *Biomaterials* **32**, 5262–5268 (2011).
31. Bae, S. Y., Kim, H. J., Lee, K. J. & Lee, K. Translationally controlled tumor protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration, invasion and metastasis. *Sci Rep* **5**, 8061 (2015).
32. Lee, E. F. *et al.* The functional differences between pro-survival and pro-apoptotic B cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins depend on structural differences in their Bcl-2 homology 3 (BH3) domains. *J. Biol. Chem.* **289**, 36001–36017 (2014).
33. Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C. & Croce, C. M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**, 1097–1099 (1984).
34. Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. & Korsmeyer, S. J. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**, 879–888 (1991).
35. Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* **75**, 229–240 (1993).
36. Strasser, A., Harris, A. W. & Cory, S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* **67**, 889–899 (1991).
37. Yang, E. *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285–291 (1995).
38. Lindsten, T. *et al.* The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* **6**, 1389–1399 (2000).
39. Kvasnakul, M. *et al.* A structural viral mimic of prosurvival Bcl-2: a pivotal role for sequestering proapoptotic Bax and Bak. *Mol. Cell* **25**, 933–942 (2007).
40. Chipuk, J. E. *et al.* Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010–1014 (2004).
41. Bah, N. *et al.* Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death Dis* **5**, e1291 (2014).
42. Graidist, P., Phongdara, A. & Fujise, K. Antiapoptotic protein partners fertilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 40868–40875 (2004).
43. Amson, R., Karp, J. E. & Telerman, A. Lessons from tumor reversion for cancer treatment. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 59–65 (2013).
44. Prusiner, S. B. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 601–623 (2013).
45. Burmann, B. M. *et al.* An alpha helix to beta barrel domain switch transforms the transcription factor RfaH into a translation factor. *Cell* **150**, 291–303 (2012).
46. Giganti, D. *et al.* Secondary structure reshuffling modulates glycosyltransferase function at the membrane. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 16–18 (2015).
47. Norbeck, J. & Blomberg, A. Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3–10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast* **13**, 1519–1534 (1997).
48. Follis, A. V. *et al.* The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 535–543 (2014).
49. Bazile, F. *et al.* Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 555–565 (2009).
50. Jaglarz, M. K. *et al.* Association of TCTP with centrosome and microtubules. *Biochem Res Int* **2012**, 541906 (2012).
51. Kloc, M. *et al.* Inverse relationship between TCTP/RhoA and p53/cyclin A/actin expression in ovarian cancer cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* **50**, 358–367 (2012).
52. Busso, D., Delagoutte-Busso, B. & Moras, D. Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **343**, 313–321 (2005).
53. Maeng, J., Kim, H. Y., Shin, D. H. & Lee, K. Transduction of translationally controlled tumor protein employing TCTP-derived protein transduction domain. *Anal Biochem* **435**, 47–53 (2013).
54. Jenkins, E. O., Schiff, D., Mackman, N. & Key, N. S. Venous thromboembolism in malignant gliomas. *J Thromb Haemost* **8**, 221–227 (2010).
55. Kim, M. *et al.* A protein transduction domain located at the NH₂-terminus of human translationally controlled tumor protein for delivery of active molecules to cells. *Biomaterials* **32**, 222–230 (2011).
56. Kabsch, W. X. D. S. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).

57. Otwinowski, Z. & Minor, W. In *Macromolecular Crystallography*. Vol. 276A *Methods in Enzymology* (eds C. W. Carter & R. M. Sweet) 307–326 (Academic Press, 1997).
58. Adams, P.D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
59. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
60. Blanc, E. *et al.* Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2210–2221 (2004).
61. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 929–935 (2000).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the French National Agency for Research (ANR, ANR-09-BLAN-0292) to AT, RA and JC; CNRS, Université de Strasbourg, INSERM, Instruct, part of the European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI) supported by national member subscriptions as well as the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) [ANR-10-INSB-05-01, grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02 to JC and IGBMC; European Union Network of Excellence CONTICANET, to AT and RA, LabEx LERMIT to AT and RA, INCa Projets libres de Recherche « Biologie et Sciences du Cancer » 2013 to AT and RA, Ligue Nationale Contre le Cancer to AT and RA, Association Sclérose Tubéreuse de Bournevilleand, Odyssea fund to AT and RA; Odyssea fund to AT and RA; Canadian Institutes of Health Research grant FRN12517 to DWA. S.T. was supported by a doctoral fellowship from MESR, Ecole Doctorale de Cancérologie Paris XI and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). J.S. was supported by a studentship from the Institut de Recherche Servier. A.S.R. was supported by a fellowship from Science without Borders (CNPq), CAPES-COFEUCUB and Federal University of Paraná (UFPR, Brazil). AT, RA thank Yann Lecluse (IGR, Villejuif) for expert help with the flow cytometry and Smartox Biotechnology for the synthesis of peptides. ST, MA, VC and JC thank the members of the IGBMC common services and the members of the structural biology platform of IGBMC for technical assistance. ST, MA, VC and JC thank members of SOLEIL Proxima1 beamlines and the European Synchrotron Radiation Facility–European Molecular Biology Laboratory joint Structural Biology groups for the use of beamlines facilities and for help during X-ray data collection.

