

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**UMR 7178**

**THÈSE** présentée par :

**Guillaume TERRAL**

soutenue le : **08 Juillet 2016**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Apports de l'échange hydrogène/deutérium  
couplé à la spectrométrie de masse en  
protéomique structurale pour la  
caractérisation de complexes multi-protéiques.**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. CIANFERANI Sarah**

Directrice de Recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. FOREST Éric  
Dr. REDEKER Virginie**

Directeur de Recherche, Université de Grenoble  
Chargée de Recherche, Université de Paris Sud

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Dr. ROGNIAUX Hélène  
Pr. SABATIER Laurence**

Ingénieur de Recherche, Université de Nantes  
Professeur, Université de Strasbourg

**A mes parents,**

**A Elise et Laury**

*« Il est souvent nécessaire d'entreprendre pour espérer et de persévérer pour réussir. »*

*Gilbert Cesbron*

## Remerciements

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

En tout premier lieu, je tiens à remercier Sarah Cianférani et Alain Van Dorsselaer de m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et offert la possibilité de travailler dans un environnement de grande qualité. J'adresse mes remerciements particuliers à Sarah Cianférani pour la confiance qu'elle m'a accordée et son encadrement tout au long de cette thèse. Cette expérience fut réellement enrichissante !

Je remercie sincèrement Eric Forest, Virginie Redeker, Hélène Rogniaux et Alain Beck pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier vivement l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai pu interagir durant ces quelques années.

Je remercie également et chaleureusement l'ensemble des membres du LSMBO, pour l'entraide et la bonne humeur qui règne dans ce laboratoire.

Merci à Jean-Marc pour son secours sur les machines, sa grande disponibilité, et surtout pour les charlottes au citron (c'est quoi déjà la recette ?).

Merci à l'équipe barbecue : Fabrice V. (le grilladolo) & Fabrice B. (le sommelier).

Merci à l'*Elsass* : Alfred et Danièle (j'ai vérifié...c'est bon il reste encore des bouteilles de 500 mL ☺).

Merci aux « coachs » de l'équipe protéo pour leur bonne humeur : Laurence, Christine C., Christine S.

Merci aux joueurs de la grande équipe protéo : Leslie, Justine, Pauline, Georg, Alisson, Magali, Charlotte, Luc, Agnès, Marianne, Aurélie, Margaux et Nina ; aux jeunes pousses : Blandine, Maurane et Paola ; ainsi qu'au porteur d'eau (bio) : François.

Merci à l'équipe qualité : Hélène, Véronique et Stella. Merci pour votre aide et votre disponibilité.

Merci à l'équipe bioinformatique : Alex 1 (toujours prêt à donner un coup de main ou de souris), Alex 2, Ibrahim, Aymen et Patrick.

Merci à Kevin pour son aide dans toutes les démarches administratives.

Merci aux anciens « docs » et « post-docs » du laboratoire : Eli, Amandine, Anna, Diego, Sarah (organisatrice de soirées « Michou » en salle Bio), Gilles (dit le *Chilles* de Benche ou le *knäckes*) et Marine (merci pour tous les bons plans à la Réunion).

Merci à la team Resto U : Gauthier (et oui la seiche vit dans la mer...ce n'est pas de la viande !), Max E. (l'homme du NORRRD), Seb (président de l'association amicale des amateurs authentiques de cou\*\*\*\* de loup), et Benoit (fils caché de Thor et François Damiens).

Merci à l'équipe...que dis-je ? A la Famille Supramol ! Merci aux anciens toujours prêts à répondre aux questions des plus jeunes : Jean-Michel, François, Julien. Ça a vraiment été un plaisir de travailler avec vous !

Merci à ceux qui ont agrandi la famille depuis : Stéphane (l'homme qui « snapchatte » plus vite que son ombre), Maxime (le soldat Jedi de l'HDX. Maxime je suis ton père !), Thomas (l'homme qui a pêché la truite qui bouchait le vieux port. Je compte sur toi pour porter haut et fort nos couleurs du SUD), et Anthony (stagiaire kératineux en phase d'adoption).

Un merci particulier à Johann, mon binôme depuis le 1<sup>er</sup> jour, mon mari de travail au final ! Je te souhaite beaucoup de réussite dans tous tes projets autant professionnels que personnels !

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents pour m'avoir permis de prendre le chemin que je souhaitais, si aujourd'hui j'en suis là, c'est en partie grâce à vous ! Un grand merci au reste de la famille, et à la belle-famille, qui a toujours eu un mot ou un geste de soutien.

Et puis, Laury...je ne te dis pas un...mais MILLE MERCIS ! MERCI pour ton aide et tes encouragements de tous les jours. Ton soutien sans faille a été inestimable ! Et enfin pour terminer un grand merci à Elise d'égayer mes journées d'un simple sourire !



## *Liste des principales abréviations*

<b>AcONH<sub>4</sub></b> : Acétate d'ammonium	<b>mAb</b> : Anticorps monoclonal
<b>ADC</b> : Antibody-Drug Conjugate	<b>MS</b> : Spectrométrie de masse
<b>Ag</b> : Antigène	<b>MS/MS</b> : Spectrométrie de masse en tandem
<b>Apo</b> : Protéine non liée (sans ligand)	<b>m/z</b> : Rapport masse sur charge
<b>ARNm, r</b> : Acide ribonucléique messenger, ribosomique	<b>PA</b> : Projection Approximation
<b>BS3</b> : bis(sulfosuccinimidyl)suberate	<b>PAGE</b> : Polyacrylamide gel electrophoresis
<b><sup>TW</sup>CCS<sub>N2</sub></b> : Section efficace mesurée en azote dans la cellule TWIMS du Synapt G2	<b>Pi</b> : Pression dans la première zone de pompage
<b>CE</b> : Energie de collision en cellule HCD (EMR)	<b>PTM</b> : Modification post-traductionnelle
<b>CID</b> : Collision induced dissociation ou énergie de collision en source (EMR)	<b>Q</b> : Quadripôle
<b>D<sub>2</sub>O</b> : eau deutérée	<b>RF</b> : Radiofréquence
<b>DAR</b> : Drug to Antibody Ratio	<b>RMN</b> : Résonance magnétique nucléaire
<b>DDA</b> : Data dependant acquisition	<b>Rs</b> : Pouvoir séparateur en IM-MS
<b>DIA</b> : Data independent acquisition	<b>RX</b> : Cristallographie aux rayons X
<b>Dn</b> : Anticorps conjugué à « n » drogues	<b>SDS</b> : Sodium dodecyl sulfate
<b>DTIMS</b> : Drift Tube Ion Mobility Spectrometry	<b>snoRNPs</b> : small nucleolar ribonucleoproteins
<b>EHSS</b> : Exact Hard Sphere Scattering	<b>SRIG</b> : Stacked Ring Ion Guide
<b>ESI</b> : Ionisation électrospray	<b>t<sub>D</sub></b> : Temps de passage de l'ion dans la cellule TWIMS
<b>FWHM</b> : Full Width at Half Maximum	<b>TM</b> : Trajectory Method
<b>GndHCl</b> : Guanidin hydrochloride	<b>TOF</b> : Time-of-flight
<b>HCD</b> : High energy Collision Dissociation	<b>t<sub>r</sub></b> : Temps de rétention
<b>HDX-MS</b> : Echange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse	<b>TWIMS</b> : Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry
<b>Holo</b> : Protéine liée (à son ligand)	<b>UHV</b> : Ultra High Vacuum
<b>IM-MS</b> : Couplage mobilité ionique spectrométrie de masse	<b>Vc</b> : Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage
<b>K<sub>d</sub></b> : Constante de dissociation	<b>TCEP</b> : tris(2-carboxyethyl)phosphine
<b>LC</b> : liquid chromatography	<b>Transfer CE</b> : Tension appliquée à l'entrée de la cellule de transfert du Synapt G2
	<b>Trap CE</b> : Tension appliquée à l'entrée de la cellule de collision du Synapt G2
	<b>XL</b> : Cross-Linking



# PLAN DÉTAILLÉ

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
-----------------------------------	----------

<b>PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
---	----------

<b>Chapitre 1 : Les complexes non-covalents et les outils biophysiques associés à leur caractérisation. ....</b>	<b>9</b>
--	----------

1. Les interactions non-covalentes .....	9
1.1. Les interactions de type électrostatiques .....	10
1.1.1. Les interactions ioniques .....	10
1.1.2. Les liaisons hydrogènes .....	10
1.1.3. Les interactions de Van der Waals .....	10
1.2. L'effet hydrophobe.....	11
1.3. Les interactions totales d'attraction et de répulsion .....	11
2. Les méthodes biophysiques utilisées pour la caractérisation de complexes non-covalents.....	12
2.1. Détermination de la topologie générale .....	12
2.1.1. La Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....	12
2.1.2. La Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) .....	13
2.2. Détermination de la topologie détaillée .....	13
2.2.2. La microcalorimétrie (ITC) .....	13
2.2.3. La résonance plasmonique de surface (SPR) .....	14
2.2.4. Les techniques de fluorescence.....	14
2.2.5. Le dichroïsme circulaire (CD).....	15
2.3. Les techniques à résolution atomique ou quasi atomique .....	16
2.3.2. La cryo-microscopie électronique (cryo-EM).....	16
2.3.3. La résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	16
2.3.4. La cristallographie aux rayons X (DRX) .....	17
3. Conclusions .....	17

<b>Chapitre 2- Caractérisation de complexes non-covalents par spectrométrie de masse structurale .....</b>	<b>19</b>
--	-----------

1. Les approches natives.....	21
1.1. La spectrométrie de masse native (MS native) .....	21
1.1.1. Principe.....	21
1.1.2. Informations accessibles .....	21
1.1.3. Instruments utilisables en MS native .....	22
1.1.4. Paramètres instrumentaux importants .....	23
1.1.5. Discussion .....	26
1.2. La spectrométrie de masse native couplée à la mobilité ionique (IM-MS native) .....	27
1.2.1. Principe.....	27
1.2.2. Informations accessibles .....	28
1.2.3. Instruments utilisables en IM-MS native.....	28
1.2.4. Optimisations instrumentales .....	30
1.2.5. Calculs de CCS.....	32
1.2.6. Discussion .....	33
2. Les approches de protéomiques.....	34
2.1. Généralités .....	34
2.2. Le pontage chimique ou crosslink (XL) .....	36
2.2.1. Principe.....	36
2.2.2. Informations accessibles .....	37
2.2.3. Partie expérimentale .....	38
2.2.4. Traitements des données .....	39
2.2.5. Discussion .....	39
2.3. Autres approches de marquage de surface .....	40



2.3.1. Principe.....	40
2.3.2. Informations accessibles .....	40
2.3.3. Discussion .....	40
3. Les approches mixtes .....	41
3.1. La spectrométrie de masse native couplée à la fragmentation en phase gazeuse (« Top-down native MS »).....	41
3.2. La protéolyse ménagée .....	41
<b>Conclusion de cette partie.....</b>	<b>43</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>44</b>

## **PARTIE 2 : LA METHODOLOGIE ECHANGE HYDROGENE/DEUTERIUM (HDX) ..... 51**

<b>Chapitre 1 : Principe de l'échange Hydrogène/Deutérium et état de l'art. ....</b>	<b>55</b>
1. Historique .....	55
2. Principe de l'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse .....	56
2.1. La source d'introduction du deutérium .....	60
2.2. Le mode de marquage isotopique en solution.....	61
2.3. Les cinétiques d'échange H/D .....	62
2.4. Le phénomène de ré-échange D → H (« back exchange ») .....	64
2.5. Analyse globale vs. locale .....	65
2.6. Etape de préfractionnement .....	68
2.7. Analyse MS.....	69
2.8. Analyse des données.....	71
2.9. Autres alternatives en HDX-MS.....	72
2.9.1. Les approches « top-down » .....	72
2.9.2. Echange H/D en phase gazeuse.....	72
2. Applications en HDX-MS .....	73
2.1. Etude de protéines .....	73
2.2. Etudes de complexes protéiques avec différents types de partenaires .....	75
2.2.1 Interaction protéine/grande molécule .....	75
2.3. Le domaine biopharmaceutique .....	76
2.4. Etude de méga-complexes .....	77
<b>Chapitre 2 : Description du système HDX-MS utilisé et du processus analytique associé. ....</b>	<b>79</b>
1. La préparation d'échantillon.....	80
2. Le module HDX .....	81
2.1. La digestion .....	81
2.2. La chromatographie .....	82
3. La spectrométrie de masse .....	84
3.1. Description de l'instrument.....	84
3.2. La méthode MS .....	87
4. Analyse des données .....	89
4.1. PLGS™ (Waters) .....	89
4.1.1. L'algorithme.....	89
4.1.2. Validation des spectres identifiés.....	91
4.2. DynamX™ (Waters) .....	92
<b>Chapitre 3 : Optimisations expérimentales et instrumentales en HDX-MS et mise en place d'un test de performance. ....</b>	<b>95</b>
1. Optimisations des paramètres expérimentaux .....	96
1.1. Influence de la quantité de matériel injectée .....	96
1.2. Influence du débit de passage sur la cartouche de digestion .....	96
1.3. Influence d'agents chaotropiques et/ou réducteurs .....	98
1.4. Influence du temps de « quench » .....	99

1.5.	Influence de l'enzyme .....	100
2.	Optimisations des paramètres instrumentaux .....	101
3.	Paramètres de retraitement .....	102
4.	Mise en place d'un test de performance .....	103
4.1.	Conditions d'analyse de la phosphorylase B .....	103
4.2.	Suivi du taux de recouvrement .....	103
4.3.	Suivi de la reproductibilité des chromatogrammes .....	105
4.4.	Suivi de la reproductibilité des temps de rétention et capacité de séparation .....	106
4.5.	Suivi du taux de deutération .....	107
4.6.	Evaluation de la pression du système .....	108
5.	Conclusions .....	109
<b>Conclusion de cette partie.....</b>		<b>111</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>112</b>
<b>PARTIE 3 : COMBINAISON D'APPROCHES DE MS NATIVE ET HDX-MS POUR LA CARACTERISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES.....</b>		<b>121</b>
<b>Introduction : Les anticorps monoclonaux thérapeutiques et leurs dérivés : les défis analytiques.....</b>		<b>125</b>
1.	Historique des anticorps monoclonaux (mAbs).....	126
2.	Architecture des anticorps monoclonaux.....	127
3.	Les « Antibody Drug Conjugates » .....	129
3.1.	Le brentuximab vedotin .....	131
3.2.	Le trastuzumab emtansine .....	132
3.3.	Propriétés thérapeutiques .....	132
3.4.	Les ADCs sites spécifiques .....	133
4.	Les défis et enjeux analytiques .....	134
5.	Objectifs généraux des travaux .....	137
<b>Chapitre 1 : Caractérisation d'ADCs par MS native haute résolution. ....</b>		<b>139</b>
1.	Objectifs des travaux .....	139
2.	De la MS native classique vers la haute résolution.....	140
2.1.	Présentation du Q-TOF Synapt G2 HDMS (Waters) en mode MS native .....	140
2.2.	Présentation de l'Orbitrap Exactive Plus EMR (ThermoFischer Scientific).....	141
3.	Résultats .....	145
3.1.	Cas du brentuximab vedotin .....	145
3.1.1.	Analyse en condition dénaturante .....	145
3.1.2.	Analyse en conditions natives classiques .....	146
3.1.3.	MS native haute résolution : les optimisations .....	147
3.1.4.	MS native classique vs. MS native haute résolution .....	155
3.2.	Cas du trastuzumab emtansine.....	158
3.2.1.	MS dénaturante vs. MS native .....	158
3.2.2.	Apports de la MS native combinée à la réduction de charge.....	159
3.2.3.	MS native haute résolution .....	161
4.	Conclusions .....	163
5.	Valorisation .....	163
<b>Chapitre 2 : Combinaison d'outils de spectrométrie de masse structurale pour la caractérisation de complexes antigène/anticorps. ....</b>		<b>165</b>
1.	Etat de l'art .....	165
1.1.	Caractérisation de l'interaction mAb/Ag.....	165
1.2.	Caractérisation de l'épitope .....	166
2.	Contexte biologique.....	168
3.	Objectifs.....	169
4.	Résultats .....	169

4.1.	Détermination des stœchiométries d'interaction Fab/Ag par MS native .....	169
4.1.1.	Analyse des sous-unités individuelles .....	169
4.1.2.	Analyse des complexes Fab/Ag .....	173
4.2.	Détermination des épitopes.....	175
4.2.1.	Optimisation de la couverture de séquence de l'antigène-A .....	176
4.2.2.	Les analyses comparatives .....	177
5.	Conclusions .....	181
6.	Valorisation .....	182
<b>Conclusion de cette partie.....</b>		<b>183</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>185</b>

## **PARTIE 4 : MS STRUCTURALE POUR LA CARACTERISATION DE SNORNPS A BOITES C/D .....**

<b>Introduction : La machinerie d'assemblage des snoRNPs à boîte C/D. ....</b>	<b>195</b>
1. Les snoARNs à boîte C/D.....	196
2. Les protéines associées aux snoRNPs .....	197
3. La biogénèse des snoRNPs à boîtes C/D .....	198
4. Les défis analytiques .....	199
5. Objectifs généraux des travaux .....	201

<b>Chapitre 1 : MS native pour l'analyse du complexe RPAP3/Hsp. ....</b>	<b>203</b>
1. Contexte biologique.....	203
2. Objectifs.....	204
3. Résultats .....	205
3.1. Détermination des constantes de dissociation des TPRs individuels avec les 3 peptides par MS native .....	205
3.2. Affinités relatives du tandem RPAP3 avec les 3 peptides .....	210
3.2.1. Titrages du tandem RPAP3(133-396) par les trois peptides.....	210
3.2.2. Expériences de compétition directe .....	212
3.2.3. Expériences de compétition indirecte .....	215
3.3. Détermination des stœchiométries d'interaction entre le tandem RPAP3 et les protéines Hsp70, Hsp90 $\alpha$ et Hsp90 $\beta$ entières .....	217
3.3.1. Analyses des composés individuels .....	217
3.3.2. Détermination des stœchiométries d'interaction entre le tandem RPAP3(133-396) et la protéine Hsp90 $\beta$ entière.....	219
4. Conclusions .....	220
5. Valorisation .....	221

<b>Chapitre 2 : Combinaison d'approches de MS structurale pour la caractérisation du complexe Bcd1p/Rtt106p. ....</b>	<b>223</b>
1. Contexte biologique.....	223
2. Objectifs.....	224
3. Résultats .....	226
3.1. Détermination de la stœchiométrie d'interaction du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) .....	226
3.1.1. Analyse des partenaires individuels .....	226
3.1.2. Analyse du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) .....	228
3.2. Suivi de l'assemblage du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par IM-MS native .....	229
3.3. Détermination des domaines d'interaction du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par protéolyse ménagée .....	232
3.4. Etude structurale du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par HDX-MS .....	234
3.4.1. Optimisation des couvertures de séquence .....	234
3.4.2. Les analyses comparatives en HDX-MS .....	237
3.5. Etude structurale du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par XL-MS .....	241

3.5.1. Approche utilisée.....	241
3.5.2. Résultats.....	242
4. Conclusions.....	245
5. Valorisation.....	246
<b>Conclusion de cette partie.....</b>	<b>247</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>249</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>253</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>255</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>261</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>267</b>
<b>LISTE DES COMMUNICATIONS.....</b>	<b>275</b>





# *Introduction générale*



## *Introduction générale*

L'ensemble des processus cellulaires fait intervenir de nombreux partenaires (protéines, ADN, métaux, *etc.*), s'associant sous forme de complexes non-covalents. En effet, les différentes fonctions biologiques reposent sur des réseaux d'interactions spécifiques, et l'altération de ces derniers peut moduler une fonction, et être la cause de certaines pathologies. Si les protéines peuvent de ce fait être des cibles thérapeutiques potentielles, une étude approfondie de la relation structure/fonction de ces complexes macromoléculaires participe à la compréhension des mécanismes cellulaires associés. Dans cette optique, les techniques biophysiques comme la cristallographie ou la RMN, peuvent accéder à la structure d'un partenaire ou d'un complexe, avec une résolution atomique. Cependant, les difficultés liées à la production d'un cristal, la quantité de matériel nécessaire (> mg) ou la taille des édifices analysables (< 30 kDa en RMN), constituent les facteurs limitant de ces approches.

Face à ces problématiques, le développement de nouvelles approches analytiques a constitué un défi pour l'ensemble de la communauté scientifique. C'est dans ce contexte, que le concept de spectrométrie de masse (MS) structurale a émergé depuis une dizaine d'années. Ce dernier vise à combiner les approches de MS native, et de protéomique.

La MS native, développée au début des années 1990, permet de maintenir des complexes non-covalents en phase gazeuse au sein d'un spectromètre de masse, et accède ainsi à la stœchiométrie d'interaction, l'affinité et la spécificité d'interaction des différents partenaires. Le couplage de la mobilité ionique à une analyse en conditions natives (IM-MS) a permis d'apporter un élément de caractérisation supplémentaire, avec notamment la détermination de sections efficaces de collision et/ou la mise en évidence de changements conformationnels.

Si la protéomique classique permet d'identifier, quantifier et caractériser la structure primaire des protéines, l'approche structurale permet de déterminer des zones d'interaction, localiser des réarrangements conformationnels et d'accéder à une certaine dynamique protéique. Cette dernière vise généralement à combiner un marquage de surface (« crosslink » - XL-MS ; échange hydrogène/deutérium – HDX-MS ; marquage radicalaire – HRF), et un processus classique d'analyse protéomique.

Les récents développements d'outils bio-informatiques permettent désormais à certains laboratoires spécialisés de transposer les données de MS structurale en contraintes spatiales, accédant ainsi à des modèles structuraux de complexes macromoléculaires. Dès lors, la MS structurale se présente comme une approche orthogonale et complémentaire pour la



caractérisation de complexes non-covalents réfractaires à une analyse par cristallographie ou RMN.

Dans ce contexte, les objectifs de ces travaux de thèse se sont articulés autour de développements méthodologiques en MS native et HDX-MS pour la caractérisation structurale de protéines recombinantes et de leurs complexes associés. La mise en place et l'évaluation de la technique HDX-MS a constitué l'objectif principal de ces travaux de thèse. Un objectif parallèle à ces travaux s'est porté sur l'évaluation de la MS native haute résolution pour la caractérisation de protéines thérapeutiques. Ainsi, des développements méthodologiques spécifiques ont été réalisés, en vue de répondre à des problématiques biologiques précises ; et l'apport de la combinaison de différentes approches a été évalué.

- La première partie du manuscrit a pour but de rappeler l'importance et la nature des interactions non-covalentes mises en jeu dans la formation d'un complexe. Une étude bibliographique centrée sur les techniques biophysiques de caractérisation structurale, ainsi que sur les différents outils de MS structurale, permet de replacer ces travaux de thèse dans leur contexte.
- La deuxième partie est portée exclusivement sur l'approche HDX-MS. Une étude bibliographique permet de retracer les développements méthodologiques et instrumentaux apportés à cette technique, et donne une vue d'ensemble sur les champs d'applications actuels. La description approfondie du système utilisé, son évaluation et la mise en place d'un test de performance constituent les points clés de cette partie.
- La troisième partie est focalisée sur la caractérisation d'anticorps thérapeutiques, et de leurs complexes associés. Dans un premier temps, l'apport de la MS native à haute résolution pour la caractérisation détaillée d'anticorps conjugués (« Antibody Drug Conjugates ») est étudié. Le développement d'une méthode spécifique en HDX-MS, combinée à la MS native pour la détermination d'épitopes (zones d'interaction d'un anticorps au niveau de l'antigène) constitue ici un deuxième axe de travail. Le potentiel de cette approche par rapport à d'autres techniques conventionnelles est notamment exploré.
- La quatrième partie de ce manuscrit est consacrée à la caractérisation de sous-complexes protéiques impliqués dans la biogénèse des ribosomes. Des méthodes de MS natives spécifiques ont été développées afin de déterminer des stœchiométries d'interaction et, évaluer les affinités entre différents partenaires. L'apport d'une stratégie visant à combiner MS native, IM-MS, HDX-MS et XL-MS a enfin été évalué, lors de la caractérisation du complexe Bcd1p/Rtt106p, réfractaire aux techniques à résolution atomique.



## *Partie 1 : Introduction bibliographique*



## *Partie 1- Introduction bibliographique*

Cette première partie introductive consiste en une présentation de l'importance des complexes non-covalents dans les différents processus biologiques. Dans un premier temps, un rappel sur la nature des interactions non-covalentes sera réalisé ; et les techniques biophysiques classiquement utilisées pour leur caractérisation seront décrites. Dans un deuxième temps, nous verrons que les techniques biophysiques les plus résolutive ne permettent pas toujours d'aboutir à la structure d'une protéine ou d'un complexe, et que dans ce contexte, la combinaison d'outils de spectrométrie de masse structurale se présente comme une alternative crédible.

**Chapitre 1 : Les complexes non-covalents et les outils biophysiques associés à leur caractérisation.**

**Chapitre 2 : La spectrométrie de masse structurale pour la caractérisation de complexes non-covalents.**



## Chapitre 1 : Les complexes non-covalents et les outils biophysiques associés à leur caractérisation.

L'ensemble des processus biologiques fait intervenir un grand nombre de partenaires de natures et de tailles différentes (protéines, oligonucléotides, ligands). Ces derniers peuvent opérer seuls, ou en complexes régis par l'existence d'interactions non-covalentes dont la force et la durée varient au cours du temps [1]. Les interactions non-covalentes sont caractérisées comme faibles ( $1.10^0$  à  $1.10^2$  kJ.mol<sup>-1</sup>), contrairement aux liaisons covalentes qui sont caractérisées comme fortes (énergie >  $1.10^2$  kJ.mol<sup>-1</sup>). En effet, les atomes d'une liaison covalente partagent des électrons, alors que les interactions non-covalentes dépendent d'une complémentarité stérique et interactionnelle entre plusieurs partenaires [2]. Les interactions non-covalentes peuvent résulter de différentes contributions qui sont décrites ci-dessous.

### 1. Les interactions non-covalentes

Les interactions non-covalentes s'opèrent à distance et selon une nature électrostatique, hydrophobe ou d'attraction et de répulsion (figure 1).

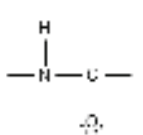
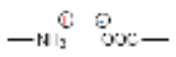

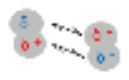
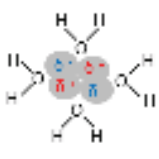
Liaison covalente	Interaction ionique	Liaison hydrogène	Interaction de Van der Waals	Effet hydrophobe
				
$1.10^2 - 1.10^3$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$1.10^2$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$10 - 40$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$0 - 10$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-10$ kJ.mol <sup>-1</sup>

Figure 1. Représentation schématique des interactions covalentes et non-covalentes.

## 1.1. Les interactions de type électrostatiques

### 1.1.1. Les interactions ioniques

Ce type d'interaction résulte de l'attraction entre deux charges de signe opposé. L'énergie de cette interaction est fonction de la distance interatomique ( $d$ ) et de la permittivité du milieu ( $\epsilon$ ). Ainsi, l'interaction sera d'autant plus forte que la distance entre les atomes chargés sera courte (distance optimale  $\sim 3 \text{ \AA}$ ), et que la permittivité sera faible. Ces interactions ioniques se trouvent renforcées d'un passage en phase aqueuse ( $\epsilon = 80$ ) vers une phase gazeuse ( $\epsilon = 1$ ), et peuvent quasiment être assimilées à des liaisons covalentes (énergie  $\sim 1.10^2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) [3].

### 1.1.2. Les liaisons hydrogènes

La liaison hydrogène implique un atome d'hydrogène porté par un atome de forte électronégativité (O, N, F et S) et un autre atome électronégatif porteur d'un doublet non liant [3]. L'interaction est d'autant plus renforcée que l'atome lié à l'hydrogène est électronégatif, et que le groupement accepteur et donneur d'hydrogène sont alignés. Les liaisons hydrogènes sont notamment impliquées dans la stabilisation des structures secondaires des protéines ou des doubles brins d'ADN. L'énergie de ce type de liaison est comprise entre 10 et 40  $\text{kJ.mol}^{-1}$ .

### 1.1.3. Les interactions de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals résultent de 3 contributions intervenant entre dipôle permanents ou induits [3] :

- **Les interactions de Keesom** (type dipôle-dipôle) apparaissent entre molécules polaires. La différence d'électronégativité entre les atomes présents au sein d'une même molécule entraîne une déformation du nuage électronique, et s'accompagne donc de la formation d'un dipôle permanent. Cette interaction est d'autant plus forte que le moment dipolaire est élevé.
- **Les interactions de Debye** (type dipôle-dipôle induit) interviennent entre une molécule polaire induisant la polarisation du nuage électronique d'une molécule apolaire.
- **Les interactions de London** (type dipôle instantané-dipôle induit) apparaissent entre molécules apolaires. La dissymétrie du nuage électronique de l'une des molécules à un

instant donné peut se traduire par la formation d'un dipôle instantané ; ce dernier pouvant entraîner à son tour la déformation du nuage électronique d'une autre molécule.

Les interactions de Van der Waals opèrent à courte distance et sont relativement faibles (0 et 10  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) ; toutefois elles sont relativement nombreuses, et inversement proportionnelles à la permittivité relative du milieu [4]. Elles sont donc renforcées en phase gazeuse et ne sont donc pas négligeables.

## **1.2. L'effet hydrophobe**

Un effet hydrophobe se traduit par la réorganisation de molécules apolaires dans un milieu aqueux. En effet, les molécules non polaires vont alors s'assembler de manière à minimiser la surface de contact à l'eau. Cet assemblage ne peut être strictement associé à une interaction, mais d'avantage à une impossibilité d'interaction avec un milieu aqueux [3]. L'éjection des molécules d'eau situées à la surface des molécules permet de favoriser la formation de liaisons hydrogènes, et donc une augmentation de l'entropie du système. Les molécules apolaires s'associent donc suivant un processus thermodynamique favorable [5]. En raison de l'absence de solvant en phase gazeuse, l'énergie d'interaction liée à un effet hydrophobe est considérablement diminuée.

## **1.3. Les interactions totales d'attraction et de répulsion**

L'ensemble des forces d'attraction conduit au rapprochement des molécules. Toutefois, l'apparition de forces répulsives liées à l'impénétrabilité des nuages électroniques conduit à un certain équilibre, et à la formation d'interactions non-covalentes dont l'énergie varie de  $1\cdot 10^0$  à  $1\cdot 10^2$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [3].



## 2. Les méthodes biophysiques utilisées pour la caractérisation de complexes non-covalents

Un large panel de techniques biophysiques permet de caractériser des complexes non-covalents. Ces approches sont souvent complémentaires et permettent de donner des informations structurales de natures différentes. En effet, suivant le type et la résolution des informations souhaitées certaines techniques seront alors privilégiées (figure 2).

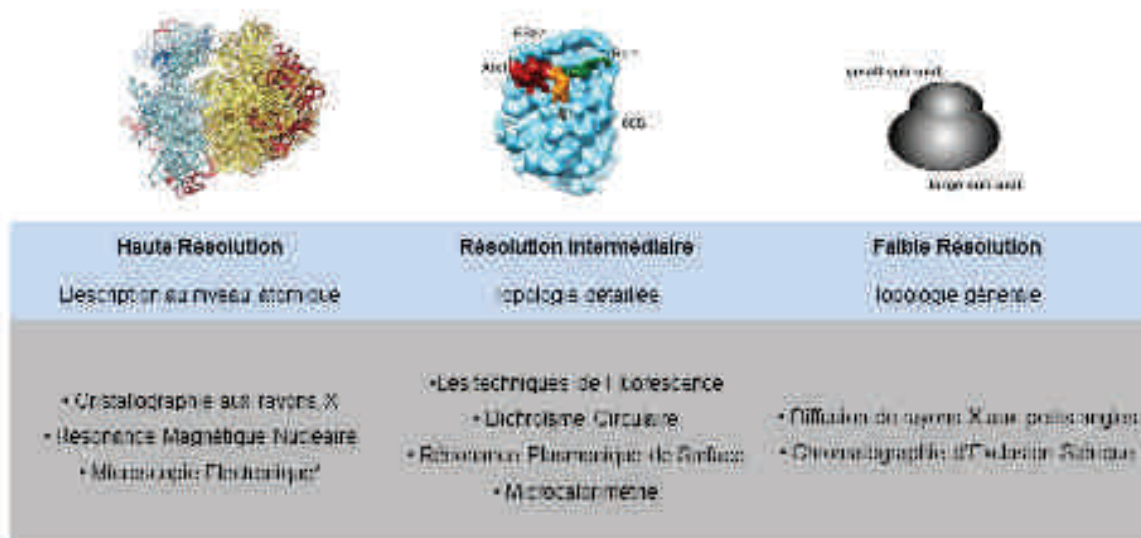


Figure 2. Techniques biophysiques classiquement utilisées en caractérisation structurale de protéines. \* La microscopie électronique génère des modèles structuraux à résolution quasi atomique.

### 2.1. Détermination de la topologie générale

#### 2.1.1. La Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

➔ *Informations obtenues : état d'oligomérisation, estimation de la masse moléculaire*

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC – « Size Exclusion Chromatography ») est basée sur la séparation de molécules en fonction de leur volume hydrodynamique [6, 7]. Les analytes sont élués au travers d'une colonne chromatographique contenant une phase stationnaire polymérique de porosité définie, en conditions non-dénaturantes. Les molécules les plus volumineuses ne pourront pas diffuser au sein de la phase stationnaire et seront alors rapidement éluées, tandis que les molécules les plus petites seront en mesure de diffuser dans les volumes poreux, et auront donc un temps de rétention plus important.

D'un point de vue structural, cette technique permet d'accéder au volume hydrodynamique des molécules (rayon de Stokes) et d'évaluer leur masse moléculaire à travers l'utilisation d'étalons appropriés [8]. Cette approche analytique est aussi utilisée pour déterminer des changements conformationnels, ainsi que des constantes d'affinité [9]. Toutefois, la résolution de cette technique est limitée et reste principalement utilisée pour la détermination d'états d'oligomérisation, ainsi que de stœchiométries d'interaction pour d'assez grandes molécules. Il est à noter que la SEC est aussi utilisée dans un but préparatif, notamment pour un échange de tampon avant une analyse MS en conditions natives [10].

### 2.1.2. La Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

➔ *Informations obtenues : rayon de giration, estimation de la taille globale*

La diffusion des rayons aux petits angles (SAXS - « Small Angle X-ray Scattering ») est une technique reposant sur la mesure de l'intensité des rayons X diffusés par une molécule en solution ; cette mesure se faisant en fonction de l'angle de diffusion ( $< 10^\circ$ ) [11]. Cette approche permet ainsi de déterminer le rayon de giration de l'analyte et donc d'accéder à la taille globale de ce dernier. La modélisation des données SAXS permet de générer des modèles structuraux tridimensionnels, cependant avec une résolution assez limitée, de l'ordre de 10 à 15 Å [12]. Si cette technique permet d'étudier l'assemblage de partenaires d'assez grande taille, sa faible résolution ne permet pas de suivre la fixation de petites molécules (ligands) sur d'autres molécules de grande taille (protéine).

## 2.2. Détermination de la topologie détaillée

### 2.2.2. La microcalorimétrie (ITC)

➔ *Informations obtenues : constante d'affinité, stœchiométrie d'interaction*

La titration calorimétrique isotherme (ITC – « Isothermal Titration Calorimetry ») est basée sur la mesure des échanges thermiques se produisant lors de l'association entre deux partenaires. Les quantités de chaleurs émises ou absorbées durant l'expérience de titrage entre un récepteur et un ligand sont mesurées, et permettent de déterminer les différents paramètres thermodynamiques liés à la complexation : la variation d'enthalpie libre ( $\Delta G$ ), d'enthalpie

( $\Delta H$ ) et d'entropie ( $\Delta S$ ) [13]. La détermination de ces grandeurs permet d'accéder à la constante d'affinité ( $K_a$ ), ainsi qu'à la stœchiométrie d'interaction du complexe. Cette approche se veut sensible et ne nécessite pas de marquage, toutefois son débit analytique reste limité, avec environ 25 analyses réalisables en une journée [14].

### 2.2.3. La résonance plasmonique de surface (SPR)

➔ *Informations obtenues : constante d'affinité, stœchiométrie d'interaction*

La résonance plasmonique de surface (SPR – « Surface Plasmon Resonance ») est une technique permettant de déterminer la stœchiométrie d'interaction ainsi que la constante d'affinité pour un complexe. Pour ce faire, une molécule réceptrice sera immobilisée sur un support fonctionnalisé (biocapteur recouvert généralement d'or), et l'association de son ligand circulant en flux continu sera mesurée. L'application d'une lumière polarisée monochromatique sur l'interface métal/liquide selon un angle d'incidence particulier va entraîner l'excitation d'électrons libres du métal ; ces derniers entreront alors en résonance, et conduiront à une chute de l'intensité de l'onde réfléchie. L'angle de résonance de cette onde est fonction de l'indice de réfraction au niveau de l'interface métal/liquide, et dépend donc des molécules y étant absorbées.

Par conséquent la mesure en temps direct de l'angle de réfraction, lors de l'association (flux continu de ligand) et de la dissociation du complexe (flux continu de tampon), permet de déterminer la stœchiométrie d'interaction, mais aussi la constante cinétique d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ). Ces constantes permettront ainsi d'accéder à la constante d'affinité du complexe ( $K_a$ ) [15].

Si cette technique s'insère aujourd'hui dans une approche haut débit [16], la principale limitation se situe au niveau de l'immobilisation d'un partenaire sur un biocapteur. En effet, la flexibilité de la molécule réceptrice peut être réduite, ou le site d'interaction peut être partiellement masqué de part le greffage sur un support.

### 2.2.4. Les techniques de fluorescence

➔ *Informations obtenues : mise en évidence d'interaction, de changements conformationnels, constante d'affinité*

Les méthodes spectroscopiques consistent à mesurer la quantité de lumière émise par des électrons revenant à un état fondamental, après avoir été excités par application d'un faisceau

lumineux (UV ou visible). Cette propriété d'absorption et de réémission de photons, qualifiée de fluorescence, permet de mettre en évidence des interactions. Plusieurs méthodes de spectroscopie de fluorescence sont utilisées en biologie structurale, notamment le FRET.

La technique de FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») est basée sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence, entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur. Pour que ce transfert ait lieu, il est nécessaire que les groupements donneur et accepteur soient suffisamment proches (< 10 nm). La mesure de ce transfert de fluorescence permet de vérifier l'interaction entre deux partenaires ou encore d'identifier des changements conformationnels [17].

Les techniques de fluorescence sont très sensibles, mais l'introduction d'un groupement fluorophore est souvent indispensable et peut générer des artefacts au niveau des sites d'interaction. Toutefois, cette approche permet de mettre en évidence l'existence de complexes *in vivo* [18].

#### 2.2.5. Le dichroïsme circulaire (CD)

➔ *Informations obtenues : structure secondaire, formation de complexe*

La technique de dichroïsme circulaire (CD – « Circular Dichroism ») est basée sur la capacité d'un composé à absorber de façon différentielle, une lumière polarisée circulairement droite ou gauche [19]. Cette approche est notamment utilisée en biologie structurale pour élucider les structures secondaires des protéines.

En effet, pour des longueurs d'ondes de l'UV lointain (190-250 nm), les spectres dichroïques obtenus peuvent révéler spécifiquement des motifs hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  ou coudes qui n'auront pas les mêmes propriétés d'absorption [20]. Cette approche est largement utilisée pour quantifier de façon relative les différentes conformations présentes en solution, mais aussi sonder l'influence des conditions physicochimiques (température, pH, force ionique,...) ou biologiques (ajout d'un interactant) sur la structure d'une biomolécule. Bien que cette approche soit rapide et sensible, elle reste peu compatible avec les tampons dans lesquels se trouvent les protéines (phosphates, sulfates...) et nécessite donc de réaliser un changement de tampon (borate, sels d'ammoniums).

## 2.3. Les techniques à résolution atomique ou quasi atomique

### 2.3.2. La cryo-microscopie électronique (cryo-EM)

➔ *Informations obtenues : structure à résolution quasi atomique*

La cryo-microscopie électronique (cryo-EM – « Cryo-Electron Microscopy ») consiste à observer un échantillon à basse température, sous un bombardement d'électrons [21]. L'échantillon biologique d'intérêt est congelé à  $-180^{\circ}\text{C}$  de manière à préserver sa structure native, et limiter sa dégradation lors de sa mise sous vide et de l'irradiation par le faisceau d'électrons. La multiplication des prises de clichés de diffraction sous différents angles, permet de reconstituer un modèle structural de l'analyte avec une résolution quasi atomique ( $\sim 3 \text{ \AA}$ ) [22].

### 2.3.3. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

➔ *Informations obtenues : structure à résolution atomique*

La résonance magnétique nucléaire est une technique qui repose sur l'interaction entre des noyaux atomiques de spins non nuls (H, C, F) et un champ magnétique. Ces noyaux atomiques, soumis à un rayonnement électromagnétique, absorbent une certaine énergie du rayonnement. Ensuite cette énergie est relâchée à une certaine fréquence qui dépend de l'environnement chimique. Ces fréquences, assimilées à un déplacement chimique sur un spectre RMN, permettent de déterminer la structure haute résolution de la biomolécule ou du complexe biologique en question. Si cette technique permet d'atteindre une résolution atomique [23], elle permet de travailler à haut débit (entre 100 et 1000 échantillons par jour selon la nature du complexe) [24], et d'accéder à des informations de types dynamiques de part son analyse directe en solution [25]. Toutefois cette approche possède deux paramètres assez limitants en biologie structurale : la quantité d'échantillon nécessaire ( $> \text{mg}$ ), et la taille des complexes analysables ( $< 30 \text{ kDa}$ ).

### 2.3.4. La cristallographie aux rayons X (DRX)

#### → *Informations obtenues : structure à résolution atomique*

La cristallographie repose sur la diffraction de rayons X par une biomolécule ou un complexe se trouvant sous forme cristalline. Les clichés de diffractions générés selon différents angles d'incidence des rayons, permettent de déterminer la nature et la position de chaque atome avec grande précision ( $< 2 \text{ \AA}$ ) [26]. La détermination de la structure tridimensionnelle permet alors d'élucider la stœchiométrie, la conformation ou encore les sites d'interaction des différents partenaires. Cette approche est largement utilisée en biologie structurale haute résolution, toutefois l'obtention de cristaux de bonne qualité représente le principal écueil de cette technique. A cette problématique, s'ajoutent la grande quantité d'échantillon nécessaire ( $> \text{mg}$ ) [24], ainsi que l'aspect non dynamique de l'analyse (cristal = état thermodynamiquement le plus stable).

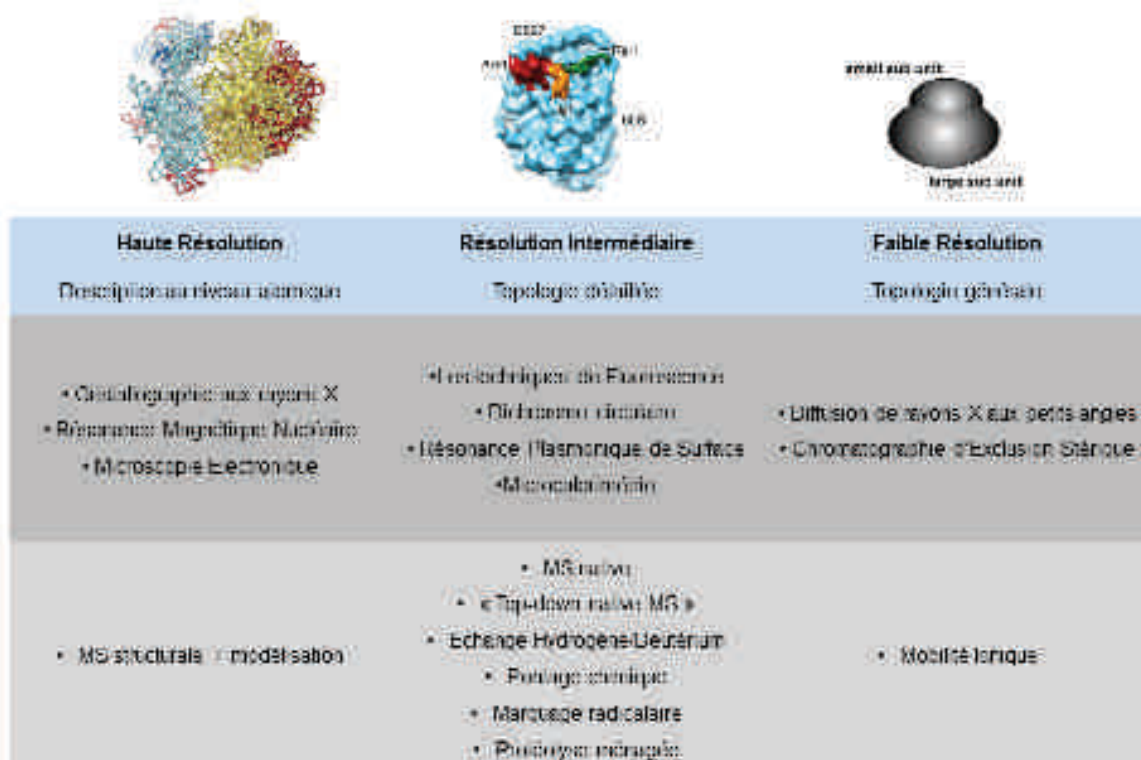
## 3. Conclusions

Les différentes techniques biophysiques présentées sont complémentaires et permettent de réaliser une caractérisation structurale de biomolécules ou de complexes biologiques avec des résolutions allant de la topologie générale à la résolution de la structure au niveau atomique. Toutefois, les limitations propres à chaque technique peuvent constituer un frein à la caractérisation de certains complexes biologiques. Dans ce contexte, l'ensemble des outils de spectrométrie de masse structurale s'imposent de plus en plus comme une alternative de choix.



## Chapitre 2- Caractérisation de complexes non-covalents par spectrométrie de masse structurale

Les limitations des techniques biophysiques observées dans le chapitre précédent ont souligné la nécessité de développer de nouvelles approches pour la caractérisation structurale de complexes biologiques non-covalents. Si la spectrométrie de masse était initialement cantonnée à la caractérisation de la structure primaire d'une protéine, les développements méthodologiques et instrumentaux ont permis l'apparition de nouveaux concepts regroupés sous le terme de spectrométrie de masse structurale [27] (figure 3).



Haute Résolution	Résolution Intermédiaire	Faible Résolution
Description au niveau atomique	Topologie détaillée	Topologie générale
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristallographie aux rayons X</li> <li>• Résonance Magnétique Nucléaire</li> <li>• Microscopie Electronique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthodes de Fluorescence</li> <li>• Dichroïsme circulaire</li> <li>• Résonance Plasmonique de Surface</li> <li>• Microcalorimétrie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diffusion de rayons X aux petits angles</li> <li>• Chromatographie d'Exclusion Stérique</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MS structurale + modélisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MS native</li> <li>• « Top-down native MS »</li> <li>• Echange Hydrogène-Deutérium</li> <li>• Pontage chimique</li> <li>• Marquage radicalaire</li> <li>• Phénylalanine métriquée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mobilité ionique</li> </ul>

Figure 3. Intégration des outils de spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale de complexes biologiques.



Si les différentes techniques de MS structurale prises individuellement ne permettent pas d'obtenir une description de la structure au niveau atomique, elles permettent d'obtenir des informations de natures différentes et donc complémentaires (figure 4). Ensuite, c'est la combinaison des données issues de ces différentes techniques qui permet d'accéder, au travers de différentes étapes de modélisation, à des modèles structuraux de haute résolution [28].

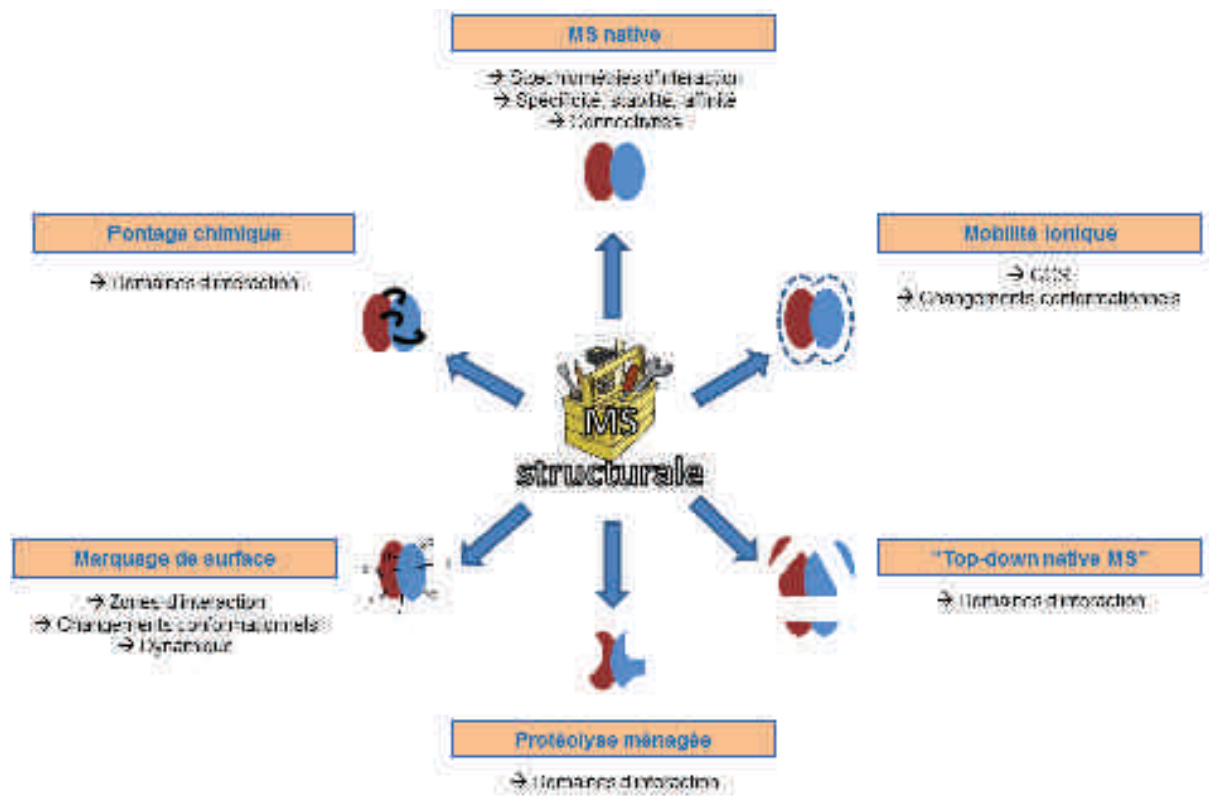


Figure 4. Présentation des principales techniques de MS structurale et des informations qui leur sont associées.

Les différentes techniques de MS structurale peuvent être divisées en deux domaines :

- Les **approches natives**
- Et les **approches de protéomique**

Après une description du principe de ces différentes approches, la nature des informations dégagées de chaque technique seront discutées. Nous porterons aussi une attention particulière sur les paramètres instrumentaux à optimiser, notamment pour les techniques qui ont été utilisées au cours de ces travaux de thèse.

## 1. Les approches natives

### 1.1. La spectrométrie de masse native (MS native)

#### 1.1.1. Principe

Le concept de spectrométrie de masse native ou supramoléculaire est basé sur le transfert de complexes non-covalents existant en solution vers une phase gazeuse. Les travaux de Chait et Henion en 1991 ont constitué le point de départ de cette approche [29, 30]. Si le maintien de complexes non-covalents en phase gazeuse est possible, c'est grâce à l'apparition, à la fin des années 1980, des techniques d'ionisation dites douces comme :

- le **MALDI** (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ») (Nobel 2002)
- et l'**ESI** (« Electrospray Ionisation ») (Nobel 2002).

Le principe de l'ionisation MALDI consiste à désorber/ioniser un analyte sous forme co-cristallisé à l'aide d'un tir laser [31]. Si cette approche a été décrite dans la littérature pour l'analyse de complexes supramoléculaires [32, 33], l'utilisation de matrices organiques acides, ou l'énergie communiquée à l'échantillon par le laser rendent difficile le maintien de l'intégrité du complexe [34].

L'ionisation ESI repose sur l'application d'une différence de potentiel entre le capillaire contenant l'échantillon et l'entrée du spectromètre de masse [35]. L'analyte sera alors ionisé et transmis en phase gazeuse. Aujourd'hui, cette méthode est largement répandue pour les analyses de type natives. En effet, l'ionisation ESI est encore plus douce que l'ionisation MALDI, et permet une meilleure préservation des complexes en phase gazeuse. De plus, la production d'ions multichargés constitue un autre avantage, dans la mesure où l'étude d'édifices de hauts poids moléculaires est rendue possible.

#### 1.1.2. Informations accessibles

L'analyse de complexes non-covalents en conditions natives permet de maintenir la structure de ce dernier, et d'en mesurer le ou les rapports  $m/z$  associés.

- En combinant cette mesure de masse, à une autre en conditions dénaturantes, il est possible de **vérifier la nature non-covalente** du système mais aussi de **déterminer la stœchiométrie d'interaction** [36, 37], ou encore **l'état d'oligomérisation** [38, 39]. Cette

approche permet notamment d'étudier la **dynamique d'assemblage** d'un complexe par analyse en temps réel [40], mais aussi de mettre en évidence des phénomènes de **coopérativité** [41, 42].

- Le développement de méthodes de quantification relative basées sur des expériences de titrage ou de compétition permet d'évaluer la spécificité [43] et l'affinité des complexes. La réalisation d'une gamme de titration permet de déterminer des **constantes d'affinité** ( $K_a$ ) ou de **dissociation** ( $K_d$ ) pour une gamme de  $10^{-7}$  à  $10^{-3}$  M [44, 45]. Des expériences de compétition directe et/ou indirecte permettent quant à elles d'évaluer **l'affinité relative** d'un partenaire avec différents types de ligands [46]. Ces deux types d'expériences particulières ont notamment été utilisés pour la caractérisation d'un complexe impliqué dans la machinerie d'assemblage des snoRNPs à boîte C/D (cf. chapitre 1 de la partie 3).
- La **stabilité d'un complexe en phase gazeuse** peut aussi être évaluée [46]. Des expériences de  $V_{c50}$  visant à déterminer l'énergie nécessaire pour induire une dissociation du complexe à hauteur de 50 %, permet de **sonder la contribution des interactions électrostatiques** intervenant dans la formation du complexe [47].
- L'analyse de complexes et de sous-complexes, qu'ils soient purifiés ou générés expérimentalement (dénaturation partielle ou dissociation en phase gazeuse) permet d'obtenir des informations sur les **connectivités** des différentes sous-unités [48, 49].

### 1.1.3. Instruments utilisables en MS native

De façon majoritaire, ce sont les analyseurs de types TOF ou Q-TOF qui sont utilisés pour des approches natives. En effet, cette géométrie d'analyseur permet d'identifier avec une relative précision des ions avec de hauts rapports  $m/z$  [50], et permet de caractériser des composés de très hauts poids moléculaires [51-53]. De plus, la possibilité de moduler assez aisément la pression au niveau du bloc source contribue aussi à leur succès dans ce domaine (voir dans le paragraphe suivant l'influence de ce paramètre). Cependant, depuis 2012 et l'introduction d'un instrument à analyseur Orbitrap, la MS native à haute résolution est désormais accessible [54].

Au cours de cette thèse, la grande majorité des analyses en conditions natives ont été réalisées sur des instruments à géométrie Q-TOF (Synapt G2 HDMS, Waters) et Orbitrap (Exactive Plus EMR, ThermoFischer Scientific). Les spécificités et les avantages de ces instruments seront notamment discutés dans le chapitre 1 de la partie 3.

### 1.1.4. Paramètres instrumentaux importants

L'analyse de protéines en conditions natives requiert au préalable une étape de changement de tampon dite de dessalage, de manière à éliminer les sels non volatils du tampon de stockage (NaCl, Tris, HEPES, MOPS, ...). Cette préparation d'échantillon peut être réalisée selon différents procédés (filtration sur gel, ultrafiltration sur membrane, dialyse), avec un tampon présentant l'avantage de mimer les conditions de stockage (pH et force ionique) avec des sels volatils. Dans ce contexte, c'est l'acétate d'ammonium ( $\text{AcONH}_4$ ) qui est le plus largement utilisé [50, 55].

D'un point de vue instrumental, l'analyse de complexes non-covalents par MS native requiert, de façon générale, l'optimisation de deux paramètres majeurs :

- La **tension d'accélération (Vc)**
- Et la **pression de l'interface (Pi)**

Les optimisations sont réalisées avec pour objectif de trouver le meilleur compromis entre **transmission** des analytes au sein du spectromètre de masse, **maintien** des complexes non-covalents, et meilleure **désolvatation** possible (figure 5).

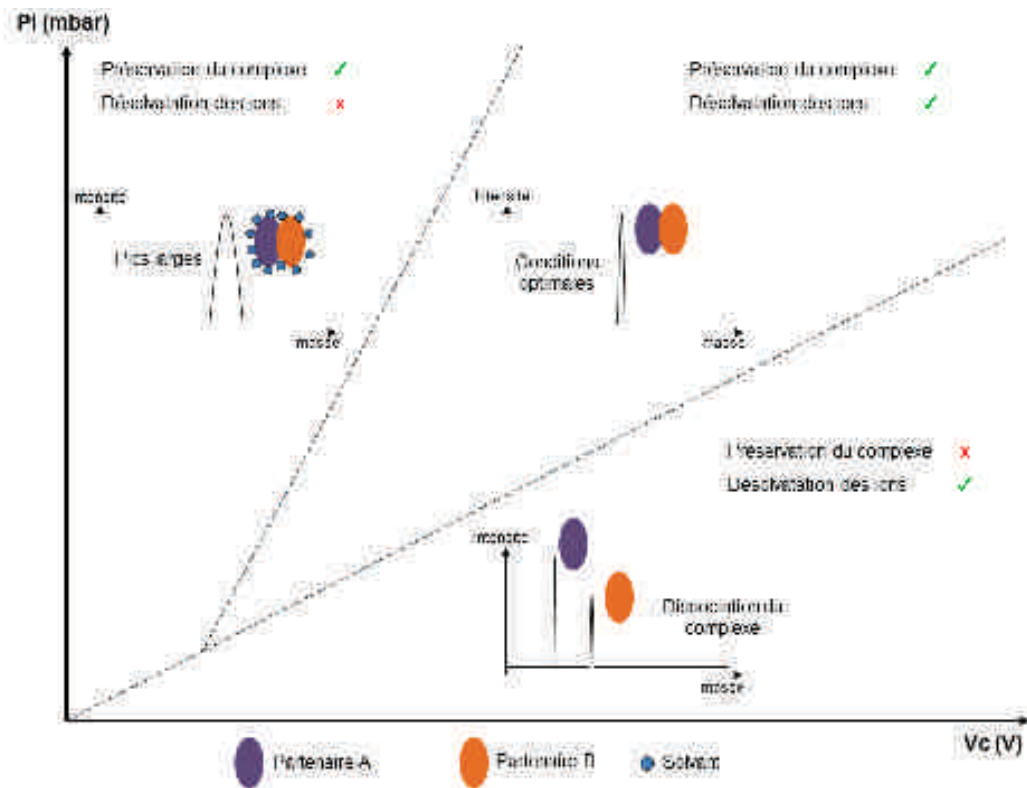


Figure 5. Optimisation des paramètres instrumentaux en MS native (adaptée à partir de [56]).

⇒ La tension d'accélération

La tension d'accélération ou tension de cône ( $V_c$ ) permet de communiquer une certaine énergie cinétique aux ions. Aux travers de collisions avec des molécules de gaz résiduelles, cette énergie cinétique est convertie en énergie interne. Toutefois, si la tension de cône doit être suffisamment importante de manière à obtenir une bonne transmission de l'analyte, ainsi qu'une désolvation convenable, elle doit être optimisée de manière à ne pas entraîner la dissociation du complexe à analyser. A titre représentatif, l'analyse du complexe co-purifié Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par MS native (5  $\mu$ M) à différentes valeurs de  $V_c$ , a mis en évidence l'influence de ce facteur sur la qualité de la caractérisation du complexe (figure 6). Ainsi, pour une valeur de  $V_c$  relativement faible (80 V, figure 6 a), le complexe 1:1 est caractérisé. Toutefois ce paramétrage ne semble pas optimal pour la transmission, et la désolvation des ions (cf. zoom 18+). Pour une valeur de  $V_c$  importante (200 V, figure 6 c), la désolvation des ions apparaît meilleure, cependant elle est optimisée au détriment du maintien du complexe non-covalent en phase gazeuse. En effet, l'intensité apparente du complexe est inférieure à celle observée pour un  $V_c$  de 120 V (figure 6 b). Dans le cadre de l'analyse du complexe co-purifié Bcd1pFL/Rtt106p(65-320), un  $V_c$  de 120 V se présente alors comme le meilleur compromis entre transmission/maintien du complexe et désolvation des ions.

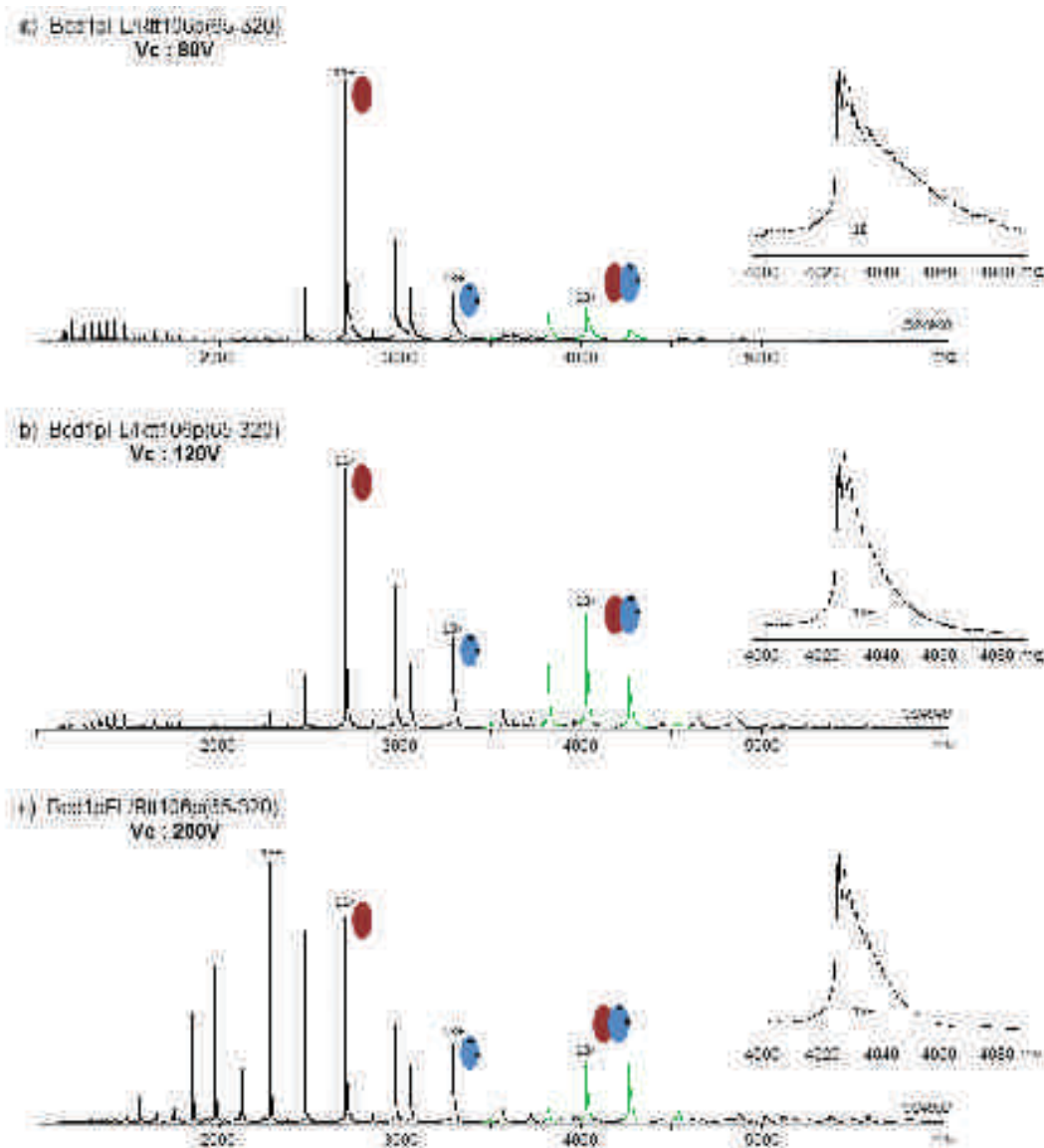


Figure 6. Influence de la tension de cône ( $V_c$ ) sur la transmission et la désolvation du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320). Le complexe co-purifié est infusé à 5  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) en conditions natives sur le Synapt G2 HDMS ( $P_i$  : 6 mbar), à différentes valeurs de  $V_c$  : 80 V (a), 120 V (b) et 200 V (c).

⇒ La pression de l'interface

La pression de l'interface peut être modulée grâce à la mise en place d'une vanne de fuite dans le circuit de pompage primaire. Le contrôle de la pression à ce niveau permet de moduler le libre parcours moyen des ions. L'augmentation de la pression entraîne une augmentation du nombre de chocs entre les ions et les molécules de gaz résiduelles ; ainsi l'énergie interne des ions est limitée, permettant de conserver l'intégrité du complexe non-covalent en phase gazeuse [57]. Ces propos sont ici illustrés à travers l'analyse du complexe myoglobine-hème

(figure 7). Pour une tension d'accélération constante ( $V_c$  : 100 V), nous pouvons remarquer que le maintien intégral du complexe protéine-ligand n'est observable que pour une pression en source suffisamment élevée (6 mbar, figure 7 a). Si la diminution de cette pression permet d'améliorer légèrement la désolvatation, elle se fait au détriment du maintien du complexe. En effet, pour des valeurs de  $P_i$  plus faibles (4 et 2 mbar, figure 7 b et c), la proportion d'apo-myoglobine se trouve fortement augmentée.

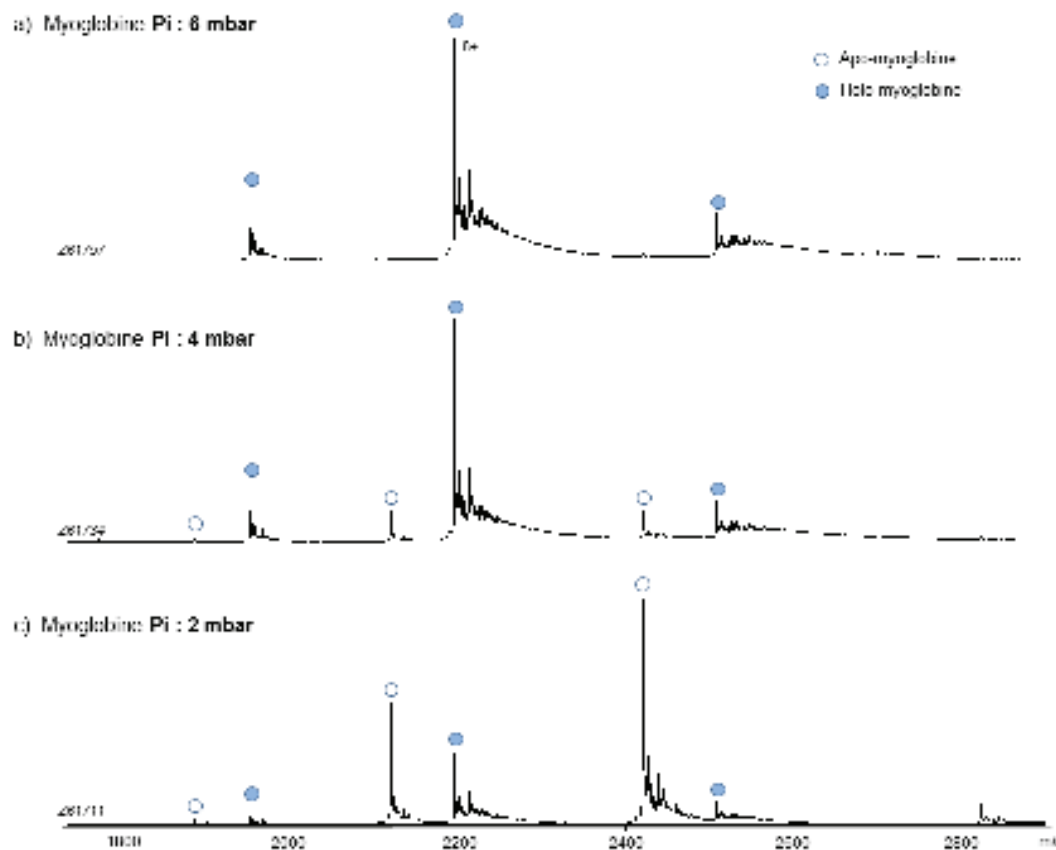


Figure 7. Influence de la pression de l'interface ( $P_i$ ) sur la désolvatation et le maintien du complexe Myoglobine/hème. L'échantillon est infusé à  $5 \mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur le LCT en conditions natives ( $V_c$  : 100 V), à différentes valeurs de  $P_i$  : 6 mbar (a), 4 mbar (b) et 2 mbar (c).

### 1.1.5. Discussion

Si la MS native permet d'accéder à de nombreuses informations complémentaires (cf. paragraphe 1.1.2.), il n'en demeure pas moins que cette approche possède certaines limitations. En effet, la qualité des résultats est étroitement liée à l'étape de préparation d'échantillon (échange de tampon), ainsi qu'à une optimisation fine des paramètres

instrumentaux. Ces optimisations permettent de maintenir l'intégrité du complexe en phase gazeuse, et d'obtenir une mesure de masse la plus précise possible.

D'un point de vue applicatif, la caractérisation de protéines membranaires par MS native a longtemps constitué un point limitant. Si l'analyse de ce type de protéines est possible en milieu micellaire (détergents) [58], cette approche n'est pas routinière et de nombreuses optimisations expérimentales et instrumentales sont nécessaires.

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

### 1.2.1. Principe

La spectroscopie de mobilité ionique consiste à séparer des ions en fonction de leur charge et de leur conformation, au sein d'une cellule remplie de gaz sous l'influence d'un champ électrique ; cette approche peut être assimilée à de « l'exclusion stérique en phase gazeuse » (figure 8). Les ions de conformations plus compactes subiront alors moins de chocs avec le gaz résiduel que des ions avec une conformation étendue, et seront alors drainés plus rapidement au sein de la cellule IMS. Toutefois la conformation des ions n'est pas le seul paramètre influant sur leur temps de dérive au sein de la cellule. En effet, la charge de l'ion aura aussi une incidence. Ainsi, à conformation « égale », un ion plus chargé répondra plus favorablement au champ électrique et sera alors drainé plus rapidement qu'un ion plus faiblement chargé [59, 60] (figure 8).

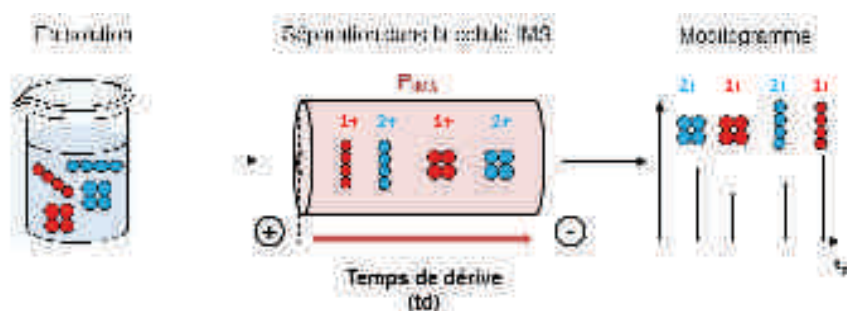


Figure 8. Représentation schématique de la séparation des ions en fonction de leur conformation et de leur charge, au sein de la cellule IMS.



### 1.2.2. Informations accessibles

Si cette approche peut être utilisée comme une dimension de séparation supplémentaire pour une analyse protéomique [61], elle permet d'accéder à un niveau structural lors d'analyses en conditions natives :

- En effet, la mise en évidence de différences au niveau du temps de dérive au sein de la cellule de mobilité ionique peut révéler des **différences de conformations globales** [62].
- A partir de la mesure des temps de dérive, il est possible de déterminer les **sections efficaces de collision (CCS)** des analytes (cf. paragraphe 1.2.5.). La CCS est représentée comme l'aire projetée du volume en phase gazeuse occupé par la molécule analysée.
- Le suivi de ces temps de dérive et/ou CCS peuvent permettre la mise en évidence de **changements conformationnels durant l'assemblage de complexes multi-protéiques** [48, 63] (cf. partie 4 chapitre 2).
- La nature des informations permet notamment d'étudier la **dynamique** d'oligomérisation [64], ainsi que les mécanismes de dépliement/repliement des protéines [65].
- Cette approche a aussi montré son intérêt pour la caractérisation de systèmes protéines-ligands. Ainsi le criblage de ces systèmes non-covalents par IM-MS peut mettre en évidence des **changements conformationnels très fins** ( $\Delta$  CCS de  $\sim 1\%$ ), et participer à la pré-sélection de candidats thérapeutiques [46, 66].
- La dimension mobilité ionique combinée à une activation de la conformation des ions en phase gazeuse permet d'accéder à des **informations d'ordre de stabilité**. Si dans certains cas, la résolution effective en mobilité ionique permet de mettre en évidence des différences globales entre deux systèmes, l'application d'énergie croissante peut mettre évidence des différences au niveau des profils de dépliement de la protéine ou du complexe en question [67, 68]. Cette approche est connue sous le terme de CIU (« Collision Induced Unfolding »).

### 1.2.3. Instruments utilisables en IM-MS native

A l'heure actuelle, il existe deux types d'instruments permettant d'utiliser la spectroscopie de mobilité ionique pour la caractérisation structurale de complexes supramoléculaires :

- La gamme Q-TOF 6560 proposée par Agilent Technologies
- La gamme Synapt de chez Waters.

D'un point de vue conceptuel, ces deux gammes sont assez différentes dans le sens où :

- Pour l'instrument Agilent, la cellule de mobilité ionique est placée entre la source d'ionisation et le quadripôle ; alors que sur les instruments Waters, cette cellule se trouve entre le quadripôle et l'analyseur TOF.
- Les cellules de mobilité aussi sont différentes : le premier instrument cité, possède une cellule IM de type DTIMS (« Drift Tube Ion Mobility Spectrometry »), alors que la gamme Synapt est équipée d'une cellule de type TWIMS (« Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry »).

Au cours de cette thèse, les expériences de mobilité ionique ont été réalisées sur un Synapt G2 HDMS (Waters) (figure 9).

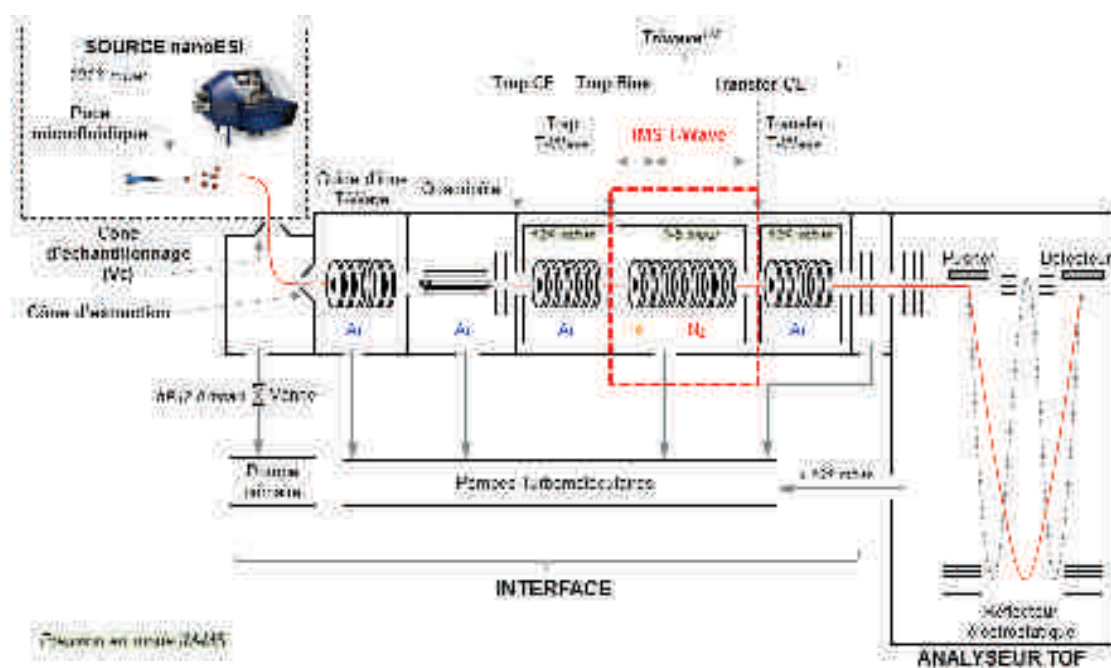


Figure 9. Représentation schématique du Synapt G2 HDMS (Waters) en mode IM-MS native. La cellule de mobilité ionique est encadrée en pointillés rouges.

Cet instrument possède donc une cellule de mobilité ionique « Travelling Wave », constituée de guides d'ions SRIG (« Stacked Ring ion Guide »). Les premières lentilles sont alimentées en Hélium de manière à thermaliser les ions entrants, alors que le reste de la cellule est sous Azote. Les ions seront alors drainés au travers de la cellule de mobilité par des vagues de potentiels se propageant de lentille en lentille. La séparation des ions se produit alors sous l'effet de chocs avec les molécules de gaz. Les ions qui seront alors ralentis jusqu'à un certain

point, subiront des phénomènes de « retour en arrière » (« roll-over ») ; et seront alors entraînés par les vagues de potentiel suivantes [69] (figure 10).

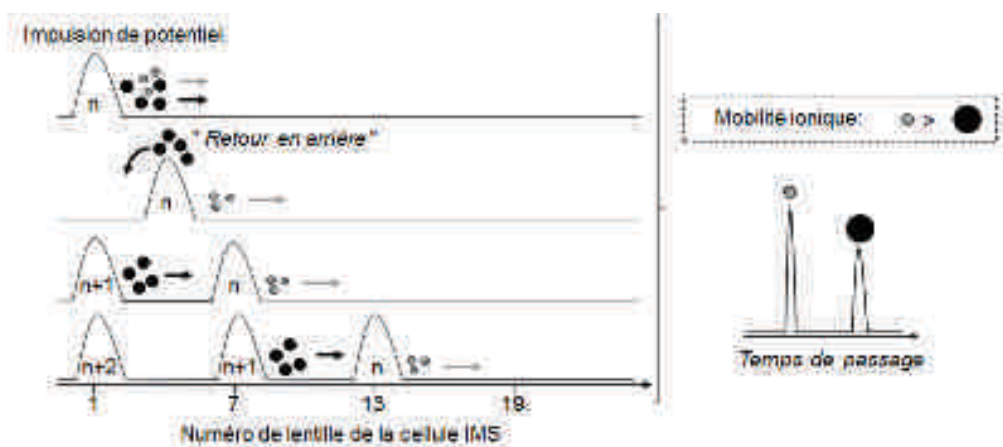


Figure 10. Séparation des ions dans la cellule TWIMS. Les vagues de potentiel successives drainent les ions ralentis par les chocs avec les molécules de gaz (adaptée à partir de [59]).

Toutes les autres parties de cet instrument seront détaillées dans le chapitre 1 de la partie 3.

#### 1.2.4. Optimisations instrumentales

En plus des prérequis liés à une analyse en conditions natives (cf. 1.1. MS native), l'utilisation de la dimension mobilité ionique nécessite une optimisation fine de certains paramètres instrumentaux, de manière à atteindre un pouvoir de séparation maximum tout en conservant la conformation native des espèces séparées.

Dans ce contexte, l'optimisation de deux couples de paramètres est primordiale [66] :

- **Hauteur et vitesse de vague**
- **Débit de gaz dans la cellule TWIMS**

⇒ Influence de la hauteur et vitesse de vague

- Une augmentation de la vitesse de vague (WV) va entraîner un nombre de « retour en arrière » ou « roll-over » plus important. Ce phénomène aura tendance à augmenter le temps de passage des ions dans la cellule IM et donc à améliorer la résolution de séparation (figure 11) (l'équation permettant de calculer la résolution de séparation en IM-MS est présentée en annexe du manuscrit). Toutefois, il est nécessaire de ne pas dépasser une valeur

limite à partir de laquelle des phénomènes de diffusion ou élargissement des pics apparaîtront, ces derniers entraînant une diminution de la résolution (figure 11).

- Concernant la hauteur de vague (WH), une augmentation de cette valeur diminue les mouvements de « roll-over » ; ainsi, le temps de passage dans la cellule IM se trouve diminué. Cependant, des valeurs de WH trop faibles favorisent les phénomènes de diffusion et entraînent une diminution de la résolution (figure 11). Une valeur de WH permettant d'obtenir une résolution suffisamment importante sans faire sortir les ions de la cellule IM trop rapidement doit ainsi être déterminée.

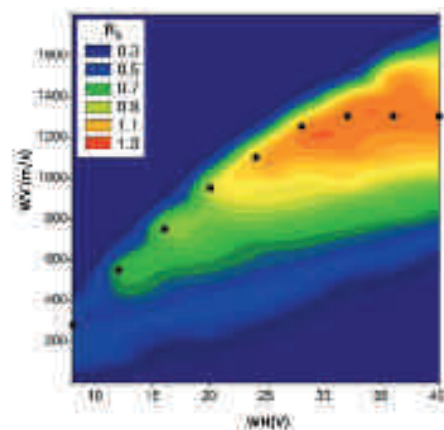


Figure 11. Influence de la hauteur et vitesse de vague sur la résolution de séparation ( $R_s$ ) pour le complexe Bcl-xL apo et holo ABT-737 (adaptée à partir de [66]).

#### ⇒ Influence des débits de gaz dans la cellule TWIMS

L'autre couple de paramètre à optimiser, est le rapport des gaz hélium/azote présents au sein de la cellule IM. Si les paramètres de hauteur et vitesse de vague conditionnent le nombre de mouvements de « roll-over », la pression en gaz de la cellule TWIMS permet de moduler le nombre de collisions entre les ions analysés et les molécules de gaz. Dans ce contexte une augmentation de pression jusqu'à un certain point permet d'augmenter la résolution de séparation (figure 12), cependant là aussi une valeur seuil ne doit pas être dépassée afin de ne pas entraîner de phénomènes de diffusion.

Il est ici important de noter qu'il n'existe pas une valeur optimale pour les paramètres de vague, débit et pression de gaz ; il est possible de trouver plusieurs couples de valeurs permettant d'obtenir une résolution de séparation équivalente (figure 12 a).

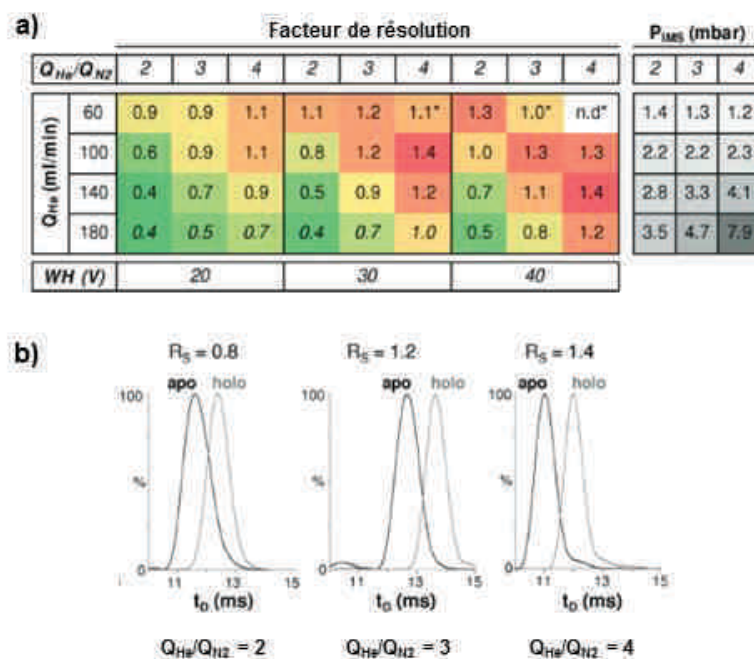


Figure 12. Influence du rapport des pressions He/N<sub>2</sub> de la cellule TWIMS sur la résolution de séparation (R<sub>S</sub>) pour le complexe Bcl-xL apo et holo ABT-737. Le panel (a) présente les facteurs de résolution calculés pour différents ratio  $Q_{He}/Q_{N_2}$  ; le panel (b) présente les mobilogrammes et les facteurs de résolution associés pour différents ratios  $Q_{He}/Q_{N_2}$  (adaptée à partir de [66]).

### 1.2.5. Calculs de CCS

⇒ CCS expérimentales

Comme énoncé précédemment, la caractérisation du temps de dérive au sein de la cellule IM permet de calculer des CCS [62].

Dans une cellule IM de type « Drift Tube » la mobilité d'un ion, notée  $K$ , est définie par le rapport entre sa vitesse dans la cellule IM ( $v_d$ ) et le champ électrique ( $E$ ). Le fait que ce champ électrique soit ici linéaire, l'équation de Mason-Schamp permet de corréler directement la mobilité d'un ion à une section efficace (CCS) [70].

Pour une cellule IM de type « Travelling Wave », ce champ électrique n'est pas linéaire [71], et l'équation de Mason-Schamp reliant CCS et mobilité ionique ne peut être directement utilisée. La détermination des CCS avec une cellule TWIMS (<sup>TW</sup>CCS) doit alors passer par l'utilisation d'une droite d'étalonnage. Cette dernière est réalisée à l'aide de protéines modèles dont les CCS ont été déterminées avec un instrument de type DTIMS (<sup>DT</sup>CCS) [72]. Les équations permettant de déterminer une CCS expérimentale à partir de données TWIMS sont décrites en détail en annexe du manuscrit.

⇒ CCS théoriques

La CCS d'une molécule peut être calculée *in silico*, à partir d'une structure haute résolution obtenue en cristallographie, RMN ou cryo-EM. En effet un programme comme MOBCAL, développé par l'équipe de Jarrold et mis à jour par Ruotolo *et al.*, [62], simule et intègre les collisions entre les atomes de la molécule et le gaz tampon. De cette simulation, la CCS peut être déterminée selon trois algorithmes :

- **L'algorithme « Projection Approximation » (PA)** : cette méthode de simulation assimile les atomes à des sphères dures, et la CCS est déterminée par une moyenne des aires projetées de ces sphères. Si cette approche facilite le calcul et augmente sa rapidité, elle a tendance à sous-estimer les valeurs de CCS étant donné qu'elle ne considère pas l'ensemble des collisions entre atomes.
- **L'algorithme « Exact Hard Sphere Scattering » (EHSS)** : cette approche permet de tenir compte d'une partie des collisions entre les ions et les molécules de gaz. Cet algorithme permet alors de déterminer des CCS plus fiables, néanmoins la considération d'un modèle de sphère dure occulte certaines interactions.
- **L'algorithme « Trajectory Method » (TM)** : cette méthode de simulation permet de déterminer les CCS les plus justes, étant donné que l'ensemble des interactions se produisant entre les ions et les molécules de gaz est considéré. Cette approche nécessite cependant un temps de calcul plus important.

Toutefois, en l'absence de structures haute résolution, il est aussi possible d'estimer une CCS à partir de la masse d'une protéine, et de l'équation proposée par Ruotolo *et al.*, [62] (cette approximation étant basée sur un modèle sphérique) :

$$\Omega = 2.435 \times M^{2/3}.$$

### 1.2.6. Discussion

L'utilisation de la dimension mobilité ionique permet d'accéder à un certain niveau de caractérisation structurale d'une molécule ou d'un complexe en conditions natives : détermination des CCS et mise en évidence de changements conformationnels assez fins. Toutefois, l'activation de ce mode entraîne une diminution de la sensibilité (~ facteur 10), et la détermination de CCS avec un Synapt G2 (cellule IM remplie d'azote, <sup>TW</sup>CCS<sub>N2</sub>) passe par

l'utilisation d'une droite d'étalonnage avec des molécules dont les CCS ont été déterminées par DTIMS (cellule IM remplie d'hélium,  $^{DT}CCS_{He}$ ). Le choix des étalons est alors primordial pour la détermination d'une CCS fiable [73, 74].

## 2. Les approches de protéomiques

### 2.1. Généralités

Avant d'introduire les méthodes de caractérisation structurale utilisant une approche protéomique, une brève introduction à ce qu'est la protéomique sera réalisée, et les concepts analytiques seront présentés.

La protéomique se présente comme la science permettant la caractérisation du protéome (ensemble des protéines) d'un échantillon biologique (tissu, fluide) provenant d'un organisme particulier (humain, animal, plante, ...). Cette approche permet notamment de déterminer la présence de protéines particulières, de caractériser leurs modifications post-traductionnelles ou encore de les quantifier.

La stratégie classique en protéomique consiste à (figure 13) :

- Séparer les protéines sur gel d'électrophorèse si l'échantillon est complexe,
- Digérer l'échantillon par l'action d'une enzyme,
- Séparer les peptides générés par une étape de chromatographie liquide,
- Analyser ces derniers par spectrométrie de masse,
- Puis à identifier les peptides et protéines par une recherche dans une banque de données.



Figure 13. Représentation schématique d'une analyse classique en protéomique (adaptée à partir de [75]).

Au niveau de l'analyse par spectrométrie de masse, l'identification ou le séquençage des peptides issus de la digestion enzymatique se fait au travers d'expériences de spectrométrie de masse en tandem, dites de MS/MS. Pour ce faire, deux modes d'acquisitions sont possibles :

- Le DDA (« Data Dependant Acquisition »)



- Le DIA (« Data Independent Acquisition »)

Le mode DDA consiste à alterner une analyse MS et analyse MS/MS. Selon le spectromètre de masse utilisé, les trois à dix ions les plus intenses pourront être sélectionnés sur le scan MS et fragmentés lors du scan MS/MS (figure 14).

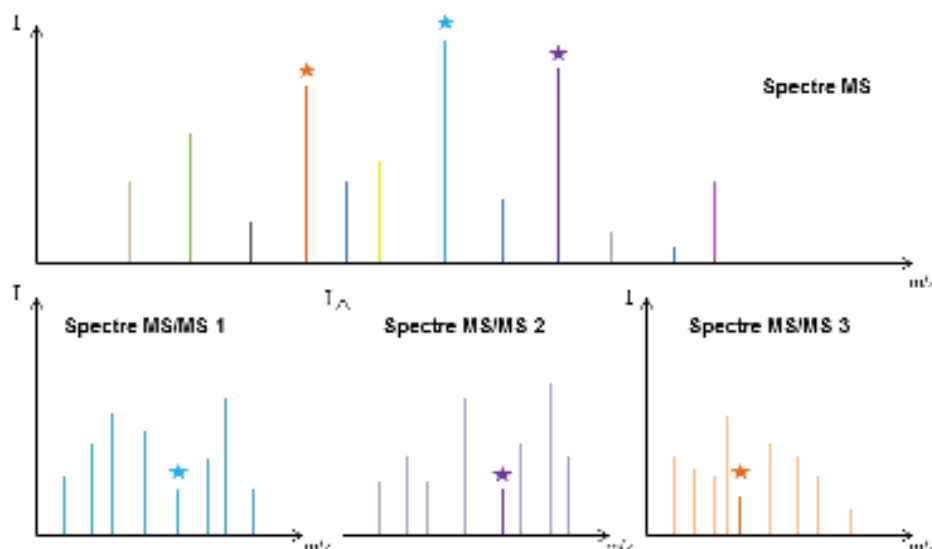


Figure 14. Représentation schématique du mode d'acquisition DDA.

Une autre approche nommée DIA consiste à s'affranchir d'une étape de sélection, et donc permet en théorie de limiter la perte d'information due à la non-sélection d'un ion. Ce mode d'acquisition DIA regroupe deux méthodes majeures :

- La technologie SWATH [76], permettant une isolation séquentielle des précurseurs sur une fenêtre de masse, et leur fragmentation.
- La technologie MS<sup>E</sup> [77], permettant de fragmenter l'ensemble des ions précurseurs sur une large gamme de masse, en alternant des scans basse et haute énergie (cette technique a notamment été utilisée pour les approches HDX-MS et sera décrite plus précisément dans la partie 2).

Au niveau de la fragmentation, plusieurs approches sont possibles :

- La dissociation induite par collision avec un gaz neutre (Ar, N<sub>2</sub>, He) : CID (« Collision Induced Dissociation »).
- La dissociation par transfert ou capture d'électron : ETD (« Electron Transfer Dissociation ») et ECD (« Electron Capture Dissociation »).



Selon le type de dissociation utilisée, la nature des fragments sera différente. Si le mode CID génère préférentiellement des ions *b* et *y*, les modes ECD/ETD génèrent des ions *c* et *z* (figure 15) :

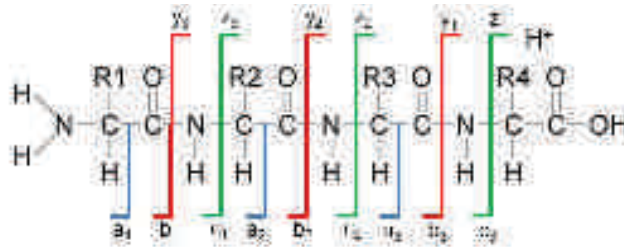


Figure 15. Nomenclature de Biemann des ions fragments. [78]

Ainsi la détermination des masses des ions fragments consécutifs, permet de remonter à la séquence de l'ion précurseur, et donc du peptide. C'est à partir de cette approche que les protéines sont identifiées et séquencées.

## 2.2. Le pontage chimique ou crosslink (XL)

### 2.2.1. Principe

Le pontage chimique ou encore « crosslink » consiste à lier covalamment les sous-unités constitutives d'un complexe non-covalent. Cette étape de pontage est réalisée par une réaction chimique, et l'ajout d'un agent bi- (voire tri-) fonctionnel spécifique, muni d'un bras espaceur (figure 16). Cette approche permet notamment d'étudier des complexes de types protéine-protéine ou protéine-ADN [79, 80]. L'analyse de complexes pontés peut se diviser en deux parties principales (figure 16) :

- L'analyse du complexe ponté intact, de manière à déterminer la stœchiométrie d'interaction.
- L'analyse du complexe avec une stratégie classique de protéomique de manière à déterminer les peptides pontés.

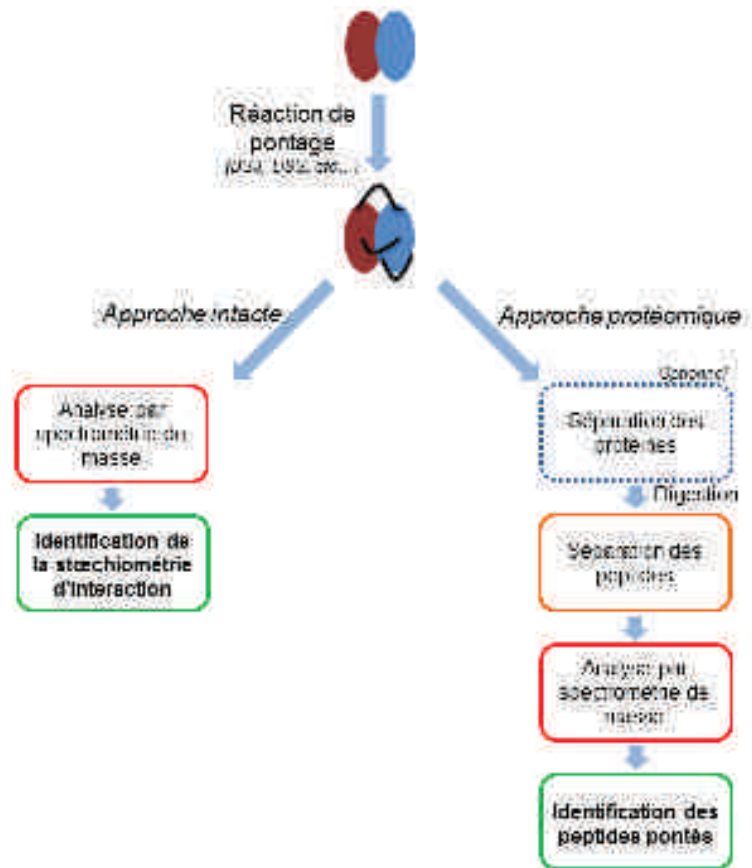


Figure 16. Représentation schématique des stratégies d'analyses possibles en « crosslink ».

### 2.2.2. Informations accessibles

L'approche « crosslink » permet de déterminer de nombreuses informations d'ordre structural suivant la stratégie analytique adoptée.

- L'analyse intacte de complexes pontés peut être utilisée afin de vérifier l'état **d'avancement de la réaction de pontage** ou déterminer la **stoechiométrie d'interaction** d'un complexe [81]. Cette approche peut se trouver en appui de la MS native, et montre un intérêt particulier pour des complexes peu stables en acétate d'ammonium [82]. Dans ce contexte, l'analyse par MALDI est privilégiée, toutefois la formation de complexes de hauts poids moléculaires nécessite l'utilisation de détecteur particulier comme le CovalX [83].
- L'analyse de complexes « crosslinkés » par une approche protéomique permet d'identifier les peptides pontés. La caractérisation de ces derniers renseigne sur la **proximité spatiale** entre deux acides aminés spécifiques. Ainsi, il est possible de déterminer des **zones d'interaction ou spatialement proches** [81, 84, 85]. L'identification de peptides pontés inter et intra, permet d'accéder à un niveau de caractérisation assez fin [86], dans le sens où

il est possible de modéliser dans l'espace les points d'ancrage, grâce à la connaissance de la taille du bras espaceur [28, 87].

### 2.2.3. Partie expérimentale

Dans la conception d'une expérience « crosslink », plusieurs paramètres doivent être déterminés avec précaution, dont la nature de l'agent pontant.

- En effet, le type d'agent doit être choisi en fonction de sa **spécificité** à réagir avec des acides aminés en particuliers, tout en **préservant l'état natif du complexe**. Suivant la séquence des partenaires en interaction, il sera préférable de cibler des acides aminés basiques [88], acides [89] ou autres [90]. Plusieurs groupements réactifs ciblant spécifiquement certains acides aminés sont disponibles commercialement (tableau 1) :

Fonctions réactives	Acides aminés cibles
Haloacétyl	Cysteine
Maleimide	
Alcyl	
Aldéhyde	Lysine et N ter
Esther (octyl, myrist, myrist)	
Dicarbonyl	Arginine et Lysine
Carboxylinde	Acide aspartique et glutamique
Dihydrasid	
Azide (iprény, born, isotrate, iprény)	Non spécifique
Benzochénone	

Tableau 1. Sélection de fonctions réactives portées par les agents pontants avec les acides aminés ciblés spécifiquement (adapté de [82]).

- S'il est possible de sélectionner les points d'ancrage de part la nature des groupements réactifs de l'agent pontant, il est aussi possible de choisir la taille du bras espaceur (généralement comprise entre 5 et 20 Å). Ainsi, en multipliant l'utilisation de « **linkers** » **de taille différentes**, la détermination de proximités à plus ou moins longues distances est accessible, et permet d'améliorer la résolution structurale du complexe analysé.
- Une des limitations principales de cette approche se situe au niveau du rendement de la réaction de pontage [90]. Toutefois, il apparaît nécessaire de contrôler la quantité d'agent pontant de manière à ne pas induire des associations non-spécifiques [91]. Si les peptides « crosslinkés » sont beaucoup moins abondants que les peptides « normaux », des méthodes d'**enrichissement** ont été développées, sur des principes différents :

chromatographie d'exclusion stérique [84], affinité [92, 93] ou encore sur la chimie « click » [94, 95].

- La recherche des peptides pontés constitue un autre point clé dans cette approche. De manière à faciliter et **valider l'identification** de ces derniers, il est envisageable d'utiliser un mélange d'**agent pontant marqué aux isotopes stables** (léger/lourd) [88], ou encore certains agents particuliers permettant de générer des ions spécifiques (reporters) au moment de la fragmentation [93, 95].

#### 2.2.4. Traitements des données

L'analyse de données « crosslink » a longtemps constitué un point très limitant de cette approche. En effet, s'il est possible d'implémenter de nouvelles modifications dans les moteurs de recherche comme Mascot, classiquement utilisé en protéomique, ce type de logiciel ne peut gérer que les peptides linéaires et non les pontés.

Dans ce contexte, plusieurs dizaines de logiciels ont été développés [96], comme MassMatrix [97], X-Quest [98], p-link [99] pour ne citer qu'eux. Si pour certains de ces derniers, les données brutes d'un constructeur particulier était un prérequis, ou la plateforme de visualisation des résultats peu conviviale, ces aspects ont été pris en compte avec la suite logicielle MS Studio [100] (cf. partie 4 chapitre 2).

#### 2.2.5. Discussion

L'approche « crosslink » peut être particulièrement informative dans la détermination de stoechiométrie d'interaction, de zones de proximités. Ces données sont particulièrement intéressantes pour donner des contraintes spatiales pour la modélisation de structures protéiques. Toutefois, le succès de cette technique et du pontage est protéine dépendant, et ne permet pas de suivre un protocole généralisable ; de nombreuses optimisations expérimentales sont donc nécessaires. Un autre point limitant se situe au niveau de l'identification des peptides pontés. La faible proportion de ces derniers nécessite l'utilisation de spectromètres de masses très sensibles et/ou une étape d'enrichissement. De plus, si les logiciels de retraitement ont tendance à se développer pour un large public, il n'en demeure pas moins qu'aucun critère de validation n'est standardisé.

## 2.3. Autres approches de marquage de surface

### 2.3.1. Principe

Dans les approches de protéomique structurale, il existe des techniques orthogonales au XL-MS, n'impliquant pas de pontage covalent entre différents partenaires. Parmi ces autres méthodes, nous pouvons trouver :

- **L'échange hydrogène/deutérium.** Cette approche fait l'objet d'une description détaillée en partie 2.
- **Le marquage radicalaire ou « Hydroxyl Radical Footprinting » (HFP).** Cette technique repose sur l'oxydation radicalaire des chaînes latérales des acides aminés de surface d'une protéine ou d'un complexe en conditions natives [101, 102]. L'oxydation se fait ici à travers l'utilisation d'espèce radicalaire (HO<sup>•</sup>), qu'il est possible de générer selon de nombreuses méthodes (radiolyse de l'eau, photolyse de peroxyde d'hydrogène, réaction de Fenton, ...) [27, 101].

### 2.3.2. Informations accessibles

La méthode de marquage HFP permet d'obtenir des informations d'accessibilité et de dynamique [103, 104]. Ainsi, dans une approche comparative, cette méthode peut être utilisée de manière à :

- Suivre **l'effet conformationnel** d'une mutation, d'une modification post-traductionnelle ou de la fixation d'un ligand sur une protéine [27, 104, 105].
- Déterminer des **zones d'interaction** pour des complexes de types protéine-ADN [106] ou protéine-protéine [107].

### 2.3.3. Discussion

Si l'approche HFP permet d'obtenir des informations structurales intéressantes, la mise en place expérimentale de l'oxydation radicalaire n'est pas triviale. De plus, la réactivité des chaînes latérales est très hétérogène selon l'acide aminé accessible, ce qui influe sur la résolution des résultats [104].

### 3. Les approches mixtes

#### 3.1. La spectrométrie de masse native couplée à la fragmentation en phase gazeuse (« Top-down native MS »)

Les récents développements instrumentaux ont permis l'essor de l'approche « Top-down native MS ». Cette technique permet désormais d'analyser des complexes non-covalents et de les fragmenter *in situ*, de manière à étudier la topologie ou l'arrangement d'un complexe [108]. En effet, l'utilisation de méthodes de fragmentation ETD ou ECD induisent une dissociation des partenaires protéiques tout en maintenant une partie des interactions non-covalentes [109]. Ainsi, la caractérisation des fragments générés permet de déterminer des zones de contact pour des systèmes protéine-ligand [110, 111] ou protéine-protéine [112, 113].

Bien que prometteuse, l'approche « Top-down native MS » doit encore faire l'objet de développements instrumentaux et informatiques : l'efficacité de fragmentation n'est pas à ce jour optimale, et le retraitement des données est peu automatisé.

#### 3.2. La protéolyse ménagée

Le principe de la protéolyse ménagée repose sur l'action d'une enzyme de façon contrôlée en conditions non dénaturantes, sur un complexe supramoléculaire. Les zones se trouvant enfouies ou à l'interface d'une interaction seront moins accessibles au solvant et donc protégées vis-à-vis de la digestion enzymatique. L'analyse des fragments générés permet alors d'identifier des domaines minimum d'interaction [114, 115], ou des changements conformationnels liés à la fixation d'un partenaire [114, 116].

Si les méthodes d'analyses des fragments générés sont généralement réalisées en conditions dénaturantes, il est possible de combiner l'approche avec une analyse en conditions natives de manière à vérifier la présence d'un complexe minimal d'interaction (cf. partie 4 chapitre 2).

L'utilisation de plusieurs enzymes est souvent nécessaire de façon à augmenter la résolution des domaines ou en cas de résistance à la digestion d'une protéine. De plus, la reproductibilité limitée des résultats, le traitement des données peu automatisé [117] et la faible résolution des zones déterminées [27] constituent des inconvénients à cette approche.



## *Conclusion de cette partie*

Cette première partie rappelle l'importance des complexes non-covalents en biologie, ces derniers intervenant dans des processus clés du fonctionnement cellulaire. Cette introduction bibliographique a permis de définir les différentes interactions mises en jeu dans la formation de complexes supramoléculaires, mais aussi de rappeler la nécessité de caractériser ces assemblages, pour expliquer les processus biologiques associés.

De nombreuses techniques biophysiques permettent d'accéder à des informations structurales avec des résolutions hétérogènes, allant d'une topologie globale à la résolution de la structure au niveau atomique. Les techniques permettant d'accéder à ces caractérisations haute résolution, comme la cristallographie ou la RMN, peuvent se heurter à des problématiques de production de cristal, taille de complexe analysable ou grande quantité d'échantillon nécessaire.

Dans ce contexte, la MS structurale se présente comme une approche orthogonale de choix. En effet, la MS présente l'avantage d'être sensible, permet de caractériser des systèmes de hauts poids moléculaires, et accède à des informations d'ordre dynamique. Si les différentes techniques de MS structurale prises individuellement ne permettent pas d'obtenir des informations à résolution atomique, la combinaison de ces différents outils couplés à la modélisation moléculaire peut s'en rapprocher.

Toutefois, l'utilisation de ces outils nécessite encore des développements méthodologiques, instrumentaux et bio-informatiques. Les parties suivantes porteront notamment sur l'évaluation et l'apport de la technique échange hydrogène/deutérium en protéomique structurale, ainsi que sur la combinaison d'approches de MS structurale pour la caractérisation approfondie de systèmes non-covalents.



## Références bibliographiques

1. Robinson, C.V., A. Sali, and W. Baumeister, *The molecular sociology of the cell*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 973-982.
2. Lehn, J., *Supramolecular Chemistry Scope and Perspectives-Molecules Supermolecules 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. Myers, D., *Wetting and spreading*. Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, Second Edition, 1999: p. 415-447.
5. 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.
6. Mori, S. and H.G. Barth, *Size exclusion chromatography*. 2013: Springer Science & Business Media.
7. Fekete, S., et al., *Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. **101**: p. 161-173.
8. Winzor, D.J., *Analytical exclusion chromatography*. Journal of biochemical and biophysical methods, 2003. **56**(1): p. 15-52.
9. 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.
10. Habegger, M., et al. *Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry*. in *MABs*. 2015: Taylor & Francis.
11. Guilbaud, J.-B. and A. Saiani, *Using small angle scattering (SAS) to structurally characterise peptide and protein self-assembled materials*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(3): p. 1200-1210.
12. Lipfert, J. and S. Doniach, *Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2007. **36**: p. 307-327.
13. Duff Jr, M.R., J. Grubbs, and E.E. Howell, *Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity*. J Vis Exp, 2011. **55**: p. e2796.
14. 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.
15. Torrieri, P., et al., *Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology*. Ann Ist Super Sanita, 2005. **41**(4): p. 437-441.
16. 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.
17. Yan, Y. and G. Marriott, *Analysis of protein interactions using fluorescence technologies*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(5): p. 635-640.
18. Waadt, R., et al., *Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations*. Arabidopsis Protocols, 2014: p. 629-658.
19. Fasman, G.D., *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. 2013: Springer Science & Business Media.

20. Lopes, J.L., et al., *Distinct circular dichroism spectroscopic signatures of polyproline II and unordered secondary structures: Applications in secondary structure analyses*. Protein Science, 2014. **23**(12): p. 1765-1772.
21. Carroni, M. and H.R. Saibil, *Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes*. Methods, 2015.
22. Bartesaghi, A., et al., *Structure of  $\beta$ -galactosidase at 3.2-Å resolution obtained by cryo-electron microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(32): p. 11709-11714.
23. Jensen, M.R., R.W. Ruigrok, and M. Blackledge, *Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR*. Current opinion in structural biology, 2013. **23**(3): p. 426-435.
24. 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.
25. 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.
26. Bizarro, J., et al., *Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control*. The Journal of cell biology, 2014. **207**(4): p. 463-480.
27. Marcoux, J. and S. Cianférani, *Towards integrative structural mass spectrometry: Benefits from hybrid approaches*. Methods, 2015. **89**: p. 4-12.
28. Politis, A., et al., *A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes*. Nature methods, 2014. **11**(4): p. 403-406.
29. 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.
30. 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.
31. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.
32. Song, F., *A study of noncovalent protein complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(7): p. 1286-1290.
33. Luo, S.-Z., et al., *Detection of specific noncovalent interaction of peptide with DNA by MALDI-TOF*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. **15**(1): p. 28-31.
34. Chen, F., et al., *Applying mass spectrometry to study non-covalent biomolecule complexes*. Mass spectrometry reviews, 2016. **35**(1): p. 48-70.
35. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. The Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
36. Gillet, F.-X., et al., *The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a zinc-binding protein with redox-dependent flexibility*. Journal of Molecular Biology, 2013. **425**(14): p. 2423-2435.
37. 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.

38. Nguyen-Huynh, N.-T., et al., *Monitoring of the retinoic acid receptor–retinoid X receptor dimerization upon DNA binding by native mass spectrometry*. Biophysical chemistry, 2015.
39. Shepherd, D.A., et al., *Probing Bunyavirus N protein oligomerisation using mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2014. **28**(7): p. 793-800.
40. 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.
41. Rogniaux, H., et al., *Mass spectrometry as a novel approach to probe cooperativity in multimeric enzymatic systems*. Analytical Biochemistry, 2001. **291**(1): p. 48-61.
42. 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.
43. Potier, N., et al., *Ligand–metal ion binding to proteins: investigation by ESI mass spectrometry*. Methods in Enzymology, 2005. **402**: p. 361-389.
44. 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.
45. Gabelica, V., et al., *Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2003. **38**(5): p. 491-501.
46. 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.
47. 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.
48. 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. 2851-2861.
49. 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.
50. Heck, A.J., *Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology*. Nature methods, 2008. **5**(11): p. 927-933.
51. 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.
52. Sanglier, S., et al., *Comparative ESI-MS study of ~ 2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: from protein oligomeric state to biotope*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 419-429.
53. Veessler, D., et al., *Architecture of a dsDNA viral capsid in complex with its maturation protease*. Structure, 2014. **22**(2): p. 230-237.
54. Rose, R.J., et al., *High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies*. Nature methods, 2012. **9**(11): p. 1084-1086.
55. Heck, A.J. and R.H. van den Heuvel, *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 2004. **23**(5): p. 368-389.
56. 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*. Functional Proteomics: Methods and Protocols, 2008: p. 217-243.
57. 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.
  58. Marcoux, J. and C.V. Robinson, *Twenty years of gas phase structural biology*. Structure, 2013. **21**(9): p. 1541-1550.
  59. 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.
  60. Thalassinos, K., et al., *Ion mobility mass spectrometry of proteins in a modified commercial mass spectrometer*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004. **236**(1): p. 55-63.
  61. Shliaha, P.V., et al., *Effects of traveling wave ion mobility separation on data independent acquisition in proteomics studies*. Journal of Proteome Research, 2013. **12**(6): p. 2323-2339.
  62. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility–mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nature protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.
  63. Pukala, T.L., et al., *Subunit architecture of multiprotein assemblies determined using restraints from gas-phase measurements*. Structure, 2009. **17**(9): p. 1235-1243.
  64. Bleiholder, C., et al., *Ion mobility spectrometry reveals the mechanism of amyloid formation of A $\beta$  (25–35) and its modulation by inhibitors at the molecular level: epigallocatechin gallate and scyllo-inositol*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(45): p. 16926-16937.
  65. W 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. 181-191.
  66. 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.
  67. Tian, Y., et al., *Collision Induced Unfolding of Intact Antibodies: Rapid Characterization of Disulfide Bonding Patterns, Glycosylation, and Structures*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(22): p. 11509-11515.
  68. 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.
  69. Pringle, S.D., et al., *An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument*. International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **261**(1): p. 1-12.
  70. Gabelica, V., *Intérêt de la spectrométrie de mobilité ionique pour l'étude de la conformation et des assemblages non-covalents de biomolécules*. Spectra analyse, 2006. **251**.
  71. Shvartsburg, A.A. and R.D. Smith, *Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(24): p. 9689-9699.
  72. 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.
  73. 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.



74. Stojko, J., *Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macrobiomolécules et de leurs complexes associés*. 2016. Thèse réalisée à l'Université de Strasbourg.
75. Lennon, S., *Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et analyse protéomique pour la recherche de biomarqueurs de différents types de cancers*. 2014. Thèse réalisée à l'Université de Strasbourg.
76. Gillet, L.C., et al., *Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012. **11**(6): p. O111. 016717.
77. Plumb, R.S., et al., *UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20**(13): p. 1989-1994.
78. Biemann, K., *Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions)*. *Methods in Enzymology*, 1990. **193**: p. 886-887.
79. Fischer, L., Z.A. Chen, and J. Rappsilber, *Quantitative cross-linking/mass spectrometry using isotope-labelled cross-linkers*. *Journal of proteomics*, 2013. **88**: p. 120-128.
80. Li, S., et al., *Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase*. *Genes & development*, 2011. **25**(22): p. 2409-2421.
81. 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. **24**(8): p. 1232-1246.
82. Nguyen Huynh, N.-T., *Développements en spectrométrie de masse pour l'étude de complexes biologiques*. 2015.
83. Chen, F., et al., *On the efficiency of NHS ester cross-linkers for stabilizing integral membrane protein complexes*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015. **26**(3): p. 493-498.
84. Zorn, M., et al., *Mapping cell envelope and periplasm protein interactions of Escherichia coli respiratory formate dehydrogenases by chemical cross-linking and mass spectrometry*. *Journal of Proteome Research*, 2014. **13**(12): p. 5524-5535.
85. Redeker, V., et al., *Identification of protein interfaces between  $\alpha$ -synuclein, the principal component of Lewy bodies in Parkinson disease, and the molecular chaperones human Hsc70 and the yeast Ssa1p*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(39): p. 32630-32639.
86. Leitner, A., et al., *Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines*. *Trends in biochemical sciences*, 2016. **41**(1): p. 20-32.
87. Kahraman, A., et al., *Cross-link guided molecular modeling with ROSETTA*. *Plos One*, 2013. **8**(9): p. e73411.
88. 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.
89. 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.
90. Paramelle, D., et al., *Chemical cross-linkers for protein structure studies by mass spectrometry*. *Proteomics*, 2013. **13**(3-4): p. 438-456.
91. Merkley, E.D., J.R. Cort, and J.N. Adkins, *Cross-linking and mass spectrometry methodologies to facilitate structural biology: finding a path through the maze*. *Journal of structural and functional genomics*, 2013. **14**(3): p. 77-90.

92. Sinz, A., *Isotope-Labeled Photoaffinity Reagents and Mass Spectrometry To Identify Protein–Ligand Interactions*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(5): p. 660-662.
93. Petrotchenko, E.V., J.J. Serpa, and C.H. Borchers, *An isotopically coded CID-cleavable biotinylated cross-linker for structural proteomics*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011. **10**(2): p. M110. 001420.
94. Nury, C., et al., *A novel bio-orthogonal cross-linker for improved protein/protein interaction analysis*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(3): p. 1853-1860.
95. Sohn, C.H., et al., *Designer reagents for mass spectrometry-based proteomics: clickable cross-linkers for elucidation of protein structures and interactions*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(6): p. 2662-2669.
96. Sinz, A., et al., *Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology*. *Protein Science*, 2015. **24**(8): p. 1193-1209.
97. Xu, H., L. Zhang, and M.A. Freitas, *Identification and characterization of disulfide bonds in proteins and peptides from tandem MS data by use of the MassMatrix MS/MS search engine*. *Journal of Proteome Research*, 2007. **7**(01): p. 138-144.
98. Rinner, O., et al., *Identification of cross-linked peptides from large sequence databases*. *Nature methods*, 2008. **5**(4): p. 315-318.
99. Yang, B., et al., *Identification of cross-linked peptides from complex samples*. *Nature methods*, 2012. **9**(9): p. 904-906.
100. Studio, M., <http://structurems.ucalgary.ca/software/>.
101. 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.
102. 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.
103. Sclavi, B., et al., *RNA folding at millisecond intervals by synchrotron hydroxyl radical footprinting*. *Science*, 1998. **279**(5358): p. 1940-1943.
104. Kiselar, J.G. and M.R. Chance, *Future directions of structural mass spectrometry using hydroxyl radical footprinting*. *Journal of mass spectrometry*, 2010. **45**(12): p. 1373-1382.
105. Levy, M.J., *Protein-Protein Interactions of the Human Iron Sulfur Cluster Biosynthesis Complex*. 2014.
106. Tullius, T.D. and B.A. Dombroski, *Hydroxyl radical" footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986. **83**(15): p. 5469-5473.
107. Yan, Y., et al., *Fast photochemical oxidation of proteins (FPOP) maps the epitope of EGFR binding to adnectin*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014. **25**(12): p. 2084-2092.
108. Erba, E.B., *Investigating macromolecular complexes using top-down mass spectrometry*. *Proteomics*, 2014. **14**(10): p. 1259-1270.
109. Zubarev, R.A., *Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry*. *Current opinion in biotechnology*, 2004. **15**(1): p. 12-16.
110. Li, H., et al., *Revealing ligand binding sites and quantifying subunit variants of noncovalent protein complexes in a single native top-down FTICR MS experiment*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014. **25**(12): p. 2060-2068.
111. Erales, J., et al., *Mapping of a copper-binding site on the small CP12 chloroplastic protein of Chlamydomonas reinhardtii using top-down mass spectrometry and site-directed mutagenesis*. *Biochemical Journal*, 2009. **419**(1): p. 75-86.

112. Zhang, H., et al., *Native electrospray and electron-capture dissociation FTICR mass spectrometry for top-down studies of protein assemblies*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(14): p. 5598-5606.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. Cohen, S.L., et al., *Probing the solution structure of the DNA-binding protein Max by a combination of proteolysis and mass spectrometry*. Protein Science, 1995. **4**(6): p. 1088-1099.
117. Wei, H., et al., *Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications*. Drug discovery today, 2014. **19**(1): p. 95-102.

## *Partie 2 : La méthodologie échange Hydrogène/Deutérium (HDX)*





## ***Partie 2- La méthodologie échange Hydrogène/Deutérium (HDX)***

Dans la continuité de ce qui a été présenté dans la partie précédente concernant les technologies utilisées en MS structurale, nous allons ici nous focaliser sur une approche qui prend de plus en plus d'importance dans ce domaine et qui a constitué le cœur de ce travail de thèse : les échanges Hydrogène/Deutérium couplés à la MS (HDX-MS). Un premier chapitre permettra d'introduire le principe de cette technique ainsi que de montrer les champs d'applications possibles. Dans un second temps le système instrumental utilisé et les schémas analytiques qui y sont associés seront détaillés. Enfin une discussion autour d'optimisations expérimentales et instrumentales sera réalisée à travers l'évaluation des performances du système afin de bien appréhender les points cruciaux de cette approche.

**Chapitre 1 : Principe de l'échange Hydrogène/Deutérium et état de l'art.**

**Chapitre 2 : Description du système HDX-MS utilisé et du processus analytique associé.**

**Chapitre 3 : Optimisations expérimentales et instrumentales en HDX-MS et mise en place d'un test de performance.**



## *Chapitre 1 : Principe de l'échange Hydrogène/Deutérium et état de l'art.*

### **1. Historique**

L'idée d'initier un échange isotopique pour réaliser une caractérisation structurale de protéine est relativement ancienne. En effet Hvidt et Linderstrøm-Lang [1] sont les pionniers en la matière, lorsqu'ils suivent l'échange H/D sur l'insuline à l'aide de tube à gradient de densité, et relient le taux d'échange à un ordre de dynamique protéique (figure 1). Une vingtaine d'années plus tard, l'apport d'une digestion enzymatique avec comme objectif l'amélioration de la résolution spatiale a été mise en évidence par les travaux de Rosa et Richards [2]. L'année 1991 fut charnière dans le développement de cette approche avec les travaux de Katta et Chait, décrivant le suivi du changement conformationnel de l'ubiquitine bovine avec le premier couplage de l'échange H/D à la spectrométrie de masse [3]. C'est alors que se sont accélérées les évolutions de cette méthodologie avec notamment, l'utilisation d'une digestion pepsique [4], les premières études de zones d'interaction [5] et l'amélioration des systèmes chromatographiques [6]. Voyant l'intérêt grandissant de cette technique pour l'étude structurale de protéines, la société Waters a commercialisé le premier système HDX en 2011. Toutefois une revue publiée par Jacob *et al*, [7] correspondant au début de ma thèse posait une question ouverte : « Are we out-of quicksand ? » (*Sommes-nous sortis des sables mouvants ?*). Des points clés ont été soulevés dans cet article, comme :

- La reproductibilité des expériences est-elle avérée ?
- Peut-on parler de technique haut débit ?
- L'ensemble des protéines se prêtent-elles à ce type d'approche ?
- Quelle résolution peut-on atteindre ?

Tous ces points seront discutés à travers un passage en revue du principe, des applications et des optimisations réalisées sur le système implanté au laboratoire.

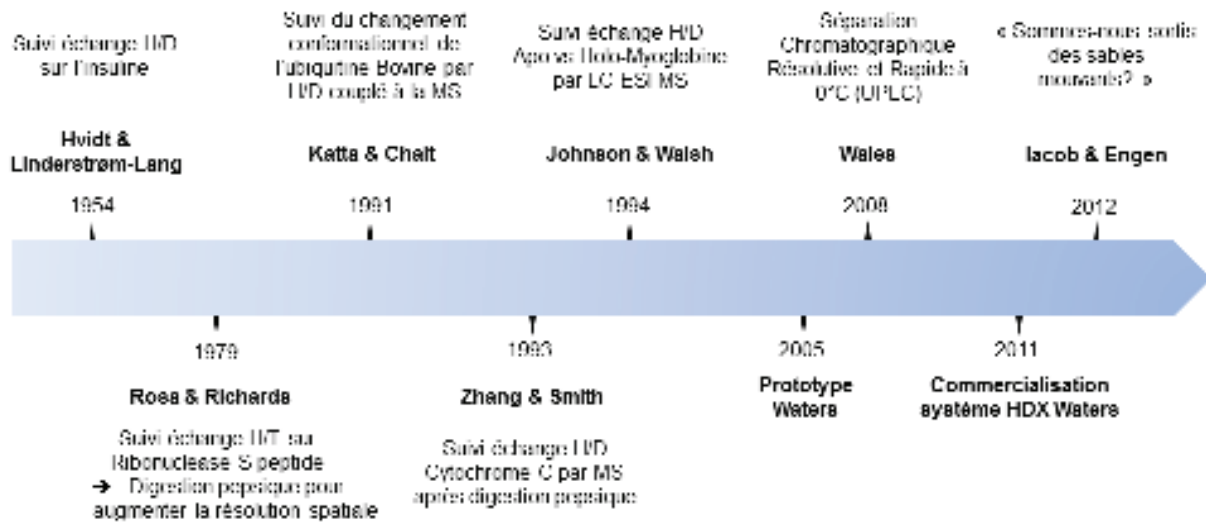


Figure 1. Historique de l'évolution des échanges isotopiques et de l'instrumentation associée pour la caractérisation structurale de protéines.

## 2. Principe de l'échange H/D couplé à la spectrométrie de masse

Cette technique est basée sur l'échange d'hydrogènes d'une protéine pour des atomes de deutérium. Toutefois tous les protons ne sont pas sujets à cet échange, et certains autres possèdent une cinétique d'échange tellement rapide, qu'elle n'est pas compatible avec une analyse MS. En effet les hydrogènes liés aux carbones  $\alpha$  ne s'échangeront pas avec des deutériums, alors que les hydrogènes des chaînes latérales s'échangeront de manière trop rapide pour être conservés durant le temps requis d'une analyse LC-MS. Seuls les protons amidiques auront une vitesse d'échange compatible pour un suivi par MS (figure 2).

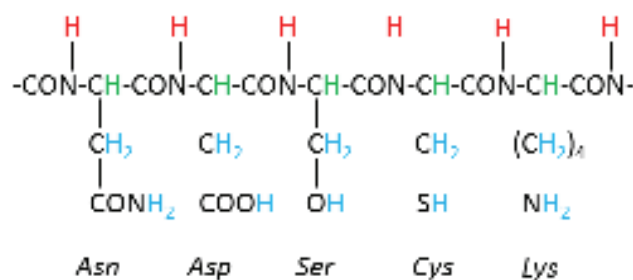


Figure 2. Présentation des hydrogènes présents sur la structure primaire d'une chaîne polypeptidique. En vert sont représentés les protons du squelette carbonés qui ne s'échangent pas, en bleu les hydrogènes des chaînes latérales qui ont une vitesse d'échange trop rapide, et enfin en rouge les protons amidiques dont l'échange avec des atomes de deutérium sera suivi par MS. La séquence de la chaîne polypeptidique prise en exemple est indiquée par un code à trois lettres en italique : Asparagine (Asn), Acide aspartique (Asp), Serine (Ser), Cystéine (Cys) et Lysine (Lys).

Ainsi selon l'accessibilité de certains acides aminés au solvant deutéré ou leur implication au niveau des structures secondaires, leurs protons amidiques pourront s'échanger contre des deutériums. Ce processus entrainera un incrément de masse au niveau de la protéine qui pourra être déterminé par MS, et suivi au cours du temps (figure 3). Ainsi des informations d'ordre dynamique et sur des zones d'interaction pourront être établies.

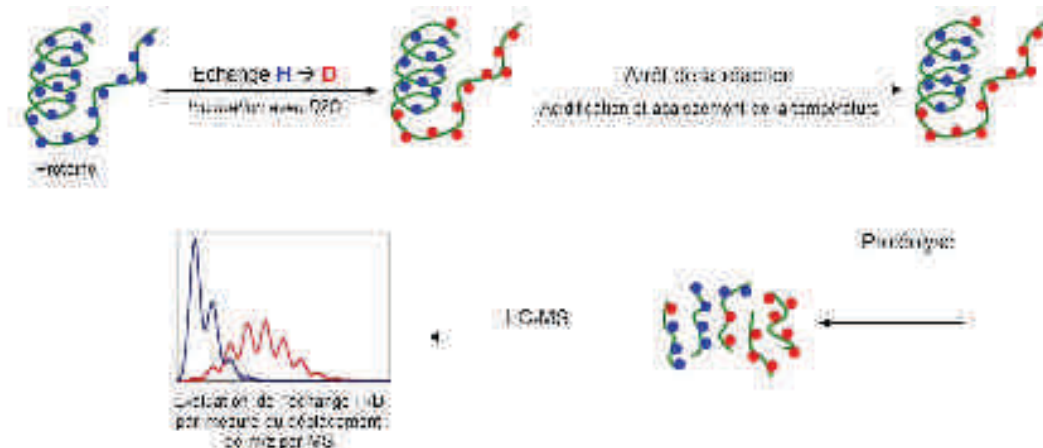


Figure 3. Principe général d'une expérience d'échange hydrogène/deutérium couplée à la spectrométrie de masse (HDX-MS) (adapté de [8]).

Toutefois si la vitesse d'échange est intimement liée à la structure de la protéine et à l'accessibilité au solvant, la maîtrise de certains paramètres techniques comme le pH et la température est essentielle dans cette approche.

### ⇒ *L'influence du pH*

La maîtrise du pH est un des paramètres majeurs pour contrôler les phénomènes d'échange  $H \rightarrow D$ , mais aussi limiter les phénomènes de ré-échange  $D \rightarrow H$ . Suivant la gamme de pH dans laquelle on se trouve, cette réaction pourra se produire selon un processus de catalyse basique ou acide (figure 4).

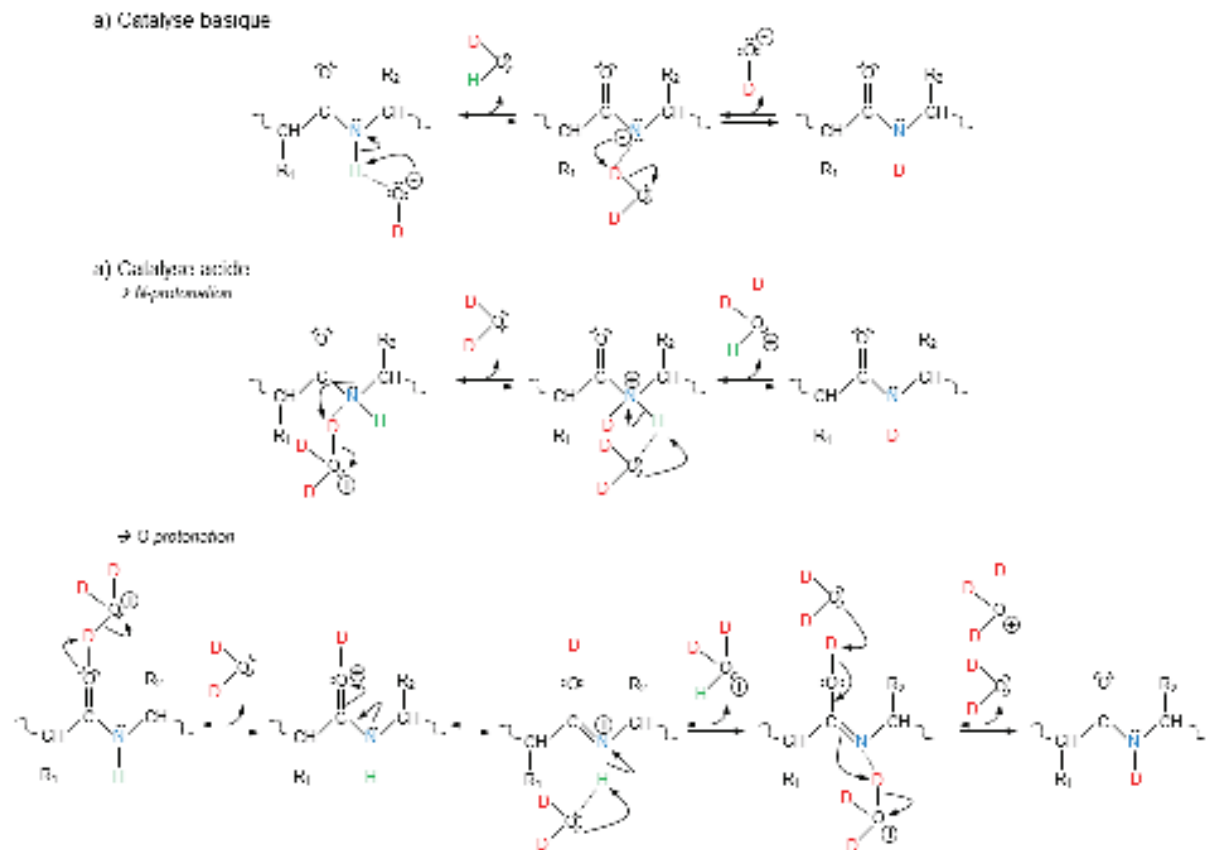


Figure 4. Réactions de l'échange hydrogène/deutérium selon le processus de catalyse basique (a) ou acide (b).

Il a été montré au travers d'une étude sur des peptides polyalanines synthétiques, que le phénomène de catalyse était minimal pour un pH compris entre 2.5 et 3.0 (figure 5) [9]. Cette étude a notamment montré que le maintien du pH dans cette zone était primordial, car pour une différence d'une unité de pH, la vitesse d'échange était multipliée par dix [9]. C'est pourquoi une fois le temps de cinétique d'échange souhaité atteint, une trempe acide ou abaissement brutal du pH est réalisé, de manière à « figer » la structure de la protéine deutérée le temps de l'analyse LC-MS.

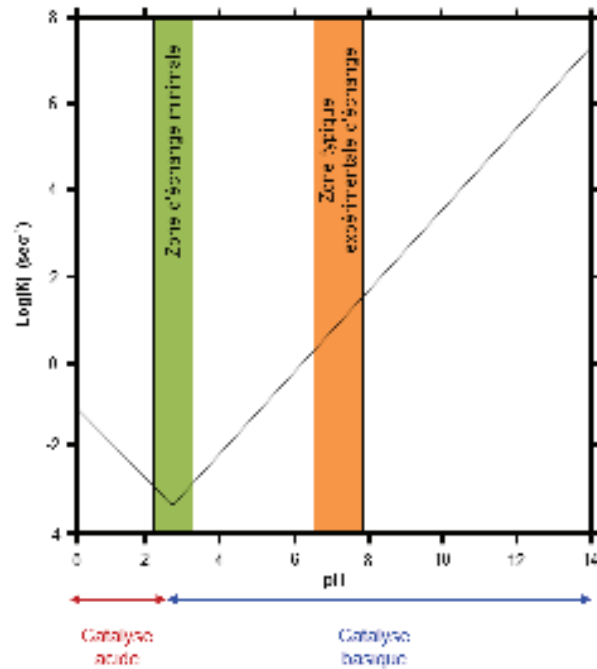


Figure 5. Influence du pH sur la constante d'échange hydrogène/deutérium (adapté de [9]).

### ⇒ L'influence de la température

Le second paramètre expérimental primordial dans une expérience HDX, est le contrôle de la température. Une augmentation de la température de l'ordre de  $10^{\circ}\text{C}$  entraîne la multiplication de la vitesse d'échange d'un facteur trois [9] (figure 6). Avec la trempe acide, l'abaissement de la température de l'échantillon à  $0^{\circ}\text{C}$  est le moyen de limiter au maximum les phénomènes de ré-échanges lié à la présence résiduelle d'hydrogènes dans les tampons et constituent l'étape dite de « quench ».

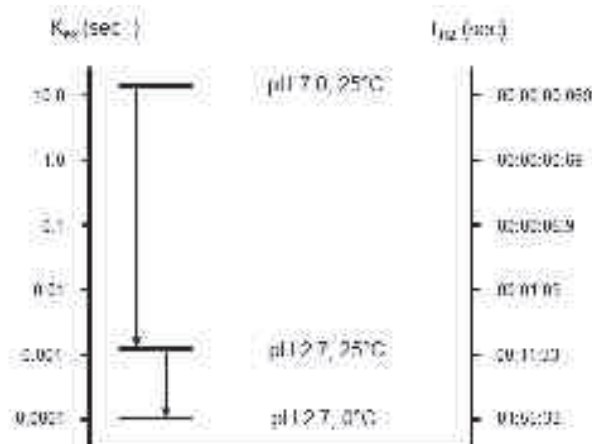


Figure 6. Influence combinée du pH et de la température sur la constante d'échange hydrogène/deutérium (adapté de [9]).



### ⇒ *L'influence de l'environnement en acides aminés*

La vitesse des échanges H/D est aussi liée à l'environnement en acide aminé des protons amidiques en question. Des expériences basées sur l'étude de dipeptides [9] ont montrés que :

- les résidus polaires présentaient un effet inductif (délocalisation de la densité électronique de la liaison peptidique) entraînant une augmentation de la catalyse basique et donc une réduction de la fixation de deutérium.
- les acides aminés apolaires et aromatiques induisent quant à eux une diminution de la constante d'échange, du fait de leur faible activité catalytique (acide et basique) et/ou de leur encombrement stérique.
- Les résidus acides et basiques n'induisent qu'une très faible modification de la constante de la vitesse d'échange.

### ⇒ *L'influence de la structure secondaire*

La vitesse d'échange des protons amidiques dépend aussi de leur implication dans des liaisons hydrogènes [10, 11] et de leur accès au solvant deutéré, [11, 12]. Si ces protons sont impliqués dans la stabilisation de structures secondaires en hélice  $\alpha$  ou feuillet  $\beta$ , ou enfouis dans un cœur hydrophobe, leur cinétique d'échange sera considérablement réduite. Cette dernière pourra être abaissée d'un facteur  $10^8$  [11] par rapport à des hydrogènes situés sur des boucles à la surface des protéines présentant un accès facilité au solvant.

## 2.1. La source d'introduction du deutérium

La technique d'introduction du deutérium la plus utilisée consiste à **diluer une protéine dans de l'eau deutérée** ( $D_2O$ ). Cette dilution d'un facteur compris généralement entre 10 et 20, génère un milieu réactionnel contenant plus de 90 à 95% de  $D_2O$ , permettant ainsi d'initier l'échange entre les protons amidiques de la protéine et les atomes de deutériums présents en solution.

Une deuxième méthode consiste à **délivrer le  $D_2O$  au travers d'une membrane ionique sélective** en nafion (figure 7). Ainsi selon un phénomène d'osmose, les protons amidiques pourront s'échanger pour des deutériums, sans passer par une étape de dilution. Ce procédé permet donc de s'affranchir de problèmes éventuels liés à la faible affinité d'un complexe, et de limiter la quantité d'échantillon initiale nécessaire. Si la preuve de concept a été faite pour

l'étude du repliement de protéines à l'échelle globale et peptidique, ou pour l'étude d'interactions protéine-protéine [13], cette approche ne demeure que très peu exploitée, probablement dû au manque d'automatisation du système de retraitement associé ainsi qu'à l'investissement pour un instrument dédié.

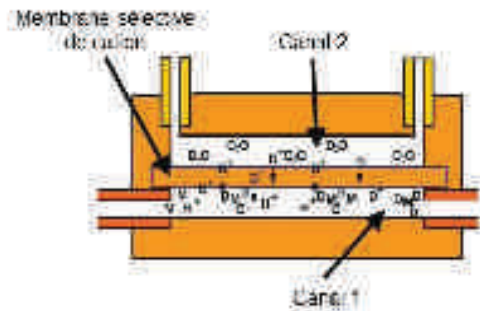


Figure 7. Représentation schématique du système d'échange hydrogène/deutérium *via* une membrane. Dans le canal 1 se trouve l'échantillon alors que dans le canal 2 circule un flux de D<sub>2</sub>O (adapté de [13]).

## 2.2. Le mode de marquage isotopique en solution

Deux approches de marquage sont possibles pour l'étude de protéines en solution [11, 14-16] (figure 8):

- le marquage continu
- et le marquage pulsé.

Le **marquage continu** constituant la technique la plus répandue, consiste à diluer une protéine dans un tampon deutéré (D<sub>2</sub>O), dans des conditions dites natives. Plusieurs temps d'échange permettront ainsi de renseigner sur l'accessibilité au solvant deutéré au cours du temps et sera fonction de la dynamique et de l'accessibilité protéique. En effet les zones des protéines qui se trouvent dépliées ou qui le deviennent seront deutérées avec un taux beaucoup plus important que les zones qui restent totalement repliées (cet aspect sera discuté au paragraphe 2.3).

La seconde méthode dite de **marquage pulsé**, consiste dans un premier temps à mettre pour une durée définie, la protéine dans des conditions non natives. En général des agents dénaturants sont ajoutés (guanidine, urée...), le pH ou la température peuvent être modifiés de quelques secondes à quelques heures avant de réaliser un marquage durant une période très courte (quelques secondes). Cette approche fera état de zones qui auront eu le temps de se déplier et d'être marquées de façon très rapide, et permettra d'appréhender les étapes de dépliement/repliement d'une protéine dans des conditions expérimentales particulières. Cette

approche a notamment été utilisée pour étudier la dénaturation de l'aldolase par l'urée [14], de suivre le repliement *in vitro* de macrophage recombinant humain [17], ou encore de sonder les changements conformationnels associés à l'agrégation de peptides amyloïdes  $\beta$  [18].

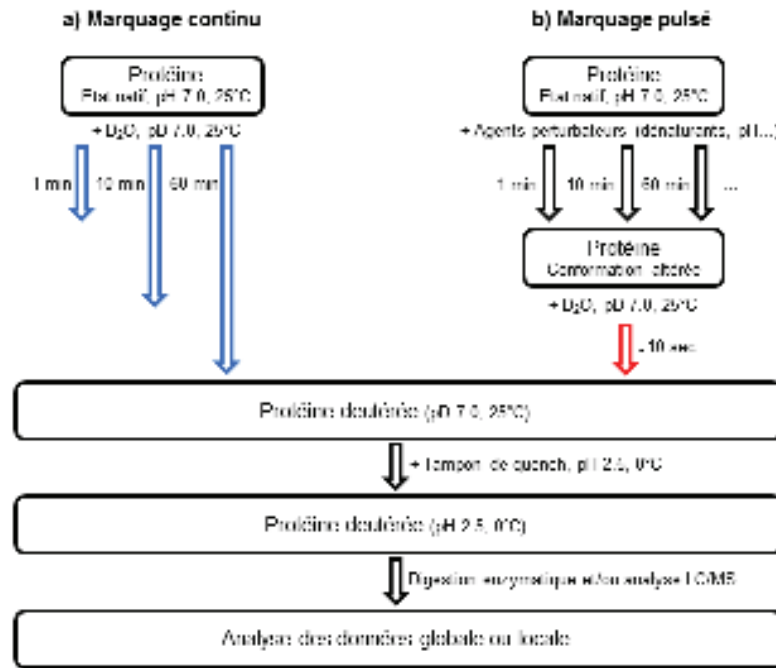


Figure 8. Schéma général d'une analyse HDX utilisant soit un mode de marquage continu (a) ou pulsé (b). Le processus d'échange H/D est suivi par LC/MS, à un niveau global en l'absence de digestion enzymatique ou à un niveau local dans le cas contraire (adapté de [16]).

### 2.3. Les cinétiques d'échange H/D

Les échanges H/D pour une protéine en conditions natives peuvent suivre plusieurs modèles de cinétique. A ces derniers sont associées deux composantes :

- le facteur structural, associé à la vitesse de dépliement /repliement de la protéine
- le facteur chimique  $k_2$ , qui représente la vitesse d'échange des protons exposés dans les zones non structurées.

Ainsi l'échange H/D peut avoir lieu sur des zones exposées au solvant, non impliquées dans les structures secondaires (figure 9a), ou sur des zones étant devenues accessibles au solvant par des phénomènes de dépliement de la protéine (figure 9b) [11, 19-21].

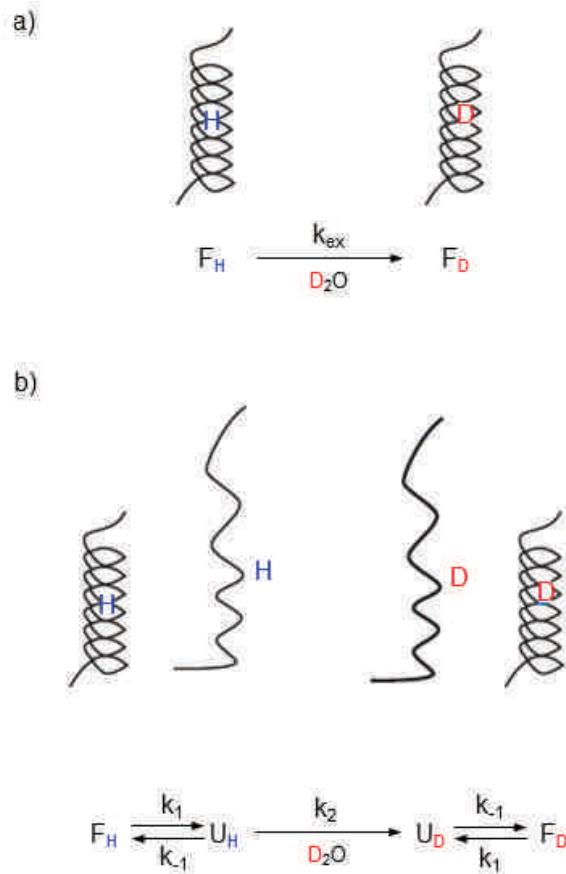


Figure 9. Modèles d'échanges hydrogène/deutérium selon la dynamique protéique (adapté de [11]). F et U correspondent respectivement aux formes repliées et dépliées d'une protéine. H et D représentent les hydrogènes et deutériums.  $k_{\text{ex}}$  définit la constante de vitesse d'échange,  $k_2$  la constante de vitesse d'échange pour un état déplié, et  $k_1/k_{-1}$  les constantes de vitesse de dépliement/repliement.

Si la constante de repliement de la protéine est supérieure à la constante d'échange H/D ( $k_{-1} \gg k_2$ ), seuls les hydrogènes de surface pourront s'échanger. Cette cinétique d'échange est caractérisée par le déplacement d'une seule enveloppe suivant l'axe de  $m/z$  au cours du temps de marquage. Ce type de cinétique nommée **EX2**, est celle qui se produit dans la majeure partie des cas (figure 10a).

Maintenant si la constante de repliement est inférieure à la constante d'échange H/D ( $k_{-1} \ll k_2$ ), de nouvelles zones seront accessibles au solvant deutéré, et deux distributions isotopiques pourront être observées, avec une enveloppe disparaissant au fil du temps au profit de la seconde (figure 10b). Ce type de cinétique **EX1** reflète la présence d'états conformationnels différents pour une même protéine qui *a fortiori* n'auront pas les mêmes taux de deutération [22-25].

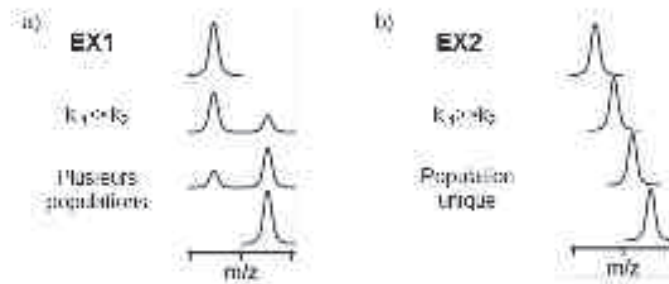


Figure 10. Schéma de l'évolution de l'enveloppe isotopique d'une espèce en fonction d'une cinétique de type EX1 (a) ou EX2 (b) (adapté de [23]).

Cependant une attention particulière doit être apportée dans cette forme de cas avant de conclure à une cinétique de type EX1. En effet, comme rapporté par Fang *et al.*, [26] la double distribution isotopique peut aussi être la cause d'un peptide qui ne serait élué que lors du cycle LC-MS suivant, et ayant subi de ce fait un ré-échange important (les aspects de ré-échanges seront notamment discutés dans le paragraphe 2.4), d'où l'importance de réaliser une étape de nettoyage efficace entre chaque injection d'échantillon.

#### 2.4. Le phénomène de ré-échange D → H (« back exchange »)

Le phénomène de ré-échange consiste en l'échange d'atomes de deutérium contre des hydrogènes résiduels dans le milieu. Ce processus entraîne donc une perte d'information étant donné que des zones qui auraient pu être marquées reviennent à leur état initial non marqué. Afin de limiter au maximum ce mécanisme d'échange inverse, les étapes suivant l'introduction de deutérium (digestion et LC-MS), doivent être réalisées le plus rapidement, à pH acide ( $\sim 2.5$ ) et basse température ( $\sim 0^\circ\text{C}$ ) [15]. Dans des conditions HDX-MS classiques le taux de ré-échange est de l'ordre de 20% [27]. Toutefois les taux d'incorporation de deutérium peuvent être corrigés en utilisant un contrôle totalement deutéré et suivant l'équation (1) suivante [4, 28] :

$$(1) \quad D = \frac{m_{x\%} - m}{m_{100\%} - m} \times N$$

où  $m$ ,  $m_{x\%}$  et  $m_{100\%}$  représentent la masse moléculaire moyenne non deutérée, partiellement deutérée et entièrement deutérée, avec  $N$ , le nombre de protons échangeables. L'obtention d'un contrôle totalement deutéré est la condition *sine qua non* pour la correction du taux de deutération, mais n'est pas forcément chose aisée [27]. Se pose alors ici la question de savoir

si nous voulons travailler avec des valeurs absolues ou relatives ? Si nous nous trouvons dans le premier cas, alors la correction du contre-échange est nécessaire. Cependant, si nous procédons à une étude comparative, des mesures relatives sont suffisantes dans le sens où le taux de ré-échange sera identique dans les différentes conditions [27].

## 2.5. Analyse globale vs. locale

Une expérience d'échange H/D peut être menée de deux façons différentes suivant le type d'informations recherchées. Une **analyse des protéines entières** permet d'obtenir des **informations globales** sur l'exposition des protons amidiques de cette dernière, et permet de vérifier rapidement l'influence d'un éventuel interagant.

L'utilisation de **protéases acides** permettra de **localiser** plus précisément les zones subissant une variation du taux de marquage au deutérium. Cette approche a été initiée par Rosa et Richards en 1979 [2], et adaptée à la MS par Zhang et Smith en 1993[4]. Toutefois, il est indispensable que l'enzyme en question soit efficace en condition acide et basse température, toujours dans l'optique de limiter les phénomènes de ré-échanges. De ce fait les enzymes spécifiques les plus couramment utilisées dans les approches protéomiques comme la trypsine ou chymotrypsine sont ici inadaptées. L'enzyme la plus communément utilisée en HDX est la pepsine. Cette enzyme, peu spécifique mais très reproductible [29], permet de générer de nombreux peptides chevauchants. Cette caractéristique permettra d'améliorer la résolution des zones impactées en terme de deutération [30]. Si cette enzyme est peu spécifique, des sites préférentiels de coupure ont été mis en évidence en C-ter de Phe, Leu, Met, et en N-ter des acides aminés aromatiques [31]. Du fait de la faible spécificité de l'enzyme, une simple mesure de masse ne permet pas de caractériser les peptides générés. Une étape d'identification de ces derniers en amont de l'étape de marquage est nécessaire ; et est réalisée par séquençage LC-MS/MS. Ainsi, un peptide séquencé sera associé un temps de rétention particulier. Basé sur le postulat que les peptides légers (non deutérés) et lourds (deutérés) co-élueront au niveau chromatographique, la différence de masse entre ces peptides sera alors déterminée par une mesure de masse, et le taux de marquage pourra être établi (figure 11).

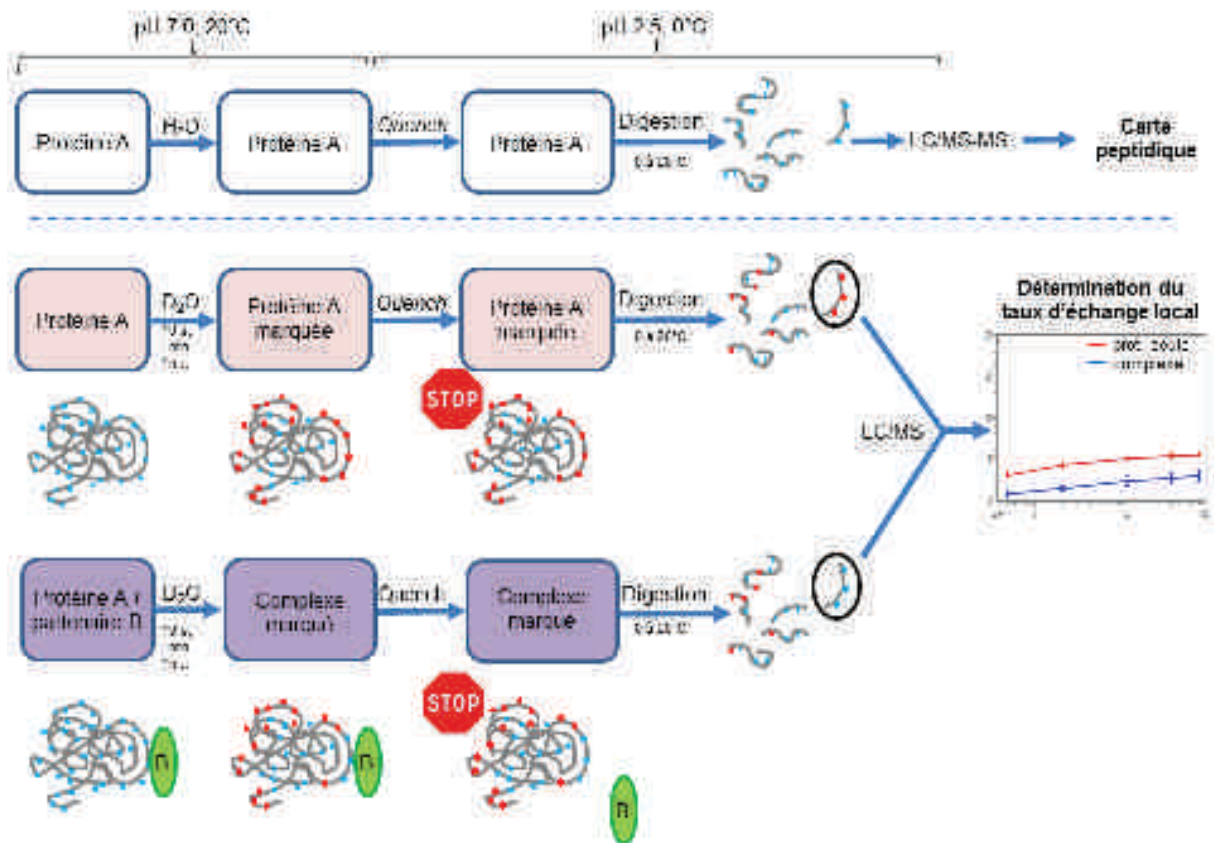


Figure 11. Schéma détaillé d'une analyse comparative par HDX-MS. L'établissement d'une carte peptidique la plus exhaustive possible constitue la première étape. La deuxième consiste à réaliser des analyses dans différentes conditions en parallèle de manière à comparer les taux d'incorporation en deutérium pour chaque peptide dans chaque condition.

De manière à accentuer la résolution spatiale ou à améliorer la couverture de séquence d'une protéine, d'autres protéases acides sont utilisables. Plusieurs études ont montrés l'intérêt de la protéase de type XIII [32-34], de type XVIII [32, 34, 35], de la plasmepsin [36], des protéases aspartiques issues de la morue d'antarctique [37] et d'anguilles de champs de riz [29], ou encore de protéase issue de plante carnivore comme la népenthésine [38-40], pour améliorer la résolution spatiale et la couverture de séquence. Toutefois, la plupart de ces enzymes sont indisponibles commercialement, ou sont propriétés de certains laboratoires ayant un certain savoir-faire au niveau de leur purification ou production recombinante. L'immobilisation de certaines enzymes sur des phases stationnaires contribue aussi à améliorer l'efficacité de digestion [35, 39], et à automatiser le processus. Cela permet aussi de limiter la quantité d'enzyme injectée en LC-MS (toutefois des peptides relatifs à l'enzyme sont toujours identifiés à cause de l'autodigestion). Dernièrement, l'intérêt d'une digestion en ligne à haute pression avec la pepsine a été rapportée (~ 10000 psi envers ~ 1000 psi plus classiquement),



et notamment montré un gain en terme de couverture de séquence d'environ 10% sur la phosphorylase B [41] et 15% sur la chaîne chaîne lourde d'un anticorps monoclonal d'isotype IgG2 [42].

La combinaison de protéases acides ou l'augmentation de la pression de digestion ne sont pas les seules manières d'augmenter la couverture de séquence. De manière à accentuer l'efficacité de digestion, des agents chaotropiques pourront être utilisés, ainsi la protéase aura un accès accru à des zones toujours repliées ou partiellement repliées malgré l'acidification du milieu [43-46]. De plus, la présence de ponts disulfures peut aussi être un des facteurs limitant à l'efficacité de digestion. De ce fait des agents réducteurs chimiques (ex : TCEP) pourront être utilisés [44-47], tout comme des approches de réduction électrochimique [48]. Si dans certains cas cette dernière technique présente un gain considérable dans l'efficacité de digestion, et permet de s'affranchir des problèmes expérimentaux dus au TCEP (diminution de la durée de vie des colonnes, bouchage et forte compétition à l'ionisation), son coût d'investissement est considérable (~ 100 k€).

La localisation précise du marquage est possible au niveau du résidu près, par fragmentation du peptide en question. Le mode de fragmentation le plus couramment utilisé en MS consiste à faire de la dissociation induite par collision avec un gaz (CID), toutefois cette approche induit le transfert de deutérium sur des positions voisines ; on parle alors de « scrambling » [49, 50]. Ce mécanisme est dû à l'augmentation de l'énergie vibrationnelle de l'ion précurseur. Les approches de dissociation induite par transfert d'électron (ETD), permettent de contourner cette problématique [49, 50] (figure 12) et permettent ainsi de déterminer la position des deutériums au niveau de l'acide aminé [51-54].

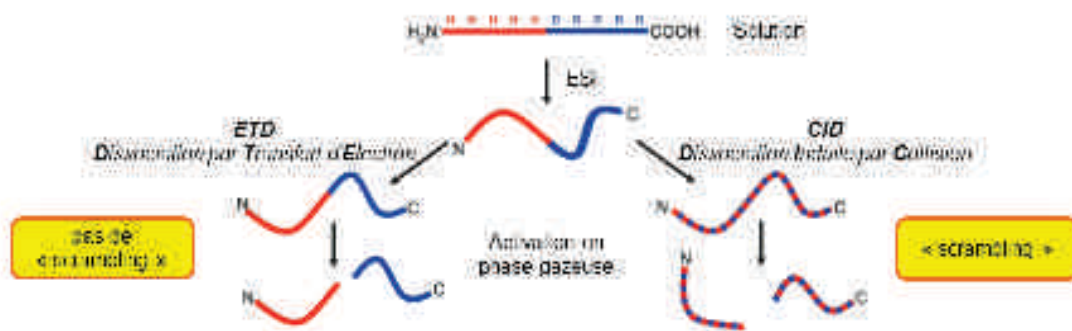


Figure 12. Illustration du phénomène de « scrambling » (adapté de [50]).