Author Contributions

J.C., R.A. and A.T. conceptualized, designed and directed the study and wrote the article as part of a teamwork with J.-C.M., D.W.A., S.C. and P.J. J.S. and S.C. performed and analyzed the mass spectrometry experiments. X.C. performed the *in vitro* reconstitution experiments on liposomes and data analysis. J.S., S.M., V.C., T.K. and J.H. A.S.R., I.B.-M., C.B. and N.T.C. performed experiments and data analysis. S.B.T. and C.M.J. performed and interpreted the ITC experiments on the hybrid *h1* subdomain of Bax/TCTP F.C. and L.M. performed and interpreted the *in cellulo* experiments using BRET S.T. and M.A. performed the biochemical and biophysical experiments and participated in writing the article. M.A., V.C. and J.C. performed the structure determination by X-ray crystallography.

Additional Information

Accession numbers: Coordinates of the refined structural model and structure factors have been deposited to the Protein Data Bank (PDB) with the accession code 4Z9V.

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Thébault, S. *et al.* TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. *Sci. Rep.* **6**, 19725; doi: 10.1038/srep19725 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macrobiomolécules et de leurs complexes associés.

Résumé

Ce travail de thèse porte sur le développement de méthodes en spectrométrie de masse (MS) et mobilité ionique (IM-MS) supramoléculaires pour la caractérisation fine de complexes protéine-ligand et d'assemblages protéiques hétérogènes de hauts poids moléculaires. L'optimisation instrumentale apportée à l'étude de ces systèmes, permet d'étendre le potentiel de ces deux approches en biologie structurale. Le criblage de complexes protéine-ligand permet ici une détermination de leurs propriétés d'interaction et la mise en évidence de subtils changements de conformation induits, pouvant être suivis au cours du temps. L'application de ce couplage à l'analyse de complexes multi-protéiques, réfractaires aux techniques conventionnelles, donne accès à la topologie de ces assemblages, facilitant la proposition de modèles structuraux. Enfin, l'apport récent de la haute résolution en MS native est ici illustré à travers l'étude de protéines complexes et hétérogènes : les anticorps thérapeutiques et leurs conjugués. Ces développements permettent de repousser certaines limites en MS native et IM-MS native, élargissant leurs perspectives d'application dans la recherche et l'industrie pharmaceutique.

Mots-clés : Spectrométrie de masse native, mobilité ionique, protéine-ligand, complexes de hauts poids moléculaires, anticorps thérapeutiques.

Résumé en anglais

This PhD thesis aims at developing methods in native mass spectrometry (MS) combined with ion mobility (IM-MS) to characterize protein-ligand complexes and large protein assemblies. Fine-tuning of instrumental settings allowed expanding the scope of these approaches in structural biology. Real-time monitoring of protein-ligand complexes by native MS and IM-MS enabled to screen their binding properties while depicting subtle conformational changes induced upon binding. Applying these methods to refractory multi-protein complexes provided insights about their topology, making structural modeling easier. Finally, benefits from high-resolution native MS were highlighted through the characterization of heterogeneous systems, including monoclonal antibodies and their drug conjugates. Here, these developments enable to push some technical limits one step forward, increasing the potential of native MS and IM-MS both in academic research and pharmaceutical industry.

Key words: native mass spectrometry, ion mobility, protein-ligand, large protein assemblies, monoclonal antibodies.