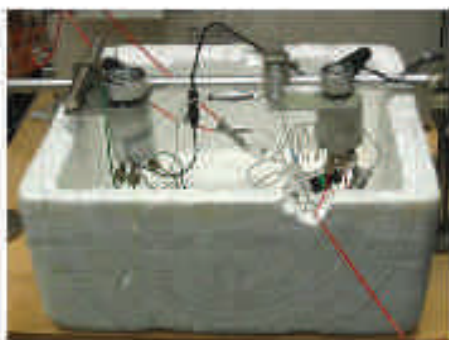
## 2.6. Etape de préfractionnement

La digestion enzymatique génère une multitude de peptides. Ces derniers ne pouvant être analysés simultanément sur le spectromètre de masse, une séparation en amont est nécessaire. Dans cette optique, la chromatographie liquide est largement utilisée. Toutefois les paramètres expérimentaux limitant le ré-échange (pH 2.5, T : 0°C) ont imposé des contraintes techniques au niveau de la LC :

- faire de la LC en quelques minutes,
- travailler à 0°C.

L'utilisation de colonnes avec des particules de diamètre 1.7  $\mu\text{m}$  a permis d'améliorer la capacité de séparation mais aussi de réduire les temps de gradient (6 à 15 min) sans toutefois détériorer la qualité de séparation [6, 55]. Le développement de nouvelles pompes chromatographiques a dû être réalisé de manière à supporter les contres pressions générées dans ces conditions. En effet, pour une colonne C18, 1.0 x 100 mm, de diamètre de particules 1.7  $\mu\text{m}$ , une pression d'environ 8000 psi est générée pour un débit de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$  à 0°C. L'implantation d'un bloc Peltier dans une enceinte close, a permis de placer l'ensemble des capillaires, pré-colonnes et colonnes analytiques dans un espace thermostaté, qui auparavant étaient placés dans de simples bacs polystyrènes remplis de glace [6].

a) Système artisanal



b) Système thermostaté



Figure 13. Photographies des systèmes chromatographiques utilisés en HSX-MS. La photo de gauche (a) représente un système artisanal où la colonne et les capillaires sont placés dans un bain de glace (adaptée de [56]), alors que la photo de droite (b) représente le système thermostaté Waters.

Dans l'optique de limiter encore plus le phénomène de contre-échange, quelques laboratoires ont établi l'apport d'une séparation chromatographique à -30°C [57-59]. L'abaissement de la

température de 0°C à -30°C permettrait de réduire d'un facteur 40, le taux de ré-échange [59]. Toutefois à cette température, il est indispensable d'ajouter des additifs comme le méthanol, afin d'éviter le gel du solvant. Il est à noter cependant que cette approche nécessite de modifier le système chromatographique et/ou de travailler avec des diamètres de particules plus importants (~ 5 µm) [57, 58].

Récemment, l'étude de Black *et al*, [60] a montré l'apport du couplage à l'électrophorèse capillaire (CE) sur puce microfluidique. En effet cette technique permet de réaliser une séparation des peptides beaucoup plus rapide et plus efficace, en s'affranchissant des problèmes de transfert de masse rencontrés en LC. De plus, à 0°C, la viscosité de la phase mobile accentue l'adsorption de l'analyte sur les particules de la phase stationnaire en LC. Cette étude a ainsi montré que pour un digest pepsique d'hémoglobine bovine, la capacité de pics a été doublée (31 à 62) en seulement 1 minute d'élution (envers 7 minutes en LC). Ici tout le potentiel de cette technique est marqué pour diminuer les temps d'analyse et ainsi limiter le ré-échange, mais aussi pour réduire considérablement la quantité d'échantillon utilisée (dans le cadre de cette étude un facteur 17000 sépare les quantités injectées en LC et en CE).

## 2.7. Analyse MS

Pour l'analyse H/D, la source d'ionisation électrospray est largement utilisée, même si au début l'échange H/D était plutôt suivi par MALDI [61-63]. Ce mode d'ionisation est plus tolérant aux sels, et favorise la production d'ions monochargés (ce qui facilite l'interprétation). Toutefois, la perte de deutérium est moins bien contrôlée, notamment à cause de la préparation d'échantillon (mode de dépôt et solvant de la matrice). De plus cette technique n'est pas adaptée à des mélanges complexes en raison de son incapacité à être couplée à la chromatographie liquide.

Pour ce qui est des spectromètres de masses utilisés, les analyseurs de type Q-ToF et Orbitrap sont les plus représentés. Un analyseur avec une bonne précision de masse et un étalonnage stable au cours du temps est nécessaire afin d'évaluer avec précision le taux de deutération, ce dernier étant évalué sur la base du « centroïd » de l'enveloppe isotopique de l'ion en question (figure 14).

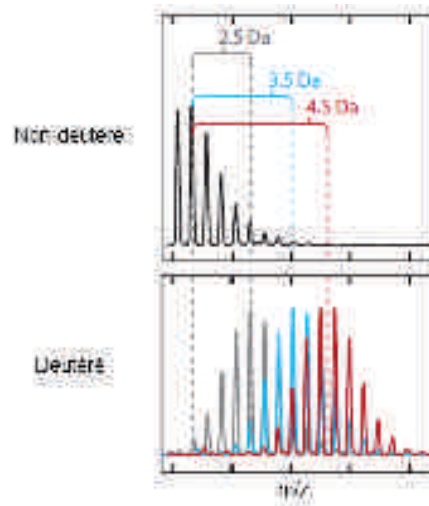


Figure 14. Evaluation du taux de marquage de part l'évolution de la masse (adapté de [15]).

Une résolution au minimum de 20000 est préférable afin d'avoir une confiance élevée en l'identification des peptides et résoudre un maximum de superposition entre massifs isotopiques [15] (l'équation permettant de calculer la résolution d'un analyseur est présentée en annexe).

L'implémentation de la mobilité ionique peut permettre de pallier ces problèmes de superposition [64-66]. En effet cette approche permet d'ajouter une dimension de séparation supplémentaire à la chromatographie liquide, basée sur la charge et la conformation des ions phase gazeuse. Ceci permettra de résoudre des peptides ayant des profils de distribution isotopiques très proches et ainsi d'améliorer la capacité de pic. L'étude de Jacob *et al.*, [64] montre que pour certains ions ayant un temps de rétention très proche, leur enveloppe isotopique peut se superposer au fil de la deutération. Toutefois, ces derniers pourront avoir un temps de dérive différent au sein de la cellule IM, et les profils isotopiques pourront alors être identifiés sans ambiguïté (figure 15). Cette approche sera commentée plus en détail dans le chapitre suivant.

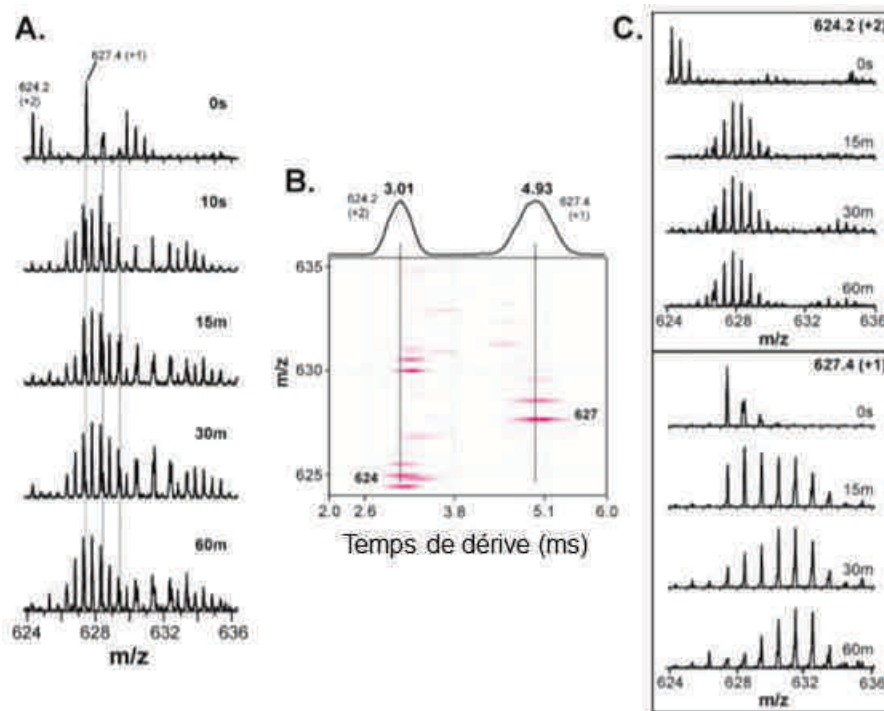


Figure 15. Apport de la mobilité ionique pour la séparation de profils isotopiques se superposant (adapté de [64]). Le panel (a) montre les profils isotopiques se superposant pour deux ions. Ces derniers sont séparés selon leur mobilité ionique (b) et ont des temps de dérive particuliers. Les profils isotopiques seront alors identifiés avec précision (c).

## 2.8. Analyse des données

Si les améliorations expérimentales et instrumentales ont contribué à l'essor de l'approche HDX-MS, les développements bio-informatiques pour l'analyse des données y ont fortement participé [67]. En effet, il y a quelques années, le procédé de retraitement était entièrement manuel. L'extraction des niveaux de deutération devait être faite par l'opérateur, pour chaque peptide généré, dans chaque condition, réplicat, temps d'incubation et états de charges. Ainsi suivant la complexité de l'échantillon, le temps de retraitement des données est passé de plusieurs mois à seulement quelques jours [68]. Les premiers logiciels dédiés à l'analyse de données HDX sont apparus au début des années 2000 [69, 70]. Par la suite leur nombre n'a cessé d'augmenter [68, 71-73], chaque laboratoire développant son propre algorithme en l'absence de plateforme commune [68]. Nous reviendrons sur cet aspect d'analyse de données dans le chapitre suivant avec l'explication de l'algorithme utilisé dans notre suite logicielle.

## 2.9. Autres alternatives en HDX-MS

### 2.9.1. Les approches « top-down »

Les approches de type « top-down » basées sur une fragmentation des protéines par capture ou transfert d'électron (ECD/ETD) se développent de plus en plus en HDX-MS. Cette méthode permet ainsi d'obtenir une résolution à l'acide aminé sans passer par une étape de digestion [15, 57]. L'autre avantage se situe au niveau du ré-échange, qui est réduit à un taux inférieur à 6% [57]. Toutefois un des points limitant reste la couverture de séquence à partir d'une taille donnée de protéine (~ 50kDa) [74]. Dans la littérature, des exemples d'application sur des anticorps monoclonaux (~ 150kDa) sont rapportés [57, 58], pourtant leur couverture de séquence demeure largement incomplète notamment au niveau de leur chaînes lourdes. Toutefois les développements instrumentaux et d'outils de traitement de données [75] contribueront très certainement à la démocratisation de cette approche.

### 2.9.2. Echange H/D en phase gazeuse

Une autre alternative à l'échange H/D en solution, est de le réaliser en phase gazeuse. Pour cela, un gaz marqué au deutérium est introduit au sein du spectromètre de masse, comme l'ammoniac ou le méthanol deutéré ( $\text{ND}_3$  ou  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (figure 16). Ici, à la différence d'une expérience en solution, l'échange H/D mesuré se fait sur les chaînes latérales des acides aminés [76]. De plus les temps de réaction peuvent être considérablement réduits, puisque des cinétiques de marquages comprises entre 0.1 et 10 ms peuvent être réalisées [77]. Cela permet de sonder la structure des protéines, de mettre éventuellement en évidence la présence de conformères [78], mais aussi d'explorer l'interface de liaison protéine/ligand [79]. Toutefois la résolution spatiale des données générées est intimement liée aux problématiques du séquençage « top-down » abordé précédemment [79-81]. De plus, cette approche est aujourd'hui développée dans seulement quelques laboratoires en raison de la nécessité de modifier les spectromètres de masses pour l'introduction de gaz deutérés.

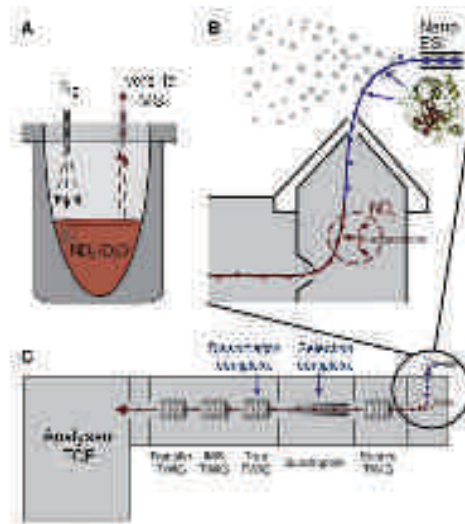


Figure 16. Représentation schématique de l'introduction d'un gaz deutéré (adaptée de [79]).

## 2. Applications en HDX-MS

L'approche HDX-MS se prête à la caractérisation structurale de nombreux types de protéines et de complexes associés. Ici l'objectif est de faire un tour d'horizon (non exhaustif) des applications en HDX-MS [82].

### 2.1. Etude de protéines

#### 2.1.1. Etude du repliement protéique

Le repliement d'une protéine où de certaines de ses zones est indispensable pour ses fonctions biologiques. L'étude des mécanismes de repliement par HDX-MS permet non seulement de mettre en évidence les zones impactées mais aussi les facteurs pouvant influencer ce processus.

Dans ce contexte, l'étude de fibrilles amyloïdes est largement documentée [83, 84]. L'HDX-MS permet ici de mettre en évidence des zones ou conditions particulières qui sont impliquées dans l'agrégation de protéines et conduisent à la formation de fibrilles. L'étude de Hodkinson *et al.*, [83] basée sur la  $\beta 2$ -microglobuline (responsable de la formation de fibrilles dans les reins), montre que si la dynamique de dépliement a été associée à cinétique de type EX1, il reste difficile de faire une corrélation entre cette dynamique et la fibrillation.

Les phénomènes de structuration de certaines protéines peuvent être guidés par une classe de protéines particulières : les chaperonnes. L'étude de la structuration même de ces dernières ou leur influence sur leurs protéines substrats a pu être réalisée par HDX-MS [85, 86]. Ainsi Hartl *et al.*, ont déterminé une cinétique de repliement de la protéine DapA, 30 fois plus rapide en présence de la chaperonne GroEL/ES.

### 2.1.2. Caractérisation structurale de protéines

Les études structurales représentent ces dernières années près d'un quart des publications en HDX-MS [82].

La plupart des expériences ont été menées afin de comparer deux états conformationnels d'une protéine résultant de conditions différentes, et de les relier à des fonctions, qui elles aussi sont différentes. Ainsi plusieurs études ont montré l'influence de conditions de stockage (lumière, température, *etc.*) [87], de mutations [88], ou modifications post-traductionnelles [89].

### 2.1.3. Cas particuliers des protéines membranaires

Les protéines membranaires et transmembranaires ont longtemps constitué un défi analytique pour la MS en raison de leur forte hydrophobicité. Cette caractéristique en fait des protéines très peu solubles, et nécessite l'utilisation de détergents pour les solubiliser et les extraire [90]. Concernant l'analyse par HDX, cette forte hydrophobicité a un effet délétère au niveau de l'efficacité de digestion. De plus l'état natif de ce type de protéine est étroitement lié aux lipides qui lui sont associés. Toutefois la présence de détergents et lipides est délétère en MS car ils masquent les signaux des peptides. En général ces derniers peuvent être séparés des protéines d'intérêt par gel SDS PAGE, précipitation alcoolique des protéines ou par chromatographie d'exclusion stérique [91]. Toutefois ces approches ne sont pas compatibles avec l'HDX-MS en termes de ré-échange. C'est pourquoi des développements méthodologiques notamment basés sur le nettoyage avec des solutions chlorés et/ou une séparation chromatographique ont été initiés [92]. Ainsi les peptides d'intérêts seront élués avant les détergents et lipides [91]. Ainsi de cette manière, la protéine transmembranaire BmrA, impliquée dans le transport de plusieurs drogues a pu être étudiée par HDX-MS. Ainsi différentes cinétiques d'échanges sur certaines zones ont été mises en évidence entre l'état ouvert et fermé de cette protéine.



## 2.2. Etudes de complexes protéiques avec différents types de partenaires

### 2.2.1 Interaction protéine/grande molécule

Par grandes molécules sont ici considérées d'après Pirrone *et al.*, celles ayant une masse supérieure à 800 Da [82]. Ainsi de nombreux types de complexe entrent dans cette catégorie. Nous allons pouvoir retrouver des études focalisées sur la détermination de zones d'interaction entre plusieurs protéines [93, 94]. Snijder *et al.*, [94] ont montré l'influence de l'agencement des protéines KaiA, KaiB et KaiC sur le rythme circadien chez les cyanobactéries. Ainsi la fixation de KaiB sur KaiC se faisait au travers de deux domaines et induisait chez cette dernière des changements conformationnels associés à des phénomènes d'allostéries. Ainsi il a été proposé que ces changements observés se rapportaient au couplage de l'activité ATPase de KaiC avec la liaison à KaiB et à la séquestration de KaiA dans un complexe ternaire KaiCBA.

L'étude de complexes formés entre protéines et acides nucléiques s'insère aussi dans cette classification. Par exemple, Trelle *et al.*, [95] ont montré par HDX-MS l'effet de la fixation d'ARN aptamères sur la flexibilité de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) (protéine inhibitrice des protéases à sérine) et notamment sur la transition de son état activé à inactivé.

La caractérisation de complexes protéines/ligands et de l'influence de la fixation de ces derniers constitue aussi un autre axe de recherche dans la catégorie des complexes protéine/grande molécule [96].

### 2.2.2. Interaction protéine/petite molécule

Dans ce cadre, les composés ayant une masse inférieure à 800 Da sont considérés comme des petites molécules. Ces dernières peuvent faire référence entre autre à des composés naturels, des antibiotiques ou des ions métalliques. Ainsi des études ont pu montrer l'influence différentielle entre la vitamine D et certains de ces analogues sur la dynamique conformationnelle du domaine de liaison au ligand (LBD) de leur récepteur. Ces différences ont permis de distinguer les molécules agonistes et partiellement agonistes de la régulation de l'activité de récepteur nucléaire [97]. Dans un autre registre, un grand nombre de protéines font appel à des ions métalliques comme le zinc pour assurer leur fonction cellulaire ou pour



le maintien de leur structure [98]. Ainsi l'intérêt de l'HDX-MS a notamment été démontré pour déterminer les sites de liaison du zinc chez la  $\beta$ -2-microglobuline [99].

## 2.3. Le domaine biopharmaceutique

### 2.3.1. Bio-comparaisons

La caractérisation structurale d'ordre supérieur de biomolécules est un point essentiel au cours des phases de recherche jusqu'à la formulation du produit. Ainsi des travaux ont été menés de manière à comprendre au niveau structural l'effet de modifications post-traductionnelles comme l'oxydation ou la glycosylation. Par exemple, les travaux de Rose *et al*, [100] ont montré l'effet notoire d'une mutation dans le domaine Fc d'un anticorps pour lequel sa structure s'en est retrouvée fortement modifiée. Ce changement conformationnel est passé par une modification du profil de glycosylation, ce qui peut avoir des effets totalement délétères au niveau de l'efficacité thérapeutique [101]. Avec l'apparition des « Antibody Drug Conjugates » (ce type de molécules fait l'objet du chapitre 1 de la partie 3), la crainte de la modification structurale de l'anticorps après le greffage de composés cytotoxiques est intervenue, qui plus est pour les composés non-covalents [102]. Si aucun changement majeur n'a été mis en évidence de par la liaison des drogues, des différences locales ont pu être dévoilées. Ce fut le cas dans la zone Fc d'un ADC à cystéine, due à l'étape de réduction et non au couplage de la drogue même [102], mais aussi pour des ADCs site-spécifique à cause de la déstabilisation de liaison hydrogène par la mutation d'un acide aminé [58].

Le champ d'application dans le domaine biopharmaceutique est encore large avec l'étude des processus d'agrégation [103] ou encore la comparaison de biosimilaires (version générique des anticorps thérapeutiques) avec leur version princeps [104].

### 2.3.2. Détermination d'épitope

Un autre aspect fondamental avec les anticorps thérapeutiques est de déterminer leurs épitopes (zones d'interaction avec leur cible antigénique) de manière à apporter un élément de compréhension aux mécanismes cellulaires associés, mais aussi d'un point de vue propriété intellectuelle. La détermination d'épitopes par HDX-MS fait l'objet d'une partie de ces travaux de thèse et sera abordé dans le chapitre 2 de la partie 3.

## 2.4. Etude de méga-complexes

Si en théorie l'approche n'est pas limitée par la taille des complexes analysables, au-delà de 300kDa [105] il devient difficile d'obtenir des résultats exploitables liés aux difficultés de digestion, d'abondance peptidique ou de fragmentation. Toutefois des complexes protéiques de très hautes masses ont pu être étudiés par HDX-MS, comme le virus de la mosaïque du brome (3.6 MDa) [106] et même la capsid virale P22 (19.6 MDa) [107]. Ceci est en réalité possible grâce à leur construction, qui se compose d'une ou deux sous-unités répétitives, ne générant ainsi pas une complexité trop grande au niveau peptidique.



## *Chapitre 2 : Description du système HDX-MS utilisé et du processus analytique associé.*

Ce chapitre a pour objectif de détailler le système instrumental utilisé pour les analyses HDX-MS (figure 17). Il sera aussi question de présenter les différentes stratégies liées au mode d'acquisition MS et les principes des logiciels utilisés pour le traitement des données.

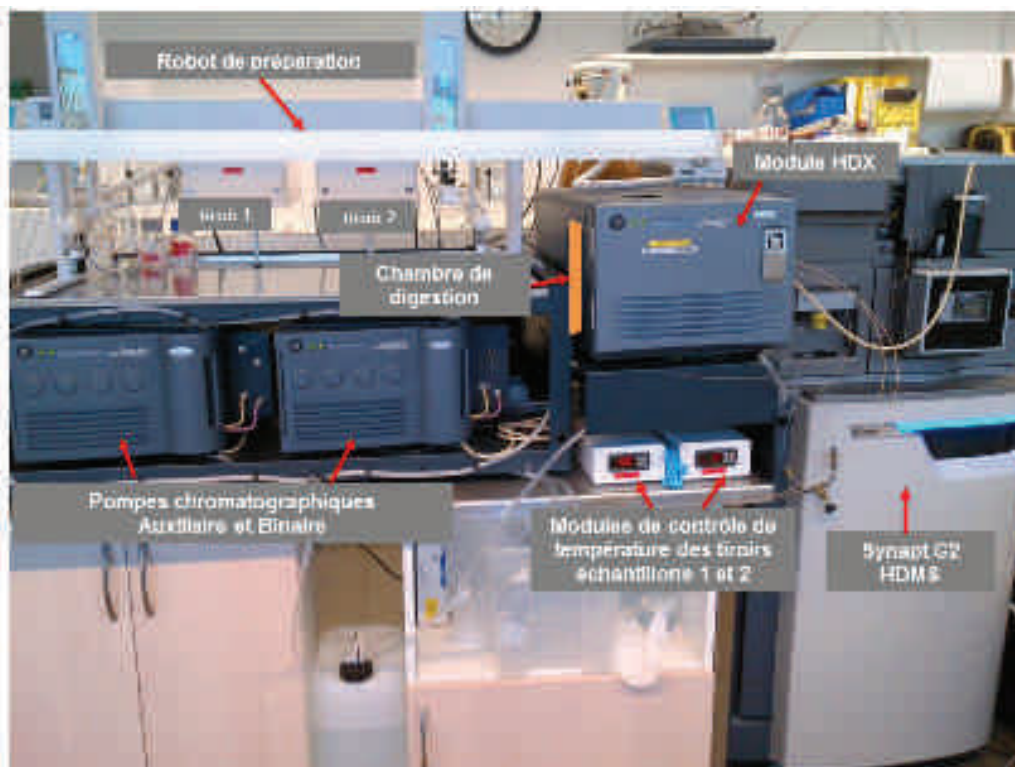


Figure 17. Système HDX-MS installé au laboratoire. Le système est composé du robot préparateur d'échantillons (Leap Technologies), d'un système chromatographique NanoAcquity HDX Technology (Waters) couplé à un spectromètre de masse Synapt G2 HDMS (Waters).

## 1. La préparation d'échantillon

Concernant la préparation des échantillons au cours de nos expériences HDX-MS, elle a été réalisée à l'aide d'un robot de la société Leap Technologies. Ce dernier est constitué d'un bras préparateur (seringue de 10  $\mu\text{L}$ ), d'un bras injecteur (seringue de 250  $\mu\text{L}$ ), et de deux tiroirs thermostatés, l'un à 20°C (dans lequel se font les réactions d'échange H/D) et l'autre à 1°C (dans lequel sont stockés les échantillons protéiques, et se font les réactions de « quench »). De plus, deux stations de lavages sont disponibles pour chaque bras afin de nettoyer chaque seringue et éviter les contaminations (composées d'une solution A ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCOOH}$  0.1%) et une solution B (ACN 5%,  $\text{HCOOH}$  1%)).

Ainsi pour une expérience type, le protocole de préparation est le suivant :

- 1- Déposer à l'aide du bras injecteur le tampon de quench dans le bloc réfrigéré (solution  $\sim \text{pH}$  2.4, sans ou avec agent dénaturant et/ou réducteur).
- 2- Après refroidissement du tampon (10 min), le bras préparateur vient prélever la protéine et la dispenser dans un vial situé dans le tiroir à 20°C.
- 3- Le bras injecteur ajoute ensuite à la protéine le tampon non deutéré pour l'établissement de la carte peptidique et le  $t_0$ , ou le tampon deutéré pour initier l'échange.
- 4- Après le temps de marquage souhaité, le bras injecteur prélève l'échantillon (non marqué ou marqué) et l'injecte dans un vial contenant le tampon de quench, préalablement réfrigéré.
- 5- Après le temps imparti de quench, le bras injecteur prélève un volume défini par l'utilisateur et l'injecte au niveau du port situé sur la partie supérieure du module HDX. L'échantillon est alors chargé dans la boucle d'injection du système chromatographique (figure 18).

L'avantage majeur d'un tel outil est la reproductibilité des expériences. En effet, toute la partie concernant la préparation de l'échantillon (dilution, marquage, jusqu'à l'injection) constitue l'étape après celle de production/purification, qui introduit la part d'erreur la plus importante au niveau des résultats finaux [15]. Ainsi l'utilisation de ce robot permet une bonne reproductibilité au niveau des pipetages, et permet de s'affranchir d'étapes pouvant constituer des sources d'introduction de ré-échange D/H, comme la congélation rapide à l'azote liquide après deutération, et décongélation avant digestion enzymatique. De plus,

l'utilisation de ce robot permet d'éviter les variabilités liées à l'opérateur, et d'automatiser le processus. Cet aspect est primordial notamment dans le milieu biopharmaceutique dans les différentes phases de Recherche et Développement [108]. Ce type d'instrument permet notamment d'optimiser le temps machine, ainsi les cinétiques de marquage les plus longues seront débutées avant les plus courtes afin qu'il n'y ait pas de temps de latence au niveau des cycles LC-MS.

En termes de robustesse, ce robot nécessite tout de même un entretien régulier des bras et seringues de pipetage. Si les mouvements de chaque bras sont contrôlés par un moteur mécanique, le retour des seringues à leur position initiale est assuré par des élastiques. Ces derniers peuvent se détendre avec le temps, et la pointe de la seringue peut alors rester légèrement engagée dans un vial. Certains de ces derniers se sont alors trouvés transportés de façon fortuite, ou l'aiguille de la seringue pliée. De façon préventive, nous changeons désormais ces élastiques une fois par an. Toutefois, l'inconvénient majeur se situe autour de la condensation pouvant se former dans le tiroir réfrigéré malgré un flux continu d'azote. L'augmentation du taux d'humidité dans ce back peut alors amplifier le contre-échange et induire un déplacement hasardeux de vials par le bras injecteur par un phénomène de ventouse.

## **2. Le module HDX**

### **2.1. La digestion**

Pour l'étape de protéolyse, nous avons utilisé un système de digestion en ligne avec une cartouche de pepsine : Porozyme<sup>®</sup> 2.1 x 30 mm (Applied Biosystems). La pepsine est ici immobilisée sur un support polystyrène hydrophile. Cette cartouche est située dans une chambre de digestion dont la température peut être modulée (figure 14 (rectangle orange) et figure 15). La température, le débit de passage sur la cartouche, et l'ajout d'agents réducteurs et/ou chaotropiques sont autant de facteurs qui auront une influence sur l'efficacité de digestion (ces aspects seront discutés en détails dans le chapitre suivant). Toutefois il est important de respecter certaines conditions expérimentales afin de préserver l'efficacité de digestion de cette cartouche :

- le pH doit toujours être strictement inférieur à 4.5,
- la concentration d'agent dénaturant doit être limitée (3M urée, 2M chlorure de guanidinium),
- la proportion de composés organiques doit aussi être contrôlée (acétonitrile < 5%).

D'un point de vue pratique, la protéine se trouvant dans la boucle d'injection est poussée par un débit (H<sub>2</sub>O, HCOOH 0.1%) à travers la cartouche de digestion (entre 50 et 200 µL/min) ; les peptides générés sont ensuite accumulés au niveau de la pré-colonne (voir paragraphe 2.2). Il est à noter ici que le nettoyage de cette cartouche après chaque cycle de digestion est primordial afin d'éviter des problèmes de relargage de certains peptides lors du cycle suivant, qui seraient non élués de la phase [109]. Ainsi ces derniers auraient le temps de subir un ré-échange et générer une double distribution isotopique, signe d'une cinétique d'échange de type EX1, mais à tort dans ce cas de figure [26]. A titre préventif des nettoyages sont réalisés avec les solutions des stations de lavages (solution A (H<sub>2</sub>O, HCOOH 0.1%) et solution B (ACN 5%, HCOOH 1%)) mais aussi avec une solution composée d'acide formique 0.8%, acétonitrile 4% et 1.5 M guanidine chlorhydrique permettant de mieux éliminer ces peptides « collés » à la cartouche enzymatique.

## 2.2. La chromatographie

La digestion sur cartouche de pepsine en ligne génère un certain nombre de peptides qui seront piégés sur une pré-colonne de phase inverse C18 Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 Van Guard pre column, 1.7 µm, 2.5 x 5 mm (Waters) (figure 18). Cette pré-colonne a un rôle de concentration, accumulation des peptides avant séparation chromatographique, mais aussi de dessalage. En effet les échantillons sont généralement dans des tampons phosphates, Tris ou Histidine et contiennent aussi des sels comme le chlorure de sodium ou potassium. Tous ces sels non volatils sont problématiques en spectrométrie de masse. C'est pourquoi il est important de passer par une étape d'accumulation et dessalage des peptides avant injection sur le spectromètre de masse. Cette étape est réalisée en ligne, en continuité de la digestion sur cartouche (débit compris entre 50 et 200 µL/min de H<sub>2</sub>O, HCOOH 0.1%), et dure en général deux à trois minutes (les produits non retenus étant dirigés vers la poubelle).

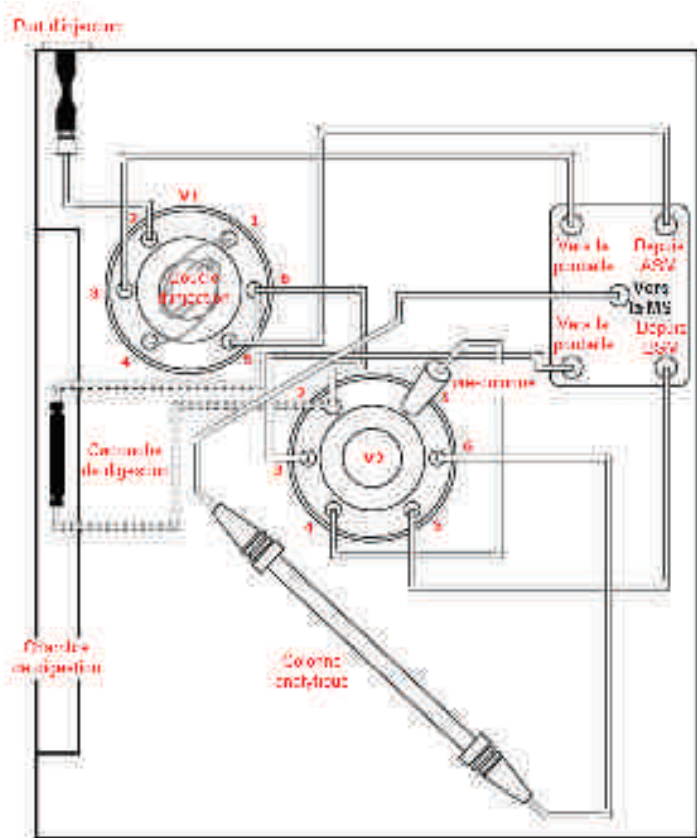


Figure 18. Représentation schématique du module HDX thermostaté.

Une fois l'étape de concentration/dessalage terminée, la vanne 2 (V2, figure 18) bascule et un gradient provenant de la pompe binaire permet d'éluer les peptides retenus sur la pré-colonne et de les séparer sur une colonne de phase inverse C18 (Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 1.7  $\mu$ m, 1.0 x 100 mm). Un gradient de 2 à 40% en acétonitrile en 7 minutes, puis jusqu'à 85% en 30 secondes est réalisé avec un débit fixé à 40  $\mu$ L/min. Un temps de gradient assez court permet ici de limiter au maximum le phénomène de contre-échange. Toujours dans cette optique, le capillaire reliant la sortie de la colonne chromatographique à la source d'ionisation ESI, est entouré d'une gaine isolante limitant les échanges thermiques avec l'extérieur (figure 14).

Il est à noter que le module HDX est entièrement réfrigéré à 0°C par un système Peltier. Ce dernier utilise le principe de refroidissement thermoélectrique (ou effet Peltier), transformant un courant électrique en une différence de température.



### 3. La spectrométrie de masse

#### 3.1. Description de l'instrument

Les analyses HDX-MS ont été réalisées sur un Synapt G2 HDMS (Waters), qui est un spectromètre de masse à source ESI et géométrie Q-ToF, ayant la particularité d'être pourvu d'une cellule de mobilité ionique de type TWIMS (figure 19). Le vide à l'intérieur de l'instrument est généré à l'aide d'une pompe primaire et 6 pompes turbomoléculaires. Concernant la structure de l'appareil, elle se divise en 5 parties distinctes :

- ⇒ **La source électrospray** de type Z-spray<sup>TM</sup>. Cette dernière est orthogonale au block source qui constitue le point d'entrée des ions dans le spectromètre de masse. Les ions sont générés par application d'une différence de potentiel entre le capillaire électrospray, le cône d'échantillonnage puis le cône d'extraction. Ces différences de potentiels combinées à un gradient de pression permettent de drainer les ions vers l'intérieur du spectromètre de masse, ces derniers suivant alors un chemin en forme de « Z ». Cette trajectoire particulière permet d'éliminer les espèces neutres, et confère à ce type de source une tolérance plus importante aux sels non-volatils. Le spectromètre de masse utilisé au laboratoire est aussi équipé d'une vanne de fuite permettant de contrôler la pression résiduelle au niveau du bloc source pour les analyses de MS native. Dans les expériences HDX-MS, la pression est fixée à 2 mbar.
- ⇒ **Un guide d'ion** situé entre le cône d'extraction et le quadripôle. Il est constitué d'une série de lentilles annulaires SRIG (« stacked ring ion guide ») basées sur la technologie T-Wave<sup>TM</sup>. L'application d'un potentiel radiofréquence (RF) et d'une tension continue (DC) sur les paires de lentilles de proche en proche, permet de focaliser et transmettre les ions au sein du spectromètre de masse, sous forme de vagues de potentiels [110].
- ⇒ **Le quadripôle** situé après le guide d'ions. Il est constitué de deux paires de barreaux parallèles connectés entre eux. Il peut être utilisé selon deux modes de fonctionnement :
  - un unique potentiel radiofréquence est appliqué sur les barreaux, en opposition de phase. Tous les ions seront alors transmis jusqu'à la cellule suivante, le quadripôle est alors utilisé en mode « **RF only** », et est assimilé à un guide d'ions [111].

- une tension continue est appliquée en superposition à un potentiel radiofréquence. Le quadripôle est alors utilisé comme **filtre de masse** et permet de sélectionner des rapports  $m/z$  donnés [112].

⇒ **La cellule Triwave** située entre le quadripôle et l'analyseur. Elle se subdivise en trois parties constituées de guides d'ions SRIG :

- Les **cellules Trap et Transfer** peuvent être assimilées à de simples guides d'ions, ou être utilisées comme cellules de collisions dans le cadre d'expériences MS/MS. Ces cellules sont alimentées en argon et la pression y régnant est de l'ordre de  $1.10^{-2}$  mbar.
- La **cellule dite de mobilité ionique (IMS)**. Suivant que l'instrument soit utilisé en mode mobilité « on » ou « off », cette cellule n'aura pas la même fonction.
  - Si le mode mobilité ionique n'est pas activé, alors une pression résiduelle d'argon ( $1.10^{-4}$  mbar) alimente cette cellule, qui est alors utilisée comme simple guide d'ion.
  - Si le mode mobilité ionique est activé, alors cette cellule est subdivisée en deux sous parties non isolées, alimentées en hélium et azote (de 1 à 6 mbar). La cellule d'hélium permet alors de thermaliser les ions dont l'énergie cinétique est contrôlée par la tension Trap Bias. La cellule d'azote permet alors de séparer les ions en fonction de leur mobilité ionique (reliée à leur charge et conformation).

⇒ **L'analyseur à temps de vol (ToF « time of flight »)**. Il est constitué de deux zones :

- une première **zone où sont accélérés les ions** de façon perpendiculaire à leur arrivée, par application d'une différence de potentiel très élevée.
- puis une deuxième **zone libre de champ sous vide poussé** ( $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  mbar) que vont traverser les ions pour atteindre le détecteur.

La mesure du temps de vol des ions permettra de déterminer leur rapport  $m/z$  à partir des équations suivantes :

L'énergie cinétique ( $E_c$ ) de chaque ion est établie par l'équation (2) où  $z$  est la charge de l'ion,  $e$  la charge d'un électron,  $U$  la différence de potentiel appliquée,  $m$  la masse de l'ion et  $v$  la vitesse de l'ion.

$$(2) \quad E_c = zeU = \frac{1}{2}mv^2$$

La vitesse de l'ion peut alors être déduite à partir de l'équation (3).

$$(3) \quad v = \sqrt{\frac{2zeU}{m}}$$

L'équation (4) permet alors de relier le temps de vol  $t$  à la racine carrée du rapport  $m/z$ , avec  $L$  la longueur du tube de vol.

$$(4) \quad t = \frac{L}{v} = L \times \sqrt{\frac{m}{z 2eU}}$$

La résolution d'un analyseur ToF peut être améliorée par l'utilisation d'un réflectron ou réflecteur électrostatique [113]. Ce dernier est composé d'une série d'anneaux sur lesquels sont appliqués des potentiels croissants de même direction mais de sens opposé au champ électrique de la zone d'accélération. Lorsque les ions entreront dans le champ électrique du réflectron, ils seront alors progressivement freinés puis ré-accélérés vers le détecteur. Ainsi les ions de même rapport  $m/z$  mais présentant une dispersion en énergie cinétique seront refocalisés temporellement de manière à ce qu'ils atteignent le détecteur en même temps (les ions avec une plus grande énergie cinétique pénétreront plus loin dans le réflectron avant d'être renvoyés). Le Synapt G2 HDMS a la particularité au niveau de son analyseur ToF de pouvoir fonctionner en trois modes différents. L'analyseur peut être utilisé en mode sensibilité ou résolution, les ions suivront alors une trajectoire décrivant un « V » permettant d'atteindre respectivement des résolutions FWHM de 10000 et 20000. Le mode haute résolution, utilise un deuxième réflecteur électrostatique de manière à doubler le temps de vol des ions qui adopteront une trajectoire en forme de « W », permettant aussi de doubler la résolution FWHM (40000 en mode haute résolution). Toutefois le gain de résolution se faisant au détriment de la sensibilité, le mode résolution sera privilégié pour les expériences HDX-MS.

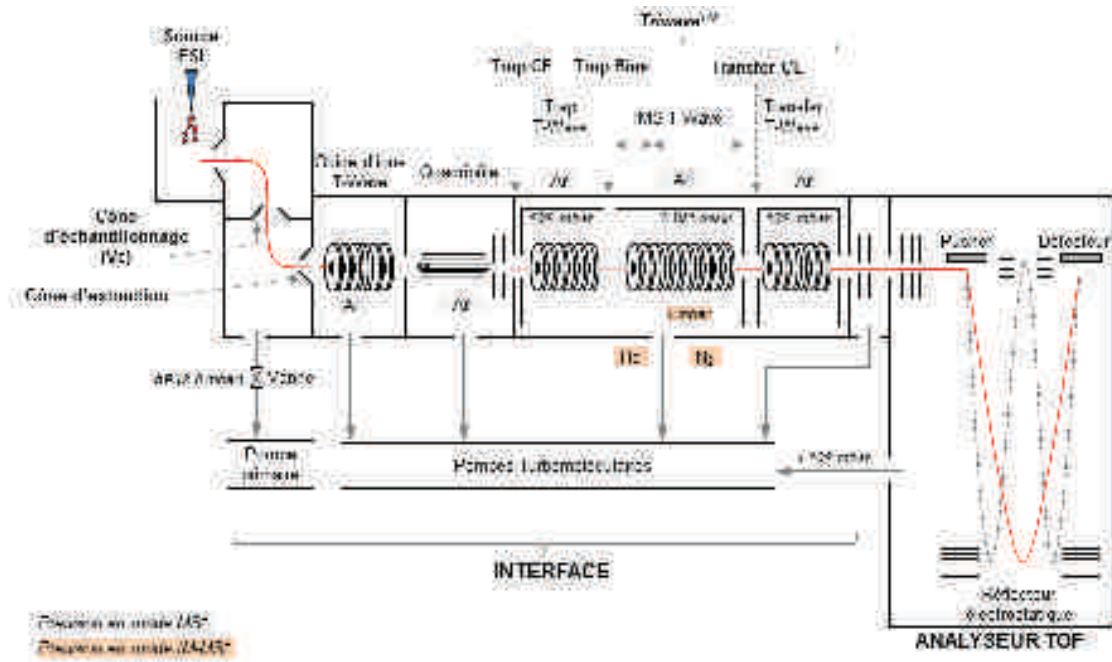


Figure 19. Représentation schématique du Synapt G2 HDMS (Waters), adaptée de [114].

### 3.2. La méthode MS

L'établissement de la carte peptidique se fait au travers d'expériences MS/MS, de manière à séquencer les peptides non marqués issus de la digestion pepsique. Pour ce faire, nous avons utilisés un mode d'acquisition DIA particulier : la MS<sup>E</sup>.

Cette approche basée sur une succession de scans basse et haute énergie [115] (figure 20) est brevetée par la société Waters. Le scan basse énergie est assimilé à un scan permettant d'obtenir la liste des ions parents, alors que le scan haute énergie est assimilé à la fragmentation de tous les ions précurseurs sans pré-sélection. C'est l'application d'une rampe d'énergie (en général comprise entre 15 et 45 eV) qui permet de réaliser le scan à haute énergie [116]. Les spectres alors générés sont identifiés à l'aide du logiciel ProteinLynx Global SERVER<sup>TM</sup> (PLGS<sup>TM</sup>, Waters) (ce processus sera détaillé dans le paragraphe 4 – analyse des données).

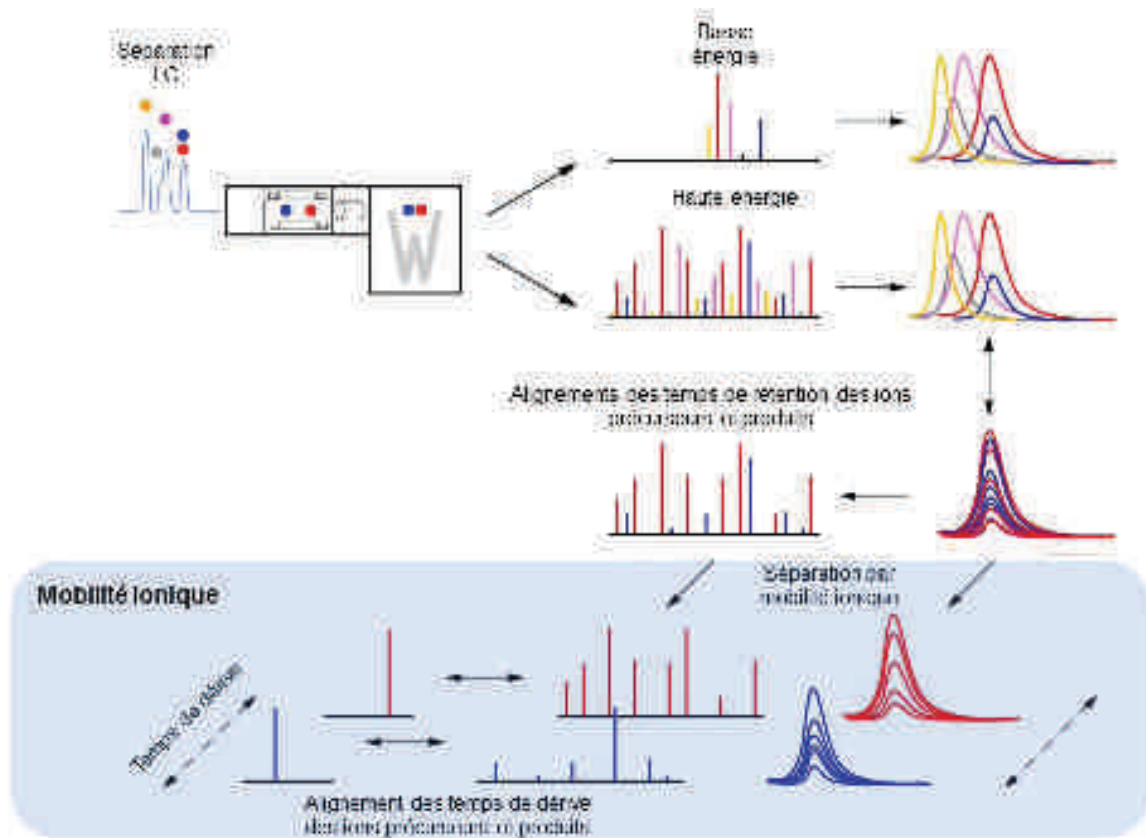


Figure 20. Principe d'une acquisition en mode MS<sup>E</sup> et HDMS<sup>E</sup>. Elle consiste en alternance de scans basse et haute énergie. L'utilisation de la mobilité ionique permet de réaligner les ions précurseurs et produits en fonction de leur temps de dérive au sein de la cellule de mobilité ionique (adapté de [117]).

Il est possible d'associer cette fragmentation MS<sup>E</sup> à une dimension de séparation supplémentaire de mobilité ionique, afin de pallier la difficulté d'assigner correctement les ions fragments à leur précurseur. Cette méthode est identifiée sous le terme HDMS<sup>E</sup> (figure 18).

Si cette approche permet un gain d'identifications peptidiques et protéiques, elle engendre une réduction de la gamme dynamique [118]. Celle-ci est occasionnée pour des raisons :

- de **perte des ions par diffusion**. Les ions transitent au travers de cellules basse pression (Trap,  $5.10^{-2}$  mbar), haute pression (IMS, 0.5 mbar) et basse pression à nouveau (Transfer,  $5.10^{-2}$  mbar), ce qui occasionne une perte de certains ions.
- de **saturation du digitaliseur**. En effet les ions sont concentrés sur quelques cycles ToF, occasionnant une résonance avec le digitaliseur. Ceci entraîne alors une modification des profils isotopiques et donc une mesure de masse moins précise [119].

## 4. Analyse des données

### 4.1. PLGS™ (Waters)

#### 4.1.1. L'algorithme

La société Waters a développé le logiciel PLGS™ de manière à interpréter les données de fragmentation. L'identification des spectres MS/MS est réalisée en deux temps (figure 21) [120, 121] :

- ⇒ Tout d'abord l'algorithme *Apex 3D* va soustraire le bruit de fond, et intégrer les signaux par rapport à leur temps de rétention. Ensuite l'algorithme *Peptide 3D* rassemblera les isotopes de chaque ion. Tous les peptides sont alors caractérisés par une masse, un temps de rétention, une intensité, et un temps de dérive au sein de la cellule de mobilité ionique si cette fonction est activée. Cette première étape se termine par un alignement des fragments et précurseurs en fonction de leur temps de rétention et éventuellement temps de dérive, aboutissant à la **création d'une composante EMRT** (« exact mass retention time »).
- ⇒ Dans un deuxième temps, l'algorithme *Ion Accounting* permet d'**identifier les spectres**, et donc les peptides et protéines associés, par recherche dans une banque. Cette recherche est préfractionnée en quatre sous-étapes :
  - Une pré-recherche permet de créer des modèles peptidiques et de leur associer des propriétés physico-chimiques. Les données expérimentales sont aussi ré-étalonnées en fonction de l'ajustement de masse en temps réel (Glufibrino-peptide).
  - Ensuite une première recherche est réalisée de façon itérative, jusqu'à atteindre le taux de faux positifs (FDR). Dans le cadre des expériences HDX-MS, le nombre de protéines présentes dans la banque est très restreint (égal au nombre de protéines du complexe plus l'enzyme de digestion), c'est pourquoi le taux de FDR est en général fixé à 100%.
  - Une deuxième recherche permet d'identifier les modifications post-traductionnelles sur les peptides des protéines préalablement identifiées.
  - Une dernière recherche est enfin réalisée de manière à identifier les spectres pour lesquels les ions fragments ont une intensité supérieure à celles du précurseur, ce qui est caractéristique d'une fragmentation en source.

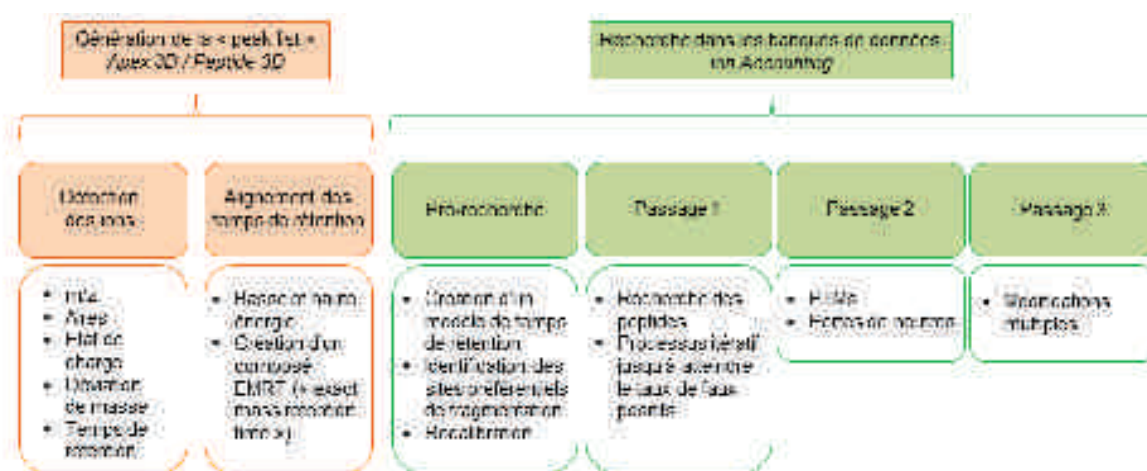


Figure 21. Description des étapes menées par PLGS<sup>TM</sup> pour l'identification de spectres acquis en MS<sup>E</sup> (adapté de [119]).

A la suite de ces identifications, les peptides sont classés suivant un score qui leur est attribué en fonction de l'adéquation entre l'identification et les modèles physico-chimiques générés, selon 14 critères pour la MS<sup>E</sup>, et 15 pour l'IM-MS<sup>E</sup> :

- Précision de masse sur la mesure du précurseur
- Précision de masse sur la mesure des fragments
- Somme de l'intensité des ions fragments
- Nombre d'ions *y* et *b* consécutifs
- Complémentarité des ions *y* et *b*
- Fragmentation au niveau des sites de clivages préférentiels
- Rapport entre la somme des intensités des ions *y* et *b*
- Différence entre le temps de rétention théorique et expérimental
- Rapport entre l'intensité du précurseur et la somme des intensités des fragments
- Observation de perte de neutre en adéquation avec la composition en acide aminé
- Multiplicité des états de charge observés en adéquation avec la prédiction du modèle
- Nombre de peptides identifiés par rapport au modèle
- Nombre de fragments identifiés par rapport au modèle
- Rapport des sommes des intensités des fragments sur celles des précurseurs
- « Différence entre le temps de dérive théorique et expérimental »

Cette approche est assez différente de celle utilisée par le moteur de recherche Mascot, classiquement utilisé en protéomique avec des méthodes de fragmentation dites de DDA. Ce dernier est basé sur une démarche probabilistique, et non itérative. Si les paramètres



d'attribution d'un score de cet algorithme ne sont pas connus, la qualité spectrale semble y être prépondérante.

#### 4.1.2. Validation des spectres identifiés

Si le mode de séquençage  $MS^E$  permet de fragmenter l'ensemble des ions précurseurs et donc de s'affranchir en théorie d'une perte d'information, il n'en demeure pas moins qu'avec cette approche nous sommes liés au logiciel de retraitement Waters. De plus, à la vue de la qualité moyenne de certains spectres identifiés, une question peut être posée : pouvons-nous avoir confiance aux spectres validés ?

En effet à la vue de certains spectres  $MS/MS$ , nous pouvons nous apercevoir que la qualité de certaines assignations sont discutables (figure 22). Si les spectres de fragmentation avec un score supérieur à 8 ne suscitent pas trop de doute, ce n'est pas le cas de ceux identifiés avec des scores inférieurs.

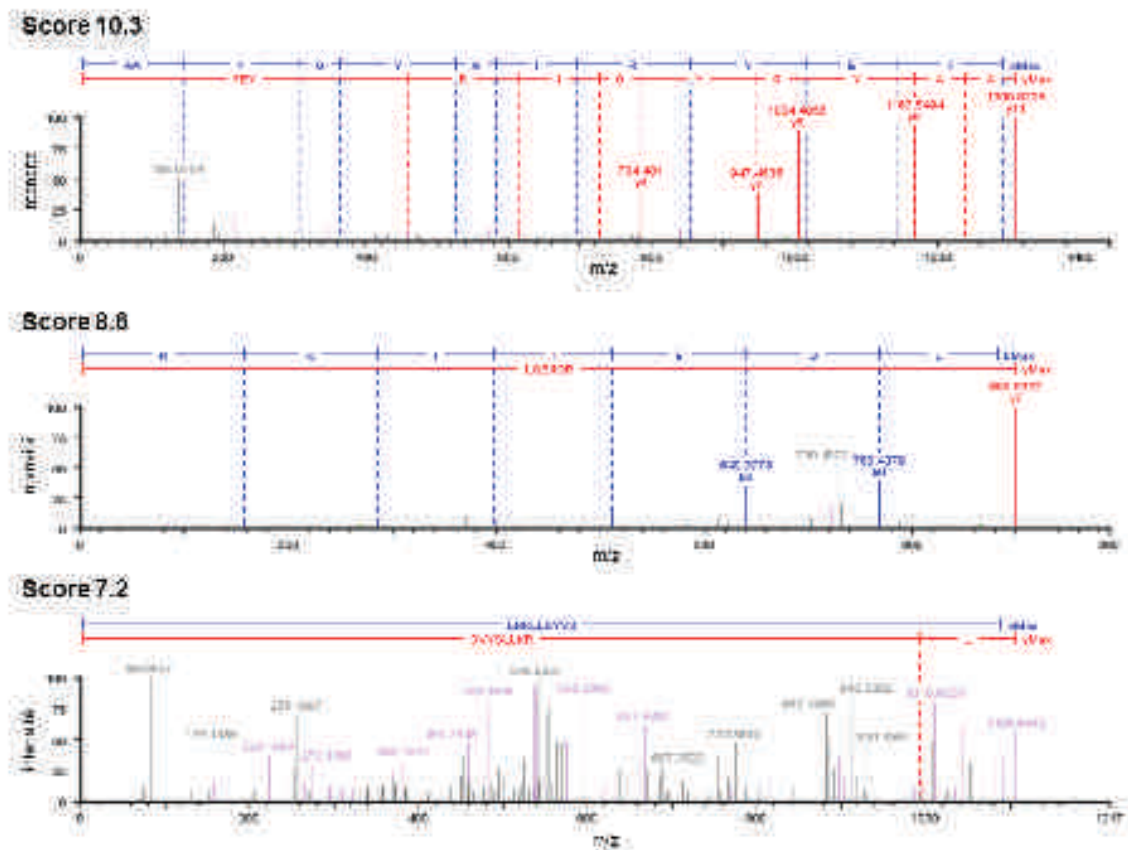


Figure 22. Exemples de spectres de fragmentation identifiés par PLGS<sup>TM</sup> avec leur score associé.



Or, près de 2/3 des spectres identifiés le sont avec un score inférieur à 8, ce qui renforce cette incertitude dans la validité des identifications (figure 23).

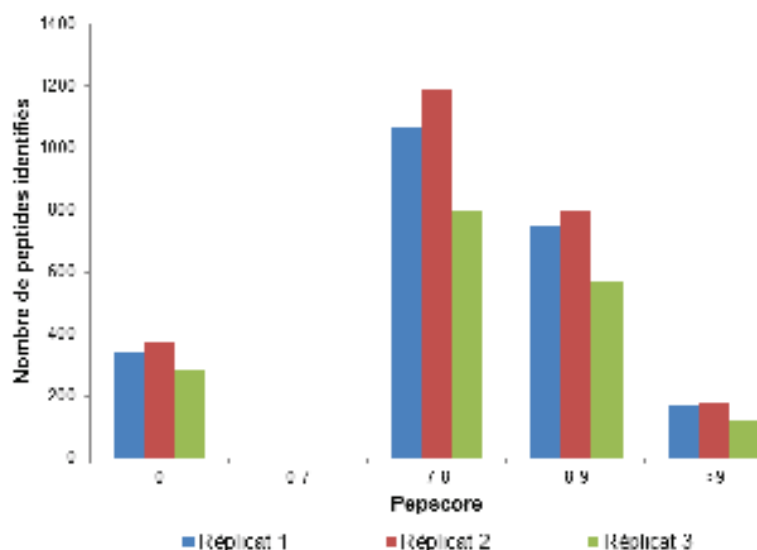


Figure 23. Distribution des peptides identifiés suivant le score attribué par PLGS<sup>TM</sup>, dans le cadre d'une analyse de phosphorylase B.

Il aurait été assurément intéressant ici d'évaluer le mode DDA pour cette application. Toutefois nous avons dû nous focaliser sur le mode MS<sup>E</sup>, ce dernier étant un prérequis pour les fichiers « input » du logiciel d'intégration des profils de deutération. S'il apparaît difficile de valider certains spectres sur la base d'une simple observation des profils de fragmentation, PLGS<sup>TM</sup> utilise beaucoup plus de critères que les algorithmes classiquement utilisés en DDA, comme Mascot. De plus des étapes de filtrage au niveau du logiciel DynamX<sup>TM</sup> permettront d'augmenter le degré de validité des peptides suivis.

#### 4.2. DynamX<sup>TM</sup> (Waters)

Dès lors que les peptides issus de la digestion sont séquencés par MS/MS et identifiés par PLGS<sup>TM</sup>, il convient alors de mesurer le taux d'incorporation en deutérium de ces derniers suivant leur temps d'échange. Auparavant cette étape constituait un des points les plus limitant de cette approche de part le temps nécessaire au traitement des données. La société Waters propose maintenant depuis quelques années une solution globale participant à l'automatisation de l'intégration des données d'incorporation en deutérium avec le logiciel

DynamX<sup>TM</sup> [71, 122]. Ce dernier opère en deux étapes parallèles qui se rejoindront au final afin de calculer les taux d'incorporation (figure 24) :

- ⇒ Dans un premier, **les peptides identifiés par PLGS<sup>TM</sup> sont importés dans DynamX<sup>TM</sup>** sous forme de tableur Excel. A ce niveau-là, des filtres peuvent être appliqués, et sont basés sur le nombre de fragments ayant permis d'identifier le peptide et particulièrement sur l'identification d'un peptide en question dans l'ensemble des réplicats. Après application de ces filtres, **une liste de peptides est générée et sera soumise à recherche** pour le calcul d'incorporation en deutérium.
- ⇒ En parallèle, une **analyse des données brutes** non deutérées et deutérées est réalisée de manière totalement indépendante à la liste des peptides issus de la première étape. Cette analyse permet de **lister tous les ions**, et de leur attribuer un temps de rétention, une intensité, une aire et éventuellement un temps de mobilité ionique.
- ⇒ Ensuite les données issues de ces étapes distinctes sont corrélées entre elles. **Les enveloppes isotopiques de chaque ion sont reliées aux peptides cibles, basé sur le temps de rétention** qui leur est associés. A la suite de ceci, les taux de deutération sont calculés automatiquement à partir des centroïds [71]. Toutes les données sont alors moyennées selon les réplicats et les conditions expérimentales. Les résultats pourront alors être visualisés de façon individuelle à chaque peptide ou alors de manière globale (ces dernières seront représentées et expliquées au cours des prochains chapitres). Toutefois si ces intégrations se font de manière automatisées, le processus n'est pas une « boîte noire » pour l'utilisateur. En effet, il est possible de vérifier pour chaque peptide, conditions et états de charges la manière dont les profils isotopiques ont été considérés.

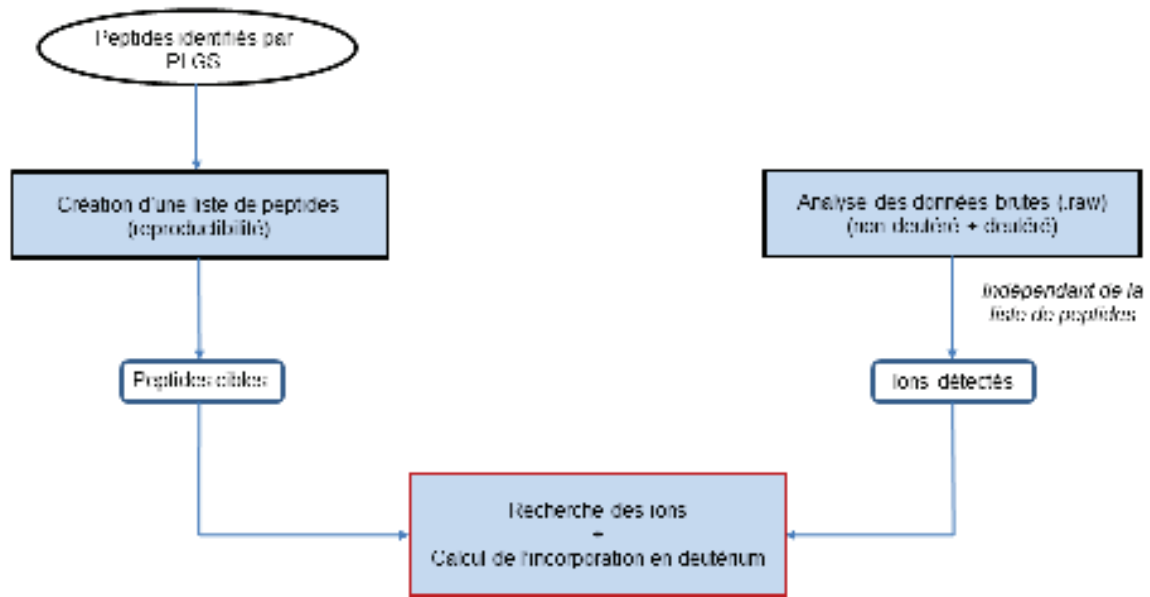


Figure 24. Principe de l'algorithme d'intégration des données de deutération par DynamX™.

### ***Chapitre 3 : Optimisations expérimentales et instrumentales en HDX-MS et mise en place d'un test de performance.***

Afin d'attribuer un certain poids aux données acquises à partir d'expériences HDX-MS, il est très important d'obtenir une couverture de séquence la plus complète qui soit, de manière à être représentatif des effets qui peuvent se produire sur l'ensemble de la protéine ou du complexe protéique en question. L'optimisation de la redondance peptidique est aussi un aspect à prendre en compte afin d'améliorer la résolution des zones impactées. Ce chapitre a pour objectif de montrer l'effet de plusieurs paramètres expérimentaux et instrumentaux lors de la mise au point des cartes de recouvrement. A titre d'exemples nous présenterons les optimisations réalisées sur deux projets qui ne font pas l'objet de chapitres dans ce manuscrit :

- l'étude du sous complexe ternaire Snu13p/Rsa1p/Hit1p impliqué dans la machinerie d'assemblage de ribonucléoparticules (d'autres sous complexes de cet assemblage sont étudiés dans la partie 4)
- la détermination d'épitopes sur l'allergène Artv3 (issu d'une plante : l'armoise commune ou *artemisia vulgaris*).

La comparaison des couvertures de séquence selon différentes conditions est réalisée à l'aide du logiciel MS tools [68].

Un test de performance permettant d'évaluer la fonctionnalité du système HDX-MS a été mis en place et sera présenté dans un dernier temps.

## 1. Optimisations des paramètres expérimentaux

### 1.1. Influence de la quantité de matériel injectée

Un des paramètres majeurs dans l'obtention d'un taux de recouvrement acceptable, est caractérisé par la quantité d'échantillon injectée. Ainsi la couverture de séquence du partenaire Hit1p est présentée pour 100 et 150 pmoles injectées (figure 25 et tableau 1).

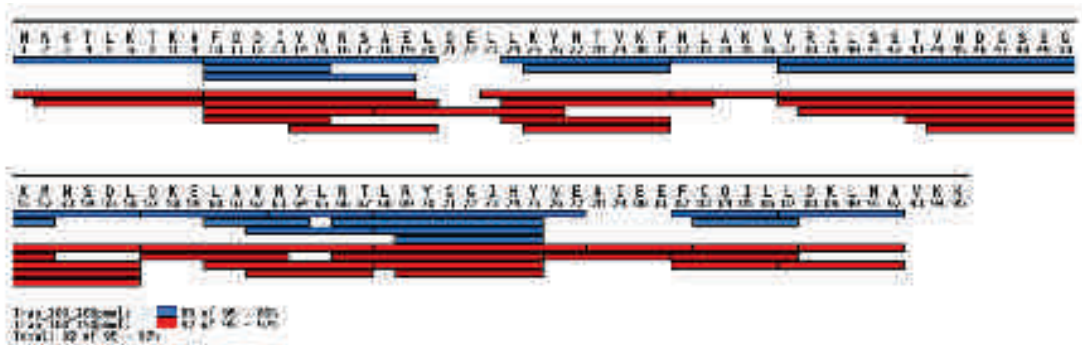


Figure 25. Influence de la quantité de matériel injectée sur la couverture de séquence et la redondance peptidique obtenues pour Hit1p. Les peptides identifiés pour 100 pmoles de matériel injecté sont représentés en bleu, ceux pour 150 pmoles en rouge.

Echantillon	Quantité injectée (pmoles)	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Hit1p	100	89	1.9
	150	97	3.2

Tableau 1. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 25.

Dans le cadre de cette protéine, une injection plus importante de matériel protéique permet d'augmenter la couverture de séquence de 8%, mais aussi d'améliorer l'indice de redondance de 1.9 à 3.2. Ce chevauchement accru au niveau peptidique se situe principalement dans la zone 24-56.

### 1.2. Influence du débit de passage sur la cartouche de digestion

Le débit de passage sur la cartouche de digestion est un paramètre qui doit faire l'objet d'une attention particulière. En effet le flux continu de solvant A (H<sub>2</sub>O, HCOOH 0.1%) entraîne le matériel protéique de la boucle d'injection jusqu'à la pré-colonne de dessalage/concentration, en passant par la cartouche de digestion. Ce dernier est donc directement associé au temps de digestion, c'est-à-dire au temps où la protéine sera en contact avec l'enzyme immobilisée.

Avec le système utilisé au laboratoire, ce débit-là peut être modulé entre 0 et 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Dans le contexte de l'étude du complexe ternaire Snu13p/Rsa1p/Hit1p, trois débits ont été testés : 75, 100 et 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  correspondant respectivement à une durée de contact avec l'enzyme d'environ 34, 30 et 22 secondes. De façon intuitive, nous aurions tendance à penser que plus le temps de digestion est élevé, meilleure la couverture de séquence sera. Cette idée n'est pas toujours vraie, comme le montrent les résultats obtenus pour Hit1p (figure 26 et tableau 2).

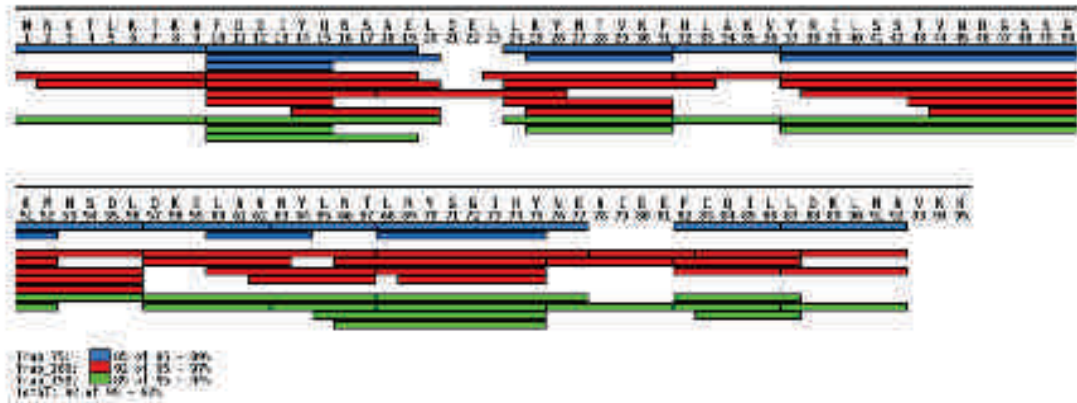


Figure 26. Influence du débit de passage à travers la cartouche de digestion sur la couverture de séquence et la redondance peptidique obtenues pour Hit1p. Les peptides identifiés pour un débit de 75  $\mu\text{L}/\text{min}$  sont représentés en bleu, 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  en rouge et 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  en vert.

Echantillon	Débit "trapping" ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Hit1p	75	89	1.6
	100	97	3.2
	150	94	2.0

Tableau 2. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 26.

En effet la couverture de séquence obtenue pour un débit de 75  $\mu\text{L}/\text{min}$  demeure inférieure de 5 et 8% à celles obtenues pour des débits de 150 et 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Toutefois nous pouvons observer que le débit intermédiaire présente la meilleure couverture de séquence (97% vs. 94%) et un indice de redondance supérieur (3.2 vs. 2.0) par rapport au débit le plus rapide.

Un autre paramètre peut être ajusté au niveau de la cartouche de digestion, c'est la régulation de la température de l'enceinte dans laquelle elle se trouve. Dans le cadre de ces travaux, nous n'avons pas modifié la température de digestion, et avons choisi de travail à une valeur de 20°C. Deux raisons ont dicté ce choix :

- premièrement nous avons souhaité favoriser l'efficacité de digestion. En effet, l'activité enzymatique est plus importante à cette température, qu'à 0°C [122, 123].

- deuxièmement, le temps de passage sur la cartouche de digestion est relativement rapide (généralement entre 15 et 30 secondes). Ainsi le phénomène de ré-échange est assez limité. Cet aspect est plus problématique avec une digestion en solution, nécessitant généralement quelques minutes. De plus, nos études se sont basées sur des approches comparatives et non absolues, ceci conférant une « tolérance » plus importante à l'éventuel ré-échange.

### 1.3. Influence d'agents chaotropiques et/ou réducteurs

L'ajout d'agents dénaturants et/ou réducteurs peut permettre d'améliorer l'accessibilité de la protéine à l'enzyme et ainsi d'accroître l'efficacité de digestion [15, 44, 45, 122]. Dans le cadre de nos expériences, nous avons évalué l'effet de la concentration en agent réducteur pour des protéines présentant des ponts disulfures, comme l'allergène Artv3 (figure 27 et tableau 3).

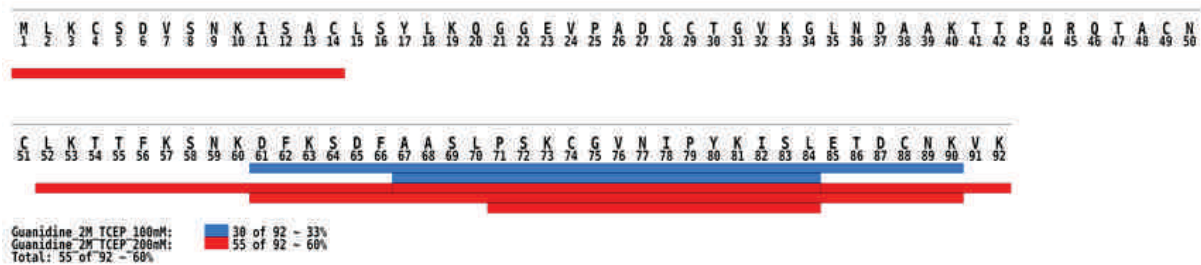


Figure 27. Influence de la concentration en agent réducteur (TCEP) sur la couverture de séquence obtenue pour Artv3. Les peptides identifiés pour le tampon de « quench » guanidine 2M TCEP 100mM et guanidine 2M TCEP 200mM sont respectivement représentés en bleu et rouge.

Échantillon	Agent dénaturant	Agent réducteur	Recouvrement (%)
Artv3	Guanidine HCl 2M	TCEP 100 mM	33
		TCEP 200 mM	60

Tableau 3. Taux de couverture de séquence associé à la figure 27.

Ainsi le fait de passer de 100 à 200 mM en TCEP permet de gagner 27% en couverture de séquence pour cette protéine. Le taux de recouvrement n'est certes pas optimal (60%), toutefois cette comparaison montre l'intérêt à optimiser ce paramètre.

### 1.4. Influence du temps de « quench »

Le temps de « quench » peut aussi être optimisé de manière à améliorer la couverture de séquence ou l'indice de redondance. En effet, certaines protéines peuvent être très structurées avec notamment la présence de ponts disulfures. Ainsi le temps de « quench » est directement lié au temps alloué à la réduction et dénaturation de la protéine. De façon générale nous avons fixé ce temps à 30 secondes, toutefois dans certains cas, une durée allongée permet d'augmenter le taux de recouvrement. Ainsi pour l'étude de l'allergène Artv3, le fait de passer de 30 à 120 secondes de temps de « quench » et donc de réduction/dénaturation, nous permet d'observer un très léger gain de couverture de séquence (de 60% à 62%) mais une nette amélioration au niveau de l'indice de redondance (1.8 vs. 2.5) (figure 28 et tableau 4).

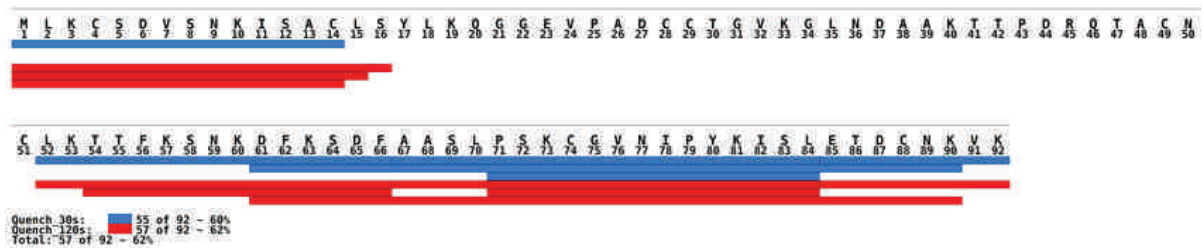


Figure 28. Influence du temps de « quench » sur la couverture de séquence et la redondance peptidique obtenues pour Artv3. Les peptides identifiés pour un temps de 30 et 120 secondes sont respectivement représentés en bleu et rouge.

Echantillon	Temps de Quench (sec)	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Artv3	30	60	1.8
	120	62	2.5

Tableau 4. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 28.

Toutefois, l'augmentation du temps de « quench » introduit une durée supplémentaire entre le marquage et l'analyse de l'échantillon, ce qui contribue *a fortiori* à l'augmentation du ré-échange. Il est donc important de trouver le bon équilibre entre les effets positifs de l'allongement de la durée de « quench » (recouvrement et/ou indice de redondance), et ses effets négatifs comme l'augmentation du ré-échange. De plus, la couverture de séquence obtenue pour cette protéine demeure largement insatisfaisante. Malgré l'ajout de fortes concentrations en TCEP (jusqu'à 500 mM), cette dernière ne s'en trouve pas améliorée. La présence de 4 ponts disulfures confère ici à l'allergène un caractère récalcitrant vis-à-vis de la digestion ; la réduction électrochimique pourrait être ici une alternative intéressante [48].



### 1.5. Influence de l'enzyme

Très récemment, nous avons eu la possibilité d'acquies un cartouche de digestion avec une autre enzyme immobilisée que la pepsine : la népenthésine [39]. Nous avons alors testé son efficacité sur le complexe ternaire Snu13p/Rsa1p/Hit1p. Si l'utilisation de cette enzyme génère des taux de recouvrement inférieurs à la pepsine pour les partenaires Snu13p et Rsa1p, elle présente un intérêt pour le partenaire Hit1p (figure 29 et tableau 5).

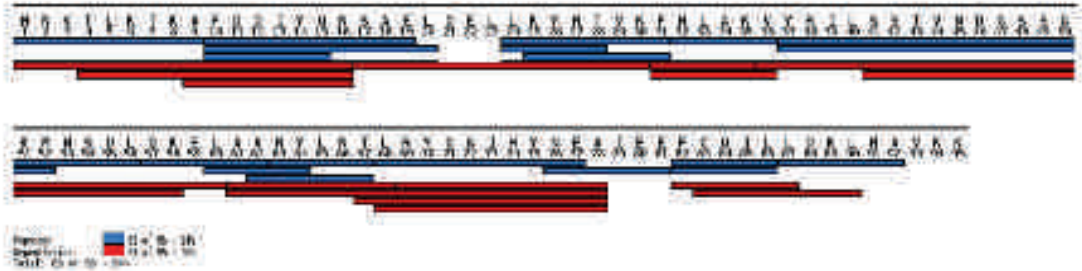


Figure 29. Influence de la nature de l'enzyme de digestion sur la couverture de séquence et la redondance peptidique obtenues pour Hit1p. Les peptides issus de la digestion sur cartouche de pepsine sont représentés en bleu, ceux issus de la digestion sur cartouche de népenthésine sont identifiés en rouge.

Echantillon	Nature de l'enzyme	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Hit1p	Pepsine	94	1.6
	Népenthésine	92	2.0

Tableau 5. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 29.

La couverture de séquence issue de la digestion à la népenthésine est légèrement inférieure à celle issue de la pepsine (92% vs. 94%). Cependant elle présente un indice de redondance légèrement supérieur (2.0 vs. 1.6), et une complémentarité au niveau de la redondance peptidique. En effet, au niveau N-ter de la protéine nous pouvons observer 3 peptides se superposant, ce qui pourrait permettre d'augmenter la résolution spatiale si des changements se produisaient dans cette zone après deutération. C'est aussi le cas de la région 60-78 qui présente des peptides chevauchants complémentaires.

## 2. Optimisations des paramètres instrumentaux

Au niveau de l'optimisation des paramètres instrumentaux, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation de l'énergie de collision délivrée dans la cellule Trap. Nous avons voulu vérifier si l'application d'une rampe d'énergie plus étendue permettait d'identifier un plus grand nombre de peptides. Pour l'exemple montré ci-dessous, nous avons testé deux rampes d'énergie de collision : de 15 à 40 eV et de 15 à 60 eV. Ainsi pour le partenaire Hit1p, la couverture de séquence et l'indice de redondance sont nettement supérieurs pour une rampe de 15 à 40 eV (figure 30 et tableau 6).

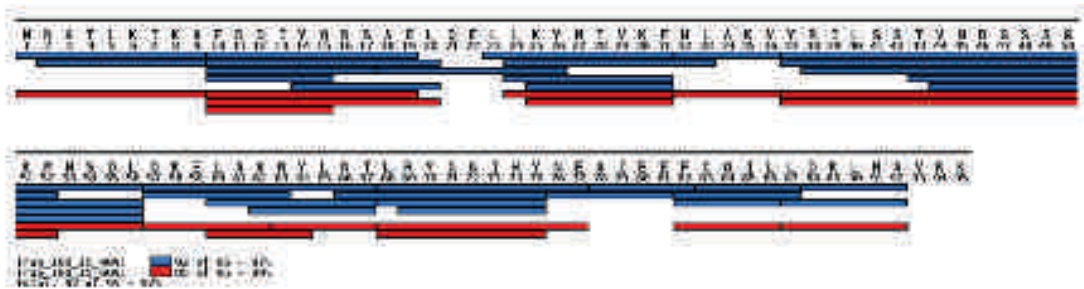


Figure 30. Influence de l'énergie de collision sur la couverture de séquence et la redondance peptidique obtenues pour Hit1p. Les peptides identifiés à l'issue d'une rampe d'énergie de 15 à 40 eV sont représentés en bleu, ceux identifiés avec une rampe de 15 à 60 eV sont représentés en rouge. Les peptides sont ici générés par digestion sur cartouche de pepsine.

Echantillon	Energie de collision (eV)	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Hit1p	15 à 40	97	3.2
	15 à 60	89	1.6

Tableau 6. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 30.

Cette différence est probablement due au fait que l'énergie optimale de fragmentation pour la majorité des peptides est située entre 15 et 40 eV. Ainsi pour la rampe balayant une plus large gamme d'énergie pour un même temps de scan (0.3 sec), les peptides se trouvent moins longtemps dans une gamme d'énergie de fragmentation optimale.

### 3. Paramètres de retraitement

L'analyse des données expérimentales se fait en deux étapes :

- Dans un premier temps, les peptides séquencés par LC-MS<sup>E</sup> sont identifiés par le logiciel PLGS après recherche dans une banque de données. Si pour une recherche classique avec un moteur de recherche comme Mascot, l'utilisateur indique une tolérance fixe pour l'ion précurseur et les ions fragments, PLGS permet d'adapter la tolérance en fonction des données expérimentales. En effet, lors de la génération de la « peak list » (avant la recherche dans la banque de données, chapitre 2 – figure 21), l'algorithme Apex 3D regarde la résolution expérimentale des 100 peptides les plus intenses, et ajuste les paramètres de tolérance en fonction de la résolution moyenne observée. De façon générale, les tolérances appliquées sur les précurseurs et les fragments sont respectivement de 6-8 et 12-15 ppm.
- Dans un deuxième temps, les peptides identifiés dans PLGS sont importés dans DynamX, filtrés, puis leur taux d'incorporation en deutérium est déterminé. De manière à augmenter la validité des peptides identifiés, le logiciel DynamX écarte automatiquement les ions faisant référence à des adduits, des pertes de neutres ou des fragmentations en source. Ensuite, il est possible d'ajouter certains autres filtres de manière à augmenter l'exactitude de l'identification. Dès lors, **pour un triplicat d'analyse**, nous avons établi qu'**un peptide devait être identifié dans les trois réplicats** d'analyse. De plus, nous avons appliqué un autre filtre basé sur le nombre de fragments conduisant à une identification. Plutôt que de fixer un nombre minimum de fragments par peptide, ne prenant donc pas en compte la taille de ce dernier, **nous avons établi un nombre de fragments minimum rapportés par acide aminé à 0.3** [29]. Ainsi, un peptide composé de 10 acides aminés devra être identifié avec un minimum de 3 fragments pour être conservé ; les peptides identifiés avec trop peu de fragments ne seront alors pas considérés. Ces paramètres sont assez stringents, cependant ils permettent d'avoir une bonne confiance quant aux peptides validés [29].

## 4. Mise en place d'un test de performance

Afin d'évaluer la fonctionnalité du système nous avons suivi plusieurs critères afin de mettre en place un test de performance. Pour ce faire, avant chaque campagne HDX-MS (chaque projet) nous avons injecté une protéine modèle : la phosphorylase B. Cette dernière a été digérée en ligne sur cartouche de pepsine, et analysées par LC-MS<sup>E</sup>.

### 4.1. Conditions d'analyse de la phosphorylase B

Les différents suivis sont réalisés sur la base d'un triplicat d'injection de 80 pmoles de phosphorylase B. Pour l'établissement de la carte peptidique, l'échantillon stock est dilué au 1/20<sup>ème</sup> avec un tampon d'équilibration (10 mM phosphate, pH 7.0, H<sub>2</sub>O), puis dilué volume à volume avec le tampon de « quench » (100 mM phosphate, 2 M Guanidine HCl, 0.1 M TCEP, pH 2.5). L'étape de « quench » dure ici 30 sec et l'échantillon est injecté, puis digéré sur cartouche de pepsine à un débit de 200 µL/min pendant 3 minutes. Les peptides piégés sur la pré-colonne sont ensuite séquencés par LC-MS<sup>E</sup> avec une rampe d'énergie de 15 à 40 eV.

Les peptides identifiés dans PLGS sont ensuite filtrés dans DynamX, avec un nombre minimum de fragments par acide aminé de 0.3 et une identification dans les 3 réplicats.

Concernant les expériences de suivis de la deutération, la dilution de l'échantillon au 1/20<sup>ème</sup> est réalisée avec un tampon de marquage (10 mM phosphate, pD 6.6, D<sub>2</sub>O)

### 4.2. Suivi du taux de recouvrement

L'évaluation du taux de recouvrement de la phosphorylase B a constitué un axe prépondérant pour la vérification de l'état de fonctionnement du système. Des réplicats d'analyses nous ont permis de construire un graphique représentant la couverture de séquence en fonction de chaque début de campagne (figure 31).

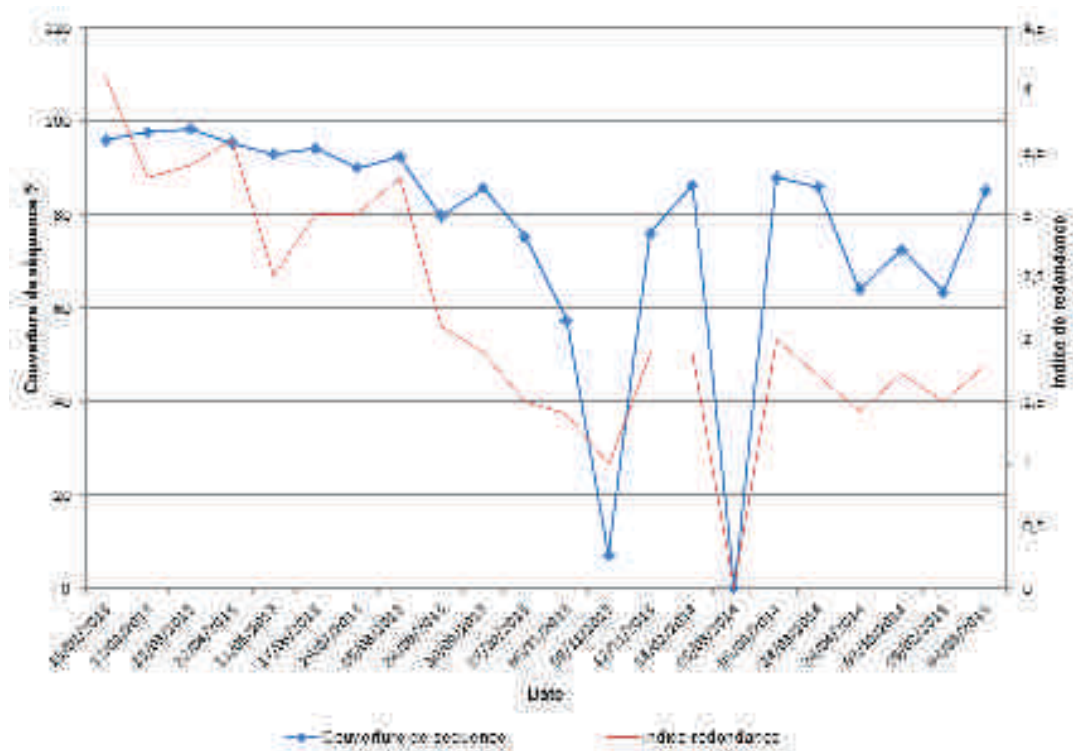


Figure 31. Suivi de la couverture de séquence obtenue sur la phosphorylase B. Le suivi est réalisé sur la base d'une injection de 80 pmoles, digérées en ligne sur cartouche de pepsine et analysées par LC-MS<sup>E</sup>.

Si le taux de recouvrement est largement supérieur à 90% pour les premiers tests, ce dernier a tendance à décroître avec le temps, pouvant être associé à une certaine perte d'efficacité de digestion de la pepsine immobilisée. Nous pouvons noter deux importantes chutes en termes de couverture de séquence qui sont à mettre en corrélation avec des problèmes d'ordre technique. La première chute du taux de recouvrement était due au joint défectueux d'un piston d'une seringue, et la quantité de protéine indiquée n'a pas correctement été prélevée. Le deuxième problème technique était à mettre en relation avec une pré-colonne en fin de vie n'assurant plus le piégeage des peptides. Toutefois, si le suivi de la couverture de séquence est une bonne indication, l'observation d'un problème à ce niveau-là ne permet pas d'en déterminer l'origine de façon certaine : baisse de l'activité enzymatique, perte de peptides au niveau chromatographique ou problème de sensibilité au niveau du spectromètre de masse. Toutefois, à partir de ces observations, nous avons estimé qu'une couverture de séquence de l'ordre de 70% permettait d'avoir une certaine confiance en la fonctionnalité du système.

### 4.3. Suivi de la reproductibilité des chromatogrammes

L'évaluation des performances chromatographiques a aussi été considérée comme un aspect important, et spécialement la reproductibilité. Dès lors, nous avons pu constater la robustesse du système chromatographique, notamment par simple vérification visuelle de la superposition de plusieurs chromatogrammes (figure 32).

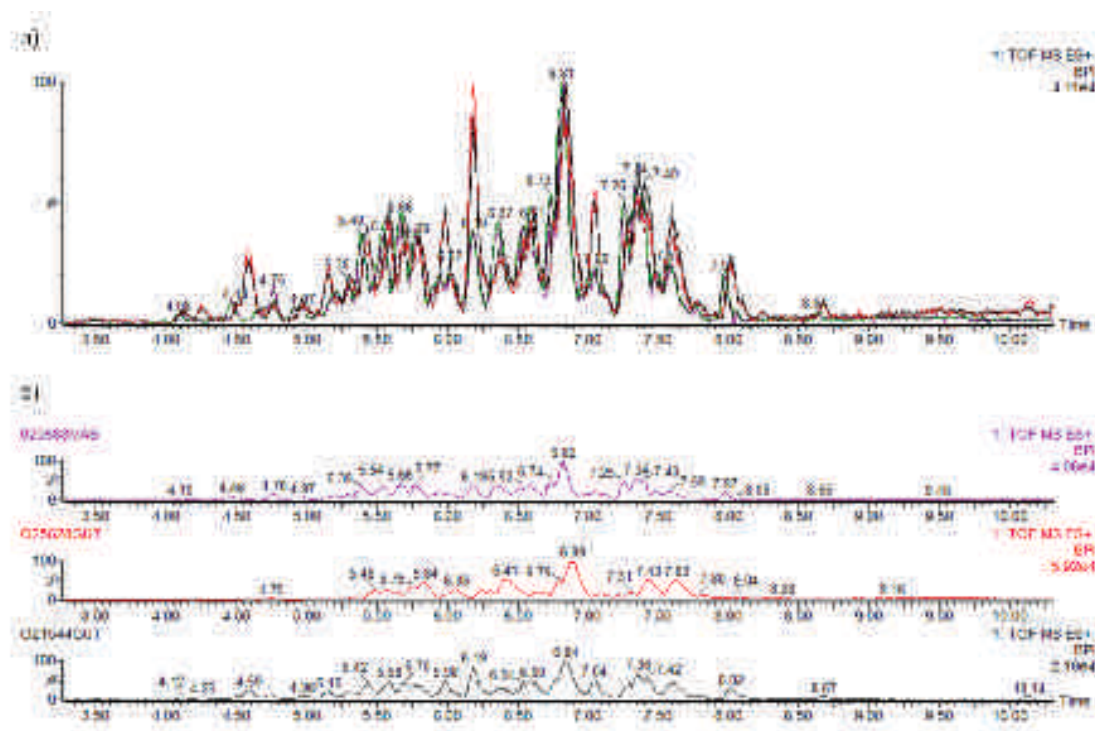


Figure 32. Suivi de la reproductibilité des chromatogrammes. Une superposition de 12 chromatogrammes est présentée sur le panel (a). Le panel (b) montre 3 chromatogrammes obtenus pour des campagnes de tests différentes avec leur intensité associée.

Si l'intensité de certains pics diffère selon l'analyse, les profils chromatographiques en termes de temps de rétention sont très similaires. De plus, l'intensité des courants d'ions associés permet d'appréhender l'état de sensibilité du système, toutefois à ce niveau nous avons opté pour la vérification de l'intensité de la « lock-mass ». L'infusion en parallèle de GFP, sans étape chromatographique, permet de renseigner directement de l'état de « propreté » du spectromètre de masse. Ainsi, une intensité du BPI supérieure à  $1.10^4$  pour un scan, permet de valider une sensibilité suffisante du spectromètre de masse.

#### 4.4. Suivi de la reproductibilité des temps de rétention et capacité de séparation

Afin d'obtenir des informations plus qualitatives qu'une simple observation d'un profil chromatographique, nous avons choisi de suivre les temps de rétention de 3 peptides spécifiques issus de la digestion de la phosphorylase B:

- Peptide 1 : YKNPRE
- Peptide 2 : EFYMGRTLQNTM
- Peptide 3 : AMPYDTPVPGYRNNVVNT

Nous avons choisi des peptides présentant des longueurs et caractère d'hydrophobicité différents, de manière à être le plus représentatif possible de l'ensemble des peptides générés. Ainsi nous avons suivi leur temps de rétention pour chaque réplicat en fonction des campagnes de tests (figure 33).

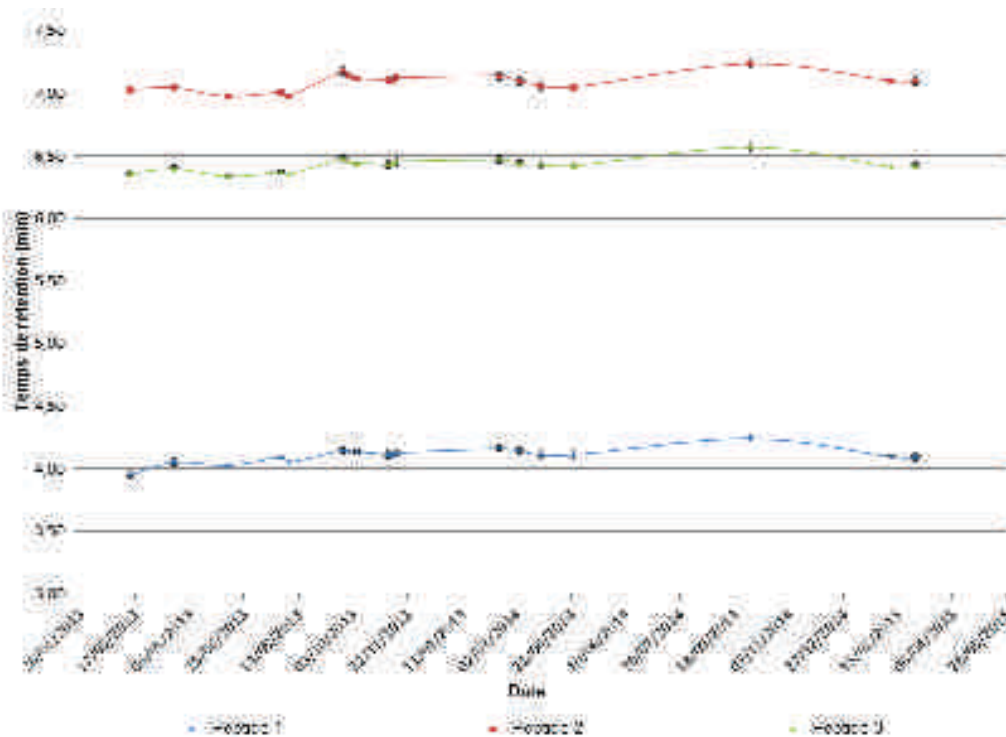


Figure 33. Suivi du temps de rétention moyen des 3 peptides spécifiques. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat d'analyse ; les écarts-types sont représentés sur le graphique. Les temps de rétention au sein d'un triplicat, et pour un peptide donné varient au plus de 5 secondes.

Nous pouvons observer ici une bonne linéarité en termes de temps de rétention ; les coefficients de variations des peptides 1, 2 et 3 sont respectivement de 1.3, 1.1 et 0.7%.



Certaines fluctuations sont observées, cependant elles s'opèrent de façon symétrique à chaque peptide, et sont dues pour certaines à un changement de colonne chromatographique.

Si la reproductibilité des temps de rétention est avérée, nous avons aussi étudié les temps de séparation de ces peptides (tableau 7). Les écarts moyens des temps de rétention entre le peptide 1 et 3, puis 3 et 2 sont respectivement de 2.30 et 0.66 minutes ; et les différences minimales respectivement de 2.15 et 0.50 minutes.

Peptides	Temps de rétention (min)	
	$\Delta$ moyen	$\Delta$ minimum
1 et 3	2.30	2.15
3 et 2	0.66	0.50

Tableau 7. Ecart moyen et minimum des temps de rétention entre les peptides 1 et 3, puis 3 et 2. Ces valeurs sont basées sur l'ensemble des triplicats d'injection réalisés sur la phosphorylase B.

Ainsi pour la mise en place du test de performance, et valider la capacité de séparation de la colonne chromatographique, nous avons établi une différence minimale de temps de rétention à observer entre les peptides 1 et 3, puis 3 et 2. Basées sur l'observation des écarts de temps de rétention minimum, ainsi que sur une variabilité supplémentaire de 0.1 min (6 sec), ces valeurs ont été respectivement fixées à 2.05 et 0.40 min.

#### 4.5. Suivi du taux de deutération

Nous avons aussi envisagé de suivre le taux d'incorporation en deutérium sur ces 3 mêmes peptides. Dans cette optique nous avons dilué la phosphorylase B dans de l'eau deutérée (facteur 1/20<sup>ème</sup>) pour une durée de 30 minutes. Ensuite nous avons déterminé la différence de masse moyenne entre les centroides des peptides non marqués et ceux des peptides marqués, de manière à suivre ce taux de marquage en fonction des tests d'évaluation (figure 34).



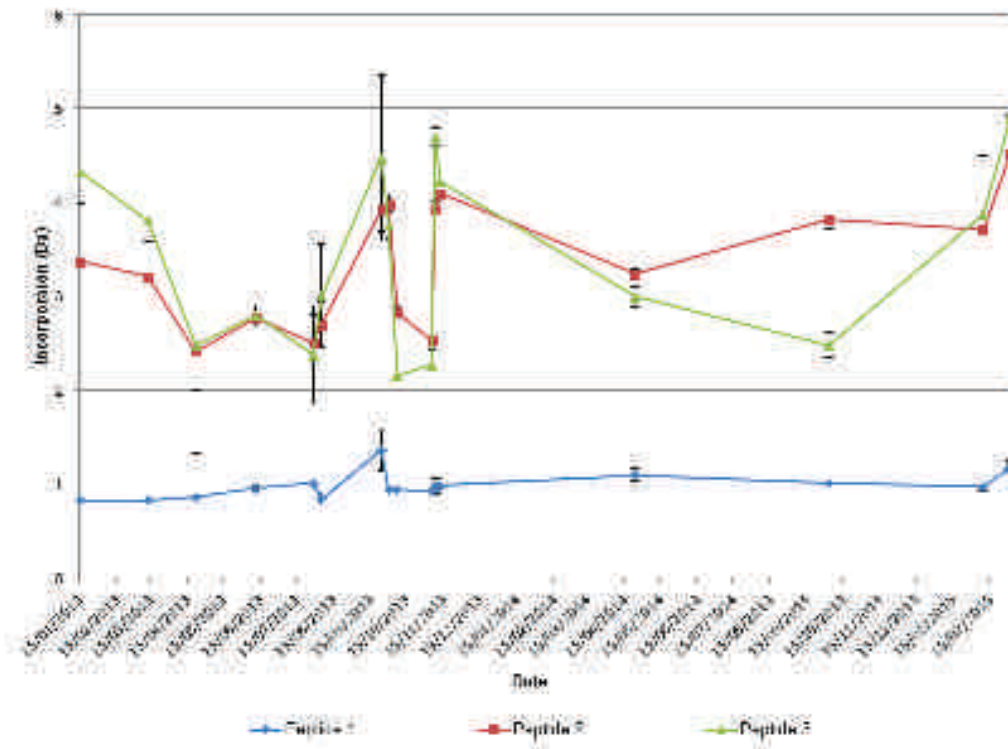


Figure 34. Suivi du taux de deutération moyen des 3 peptides spécifiques pour une incubation de 30 minutes avec du deutérium. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat d'analyse ; les écart-types sont représentés sur le graphique.

Si l'incorporation de masse pour le peptide 1 est relativement bien centrée sur 1 Da, nous pouvons remarquer une assez grande variabilité notamment inter-campagnes pour les peptides 2 et 3. Ces différences peuvent être dues à un taux de ré-échange variable en fonction du peptide et de la campagne de test. Suite à ces observations, ainsi qu'à notre approche comparative dans nos projets (et non absolue), nous avons choisi de ne pas définir un taux d'incorporation donné en deutérium, pour nos tests de performance.

#### 4.6. Evaluation de la pression du système

Un autre paramètre peut contribuer à évaluer la fonctionnalité du système : la contre pression générée en sortie de la colonne chromatographique. Si cette valeur n'a pas été consignée comme les paramètres précédents, une observation régulière de cette valeur a permis de la corrélérer avec l'état de la pré-colonne et colonne analytique. Ainsi de façon générale, en tout début de gradient nous pouvons relever une valeur de pression comprise entre 6900 et 7300 psi pour un système fonctionnel. Si cette pression dépasse les 7500 psi pour 98% de solvant A (H<sub>2</sub>O, HCOOH 0.1%), cela peut indiquer que la pré-colonne et/ou la colonne analytique sont

en fin de vie. De plus, si le fait de connecter le capillaire de sortie de colonne chromatographique à la canne électrospray engendre un gain de pression supérieur à 100 psi, cela peut être signe d'un bouchage au niveau du capillaire ESI. Ceci est notamment dû à la cristallisation de sels qui ne sont pas éliminés durant l'étape de dessalage/concentration des peptides.

## 5. Conclusions

Au travers de ce chapitre, nous avons pu constater que les étapes d'optimisations sont primordiales dans le cadre d'expériences HDX-MS, notamment en terme de conditions expérimentales et préparation d'échantillon comme la **quantité de matériel** injectée, la **nature du tampon de « quench »**, la **nature de l'enzyme** utilisée ou le **débit de passage sur la cartouche**.

De plus, à travers le suivi de plusieurs paramètres sur la phosphorylase B, nous avons mis en place un test de performance. Ce dernier permet de vérifier la fonctionnalité du système avant chaque campagne d'analyse HDX-MS. Ce tests est basé sur :

- La **sensibilité du système** : l'intensité sur un scan MS de la GFP à 200 fmol/μL doit être supérieure à  $1.10^4$ .
- La **capacité de séparation chromatographique** : pour le gradient utilisé, les temps de rétention moyens du peptide 1 et 3 doivent être séparés d'au moins 2.05 min et ceux des peptides 3 et 2 au minimum de 0.4 min.
- et l'**obtention d'une couverture de séquence minimale de 70%**.



## *Conclusion de cette partie*

Cette seconde partie focalisée sur l'approche HDX-MS a permis de donner une vue d'ensemble de son principe, de ses applications et paramètres clés à optimiser pour des analyses de ce type.

Si la première étude structurale par échange H/D date du début des années 1950, ce sont les développements instrumentaux, méthodologiques et bio-informatiques y ayant succédé, qui expliquent l'essor considérable de cette approche depuis une dizaine d'années. Bien que cette technique ne prétende pas atteindre les mêmes résolutions que la cristallographie ou la RMN, elle permet d'accéder à de nombreuses informations (zone d'interaction, changement conformationnel), dans un ordre dynamique, pour des analytes très variés (complexes protéine-protéine, protéine-ligand, protéines membranaires,...).

L'évaluation du système installé au laboratoire, a notamment permis de montrer l'importance et la diversité des paramètres à optimiser, de manière à obtenir un taux de recouvrement de séquence le plus complet possible. D'un point de vue expérimental, nous retiendrons principalement la quantité de matériel injectée, la nature du tampon de « quench », et le débit de passage sur la cartouche de digestion, avec en parallèle une maîtrise de la température et du pH. Si cette approche connaît aujourd'hui un essor notable, c'est aussi en grande partie dû aux développements d'outils bio-informatiques spécialisés. En effet, des logiciels comme DynamX, permettent d'automatiser la validation et le calcul du taux de deutération des peptides analysés.

Enfin, les différentes expériences et optimisations réalisées sur notre dispositif ont abouties à l'établissement d'un test de performance, permettant de s'assurer de la fonctionnalité du système avant campagne d'analyse.

## Références bibliographiques

1. Hvidt, A. and K. Linderstrøm-Lang, *Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions*. *Biochimica et biophysica acta*, 1954. **14**: p. 574-575.
2. Rosa, J.J. and F.M. Richards, *An experimental procedure for increasing the structural resolution of chemical hydrogen-exchange measurements on proteins: application to ribonuclease S peptide*. *Journal of Molecular Biology*, 1979. **133**(3): p. 399-416.
3. 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.
4. Zhang, Z. and D.L. Smith, *Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation*. *Protein Science*, 1993. **2**(4): p. 522-531.
5. Johnson, R.S. and K.A. Walsh, *Mass spectrometric measurement of protein amide hydrogen exchange rates of apo-and holo-myoglobin*. *Protein Science*, 1994. **3**(12): p. 2411-2418.
6. Wales, T.E., et al., *High-speed and high-resolution UPLC separation at zero degrees Celsius*. *Analytical chemistry*, 2008. **80**(17): p. 6815-6820.
7. Iacob, R.E. and J.R. Engen, *Hydrogen exchange mass spectrometry: are we out of the quicksand?* *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2012. **23**(6): p. 1003-1010.
8. ExSAR, [http://fr.slideshare.net/Chrom\\_Solutions/biopharmfocusonhdxappswebinar](http://fr.slideshare.net/Chrom_Solutions/biopharmfocusonhdxappswebinar).
9. Bai, Y., et al., *Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1993. **17**(1): p. 75-86.
10. Hilser, V.J. and E. Freire, *Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. Correlation with hydrogen exchange protection factors*. *Journal of Molecular Biology*, 1996. **262**(5): p. 756-772.
11. John R. Engen, D.L.S., *A powerful new approach that goes*. *Analytical Chemistry*, 2001: p. 2001.
12. Resing, K.A. and N.G. Ahn, *Applications of mass spectrometry to signal transduction*. *Progress in biophysics and molecular biology*, 1999. **71**(3): p. 501-523.
13. Astorga-Wells, J., et al., *A membrane cell for on-line hydrogen/deuterium exchange to study protein folding and protein-protein interactions by mass spectrometry*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011. **10**(9): p. M110. 006510.
14. Deng, Y., Z. Zhang, and D.L. Smith, *Comparison of continuous and pulsed labeling amide hydrogen exchange/mass spectrometry for studies of protein dynamics*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1999. **10**(8): p. 675-684.
15. Engen, J.R. and T.E. Wales, *Analytical aspects of hydrogen exchange mass spectrometry*. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015. **8**: p. 127-148.
16. Wei, H., et al., *Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications*. *Drug discovery today*, 2014. **19**(1): p. 95-102.
17. Zhang, Y.H., et al., *Conformational analysis of intermediates involved in the in vitro folding pathways of recombinant human macrophage colony stimulating factor  $\beta$  by sulfhydryl group trapping and hydrogen/deuterium pulsed labeling*. *Biochemistry*, 2002. **41**(52): p. 15495-15504.

18. Zhang, Y., et al., *Pulsed hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry probes conformational changes in amyloid beta (A $\beta$ ) peptide aggregation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(36): p. 14604-14609.
19. Miller, D.W. and K.A. Dill, *A statistical mechanical model for hydrogen exchange in globular proteins*. Protein Science, 1995. **4**(9): p. 1860-1873.
20. Li, R. and C. Woodward, *The hydrogen exchange core and protein folding*. Protein Science, 1999. **8**(08): p. 1571-1590.
21. Bai, Y., et al., *Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange*. Science, 1995. **269**(5221): p. 192-197.
22. Bereszczak, J.Z., et al., *Assessment of differences in the conformational flexibility of hepatitis B virus core-antigen and e-antigen by hydrogen deuterium exchange-mass spectrometry*. Protein Science, 2014. **23**(7): p. 884-896.
23. Weis, D.D., et al., *Identification and characterization of EX1 kinetics in H/D exchange mass spectrometry by peak width analysis*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(11): p. 1498-1509.
24. Duc, N.M., et al., *Effective application of bicelles for conformational analysis of G protein-coupled receptors by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2015. **26**(5): p. 808-817.
25. Paslawski, W., et al., *Co-existence of Two Different  $\alpha$ -Synuclein Oligomers with Different Core Structures Determined by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(29): p. 7560-7563.
26. Fang, J., et al., *False EX1 signatures caused by sample carryover during HX MS analyses*. International journal of mass spectrometry, 2011. **302**(1): p. 19-25.
27. Wales, T.E. and J.R. Engen, *Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics*. Mass spectrometry reviews, 2006. **25**(1): p. 158-170.
28. Zhang, Z., C.B. Post, and D.L. Smith, *Amide hydrogen exchange determined by mass spectrometry: application to rabbit muscle aldolase*. Biochemistry, 1996. **35**(3): p. 779-791.
29. Ahn, J., et al., *Assessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2013. **1834**(6): p. 1222-1229.
30. Garcia, R.A., D. Pantazatos, and F.J. Villarreal, *Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for investigating protein-ligand interactions*. Assay and drug development technologies, 2004. **2**(1): p. 81-91.
31. Hamuro, Y., et al., *Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(7): p. 1041-1046.
32. Cravello, L., D. Lascoux, and E. Forest, *Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(21): p. 2387-2393.
33. Englander, J.J., et al., *Protein structure change studied by hydrogen-deuterium exchange, functional labeling, and mass spectrometry*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(12): p. 7057-7062.
34. Zhang, H.-M., et al., *Enhanced digestion efficiency, peptide ionization efficiency, and sequence resolution for protein hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2008. **80**(23): p. 9034-9041.



35. Rey, M., et al., *Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(21): p. 3431-3438.
36. Marcoux, J., et al., *Investigating alternative acidic proteases for H/D exchange coupled to mass spectrometry: plasmepsin 2 but not plasmepsin 4 is active under quenching conditions*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(1): p. 76-79.
37. Brier, S., et al., *Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii**. FEBS journal, 2007. **274**(23): p. 6152-6166.
38. Rey, M., et al., *Nepenthesin from monkey cups for hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics, 2013. **12**(2): p. 464-472.
39. Kadek, A., et al., *Aspartic protease nepenthesin-1 as a tool for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2014. **86**(9): p. 4287-4294.
40. Yang, M., et al., *Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2015. **87**(13): p. 6681-6687.
41. Ahn, J., et al., *Pepsin immobilized on high-strength hybrid particles for continuous flow online digestion at 10 000 psi*. Analytical chemistry, 2012. **84**(16): p. 7256-7262.
42. Fang J, Q.Y.Y., Lawler R, Fadgen K, Eggertson M, Chakraborty A, Chen W, [http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/hdx\\_high\\_pressure\\_hos\\_2015.pdf](http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/hdx_high_pressure_hos_2015.pdf). ASMS conference, 2015.
43. Woods Jr, V.L., *Methods for the high-resolution identification of solvent-accessible amide hydrogens in polypeptides or proteins and for characterization of the fine structure of protein binding sites*. 2001, Google Patents.
44. Yan, X., et al., *Hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometric analysis of a protein containing multiple disulfide bonds: Solution structure of recombinant macrophage colony stimulating factor-beta (*rhM-CSFβ*)*. Protein Science, 2002. **11**(9): p. 2113-2124.
45. Hamuro, Y., et al., *Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Journal of biomolecular techniques: JBT, 2003. **14**(3): p. 171.
46. Houde, D., et al., *Characterization of IgG1 conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2009. **81**(7): p. 2644-2651.
47. Zhang, H.-M., et al., *Simultaneous reduction and digestion of proteins with disulfide bonds for hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2010. **82**(4): p. 1450-1454.
48. Trabjerg, E., et al., *Conformational analysis of large and highly disulfide-stabilized proteins by integrating online electrochemical reduction into an optimized H/D exchange mass spectrometry workflow*. Analytical chemistry, 2015. **87**(17): p. 8880-8888.
49. Rand, K.D. and T.J. Jørgensen, *Development of a peptide probe for the occurrence of hydrogen (1H/2H) scrambling upon gas-phase fragmentation*. Analytical chemistry, 2007. **79**(22): p. 8686-8693.
50. Rand, K.D., et al., *Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(4): p. 1341-1349.
51. Zehl, M., et al., *Electron transfer dissociation facilitates the measurement of deuterium incorporation into selectively labeled peptides with single residue*

- resolution*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(51): p. 17453-17459.
52. Rand, K.D., et al., *Protein hydrogen exchange measured at single-residue resolution by electron transfer dissociation mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2009. **81**(14): p. 5577-5584.
  53. Rand, K.D., et al., *ETD in a traveling wave ion guide at tuned Z-spray ion source conditions allows for site-specific hydrogen/deuterium exchange measurements*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011. **22**(10): p. 1784-1793.
  54. Huang, R.Y., et al., *Hydrogen/deuterium exchange and electron-transfer dissociation mass spectrometry determine the interface and dynamics of apolipoprotein E oligomerization*. Biochemistry, 2011. **50**(43): p. 9273-9282.
  55. Wu, Y., J.R. Engen, and W.B. Hobbins, *Ultra performance liquid chromatography (UPLC) further improves hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(2): p. 163-167.
  56. Engen, J., *HDX user meeting*, Waters. 2012.
  57. Pan, J., et al., *Subzero temperature chromatography and top-down mass spectrometry for protein higher-order structure characterization: method validation and application to therapeutic antibodies*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(37): p. 13065-13071.
  58. Pan, J., et al., *Fast Comparative Structural Characterization of Intact Therapeutic Antibodies Using Hydrogen–Deuterium Exchange and Electron Transfer Dissociation*. Analytical chemistry, 2015. **87**(12): p. 5884-5890.
  59. Venable, J.D., et al., *Subzero temperature chromatography for reduced back-exchange and improved dynamic range in amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2012. **84**(21): p. 9601-9608.
  60. Black, W.A., et al., *Utilizing Microchip Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization for Hydrogen Exchange Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2015. **87**(12): p. 6280-6287.
  61. Nazabal, A., et al., *Hydrogen/deuterium exchange on yeast ATPase supramolecular protein complex analyzed at high sensitivity by MALDI mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 471-481.
  62. Hsu, Y.-H. and J.A. Traugh, *Amide hydrogen/deuterium exchange & MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Pak2 activation*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2011(57): p. e3602-e3602.
  63. Rand, K.D., et al., *Spatially resolved protein hydrogen exchange measured by matrix-assisted laser desorption ionization in-source decay*. Analytical chemistry, 2011. **83**(23): p. 8859-8862.
  64. Iacob, R.E., J.P. Murphy, and J.R. Engen, *Ion mobility adds an additional dimension to mass spectrometric analysis of solution-phase hydrogen/deuterium exchange*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(18): p. 2898-2904.
  65. Wales, T., et al., *Validation of an ion mobility hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry system*. Journal of biomolecular techniques: JBT, 2011. **22**(Suppl): p. S63.
  66. Donohoe, G.C., J.R. Arndt, and S.J. Valentine, *Online Deuterium Hydrogen Exchange and Protein Digestion Coupled with Ion Mobility Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2015. **87**(10): p. 5247-5254.
  67. Campobasso, N. and D. Huddler, *Hydrogen deuterium mass spectrometry in drug discovery*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2015. **25**(18): p. 3771-3776.



68. Kavan, D. and P. Man, *MSTools—Web based application for visualization and presentation of HXMS data*. International journal of mass spectrometry, 2011. **302**(1): p. 53-58.
69. Palmblad, M., J. Buijs, and P. Håkansson, *Automatic analysis of hydrogen/deuterium exchange mass spectra of peptides and proteins using calculations of isotopic distributions*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001. **12**(11): p. 1153-1162.
70. Woods, V.L. and Y. Hamuro, *High resolution, high-throughput amide deuterium exchange-mass spectrometry (DXMS) determination of protein binding site structure and dynamics: Utility in pharmaceutical design*. Journal of Cellular Biochemistry, 2001. **84**(S37): p. 89-98.
71. Weis, D.D., J.R. Engen, and I.J. Kass, *Semi-automated data processing of hydrogen exchange mass spectra using HX-Express*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(12): p. 1700-1703.
72. Pascal, B.D., et al., *HDX workbench: software for the analysis of H/D exchange MS data*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(9): p. 1512-1521.
73. Lindner, R., et al., *Hexicon 2: automated processing of hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry data with improved deuteration distribution estimation*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014. **25**(6): p. 1018-1028.
74. Pan, J. and C.H. Borchers, *Top-down mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange for comprehensive structural characterization of interferons: Implications for biosimilars*. Proteomics, 2014. **14**(10): p. 1249-1258.
75. Petrotchenko, E.V. and C.H. Borchers, *HDX Match Software for the Data Analysis of Top-Down ECD-FTMS Hydrogen/Deuterium Exchange Experiments*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2015. **26**(11): p. 1895-1898.
76. Rajabi, K., A.E. Ashcroft, and S.E. Radford, *Mass spectrometric methods to analyze the structural organization of macromolecular complexes*. Methods, 2015. **89**: p. 13-21.
77. 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.
78. Beeston, H.S., et al., *Changes in protein structure monitored by use of gas-phase hydrogen/deuterium exchange*. Proteomics, 2015. **15**(16): p. 2842-2850.
79. Mistarz, U.H., et al., *Probing the Binding Interfaces of Protein Complexes Using Gas-Phase H/D Exchange Mass Spectrometry*. Structure, 2015.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Hodkinson, J.P., S.E. Radford, and A.E. Ashcroft, *The role of conformational flexibility in  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril formation at neutral pH*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012. **26**(16): p. 1783-1792.

84. Mysling, S., et al., *Characterizing the dynamics of  $\alpha$ -synuclein oligomers using hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry*. *Biochemistry*, 2013. **52**(51): p. 9097-9103.
85. Kirschke, E., et al., *Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles*. *Cell*, 2014. **157**(7): p. 1685-1697.
86. Georgescauld, F., et al., *GroEL/ES chaperonin modulates the mechanism and accelerates the rate of TIM-barrel domain folding*. *Cell*, 2014. **157**(4): p. 922-934.
87. Lee, C.-T., et al., *Light-induced differences in conformational dynamics of the circadian clock regulator VIVID*. *Journal of Molecular Biology*, 2014. **426**(3): p. 601-610.
88. Xu, X., et al., *Unique domain appended to vertebrate tRNA synthetase is essential for vascular development*. *Nature communications*, 2012. **3**: p. 681.
89. Lee, Y., et al., *Promotion of enzyme flexibility by dephosphorylation and coupling to the catalytic mechanism of a phosphohexomutase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(8): p. 4674-4682.
90. Rey, M., E. Forest, and L. Pelosi, *Exploring the conformational dynamics of the bovine ADP/ATP carrier in mitochondria*. *Biochemistry*, 2012. **51**(48): p. 9727-9735.
91. Mehmood, S., et al., *Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward-and outward-facing conformations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(27): p. 10832-10836.
92. Rey, M., et al., *Effective removal of nonionic detergents in protein mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange, and proteomics*. *Analytical chemistry*, 2010. **82**(12): p. 5107-5116.
93. Macakova, E., et al., *Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013. **1830**(10): p. 4491-4499.
94. Snijder, J., et al., *Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB–KaiC interaction*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(4): p. 1379-1384.
95. Trelle, M.B., et al., *Dissecting the effect of RNA aptamer binding on the dynamics of plasminogen activator inhibitor 1 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. *Acs Chemical Biology*, 2013. **9**(1): p. 174-182.
96. Malovichko, M.V., T.M. Sabo, and M.C. Maurer, *Ligand binding to anion-binding exosites regulates conformational properties of thrombin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. **288**(12): p. 8667-8678.
97. Zhang, J., et al., *Hydrogen/deuterium exchange reveals distinct agonist/partial agonist receptor dynamics within vitamin D receptor/retinoid X receptor heterodimer*. *Structure*, 2010. **18**(10): p. 1332-1341.
98. McCall, K.A., C.-c. Huang, and C.A. Fierke, *Function and mechanism of zinc metalloenzymes*. *The Journal of nutrition*, 2000. **130**(5): p. 1437S-1446S.
99. Dong, J., et al., *Identifying Zn-Bound Histidine Residues in Metalloproteins Using Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry*. *Analytical chemistry*, 2013. **86**(1): p. 766-773.
100. Rose, R.J., et al. *Mutation of Y407 in the CH3 domain dramatically alters glycosylation and structure of human IgG*. in *MAbs*. 2013: Taylor & Francis.
101. Beck, A., et al., *Characterization of therapeutic antibodies and related products*. *Analytical chemistry*, 2012. **85**(2): p. 715-736.
102. Valliere-Douglass, J.F., S.M. Hengel, and L.Y. Pan, *Approaches to interchain cysteine-linked ADC characterization by mass spectrometry*. *Molecular Pharmaceutics*, 2014. **12**(6): p. 1774-1783.

103. Beckley, N.S., et al., *Investigation into temperature-induced aggregation of an antibody drug conjugate*. Bioconjugate Chemistry, 2013. **24**(10): p. 1674-1683.
104. Visser, J., et al., *Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab*. BioDrugs, 2013. **27**(5): p. 495-507.
105. Beck, A., et al., *Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates*. Expert review of proteomics, 2016(just-accepted).
106. Wang, L., L.C. Lane, and D.L. Smith, *Detecting structural changes in viral capsids by hydrogen exchange and mass spectrometry*. Protein Science, 2001. **10**(6): p. 1234-1243.
107. Tuma, R., et al., *Hydrogen-deuterium exchange as a probe of folding and assembly in viral capsids*. Journal of Molecular Biology, 2001. **306**(3): p. 389-396.
108. Chalmers, M.J., et al., *Probing protein ligand interactions by automated hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2006. **78**(4): p. 1005-1014.
109. Majumdar, R., et al., *Minimizing carry-over in an online pepsin digestion system used for the H/D exchange mass spectrometric analysis of an IgG1 monoclonal antibody*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(12): p. 2140-2148.
110. 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.
111. 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.
112. Campana, J., *Elementary theory of the quadrupole mass filter*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, 1980. **33**(2): p. 101-117.
113. Mamyrin, B., et al., *The mass-reflectron. A new nonmagnetic time-of-flight high resolution mass-spectrometer*. 1973.
114. Atmanene, C., *Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectroétrie de masse supramoléculaire*. 2009.
115. Plumb, R.S., et al., *UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(13): p. 1989-1994.
116. Geromanos, S.J., et al., *The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS*. Proteomics, 2009. **9**(6): p. 1683-1695.
117. Waters.
118. Shliaha, P.V., et al., *Effects of traveling wave ion mobility separation on data independent acquisition in proteomics studies*. Journal of Proteome Research, 2013. **12**(6): p. 2323-2339.
119. Lennon, S., *Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et analyse protéomique pour la recherche de biomarqueurs de différents types de cancers*. 2014.
120. Li, G.Z., et al., *Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures*. Proteomics, 2009. **9**(6): p. 1696-1719.
121. Geromanos, S.J., et al., *Simulating and validating proteomics data and search results*. Proteomics, 2011. **11**(6): p. 1189-1211.

122. Wei, H., et al., *Using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry to study conformational changes in granulocyte colony stimulating factor upon PEGylation*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(3): p. 498-504.
123. *Applied biosystem* - [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041678.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_support/documents/generaldocuments/cms_041678.pdf).



***Partie 3 : Combinaison d'approches de MS native et HDX-MS pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques***



## ***Partie 3- Combinaison d'approches de MS native et HDX-MS pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques***

Cette partie porte sur la caractérisation d'anticorps thérapeutiques, leurs dérivés et complexes associés. Une première partie permettra d'introduire le rôle biologique, la structure de ce type de molécules, ainsi que les enjeux analytiques liés à leur caractérisation. Un premier chapitre sera axé sur l'évaluation de la MS native haute résolution pour la caractérisation d'anticorps conjugués ou « Antibody drug Conjugates » (ADC), au travers d'une étude comparative des deux anticorps conjugués aujourd'hui commercialisés sur deux spectromètres de masses à géométries et résolutions différentes (Q-TOF Synapt G2 HDMS, Waters vs. Orbitrap Exactive Plus EMR, ThermoFischer Scientific). Le second chapitre portera sur l'étude de complexes antigène/anticorps, et notamment la détermination d'épitopes par HDX-MS.

**Introduction : Les anticorps monoclonaux thérapeutiques et leurs dérivés : les défis analytiques.**

**Chapitre 1 : Caractérisation d'ADCs par MS native haute résolution.**

**Chapitre 2 : Combinaison d'outils de spectrométrie de masse structurale pour la caractérisation de complexes antigène/anticorps.**





## *Introduction : Les anticorps monoclonaux thérapeutiques et leurs dérivés : les défis analytiques.*

Les anticorps monoclonaux (mAbs) et autres produits associés constituent depuis quelques années une classe d'agents thérapeutiques en considérable essor [1-3]. Aujourd'hui plus de 50 anticorps et dérivés ont été approuvés par les agences réglementaires (EMA, FDA), et sont indiqués dans divers domaines comme la cancérologie, les maladies inflammatoires, les transplantations ou encore le traitement du cholestérol [4]. Ne serait-ce que ces 5 dernières années, 25 mAbs et dérivés ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) (tableau 1).

Nomenclature commerciale	Nomenclature internationale	Approbation	Isotype	Cible	Indication
Abthrax	raxibacumab	2012	IgG1	anthrax	Inhalation anthrax
Adcetris	brentuximab vedotin	2011	IgG1 – MMAE (ADC)	CD30	Lymphome de Hodgkin réfractaire
Alprolix	protéine de fusion facteur IX	2014	Fc	IGHG1	Hémophilie B
Benlysta	belimumab	2011	IgG1	BAFF	Lupus
Cosentyx	secukinumab	2015	IgG1	IL17a	Rhumathologie
Cyramza	ramucirumab	2014	IgG1	VEGFR-2	Cancers gastriques
Eloctate	protéine de fusion facteur VIII	2014	Fc	IGHG1	Hémophilie A
Entyvio	vedolizumab	2014	IgG1	$\alpha 4\beta 7$	Maladie de Crohn
Eylea	afibercept	2011	Fc	VEGF-A	Dégénérescence maculaire
Gazyva	obinutuzumab	2013	IgG1	CD20	Leucémie lymphocytaire chronique
Inflixtra	infliximab	2013	IgG1 (biosimilaire)	TNF $\alpha$	Polyarthrite rhumatoïde Maladie de Crohn
Kadcyla	ado-trastuzumab emtansine	2013	IgG1 – DM1 (ADC)	HER2	Cancer du sein métastatique
Keytruda	pembrolizumab	2014	IgG4	PD1	Mélanome métastatique
Lemtrada	alemtuzumab	2013	IgG1	CD52	Leucémie lymphocytaire chronique
Nulojix	belatacept	2011	Fc	CD80/86	Prévention rejet transplantation
Perjeta	pertuzumab	2012	IgG1	HER2	Cancer du sein
Praluent	alirocumab	2015	IgG1	PCSK9	Cholestérol
Prolia	denosumab	2011	IgG2	RANKL	Ostéoporose et métastases osseuses
Remsima	infliximab	2013	IgG1 (biosimilaire)	TNF $\alpha$	Polyarthrite rhumatoïde Maladie de Crohn
Repatha	evolocumab	2015	IgG2	PCSK9	Cholestérol
Sylvant	siltuximab	2014	IgG1	IL6	Cancer du rein, de la prostate
Unituxin	dinutuximab	2015	IgG1	GD2	Neuroblastomes
Xgeva	denosumab	2010	IgG2	RANKL	Ostéoporose et métastases osseuses
Yervoy	ipilimumab	2011	IgG1	CD152	Mélanome métastatique
Zaltrap	Ziv-aflibercept	2012	Fc	VEGF-A	Dégénérescence maculaire

Tableau 1. Anticorps monoclonaux et dérivés ayant reçu une AMM depuis 2010 (adapté à partir de [2]). Ils sont référencés selon leur nom commercial, international, avec leur année d'AMM. L'isotype du composé ainsi que leur cible et dans quelle pathologie ils sont indiqués sont aussi référencés.

## 1. Historique des anticorps monoclonaux (mAbs)

Bien que les anticorps thérapeutiques soient des composés relativement récents dans le domaine pharmaceutique, l'idée de l'immunologie comme traitement est assez ancienne. En effet, c'est en 1901 que Paul Ehrlich a pensé utiliser la grande spécificité des anticorps pour neutraliser un agent pathogène [5]. Ces travaux font suite à ceux d'Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato, qui en 1890, ont observé des **résistances spécifiques** lors d'inoculation de toxines particulières chez des cobayes ; la notion **d'immunité spécifique** voyait alors le jour [6]. Toutefois ce n'est qu'en 1975 que Georges Köhler et César Milstein ont réussi à mettre à profit cette idée, grâce à leur mise au point de la production des premiers anticorps murins via la technologie des hybridomes [7] (prix Nobel de médecine 1984). Muromonab fut le premier anticorps murin recevant une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis en 1986 afin de prévenir le rejet de transplantation d'organes, avant que n'apparaissent en 1989 les premiers anticorps monoclonaux humanisés.

Le succès thérapeutique des mAbs réside dans leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. Ils possèdent une grande spécificité et une très grande affinité, de l'ordre du nM voire du pM pour leur antigène (Ag). Ils possèdent une large gamme de mécanismes d'action (figure 1) :

- **Effets directs** : altération de la cascade de signalisation, inhibition de la fonction des récepteurs de facteurs de croissance et des molécules d'adhésion.
- **Fonctions effectrices** : « Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity » (**ADCC**) responsable du recrutement de cellules naturelles tueuses, et « Complement-Dependant Cytotoxicity » (**CDC**) responsable de l'activation d'un complexe d'attaque membranaire.

De plus, la toxicité intrinsèque des mAbs est faible car leur structure est similaire aux immunoglobulines (IgGs) endogènes, et ces derniers se trouvent métabolisés en acides aminés naturels.

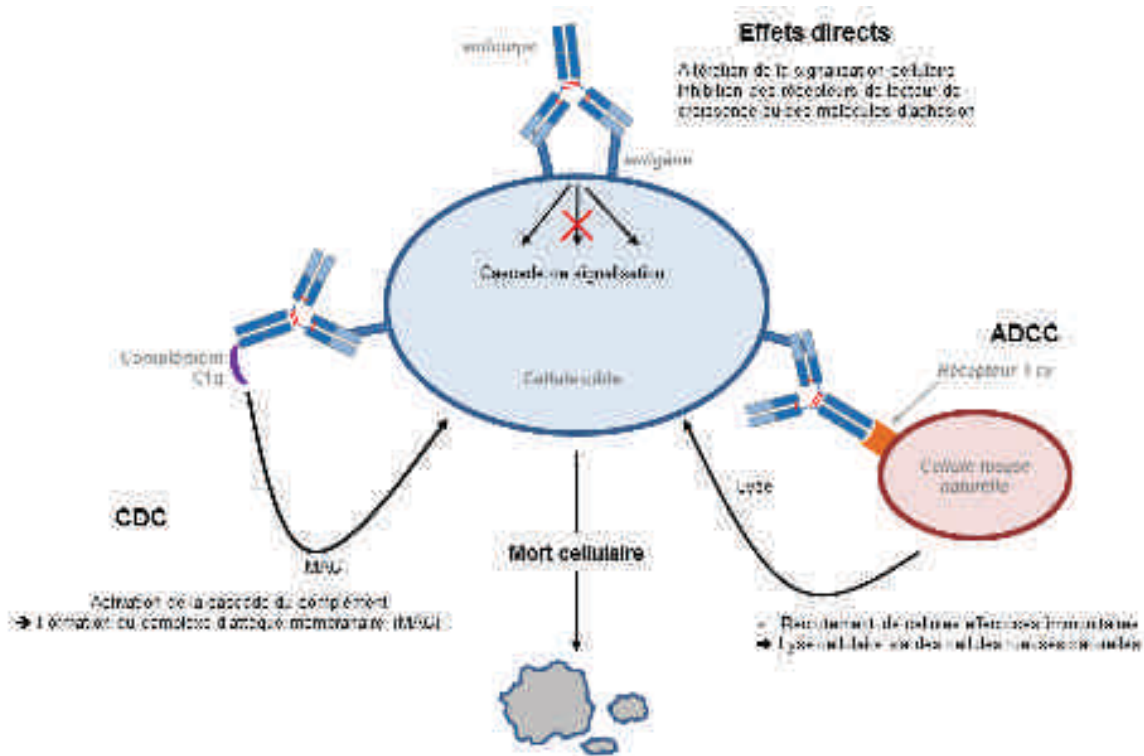


Figure 1. Représentation schématique des mécanismes d'action d'un mAb conduisant à la mort de cellule cible (adaptée à partir de [8, 9]).

## 2. Architecture des anticorps monoclonaux

Dans le système immunitaire humain, existent cinq types d'anticorps ou immunoglobulines (Ig), dont :

- Les IgG représentant 70 à 75% des anticorps présents dans l'organisme.
- Les IgA dans une proportion de 15 à 20%.
- Les IgM à hauteur d'environ 10%.
- Les IgE représentant moins de 1%.
- Et les IgD pour moins de 1%.

A l'heure actuelle, seul les IgGs ont reçu des autorisations de mise sur le marché. D'un point de vue structural, ces protéines de 150 kDa sont constituées de 2 chaînes lourdes (50 kDa) et 2 chaînes légères (25 kDa) identiques. Chaque chaîne légère (environ 220 acides aminés) est constituée d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL), alors que chaque chaîne lourde (environ 450 acides aminés) est formée d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) ainsi que d'une région charnière séparant les

domaines CH1 et CH2 (figure 2a). Chaines lourdes et légères sont reliées entre elles par des ponts disulfures dont le nombre et la connectivité diffèrent selon les isotypes (figure 3).

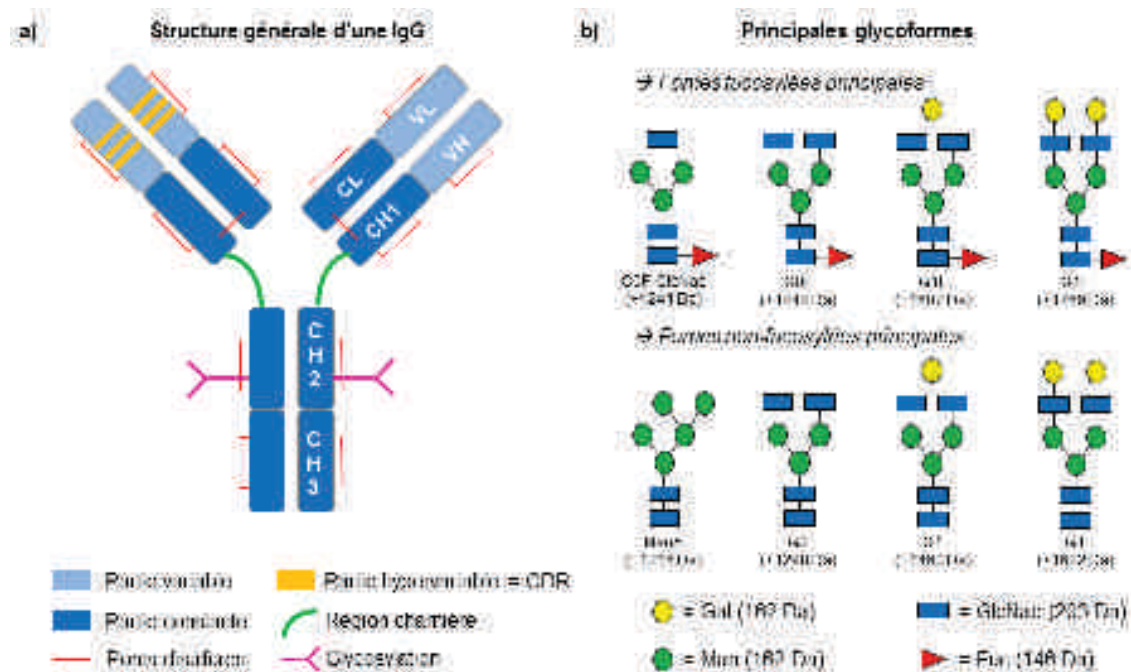


Figure 2. Représentation schématique de la structure générale d'un anticorps monoclonal (a) et des principales formes glycosylées associées (b).

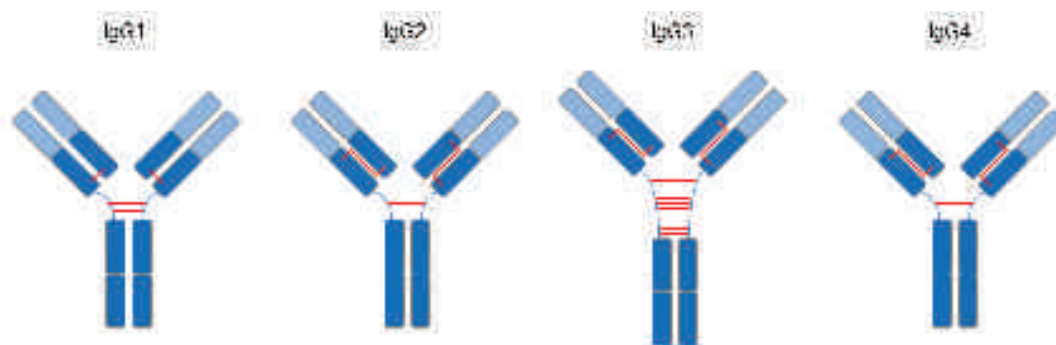


Figure 3. Représentation schématique des différents isotopes d'IgG et de l'arrangement des ponts disulfures inter-chaines (en rouge).

Les IgG3, caractérisées par une région charnière plus longue, ne sont pas utilisées à des fins thérapeutiques en raison de leur temps de demi-vie trop courte (environ 7 jours) comparé aux autres IgGs (environ 21 jours). Plus généralement, la technique des hybridomes permettant l'obtention d'anticorps murins a malgré tout montré des limites notamment en raison de réponse immunitaire anti-murine (HAMA), écourtant ainsi leur demi-vie. Les anticorps

chimériques et humanisés ont alors été introduits dans le but de diminuer cette immunogénicité (figure 4).

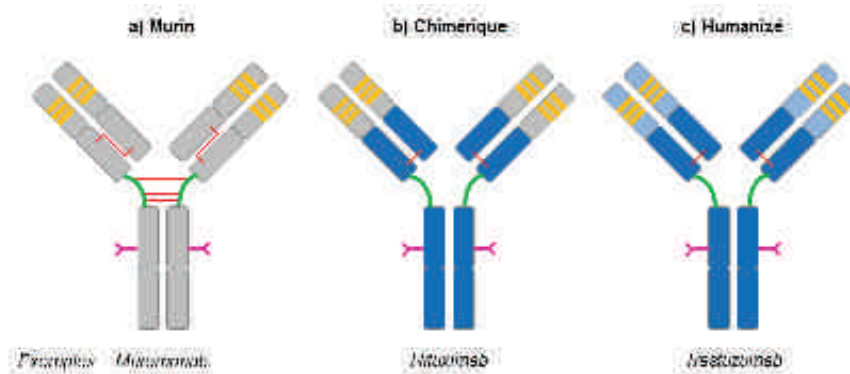


Figure 4. Processus d'humanisation des anticorps monoclonaux. Les anticorps murins (a) sur lesquels ont été greffées des parties constantes humaines ont permis de générer des anticorps chimériques (b). Les anticorps humanisés (c) sont le résultat du greffage de CDRs murins sur des anticorps humains.

D'un point de vue fonctionnel, deux domaines sont essentiels : les CDRs (*Complementary-Determining Regions*) situés dans les domaines variables qui sont responsables de la fixation de l'anticorps sur la cible antigénique, et la fraction cristallisable Fc responsable des fonctions effectrices comme la fixation du complément ou la liaison avec le récepteur. De plus, cette fraction porte un site de N-glycosylation (Asp 297), dont la nature peut varier au sein d'un même lot (figure 2b) et peut avoir une influence en terme d'efficacité clinique [10, 11].

### 3. Les « Antibody Drug Conjugates »

Les traitements utilisant les mAbs sont généralement couplés à la chimiothérapie (agent cytotoxique), et l'idée de greffer chimiquement un agent cytotoxique directement sur un anticorps a émergé rapidement (immunoconjugués ou ADC) [12] (figure 5).

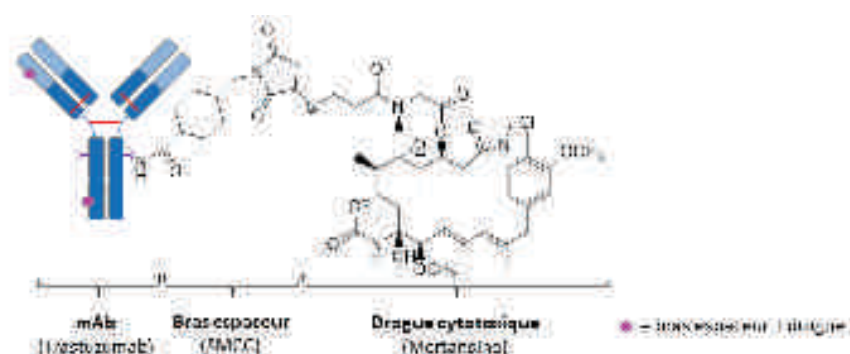


Figure 5. Représentation schématique de la construction d'un ADC : Anticorps monoclonal + bras espaceur (linker) + drogue cytotoxique (exemple du trastuzumab emtansine).



Le concept utilise les propriétés vectrices de l'anticorps (forte affinité et grande spécificité pour l'antigène) de manière à acheminer l'agent cytotoxique au sein d'une cellule tumorale après internalisation (figure 6) [13, 14], contribuant ainsi à la mort cellulaire [15, 16]. La première génération d'ADC a connu un échec du à l'instabilité de la bioconjugaison, à l'absence de libération de la drogue dans la cellule ou à la libération de forme inactive, ainsi qu'à une faible efficacité de drogues greffés [17], nécessitant un couplage trop nombreux de ces dernières [18]. Toutefois les améliorations apportées aux méthodes de conjugaison, des agents de liaison, ainsi que l'utilisation de composés hautement plus toxiques ont permis l'avènement d'une nouvelle génération d'ADCs. En 2000, le gemtuzumab ozogamicin (anti CD33, leucémie aigüe myéloïde) fut le premier ADC commercialisé, mais fut retiré du marché en 2010 à cause d'un effet thérapeutique limité et d'une toxicité trop importante [19]. Depuis deux autres ont reçu une AMM, à savoir le brentuximab vedotin en 2011 (anti CD30, lymphome de Hodgkin réfractaire) et le trastuzumab emtansine en 2013 (anti HER2, cancer du sein métastatique), et près de 60 sont en phases cliniques [20].

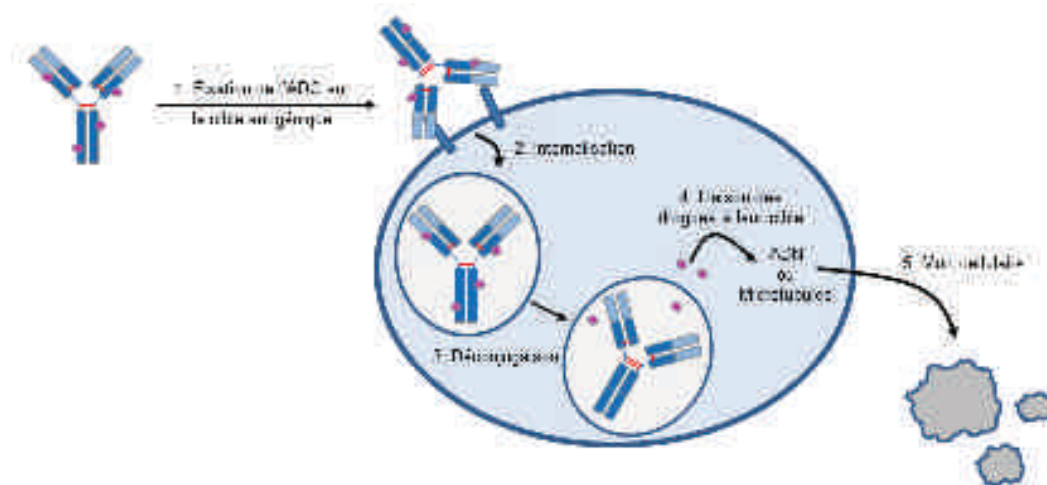


Figure 6. Mécanisme d'action d'un ADC, d'après [16]. Après reconnaissance de la cible antigénique associée à une tumeur par les régions CDRs de l'anticorps, l'ADC se trouve internalisé par endocytose. Ensuite une coupure du bras espaceur (linker) reliant la drogue à l'anticorps se produit, et les composés cytotoxiques se retrouvent sous une forme libre et active. Ces derniers vont ensuite se fixer à l'ADN ou aux microtubules entraînant ainsi la lyse cellulaire.

Si le concept global de ces deux ADCs aujourd'hui commercialisés est équivalent (mAb relié à une drogue cytotoxique via un linker), il n'en demeure pas moins que ces derniers ont des stratégies de greffage totalement différentes et que les structures des produits conjugués sont assez différentes (figure 7 et 8).

### 3.1. Le brentuximab vedotin

Concernant le brentuximab vedotin (figure 7a) [21], la stratégie chimique de greffage consiste dans un premier temps à réduire de façon contrôlée les ponts disulfures inter-chaines, ainsi les cystéines en question se trouvent sous une forme thiol libre. Celles-ci pourront donc réagir avec les fonctions maléimides portées par les linkers (peptide valine-citrulline), les drogues cytotoxiques (auristatin E) ayant été préalablement liées à ces derniers. L'anticorps de base de cet ADC étant une IgG1, 4 ponts disulfures se retrouvent en position d'être réduits, générant ainsi la possibilité de greffer 0, 2, 4, 6 ou 8 drogues (« Drug number » ou Dn, avec  $n = 0, 2, 4, 6$  et  $8$ ). Cette stratégie de synthèse génère ainsi un mélange potentiel de 12 composés avec des espèces covalentes et non-covalentes (figure 7b).

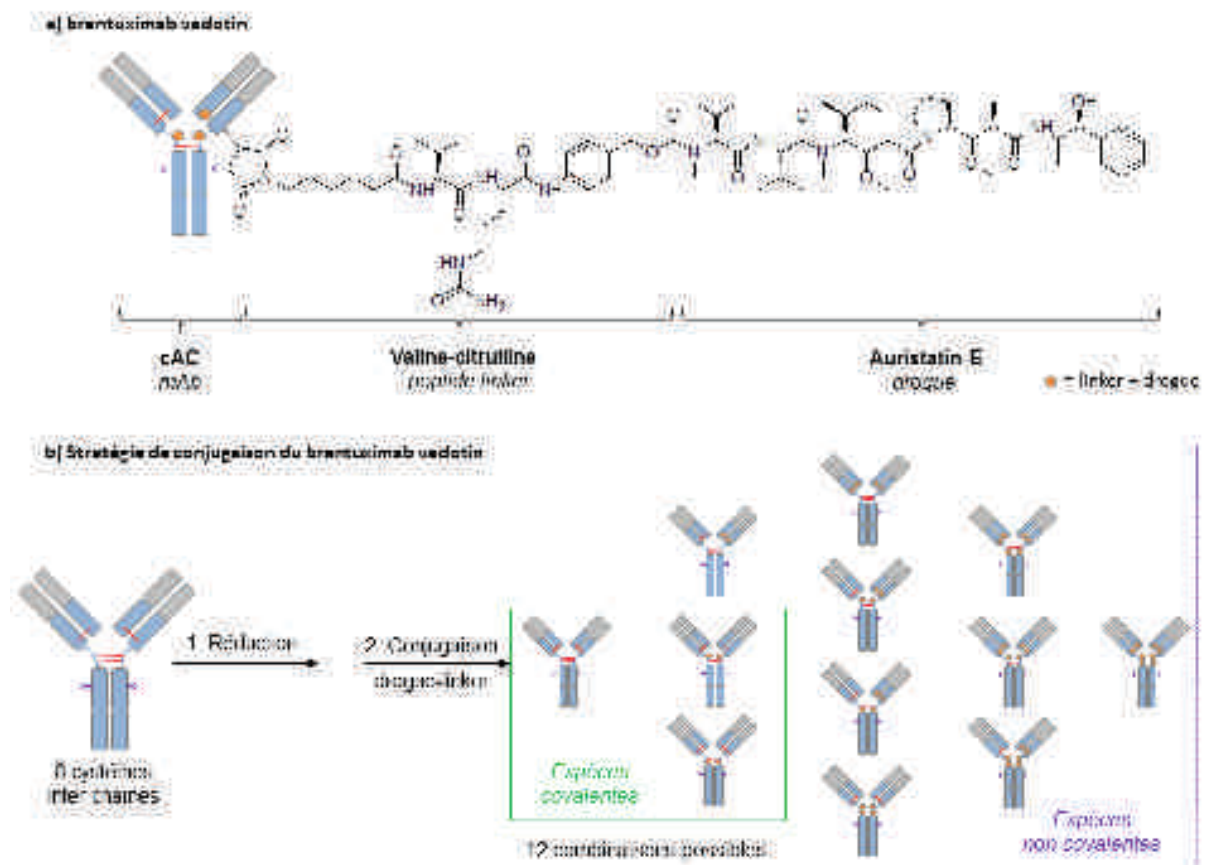


Figure 7. Structure du brentuximab vedotin (a), et stratégie de conjugaison associée (b).



### 3.2. Le trastuzumab emtansine

La voie synthèse du trastuzumab emtansine (figure 8a) [22], vise dans un premier à greffer un linker hétérobifonctionnel (SMCC : N-succinimidyl-4-(N-maleimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate) sur les chaînes latérales des lysines de l'anticorps. Dans un deuxième temps, l'agent cytotoxique (mertansine) possédant un groupement thiol libre réagit avec la fonction maléimide du linker de manière à produire un conjugué thioether (figure 8b). Si cette stratégie conduit à la formation d'espèces uniquement covalentes, avec une distribution paire et impaire allant de 0 à 8 drogues, le nombre de combinaisons est supérieur à  $10^{13}$ , étant donné que sur les 88 lysines du mAb, 40 se trouvent exposées au solvant et donc accessibles à la conjugaison [20].

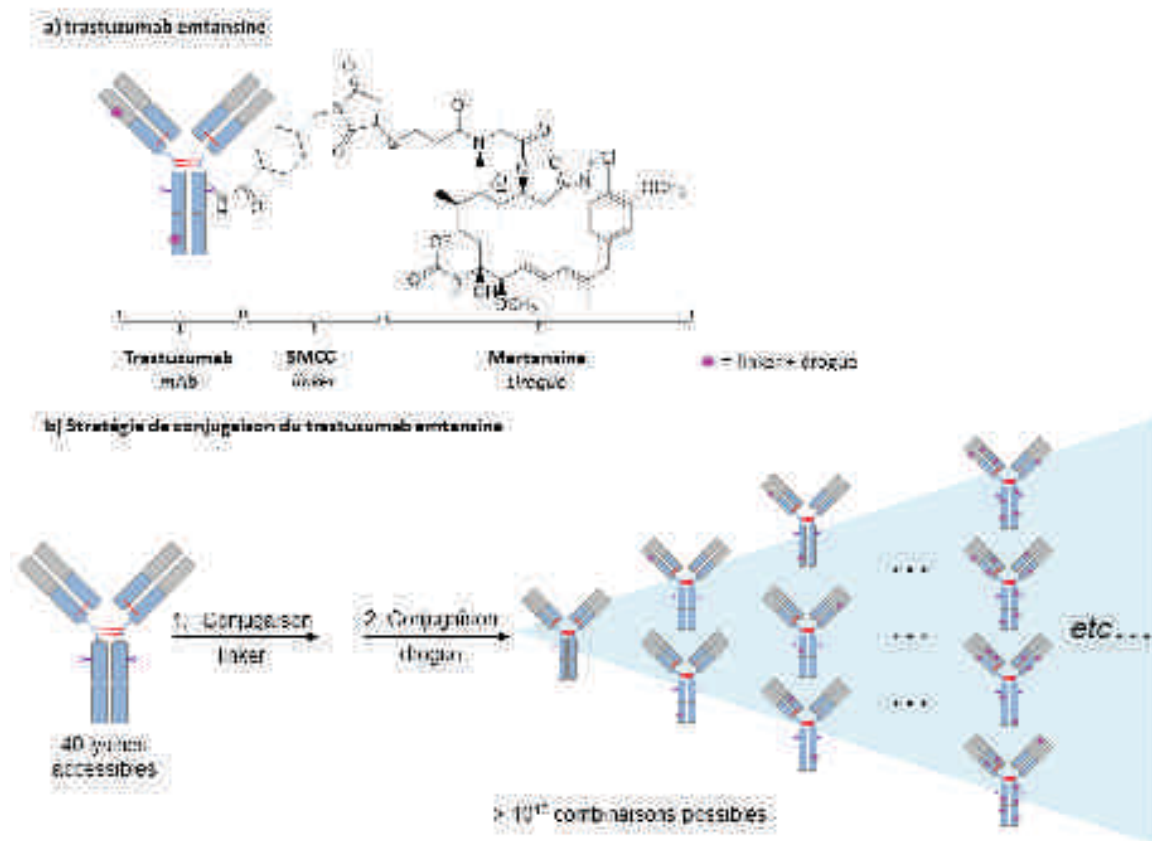


Figure 8. Structure du trastuzumab emtansine (a), et stratégie de conjugaison associée (b).

### 3.3. Propriétés thérapeutiques

Les propriétés pharmacocinétiques des immuno-conjugués, sont intimement liées au ratio moyen de greffage (DAR : « Drug Antibody Ratio ») mais aussi à la distribution des drogues greffées. En effet, les ADCs D8 se heurtent à des problèmes de grande toxicité, de solubilité

(dû au couplage de drogues très hydrophobes) mais aussi de clairance trop rapide ; alors qu'un D0 se retrouve en compétition avec des composés de plus haut Dn pour l'internalisation dans une cellule, limitant ainsi l'effet thérapeutique [20, 23, 24]. Un DAR moyen de 4 est plus généralement ciblé, ce dernier se présentant comme un bon compromis entre effet thérapeutique souhaité, toxicité et temps de présence dans la circulation sanguine.

### 3.4. Les ADCs sites spécifiques

Il existe un troisième type d'immunoconjugués actuellement en cours de développement : les ADCs dits : site spécifique. Les objectifs de ces derniers sont d'augmenter la fenêtre thérapeutique mais aussi de diminuer considérablement l'hétérogénéité du produit injecté [20, 25]. A l'heure actuelle, seuls deux à quatre ADCs sites spécifiques sont entrés en phase clinique I [20]. Ce type de composé s'appuie sur plusieurs stratégies de conjugaisons [20, 25], comme l'introduction de cystéines modifiées à des positions spécifiques, le ciblage sélectif de glycanes ou l'introduction d'acide aminé non naturel (figure 9).

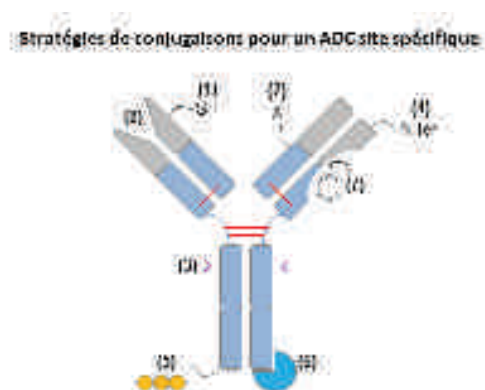


Figure 9. Stratégies de conjugaisons des ADCs sites spécifiques (adapté à partir de [20]). Elles sont basées sur une conjugaison covalente de part l'introduction de cystéine modifiée (1), l'insertion d'un acide aminé non naturel (2), la liaison à un glycanes (3), à la partie N-ter des chaînes lourdes et légères (4), ou l'ajout de tags spécifiques ; mais aussi sur une liaison non covalente en utilisant les propriétés d'affinités du domaine Fc ; le marquage par photoaffinité (7) ; et la conjugaison d'un pharmacophore (8).

Ces approches de conjugaisons permettent généralement d'obtenir un composé D2 (avec peu ou pas de population D0 ou D1), et donc d'améliorer grandement l'homogénéité du produit. De plus, des études précliniques toxicologiques ont permis de montrer les améliorations de ce type de composé au niveau de l'index thérapeutique [26]. Toutefois, les relations entre stratégie de couplage site spécifique et type de drogue utilisé ou toxicité, sont encore mal identifiées et doivent être approfondies [25].

## 4. Les défis et enjeux analytiques

Les mAbs sont des biomolécules de structures très complexes, de par la présence de modifications post-traductionnelles (PTMs), de plusieurs formes glycosylées. Cette hétérogénéité n'a fait qu'être accentuée avec les ADCs et le greffage d'une distribution de drogues. Ces caractéristiques, font qu'il est nécessaire de mettre à disposition des outils analytiques adaptés, pour une caractérisation de ces mAbs et ADCs à différents niveaux :

- ⇒ **linker/drogue** : pour la quantification de linker-drogue résiduels circulant (spécifique à l'ADC).
- ⇒ « **Bottom** » : pour la validation de la séquence en acide aminé, la détermination de PTMs, ou encore la localisation des sites de conjugaison.
- ⇒ « **Middle** » : pour la mesure de fragments de mAbs (HC, LC, Fd, Fc/2), l'étude du profil de glycosylation (sur les fragments Fc/2 ou HC), ou la détection d'isomères de positions.
- ⇒ « **Top** » : pour la mesure de masse intacte, la caractérisation du profil de glycosylation, l'étude de la distribution des DARs et la détermination du DAR moyen.
- ⇒ « **Higher Order Structure** » : pour la détermination de stœchiométries d'interaction, l'étude de la dynamique d'interaction, la caractérisation conformationnelle, la détermination d'épitope, ainsi que l'évaluation de l'impact de la conjugaison de drogues sur la structure globale.

Dans cette optique, plusieurs outils de séparation (chromatographie liquide, électrophorèse) peuvent être couplés à une analyse par spectrophotométrie, fluorimétrie ou spectrométrie de masse (tableau 2).

Technique opératoire	Principe de séparation	Niveau de caractérisation	Techniques analytiques	Caractéristiques	Inconvénients
Chromatographie liquide	Chromatographie d'adsorption (RP-HPLC)	Protéome Peptide Glycane	UV, MS UV, MS MS, LIF	Caractérisation de la séquence primaire, identification, quantification des PTMs (n-Ac) et des peptides conjugués (ADC) DAR moyen d'ADCs non conjugués à chimie de couplage Cys	Adaptation (ex. conjugaison) Faible sélectivité des peptides conjugués Risque de dilution inévitable
	Interaction hydrophobe (HIC)	Protéome	UV, MS	Conditions non dénaturantes, préservation intégrité, quantification des espèces conjuguées Dn et du DAR moyen d'ADCs non conjugués à chimie de couplage Cys	Incompatibilité MS des sels utilisés en phase tampon
	Interaction hydrophobe (HILIC)	Peptide Glycane	UV, MS MS, LIF	Identification, localisation, quantification des glycoformes (nature, abondance)	Marquage fluorescent des glycans extraits
	Fonctionnalisation (FF)	Protéome	UV (MS)	Identification des PTMs à condition de charge (cyclisation, acétylation, cystéinylation, charge, glycosylation)	Incompatibilité MS des sels utilisés en phase tampon
	Exclusion de taille (SEC)	Protéome	UV, MS	Conditions non dénaturantes, caractérisation (logique) et quantification de complexes conjugués à multi-épitopes (structures protéomiques)	Quantification limitée, coût élevé pour quantité importante
Fluorescence capillaire	Charge et rayon hydrodynamique	Protéome Peptide Glycane	UV, (MS) UV, (MS) MS, LIF	Caractérisation de la séquence primaire, identification, localisation, quantification des PTMs à variation de charge (cyclisation, acétylation, cystéinylation, charge, glycosylation)	Incompatibilité MS des additifs utilisés Marquage fluorescent des glycans extraits
	Point isoelectrique et rayon hydrodynamique	Protéome	UV (MS)	Identification des PTMs à condition de charge (cyclisation, acétylation, cystéinylation, charge) Séparation, quantification des espèces conjuguées Dn et du DAR moyen d'ADCs à chimie de couplage Cys	Incompatibilité MS des additifs utilisés Temps d'implémentation et de régénération
	Rayon hydrodynamique	Protéome Peptide Glycane	UV UV LIF	Identification, quantification des variants de taille (substitution, troncation de résidus) Identification, localisation, quantification des glycoformes	Incompatibilité MS

Tableau 2. Techniques classiquement utilisées pour la caractérisation de mAbs et ADCs (adapté à partir de [27]). UV : spectrophotométrie d'absorption ultraviolet-visible, MS : spectrométrie de masse, LIF : fluorimétrie par excitation laser.

En ce qui concerne notre **axe d'étude situé au niveau de l'ADC intact**, plusieurs technologies permettent d'accéder aux informations de type **distribution de Dn** et **DAR moyen** :

- La **spectroscopie UV/Vis** est une des méthodes relativement simple pour la mesure de DAR moyen [28], toutefois la photosensibilité de certaines drogues et linker, ainsi que la forte concentration de drogues non conjuguées peuvent constituer des limitations [23].
- La **chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC)** est une des méthodes de choix pour l'évaluation du profil de distribution et la détermination de DAR moyen pour les ADCs à conjugaison cystéine (**ADCs Cys**) [29-33]. Cette technique permet de séparer des composés en fonction de leur hydrophobicité, au travers d'un gradient de force ionique, et ceci en condition non dénaturante. Cependant, de part la nature des tampons utilisés (sels non volatils), un couplage direct à la spectrométrie de masse n'est pas envisageable.

- La **chromatographie liquide de phase inverse** (rpHPLC) ainsi que l'**électrophorèse capillaire** (CE) en présence de sodium dodécyl sulfate font aussi partie des approches utilisables pour la caractérisation des profils de conjugaisons pour les **ADCs Cys** [29, 31].
- Les méthodes d'**isoélectrofocalisation** (IEF) ou **isoélectrofocalisation capillaire imagée** (icIEF) sont quant à elles mieux adaptées pour les ADCs à conjugaison lysine (**ADCs Lys**) [34].

C'est dans ce contexte que la **MS native s'illustre aujourd'hui comme une technique analytique de choix**, pour la **mesure de masses intactes d'ADCs, l'évaluation du profil de conjugaison et la détermination du DAR moyen**. En 2012, l'équipe de Valliere-Douglass, fut la première à démontrer l'intérêt de la MS native pour la détermination de masses intactes d'ADCs Cys présentant un mélange d'espèces covalentes et non-covalentes, mais aussi pour la détermination de la distribution des drogues grâce à l'abondance relative des ions de chaque Dn [35]. Toutefois l'hétérogénéité due aux PTMs, ou aux greffages d'une population de drogues s'illustre par des incréments de masse assez faibles, comparée à la masse de l'anticorps (d'une dizaine de Da à kDa, soit 0.01 à 5% de la masse du mAb), et constituent une limitation à ces approches de spectrométrie de masse natives [36]. Des développements technologiques instrumentaux en termes de désolvatation des ions [37] et résolution effective se présentent aujourd'hui comme le moyen à disposition pour pallier ces problématiques [38-43].

## 5. Objectifs généraux des travaux

Les caractéristiques de hauts poids moléculaires, l'hétérogénéité en terme de glycosylation, modifications post-traductionnelles, mais aussi en terme de greffage de composés cytotoxiques pour les ADCs, font qu'il est nécessaire de développer de nouveaux outils analytiques pour leur caractérisation biophysique la plus complète possible. De plus l'étude de l'assemblage et la caractérisation des complexes mAb/Ag contribuent aussi à la compréhension des processus cellulaires associés. Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont déclinés en deux points :

- ⇒ Evaluer l'apport de la MS native et MS native haute résolution pour la caractérisation d'ADCs. Pour cela, une étude comparative des deux ADCs actuellement commercialisés a été réalisée sur des spectromètres de masse à géométries et résolutions différentes (Q-TOF versus Orbitrap).
- ⇒ Développer des approches d'échange HDX-MS pour la détermination d'épitopes de complexes mAb/Ag.



## ***Chapitre 1 : Caractérisation d'ADCs par MS native haute résolution.***

### **1. Objectifs des travaux**

Depuis l'introduction du concept de la spectrométrie de masse native en 1991, et les travaux de Chait et Henion sur la caractérisation du complexe myoglobine-hème (17.5 kDa) [44] ou de récepteur-ligand [45], la complexité des systèmes analysés n'a cessé de croître, comme l'atteste l'analyse de protéines de capsides virales (~ 18000 kDa) [46, 47] en 2013. Cette évolution de la complexité des systèmes analysables par spectrométrie de masse native est étroitement liée aux évolutions instrumentales, notamment au niveau des pressions et des optiques de transmission [38]. Toutefois, si ces améliorations techniques ont pour la grande majorité été bénéfiques à des instruments dotés d'un analyseur TOF ou Q-TOF, ces derniers présentent des résolutions et transmissions limitées pour des protéines ou complexes d'hétérogénéité et de masse croissantes. Dans l'optique de pallier ces problématiques, le groupe de Heck a modifié un instrument pourvu d'un analyseur à fort pouvoir résolutif (Orbitrap) tout en s'adaptant aux prérequis de la MS native (voir modifications de l'instrument au paragraphe 2.2.) [38]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un gain notable en termes de transmission et résolution pour différents types d'analytes sur cet instrument : l'Exactive Plus EMR. Ainsi les glycoformes d'un mAb ont pu être résolues à la ligne de base [38-40], et des mélanges complexes de mAbs ont été caractérisés en une seule analyse [42]. Le complexe GroEL (801 kDa) a été caractérisé, et des incréments de masse de l'ordre de 0.1% relatifs à la fixation d'ADP et ATP ont été mis en évidence [38]. En 2013, Rosati montrait l'intérêt de cet instrument pour l'analyse du brentuximab vedotin [40]. En effet, les espèces non covalentes étaient maintenues en phase gazeuse, et le profil de distribution  $D_n$  pouvait être déterminé à partir des spectres de masse.

A partir de ces travaux précurseurs, nous avons mis en place une stratégie analytique afin d'évaluer l'apport de la MS native haute résolution pour la caractérisation d'ADCs. Le brentuximab vedotin et trastuzumab emtansine étant les deux ADCs de référence, avec une chimie de couplage différente, ils constituent un cas d'étude idéal. L'évaluation de ce système haute résolution (Exactive Plus EMR, ThermoFischer Scientific) récemment implanté au laboratoire, est ici réalisée à travers la comparaison avec un système moins résolutif (Q-TOF, Synapt G2 HDMS), et porte une observation particulière sur :



- ⇒ la **capacité à caractériser et quantifier la distribution de chaque DAR**
- ⇒ la **précision de mesure de masse**

## 2. De la MS native classique vers la haute résolution

Afin de saisir l'importance des paramètres instrumentaux associés aux deux spectromètres de masses qui seront ici comparés, le Synapt G2 HDMS et l'Exactive Plus EMR, une description approfondie du fonctionnement de ces derniers est réalisée au sein de ce paragraphe.

### 2.1. Présentation du Q-TOF Synapt G2 HDMS (Waters) en mode MS native

La description détaillée de l'instrument a été faite dans la partie 2, toutefois nous allons ici présenter les spécificités de cet instrument en mode MS native (figure 10) :

- ⇒ les ions sont ici générés à l'aide d'un automate d'infusion nanoESI (Triversa Nanomate, Advion) par application d'une différence de potentiel entre la puce microfluidique et le cône d'échantillonnage puis le cône d'extraction du bloc source. Le cône conducteur contenant l'échantillon vient se juxtaposer sur une position particulière de la puce microfluidique.
- ⇒ la pression résiduelle au sein du bloc source peut être contrôlée grâce à une vanne de fuite dans le système de pompage primaire (2-8 mbar) [48]. En effet, la dégradation du vide à ce niveau, permet de contrôler l'accélération des ions entre deux chocs consécutifs et ainsi de maintenir des assemblages non-covalents.
- ⇒ l'optimisation des énergies de collision des cellules Trap et Transfer CE permet de donner suffisamment d'énergie interne aux ions pour les transmettre jusqu'à l'analyseur sans toutefois rompre les complexes, avec une pression résiduelle en argon de  $10^{-2}$  mbar. La cellule IM, où règne une pression résiduelle en argon de  $10^{-4}$  mbar est ici utilisée comme guide d'ion.
- ⇒ comme décrit précédemment, l'analyseur TOF peut ici être utilisé sous différents modes (sensibilité, résolution ou haute résolution). Les prérequis de la MS native privilégieront le mode résolution pour des complexes de taille relativement restreints ( $\leq 30$ kDa) et le mode sensibilité pour des plus hauts poids moléculaires.

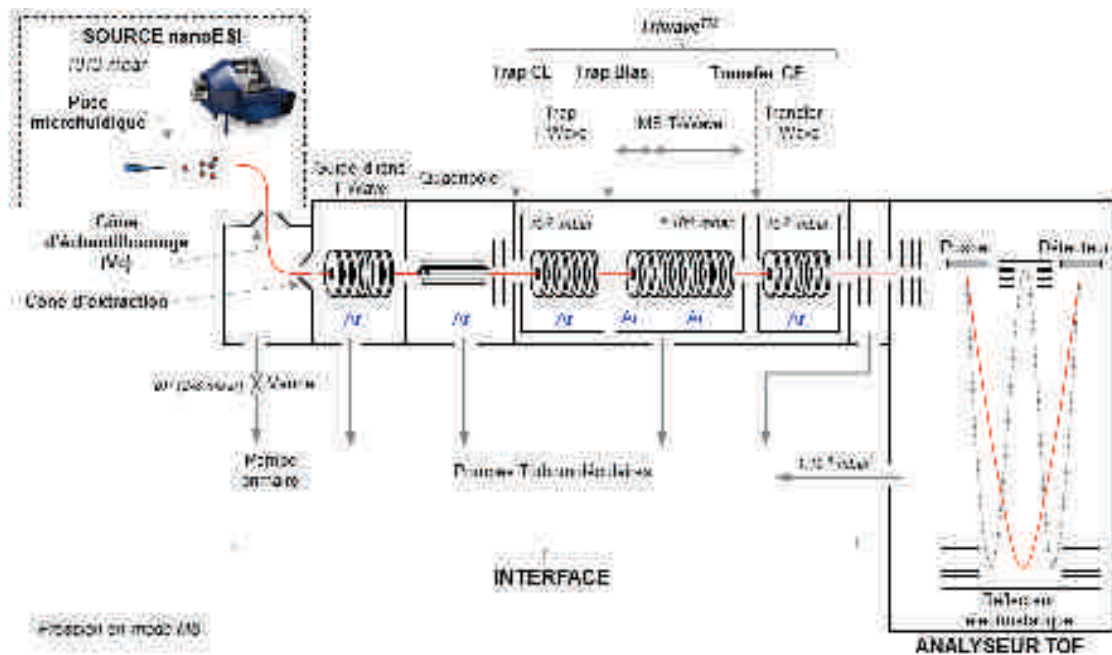


Figure 10. Représentation schématique du Synapt G2 HDMS (Waters), adaptée de [49]

## 2.2. Présentation de l'Orbitrap Exactive Plus EMR (ThermoFischer Scientific)

L'Orbitrap Exactive Plus EMR est un spectromètre de masse à analyseur Orbitrap conçu pour l'analyse de complexes non-covalents de hauts poids moléculaires. Cet instrument (figure 11) basé sur la géométrie d'un Orbitrap Exactive Plus a subi quelques modifications de manière à s'adapter aux contraintes de la MS native [38, 39] :

- une extension de la gamme d'analyse à 20000 Th, de part la modification du logiciel de pilotage (« Extended Mass Range », EMR).
- une augmentation des potentiels radiofréquences (RF) est appliquée à l'ensemble des multipôles, afin de favoriser la transmission des ions de plus hauts rapports m/z.
- une augmentation des énergies de collision ainsi que le contrôle de la pression en gaz au sein de la cellule HCD, de manière à mieux thermaliser, focaliser et désolvater les ions.
- un contrôle direct des paramètres de transmission (flatapôles) pour une meilleure sensibilité en fonction des rapports m/z des ions générés.

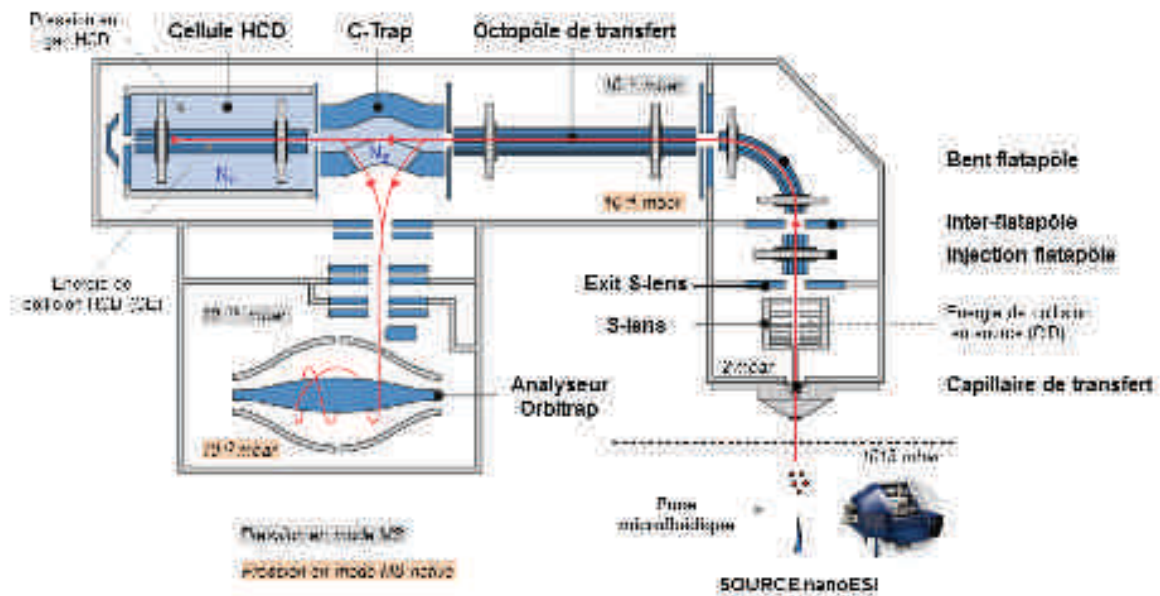


Figure 11. Représentation schématique de l'Orbitrap Exactive Plus EMR couplé à un robot d'infusion Nanomate (Advion).

Les pressions au sein de l'appareil sont régulées à l'aide d'une pompe primaire et de deux pompes turbomoléculaires. Ce spectromètre de masse se subdivise en 5 parties distinctes :

- ⇒ **l'interface bloc source**, constitué principalement d'un capillaire de transfert en métal (point d'entrée des ions) connecté à une série de lentilles annulaires « S-lens ». Les ions générés en amont du capillaire de transfert (automate d'infusion nanoESI) sont aspirés par un gradient de pression décroissant, et sont transmis jusqu'aux lentilles « S-lens ». Ces dernières sont utilisées comme un dispositif de transmission des ions. Les ions de rapports  $m/z$  de plus en plus élevés sont transmis progressivement de part l'application d'une tension radiofréquence (RF) d'amplitude croissante et en opposition de phase sur les lentilles « S-lens » [50]. Au sein de cette interface, la pression ne peut être régulée (elle reste constante  $\approx 2$  mbar), toutefois le contrôle de la différence de potentiel entre les « S-lens » et la lentille « Exit S-lens » relative à l'énergie de collision en source (CID) permet de maîtriser l'accélération des ions et ainsi de préserver l'intégrité d'édifices non-covalents.
- ⇒ un bloc optique de transmission, composé des **flatapôles « injection », « inter », « bent » et d'un octopôle de transfert**. Cette série d'optiques focalise et transmet les ions jusqu'à la trappe linéaire « C-trap ». « L'injection » flatapôle est formé de quatre

barreaux plats soumis à une tension radiofréquence, permettant ainsi de focaliser les ions. La transmission des ions depuis le bloc « S-lens » se fait au travers de l'application d'un potentiel continu DC sur « l'injection » flatapôle. De la même manière, les ions sont transférés jusqu'à « l'inter » flatapôle, ce dernier pouvant être apparenté à une lentille annulaire plate. Le « bent » flatapôle, constitué de quatre barreaux plats, permet quant à lui de focaliser et transmettre les ions jusqu'à l'octopôle de transfert. Sa particularité vient de son orientation à 90° favorisant ainsi l'élimination d'espèces neutres et de gouttelettes résiduelles de solvant. Là aussi des potentiels RF permettent de drainer les ions, alors que l'application d'un potentiel DC permet d'éjecter les ions vers le multipôle de transfert. Ce dernier opère seulement en mode radiofréquence (« RF-only ») et permet d'acheminer les ions à la C-Trap, avec une pression comprise entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  mbar selon la pression délivrée dans la cellule HCD [38].

- ⇒ la trappe linéaire incurvée « **C-Trap** » et la cellule de collision « **HCD** » (High energy Collision Dissociation) sont deux parties distinctes mais opèrent de façon synchronisée. Elles permettent tour à tour de piéger, thermaliser et parachever la désolvatation des ions [39]. L'approvisionnement en gaz de la C-trap permet de thermaliser les ions au travers de collisions permettant de dissiper leur énergie cinétique, alors que l'application d'un potentiel RF permet de les concentrer en son centre. Les ions sont ensuite éjectés vers la cellule HCD par application d'un potentiel DC, où sera poursuivi leur désolvatation au travers de collisions avec un gaz neutre (azote, xénon). L'optimisation du gradient de potentiel au sein de la cellule HCD (énergie de collision HCD ou CE) permet de contrôler l'accélération des ions entre deux chocs consécutifs. Si la modulation de la pression en gaz se fait à travers une vanne située dans la cellule HCD, la pression y régnant ne peut y être directement déterminée, toutefois la pression mesurée au sein de l'analyseur orbitrap y est indirectement associée ( $10^{-9}$  à  $10^{-10}$  mbar). Une inversion du potentiel DC permet ensuite de rediriger les ions vers la C-Trap, où ils pourront ensuite être extraits vers l'analyseur orbitrap.
- ⇒ **la cellule orbitrap** combine le rôle d'analyseur mais aussi de détecteur. Elle est constituée d'une électrode centrale de forme fuselée, cette dernière étant entourée d'électrodes externes ayant ce rôle de détection des ions [51, 52] (figure 12).

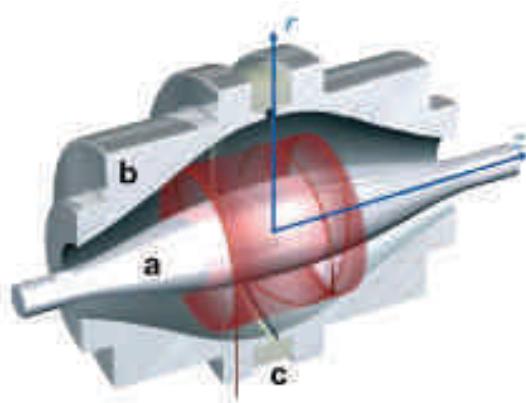


Figure 12. Représentation schématique de la cellule orbitrap (adaptée à partir de [53]). Les ions représentés en rouge tournent autour de l'électrode centrale (a) tout en se déplaçant le long de l'axe z, de part l'application d'un champ électrique entre l'électrode centrale fuselée et les électrodes externes (b). Ces dernières sont isolées par une gaine en céramique (c).

L'application d'un champ électrique au niveau de l'électrode centrale permet l'injection des ions au sein de l'analyseur. L'attraction du nuage d'ions vers l'électrode centrale est alors compensée par leur propre force centrifuge, leur permettant d'adopter une trajectoire oscillatoire suivant l'axe de l'électrode. L'oscillation harmonique de ce nuage d'ions se traduit par la production d'un courant global induit, pouvant être mesuré par les électrodes externes. Le traitement de ce signal par Transformée de Fourier permet de caractériser les fréquences  $\omega$  et amplitudes propres à chaque ion qui dépendent directement de leur rapport  $m/z$  et de leur intensité (équation 1) [54] :

$$(1) \quad \omega_z = \sqrt{k \left( \frac{1}{m/z} \right)},$$

où  $k$  est une constante relative à la courbure du champ électrique de l'instrument.

La fréquence d'oscillation  $\omega$  est d'autant plus importante que le rapport  $m/z$  est faible, ainsi pour les ions de hauts rapports  $m/z$ , une accumulation du signal plus importante sera nécessaire. La résolution de cet analyseur étant directement liée au nombre de mesures de  $\omega$  par temps de scan, elle diminue d'autant plus que le rapport  $m/z$  est élevé. La particularité de ce type d'instrument est de pouvoir choisir le temps de scan (32, 64, 128, 256 ou 512 ms) associé à une résolution instrumentale (respectivement 8750, 17500, 35000, 70000 et 140000 à  $m/z$  200). Toutefois il est possible de calculer

la résolution instrumentale théorique pour un rapport  $m/z$  donné à partir de l'équation (2) :

$$(2) \quad R = R_{nom} \times \sqrt{\frac{200}{m/z}},$$

où  $R_{nom}$  correspond à la résolution nominale de l'instrument fixée à  $m/z$  200.

### 3. Résultats

#### 3.1. Cas du brentuximab vedotin

##### 3.1.1. Analyse en condition dénaturante

Dans un premier temps nous avons procédé à une analyse classique, en utilisant des conditions dénaturantes. Après dilution de l'échantillon avec un mélange eau/acétonitrile/acide formique (50/50/1), nous observons (figure 13) plusieurs profils d'ions multichargés correspondant à différentes espèces générées en conditions dénaturantes. En effet, les interactions non-covalentes sont ici rompues, générant des fragments de chaînes légères (L), lourdes (H), et des couples chaînes lourdes et/ou légères (HL, HH, H<sub>2</sub>L). La seule forme entière de l'anticorps observée (très minoritaire) correspond à l'anticorps entier sous sa forme entièrement oxydée ne portant pas de drogues (figure 13).

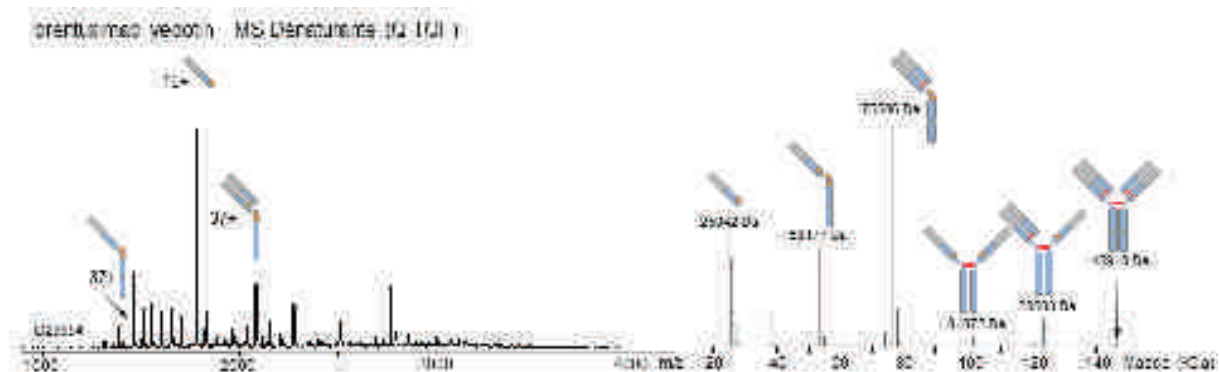


Figure 13. Analyse du brentuximab vedotin en conditions dénaturantes sur le Synapt G2 HDMS. Le spectre de masse est présenté en partie gauche, le spectre déconvolué associé sur la partie de droite. L'échantillon est infusé à 2 µM (H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH : 50/50/1) (V<sub>c</sub> : 40 V, P<sub>i</sub> : 2.1 mbar).



Ceci traduit l'inaptitude des méthodes de caractérisation en conditions dénaturantes pour l'analyse de cet ADC composé d'espèces covalentes et non covalentes. Pour pallier à cette problématique, nous nous sommes donc tournés vers des approches de MS natives.

### 3.1.2. Analyse en conditions natives classiques

L'analyse du brentuximab vedotin déglycosylé (10  $\mu$ M) en conditions non dénaturantes a donc été réalisée, sur instrument de type Q-TOF pour débiter. Les conditions expérimentales et instrumentales, nous permettent ici de conserver l'intégrité des complexes non covalents. Ainsi entre 5250 et 7250 m/z, nous pouvons observer des profils multichargés correspondant aux différentes distributions de Dn (figure 14). Après déconvolution du spectre de masse nous observons une distribution de Dn pairs centrés sur le D4, ceci étant en accord avec les données de la littérature [55] ainsi qu'avec la stratégie de synthèse. L'absence de DAR impair est due au fait que pour chaque pont disulfure ouvert, 2 groupements thiols se trouvent en position de réagir avec le groupe « linker + drogue ».

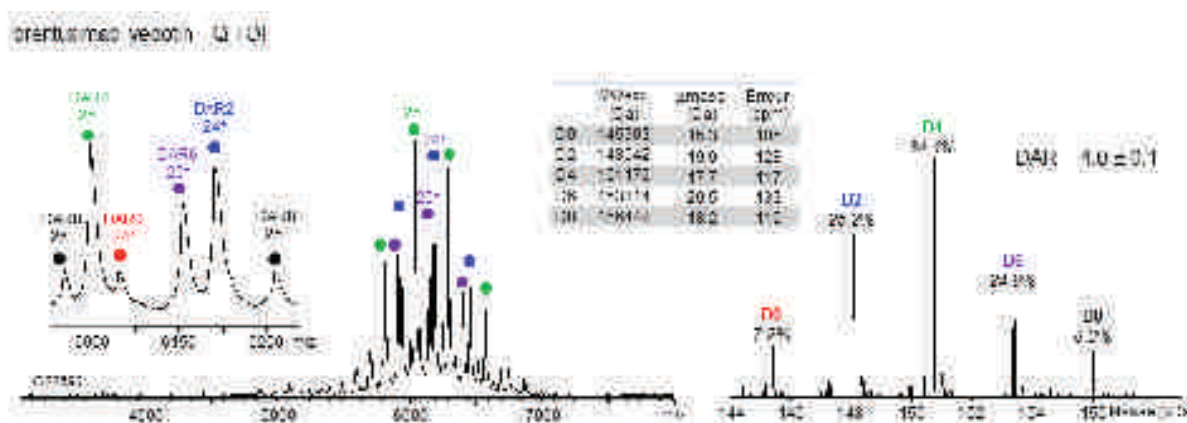


Figure 14. Analyse du brentuximab vedotin en conditions natives sur le Synapt G2 HDMS. L'échantillon est infusé à 10  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) (Vc : 80 V, Trap et Transfer CE : 20 et 10 V, Pi : 6 mbar). Le spectre de masse est présenté en partie gauche, le spectre déconvolué associé sur la partie de droite. Le tableau présente les masses expérimentales des différents Dn avec les erreurs de masses en Dalton et ppm par rapport aux masses théoriques.

La résolution effective sur le Q-TOF apparait ici suffisante pour distinguer l'ensemble des états de charge de chaque Dn. Toutefois nous avons souhaité évaluer si la MS native haute résolution était en mesure d'apporter une meilleure précision de masse, qui est supérieure à 100 ppm sur le Q-TOF, tout en maintenant la structure de ce type d'ADC pour la caractérisation des profils Dn et du DAR moyen.

### 3.1.3. MS native haute résolution : les optimisations

Si les méthodes d'analyses sur le Q-TOF étaient déjà bien optimisées, ce n'était pas le cas sur l'Orbitrap. Les optimisations instrumentales réalisées sur l'Exactive Plus EMR vont ici être développées avant de réaliser la comparaison Q-TOF vs. Orbitrap.

Les influences du choix de la résolution sur les mesures de masse, de l'énergie CID et la pression de la cellule HCD sur les profils de distributions  $D_n$  et sur le DAR moyen, seront ici discutées.

#### *3.1.3.1. Influence de la résolution nominale de l'analyseur Orbitrap*

Comme décrit dans le paragraphe précédent, il est possible de choisir la résolution nominale de l'instrument. Nous avons ici évalué trois résolutions et vérifier l'impact de ce paramètre sur la précision de mesure de masse (figure 15). Nous pouvons voir que si le profil au niveau du spectre de masse reste sensiblement le même, les résolutions effectives sont nettement améliorées (zooms figures 15). Cette augmentation de résolution effective, s'accompagne d'une meilleure précision de masse. En passant de 8750 à 17500, puis à 35000 de résolution, les erreurs moyennes sur les mesures de masses évoluent favorablement de 230 ppm à 110 ppm, puis à 36 ppm. Ainsi, pour la suite de nos analyses, c'est la valeur 35000 en résolution nominale qui sera retenue.



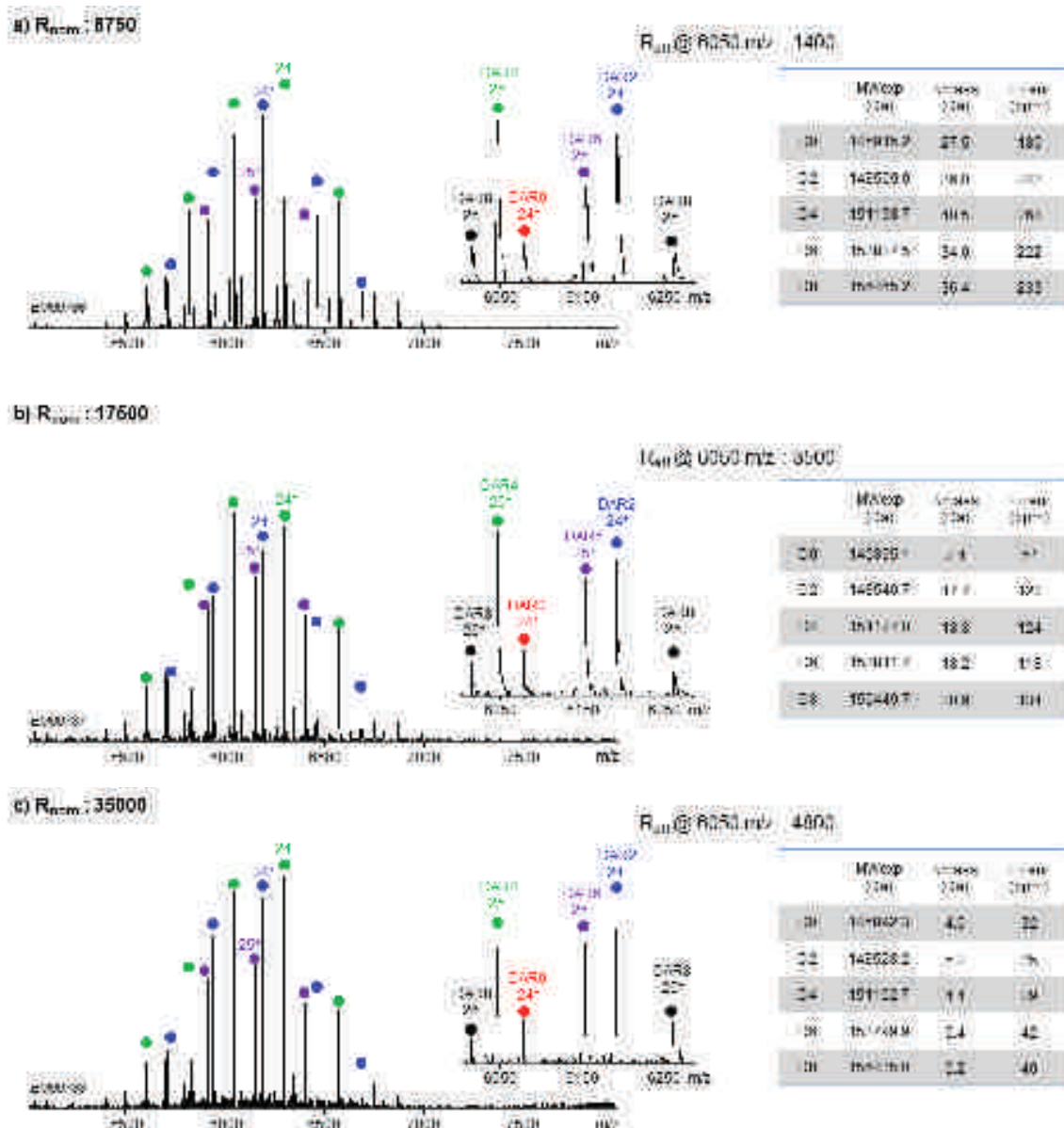


Figure 15. Comparaison des spectres de masses natifs du brentuximab vedotin obtenu sur l'Orbitrap en utilisant une résolution nominale de 8750 (a), 17500 (b) et 35000 (c). Les échantillons sont infusés à 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur l'Exactive Plus EMR (CID : 75 eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V,  $P_{\text{UHV}}$  :  $1,1 \cdot 10^{-9}$  mbar). Les tableaux présentent les masses expérimentales des différents  $D_n$  avec les erreurs de masses en Dalton et ppm par rapport aux masses théoriques.

### 3.1.3.2. Influence de l'énergie de collision en source (CID)

Si le choix de la résolution nominale de l'instrument est important pour la détermination de masses précises, les optimisations des énergies de collisions CID et CE sont aussi

primordiales pour la détermination des profils Dn et du DAR moyen. Ceci est particulièrement marqué pour le brentuximab vedotin (figure 16).

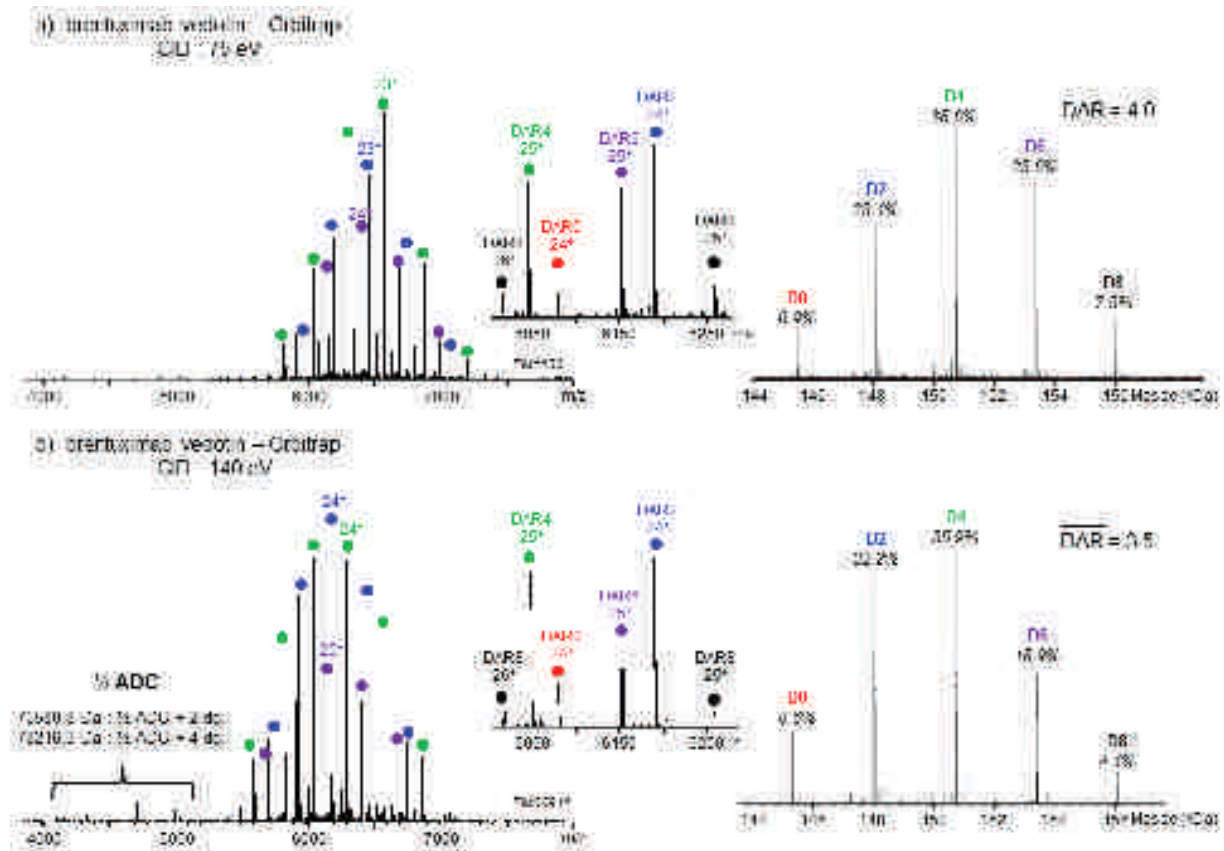


Figure 16. Influence de l'énergie de collision CID sur le profil de distribution Dn et le DAR moyen. Les échantillons sont infusés à 10  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) sur l'Exactive Plus EMR (CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V, P<sub>UH<sub>V</sub></sub> : 1,1.10<sup>-9</sup> mbar, R<sub>nom</sub> : 35000) avec une énergie de collision CID de 75 eV (a) ou 140 eV (b). Les spectres de masses sont présentés en partie gauche, les spectres déconvolués associés sur la partie de droite. dg. = drogue.

Ainsi avec une énergie de collision en source (CID) de 75 eV l'ensemble des espèces sont observées sur le spectre de masse. Le profil de distribution Dn et le DAR moyen sont déterminés, et sont accord avec la littérature [55]. Avec l'augmentation de l'énergie de collision CID à 140 eV, nous remarquons l'apparition d'espèces de plus basses masses entre 4000 et 5000 m/z correspondant à des demi-ADCs couplés à 2 et 4 drogues. Cette valeur d'énergie ne permet pas ici de maintenir l'ensemble des espèces non covalentes au sein du spectromètre de masse. Cette dissociation induit notamment des modifications au niveau des profils de distributions Dn et du DAR moyen (figure 16, partie droite). En effet, nous constatons une diminution des espèces D4, D6 et D8 respectivement de 2.7, 4.7 et 3.1%. Cette diminution se fait au profit des espèces D0 et D2, pour qui nous remarquons une augmentation respective de 1.7 et 8.8%. Ces variations de distributions Dn influent aussi sur

la détermination du DAR moyen, qui dans ce deuxième cas est sous-estimé (3.5), et n'est plus en accord avec ce qui est attendu. Cette illustration montre bien ici l'importance de l'optimisation de ces paramètres, et notamment dans le cas d'un mélange de composés covalents et non covalents.

### 3.1.3.3. Influence de la pression au niveau de la cellule HCD

Un autre paramètre à optimiser de manière à conserver l'intégrité des complexes en phase gazeuse, est la pression de la cellule HCD. S'il n'est pas possible de déterminer une valeur de pression absolue, nous pouvons moduler une valeur arbitraire y étant rattachée. Ainsi nous pouvons voir l'influence de cette variable en figure 17.

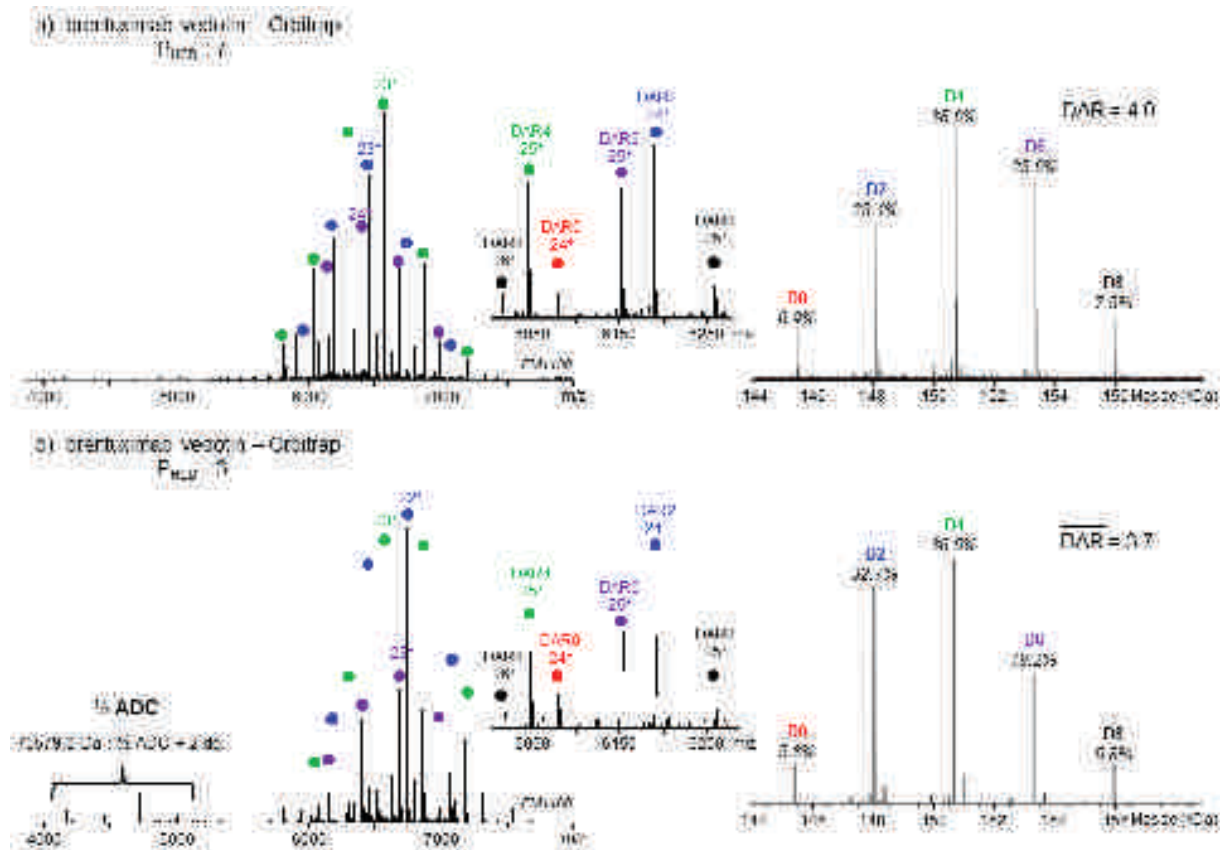


Figure 17. Influence de la pression de la cellule HCD sur le profil de distribution  $D_n$  et le DAR moyen. Les échantillons sont infusés à 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur l'Exacte Plus EMR (CID : 75eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V,  $R_{\text{nom}}$  : 35000) avec une pression arbitraire en cellule HCD de 7 (a) ou 3 (b). Les spectres de masses sont présentés en partie gauche, les spectres déconvolués associés sur la partie de droite. dg. = drogue.

Nous pouvons constater ici la présence de demi-ADC pour une valeur de pression de 3, ce qui n'est pas le cas pour une pression de 7. Pour une valeur de vide plus poussée (donc ici 3), le

libre parcours des ions devient plus important, ainsi ces derniers accumulant une plus grande énergie cinétique, les chocs avec les molécules de gaz du milieu deviennent plus énergétiques, et entraînent la dissociation d'une partie des espèces non covalentes. Ceci se traduit notamment au niveau des profils de distributions  $D_n$ , pour lesquels nous pouvons noter la baisse des espèces D4, D6 et D8, qui diminuent respectivement de 2.1, 4.4 et 1.7. La réduction du taux des espèces se fait notamment au profit de l'espèce D2, qui augmente de 7.3%.

#### *3.1.3.4. Evaluation du logiciel de retraitement associé à l'Exactive Plus EMR : « Protein Deconvolution 3.0® » (PD 3.0)*

Les analyses réalisées sur l'Exactive Plus EMR sont retraitées à l'aide du logiciel PD 3.0, de manière à déterminer les masses des analytes et générer les spectres déconvolués associés. Pour une utilisation optimale de ce logiciel, nous avons noté trois paramètres essentiels à optimiser :

- La **gamme m/z** sur laquelle la déconvolution va être réalisée
  - La **masse ciblée**
  - La **tolérance de masse**
- Dans un premier temps nous avons évalué **l'impact de la gamme de m/z paramétrée, associé à la valeur de masse ciblée**. A titre d'exemple nous avons réalisé une comparaison de ces variables à l'aide du spectre de masse présenté en amont (influence du CID), présentant des espèces hétérogènes en masses (demi-ADCs et ADCs entiers) (figure 18). En effet nous pouvons remarquer deux distributions, une entre 4000 et 5000 m/z et l'autre entre 5300 et 7000 m/z. Dès lors, les paramètres de déconvolution sont cruciaux pour la caractérisation de toutes les espèces présentes sur le spectre de masse. Si la gamme m/z établie est corrélée avec une masse cible adéquate, la déconvolution associée permet une caractérisation des espèces de qualité. C'est le cas pour le panel b et d, où les paramètres de déconvolutions sont bien centrés respectivement sur des espèces faisant référence à l'ADC entier et au demi-ADC. En revanche si la gamme m/z utilisée est conséquente, il est possible de passer au travers d'espèces si la masse ciblée est trop éloignée (figure 18 d et e). Dans notre cas, si la masse cible est de 150000 Da, les espèces faisant référence au demi-ADC ne sont pas observées.

Ceci montre l'importance d'optimiser ces paramètres, et de travailler avec plusieurs méthodes de retraitement selon la dispersion des profils multichargés sur le spectre de masse.

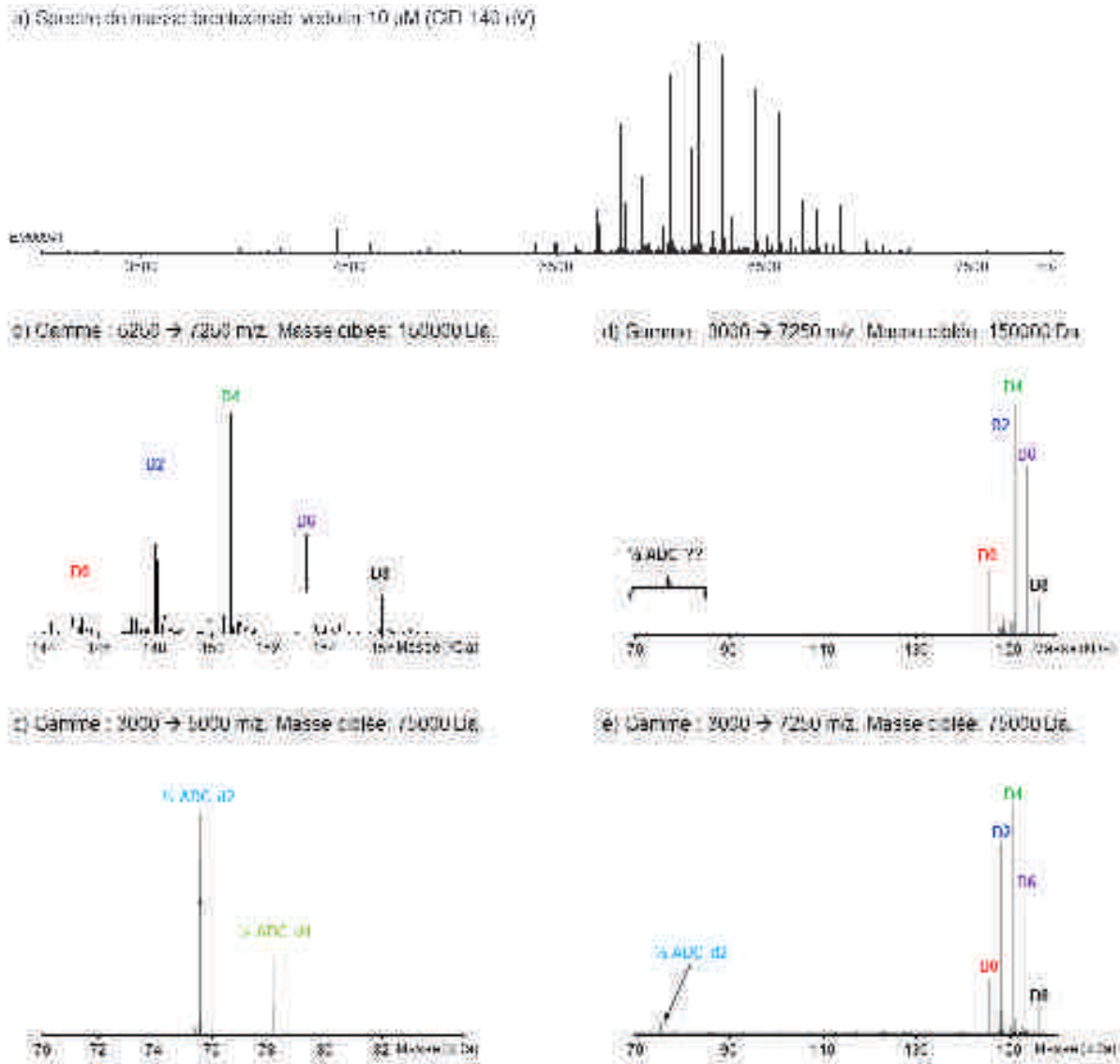


Figure 18. Evaluation de l'influence des paramètres de gamme de m/z et de masse cible sur la génération du spectre déconvolué. A titre d'exemple nous présentons ici les résultats de l'infusion du brentuximab vedotin à 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur l'Exactive Plus EMR (CID : 75eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V,  $P_{\text{HCD}}$  : 7,  $R_{\text{nom}}$  : 35000). Le spectre de masse est présenté en partie haute (a) alors que les spectres déconvolués selon différents paramètres sont présentés sur les panels (b) à (e).

- Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'influence du paramètre « **tolérance de masse** » sur la détermination des masses de toutes les espèces  $D_n$ , ainsi que sur leur distribution. Pour ce faire, l'échantillon infusé dans les conditions instrumentales optimales



(cf. figure 17a) a été soumis à deux retraitements, avec des valeurs respectives de tolérance de masse de 5 et 25 ppm (tableau 3). Ce paramètre de tolérance de masse fait référence à la déviation acceptable pour un état de charge donné, et non pas sur la masse moyenne.

	Masse			Distribution Dn	
	Théorique	5 ppm	25 ppm	5 ppm	25 ppm
D0	145007.7	145002.3	145002.0	10.2	8.9
D2	140520.0	140520.2	140530.0	24.6	23.4
D4	136118.2	136102.7	136104.4	36.8	38.6
D6	131703.5	131700.9	131700.3	21.2	22.6
D8	127288.8	127291.0	127290.0	7.2	7.5
			<b>DAR moyen</b>	<b>3.8</b>	<b>4.0</b>

Tableau 3. Evaluation du paramètre tolérance de masse sur la détermination de la masse et du profil de distribution.

Nous pouvons observer ici que la détermination des masses des espèces Dn est plus précise avec un paramétrage stringent. Toutefois, avec une tolérance stricte, la quantification des espèces Dn n'est pas optimale. En effet, certains ions ne sont plus comptabilisés pour la construction du spectre déconvolués, et certaines populations sont alors mal estimées. Ceci est notamment le cas du D0 qui est surestimé pour une valeur de tolérance de 5 ppm. La valeur du DAR moyen s'en trouve aussi influencée, puisqu'elle devient légèrement sous-estimée dans ce cas à 3.8.

Ainsi, pour le retraitement de nos analyses, nous avons procédé systématiquement à un double retraitement : un premier avec une tolérance plus élevée pour la détermination des profils Dn, et un deuxième plus stringent pour la détermination de masse la plus précise possible.

### 3.1.3.5. Evaluation de la méthode de calcul du DAR moyen et des distributions Dn

Avec les interrogations du logiciel de déconvolution soulevées dans le paragraphe précédent, nous avons souhaité évaluer l'impact de la méthode de calcul sur le DAR moyen et la distribution Dn. Les méthodes de calculs possibles, sont basées soit sur les intensités des espèces du spectre déconvolué, soit sur les intensités de chaque état de charge pour chaque espèce observée sur le spectre de masse. De manière à répondre à cette question nous avons aussi voulu vérifier la reproductibilité des résultats générés de manière à être représentatif. Ainsi nous avons infusé à plusieurs reprises un échantillon déglycosylé de brentuximab vedotin et avons calculé les profils Dn et DAR moyen pour chaque réplicat (figure 19).

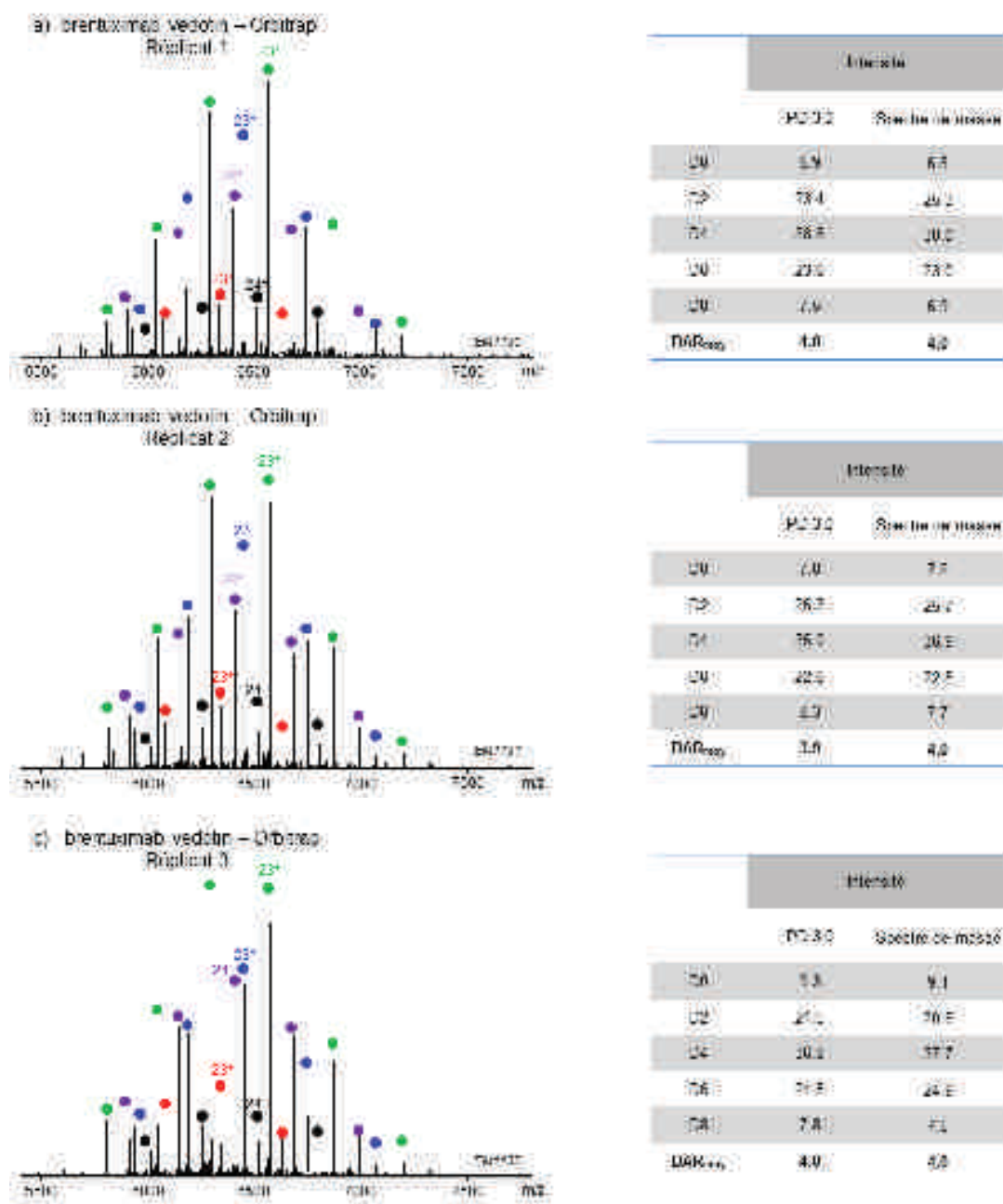


Figure 19. Evaluation de la reproductibilité des analyses et de la méthode de calcul sur le profil de distribution Dn et le DAR moyen. Les échantillons sont infusés à 10  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) sur l'Exacte Plus EMR (CID : 75eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V, P<sub>HCD</sub> : 7, R<sub>nom</sub> : 35000). Les spectres de masses sont présentés en partie gauche ; les tableaux présentent les profils Dn et DAR moyen pour chaque réplicat, selon un calcul basé sur le spectre déconvolué (PD 3.0) ou à partir des intensités relevées sur le spectre de masse (Spectre de masse).

Ces analyses permettent ici de montrer la grande similarité au niveau de l'évaluation des profils Dn et du DAR moyen, entre la méthode basée sur l'intensité des spectres déconvolués et celle basée sur l'intensité des espèces observées sur le spectre de masse. En effet nous

pouvons noter une différence maximale de 1.9% pour un Dn donné entre l'intensité déterminée à partir de la déconvolution et du spectre de masse. Cette observation participe à valider les résultats déterminés à partir des déconvolutions et donc du logiciel PD 3.0. De plus, ces analyses ont aussi permis de démontrer la reproductibilité des mesures inter-réplikat. En effet le DAR moyen est reproductible sur les différentes analyses, avec une faible déviation associée :  $4.0 \pm 0.05$ . De plus, les distributions des espèces Dn sont aussi très proches dans les différents réplikats.

#### 3.1.4. MS native classique vs. MS native haute résolution

L'analyse du brentuximab vedotin déglycosylé (10  $\mu$ M) par MS native classique, c'est-à-dire sur un instrument de résolution intermédiaire (Synapt G2 HDMS), et MS native haute résolution (Exactive Plus EMR) a permis de définir l'apport de ce dernier instrument en terme de précision de mesure de masse de chaque Dn, ainsi que pour leur quantification relative.

Dans le cadre de ces analyses en conditions natives, le Synapt G2 HDMS présente une résolution nominale de 20000, alors que l'Exactive Plus EMR a été utilisé avec une résolution nominale de 35000. L'effet de la haute résolution est marqué dans un premier temps au niveau des spectres masses même (figure 20), en effet nous pouvons observer (zoom état de charge 25+) des pics plus fins, et mieux résolus pour l'analyse réalisée sur l'Orbitrap que sur le Q-TOF. Toutefois la résolution effective sur le Q-TOF apparaît suffisante pour distinguer l'ensemble des états de charge de chaque DAR. Le résultat observé au niveau des spectres de masses est dû à un effet combiné d'une meilleure désolvatation des ions au sein de la cellule HCD et d'une résolution potentielle de l'analyseur Orbitrap supérieure. En termes de précision de masse, l'Exactive Plus EMR présente des erreurs de mesures entre masses expérimentales et théoriques comprises entre 30 et 40 ppm (soit environ de 4 à 6 Da), alors que celles obtenues sur le Q-TOF oscillent entre 100 et 130 ppm (soit environ de 15 à 20 Da).



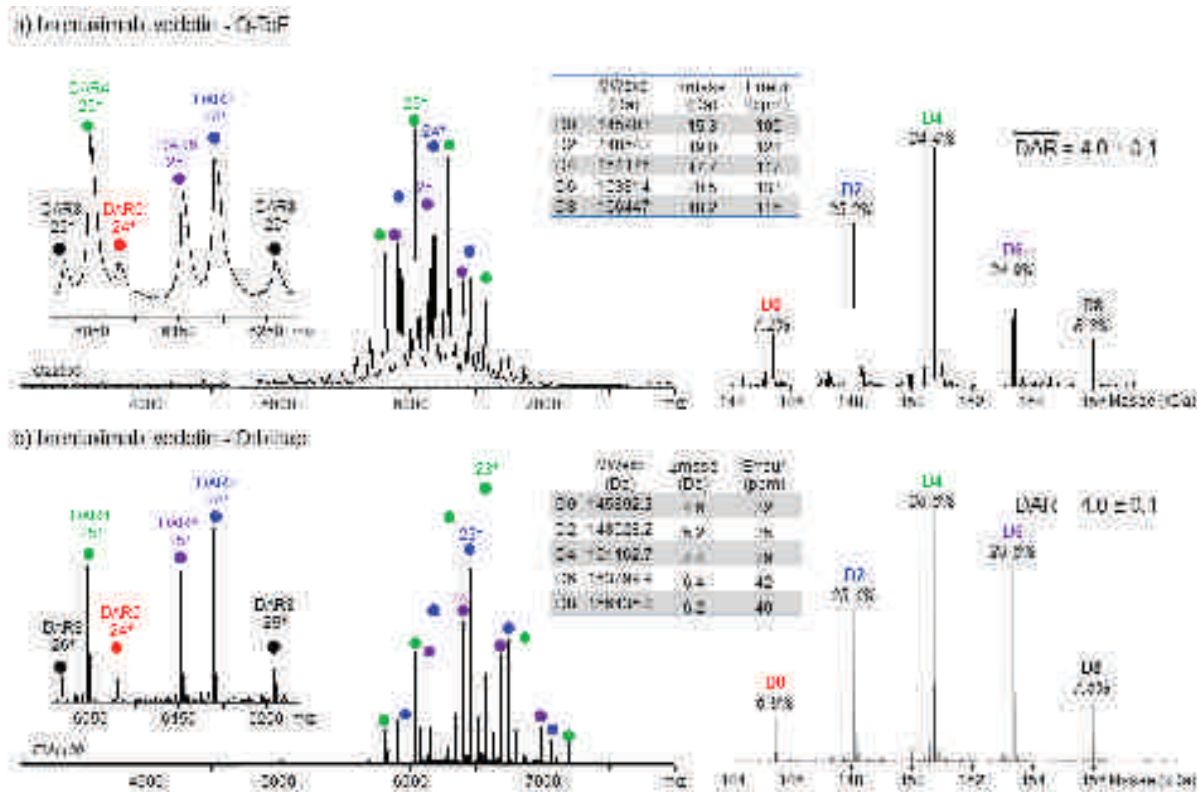


Figure 20. Comparaison d'un spectre de masse natif du brentuximab vedotin obtenu sur le Q-TOF (a) et l'Orbitrap (b). Les échantillons sont infusés à 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur le Synapt G2 HDMS ( $V_c$  : 80 V, Trap et Transfer CE : 20 et 10 V, Pi : 6 mbar) (a) et l'Exacte Plus EMR (CID : 75 eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V,  $P_{\text{UHV}}$  :  $1,1 \cdot 10^{-9}$  mbar,  $R_{\text{nom}}$  : 35000) (b). Les spectres de masses sont présentés en partie gauche, les spectres déconvolués associés sur la partie de droite. Les tableaux présentent les masses expérimentales des différents DAR avec les erreurs de masses en Dalton et ppm par rapport aux masses théoriques.

Pour ce qui est de l'évaluation du DAR moyen et des profils de distribution, la différence est là beaucoup moins marquante. En effet, les deux méthodes présentent un DAR moyen de 4.0 avec une distribution gaussienne centrée sur le D4 (spectres déconvolués figure 20). La proportion de chaque  $D_n$  est aussi très proche pour les deux méthodes, reproductibles, et sont en adéquation avec ce qui est observé en HIC (figure 21, et tableau 4), technique à l'heure actuelle considérée comme référence pour la quantification relative des DARs.

La MS native et donc plus particulièrement la **MS native haute résolution** se présente ici comme une **méthode de choix pour la caractérisation d'ADCs**, et notamment en termes de :

- **Maintien des composés non covalents en phase gazeuse.**
- **Précision de mesure de masse.**
- **Détermination des profils de distributions  $D_n$ .**
- **Calcul du DAR moyen.**

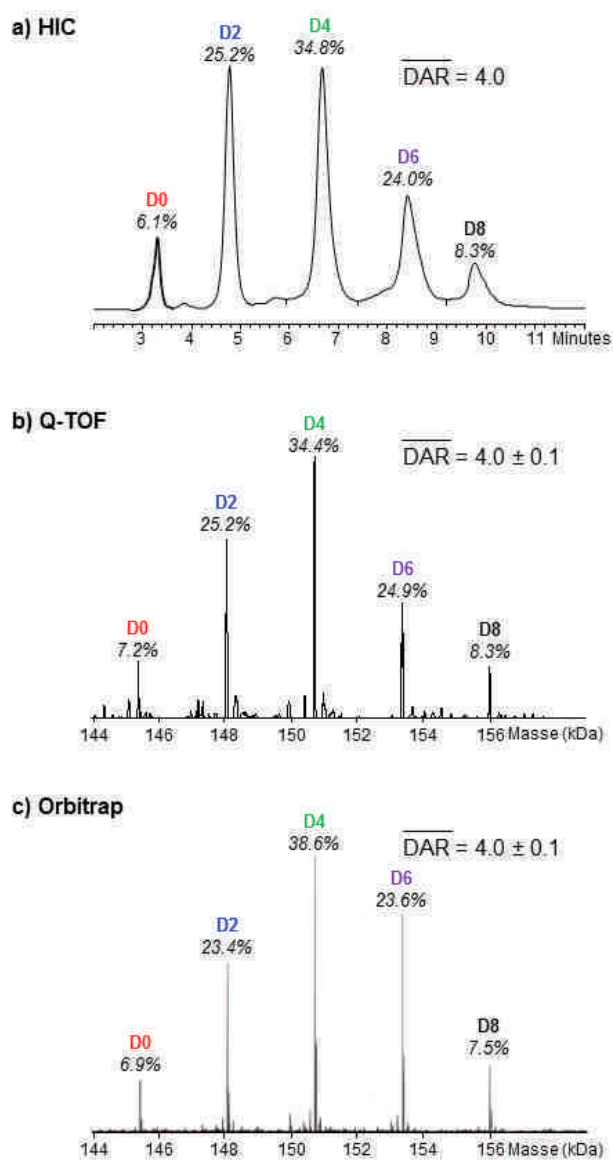


Figure 21. Comparaison des distributions  $D_n$  et DAR moyen pour le brentuximab obtenus en HIC (a) et après déconvolutions des spectres MS obtenus sur le Q-TOF (b) et l'Orbitrap (c).

	HIC	MS Native classique (Q-ToF)	MS Native haute résolution (Orbitrap)
D0	6.1	7.2	6.9
D2	25.2	25.2	23.4
D4	34.8	34.4	38.6
D6	24.0	24.9	23.6
D8	8.3	8.3	7.5
DAR moyen	4.0	4.0	4.0

Tableau 4. Distributions de chaque  $D_n$  et DAR moyen observés par HIC, MS native classique (Q-TOF) et MS native haute résolution (Orbitrap). Les proportions de chaque DAR sont exprimées en %.

## 3.2. Cas du trastuzumab emtansine

### 3.2.1. MS dénaturante vs. MS native

La stratégie de synthèse de cet ADC s'appuie sur la conjugaison d'un linker sur les lysines puis le couplage d'une drogue sur les lysines accessibles de l'anticorps. Si les espèces générées sont strictement covalentes, nous avons souhaité ici s'il pouvait y avoir un bénéfice à utiliser la MS native pour l'analyse d'espèces covalentes. En MS dénaturante (figure 22a), nous observons une superposition de profils d'ions multichargés entre 2250 et 4250 m/z. Une distribution de D0 à D7 est caractérisée, toutefois le D8 n'est pas observé. Ceci est dû au fait que les états de charges associés à ce DAR se superposent avec d'autres états de charges. La résolution effective de l'instrument ne permet pas ici de tous les séparer, la différence de masse entre deux Dn consécutifs n'étant que de 957.5 Da. L'analyse de ce même échantillon en conditions native classiques a pour effet de « décaler » les profils multichargés vers des plus hauts rapports m/z : effet de réduction des charges en conditions natives (figure 22b), permettant ainsi de résoudre plusieurs états de charges qui se superposaient en conditions dénaturantes. L'état de charge  $z$  diminuant, les faibles différences de masse  $\Delta m$  deviennent ainsi mieux résolues. Toutefois certains états de charges des espèces caractérisées se superposent toujours, et le D8 n'est pas observé. Par ailleurs le DAR moyen évalué en MS dénaturante est  $3.5 \pm 0.1$ , ce qui est en accord avec la valeur de 3.5 caractérisée par LC-MS [56]. En MS native le profil de distribution est légèrement décalé vers les DARs plus faibles expliquant la valeur de  $3.2 \pm 0.2$ . Cependant si les DARs moyens sont relativement proches (MS Native) ou en totale adéquation (MS dénaturante) avec ce qui est attendu (3.5), ce n'est que par effet de compensation des différents états de charge des différents Dn non observés.

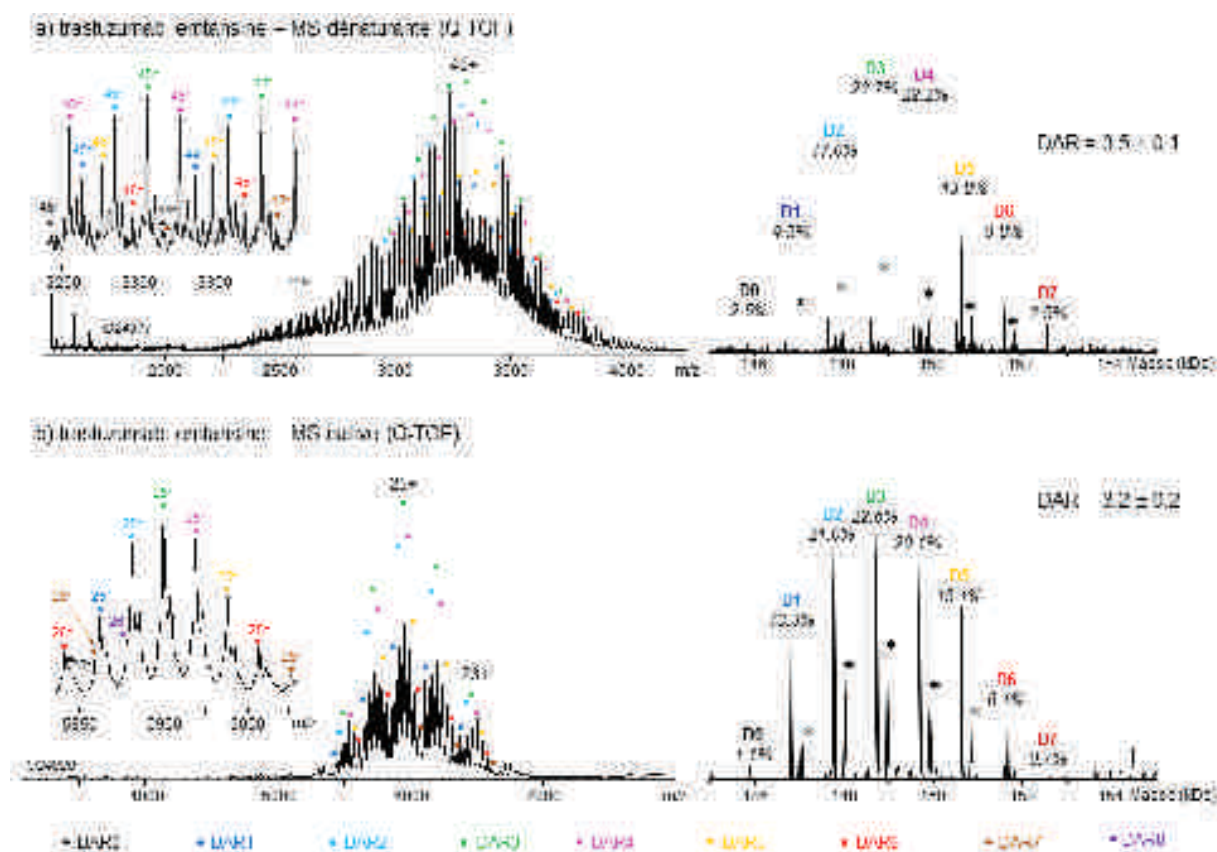


Figure 22. Analyse du trastuzumab emtansine en condition dénaturante (a) et native (b) sur le Synapt G2 HDMS. Les spectres de masses sont présentés en partie gauche, les spectres déconvolués associés sur la partie de droite. L'échantillon est infusé à 2  $\mu\text{M}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH}$  : 50/50/1) ( $V_c$  : 50 V,  $P_i$  : 2.1 mbar) en condition dénaturante (a) et à 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) ( $V_c$  : 180 V, Trap et Transfert CE : 20 et 10 V,  $P_i$  : 6 mbar) en condition native. Les astérisques \* indiquent la présence d'adduits covalents de +220 Da dus la fixation de linkers ces derniers n'ayant réagis avec aucune drogue.

### 3.2.2. Apports de la MS native combinée à la réduction de charge

Dans la lignée de ce qui a été observé au paragraphe précédent avec l'effet de la réduction de charge due aux conditions d'analyse en MS native, nous avons souhaité ici vérifier si une réduction de charge supérieure, en ajoutant un composé chimique, permettait d'améliorer la séparation entre les différents états de charges de chaque Dn. La réduction de charge dans ce cas est le résultat d'une compétition d'affinité pour les protons présents en solution entre l'additif basique (dans notre cas de l'imidazole) et la protéine, au terme de la désolvatation [57, 58]. Cette approche de réduction de charge a initialement été utilisée pour montrer le lien entre état de charge et stabilité des protéines en phase gazeuse. Le laboratoire de Robinson a largement contribué à montrer l'effet stabilisateur d'agents réducteur de charge pour des

protéines multimériques présentant une cavité en leur sein [59], ou sur des protéines membranaires nécessitant l'utilisation d'énergies de collision élevées [60].

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas visé à stabiliser le trastuzumab emtansine en phase gazeuse, mais à utiliser les propriétés de l'imidazole pour déplacer notre signal vers des plus hauts rapports m/z. Cette stratégie a été mise en place de manière à vérifier s'il est possible de discriminer des espèces qui se superposent à plus bas rapport m/z (entre 5500 et 7000 m/z), et ainsi de voir si la réduction de charge est une alternative à la MS native haute résolution.

Cet effet réducteur de charge est visible sur la figure 23, sur laquelle nous pouvons voir que sans agent réducteur de charges, le profil est centré sur l'état de charge 25+, alors qu'après ajout de 10 mM d'imidazole, ce profil est largement déplacé vers des plus hauts rapports m/z (8000-11000) avec une distribution centrée sur l'état de charge 16+. La superposition des états de charges majoritaires respectifs dans les deux conditions montre bien ici la capacité à séparer tous les Dn pour un état de charge donné. De plus, il est à souligner que la réduction de charge couplée à la MS native classique permet de détecter le D8. Le spectre déconvolué associé à la condition avec imidazole est réalisé sur la base des états de charges réduits majoritaires (15+ à 18+). En termes d'évaluation du DAR moyen, la MS native couplée à la réduction de charge détermine une valeur de  $3.3 \pm 0.2$ , cette dernière étant légèrement plus fidèle à ce qui est attendu, avec un profil mieux centré sur le DAR 3.



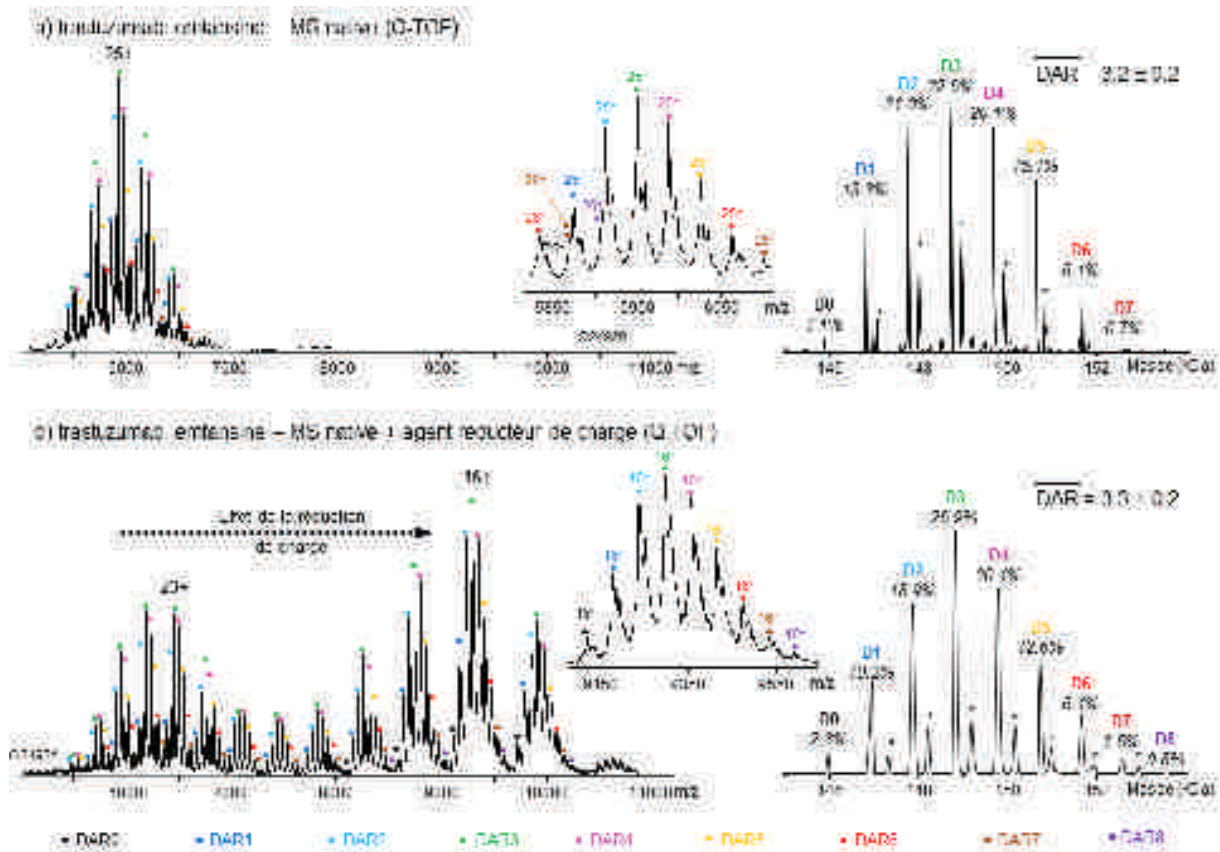


Figure 23. Analyse du trastuzumab emtansine en condition native avant (a) et après ajout d'imidazole (b) sur le Synapt G2 HDMS. Les spectres de masses sont présentés en partie gauche, les spectres déconvolués associés sur la partie de droite. L'échantillon est infusé à 10  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) (V<sub>c</sub> : 180 V, Trap et Transfer CE : 20 et 10 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar) avant (a) et après ajout de 10 mM d'imidazole (b). Les astérisques \* indiquent la présence d'adduits covalents de +220 Da dus la fixation de linkers ces derniers n'ayant réagi avec aucune drogue.

### 3.2.3. MS native haute résolution

L'analyse du trastuzumab emtansine déglycosylé sur l'Exactive Plus EMR, a permis de démontrer les bénéfices de la haute résolution pour ce type d'ADC Lys. Les effets de meilleure désolvatation et meilleure résolution de cet instrument sont visibles sur le comparatif d'une d'analyse Q-TOF et Orbitrap (figure 24). En effet si les états de charges 25+ D0, 26+ D7, 26+ D8 se superposaient respectivement avec les états de charges 26+ D6, 25+ D1 et 25+ D2 sur le Synapt G2 HDMS (figure 24a), ces derniers sont totalement résolus avec l'Orbitrap (figure 24b). Pour ce qui est de la précision de mesure de masse, le gain est ici considérable. Si l'erreur de masse oscille entre 75 et 130 ppm pour toute la distribution D<sub>n</sub> sur le Q-TOF, cette erreur sur l'Orbitrap est inférieure à 5 ppm pour les D0 à D5, inférieure à 10 ppm pour les D6 et D7, et en dessous de 30 ppm pour le D8. Ces résultats soulignent aussi la

différence entre l'analyse à haute résolution entre ces deux composés : nous observons des erreurs de masses 10 à 20 fois moins importantes pour le trastuzumab emtansine que pour le brentuximab vedotin. Ceci peut provenir d'une efficacité de désolvatation plus importante pour le trastuzumab emtansine et/ou que les masses théoriques pour le brentuximab vedotin aient été calculées sur la base d'une ré-oxydation totale des ponts disulfures après le greffage des drogues. Il se pourrait que des formes partiellement réduites demeurent toujours présentes en solution.

La caractérisation du DAR moyen de  $3.4 \pm 0.1$  en MS native haute résolution est ici bien concordante avec la valeur attendue, et présente une distribution gaussienne centrée sur le DAR 3. Les expériences de MS native haute résolution soulignent ici les apports de cette méthodologie en termes de précision de mesure de masse, et détection de toutes les espèces présentes en solution (D0 à D8) tout en s'affranchissant d'une étape de réduction de charge préalable.

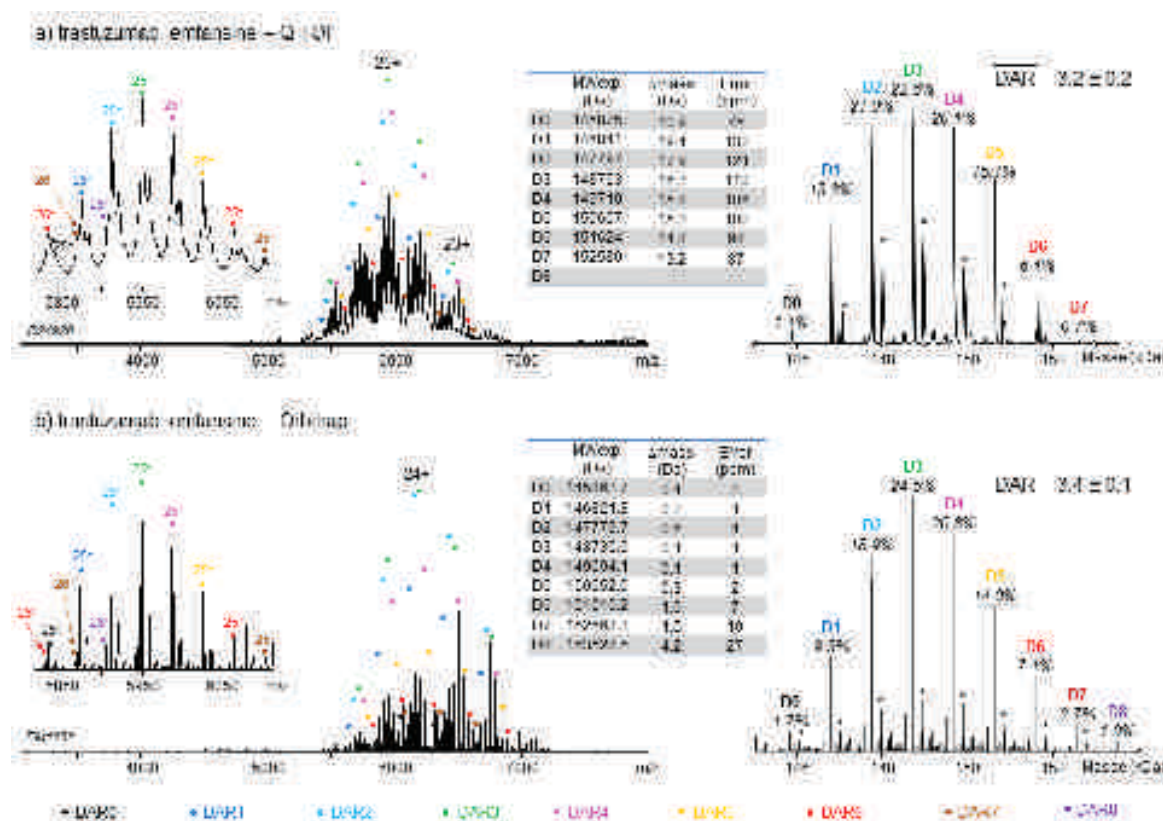


Figure 24. Comparaison d'un spectre de masse natif du trastuzumab emtansine obtenu sur le Q-TOF (a) et l'Orbitrap (b). Les échantillons sont infusés à 10  $\mu$ M ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur le Synapt G2 HDMS ( $V_c$  : 180 V, Trap et Transfert CE : 20 et 10 V,  $P_i$  : 6 mbar) (a) et l'Exactive Plus EMR (CID : 75 eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V,  $P_{UH\bar{V}}$  :  $1,1 \cdot 10^{-9}$  mbar,  $R_{nom}$  : 35000) (b). Les spectres de masses sont présentés en partie gauche, les spectres déconvolués associés sur la partie de droite. Les tableaux présentent les masses expérimentales des différents DAR avec les erreurs de masses en Dalton et ppm par rapport aux masses théoriques.

## 4. Conclusions

La MS native et la MS native haute résolution se présentent désormais comme des techniques références pour la caractérisation d'anticorps thérapeutiques [61], mais aussi d'ADCs, que la stratégie de couplage vise les cystéines [55, 61] ou les lysines [62]. L'Orbitrap Exactive Plus EMR permet non seulement de transmettre les composés sans détériorer les édifices non covalents mais aussi de les caractériser avec des précisions de mesure de masses grandement améliorées comparé à un instrument de type Q-TOF. Ce gain en résolution effective ( $\approx 7000$  pour l'orbitrap, et  $\approx 1000$  pour le Q-TOF @ 6000 m/z) permet notamment de résoudre les différents états de charges chevauchant quand l'incrément de masse apporté par la drogue est relativement faible, et ainsi de mieux quantifier les proportions relatives de chaque distribution de DAR.

## 5. Valorisation

Une étude bibliographique approfondie sur les méthodes de caractérisation des anticorps monoclonaux, ADCs et autres dérivés à différents niveaux par spectrométrie de masse a fait l'objet de deux revues scientifiques parues dans *Expert Review of Proteomics* et *Journal of Chromatography B*. L'évaluation de l'apport de la spectrométrie de masse native haute résolution pour la caractérisation d'ADC a fait l'objet d'une communication par affiche.

### Publications :

Alain Beck, Guillaume Terral, François Debaene, Elsa Wagner-Rousset, Julien Marcoux, Marie-Claire Janin-Bussat, Olivier Colas, Alain Van Dorsselaer, Sarah Cianférani. « Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugate ». *Expert Review of Proteomics*, 2016, 13(2):157-183.

Guillaume Terral, Alain Beck, Sarah Cianférani. « Insights from native mass spectrometry and ion mobility for antibody and antibody-based product characterization ». *Journal of Chromatography B*, sous presse.



**Communication par affiche :**

Guillaume Terral, François Debaene, Julien Marcoux, Amandine Bœuf, Elsa Wagner-Rousset, Nathalie Corvaia, Alain Van Dorsselaer, Alain Beck, Sarah Cianférani. « Native MS and IM-MS characterization of lysine- and cysteine-linked antibody drug conjugates (ADC) ». Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, Septembre 2015, Ajaccio, France.

## ***Chapitre 2 : Combinaison d'outils de spectrométrie de masse structurale pour la caractérisation de complexes antigène/anticorps.***

### **1. Etat de l'art**

Si la caractérisation de la séquence, des PTMs ou encore des profils de glycosylation d'un mAb à visée thérapeutique est primordiale, l'étude de l'interaction de ce dernier avec sa cible antigénique n'en demeure pas moins essentiel. L'étude approfondie de la relation structure/fonction est d'un intérêt particulier pour la compréhension des mécanismes cellulaires associés [63, 64]. Sous l'approche de caractérisation d'ordre supérieur des complexes mAb/Ag sont adossées les notions de stœchiométrie d'interaction et « d'épitope mapping » (cartographie de la zone d'interaction au niveau de l'antigène).

#### **1.1. Caractérisation de l'interaction mAb/Ag**

Afin de vérifier la capacité de liaison d'un mAb et d'un antigène, différentes techniques biophysiques sont aujourd'hui à disposition :

- La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à une détection UV peut être utilisée pour vérifier la liaison de ces partenaires et évaluer la stœchiométrie d'interaction [65-68].
- La résonance plasmonique de surface (SPR) ou encore la titration calorimétrique isotherme (ITC) permettent de vérifier l'association mAb/Ag, mais aussi de déterminer les constantes d'affinités [66, 69-72].
- Toutefois la MS native apparaît ici à son avantage car en une seule analyse elle donne accès à des mesures de masses précises, à la stœchiométrie d'interaction de façon catégorique, et les intensités des pics associés à chaque espèce permettent d'évaluer l'affinité relative.

En 2001, Tito [73] est le premier à démontrer l'apport de la MS native pour la caractérisation de complexes immuns. Depuis, plusieurs autres groupes ont attesté de l'intérêt de cette technique pour la caractérisation de stœchiométries d'interaction [39, 74, 75], et notamment dans certains cas particuliers pour lesquels des stœchiométries d'interactions inhabituelles ont

été caractérisées [76, 77]; ainsi que pour l'évaluation d'affinités au travers d'études comparatives [78, 79]. Les dérivés thérapeutiques de type anticorps bispécifiques ont aussi été caractérisés par MS native, et l'étude de Debaene *et al*, [80] contribue à démontrer la spécificité d'interaction entre la partie Fab du mAb pour sa cible antigénique.

## 1.2. Caractérisation de l'épitope

L'autre aspect primordial dans la caractérisation de tels complexes est de déterminer la zone de reconnaissance au niveau de la cible antigénique : l'épitope (figure 25).

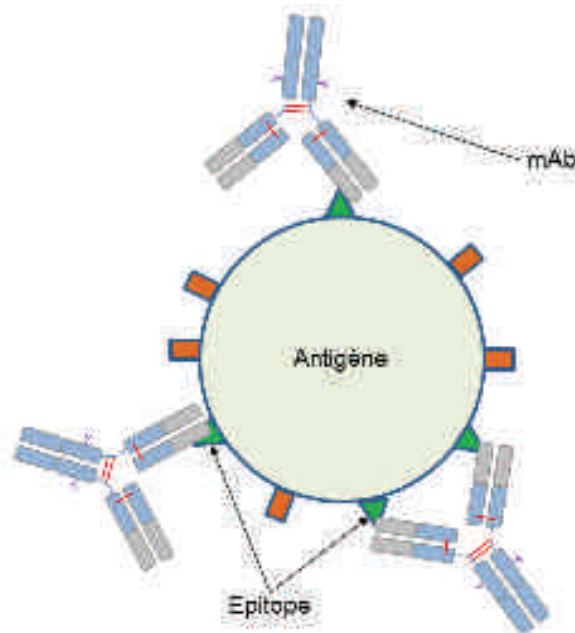


Figure 25. Représentation schématique de la fixation d'un mAb sur un antigène *via* la reconnaissance de l'épitope.

- Les techniques structurales à résolution atomiques n'ont un succès que très limité dans la caractérisation de complexe mAb/Ag. En effet la **RMN** atteint ses limites pour des masses moléculaires supérieures à 30 kDa, alors que les contraintes expérimentales liées à la **crystallographie** (difficulté à la production de cristal due à la flexibilité de certaines régions, quantité de matériel biologique importante) ne permettent que trop rarement d'obtenir un cristal de bonne qualité pour la diffraction [81, 82].
- Une technique de biologie moléculaire a largement été utilisée pour la détermination d'épitope : le **phage display** [83, 84]. Son principe vise à exprimer toute une librairie de peptide de l'antigène en question à la surface de bactériophages (virus bactériens) en

fusion avec le domaine N-ter. Le processus de sélection des phages recombinants repose sur plusieurs cycles de capture, lavage et élution sur des anticorps préalablement immobilisés. Les phages sont alors analysés par immunocriblage. Cependant cette approche nécessitant des manipulations génétiques est relativement chronophage [83] et présente des limitations dans le cas d'épitopes conformationnels (non linéaires) [81, 85, 86].

- Une autre méthode combinant protéolyse ménagée avec une analyse MS est aussi utilisée, et peut être retrouvée sous le terme **d'excision d'épitope** [81, 83, 87]. Cette technique consiste à immobiliser un anticorps sur des billes, à y ajouter l'antigène et réaliser ensuite une digestion enzymatique de façon contrôlée suivi d'une analyse MS [83]. Toutefois cette méthode ne permet pas d'obtenir des zones très précises d'interaction [88], nous parlerons ici plutôt de domaine d'interaction. De plus, ce type d'approche nécessite d'immobiliser son anticorps au préalable sur des billes, et la reproductibilité des résultats n'est pas toujours avérée [81].
- En appui des techniques citées précédemment, la technique d'**Ala-scan** peut aussi être utilisée afin de confirmer les zones d'interactions, et préciser l'importance de chaque acide aminé s'y trouvant. Toutefois cette approche nécessite la production de nombreux mutants qui doivent ensuite être testés notamment par SPR [88, 89].
- Les approches de **marquages chimiques différentiels suivis d'une analyse MS** s'imposent de plus en plus comme méthodes de choix pour la détermination d'épitopes. Nous retrouvons ici le **marquage radicalaire** [90] dans une moindre mesure, mais surtout les **échanges Hydrogène/Deutérium** [91-96]. En effet, cette dernière technique peu consommatrice en matériel biologique, permet avec un minimum de préparation d'échantillon et une analyse MS en ligne, de déterminer des zones d'interaction et de changements conformationnels [97]. Elle accède aussi à une certaine dynamique en solution [97, 98]. L'automatisation du processus expérimental et du traitement des données a grandement participé l'avènement de cette technique, notamment dans le milieu industriel [98-101]. De plus, les dernières avancées instrumentales en terme de fragmentation des ions, avec les bénéfices liés au mode de dissociation induite par transfert d'électron (ETD) permettent maintenant d'obtenir des résolutions spatiales au niveau de l'acide aminé [102, 103], et contribuent à l'essor de cette technique.

## 2. Contexte biologique

A titre de modèle, non limitatif, notre étude s'est basée sur la caractérisation d'un anticorps humanisé dirigé contre une cible antigénique A. Cette cible a été identifiée par nos collaborateurs du Centre d'Immunologie Pierre Fabre, en utilisant une approche fonctionnelle. Des cellules tumorales ont été inoculées et utilisées comme immunogène chez la souris, et les anticorps monoclonaux murins obtenus ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber *in vitro* la croissance de cellules tumorales. Les anticorps se révélant actifs *in vitro* ont ensuite été testés pour leur capacité à bloquer la croissance tumorale de cellules implantées *in vivo*. Des analyses protéomiques réalisées avec le LSMBO ont alors permis d'identifier l'anticorps 1 (mAb1), ce dernier reconnaissant spécifiquement l'antigène A (Ag-A). Cette cible antigénique se trouve notamment surexprimée sur différentes lignées ou tissus tumoraux, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle en oncologie.

Dans ce contexte une première étude a été réalisée au laboratoire, de manière à caractériser la stœchiométrie d'interaction entre une forme recombinante de l'Ag-A et le mAb1 sous sa forme murine, mais aussi après un processus d'humanisation. Des expériences de titrations analysées par MS native ont alors permis de mettre en évidence la fixation de deux dimères d'Ag-A par anticorps (figure 26).

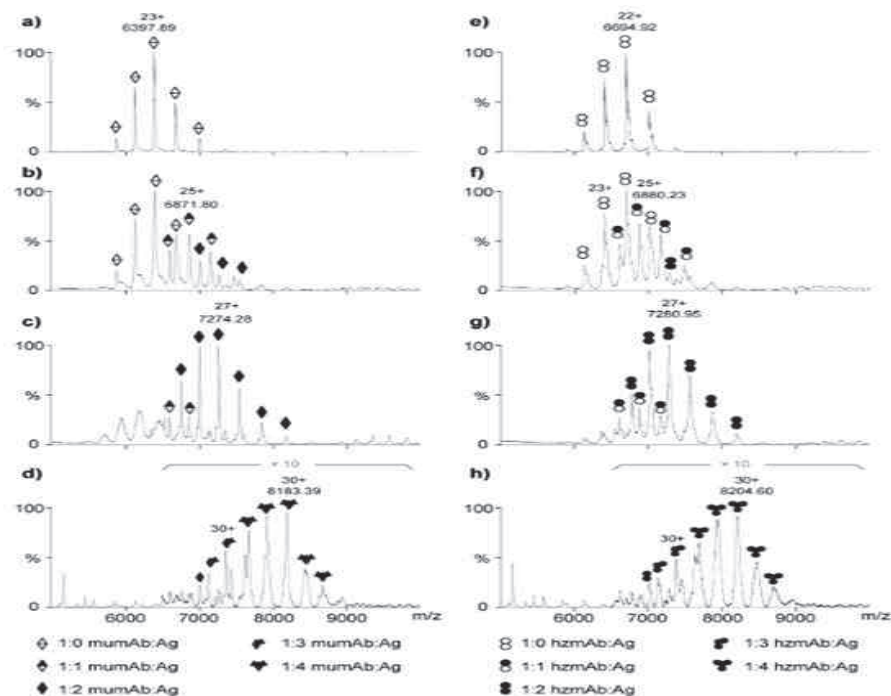


Figure 26. Détermination des stœchiométries d'interaction mAb1/Ag-A. L'anticorps 1 murin (mumAb) et humanisé (hzmAb) sont analysés seuls à 5 µM (a et e), puis en présence de 5 µM (b et f), 10 µM (c et g) et 40 µM (d et h) d'Ag-A.

Ces expériences ont aussi souligné la grande similarité entre la forme murine (mumAb) et humanisée (hzmAb), en termes de sélectivité et affinité. Ces observations ont aussi conforté la fiabilité du processus d'humanisation.

### 3. Objectifs

Dans ce contexte et à partir des observations précédentes, nous avons mis en place une stratégie analytique combinant MS native et HDX-MS de manière à apporter une caractérisation structurale du complexe mAb/Ag la plus complète possible. De plus, deux autres anticorps (le mAb2 et mAb3) ayant la capacité de se lier aussi sur cette même cible antigénique, sont venus élargir et compléter notre approche de caractérisation structurale de complexes immuns. Ici, nos objectifs se sont articulés autour de deux points majeurs :

- Etablir les stœchiométries d'interaction pour les 3 mAbs avec leur cible antigénique-A par une approche de MS native.
- Déterminer les épitopes de l'antigène 3 anticorps par HDX-MS.

de manière à établir un lien précis entre l'interaction sélective entre l'Ag-A sous une forme dimérique et le mAb1.

### 4. Résultats

#### 4.1. Détermination des stœchiométries d'interaction Fab/Ag par MS native

##### 4.1.1. Analyse des sous-unités individuelles

De manière à déterminer précisément les stœchiométries d'interaction, nous avons choisi de travailler sur les fragments Fabs des mAbs (porteurs des CDRs responsables de la reconnaissance de l'Ag). Ces derniers ont été générés par digestion à la papaïne, enzyme clivant les mAbs en dessus de leur région charnière. Avant de réaliser les titrations, les composés ont été caractérisés de façons individuelles en conditions dénaturantes et natives.

#### 4.1.1.1. Analyse de l'antigène-A

La caractérisation de l'Ag-A en conditions dénaturantes et natives (respectivement figure 27 a et b) permet de mettre en évidence une forme monomérique majoritaire à  $24543 \pm 1$  Da et une forme dimérique non-covalente minoritaire à  $49085 \pm 1$  Da, pour une concentration de  $5 \mu\text{M}$ .

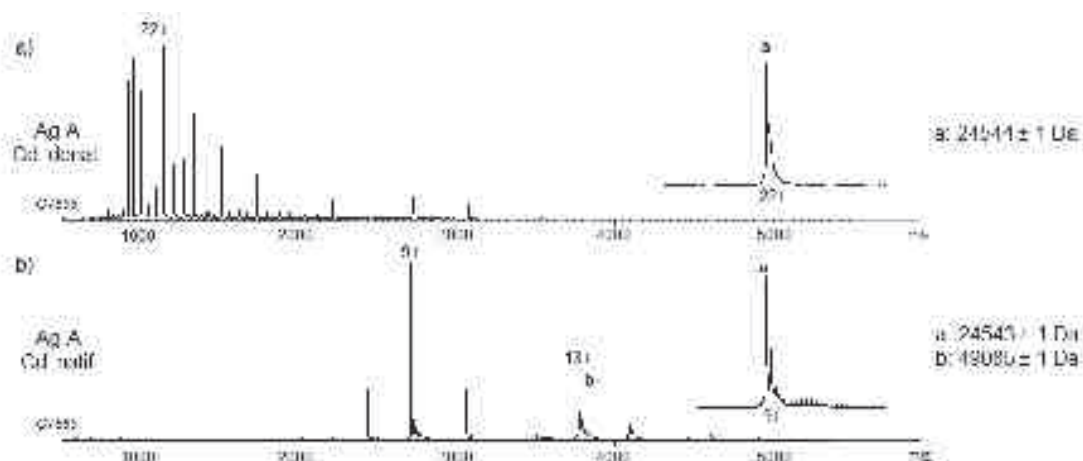


Figure 27. Caractérisation de l'antigène-A en conditions dénaturantes et natives. L'échantillon est infusé à  $2 \mu\text{M}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH} : 50/50/1$ ) ( $V_c : 40 \text{ V}$ ,  $P_i : 2.1 \text{ mbar}$ ) en conditions dénaturantes (a) et à  $5 \mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$   $150 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} 7.5$ ) ( $V_c : 120 \text{ V}$ ,  $\text{Trap}$  et  $\text{Transfer CE} : 10$  et  $30 \text{ V}$ ,  $P_i : 6 \text{ mbar}$ ) en conditions natives (b).

Afin de vérifier l'observation faite sur la tendance à dimériser de l'Ag-A, nous avons réalisé des analyses en MS natives pour suivre l'état d'oligomérisation en fonction de sa concentration (figure 28).

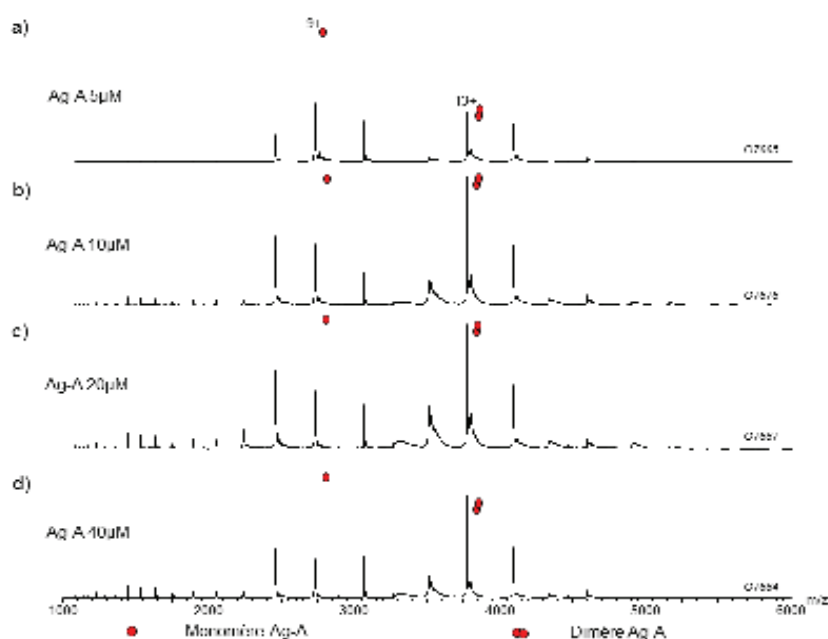


Figure 28. Suivi de l'état d'oligomérisation de l'antigène-A en fonction de sa concentration, par MS native. L'échantillon est infusé à  $5$  (a),  $10$  (b),  $20$  (c) et  $40 \mu\text{M}$  (d) en conditions natives ( $\text{AcONH}_4$   $150 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} 7.5$ ) sur le Synapt G2 HDMS ( $V_c : 120 \text{ V}$ ,  $\text{Trap}$  et  $\text{Transfer CE} : 4$  et  $0 \text{ V}$ ,  $P_i : 6 \text{ mbar}$ ).

Cette expérience permet bien de mettre en évidence la prédisposition de cet Ag à dimériser. En effet plus la concentration d'Ag-A est importante plus la proportion de dimère augmente. Toutefois, cette observation est en accord avec les données cristallographiques qui décrivent deux molécules d'Ag-A s'associant au travers d'interactions ioniques et hydrophobes.

#### *4.1.1.2. Analyse du Fab(mAb1)*

Concernant le Fab(mAb1) (figure 29 a et b), il est bien détecté à la masse attendue sous une forme monomérique à  $48486 \pm 1$  Da. Toutefois, une espèce à  $48369 \pm 1$  Da est aussi détectée, celle-ci correspondant à un fragment avec un site de coupure localisé deux acides aminés en amont.

#### *4.1.1.3. Analyse du Fab (mAb2)*

Au sujet du Fab(mAb2), il est caractérisé sous une forme monomérique mais hétérogène (figure 29 c et d). Nous remarquons la présence de quatre espèces faisant références à différents sites de coupures de l'enzyme. Deux espèces se retrouvent ici majoritaires avec des masses de  $46469 \pm 1$  Da et  $47233 \pm 1$  Da.

#### *4.1.1.4. Analyse du Fab(mAb3)*

Pour ce qui est du Fab(mAb3), là aussi il est caractérisé sous une forme monomérique et hétérogène (figure 29 e et f). Cependant, une espèce caractérisée à  $48797 \pm 1$  Da est ici largement majoritaire. Les séquences des mAbs 2 et 3 n'étant pas accessibles dans les bases de données, il n'est pas possible de déterminer quels acides aminés sont clivés, par une simple analyse MS.



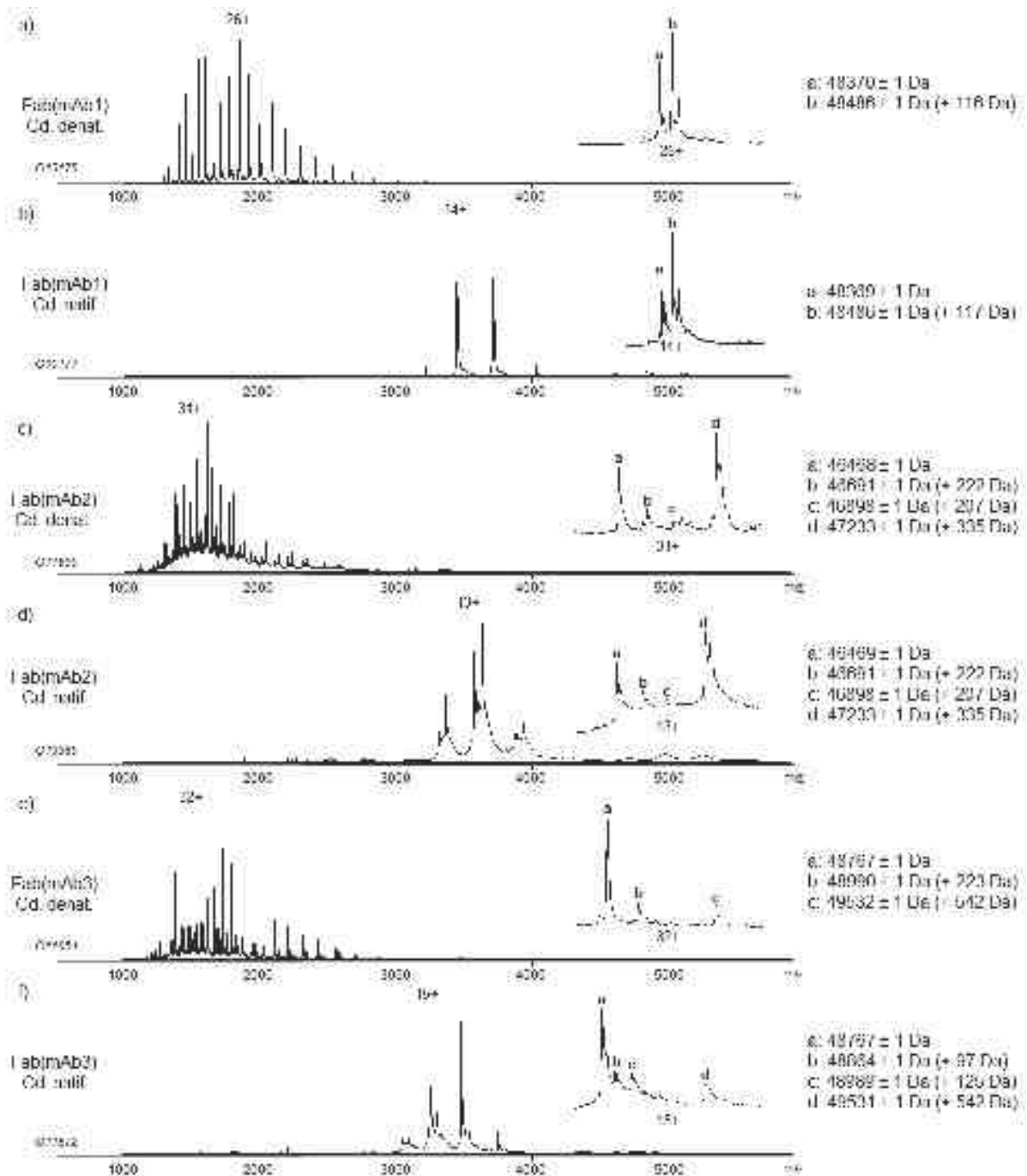


Figure 29. Caractérisation des fragments Fabs en conditions dénaturantes et natives. Les Fabs (mAb1), (mAb2), et (mAb3) sont infusés à 2 $\mu$ M (H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH : 50/50/1) (Vc : 40 V, Pi : 2.1 mbar) en conditions dénaturantes (respectivement a, c, et e), et à 5  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) (Vc : 120 V, Trap et Transfer CE : 10 et 30 V, Pi : 6 mbar) en conditions natives (respectivement b, d et f).

#### 4.1.2. Analyse des complexes Fab/Ag

Dans le but de déterminer les stœchiométries d'interaction, des expériences de titrage sont réalisées. Une concentration fixe en Fab (5  $\mu$ M) est mise en présence de concentrations croissantes en Ag-A, puis les mélanges sont analysés par MS native.

##### 4.1.2.1. Complexe *Fab(mAb1)/Ag-A*

L'addition de l'Ag-A en large excès au Fab(mAb1) conduit à la formation d'espèces de plus hauts rapports m/z (figure 30a et b). Avec l'augmentation de la concentration en Ag-A, nous observons des changements dans l'état d'oligomérisation de l'Ag, mais aussi la formation de composés avec des masses de  $73033 \pm 1$  Da and  $97584 \pm 4$  Da correspondant à des complexes Fab:Ag avec des stœchiométries respectives de 1:1 et 1:2 (tableau 5). Aucune espèce faisant référence au Fab seul ou à des complexes d'ordres supérieurs n'a été observée, reflétant bien qu'un Fab(mAb1) est capable de fixer une ou deux molécules d'Ag-A, c'est-à-dire au maximum un dimère d'Ag-A ; ce qui est en accord avec ce qui a été observé sur la forme entière de l'anticorps (figure 26).

##### 4.1.2.2. Complexe *Fab(mAb2)/Ag-A*

Concernant le Fab(mAb2), l'ajout d'Ag-A en large excès (6 équivalents) mène à la formation de plusieurs complexes non-covalents (figure 30c et d) faisant références à des stœchiométries d'interaction Fab:Ag de 1:1 et 1:2 avec des masses respectives de  $71778 \pm 5$  Da and  $96358 \pm 10$  Da (tableau 5). Là aussi, même en large excès d'Ag-A, aucune espèce correspondant à des complexes avec des stœchiométries supérieures n'est observée, traduisant une capacité de ce Fab à lier au maximum un dimère d'Ag-A.

##### 4.1.2.3. Complexe *Fab(mAb3)/Ag-A*

Dans le cas d'ajout de l'Ag-A en forte concentration (6 équivalents) au Fab(mAb3), un seul composé faisant référence à un complexe Fab:Ag est détecté (figure 30e et f). Malgré la présence majoritaire de dimère d'Ag-A et une désolvation des ions non optimale, une espèce à  $73311 \pm 1$  Da a été caractérisée correspondant à un complexe Fab:Ag avec une stœchiométrie de 1:1 (tableau 5). Cette observation montre le caractère particulier de ce Fab comparé au deux précédents, dans le sens où il ne peut lier qu'un seul monomère d'Ag-A.

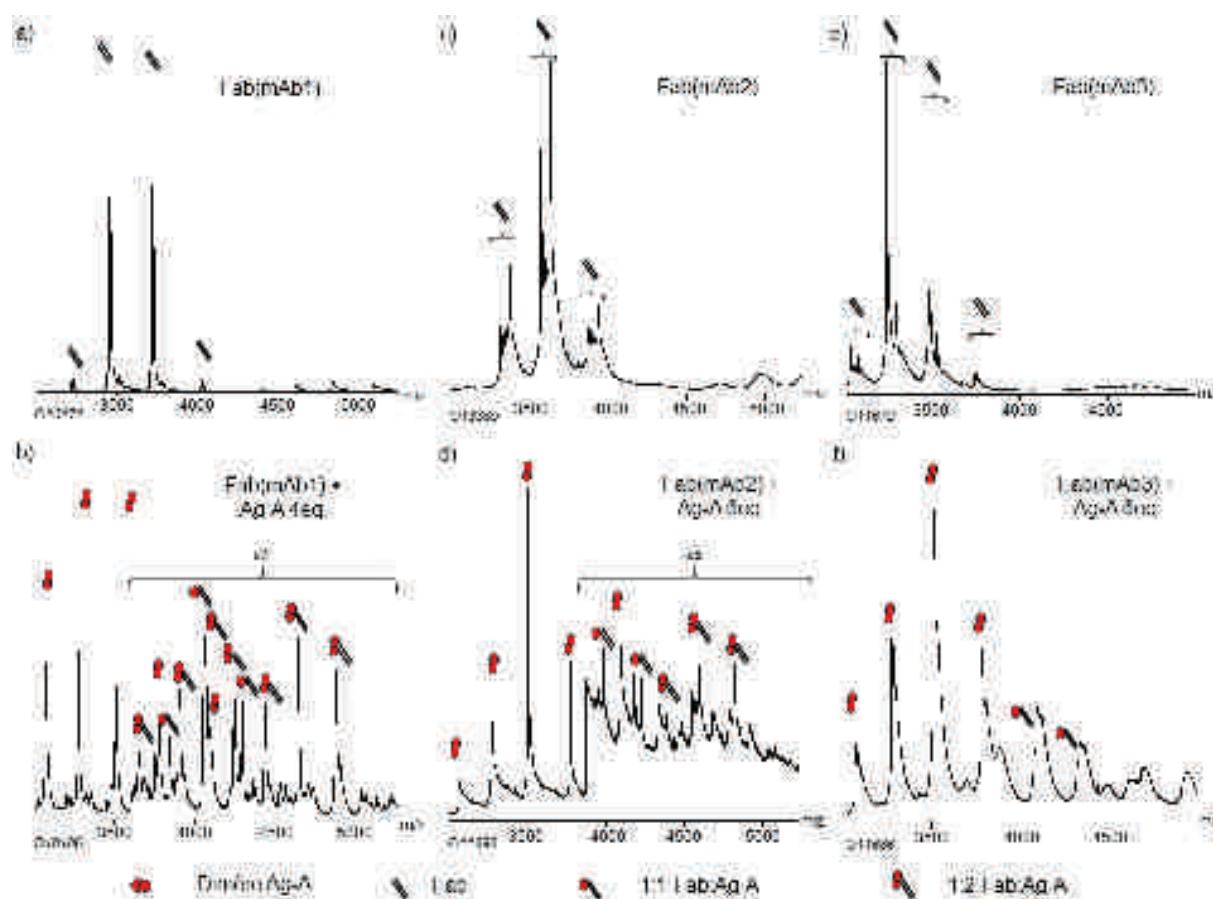


Figure 30. Titrations des fragments Fabs par l'antigène-A. Les Fabs (mAb1), (mAb2), et (mAb3) sont analysés à 5  $\mu$ M, seuls (respectivement a, c et e) et en large excès d'Ag-A (respectivement b, d et f) par MS native ( $\text{AcONH}_4$  150mM, pH 7.5) sur le Synapt G2 HDMS ( $V_c$  : 120 V, Trap et Transfer CE : 10 et 30 V,  $P_i$  : 6 mbar).

Composé	Stœchiométrie d'interaction	Masse expérimentale (Da)
Ag A	monomère	24543 $\pm$ 1
	dimère	48005 $\pm$ 1
Fab(mAb1) - Ag A	1:0	48108 $\pm$ 1
	1:1	73033 $\pm$ 1
	1:2	87567 $\pm$ 1
Fab(mAb2) - Ag A	1:0	47233 $\pm$ 1
	1:1	71776 $\pm$ 5
	1:2	86356 $\pm$ 10
Fab(mAb3) - Ag A	1:0	46767 $\pm$ 1
	1:1	73011 $\pm$ 1
	1:2	

Tableau 5. Masses moléculaires mesurées lors des titrations des Fabs par l'antigène-A.

Si nous observons des stœchiométries d'interaction bien distinctes entre les Fabs(mAb1 et mAb2) et le Fab(mAb3), il n'en demeure pas moins qu'une différence de comportement est aussi observée pour les deux premiers. En effet, si le nombre de molécules d'Ag-A fixée est le

même, les proportions des espèces Fab:Ag 1:1 et 1:2 diffèrent (figure 31). A partir des intensités de chaque espèce observée (complexes 1:1 et 1:2), la proportion de ces derniers a été établie, et il en ressort que le Fab(mAb1) semble présenter une affinité supérieure pour l'Ag-A comparée au Fab(mAb2). Ces différences observées pour ces trois Fabs, en terme de stœchiométries d'interaction et/ou d'affinité relative pour l'Ag-A, montrent bien le caractère spécifique de la formation de ces complexes et pourraient être expliquée par des sites de fixation à l'Ag différents.

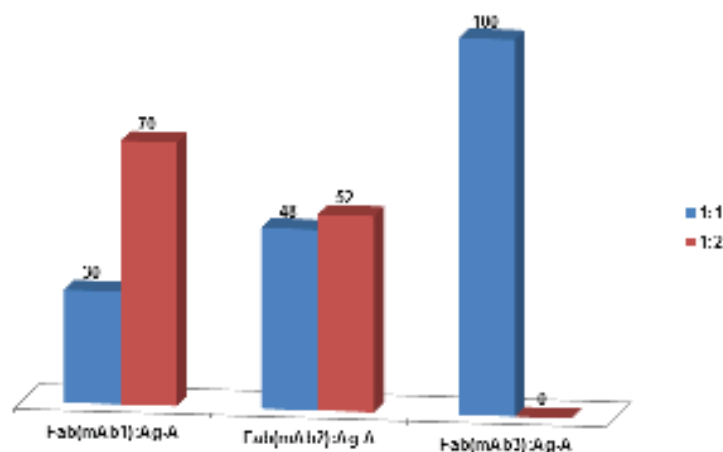


Figure 31. Stœchiométries d'interactions Fab:Ag en large excès d'Ag-A. Les proportions de Fab:Ag 1:1 et 1:2 sont représentés respectivement en bleu et rouge, avec le pourcentage associé à chaque composé.

Ces différentes expériences de MS natives, nous ont permis ici de caractériser les trois complexes Fab/Ag, et de montrer que :

- Les mAbs 1 et 2 fixent un ou deux Ag-A, alors que le mAb3 est en capacité d'en fixer qu'un seul.
- L'affinité de l'Ag-A est supérieure pour le mAb1 que pour le mAb2.

#### 4.2. Détermination des épitopes

Afin d'apporter un élément d'explication aux observations faites en MS native et d'aller plus loin dans la caractérisation structurale de ces composés, nous avons entrepris des expériences d'HDX-MS. L'objectif étant ici de déterminer les épitopes mais aussi de démontrer l'apport de cette approche avec un minimum de préparation d'échantillon par rapport aux techniques classiquement utilisées dans ce cas, nous avons choisi de travailler sur les formes entières des trois mAbs.

#### 4.2.1. Optimisation de la couverture de séquence de l'antigène-A

Avant de réaliser les comparatifs d'incorporation en deutérium entre Ag seul et complexe mAb/Ag, nous avons pris soin d'obtenir la couverture de séquence de l'Ag-A la plus complète possible. Nos optimisations se sont portées ici sur la nature du tampon de « quench », pour 100 pmoles de matériel injecté et une durée de « quench » de 30 secondes. Pour cela, nous avons évalué le taux de recouvrement obtenu pour trois tampons (figure 32 et tableau 6) :

- 100 mM phosphate, pH 2.4
- 100 mM phosphate, 2 M GndHCl, 0.1 mM TCEP, pH 2.4
- 100 mM phosphate, 2 M GndHCl, 100 mM TCEP, pH 2.4

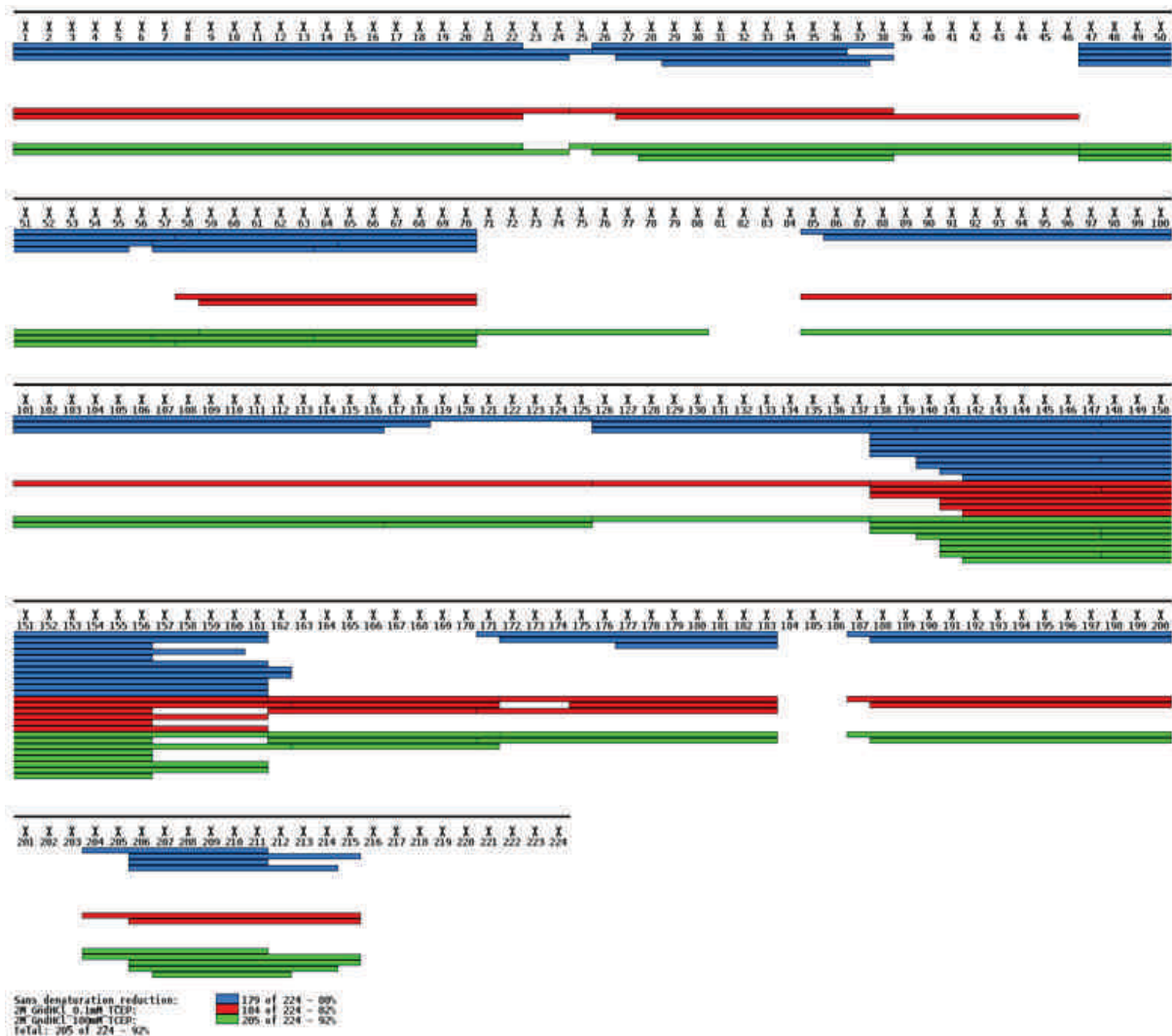


Figure 32. Optimisation la couverture de séquence de l'antigène-A pour une quantité injectée de 100 pmoles. Les peptides identifiés pour un tampon de quench sans agent dénaturant ni réducteur, avec 2 M GdnHCl 0.1 mM TCEP, puis 2 M GdnHCl 100 mM TCEP sont respectivement représentés en bleu, rouge et vert.

Échantillon	Tampon de « quench »	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Ag-A (190 acides)	Sans dénaturant/réducteur	80	2.7
	2M GndHCl, 0.1mM TCEP	82	2.1
	2M GndHCl, 100mM TCEP	92	2.7

Tableau 6. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 32.

Nous pouvons remarquer ici l'influence de la présence et la concentration en agent dénaturant et réducteur. Ainsi, avec une dénaturation juste par ajout d'une solution acide, la couverture est de 80%. Si la couverture de séquence n'est que très légèrement augmentée (82%) avec l'ajout de GndHCl (2 M) et TCEP (0.1 mM), elle passe à plus de 90% avec l'augmentation de la concentration de TCEP (100mM). L'augmentation de la concentration en agent réducteur doit ici prévenir les phénomènes d'oxydation et de formation de ponts disulfures. Après optimisation de ce tampon, le taux de recouvrement est ici largement satisfaisant puisqu'il dépasse les 90% avec un indice de redondance de 2.7.

#### 4.2.2. Les analyses comparatives

Pour ce qui est des peptides analysés au cours du marquage différentiel, ils sont au nombre de 42 (représentant les 92% de couverture) sauf dans le cas de l'interaction avec le mAb2 où la région 40-59 de l'Ag-A ne peut être suivie. Les différentiels d'incorporation relatifs entre l'état libre de l'Ag-A et l'état complexé sont présentés pour tous les temps d'exposition au solvant deutéré (figure 33). Les différentiels relatifs caractérisés à 60 minutes d'exposition sont ensuite transposés directement sur la structure cristallographique de l'Ag-A (figure 34).

##### 4.2.2.1. Ag-A vs. Ag-A/mAb1

La liaison du mAb1 semble affecter majoritairement deux zones, la 1-24 et la 59-70, qui présentent des taux d'incorporation réduits dans l'état complexé (figures 33a, 34a et b). Les autres régions de l'Ag-A n'apparaissent pas réellement impactées par la liaison du mAb1. D'un point de vue structural, les zones 1-24 et 59-70 sont spatialement très proches. En effet elles se trouvent sur la même face du domaine N-ter de l'Ag, ce qui pourrait suggérer ici un épitope conformationnel.



#### 4.2.2.2. *Ag-A vs. Ag-A/mAb2*

L'interaction du mAb2 induit de plus nombreux changements d'incorporation en deutérium (figures 33b, 34c et d). En effet deux régions ont un taux de deutération réduit dans leur état complexé. C'est le cas de la région N-ter 1-24 pour laquelle le différentiel augmente au cours du temps de marquage, mais aussi la zone 187-200 qui apparaît plus marquée (figures 33b et 34 d). Notons ici que la différence d'incorporation pour la zone 1-24 est moins importante que dans le cas du mAb1, ceci pouvant être dû à une affinité moins bonne du mAb2 pour l'Ag-A. Cependant deux autres régions apparaissent impactées par la liaison du mAb2, localisées entre les acides aminés 101-118 et 163-171. Celles-ci présentent des taux d'échange supérieur, se traduisant par une exposition accrue de ces zones au solvant deutéré en raison d'un réarrangement conformationnel.

#### 4.2.2.3. *Ag-A vs. Ag-A/mAb3*

Concernant le mAb3, son interaction avec l'Ag-A induit une seule réduction du taux de deutération, localisée dans la zone 85-94. La résolution de cette dernière a pu être améliorée grâce à la redondance peptidique générée (figure 34f). Cette région se situe dans le domaine N-ter sur la face opposée à la zone 1-24 mise en évidence pour le mAb1 et mAb2 (figure 34e). Toutefois, la fixation du mAb3 induit aussi des changements conformationnels associés à des régions qui deviendraient plus exposées à la surface de la protéine comme c'est le cas pour les zones 34-38, 66-70 et 142-147 (figures 33c et 34e).

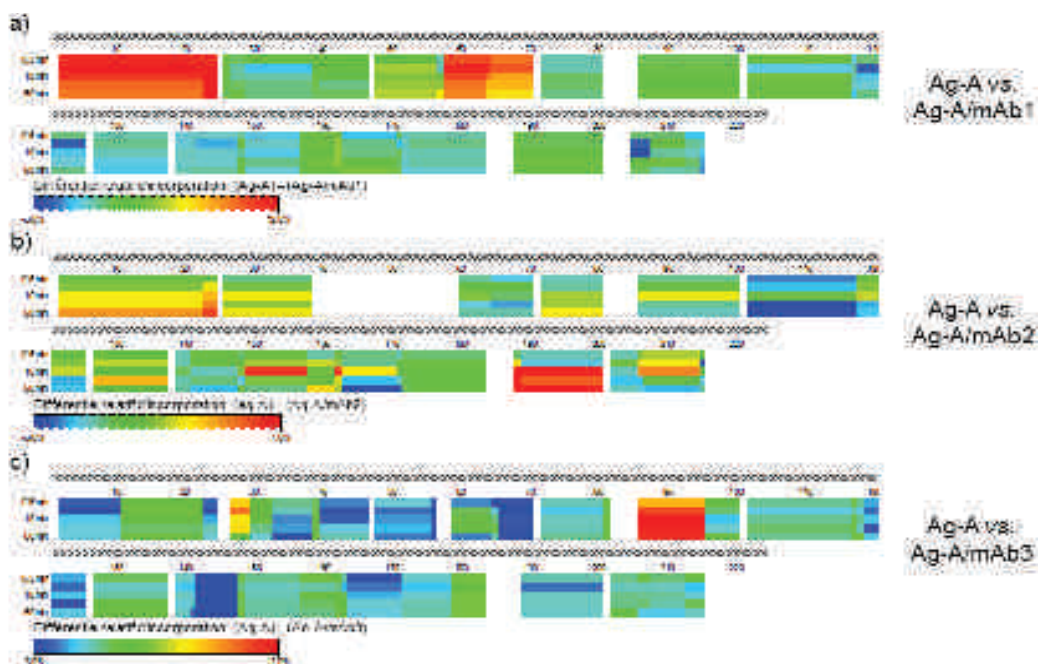


Figure 33. Différentiels relatifs d'incorporation en deutérium entre l'état libre de l'antigène-A et l'état complexé Ag-A / mAb1 (a), Ag-A / mAb2 (b) et Ag-A / mAb3 (c).

Le code couleur pour le différentiel relatif d'incorporation est indiquée en bas à gauche (les couleurs froides correspondent à des zones qui intègrent plus de deutérium dans l'état complexé et deviennent ainsi plus exposées au tampon deutéré; tandis que les couleurs chaudes sont associées à des zones qui intègrent moins de deutérium dans l'état complexé et sont donc à l'abri du tampon de marquage).

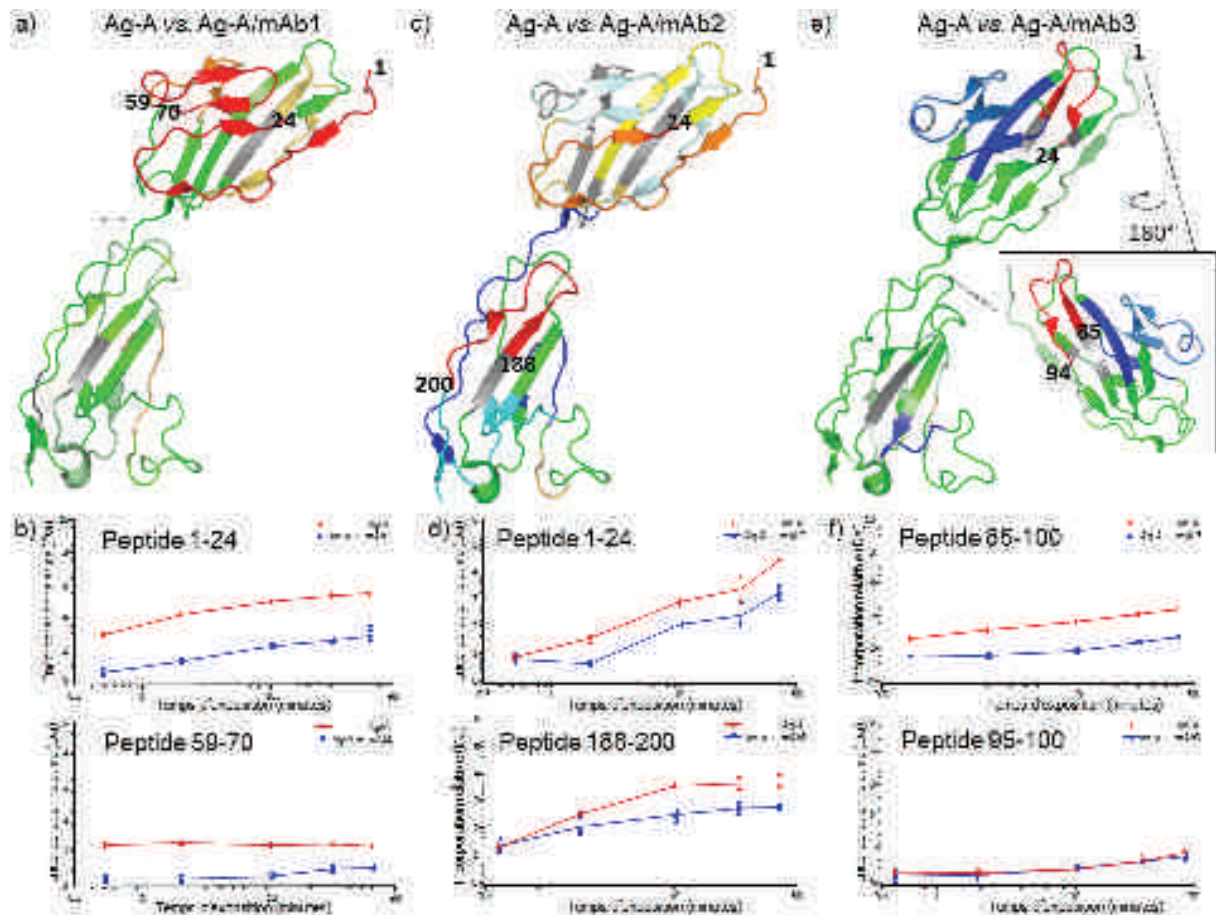


Figure 34. Différentiels relatifs d'incorporation en deutérium à 60 minutes d'exposition représentés sur la structure cristallographique de l'Ag-A (les palettes de couleurs appliquées en figure 19a, 19b and 19c sont respectivement les mêmes en 20a, 20c and 20e). Pour le panel du bas, les graphiques représentent le taux d'incorporation relative en deutérium pour des peptides d'intérêt de l'Ag-A dans leur état libre (droites rouges) et complexé au mAb1 (b), mAb2 (d) et mAb3 (f) (droites bleues) en fonction du temps d'exposition.



#### 4.2.2.4. Discussion autour des résultats HDX-MS

Des épitopes potentiels ont été déterminés pour les trois mAbs (figure 35a). Concernant le mAb1 et le mAb2, ces derniers partagent une zone commune localisée sur le fragment N-ter 1-24 de l'Ag. Cependant des disparités en termes de différence d'incorporation sont notées, montrant déjà une nuance de comportement subtile entre ces deux mAbs. Toutefois, ces mAbs présentent une deuxième région bien distincte l'une de l'autre. La région 59-70 pour le mAb1 est aussi mise en évidence par HDX-MS.

De manière orthogonale, des expériences d'excision d'épitope ont été menées par nos collaborateurs, qui ont permis de mettre en évidence la région 1-12 de l'Ag-A. Ces observations participent à valider les résultats générés en HDX-MS, et à montrer l'apport de cette technique comparé à la protéolyse ménagée notamment dans le cas d'épitope conformationnel.

Concernant le mAb2, la zone 188-200 a aussi été mise en évidence. Toutefois, une étude fonctionnelle a permis de mettre en évidence que les voies de signalisation cellulaires pouvaient être bloquées par les peptides synthétiques 1-23 et 70-82. Si le premier correspond à une zone mise en évidence par HDX-MS, ce n'est pas le cas du deuxième. La zone 188-200 pourraient alors être identifiée, en conséquence d'un changement conformationnel induisant une diminution de l'accessibilité au solvant deutéré.

Concernant le mAb3, ce dernier présente un épitope potentiel linéaire dans la zone 85-94, ce qui fait totalement sens avec les expériences de *Phage Display*, déterminant une zone composée des acides aminés 84 à 96. Un autre argument est tiré de la structure cristallographique même de l'Ag-A (figure 35b), sur laquelle nous pouvons visualiser que l'épitope du mAb3 est situé à l'interface de dimérisation de l'Ag. La fixation du mAb3 inhiberait donc la dimérisation de l'Ag-A, ceci étant vérifié avec la stœchiométrie d'interaction déterminée par MS native. Les épitopes potentiels des mAb1 et mAb2 se situant hors de cette zone de dimérisation, cela expliquerait aussi les stœchiométries d'interaction observées pour ces mAbs en MS native.

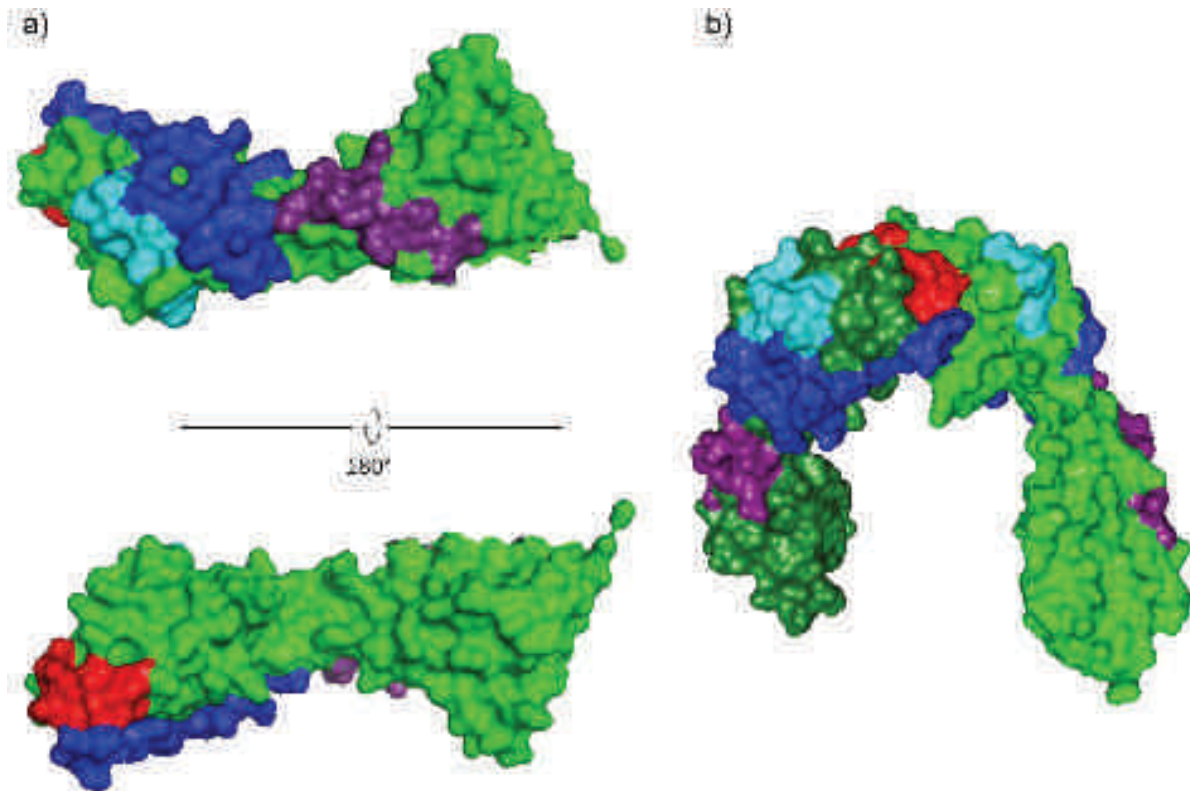


Figure 35. Représentation de surface des trois épitopes potentiels pour chaque mAb mis en évidence par HDX-MS. Sur le panel (a) sont superposés les trois épitopes, où la zone bleue est région commune aux épitopes du mAb1 et mAb2, la zone cyan est spécifique au mAb1, la zone violette est propre au mAb2 et la surface rouge et exclusive au mAb3. Le panel (b) représente les 3 épitopes sur la structure dimérique de l'Ag-A. Cette vue permet notamment de mettre en évidence la localisation de l'épitope du mAb3, situé à l'interface de dimérisation.

## 5. Conclusions

Les approches combinées de MS native et HDX-MS montrent ici tout leur intérêt pour la caractérisation de complexes mAb/Ag. Si les expériences de MS native ont permis de déterminer des stœchiométries d'interaction sans ambiguïté, les données de HDX-MS ont permis de les expliquer. Concernant l'approche HDX-MS, nous avons pu montrer son apport quand les techniques bio-structurales les plus résolutes comme la RMN ou la cristallographie ne permettent pas de caractériser ce type de complexe. L'approche échange H/D étant une technique comparative indirecte, il serait confortable de valider les résultats obtenus par d'autres méthodes utilisant des mutants des régions mises en évidence. Toutefois, les résultats générés ont permis de montrer l'intérêt grandissant de cette approche en comparaison à des techniques de caractérisation d'épitope plus empiriques.

## 6. Valorisation

Ces travaux ont fait l'objet des communications suivantes :

### **Publication :**

Guillaume Terral, Thierry Champion, François Debaene, Elsa Wagner-Rousset, Alain Beck, Sarah Cianférani. « A combination of biophysical and mass spectrometry-based approaches to decipher mAb/antigen complexes with different binding stoichiometries ». *mAbs*, *soumis*.

### **Communication orale :**

Guillaume Terral, Alain Van Dorsselaer, Sarah Cianférani. « Caractérisation structurale de complexes protéiques non covalents par Echanges Hydrogène/Deutérium couplés à la spectrométrie de masse ». XIX<sup>e</sup> rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse, Mars 2014 Dieppe, France.

### **Communication par affiche :**

Guillaume Terral, François Debaene, Julien Marcoux, Amandine Bœuf, Elsa Wagner-Rousset, Nathalie Corvaia, Alain Van Dorsselaer, Alain Beck, Sarah Cianférani. « Native MS and IM-MS characterization of lysine- and cysteine-linked antibody drug conjugates (ADC) ». Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, Septembre 2015, Ajaccio, France.

## *Conclusion de cette partie*

Le travail présenté dans cette partie a été centré sur le développement de méthodologies pour la caractérisation d'anticorps thérapeutiques et de complexes immuns qui leur sont associés. L'apparition d'une nouvelle génération d'anticorps, dits conjugués, a nécessité le développement de nouvelles approches pour faire face à l'hétérogénéité croissante de ces composés. La détermination des zones d'interaction d'un anticorps au niveau de sa cible constitue une autre problématique, dans le sens où les techniques biophysiques à haute résolution ne permettent pas de caractériser ce type de composés, et que les techniques jusqu'alors utilisées sont chronophages et/ou peu résolutive.

Dans ce contexte, deux objectifs principaux ont été établis :

- Evaluer l'apport de la MS native à haute résolution pour la caractérisation détaillée d'ADC.
  - Développer des stratégies analytiques alternatives pour la détermination d'épitopes.
- L'évaluation de la MS native à haute résolution a été réalisée à travers la comparaison d'un instrument de dernière génération (Orbitrap Exactive Plus EMR) avec un instrument à résolution intermédiaire (Q-TOF Synapt G2 HDMS). Les deux ADCs aujourd'hui commercialisés ont constitué les analytes de référence.

Cette approche comparative a notamment permis de montrer l'intérêt de la MS native à haute résolution pour l'analyse d'ADCs non-covalents, mais aussi covalents. La capacité de désolvatation de l'Exactive Plus EMR couplé à une résolution accrue de l'analyseur permettent de caractériser les profils de distribution  $D_n$ , les DARs moyens et les masses des composés avec grande précision ( $< 40$  ppm pour le brentuximab vedotin, et  $< 10$  ppm pour le trastuzumab emtansine). Néanmoins une attention particulière doit être apportée au moment du retraitement, de manière à ne pas discriminer des espèces qui pourraient apparaître dans les plus bas rapports  $m/z$ .

Si les instruments de type Orbitrap accèdent à des précisions de mesure de masse considérables, les instruments de type Q-TOF ne sont pas encore totalement dénués d'intérêt. En effet, leur transmission homogène sur une plus large gamme de masse est avérée. De plus, une optimisation instrumentale rigoureuse, associée à des optimisations expérimentales (réduction de charge dans le cas du TDM1) permettent aussi de caractériser les « quality attributes » d'un ADC (proportion  $D_n$  et DAR moyen).

- L'étude à large échelle de trois anticorps ayant la capacité de se lier à un antigène commun, a permis de démontrer l'intérêt de combiner la MS native et l'HDX-MS pour une caractérisation structurale détaillée. Alors que la MS native a déterminé les stœchiométries d'interaction différentielles, la détermination des épitopes a permis de les expliquer.

La stratégie analytique ici mise en place, illustre le potentiel de l'HDX-MS pour la détermination d'épitopes, et notamment les épitopes conformationnels. Cette approche, peu consommatrice d'échantillon, permet de les caractériser dans une gamme de temps restreinte (quelques jours) avec une bonne résolution (de l'ordre du peptide dans nos conditions ; au niveau de l'acide aminé avec une fragmentation ETD). S'il convient de confirmer les résultats par des approches orthogonales (Ala-scan, ...), cette méthode se présente comme une alternative au phage display, protéolyse ménagée ou excision d'épitope.

En conclusion, l'ensemble de ces développements méthodologiques ouvrent des perspectives intéressantes pour l'industrie pharmaceutique, et notamment la caractérisation d'agent thérapeutique de complexité croissante, et la détermination d'épitopes de façon plus rapide et résolutive.

## Références bibliographiques

1. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(5): p. 345-352.
2. Ecker, D.M., S.D. Jones, and H.L. Levine. *The therapeutic monoclonal antibody market*. in *MAbs*. 2015: Taylor & Francis.
3. Reichert, J.M. *Marketed therapeutic antibodies compendium*. in *MAbs*. 2012: Taylor & Francis.
4. Reichert, J.M., et al. *9th Annual European Antibody Congress, November 11–13, 2013, Geneva, Switzerland*. in *MAbs*. 2014: Taylor & Francis.
5. Schneider, C.K., *Monoclonal antibodies-regulatory challenges*. Current pharmaceutical biotechnology, 2008. **9**(6): p. 431-438.
6. Fougereau, M., *Les anticorps monoclonaux : un fantastique arsenal thérapeutique en plein devenir*. Médecine/Sciences, 2009. **25**: p. 997-998.
7. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**: p. 495-497.
8. Van De Donk, N., et al., *Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma*. Leukemia, 2012. **26**(2): p. 199-213.
9. Wu, Y., Lefranc, M-P., *IMGT*. *IMGT* [http://www.imgt.org/IMGTeducation/IMGTlexique/A/ADCC\\_and\\_CDC.html](http://www.imgt.org/IMGTeducation/IMGTlexique/A/ADCC_and_CDC.html), 2006.
10. 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.
11. Jefferis, R., *Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics*. Nature reviews Drug discovery, 2009. **8**(3): p. 226-234.
12. 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.
13. Casi, G. and D. Neri, *Antibody–drug conjugates: basic concepts, examples and future perspectives*. Journal of controlled release, 2012. **161**(2): p. 422-428.
14. Carter, P.J. and P.D. Senter, *Antibody-drug conjugates for cancer therapy*. The Cancer Journal, 2008. **14**(3): p. 154-169.
15. Polakis, P., *Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy*. Pharmacological reviews, 2016. **68**(1): p. 3-19.
16. Iyer, U. and V. Kadambi, *Antibody drug conjugates—Trojan horses in the war on cancer*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2011. **64**(3): p. 207-212.
17. CARLSON, B., *Antibody-drug conjugates: where the action is: ADCs—the New Frontier*. Biotechnology healthcare, 2012. **9**(4): p. 28.
18. Haeuw, J.-F., V. Caussanel, and A. Beck, *[Immunoconjugates, drug-armed antibodies to fight against cancer]*. Medecine sciences: M/S, 2009. **25**(12): p. 1046-1052.
19. Beck, A., et al., *The next generation of antibody-drug conjugates comes of age*. Discovery medicine, 2010. **10**(53): p. 329-339.
20. Beck, A., et al., *Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates*. Expert review of proteomics, 2016(just-accepted).
21. 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.



22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Chudasama, V., A. Maruani, and S. Caddick, *Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates*. *Nature Chemistry*, 2016. **8**(2): p. 114-119.
26. Strop, P., et al., *Site-specific conjugation improves therapeutic index of antibody drug conjugates with high drug loading*. *Nature biotechnology*, 2015. **33**(7): p. 694-696.
27. Stojko, J., *Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macromolécules et de leurs complexes associés*. 2016.
28. Chen, Y., *Drug-to-antibody ratio (DAR) by UV/Vis spectroscopy*. *Antibody-Drug Conjugates*, 2013: p. 267-273.
29. Le, L.N., et al., *Profiling antibody drug conjugate positional isomers: a system-of-equations approach*. *Analytical chemistry*, 2012. **84**(17): p. 7479-7486.
30. 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.
31. Ouyang, J., *Drug-to-antibody ratio (DAR) and drug load distribution by hydrophobic interaction chromatography and reversed phase high-performance liquid chromatography*. *Antibody-Drug Conjugates*, 2013: p. 275-283.
32. Haverick, M., et al. *Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: overview and applications*. in *MABs*. 2014: Taylor & Francis.
33. 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.
34. Lin, J. and A.C. Lazar, *Determination of charge heterogeneity and level of unconjugated antibody by imaged cIEF*. *Antibody-Drug Conjugates*, 2013: p. 295-302.
35. Valliere-Douglass, J.F., W.A. McFee, and O. Salas-Solano, *Native intact mass determination of antibodies conjugated with monomethyl Auristatin E and F at interchain cysteine residues*. *Analytical chemistry*, 2012. **84**(6): p. 2843-2849.
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. Van der Horst J. et al, *Improving desolvation on Q-ToF instruments for native MS applications*. 5th Symposium on Structural proteomics, 2015.
38. Rose, R.J., et al., *High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies*. *Nature methods*, 2012. **9**(11): p. 1084-1086.
39. 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.
40. 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.
41. Thompson, N.J., S. Rosati, and A.J. Heck, *Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies.* *Methods*, 2014. **65**(1): p. 11-17.
  42. Thompson, N.J., et al. *Complex mixtures of antibodies generated from a single production qualitatively and quantitatively evaluated by native Orbitrap mass spectrometry.* in *MAbs*. 2014: Taylor & Francis.
  43. 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.
  44. 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.
  45. 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.
  46. Shoemaker, G.K., et al., *Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry.* *Molecular & Cellular Proteomics*, 2010. **9**(8): p. 1742-1751.
  47. Snijder, J., et al., *Studying 18 MDa virus assemblies with native mass spectrometry.* *Angewandte Chemie International Edition*, 2013. **52**(14): p. 4020-4023.
  48. 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.
  49. Atmanene, C., *Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectroétrie de masse supramoléculaire.* 2009.
  50. 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.
  51. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis.* *Analytical chemistry*, 2000. **72**(6): p. 1156-1162.
  52. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer.* *Journal of mass spectrometry*, 2005. **40**(4): p. 430-443.
  53. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics.* *Proteomics*, 2006. **6**(S2): p. 16-21.
  54. 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.
  55. Debaene, F.o., 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.
  56. 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.
  57. Catalina, M.I., et al., *Decharging of globular proteins and protein complexes in electrospray.* *Chemistry—A European Journal*, 2005. **11**(3): p. 960-968.
  58. Pagel, K., et al., *Alternate dissociation pathways identified in charge-reduced protein complex ions.* *Analytical chemistry*, 2010. **82**(12): p. 5363-5372.
  59. 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.



60. 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.
61. Terral, G., *Insights from native mass spectrometry and ion mobility for antibody and antibody-based product characterization* Journal of Chromatography B, 2016.
62. 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.
63. Beck, A., et al., *Characterization of therapeutic antibodies and related products*. Analytical chemistry, 2012. **85**(2): p. 715-736.
64. Jefferis, R., *Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012. **526**(2): p. 159-166.
65. Qian, R., R. Mhatre, and I. Krull, *Characterization of antigen-antibody complexes by size-exclusion chromatography coupled with low-angle light-scattering photometry and viscometry*. Journal of Chromatography A, 1997. **787**(1): p. 101-109.
66. Santora, L., et al., *Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography, and BIAcore*. Analytical biochemistry, 2001. **299**(2): p. 119-129.
67. Sanny, C.G., *Antibody-antigen binding study using size-exclusion liquid chromatography*. Journal of Chromatography B, 2002. **768**(1): p. 75-80.
68. Rehder, D.S., et al., *Isomerization of a single aspartyl residue of anti-epidermal growth factor receptor immunoglobulin  $\gamma$ 2 antibody highlights the role avidity plays in antibody activity*. Biochemistry, 2008. **47**(8): p. 2518-2530.
69. Oda, M. and T. Azuma, *Affinity maturation of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl antibodies accompanies a modulation of antigen specificity*. Molecular immunology, 2016. **70**: p. 8-12.
70. Coppari, E., et al., *Kinetics and binding geometries of the complex between  $\beta$  2-microglobulin and its antibody: An AFM and SPR study*. Biophysical Chemistry, 2016.
71. Kamatari, Y.O., et al., *Identification and characterization of a multispecific monoclonal antibody G2 against chicken prion protein*. Protein Science, 2014. **23**(8): p. 1050-1059.
72. van Eldijk, M.B., et al., *Thermodynamic investigation of Z 33-antibody interaction leads to selective purification of human antibodies*. Journal of biotechnology, 2014. **179**: p. 32-41.
73. Tito, M.A., et al., *Probing molecular interactions in intact antibody: antigen complexes, an electrospray time-of-flight mass spectrometry approach*. Biophysical journal, 2001. **81**(6): p. 3503-3509.
74. Pritchard, C., et al., *Quantification of human growth hormone in serum with a labeled protein as an internal standard: essential considerations*. Analytical chemistry, 2014. **86**(13): p. 6525-6532.
75. Dyachenko, A., et al., *Tandem Native Mass-Spectrometry on Antibody-Drug Conjugates and Submillion Da Antibody-Antigen Protein Assemblies on an Orbitrap EMR Equipped with a High-Mass Quadrupole Mass Selector*. Analytical chemistry, 2015. **87**(12): p. 6095-6102.
76. 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.

77. Arthur, K.K., et al., *In vitro stoichiometry of complexes between the soluble RANK ligand and the monoclonal antibody denosumab*. *Biochemistry*, 2012. **51**(3): p. 795-806.
78. Oda, M., et al., *Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes*. *Molecular immunology*, 2009. **47**(2): p. 357-364.
79. Oda, M., et al., *Regional and segmental flexibility of antibodies in interaction with antigens of different size*. *FEBS Journal*, 2006. **273**(7): p. 1476-1487.
80. 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.
81. Wei, H., et al., *Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications*. *Drug discovery today*, 2014. **19**(1): p. 95-102.
82. Abbott, W.M., M.M. Damschroder, and D.C. Lowe, *Current approaches to fine mapping of antigen-antibody interactions*. *Immunology*, 2014. **142**(4): p. 526-535.
83. Clementi, N., et al., *Epitope mapping by epitope excision, hydrogen/deuterium exchange, and peptide-panning techniques combined with in silico analysis*. *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*, 2014: p. 427-446.
84. Wu, C.-H., et al., *Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science*. *Journal of biomedical science*, 2016. **23**(1): p. 1-14.
85. Pandit, D., et al., *Mapping of discontinuous conformational epitopes by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and computational docking*. *Journal of Molecular Recognition*, 2012. **25**(3): p. 114-124.
86. Malito, E., et al., *Defining a protective epitope on factor H binding protein, a key meningococcal virulence factor and vaccine antigen*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(9): p. 3304-3309.
87. Suckau, D., et al., *Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(24): p. 9848-9852.
88. Hao, G., et al., *Epitope characterization of an anti-PD-L1 antibody using orthogonal approaches*. *Journal of Molecular Recognition*, 2015. **28**(4): p. 269-276.
89. Brier, S., et al., *Use of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis as a tool to identify the binding region of inhibitors targeting the human mitotic kinesin Eg5*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20**(3): p. 456-462.
90. Jones, L.M., et al., *Fast photochemical oxidation of proteins for epitope mapping*. *Analytical chemistry*, 2011. **83**(20): p. 7657-7661.
91. Obungu, V.H., et al., *Determination of the mechanism of action of anti-FasL antibody by epitope mapping and homology modeling*. *Biochemistry*, 2009. **48**(30): p. 7251-7260.
92. Coales, S.J., et al., *Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009. **23**(5): p. 639-647.
93. Zhang, Q., et al., *Epitope mapping of a 95 kDa antigen in complex with antibody by solution-phase amide backbone hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. *Analytical chemistry*, 2011. **83**(18): p. 7129-7136.
94. 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.

95. Casina, V.C., et al., *High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(31): p. 9620-9625.
96. Bertoldi, I., et al., *Exploiting chimeric human antibodies to characterize a protective epitope of Neisseria adhesin A, one of the Bexsero vaccine components*. The FASEB Journal, 2016. **30**(1): p. 93-101.
97. Engen, J.R., *Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS*. Analytical chemistry, 2009. **81**(19): p. 7870-7875.
98. Houde, D., S.A. Berkowitz, and J.R. Engen, *The utility of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry in biopharmaceutical comparability studies*. Journal of pharmaceutical sciences, 2011. **100**(6): p. 2071-2086.
99. Iacob, R.E. and J.R. Engen, *Hydrogen exchange mass spectrometry: are we out of the quicksand?* Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(6): p. 1003-1010.
100. 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.
101. Majumdar, R., et al., *Hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry as an emerging analytical tool for stabilization and formulation development of therapeutic monoclonal antibodies*. Journal of pharmaceutical sciences, 2015. **104**(2): p. 327-345.
102. Huang, R.Y., et al., *Hydrogen/deuterium exchange and electron-transfer dissociation mass spectrometry determine the interface and dynamics of apolipoprotein E oligomerization*. Biochemistry, 2011. **50**(43): p. 9273-9282.
103. 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.

*Partie 4 : MS structurale pour la  
caractérisation de snoRNPs à boîtes C/D*



## ***Partie 4- MS structurale pour la caractérisation de snoRNPs à boîte C/D***

Cette dernière partie est centrée sur la caractérisation structurale de sous-complexes impliqués dans la machinerie d'assemblage des snoRNPs à boîte C/D. Dans un premier temps, une introduction permettra de décrire les fonctions de ces complexes macromoléculaires, ainsi que les enjeux analytiques liés à leur caractérisation. Le premier chapitre sera constitué de l'analyse du complexe RPAP3/Hsp par MS native. Enfin le deuxième chapitre sera consacré à l'analyse d'un deuxième sous-complexe nommée Bcd1p/Rtt106p, par des approches combinées de MS structurale.

**Introduction : La machinerie d'assemblage des snoRNPs à boîte C/D.**

**Chapitre 1 : MS native pour l'analyse du complexe RPAP3/Hsp.**

**Chapitre 2 : Combinaison d'approches de MS structurale pour la caractérisation du complexe Bcd1p/Rtt106p.**





## *Introduction : La machinerie d'assemblage des snoRNPs à boîte C/D.*

Le ribosome est un assemblage ribonucléoprotéique qui a pour fonction principale de synthétiser les protéines d'un organisme, de par la traduction d'ARN messager (ARNm). D'un point de vue structural, les ribosomes sont constitués d'une petite sous unité 40S qui porte ce rôle de traduction de l'information génétique, et une grande sous unité 60S qui est responsable de l'assemblage des acides aminés constitutifs de la protéine en cours de synthèse (figure 1).

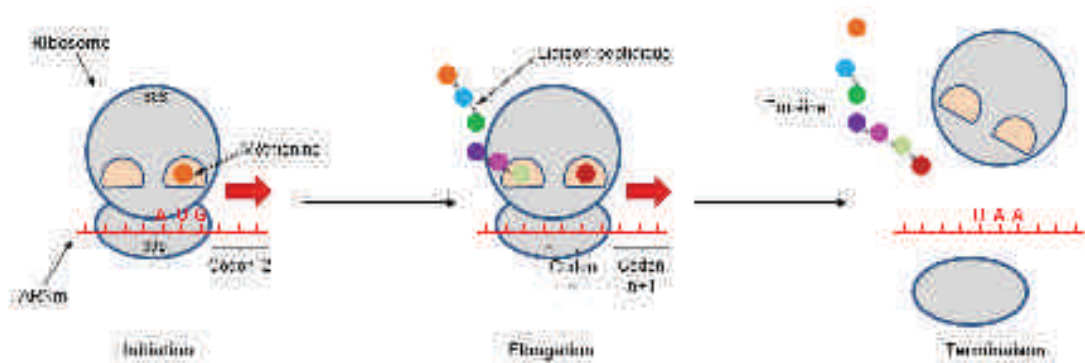


Figure 1. Représentation schématique de la traduction d'ARNm en protéine via l'action du ribosome (adapté à partir de [1]).

Durant la biogénèse des ribosomes, c'est-à-dire au cours de leur propre assemblage, deux types de complexes ribonucléoprotéiques associés aux petits ARNs nucléolaires (snoRNPs) catalysent les modifications des preARN ribosomiques [2], en amont de la formation des sous-unités ribosomales.

- Une première famille est constituée des **snoRNPs à boîte H/ACA**, qui sont responsables de la pseudouridylation (figure 2a). Cette modification entraîne une isomérisation du cycle pyrimidine d'une uridine, lui permettant de former ainsi de nouvelles liaisons hydrogènes, et donc de stabiliser l'ARN ribosomique (ARNr).
- La seconde famille est formée des **snoRNPs à boîte C/D**, qui catalysent la 2'-O-méthylation des ARNr substrats (figure 2b). La méthylation de la position 2' du ribose confère une résistance à l'hydrolyse de cet ARNr vis-à-vis des ribonucléases, et participe donc à la stabilité de ce dernier.

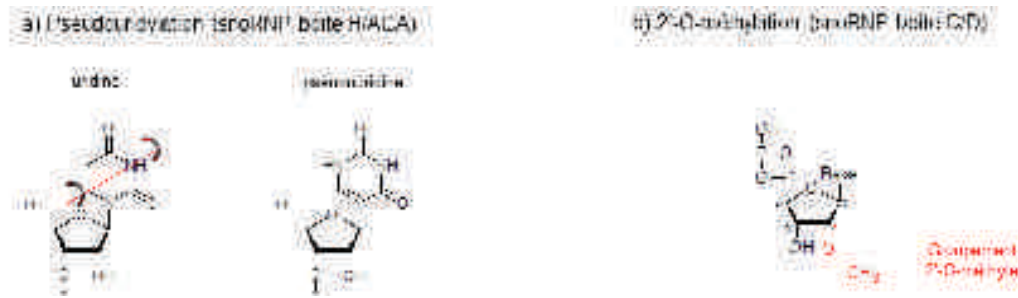


Figure 2. Modifications post-transcriptionnelles des ARNr : la pseudouridylation catalysée par les snoRNPs à boîte H/ACA (a), et la 2'-O-méthylation des riboses catalysée par les snoRNPs à boîte C/D.

Ces modifications ont une importance au niveau structural, avec notamment la stabilisation de l'ARNr, et de surcroît au niveau fonctionnel. Des mutations génétiques peuvent entraîner des dérégulations de ces mécanismes de modifications post-transcriptionnelles, et mener à de nombreuses pathologies comme l'anémie de *Blackfan-Diamond* (*non production de globules rouges*), ou le syndrome de *Shwachman-Diamond* (*insuffisance pancréatique*). Ces différentes maladies affectant la biogénèse du ribosome sont regroupées sous le terme de ribosomopathies [3].

## 1. Les snoARNs à boîte C/D

Les snoARNs à boîte C/D sont caractérisés par la présence de motifs consensus appelés « boîtes », s'appariant deux à deux, pour former les boîtes C/D et C'D' (figure 3).

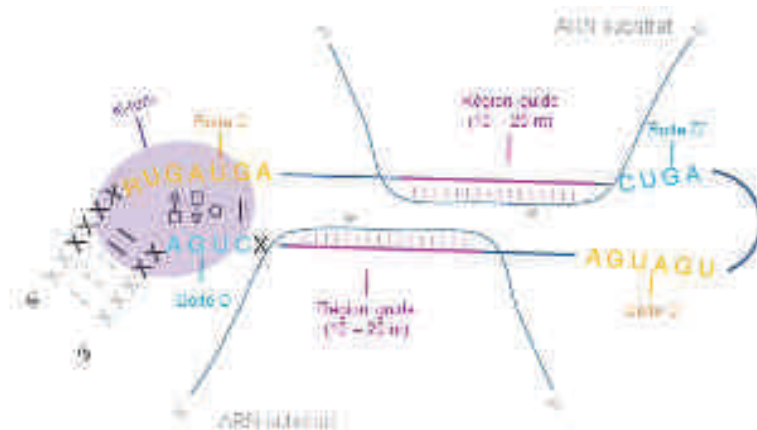


Figure 3. Représentation schématique des snoARNs à boîte C/D (adaptée à partir de [4]).

Le motif C/D est constitué d'une boîte C située quelques nucléotides après l'extrémité 5' définie par la séquence 5'-RUGAUGA-3' (R = purine), et d'une boîte D formée de la séquence 5'-CUGA-3' se situant quelques nucléotides avant l'extrémité 3'. Le motif C/D se

structure de manière particulière, dit en « K-turn ». Cette structure secondaire est caractérisée par un double brin adoptant une forme coudée à environ 60°. Le motif C'/D' adopte quant à lui une forme boucle. Il est important aussi de souligner la présence de deux régions guides au niveau de l'ARN, composées de dix à vingt nucléotides localisés en amont des motifs D et D'. Ces régions s'apparient à l'ARN substrat en vue de réaliser la 2'-O-méthylation des riboses.

## 2. Les protéines associées aux snoRNPs

De manière à former des particules fonctionnelles, les snoARNs doivent s'associer à plusieurs composants protéiques. Les protéines de la famille L7Ae constituent avec le snoARN, l'unité de base pour la formation du snoRNP à boîte C/D (figure 4). Au niveau de ces protéines, nous retrouverons Snu13p chez la levure et 15.5K chez l'Homme. L'activité catalytique est quant à elle portée par la 2'-O-méthylase Nop1p chez la levure, et la Fibrillarine (FBL) chez l'Homme. Cette protéine est responsable du transfert d'un groupement méthyle, réalisé à partir d'un donneur S-Adénosyl-Méthionine (SAM) [5]. Les protéines Nop56p et Nop58p sont les derniers constituants du snoRNP à boîte C/D. Alors que la protéine Nop56p serait impliquée dans le maintien du snoRNP sous une forme active, le complexe Nop58p-Nop56p-FBL participerait directement à la méthylation de l'ARN substrat [5].

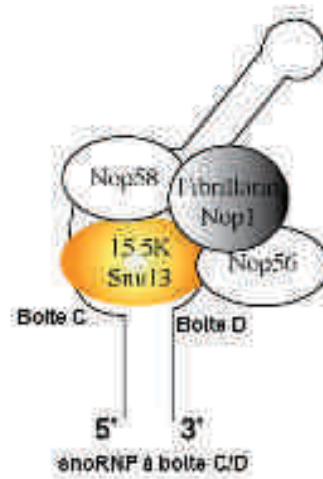


Figure 4. Représentation schématique des partenaires protéiques des snoRNPs à boîte C/D classiques (adaptée à partir de [6]).

### 3. La biogénèse des snoRNPs à boîtes C/D

La biogénèse des snoRNP à boîte C/D repose sur des processus d'association complexes, entre de nombreux partenaires protéiques (figure 5).

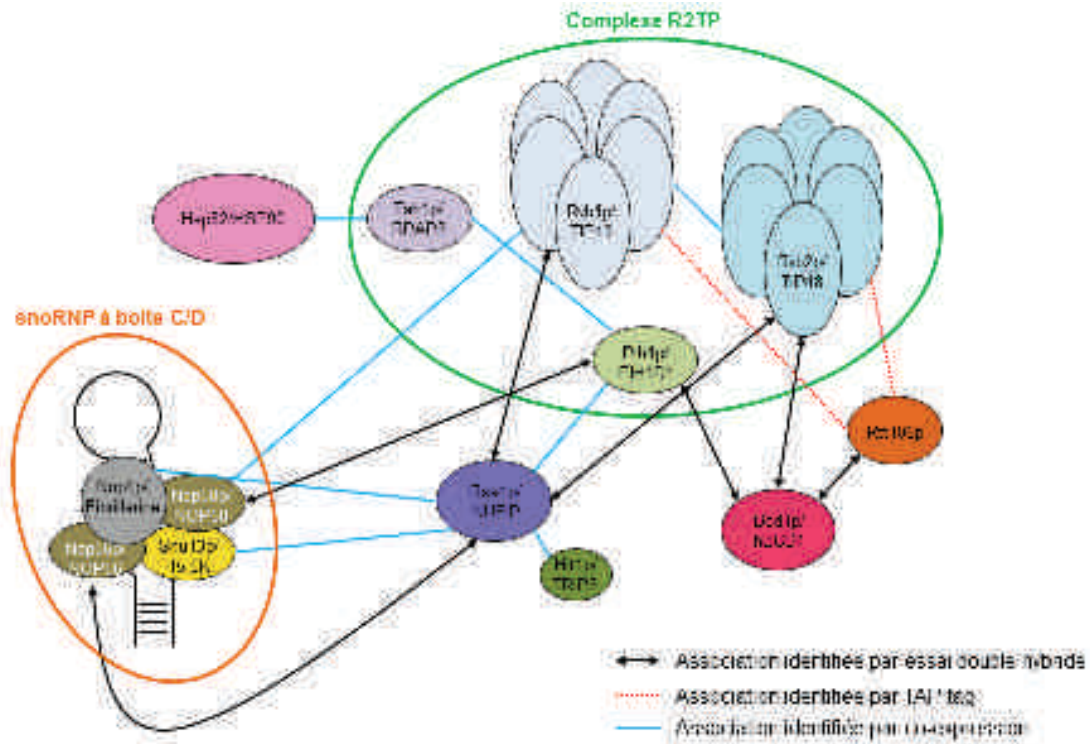


Figure 5. Représentation schématique du réseau d'interaction entre les constituants du snoRNP à boîte C/D et d'autres sous-complexes impliqués dans sa biogénèse. Les protéines notées en minuscules et en majuscules font respectivement références aux protéines retrouvées chez la levure et chez l'Homme.

Parmi les différents candidats potentiels impliqués dans l'assemblage des particules, figurent :

- le **complexe R2TP**, qui possède notamment un rôle primordial au niveau du repliement protéique, ainsi qu'à l'activité ATPase [7, 8].
- la protéine **Rsa1p/NUFIP**, ayant un rôle essentiel pour la croissance cellulaire. Son absence affecte négativement les voies de maturation des différents ARNr [9].
- la protéine **Bcd1p/hBCD1**. Cette dernière a été identifiée lors d'un large criblage de mutants de levures, associés à des défauts de maturation de certains ARNs [10]. Si actuellement le rôle précis de cette protéine n'est pas élucidé, son absence conduit à une chute du taux des snoARNs à boîte C/D, et à la mort cellulaire [10, 11].

## 4. Les défis analytiques

La caractérisation de l'ensemble des protéines impliquées dans les différents états transitoires est nécessaire pour l'explication des mécanismes cellulaires conduisant à la formation de particules fonctionnelles.

Dans ce contexte, les techniques biophysiques de caractérisation les plus résolutive sont généralement utilisées. Ainsi une partie des protéines impliquées dans la machinerie d'assemblage a pu être analysée à l'échelle atomique. C'est notamment le cas de Snu13p [12], de Rvb1p [13] qui ont été caractérisés par cristallographie. Les structures d'autres fragments protéiques seuls ou impliqués dans une interaction ont aussi été élucidées comme le domaine C-ter de Tah1p en interaction avec Pih1p [14] (RMN), ou Tah1p associée au motif peptidique de liaison de HSP90 [15] (cristallographie).

Si la caractérisation des partenaires individuels est essentielle, la résolution des complexes sous leur forme la plus étendue possible est préférable, non seulement pour déterminer les domaines d'interactions, mais aussi pour caractériser d'éventuels changements conformationnels. A ce niveau, la RMN est limitée par la taille des complexes analysables, et la cristallographie se heurte à des protéines réfractaires à la cristallisation et/ou des zones trop dynamiques pour être résolues. Dans ce contexte, la spectrométrie de masse structurale se présente comme une alternative de choix [16-18]. Les différentes techniques de MS structurale (cf. partie 1) prises individuellement, ne permettent au mieux que d'atteindre une résolution intermédiaire, toutefois la combinaison des différents résultats permet de caractériser des systèmes à un niveau pseudo-atomique, au travers de modélisations structurales [17, 19]. Récemment de nouvelles plateformes bio-informatiques ont été développées [20-22], de manière à transposer les résultats expérimentaux (stœchiométrie d'interaction, domaines de liaison, CCS, ...) en contraintes spatiales, afin de proposer des modèles structuraux des complexes analysés. Le processus d'intégration des données expérimentales pour la modélisation de structure est décrit dans la figure 6. Ce type d'approche nécessite l'utilisation de « briques élémentaires » représentées par les structures des sous-unités individuelles [17, 19]. Si les structures hautes résolutions sont préférentiellement utilisées comme élément de base, il est aussi possible en cas d'indisponibilité, d'assimiler un élément individuel à une forme géométrique simple (sphère). Cette dernière est générée à partir de données de plus basses résolutions [23-25]. Toutefois, la pertinence des modèles structuraux générés dépend notamment de la résolution des sous-unités de base, mais aussi de la nature des techniques de MS structurale et de leur combinaison [19].

Ainsi, les données expérimentales obtenues au niveau des espèces individuelles, sous-complexes et complexe entier sont transposées en contraintes spatiales, et guideront l'assemblage *in silico* des différentes structures individuelles [17, 19, 25, 26]. Dès lors, un premier ensemble de modèles sont générés, et un score leur est attribué en fonction de leur adéquation avec les contraintes spatiales préalablement établies. Les modèles les plus satisfaisants sont alors sélectionnés pour une dernière étape, consistant à les perfectionner par des approches de dynamique moléculaire et de minimisation énergétique [19]. Ce type d'approche intégrative a notamment permis de proposer des modèles structuraux pour des complexes biologiques comme l'ADN polymérase III [27], la protéine transmembranaire OmpA [28], ou encore le complexe initiateur de la traduction eIF3:eIF5 [29].

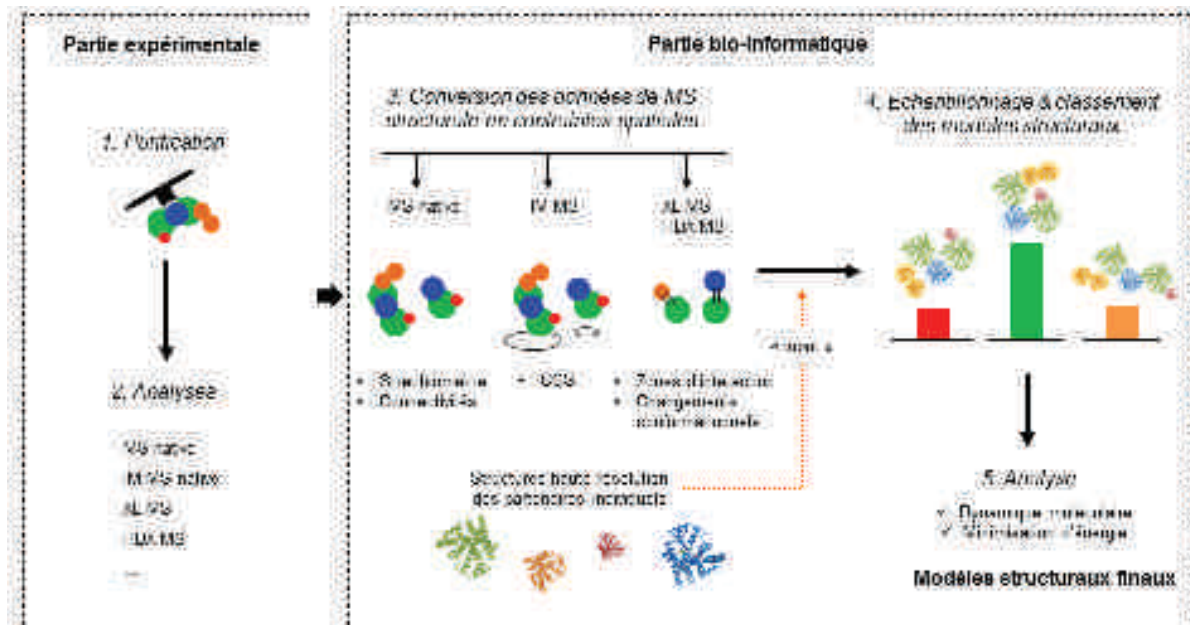


Figure 6. Processus d'intégration de données de MS structurale pour la proposition de modèles structuraux (adapté à partir de [19]). Cette approche est basée sur l'utilisation de la plateforme « Integrative Modeling Platform » [22].



## 5. Objectifs généraux des travaux

Avec pour objectif d'apporter des éléments nouveaux dans la caractérisation des complexes protéiques formés de façon transitoire durant la biogénèse des snoRNP à boîte C/D, une large collaboration a été entreprise entre le LSMBO et les équipes de biologie structurale du Pr. Charpentier et Dr. Manival (IMoPA, Nancy), et du Dr. Meyer (IBPC, Paris).

Notre travail s'est ici focalisé sur deux sous-complexes, pour lesquels les données structurales à haute résolution n'étaient que partielles voire totalement manquantes. Dans ce contexte, nous avons mis en place différentes stratégies analytiques, visant à utiliser ou combiner des techniques de MS structurale, de manière à :

- ⇒ **Caractériser les sous-complexes formés entre la protéine RPAP3 et les protéines Hsp70 ou Hsp90.** Des informations hautes résolutions sont disponibles pour des fragments de complexe. Toutefois les affinités, et les stœchiométries d'interaction des partenaires entiers doivent être confirmées.
  
- ⇒ **Caractériser le sous-complexe Bcd1p/Rtt106p.** L'association de ces deux protéines a été mise en évidence très récemment par essai double hybride, toutefois le complexe est totalement réfractaire à la cristallisation.





## Chapitre 1 : MS native pour l'analyse du complexe RPAP3/Hsp.

### 1. Contexte biologique

Le complexe R2TP se trouve être un élément essentiel dans différents processus cellulaires comme l'assemblage de l'ARN pol II, l'induction d'apoptose, les voies de signalisation des protéines kinases ou encore la biogénèse des snoRNPs à boîte C/D [7]. Sa fonction biologique est directement reliée à son interaction avec la chaperonne Hsp90, et se comporte alors comme un cochaperon d'Hsp90 [30]. Si chez la levure, la protéine Tah1p est responsable du recrutement d'Hsp90, chez le métazoaire c'est la protéine Spagh ou RPAP3 qui possède ce rôle. Dans les deux cas, ce sont les domaines TPRs (« tetratricopeptide repeat ») de Tah1p/RPAP3 qui se lient à un domaine C-ter MEEVD conservé de Hsp90. Toutefois, à la différence du système levure, la protéine RPAP3 possède deux domaines TPRs (figure 7), l'existence de ces deux domaines restant encore inexplicée. Il est à noter qu'une partie domaine conservé de Hsp90 (EEVD) est aussi retrouvée chez Hsp70, et tout comme Hsp90, cette protéine chaperonne possède une activité ATPase (responsable de la phosphorylation de protéines). Si des tests d'activité ont permis de montrer l'implication de RPAP3 ou Pih1D1 dans l'activation ou la régulation de l'activité ATPase, les processus d'assemblages des différents partenaires demeurent encore hypothétiques [7].

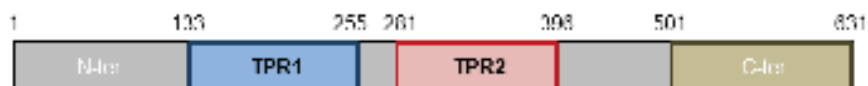


Figure 7. Représentation schématique de RPAP3 (chez la levure, Tah1p ne possède pas le TPR1).

Dans ce contexte une caractérisation structurale à large échelle a été entreprise, de manière à renseigner l'agencement de ces différents partenaires. Si les structures des domaines individuels TPR1 et TPR2 en interaction avec un peptide d'Hsp90 (SRMEEVD) ont été résolues [7], aucune donnée haute résolution n'est disponible avec un peptide de Hsp70, ou sur les protéines entières. Ainsi, une étude structurale par RMN réalisée par nos collaborateurs a été initiée de manière à vérifier si les deux domaines TPRs étaient en mesure de fixer deux variants de Hsp90 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et Hsp70, ou si chaque domaine était spécifique à une Hsp. Dans un premier temps, les expériences RMN ont permis de déterminer les structures des TPRs individuels en interaction avec les peptides Hsp90 et Hsp70. Les résultats ont alors montré que les différents domaines TPRs étaient en mesure de fixer les peptides Hsp90 ou Hsp70.

Toutefois, le TPR1 présente une meilleure affinité pour le peptide Hsp70 (~ 60  $\mu$ M envers ~ 100 et 130  $\mu$ M pour les peptides Hsp90 $\alpha$  et  $\beta$ ), alors que le TPR2 présente une bien meilleure affinité pour les peptides Hsp90s (~ 5  $\mu$ M envers ~ 50  $\mu$ M pour le peptide Hsp70). Cependant, cette approche n'a pas permis de caractériser le complexe à grande échelle, c'est-à-dire la protéine RPAP3 avec les Hsp entières.

## 2. Objectifs

Dans ce contexte nous avons développé des méthodes de MS native pour compléter la caractérisation structurale de l'assemblage des protéines RPAP3, Hsp70 et 90. Ces analyses avaient pour objectifs de :

- **Vérifier les tendances des constantes de dissociation** ( $K_d$ ) observées sur les TPRs individuels avec les trois peptides Hsp70 (SGPTIEEVD), Hsp90 $\alpha$  (DTSRMEEVD) et Hsp90 $\beta$  (DASRMEEVD).
- Apporter un **complément d'information sur les affinités**, entre le tandem RPAP3 (forme regroupant les deux domaines TPRs) et les trois peptides, en réalisant des compétitions directes et indirectes.
- **Déterminer les stœchiométries d'interaction entre les formes entières** de RPAP3 et des protéines Hsp70 et 90.

### 3. Résultats

#### 3.1. Détermination des constantes de dissociation des TPRs individuels avec les 3 peptides par MS native

Afin de vérifier les valeurs de  $K_d$  déterminées par RMN entre les TPRs individuels de RPAP3 et les trois peptides Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et  $\beta$ , nous avons développé des méthodes MS en conditions natives. Cette approche a été décrite dans la littérature, notamment sur des systèmes protéines-ligands [31-33]. Ainsi, nous avons réalisé des expériences de titrages avec les trois peptides sur les deux domaines TPRs individuellement. Pour ce faire, une concentration fixe en TPR est incubée avec une concentration croissante en peptide. Dans chaque condition, les intensités des états de charge principaux des différentes espèces (protéine libre et protéine + peptide) sont relevées (ces analyses sont faites en triplicats). A partir de ces données, des graphiques peuvent être construits, représentant l'intensité du complexe protéine-ligand en fonction de la concentration totale en ligand. Dès lors l'ajustement d'un modèle mathématique aux données expérimentales, permet de déterminer la constante d'association [34] ou dissociation [35] de chaque complexe.

Ainsi, pour un équilibre de formation du complexe :  $P + L \rightleftharpoons PL$ ,

La constante de dissociation  $K_d$  est définie par l'équation suivante (1) :

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (1)$$

où  $[P]$  est la concentration en protéine libre,  $[L]$  la concentration en ligand libre, et  $[PL]$  la concentration du complexe protéine-ligand.

La concentration molaire totale en protéine  $[P]_0$  est la somme des concentrations en protéine libre  $[P]$  et complexée  $[PL]$  [32], soit :

$$[P]_0 = [P] + [PL] \quad (2)$$

La concentration molaire totale en ligand  $[L]_0$  est la somme des concentrations en ligand libre  $[L]$  et complexé  $[PL]$ , soit :

$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad (3)$$

En posant :

$$R = \frac{[P]}{[PL]} \quad (4)$$

On peut écrire l'équation (5) :

$$Kd = R[L] = R([L]_0 - [PL]) \quad (5)$$

D'où :

$$R = \frac{I_P}{I_{PL}} = - \frac{-Kd + [L]_0 - [P]_0 - \sqrt{4 Kd [L]_0 + (Kd - [L]_0 + [P]_0)^2}}{2 [L]_0} \quad (6)$$

Dans l'équation 6, les intensités  $I_P$  et  $I_{PL}$  sont déterminées à partir des sommes des intensités des pics de protéine libre  $P$  et du complexe  $PL$ , et les concentrations  $[P]_0$  et  $[L]_0$  sont connues. Pour cette étude, nous avons relevées les intensités des états de charge 6+ et 7+ faisant référence à l'état natif de la protéine, capable de fixer le ligand peptidique. En effet, à la vue des spectres de masses (figure 8a et c), nous pouvons observer une partie des TPRs individuels sous une forme dénaturée (états de charge 8+ à 18+), n'étant pas en capacité de fixer les peptides. Pour les calculs de  $Kd$ , qui sont ici basés sur les intensités relevées sur le spectre de masse, nous avons considéré que le facteur de réponse entre la protéine seule et protéine-ligand est identique. En effet l'efficacité d'ionisation ou la transmission des ions peut varier en fonction de l'analyte [36]. Toutefois, nous avons ici établi cette approximation étant donné que la masse du ligand représente moins de 10% de la masse du complexe, et que le profil d'états de charge reste sensiblement le même entre la forme libre de la protéine et la forme complexée (figure 8 b et d).

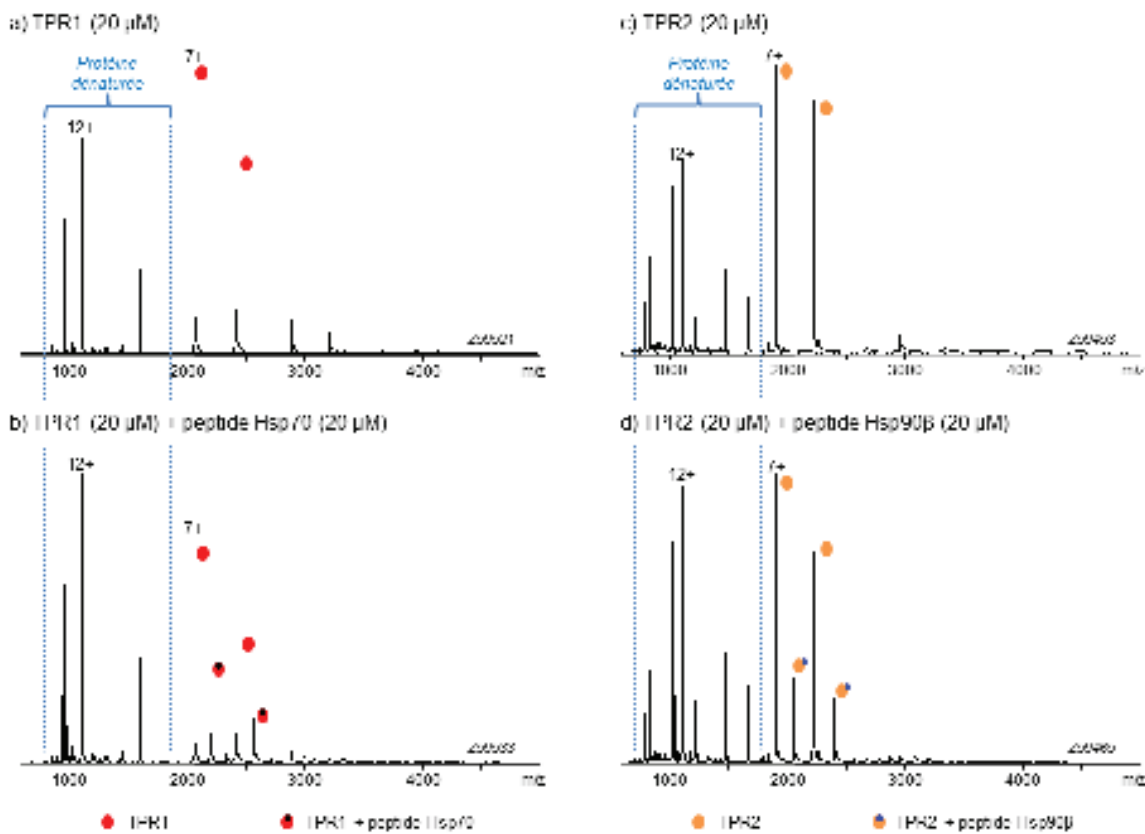


Figure 8. Analyses des TPRs individuels seuls et en présence des peptides en conditions natives. Le TPR1 (a) et TPR2 (b) sont infusés à 20  $\mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) sur le LCT (Waters) ( $V_c$  : 90 V,  $P_i$  : 6 mbar). Les protéines se trouvent sous une forme native (états de charge 6+ et 7+) et sous une forme dénaturée (états de charge 8+ à 18+). Le TPR1 et 2 sont respectivement incubés avec le peptide Hsp70 et Hsp90 $\beta$  à 20  $\mu\text{M}$  chacun et analysé dans les mêmes conditions. Les profils d'états de charge sont sensiblement les mêmes, et une espèce correspondant au complexe TPR + peptide est identifiée pour les états de charge 6+ et 7+).

Dans le cadre de nos expériences, nous avons fixé la concentration en TPR à 20  $\mu\text{M}$ , et incubé ce dernier avec des concentrations croissantes en peptides, au moins jusqu'à cinq équivalents. A titre représentatif une partie des titrages réalisés avec le TPR2 et le peptide Hsp90 $\alpha$  sont présentés en figure 9.

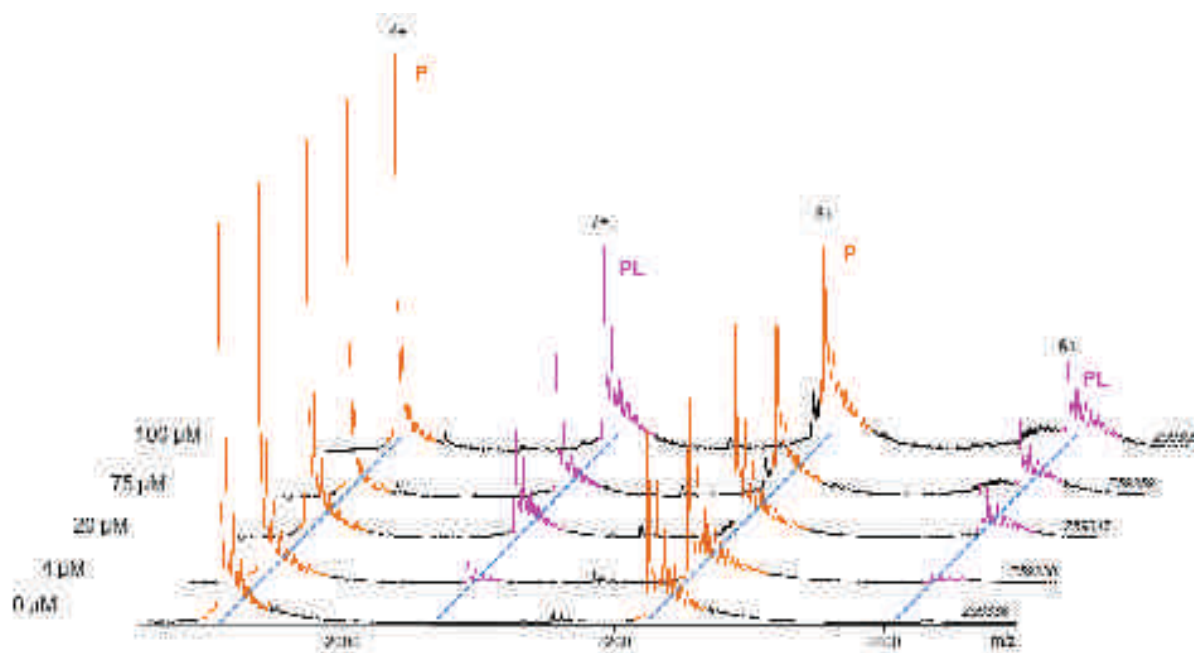


Figure 9. Titrages du TPR2 par le peptide Hsp90 $\alpha$  (DTSRMEEVD). Le TPR2 est incubé à 20  $\mu$ M dans un tampon AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5, avec des concentrations croissantes en peptide Hsp90 $\alpha$ . Les états de charge 6+ et 7+ de la protéine seule et protéine-ligand sont présentés, après analyse sur un LCT (Waters) (Vc : 90 V, Pi : 6 mbar). Les états de charge oranges notés P, et roses notés PL font respectivement référence à la protéine (TPR2) et au complexe protéine-ligand (TPR2 + peptide Hsp90 $\alpha$ ).

Ainsi, à partir des intensités relevées sur les pics correspondant à la protéine seule et à la protéine avec son ligand, nous avons pu construire des courbes de titrages. Le logiciel SigmaPlot 2000 a ici été utilisé, de manière à ajuster le modèle mathématique à nos données expérimentales et déterminer ainsi les constantes de dissociations (figure 10).



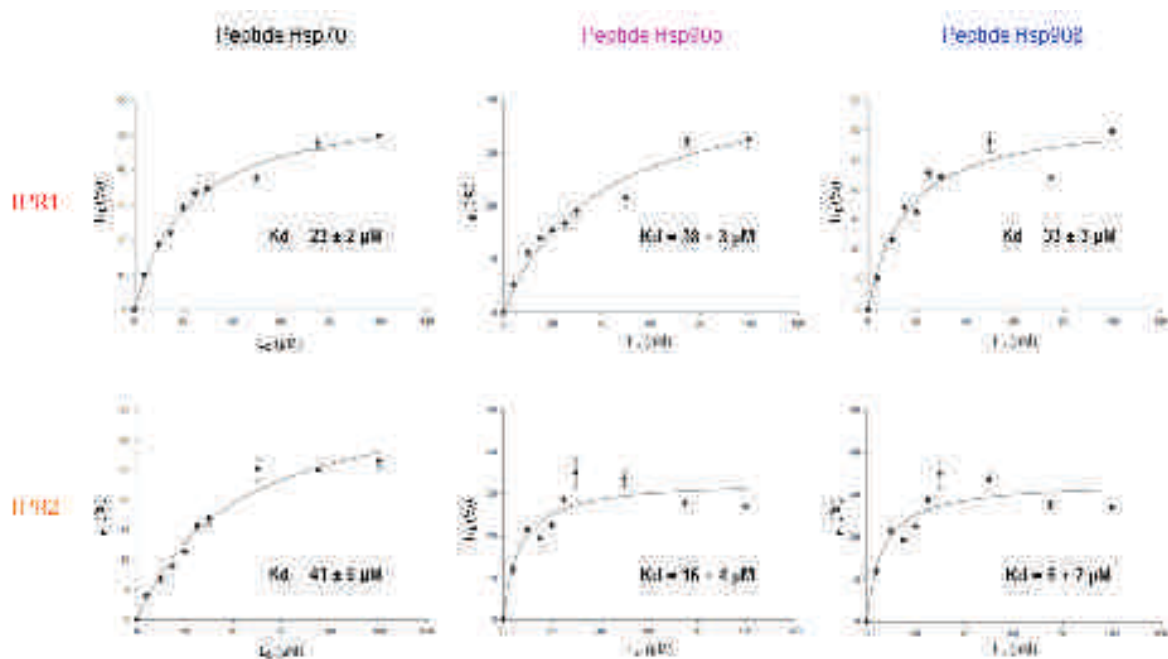


Figure 10. Courbes de titrages des TPRs individuels par les peptides Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$ . Les TPRs sont incubés à 20  $\mu$ M dans un tampon AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5, avec des concentrations croissantes en peptides. Les courbes sont construites à partir des intensités relevées sur les états de charge 6+ et 7+ de la protéine seule et protéine-ligand, après analyse sur un LCT (Waters) (Vc : 90 V, Pi : 6 mbar).

	Peptide Hsp70 (SGPTIEEVD)		Peptide Hsp90 $\alpha$ (DTSRMEEVD)		Peptide Hsp90 $\beta$ (DASRMEEVD)	
	RMN	MS native	RMN	MS Native	RMN	MS Native
TPR1 RPAP3 <sub>133-255</sub>	58 $\pm$ 7	23 $\pm$ 2	100 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3	128 $\pm$ 4	33 $\pm$ 3
TPR2 RPAP3 <sub>281-396</sub>	51 $\pm$ 5	41 $\pm$ 6	5.5 $\pm$ 2	16 $\pm$ 4	4.5 $\pm$ 2.5	6 $\pm$ 2

Tableau 1. Comparaison des valeurs de Kd déterminées par RMN et MS native.

Nous pouvons observer que les valeurs absolues de Kd calculées par cette approche MS native sont différentes de celles déterminées par RMN (tableau 1). Ces différences sont en partie dues à l'approche expérimentale différente entre les deux techniques. En effet, les tampons utilisés ne sont pas identiques, et il ne faut pas omettre qu'en RMN les mesures sont faites en phase liquide alors qu'en MS native nous travaillons en phase gazeuse [37]. Toutefois, nous observons les mêmes tendances dans les deux approches. Si le TPR1 présente une meilleure affinité pour le peptide Hsp70, le TPR2 a quant à lui une meilleure affinité pour les peptides Hsp90 $\alpha$  et  $\beta$ .

## 3.2. Affinités relatives du tandem RPAP3 avec les 3 peptides

Afin de vérifier les tendances précédemment observées sur les TPRs individuels et les peptides, nous avons réalisé des expériences de titrage, compétition directe et indirecte sur le tandem RPAP3(133-396) (fragment de la protéine RPAP3 regroupant les TPRs 1 et 2).

### 3.2.1. Titrages du tandem RPAP3(133-396) par les trois peptides

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de titrage en incubant le tandem RPAP3(133-396) avec des concentrations croissantes en peptide, de manière à :

- Vérifier la stœchiométrie d'interaction.
- Et déterminer la proportion des espèces formées à chaque ratio de concentration.

A titre représentatif, les spectres de masses du tandem seul (20  $\mu\text{M}$ ) et incubé avec un peptide (40  $\mu\text{M}$ ) sont présentés en figure 11. A partir de ces analyses, nous avons pu mettre en évidence que le tandem était en mesure de fixer les 3 peptides, avec une stœchiométrie d'interaction maximale de deux peptides par tandem. Nous remarquerons aussi la présence de tandem dénaturé (entre 500 et 1500 m/z) comme c'était le cas pour les TPRs individuels.

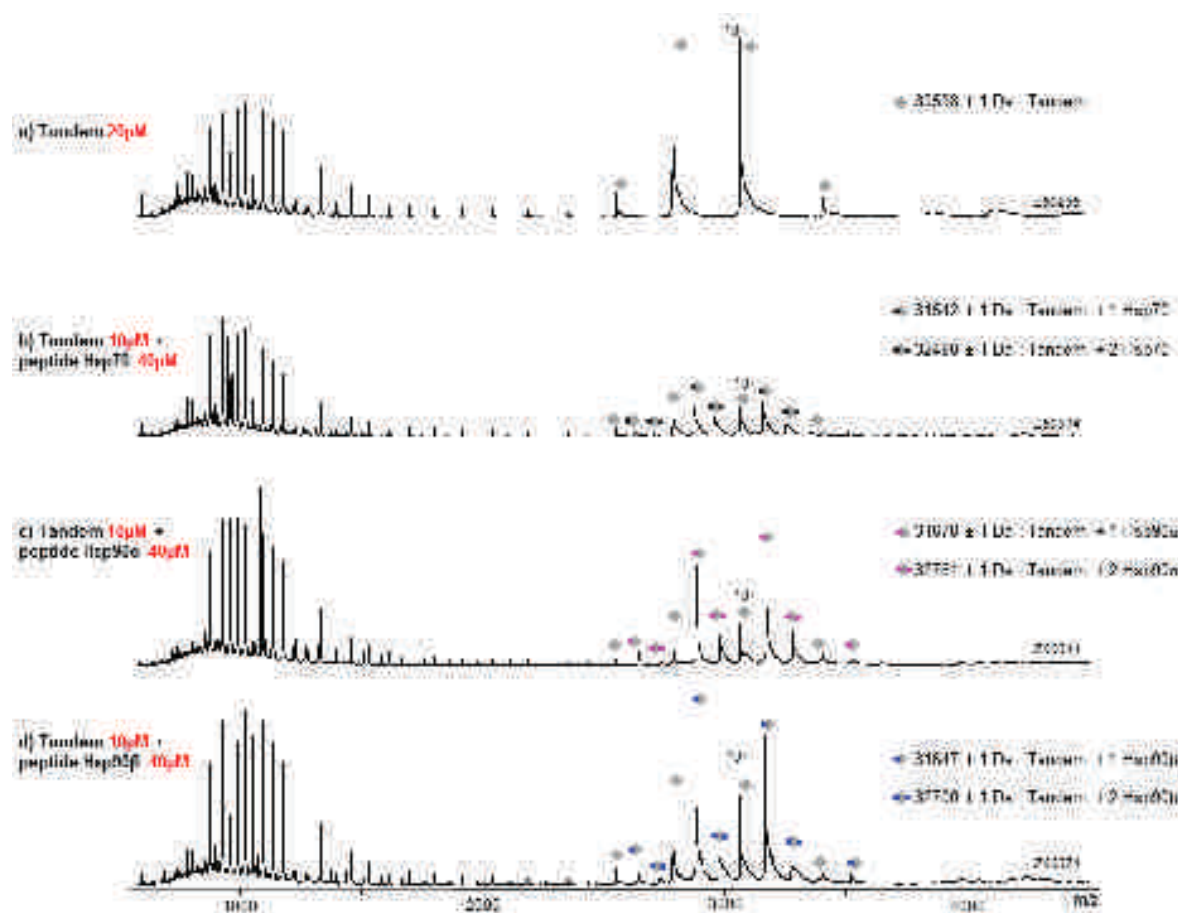


Figure 11. Titrages du tandem RPAP3(133-396) par les trois peptides Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$ . A titre représentatif, cette figure présente le Tandem à 20  $\mu$ M (a) ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5), puis incubé avec les peptides Hsp70 (a), Hsp90 $\alpha$  (b) et Hsp90 $\beta$  (c) à 40  $\mu$ M. Les échantillons sont analysés en conditions natives sur le LCT (Waters) ( $V_c$  : 90 V,  $P_i$  : 6 mbar). Les losanges gris font référence au Tandem, et les points noirs, roses et bleus respectivement à la fixation d'un peptide Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$ .

Pour chaque condition, nous avons réalisé des mesures en triplicat, et déterminé la proportion de chaque espèce faisant référence au tandem seul (P), et au tandem avec 1 et 2 peptides (PL et PL<sub>2</sub>), à partir des intensités des états de charges 9+ à 12+ (figure 12). Si ces expériences ont permis de montrer que le tandem pouvait fixer les 3 peptides, nous pouvons aussi remarquer une meilleure affinité de ce dernier pour les peptides Hsp90 $\alpha$  et  $\beta$ . En effet, le tandem a tendance à être plus rapidement saturé par les peptides Hsp90, même si la proportion de tandem libre n'a pas totalement disparue. Pour de fortes concentrations en peptides (> 100  $\mu$ M) la proportion de tandem libre est inférieure à 10% pour les peptides Hsp90 (figure 12b et c) alors qu'elle est supérieure à 20% pour le peptide Hsp70.

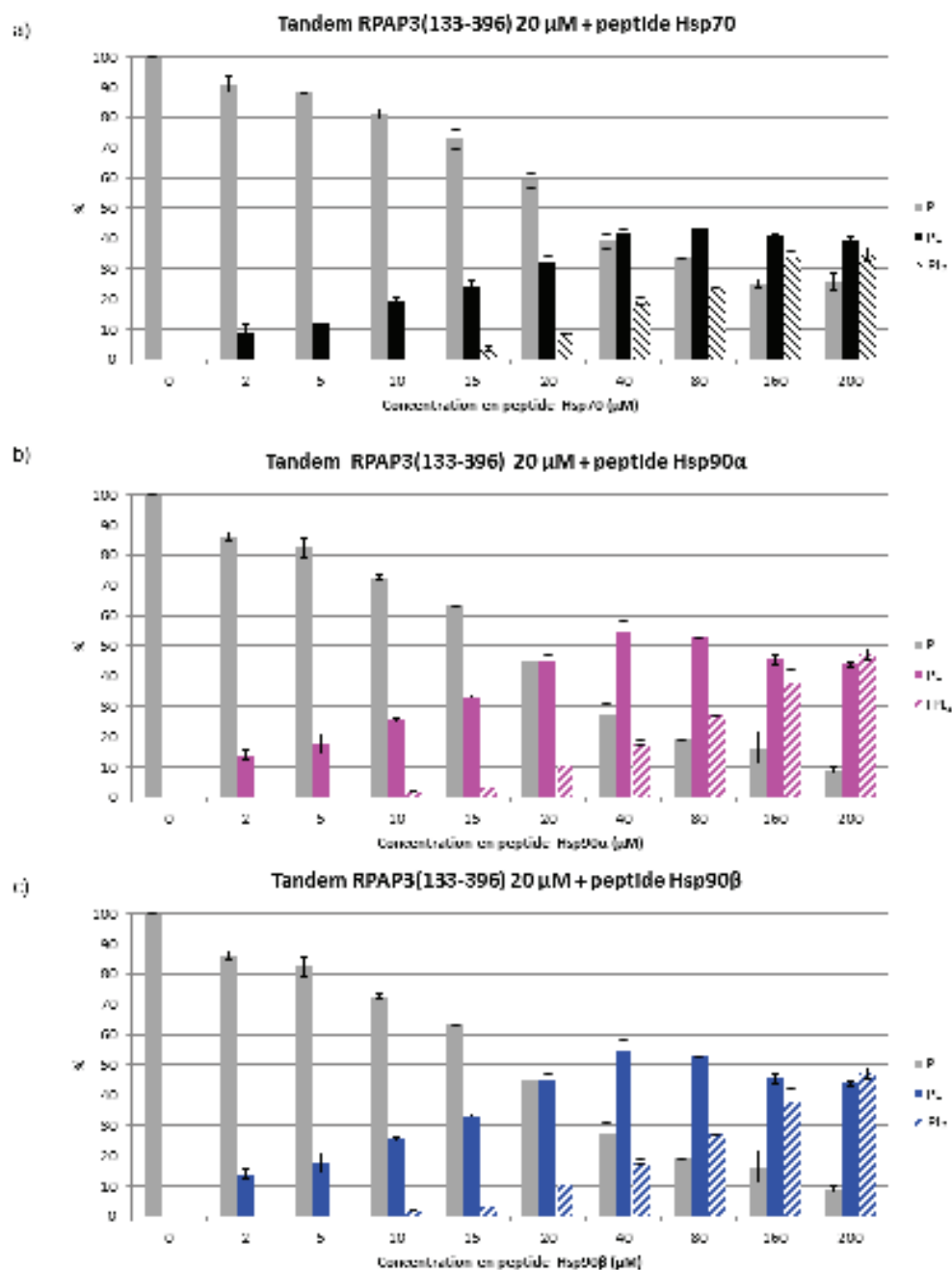


Figure 12. Titrations du tandem RPAP3(133-396) par les trois peptides Hsp70 (a), Hsp90α (b) et Hsp90β (c). Le Tandem est incubé à 20 μM dans un tampon AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5, avec des concentrations croissantes en peptides, est analysé en triplicat sur le LCT (Waters) (V<sub>c</sub> : 90 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar). Les proportions de chaque espèce sont mesurées à partir des intensités des états de charge 9+, 10+, 11+ et 12+. Le tandem seul, puis en interaction avec 1 et 2 peptides sont respectivement annotés P, PL et PL<sub>2</sub>.

### 3.2.2. Expériences de compétition directe

Avec pour objectif de valider les observations réalisées sur les TPRs individuels et de déterminer si un peptide se fixe préférentiellement à un TPR, nous avons procédé à des

expériences de compétition directe, en incubant le tandem avec un mélange équimolaire de deux peptides (figure 13a). Ainsi, nous avons utilisé trois couples équimolaires : Hsp70/Hsp90 $\alpha$ , Hsp70/Hsp90 $\beta$  et Hsp90 $\alpha$ /Hsp90 $\beta$  (respectivement figure 13b, c et d). Les échantillons sont analysés en conditions natives après 1 et 15 minutes de compétition. Les proportions de chaque espèce ont ici été établies sur la base des états de charge 10+ à 12+ (le 9+ n'étant pas exploitable dans ces analyses).

De façon générale, nous pouvons observer que les proportions de chaque espèce sont relativement similaires que ce soit après 1 ou 15 minutes de compétition. Cela signifie ici que les équilibres sont atteints assez rapidement. Toutefois nous pouvons remarquer des différences entre les couples Hsp70/Hsp90s et Hsp90 $\alpha$  /Hsp90 $\beta$ .

- Hsp70/Hsp90s :

Pour ces premiers couples, nous observons une espèce majoritaire représentant le tandem en interaction avec 1 peptide Hsp90 (~25%). Une espèce fait aussi référence au tandem interagissant avec 1 peptide Hsp70, mais en proportion nettement inférieure (~15%). Pour le complexe formé du tandem et de 2 peptides, la forme majoritaire fait référence au tandem en interaction avec 1 peptide Hsp70 et 1 peptide Hsp90 (~22%). Cependant, nous pouvons aussi observer la présence de tandem avec 2 peptides Hsp70 ou 2 peptides Hsp90 (~8% et ~17%). Si l'affinité d'un TPR est meilleure pour Hsp70 ou Hsp90, elle n'est pas assez grande pour empêcher la fixation du peptide moins afin.

- Hsp90 $\alpha$  /Hsp90 $\beta$  :

Concernant le dernier couple formé des deux peptides Hsp90s, nous pouvons observer par rapport aux couples précédents, une diminution de la proportion de tandem libre (~10% vs. ~14%) et tandem avec 2 peptides (~40% vs. ~46%) au profit de tandem avec 1 seul peptide (~50% vs. ~40%).

Toutes ces constatations vont dans le sens où un des TPRs du tandem aurait une meilleure affinité pour le peptide Hsp70, et le second pour les peptides Hsp90s. En effet, pour les complexes à 2 peptides, ce sont les complexes mixtes qui sont majoritaires (Hsp70/Hsp90). De plus, nous pouvons observer dans le cadre du couple Hsp90 $\alpha$ /Hsp90 $\beta$  que la proportion de complexe avec 2 peptides mixtes est significativement inférieure aux couples Hsp70/Hsp90s (~22% vs. ~16%); cette tendance est due au fait qu'un des TPRs n'est probablement pas destiné à fixer un Hsp90 en priorité.

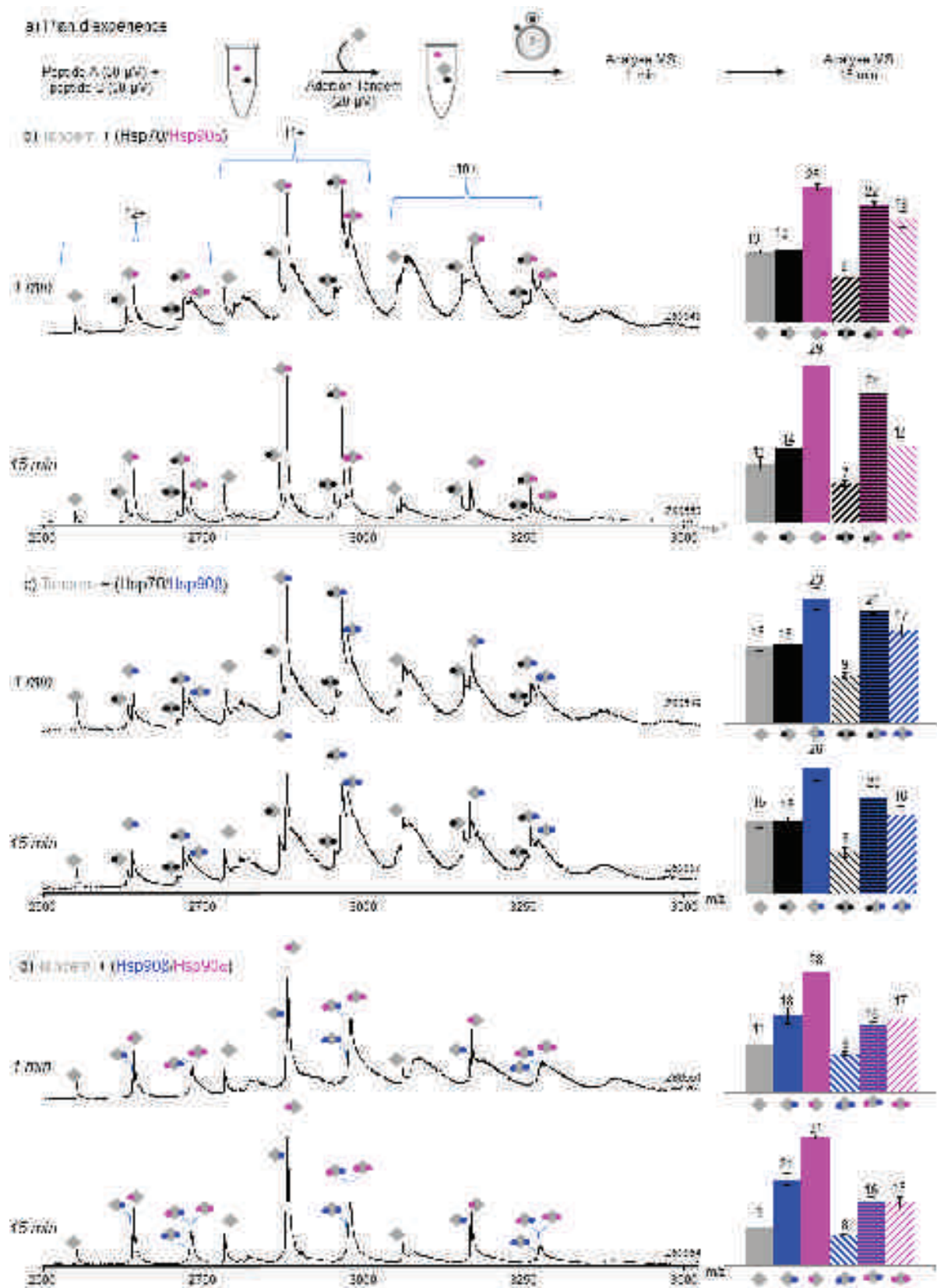


Figure 13. Expériences de compétitions directes. (a) Représentation schématique des expériences de compétitions directes : le Tandem RPAP3(133-396) 20 μM est ajouté à un mélange équimolaire de deux peptides à 50 μM (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5), et suivi en temps réel par analyse sur le LCT (Waters) (V<sub>c</sub> : 90 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar). Les panels (b), (c) et (d) présentent les spectres de masses et proportions de chaque espèce après 1



et 15 minutes de compétition, respectivement pour les couples de peptides Hsp70/Hsp90 $\alpha$ , Hsp70/Hsp90 $\beta$  et Hsp90 $\alpha$ /Hsp90 $\beta$ . Les losanges gris font référence au Tandem, et les points noirs, roses et bleus respectivement à la fixation d'un peptide Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$ . Les proportions de chaque espèce sont mesurées à partir des intensités des états de charge 10+, 11+ et 12+ (l'état de charge 9+ n'étant ici pas visible, il n'a pu être pris en compte).

### 3.2.3. Expériences de compétition indirecte

Des expériences de compétition indirecte ont aussi été utilisées de manière à confirmer les tendances d'affinités observées en amont, et une nouvelle fois vérifier la spécificité de liaison de chaque TPR. L'expérience vise à incuber le tandem avec un peptide donné (5 minutes de manière à être sûr d'avoir atteint un équilibre) puis à en ajouter un deuxième avec la même concentration, et à suivre la fixation de ce dernier par MS native après 1 et 15 minutes de compétition (figure 14a). Ainsi, nous avons utilisé trois couples, en incubant dans un premier temps le peptide Hsp70 puis Hsp90 $\alpha$ , le peptide Hsp70 puis Hsp90 $\beta$ , et le peptide Hsp90 $\beta$  puis le Hsp70 (respectivement figure 13b, c et d).

Dans ce contexte, là aussi les proportions de chaque espèce sont relativement similaires après 1 ou 15 minutes de compétition, traduisant une atteinte rapide de l'équilibre pour ce complexe.

De plus ces expériences montrent bien la capacité des peptides Hsp90 à chasser au moins 1 peptide Hsp70 (figure 14b et c), mais aussi celle du peptide Hsp70 à chasser au moins peptide Hsp90.

Ces observations viennent confirmer le fait qu'un des domaines TPR possède une meilleure affinité pour le peptide Hsp70, et le deuxième pour un des peptides Hsp90s ; et vont dans le sens où le TPR1 possède une meilleure affinité pour le peptide Hsp70, et le TPR2 pour les peptides Hsp90s. Toutefois l'affinité d'un des domaines pour un peptide donné n'est pas assez forte pour que l'équilibre ne soit pas modifié lors de l'ajout du deuxième peptide.

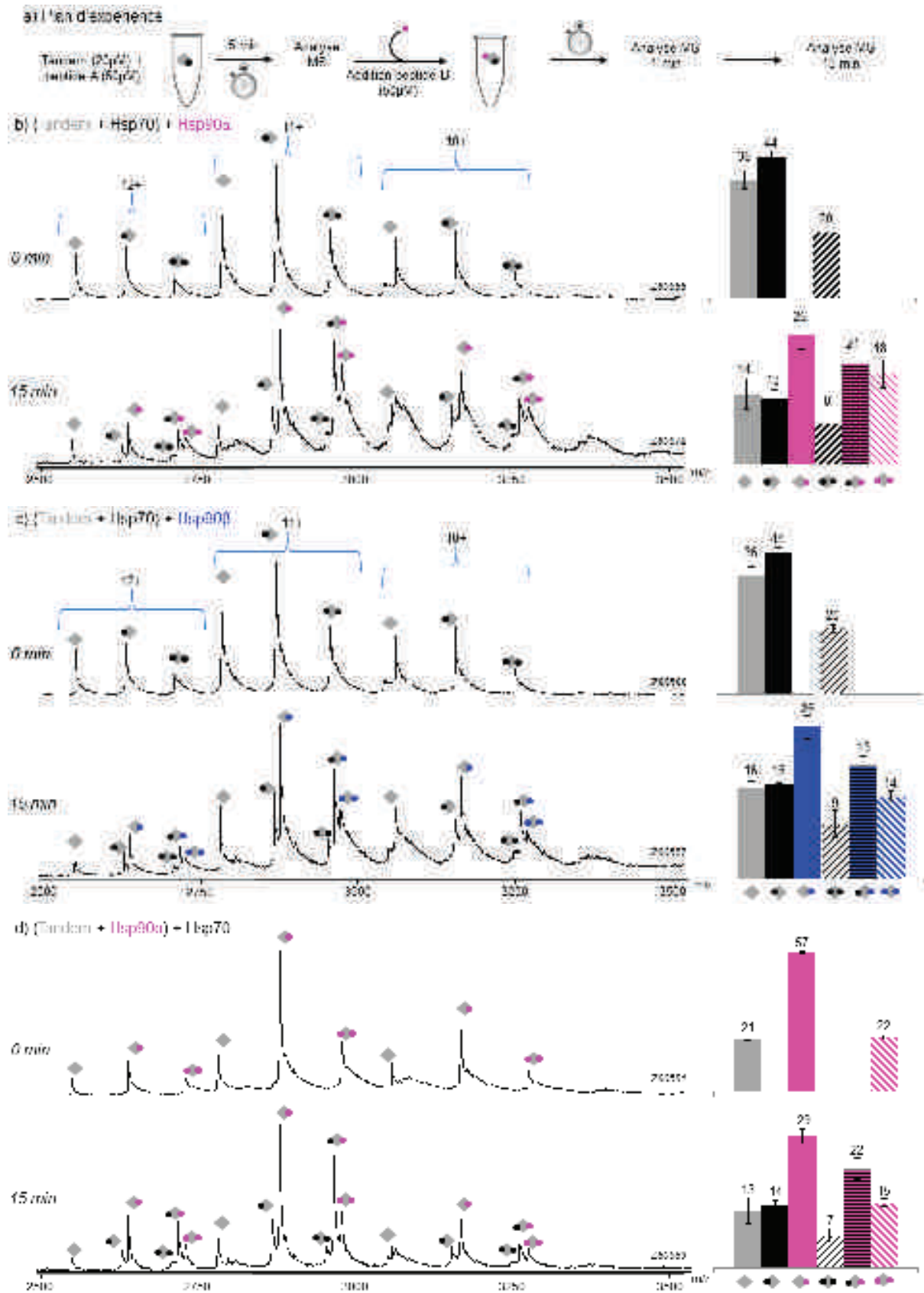


Figure 14. Expériences de compétitions indirectes. (a) Représentation schématique des expériences de compétitions indirectes : le Tandem RPAP3(133-396) 20  $\mu$ M est incubé au préalable avec un peptide à 50  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) pendant 5 min. Une première analyse de masse est réalisée avant qu'une deuxième



peptide à 50  $\mu\text{M}$  ne soit ajouté. Ensuite, un suivi en temps réel est réalisé par analyse sur le LCT (Waters) ( $V_c$  : 90 V,  $P_i$  : 6 mbar). Les panels (b), (c) et (d) présentent les spectres de masses et proportions de chaque espèce avant et après 15 minutes de compétition, respectivement pour les couples de peptides Hsp70/Hsp90 $\alpha$ , Hsp70/Hsp90 $\beta$  et Hsp90 $\alpha$ /Hsp70. Les losanges gris font référence au Tandem, et les points noirs, roses et bleus respectivement à la fixation d'un peptide Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$ . Les proportions de chaque espèce sont mesurées à partir des intensités des états de charge 10+, 11+ et 12+ (l'état de charge 9+ n'étant ici pas visible, il n'a pu être pris en compte).

### 3.3. Détermination des stœchiométries d'interaction entre le tandem RPAP3 et les protéines Hsp70, Hsp90 $\alpha$ et Hsp90 $\beta$ entières

Le dernier axe de l'étude a consisté à déterminer les stœchiométries d'interaction entre le tandem RPAP3(133-396) et les formes entières des protéines Hsp70 et 90s. En effet, si le tandem est en mesure de fixer jusqu'à 2 peptides différents, il n'en est peut-être pas de même avec les protéines entières. Nous avons alors développé des méthodes de MS native pour déterminer les stœchiométries d'interaction.

Il est à noter que pour cette troisième partie de l'étude, nous avons travaillé avec un tandem légèrement différent, dans le sens où il n'est pas marqué aux isotopes stables. Le tandem utilisé pour les expériences de compétitions provenait d'un lot marqué  $^{15}\text{N}$  aussi utilisé en RMN.

#### 3.3.1. Analyses des composés individuels

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le tandem et les protéines Hsp entières par MS native (figure 15).

- Le tandem RPAP3(133-396) est caractérisé sous une forme monomérique majoritaire, avec une masse de  $30223 \pm 1$  Da, en bonne adéquation avec la masse théorique (30223.3 Da) (figure 15a).
- La protéine Hsp70 a été caractérisée avec une masse de  $70000 \pm 14$  Da (figure 15b). Pour cette protéine, nous sommes confrontés à plusieurs problèmes : non seulement l'erreur de masse est relativement importante ( $\pm 14$  Da) mais nous relevons aussi une différence de 50 Da par rapport à la masse théorique (70052.2 Da). De plus, la protéine est caractérisée sous une unique forme monomérique alors qu'elle est attendue sous une forme dimérique majoritaire. Cette dernière caractéristique nous a contraint à écarter cette protéine pour les tests d'interaction.

- La protéine Hsp90 $\alpha$  a, quant à elle, été caractérisée sous une forme dimérique majoritaire avec une masse de  $176609 \pm 14$  Da (figure 15c). Cette dernière, a une différence de masse de 132 Da par rapport à la masse théorique du dimère (176477.2) et peut être due à différentes modifications, toutefois la précision de mesure masse ne permet pas de les déterminer. Cependant, le problème majeur ici se situe au niveau de la stabilité du spray. L'obtention d'un signal MS s'est trouvé vraiment problématique ; le spectre de masse présenté est le résultat de l'accumulation d'un signal de seulement quelques secondes, et n'a pu être reproduit. Cette protéine n'a donc pu être prise en compte pour les expériences de détermination de stœchiométrie d'interaction.
- La protéine Hsp90 $\beta$  a été caractérisée sous une forme monomérique minoritaire, mais aussi sous une forme dimérique majoritaire à  $169723 \pm 10$  Da (figure 15d). La masse expérimentale est ici plus en adéquation avec la masse théorique du dimère (169729.8 Da) puisqu'elle ne diffère que de 7 Da. La protéine Hsp90 $\beta$  constitue la seule protéine Hsp qui a été conservée pour les tests d'interaction avec le tandem RPAP3(133-396).

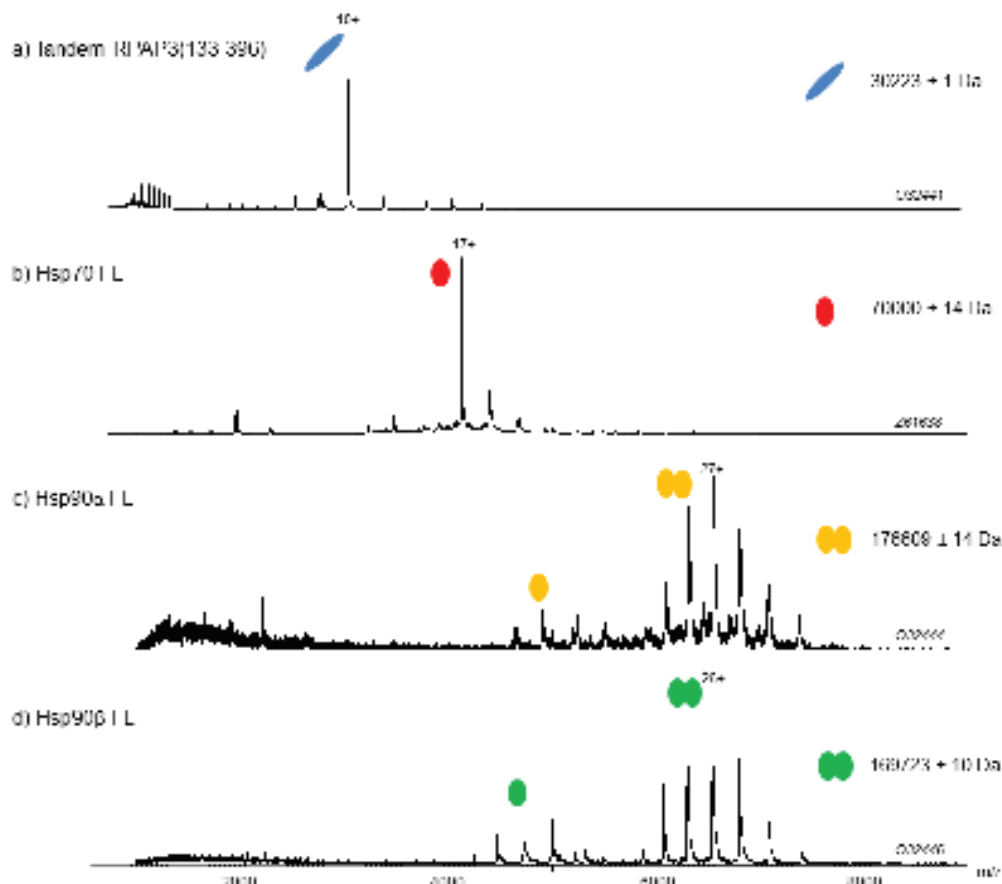


Figure 15. Caractérisation du tandem RPAP3(133-396) et des protéines Hsp en conditions natives. Le tandem (a), Hsp70 (b), Hsp90 $\alpha$  (c) et Hsp90 $\beta$  (d), sont infusés à 5  $\mu$ M (AcONH $_4$  150 mM, pH 7.5) sur le Synapt G2 HSMS (Waters) (Vc : 180 V, Pi : 6 mbar). Le tandem est représenté par une forme ovale bleue, alors que les protéines Hsp70, Hsp90 $\alpha$  et Hsp90 $\beta$  sont respectivement représentées par une boule rouge, orange et verte.

### 3.3.2. Détermination des stœchiométries d'interaction entre le tandem RPAP3(133-396) et la protéine Hsp90 $\beta$ entière.

Afin de déterminer les stœchiométries d'interaction entre ces deux partenaires, nous avons incubé des concentrations croissantes de tandem RPAP3(133-396) (de 5 à 40  $\mu$ M), pour une concentration fixe en Hsp90 $\beta$  (10  $\mu$ M) (figure 16). Pour un large excès de tandem, une espèce avec une masse à  $230947 \pm 10$  Da est caractérisée ; cette dernière faisant vraisemblablement référence à une stœchiométrie d'interaction de 1 dimère de Hsp90 $\beta$  avec 2 tandems (masse théorique 230176.4 Da). La précision des mesures de masses est ici affectée par une qualité spectrale assez faible.

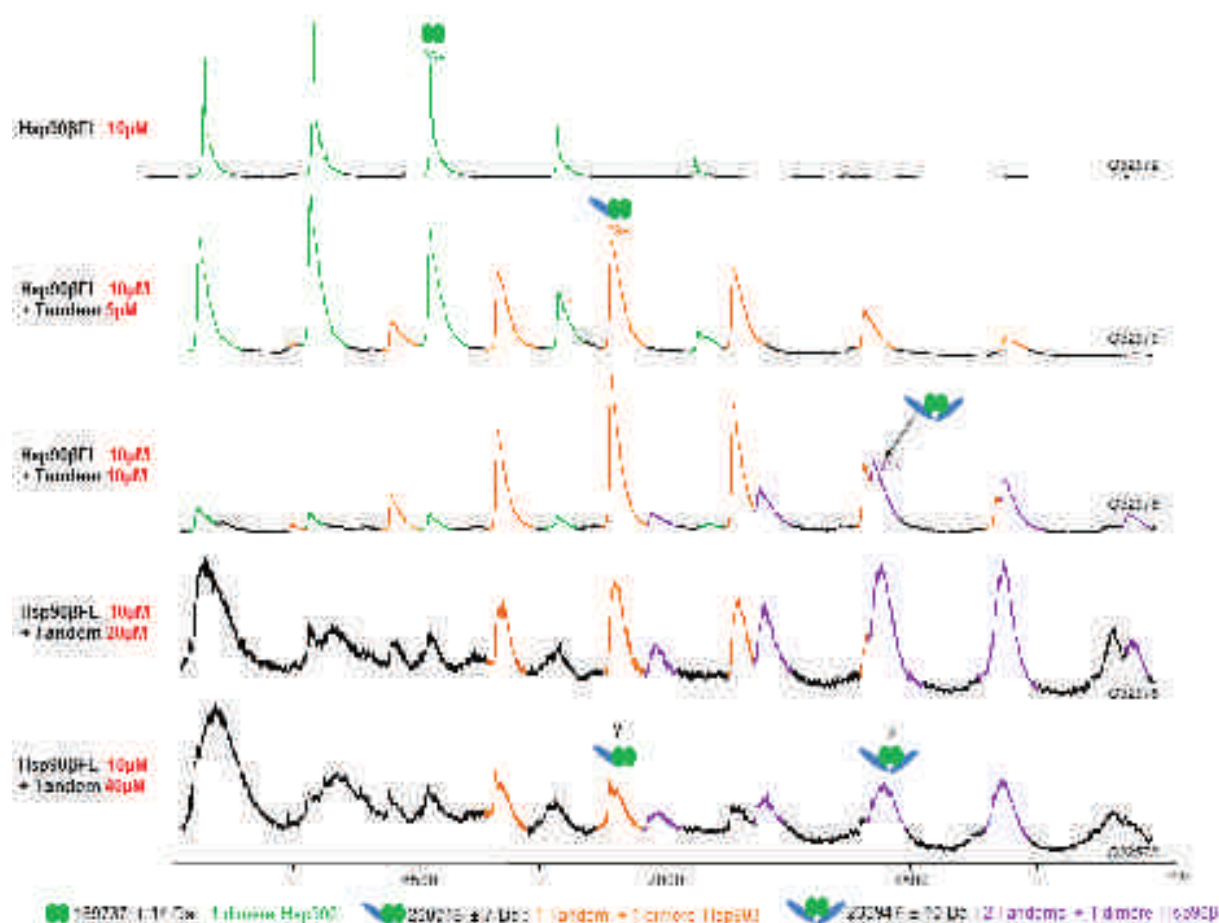


Figure 16. Détermination de la stœchiométrie d'interaction entre le Tandem RPAP3(133-396) en excès et la protéine Hsp90 $\beta$  entière. La protéine Hsp90 $\beta$  entière à 10  $\mu$ M est incubée avec le Tandem à 5, 10, 20 et 40  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5), puis analysée en conditions natives sur le Synapt G2 HDMS (Waters) (Vc : 180 V, Pi : 6 mbar). Le tandem est représenté par une forme ovale bleue, le dimère de Hsp90 $\beta$  par deux boules vertes. Sur le spectre de masse, les pics verts, oranges et violets font respectivement référence au dimère de Hsp90 $\beta$ , au complexe dimère Hsp90 $\beta$  + 1 Tandem, et dimère Hsp90 $\beta$  + 2 Tandems.

A partir de ces observations, nous avons établis plusieurs hypothèses sur les modèles d'assemblages possibles entre le tandem RPAP3(133-396) et la protéine Hsp90 $\beta$  (figure 17).



Figure 17. Hypothèses d'assemblages entre le tandem RPAP3(133-396) et Hsp90 $\beta$ . Le panel (a) présente les modèles en cas d'excès de Hsp90 $\beta$ , et le (b) pour un excès de tandem.

Afin de donner plus de poids à une des hypothèses, des expériences de FRET ont été entreprises. Ces dernières, actuellement en cours de réalisation, visent à comparer la forme sauvage de RPAP3 et une forme mutée (délétion TPR1). Si une différence de demi-vie était alors observée, le TPR1 posséderait aussi un rôle dans la fixation du dimère ; alors que dans le cas inverse, l'assemblage du complexe serait uniquement médiée par le TPR2.

Dans ce contexte, des expériences HDX-MS pourraient être réalisées de manière à apporter des informations orthogonales à celles issues du FRET. En effet, l'utilisation de cette approche permettrait d'accéder aux zones d'interactions, ainsi qu'à celles présentant des réarrangements structuraux suite à la formation du complexe.

## 4. Conclusions

Les protéines RPAP3 et Hsp sont engagées dans un grand réseau d'interaction, formant le complexe R2TP notamment impliqué dans la biogénèse des snoRNPs à boîte C/D. Les protéines Hsp possèdent une activité ATPasique, régulée par la protéine RPAP3. Toutefois, à la différence des autres règnes qui possèdent un seul domaine TPR, la protéine RPAP3 (métazoaire) en possède deux. L'objectif était ici d'apporter des éléments de caractérisation structurale pour étudier l'assemblage de ces différents partenaires.

- Dans un premier temps, l'analyse en conditions natives des titrations réalisées sur les TPRs individuels et les 3 peptides, nous ont permis de déterminer des constantes de dissociation ( $K_d$ ). **Les valeurs de  $K_d$  déterminées en MS native sont venues renforcer les**

**tendances observées en RMN**, et ont mis en évidence une **meilleure affinité du TPR1 pour le peptide Hsp70**, alors que le **TPR2 présente une bien meilleure affinité pour les peptides Hsp90s**.

- Ces **tendances ont ensuite été vérifiées sur le tandem RPAP3(133-396)** regroupant les deux TPRs. Des expériences de titrations et compétitions sont venues conforter l'hypothèse d'une affinité préférentielle d'un des domaines TPR pour le peptide Hsp70 et du second TPR pour les peptides Hsp90s.
- La dernière partie de l'étude s'est portée sur la caractérisation des complexes impliquant les protéines Hsp entières, les techniques biophysiques de haute résolution n'ayant pu apporter des informations à ce niveau. La MS native a permis que de **caractériser les stœchiométries d'interactions entre le tandem et la protéine Hsp90 $\beta$** , et des hypothèses sur leur mode d'assemblages ont été émises. De manière à affiner ces modèles, des expériences HDX-MS pourraient être envisagées de manière à déterminer si un seul domaine TPR est impliqué dans l'interaction avec le dimère Hsp, et si le tandem subit des modifications conformationnelles.

## 5. Valorisation

Les travaux ici présentés font actuellement l'objet d'une publication en cours de rédaction :

### Publication :

Quinternet M., Terral G., Henri J., Maurizy C., Pradet-Balade B., Charpentier B., Bertrand E., Meyer P., Cianférani S, Manival X. « Structural characterization of RPAP3/HSPs complexes ». *article en cours de rédaction*



## ***Chapitre 2 : Combinaison d'approches de MS structurale pour la caractérisation du complexe Bcd1p/Rtt106p.***

### **1. Contexte biologique**

La protéine Bcd1p a été identifiée comme étant un des partenaires impliqués dans la biogénèse des snoRNPs à boîte C/D [10]. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que son absence conduisait à une baisse notable de l'accumulation des snoRNPs à boîte C/D, et de la viabilité cellulaire [10, 11]. Toutefois son rôle précis et son mode d'action demeurent mal connus. Suite aux travaux de Huh *et al*, [38] montrant une co-localisation de Bcd1p avec un nouvel interactant potentiel, la protéine Rtt106p, nos collaborateurs ont testé leur interaction directe par double-hybride. Les résultats alors générés, ont confirmé une interaction entre ces deux partenaires. La protéine Rtt106p était à ce moment connue pour être une chaperonne d'histones, impliquée dans le remodelage de la chromatine [39, 40], mais aussi dans la régulation de la transcription [41]. Si nos collaborateurs ont montré que l'absence de Rtt106p n'influe pas sur le taux des snoRNPs à boîte C/D, la mise en évidence d'une interaction entre ces deux partenaires pourrait impliquer un possible lien entre biogénèse des snoRNPs et régulation de la transcription.

De manière à comprendre plus en détail, l'association entre ces deux partenaires, une caractérisation structurale des composés individuels et du complexe a été initiée. Les données disponibles au début de ces travaux étaient les suivantes :

- Pour ce qui est de la protéine Bcd1p, deux doigts de zinc ont été caractérisés dans sa partie N-ter (1-43), constituant le domaine minimal fonctionnel [42]. Toutefois cette protéine est totalement réfractaire à la cristallisation, ainsi qu'à une analyse par RMN (taille > 40kDa).
- Le fragment 65-320 de Rtt106p avait quant à lui déjà été cristallisé par l'équipe de Shi [43].
- Aucune donnée haute résolution n'était disponible pour le complexe Bcd1p/Rtt106p. Les tentatives de cristallogénèse se sont révélées infructueuses.

Des études préliminaires de titration calorimétrique isotherme (ITC) et dichroïsme circulaire (CD), réalisées par nos collaborateurs, ont permis de mettre en évidence des zones potentiellement impliquées dans les interfaces d'interaction (figure 18).



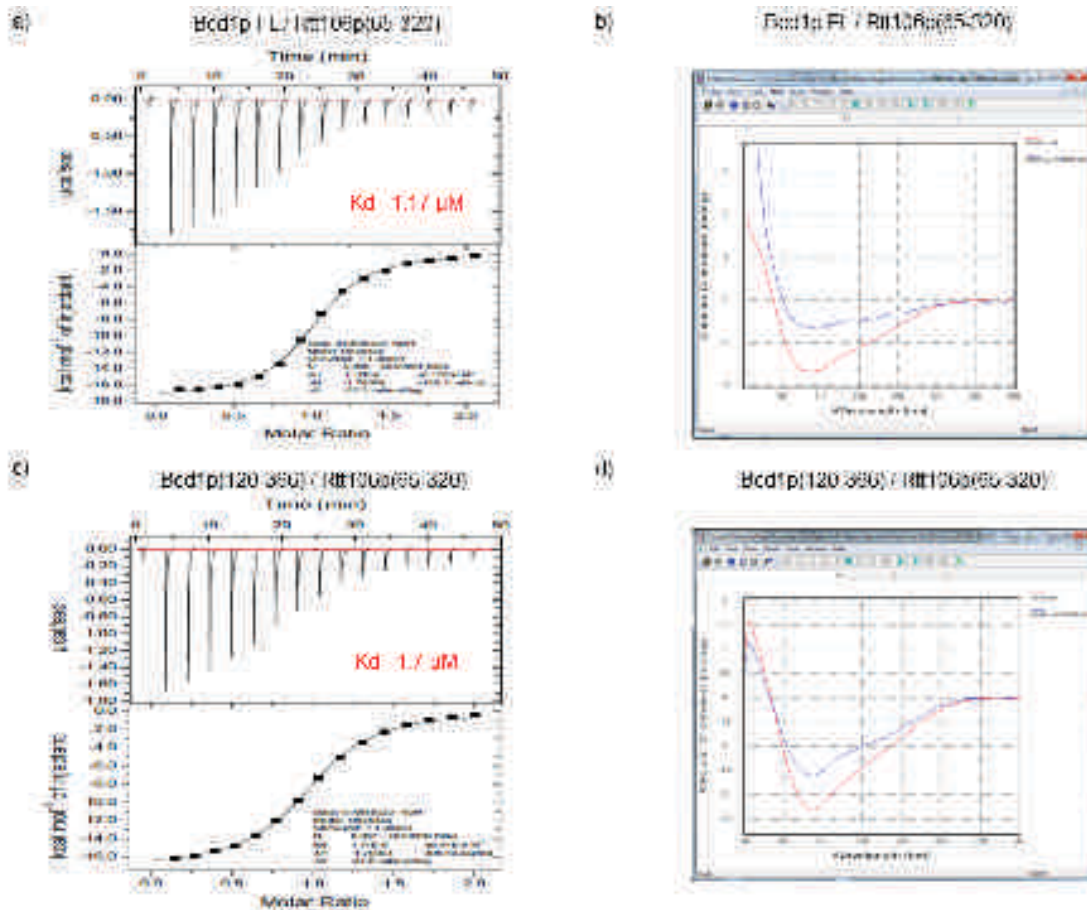


Figure 18. Résultats ITC et DC obtenus sur les complexes Bcd1p FL / Rtt106p(65-320) (respectivement (a) et (b)), et Bcd1p(120-366) / Rtt106p(65-320) (respectivement (c) et (d)). FL = « full length » = entier.

Ces résultats suggèrent qu'il y a bien une interaction entre Bcd1pFL (FL = Full Length) et le fragment Rtt106p(65-320), ainsi qu'entre les fragments Bcd1p(120-366) et Rtt106p(65-320). De plus, les résultats obtenus en ITC montrent une constante de dissociation de 1.7 μM pour les deux complexes, suggérant que la partie (1-119) de Bcd1p n'est pas indispensable pour l'association de ces deux partenaires.

## 2. Objectifs

Dans ce contexte, nous avons mis en place une **stratégie analytique, basée sur des approches de MS structurale, visant à caractériser le complexe Bcd1pFL/Rtt106(65-320)** de manière à :

- ⇒ Caractériser/affiner les **zones potentielles d'interaction**.
- ⇒ Caractériser les **changements conformationnels** des protéines éventuellement liés à l'assemblage de ces dernières.

Si pour Bcd1p nous avons choisi de travailler sur la forme entière, c'est dans un souci d'apporter une caractérisation structurale du complexe la plus complète possible, et d'observer si un changement se produit même dans les régions qui sont *a priori* non essentielles pour l'interaction. Concernant la protéine Rtt106p, nous avons dû travailler avec le fragment (65-320), les formes plus longues étant insolubles.

La stratégie analytique mise en place dans ce cas utilise l'ensemble des outils de MS structurale disponibles au laboratoire (figure 19) :

- 1- **La MS native** : permet de déterminer la masse des composés individuels et du complexe, et ainsi de vérifier la présence des doigts de zinc et déterminer la **stœchiométrie d'interaction**.
- 2- **L'IM-MS** : de manière à suivre les **changements de conformation** lors de l'assemblage du complexe.
- 3- **La protéolyse ménagée** : cette approche permet de définir des **domaines minimum d'interaction**.
- 4- **L'HDX-MS** : de façon à déterminer des **zones potentielles d'interaction** et **changements conformationnels**.
- 5- **Le pontage chimique** : de manière à définir des **zones de proximités spatiales**.

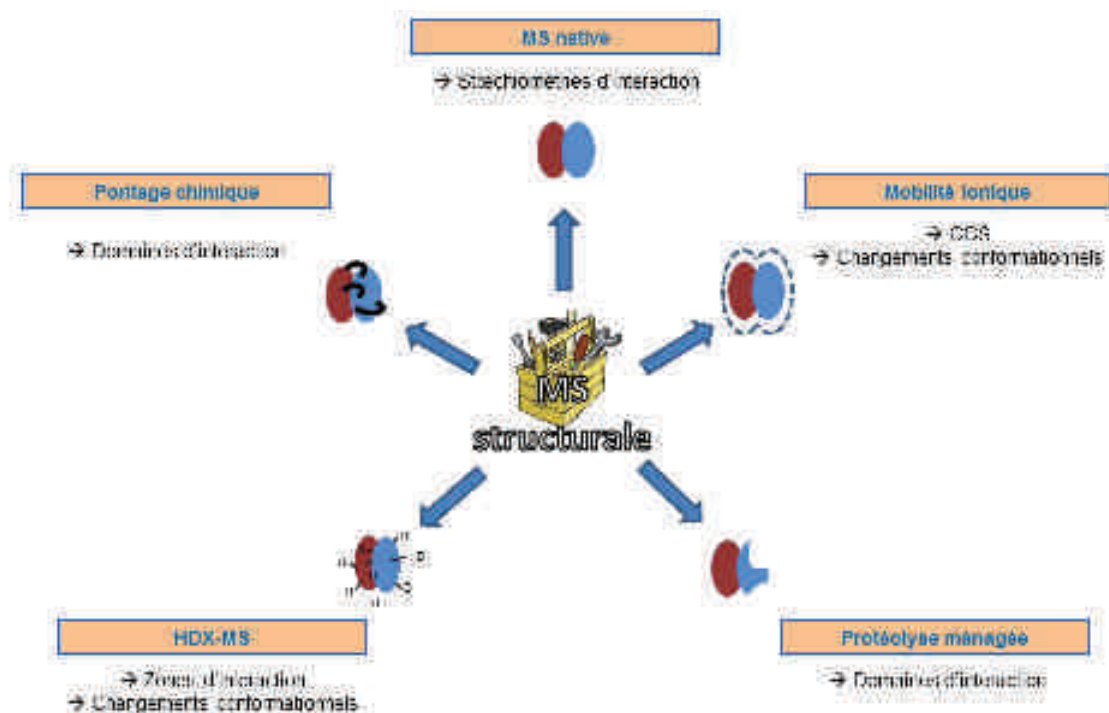


Figure 19. Représentation schématique de la stratégie analytique mise en place pour la caractérisation structurale du complexe Bcd1p FL/Rtt106p(65-320).

## 3. Résultats

### 3.1. Détermination de la stœchiométrie d'interaction du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320)

La première étape dans la caractérisation structurale du complexe a consisté en une analyse des partenaires individuels et du complexe par des approches de MS native [44].

#### 3.1.1. Analyse des partenaires individuels

##### 3.1.1.1. Analyse de Bcd1pFL

L'analyse de la protéine Bcd1pFL en conditions dénaturantes permet de déterminer la masse de ce composé ( $42625.5 \pm 0.3$  Da) en bonne adéquation avec la masse théorique (42625.0 Da) (figure 20 a). Si l'analyse en conditions natives permet de caractériser une forme monomérique majoritaire ( $42752.0 \pm 0.3$  Da), et une forme dimérique minoritaire ( $85508.2 \pm 1.3$  Da), elle met en évidence une différence de 126.5 Da entre les espèces monomériques mesurées dans les deux conditions (figure 20 b). Cet incrément de masse est dû à la fixation de deux atomes de zinc dans la partie N-ter de la protéine, correspondant aux deux domaines doigts de zinc [42]. Nous pouvons constater ici, la grande stabilité en phase gazeuse de ce complexe protéine/ions métalliques, étant donné la valeur de tension de cône utilisée (200 V).

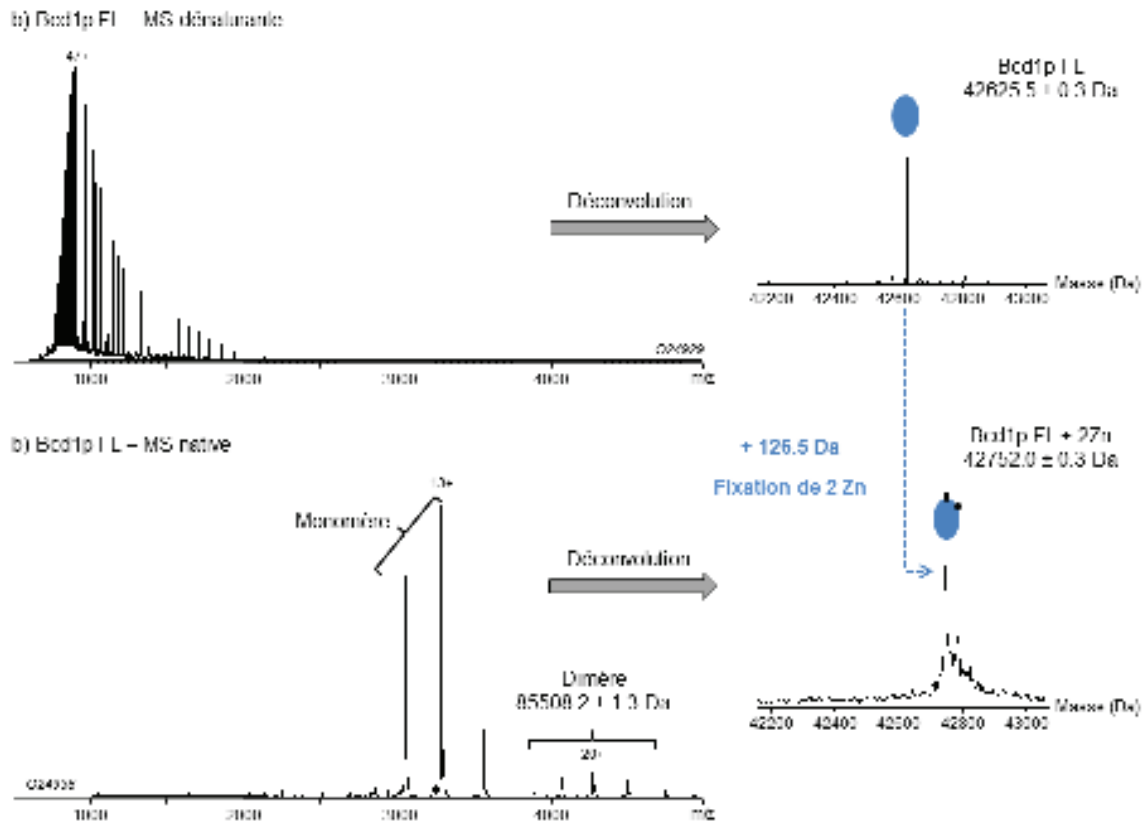


Figure 20. Caractérisation de Bcd1p FL en conditions dénaturantes et natives. Bcd1p FL, est infusé sur le Synapt G2 HDMS à  $2\ \mu M$  ( $H_2O/ACN/HCOOH$  : 50/50/1) ( $V_c$  : 40 V,  $P_i$  : 2.1 mbar) en conditions dénaturantes (a) et à  $5\ \mu M$  ( $AcONH_4$  150 mM, pH 7.5) ( $V_c$  : 200 V,  $P_i$  : 6 mbar) en conditions natives (b).

### 3.1.1.2. Analyse de Rtt106p(65-320)

L'analyse du partenaire Rtt106p(65-320) en conditions natives, permet de le caractériser sous une forme monomérique majoritaire ( $29695.2 \pm 0.3\ Da$ ), avec une bonne concordance avec la masse attendue ( $29694.1\ Da$ ). Une forme dimérique de Rtt106p(65-320) est aussi caractérisée ( $59391.0 \pm 1.0\ Da$ ), mais reste minoritaire (figure 21).

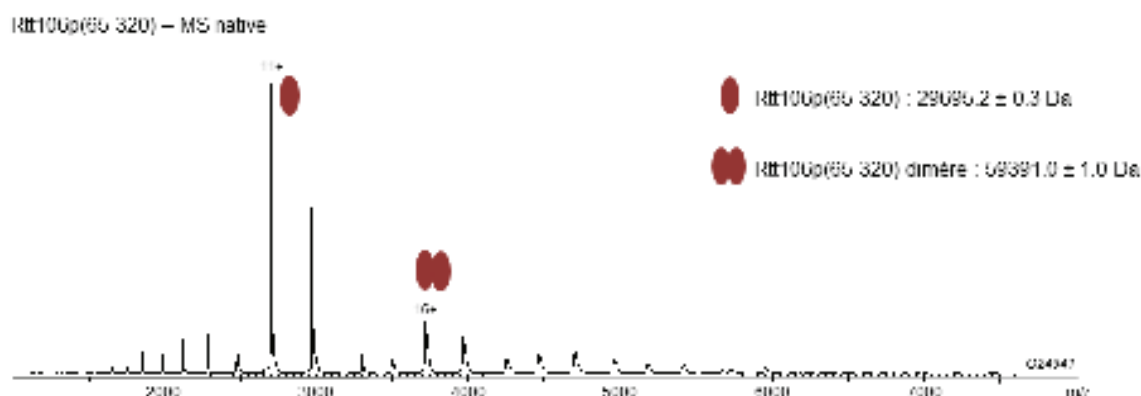


Figure 21. Caractérisation de Rtt106p(65-320) en conditions natives. Rtt106p(65-320), est infusé sur le Synapt G2 HDMS à  $5 \mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$  150 mM, pH 7.5) ( $V_c$  : 200 V,  $P_i$  : 6 mbar).

### 3.1.2. Analyse du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320)

Afin de déterminer la stœchiométrie d'interaction du complexe, nous avons procédé à des analyses MS en conditions natives. Toutefois, la caractérisation de ce complexe a nécessité plusieurs optimisations, notamment au niveau expérimental, mais aussi au niveau instrumental.

Une des premières optimisations s'est portée sur le mode d'assemblage du complexe. Ainsi nous avons mis en évidence qu'une addition des partenaires individuels *in vitro*, ne permettait de former que très peu de complexe (figure 22 a). En effet, en ajoutant de façon équimolaire le partenaire His-Bcd1pFL avec Rtt106p(65-320), très peu d'espèces faisant référence à un complexe 1:1 sont observées ( $74772.0 \pm 2.0$  Da, pics verts clairs figure 22 a). L'analyse du complexe co-purifié en conditions natives a, quant à elle, permis de caractériser l'interaction directe entre ces deux partenaires, avec une stœchiométrie d'interaction de 1:1 ( $72450.5 \pm 0.4$  Da, pics verts foncés figure 22 b).

La différence de masse entre le complexe reconstitué et co-purifié, vient du fait que les expériences préliminaires de reconstitution du complexe aient été réalisées avec un partenaire Bcd1p marqué d'un tag histidine. Il est à noter, que pour toutes les expériences suivantes, c'est le complexe co-purifié qui a été utilisé.

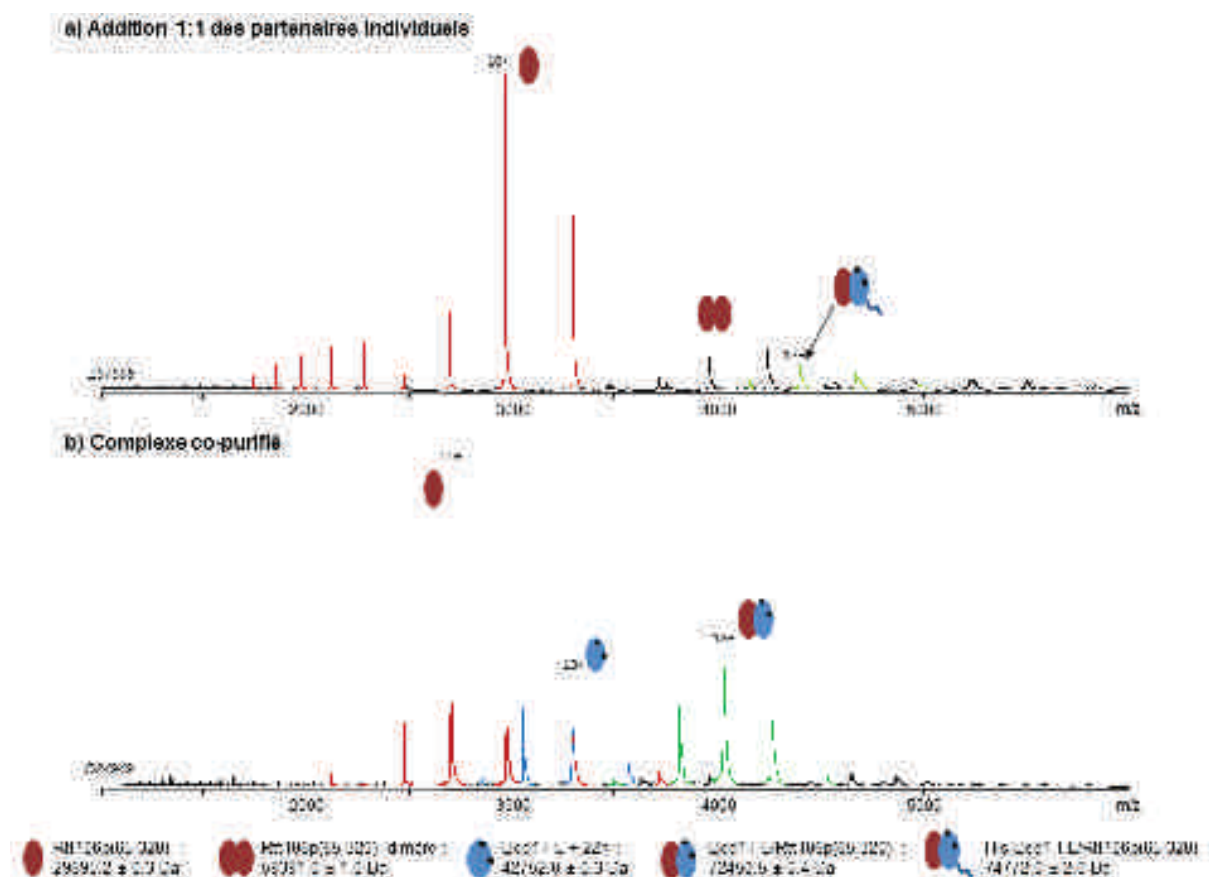


Figure 22. Suivi de l'assemblage du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par MS native. Les complexes reconstitués (a) ou co-purifiés (b) sont infusés sur le Synapt G2 HDMS à 5  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) (Vc : 120 V, Pi : 6 mbar).

### 3.2. Suivi de l'assemblage du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par IM-MS native

Afin de compléter les informations structurales sur ce complexe, nous avons utilisé l'approche de mobilité ionique couplée à la MS native (IM-MS). Cette technique permet de caractériser la conformation d'espèces en phase gazeuse, sous forme de surfaces ou sections efficaces de collision (CCS) [45]. Cette CCS sera alors une caractéristique d'une protéine en particulier, et le suivi de l'assemblage de différents partenaires par IM-MS pourra alors renseigner sur d'éventuels réarrangements structuraux [44, 46].

Dans ce contexte, le complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) a été analysé par IM-MS native, et les <sup>TW</sup>CCS<sub>N<sub>2</sub></sub> (CCS déterminée dans une cellule de mobilité ionique, sous azote, de type « Travelling Wave ») de ce dernier mais aussi des partenaires individuels ont été déterminées.

Les temps de dérive ( $t_d$ ) des ions majoritaires ont été extraits, et au travers d'un étalonnage, ont permis d'en déduire leur  $^{TW}CCS_{N_2}$ . Pour construire notre droite d'étalonnage nous avons ici utilisé trois protéines, pour lesquelles les  $^{DT}CCS_{He}$  sont référencées (CCS déterminées avec une cellule de mobilité de type « Drift Tube », remplie d'hélium) [47], et dont les masses encadrent au mieux celles de nos analytes :  $\beta$ -lactoglobuline (monomère 18.5 kDa et dimère 37kDa), transthyréine (56 kDa) et sérum albumine bovine (69 kDa).

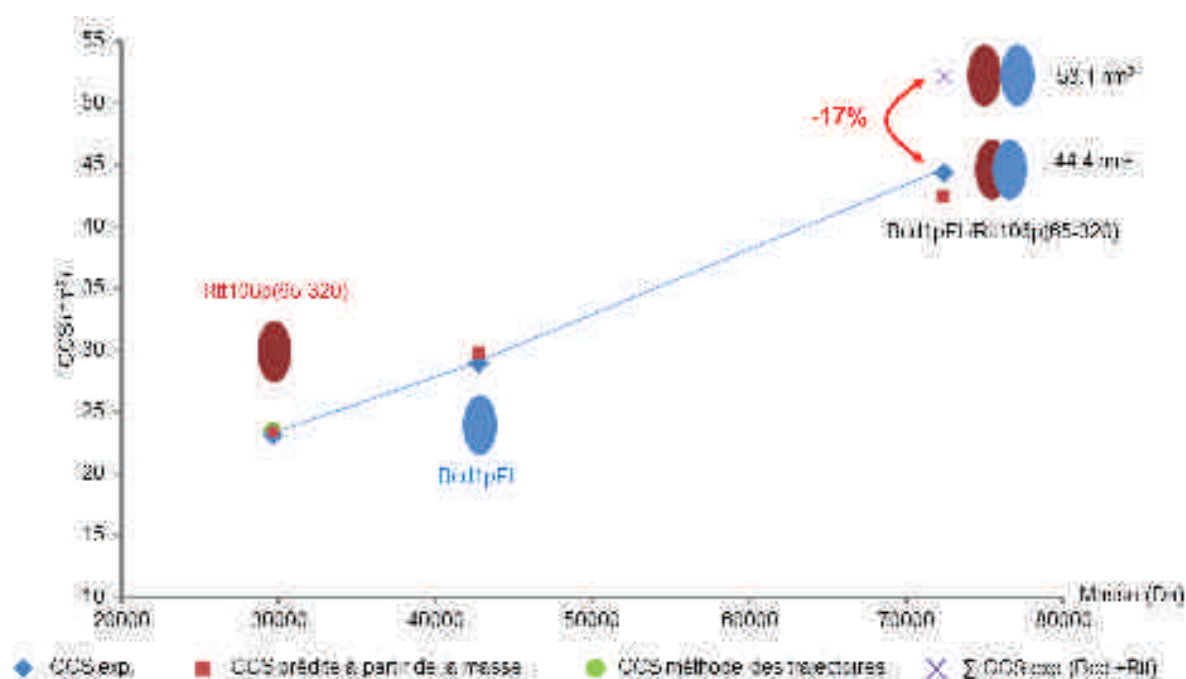
Les  $^{TW}CCS_{N_2}$  mesurées sur les états de charge majoritaires de chaque espèce ont été ensuite moyennés (tableau 2 et figure 23), prenant ainsi compte de l'effet des répulsions coulombiennes sur la conformation globale des protéines [48, 49]. Ainsi, les  $^{TW}CCS_{N_2}$  expérimentales ont été comparées avec les CCS théoriques, déterminées à partir de la structure cristallographique et du logiciel Mobcal pour Rtt106p(65-320), ou à partir de la masse en l'absence de structure haute résolution [50].

- L'analyse du partenaire Rtt106p(65-320) de façon individuelle permet de déterminer une  $^{TW}CCS_{N_2}$  expérimentale de  $23.18 \pm 1.86 \text{ nm}^2$ , qui est en bonne adéquation avec la CCS prédite à partir de la masse ( $- 0.17 \text{ nm}^2$ ), et les algorithmes de calcul « Exact Hard Sphere Scatering » ( $- 0.39 \text{ nm}^2$ ), et « Trajectory Method » ( $- 0.28 \text{ nm}^2$ ) (tableau 2). Pour la dernière méthode de calcul de CCS *in silico*, avec la méthode « Projection Approximation », nous pouvons observer une valeur expérimentale nettement supérieure ( $+ 4.67 \text{ nm}^2$ ). Toutefois ce dernier algorithme est connu pour généralement sous-estimer les CCS des protéines [51].
- La  $^{TW}CCS_{N_2}$  expérimentale du partenaire individuel Bcd1pFL a été caractérisée à  $28.95 \pm 1.52 \text{ nm}^2$ . Cette valeur, est ici en bon accord aussi avec la CCS déterminée à partir de la masse ( $- 0.82 \text{ nm}^2$ ).
- L'analyse du complexe co-purifié Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par IM-MS native a permis de déterminer la  $^{TW}CCS_{N_2}$  à  **$44.40 \pm 1.38 \text{ nm}^2$** . Si nous comparons ici cette valeur à la somme des  $^{TW}CCS_{N_2}$  individuelles des deux partenaires ( $29.95 + 23.18 = \mathbf{53.13 \text{ nm}^2}$ ), nous pouvons mettre en évidence une **différence de 17% en CCS** (figure 23). Cet écart suggère ici que la formation du complexe ne se ferait pas par simple juxtaposition des deux partenaires individuels, mais qu'il entrainerait un fort réarrangement structural (compaction et/ou emboîtement d'une protéine dans l'autre).



Espèces	Masse expérimentale (Da)	Etat de charge	<sup>TW</sup> CCS <sub>N2</sub> expérimentales (nm <sup>2</sup> )		CCS théoriques (nm <sup>2</sup> )			
			Individuelle	Moyenne	Masse*	PA	EHSS	TM
Bcd1pFL	42752.0 ± 1	11	27.48 ± 0.05	28.95 ± 1.52	29.77	-	-	-
		12	28.86 ± 0.07					
		13	30.51 ± 0.09					
Rtt106p(65-320)	29695.2 ± 1	9	21.29 ± 0.06	23.18 ± 1.86	23.35	18.51	23.57	23.46
		10	23.23 ± 0.02					
		11	25.02 ± 0.02					
Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) 1:1	72450.5 ± 1	16	43.01 ± 0.03	44.40 ± 1.38	42.32	-	-	-
		17	44.39 ± 0.07					
		18	45.77 ± 0.10					

Tableau 2. Comparaison des <sup>TW</sup>CCS<sub>N2</sub> expérimentales et théoriques pour les partenaires individuels Bcd1pFL et Rtt106p(65-320), et le complexe co-purifié Bcd1pFL/Rtt106p(65-320). Les valeurs de <sup>TW</sup>CCS<sub>N2</sub> expérimentales sont déterminées à partir d'un triplicat d'analyse sur le Synapt G2 HDMS, sur lequel l'échantillon est infusé à 5 μM (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) (V<sub>c</sub> : 100 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar, Trap et Transfert CE : 4 et 2 V, Trap Bias : 44.5 V, QHe/QN2 : 105/25 mL/min, WH : 40 V, WV : 1053 m/s). Les CCS théoriques sont prédites à partir de la masse, et de l'équation :  $CCS_{MW} = 2.435 \times Mw^{2/3}$  [50] ; ou à partir du logiciel Mobcal et des algorithmes « Projection Approximation » (PA), « Exact Hard Sphere Scattering » (EHSS) et « Trajectory Method » (TM) pour Rtt106p(65-320) bénéficiant d'une structure cristallographique (PDB : 3GYP, [43]).



### 3.3. Détermination des domaines d'interaction du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par protéolyse ménagée

En parallèle à ces premières analyses par MS native et IM-MS native, des expériences de protéolyse ménagée ont été menées au laboratoire par le Dr. Saliou dans le but d'apporter des résultats préliminaires quant aux potentiels domaines d'interaction.

Généralement cette approche est basée sur la comparaison par analyse LC-MS des peptides générés par digestion enzymatique contrôlée, entre un état libre et un état complexé [52]. Ainsi, les zones peptiques identifiées dans une protéine libre mais qui ne le sont pas lorsque cette dernière est engagée dans un complexe, peuvent faire référence à une potentielle zone d'interaction [52, 53]. Cette zone étant masquée par un autre partenaire, elle n'est plus accessible pour l'enzyme. L'approche menée au laboratoire était légèrement différente, dans le sens où des techniques en conditions natives et dénaturantes ont été combinées (figure 24).

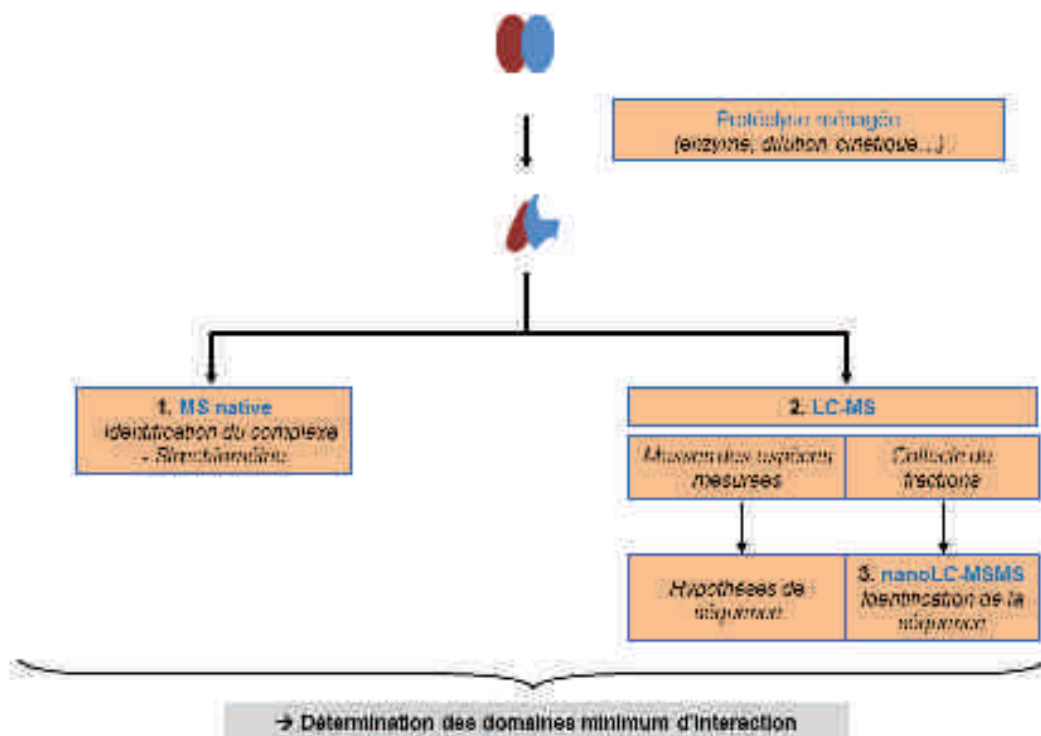


Figure 24. Représentation schématique du processus analytique possible dans le cadre d'une analyse par protéolyse ménagée.

Ainsi différents essais de digestions du complexe Bcd1pFL/Rtt106(65-320) ont été réalisés, en jouant notamment sur la nature de l'enzyme (trypsine, chymotrypsine), et sur le temps de digestion. Les échantillons ont ensuite été analysés par MS native de manière à vérifier que

des complexes mixtes Bcd1p/Rtt106p étaient toujours présents. Ensuite, les séquences des hypothétiques domaines minimum de liaison ont été vérifiés par des analyses LC-MS et LC-MS/MS. Les résultats alors générés ont permis de montrer de manière surprenante, que seule la protéine Bcd1p était sensible à la digestion ; la protéine Rtt106p était quant à elle quasiment totalement réfractaire aux différentes protéases. Ainsi pour la condition expérimentale la plus informative, c'est-à-dire après 4h de digestion trypsique, des domaines minimum d'interaction ont pu être mis en évidence (figure 25). Sur le spectre de masse obtenu en conditions natives, deux espèces faisant référence à des complexes Bcd1p/Rtt106p « protéolysés » ont été déterminés. Si la protéine Rtt106(65-320) n'apparaît pas touchée par la digestion, nous observons que les fragments 113-366 (très majoritaire) et 150-366 (dans une moindre mesure) de Bcd1p sont en mesure d'interagir avec la protéine Rtt106p(65-320) (respectivement les espèces en bleu et en vert).

#### MS native du complexe après 4h de digestion trypsique

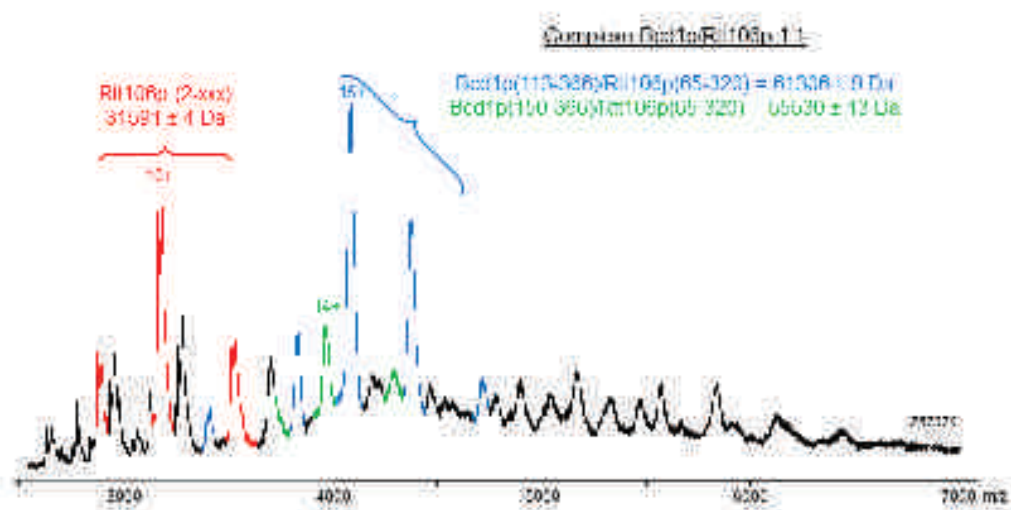


Figure 25. Caractérisation par MS native du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) après 4h de digestion trypsique. L'échantillon est infusé sur le LCT (Waters) à environ 5  $\mu$ M (AcONH<sub>4</sub> 150 mM, pH 7.5) (Vc : 200 V, aperture : 10 V, Pi : 7 mbar).

Ces expériences de protéolyse ménagée sur le complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) ont permis de mettre en évidence que toute une partie N-ter (1-113) de la protéine Bcd1p n'était pas primordiale pour conserver une interaction entre ces deux partenaires, ce qui est en accord avec les données ITC et CD. De plus, même si l'espèce faisant référence au complexe Bcd1p(150-366)/Rtt106p(65-320) est relativement minoritaire, la mise en évidence de ce complexe suggère que la partie 113-150 de Bcd1p ne serait pas non plus indispensable pour le

maintien du complexe, ou que la région 150-366 suffit à maintenir l'interaction, mais peut-être avec une moins bonne affinité.

Toutefois, au regard de l'investissement demandé par une telle approche et de la résolution des résultats générés, il apparaît ici que cette technique n'est pas assez résolutive pour apporter des éléments nouveaux en terme de caractérisation structurale. En effet les expériences d'ITC avaient déjà montré que la délétion de la partie 1-119 de Bcd1p n'avait aucune influence délétère sur l'association du complexe Bcd1p/Rtt106p. Dès lors, je me suis dirigé vers l'approche HDX-MS, dans l'optique de déterminer des zones d'interaction avec une meilleure résolution [52].

### 3.4. Etude structurale du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par HDX-MS

Afin de compléter les informations structurales sur le complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320), des expériences HDX-MS ont été menées. Ces dernières avaient pour objectifs :

- De déterminer des zones probables d'interaction avec une meilleure résolution, que les expériences d'ITC ou protéolyse ménagée.
- De localiser les domaines subissant des changements conformationnels, et ainsi les corréler avec les données obtenues en IM-MS native montrant un fort réarrangement structural global.

Pour ce faire nous avons réalisé des comparatifs d'incorporation en deutérium entre les partenaires individuels et le complexe co-purifié.

#### 3.4.1. Optimisation des couvertures de séquence

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à déterminer des conditions expérimentales nous permettant d'obtenir la couverture de séquence la plus complète possible pour les deux protéines formant le complexe (figure 26 et 27).

Ici, nos optimisations se sont portées sur la quantité de matériel injectée. Ainsi, pour une durée de « quench » de 30 secondes (tampon 100 mM phosphate, 2 M GndHCl, 100 mM TCEP, pH 2.3), un débit de passage sur la cartouche de digestion de 200  $\mu$ L/min, nous avons évalué les couvertures de séquence pour 20 et 100 pmoles de matériel injecté (figure 26 et 27).

- Pour la protéine **Bcd1p** (figure 26 et tableau 3), nous pouvons observer une nette amélioration de la couverture de séquence. L'augmentation de la quantité de matériel injectée permet d'obtenir un gain de 10% sur le taux de recouvrement, et ainsi de passer de 85 à 95%. L'autre avantage d'une injection plus concentrée, se situe au niveau de la redondance peptidique ; l'indice de redondance passe alors de 1.4 à 2.6. Cet aspect est notamment marqué pour les zones 25-76, 215-238 et 283-325.

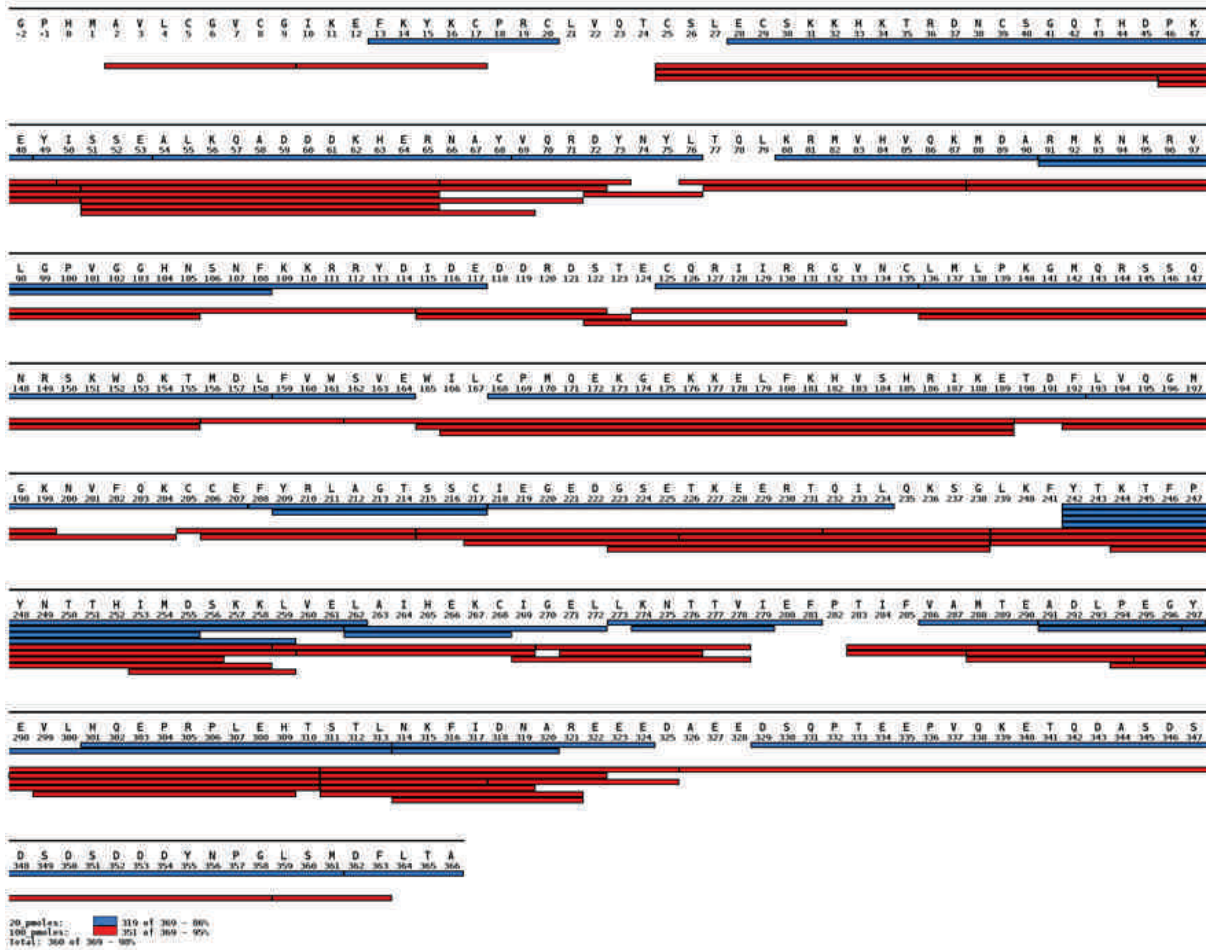


Figure 26. Optimisation de la couverture de séquence de Bcd1pFL. Les peptides identifiés pour 20 et 100 pmoles de matériel injecté sont respectivement représentés en bleu et rouge.

Echantillon	Quantité injectée (pmoles)	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Bcd1pFL	20	86	1.4
	100	95	2.6

Tableau 3. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 26.

- **Pour la protéine Rtt106p(65-320)** (figure 27 et tableau 4), l'augmentation de la quantité de matériel ne génère là qu'un gain limité au niveau de la couverture de séquence. En effet, passer de 20 à 100 pmoles ne permet d'obtenir qu'un bénéfice de 3% au niveau du taux de recouvrement (nous passons de 85 à 88% de couverture de séquence). La condition utilisant plus de matériel permet néanmoins d'augmenter l'indice de redondance de 2.2 à 2.5, avec un effet notamment visible dans la région N-ter de la protéine (61-93).

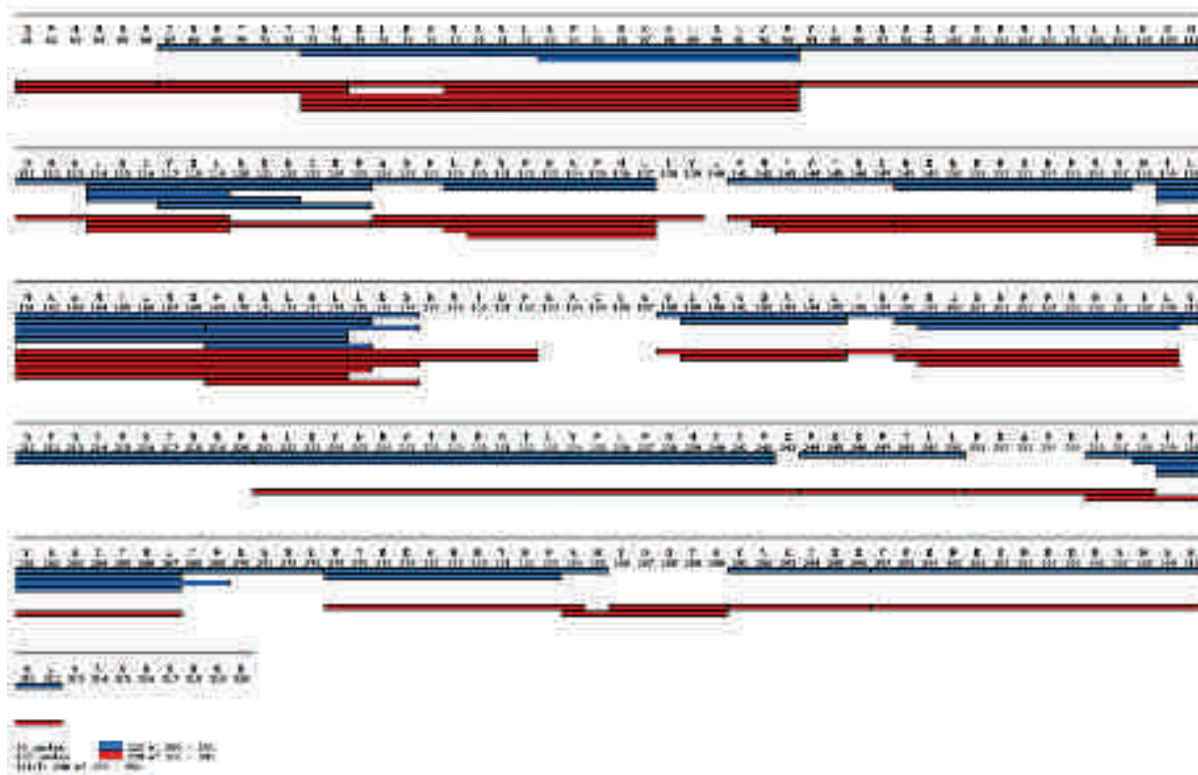


Figure 27. Optimisation de la couverture de séquence de Rtt106p(65-320). Les peptides identifiés pour 20 et 100 pmoles de matériel injecté sont respectivement représentés en bleu et rouge. Les couvertures de séquence sont respectivement de 85 et 88% ; alors que les indices de redondance sont respectivement de 2.2 et 2.5.

Echantillon	Quantité injectée (pmoles)	Recouvrement (%)	Indice de redondance
Rtt106p(65-320)	20	85	2.2
	100	88	2.5

Tableau 4. Taux de couverture de séquence et indice de redondance associés à la figure 27.

Notons que pour les expériences de deutération qui ont suivi, nous avons retenu une injection de 100 pmoles de matériel protéique.



### 3.4.2. Les analyses comparatives en HDX-MS

Dans le cadre de cette analyse structurale, nous avons opté pour des temps de marquage allant de 30 secondes à 60 minutes. Les résultats sont présentés ici sous forme de graphiques différentiels. Ainsi, pour vérifier l'impact de la fixation de Rtt106p(65-320) sur Bcd1pFL, nous avons comparé le taux d'incorporation des peptides de Bcd1pFL entre l'état libre de cette protéine et son état complexé (figure 28). La comparaison des profils de deutération des peptides de Rtt106p(65-320) entre l'état libre et complexé de cette protéine, a permis à l'inverse d'évaluer l'impact de Bcd1pFL sur Rtt106p(65-320) (figure 29). Dans le mode de représentation utilisé ici, tous les peptides suivis en MS sont représentés sur l'axe des abscisses. Les différences d'incorporation en deutérium (exprimées en Dalton), pour tous ces peptides, aux différents temps de marquage (représentés par une couleur différente) sont représentées selon l'axe des ordonnées. Les barres verticales représentent les sommes des différences d'incorporation à tous les temps d'incubation, pour un peptide donné. La significativité de ces différences sommées a été évaluée selon leur déviation standard [54, 55], et fixée à 1.5 Da.

#### 3.4.2.1. *Bcd1pFL vs. Bcd1pFL/Rtt106p(65-320)*

Si nous considérons les effets induits sur Bcd1pFL par la fixation de Rtt106p(65-320) (figure 28 a), nous pouvons remarquer dans un premier temps qu'aucune différence majeure d'incorporation n'est observée pour une grande partie N-ter (1-135). Cette première analyse vient renforcer les résultats obtenus en ITC, DC ou protéolyse ménagée.

Par ailleurs, de nombreuses zones apparaissent impactées de façon directe ou indirecte lors de la liaison du second partenaire. En effet, nous pouvons observer des baisses significatives du taux d'incorporation en deutérium pour les zones 139-158, 165-192, 218-234, 242-259, 272-281 et 329-361. A titre représentatif, les suivis d'incorporation en deutérium en fonction du temps pour les peptides 139-158 et 272-281 sont présentés (figure 28 b), et montrent la diminution du taux de deutération pour la forme complexée. S'il est impossible de savoir si ces différentes zones sont spatialement proches en l'absence de structure haute résolution de Bcd1p ou d'un homologue, elles sont relativement étendues selon la séquence linéaire de la protéine. Si une ou plusieurs zones font référence à la zone d'interaction, il apparaît fort probable que plusieurs fassent référence à des réarrangements structuraux et/ou des compactations locales. Cette hypothèse peut être cohérente en considérant :



- les résultats IM-MS montrant une CCS du complexe 17% inférieure à la somme des CCSs des composés individuels.
- les résultats HDX-MS, prouvant des réarrangements structuraux s'opérant sur Bcd1pFL. En effet, nous pouvons observer que le domaine 208-217 présente un taux de deutération supérieur dans l'état complexé (figure 28 a et b), traduisant une zone qui devient plus accessible au solvant deutéré suite à un changement conformationnel.

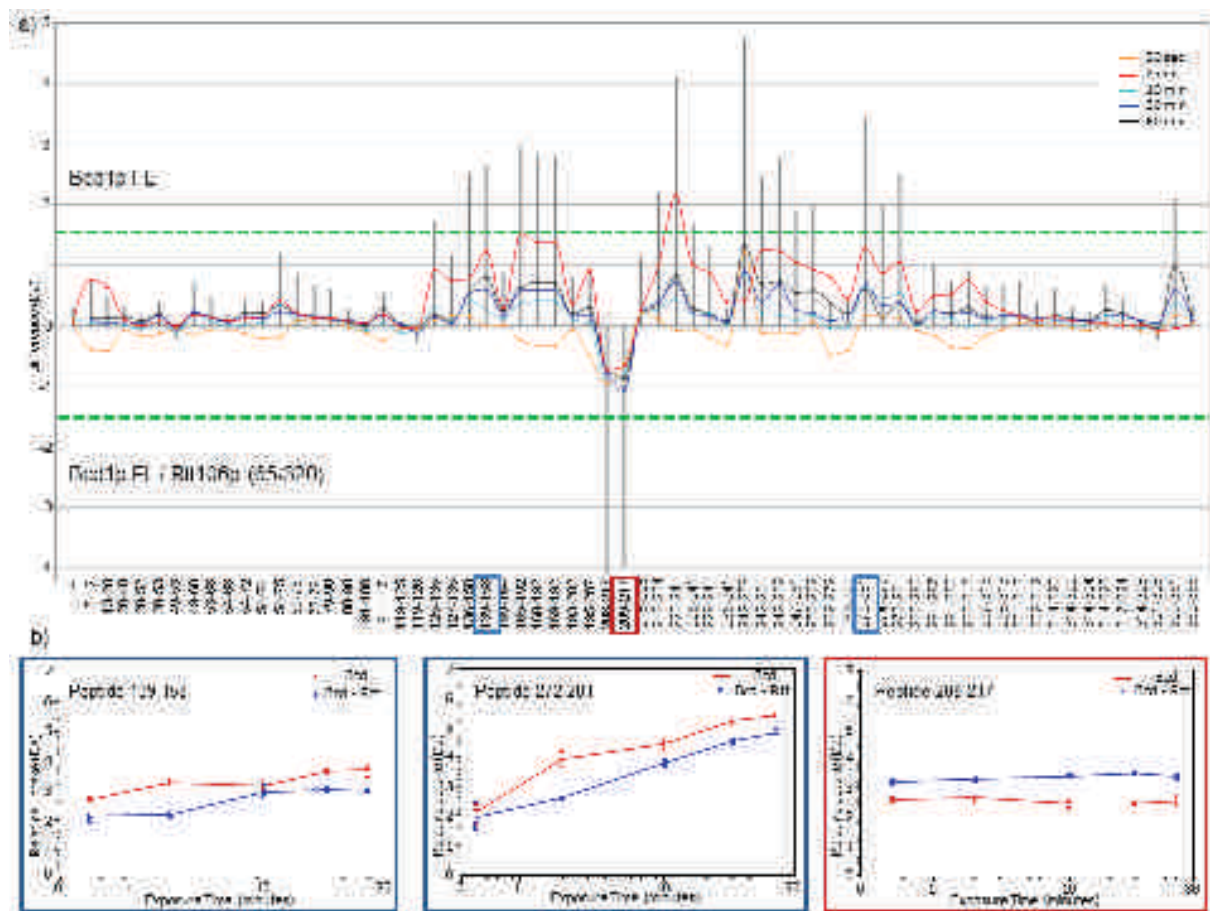


Figure 28. Différentiels d'incorporation de la protéine Bcd1pFL. La différence est faite pour tous les peptides de Bcd1pFL entre l'état libre et complexé de cette protéine (a) ; pour des temps d'incubation de: 30 sec (orange), 2 min (rouge), 10 min (cyan), 30 min (bleu) et 60 min (noir). Les barres verticales grises représentent la somme des différences d'incorporation en deutérium de chaque peptide, pour les cinq temps de marquage. Les lignes en pointillés verts représentent les critères de significativité pour les différences sommées. Les incorporations relatives en deutérium en fonction du temps pour des peptides représentatifs identifiés dans la section (a) (encadrés) sont représentées sous formes de graphiques dans le panel (b). La courbe rouge fait référence à l'incorporation dans l'état libre (Bcd1pFL seul), et la bleue à l'état complexé (Bcd1pFL/Rtt106p(65-320)).

### 3.4.2.2. *Rtt106p(65-320)* vs. *Bcd1pFL/Rtt106p(65-320)*

Si nous considérons maintenant les effets produits sur *Rtt106p(65-320)* par le recrutement de *Bcd1pFL*, nous pouvons voir que les différences significatives ( $> 1.5$  Da) sont plus locales (figure 29 a). En effet, la zone 159-195 présente des taux de deutérotation réduits une fois le complexe formé. La réduction de la deutérotation est observable pour trois peptides se trouvant dans cette zone (figure 29 b).

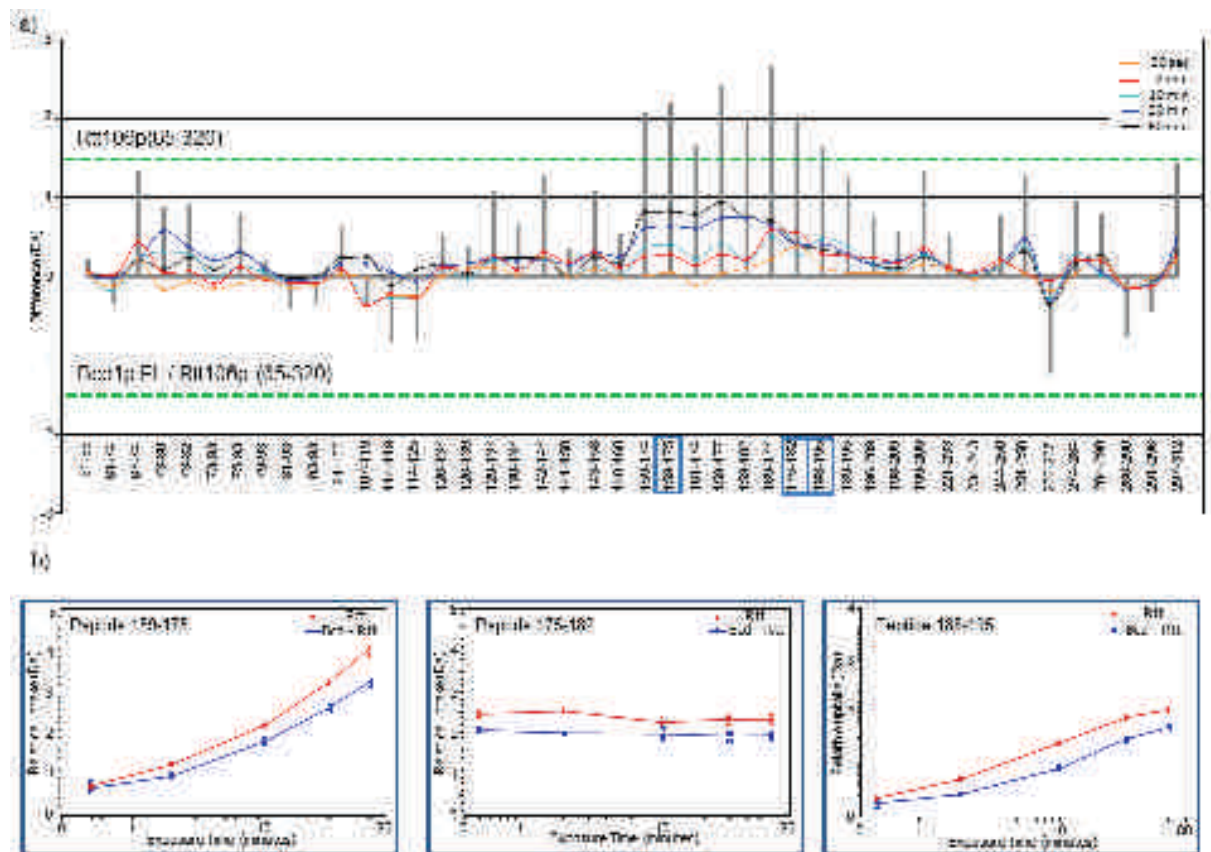


Figure 29. Différentiels d'incorporation de la protéine *Rtt106p(65-320)*. La différence est faite pour tous les peptides de *Rtt106p(65-320)* entre l'état libre et complexé de cette protéine (a) ; pour des temps d'incubation de: 30 sec (orange), 2 min (rouge), 10 min (cyan), 30 min (bleu) et 60 min (noir). Les barres verticales grises représentent la somme des différences d'incorporation en deutérium de chaque peptide, pour les cinq temps de marquage. Les lignes en pointillés verts représentent les critères de significativité pour les différences sommées. Les incorporations relatives en deutérium en fonction du temps pour des peptides représentatifs identifiés dans la section (a) (encadrés) sont représentées sous formes de graphiques dans le panel (b). La courbe rouge fait référence à l'incorporation dans l'état libre (*Rtt106p(65-320)* seul), et la bleue à l'état complexé (*Bcd1pFL/Rtt106p(65-320)*).

La structure haute résolution de ce partenaire étant disponible, nous y avons représenté les résultats HDX-MS (figure 30). Ainsi, la région mise en évidence est composée de deux hélices  $\alpha$  reliées par une boucle, le tout étant regroupé dans un espace relativement restreint.

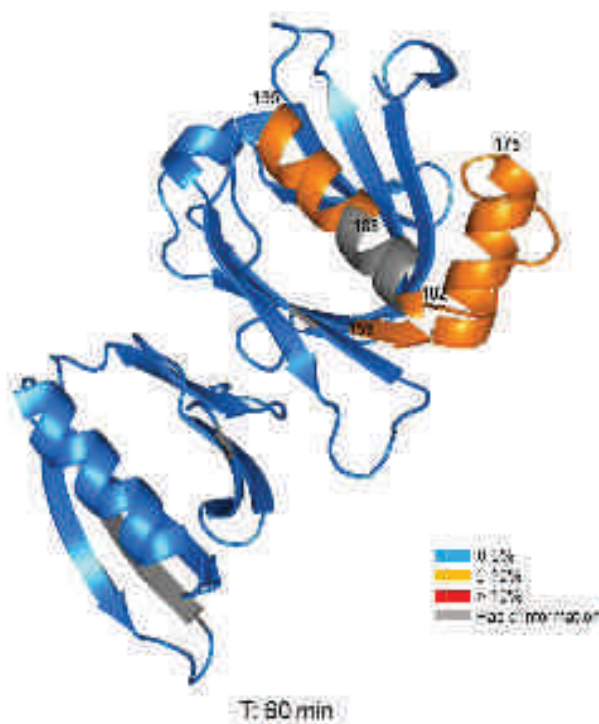


Figure 30. Différentiel relatif d'incorporation en deutérium à 60 minutes d'exposition entre l'état libre de Rtt106p(65-320) et l'état complexé Bcd1pFL/Rtt106p(65-320). Le code de couleur pour le différentiel relatif d'incorporation est indiquée en bas à droite (les couleurs froides correspondent à des zones pour lesquelles le taux de deutération reste similaire dans les deux conditions; tandis que les couleurs chaudes sont associées à des zones qui intègrent moins de deutérium dans l'état complexé).

A la vue de ces résultats, il est probable que Rtt106p(65-320) ne subisse que très peu de réarrangement conformationnel, et que cette région 159-195 soit directement impliquée dans la formation du complexe. Cette hypothèse prend d'autant plus de sens, que l'homologue structural de Rtt106p(65-320) nommé Pob3, ne possédant pas l'hélice  $\alpha$  159-174 et la boucle 175-182 (figure 31), n'est pas en mesure de former un complexe avec Bcd1p. Cette observation suggère donc que la région 159-195, mise en évidence par HDX-MS, serait au cœur de l'interaction, et plus précisément la zone 159-182.

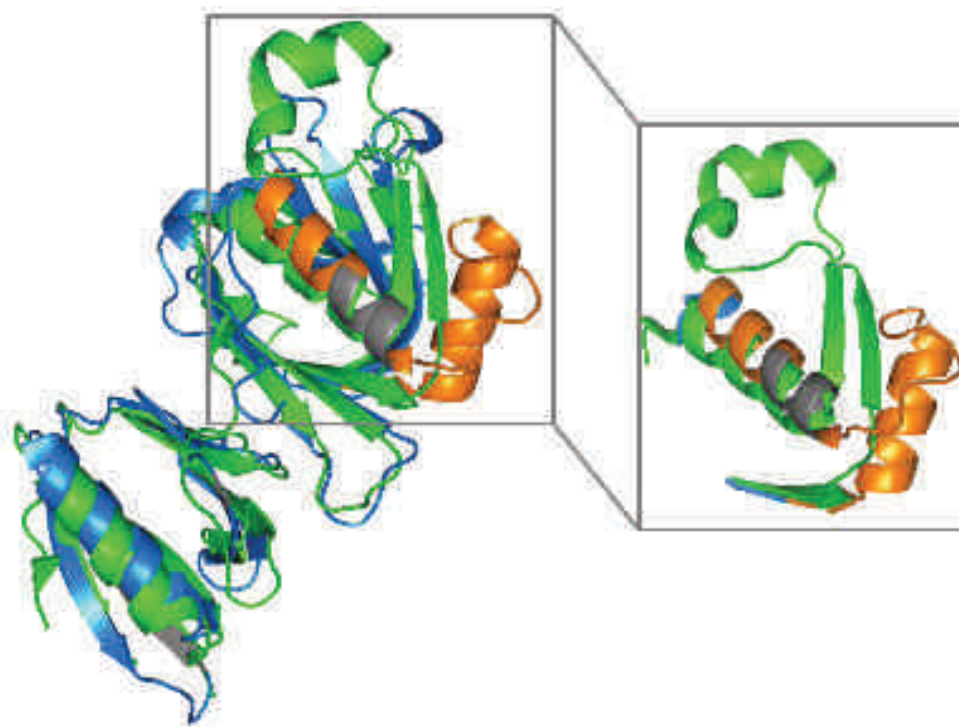


Figure 31. Superposition structurale de Rtt106p(65-320) (bleu et orange) avec l'homologue structural Pob3 (vert) (PDB : 2GCJ, [56]).

### 3.5. Etude structurale du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) par XL-MS

Avec pour objectif de valider des points d'ancrage mis en évidence par l'approche HDX-MS, nous avons réalisé des expériences de pontages chimiques couplés à une analyse MS.

#### 3.5.1. Approche utilisée

Pour ce faire, nous avons utilisé un agent chimique pontant couramment utilisé dans ce type approche : le BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate) [57]. Cet agent homo-bifonctionnel (ester sulfo-NHS), muni d'un bras espaceur de 11.4 Å, cible les acides aminés portant une amine primaire. Un mélange équimolaire en BS3 léger (d0) et lourd (d4) a été utilisé lors de la réaction de pontage (figure 32). Ensuite, les échantillons sont déposés sur gel 1D SDS PAGE, les bandes d'intérêts sont réduites, alkylées et digérées à la trypsine ; puis analysées par nanoLC-MS/MS sur le Q Exactive Plus (ThermoFischer) (figure 32 a).

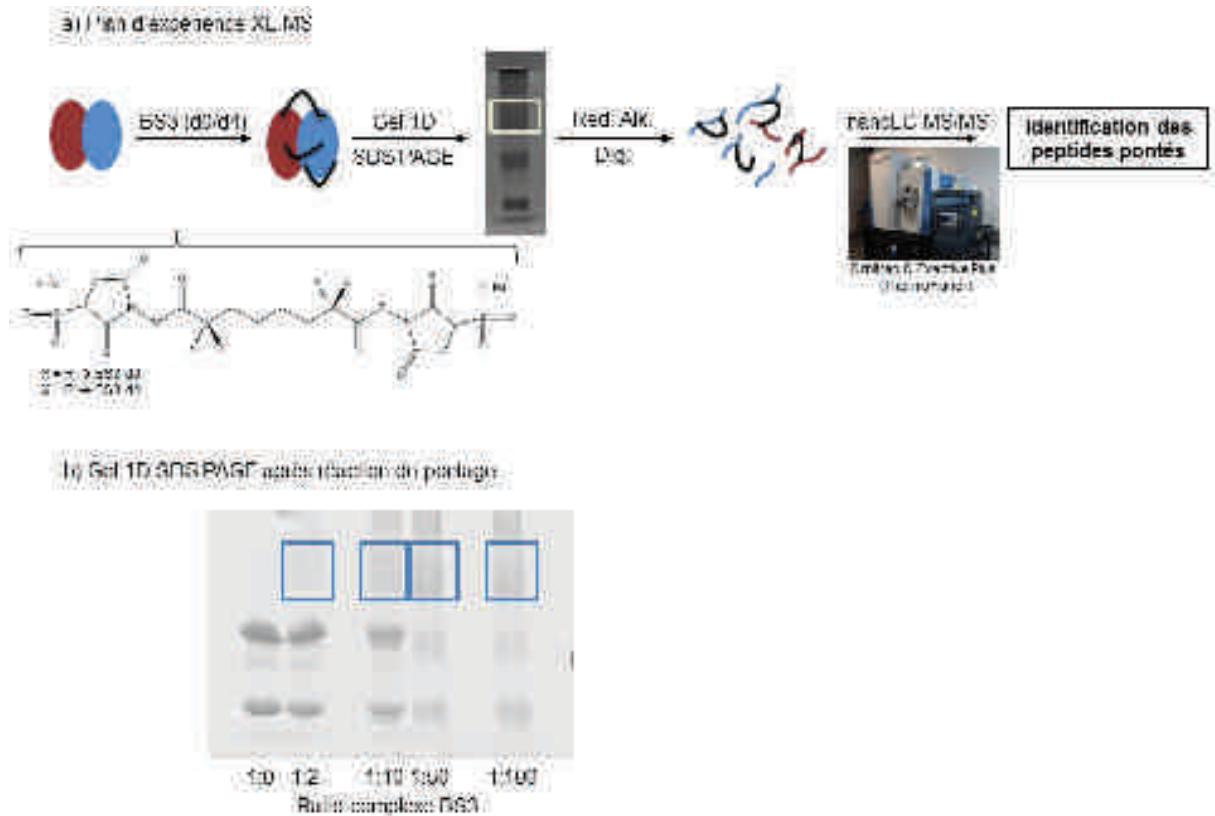


Figure 32. Représentation schématique de l'expérience XL-MS réalisée sur le complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) (a). Red. = réduction, Alk. = alkylation, Dig. = digestion trypsique. Le panel (b) présente le gel SDS PAGE 1D réalisé après la réaction de pontage, pour différents ratios complexe : BS3 (1:0 ; 1:2 ; 1:10 ; 1:50 et 1:100).

Concernant les réactions de pontages, différents ratios « complexe/BS3 » ont été testés (excès en BS3 d0/d4 de 2, 10, 50 et 100) (figure 32 b). Les peptides pontés identifiés ont été validés par double identification du peptide lourd et léger. Concernant l'identification des peptides pontés, les recherches dans les bases de données ont été réalisées avec des logiciels dédiés. Dans un premier temps, nous avons utilisé le logiciel p-link [58] dont l'utilisation est largement répandue dans cette approche. Dans un second temps, nous avons testé la suite logicielle MS Studio présentée lors de la conférence SMAP 2015 par Martial Rey [59].

### 3.5.2. Résultats

Si les deux logiciels nous ont permis de mettre en évidence les mêmes peptides pontés d'intérêt, le logiciel p-link nécessite de lancer une recherche en ligne de commande après avoir généré un fichier .mgf. Les résultats sont présentés sous forme de tableau, et nécessitent alors un temps important de vérification. Le logiciel MS Studio permet lui de lancer une recherche directement avec un fichier .raw, et la présentation des résultats est nettement plus



conviviale [59]. Ainsi après recherche dans les bases de données, nous avons pu mettre en évidence pour les différentes conditions testées, trois peptides pontés –inter (tableau 5).

Les lysines K140 et K151 de Bcd1p se trouvent pontées à la lysine K191 de Rtt106p, et la lysine K184 de Rtt106p se trouve pontée avec la K151 de Bcd1p.

N°	Peptides	Masse monoisotopique théorique	Masse monoisotopique expérimentale	Ratio isotopique (d0 / d4) %
1.	GVNCLMLPK <sup>140</sup> GMQR Bcd1p BS3 K <sup>191</sup> QAILTGFK Rtt106p	882.80 (z=3)	882.81 (z=3)	45.7 / 54.3
2.	SKWDK <sup>151</sup> Bcd1p BS3 NLGLLDSNVDFEK <sup>184</sup> Rtt106p	789.06 (z=3)	789.07 (z=3)	48.7 / 51.3
3.	SKWDK <sup>151</sup> Bcd1p BS3 K <sup>191</sup> QAILTGFK Rtt106p	452.25 (z=4)	452.26 (z=4)	47.5 / 52.5

Tableau 5. Peptides inters Bcd1p-Rtt106p identifiés par XL-MS. L'acide aminé C correspond à une cystéine alkylée à l'iodoacétamide ; les masses monoisotopiques théoriques et expérimentales sont renseignées pour les peptides légers (d0).

Dans notre approche expérimentale, la validation des peptides pontés se fait par une double identification léger/lourd (figure 33 a), et les rapports isotopiques observés sont proches de 1:1 (tableau 5 et figure 33 a). L'identification des peptides est réalisée par un séquençage MS/MS des peptides légers et lourds (figure 33 b).

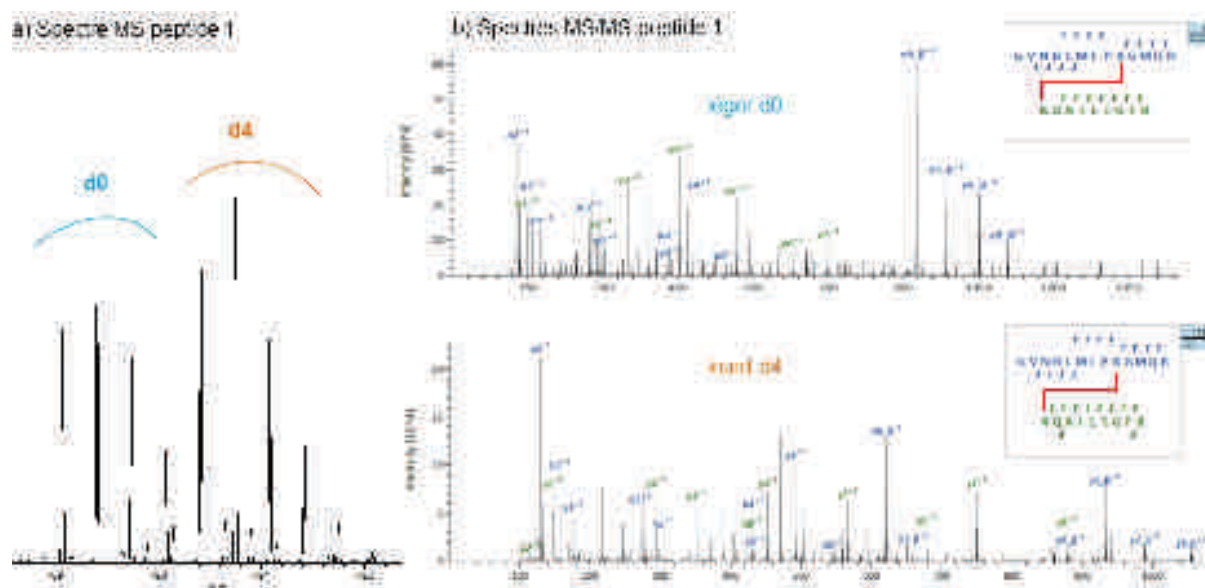


Figure 33. Spectres MS et MS/MS d'un peptide ponté inter Bcd1p/Rtt106p. Le spectre de masse MS (a) présente la double distribution isotopique due au ratio d0/d4. Les spectres de masses MS/MS (b) permettent le séquençage et l'identification des peptides pontés léger et lourd.

Les peptides pontés –inters ici identifiés viennent apporter un élément supplémentaire dans la caractérisation structurale du complexe, et permettent d’orienter un peu plus l’interprétation des résultats HDX-MS. Si nous observons les positions des lysines pontées, elles se trouvent dans des régions préalablement identifiées par HDX-MS comme étant potentiellement des zones d’interactions (figure 34 a). D’un point de vue de la structure de Rtt106p, les lysines 184 et 191, identifiées par XL-MS, se trouvent sur l’hélice  $\alpha$  182-195 (précédemment identifiée en HDX-MS). Cette dernière se trouvant à proximité de l’hélice  $\alpha$  159-174 et de la boucle 175-182 (figure 34 b), tend à confirmer que la zone 159-195 est impliquée dans l’interaction avec Bcd1pFL.

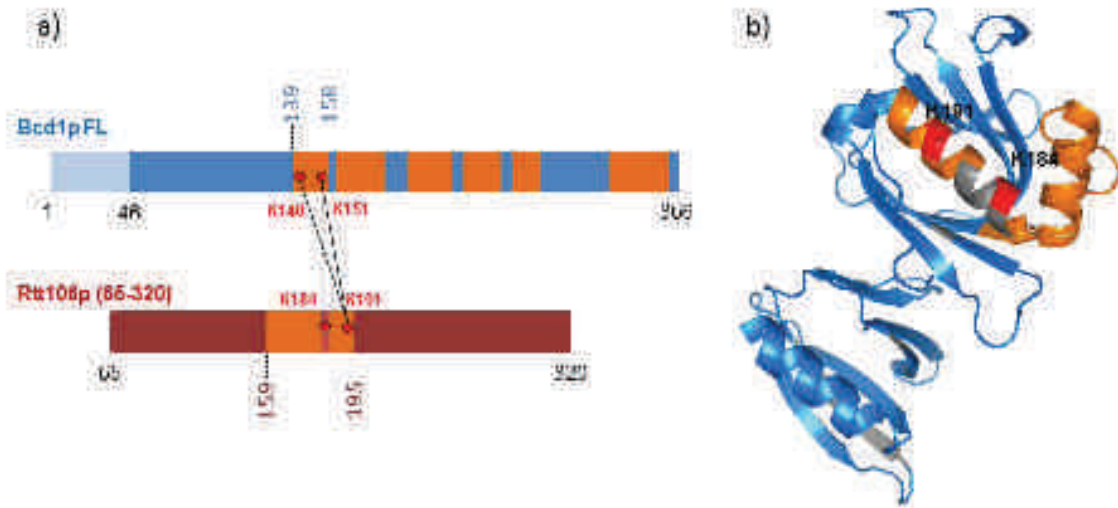


Figure 34. Représentations schématiques des résultats XL-MS et comparaison avec les données HDX-MS. Le panel (a) présente les protéines Bcd1pFL (bleu) et Rtt106p(65-320) selon une représentation linéaire ; les zones identifiées en HDX-MS sont colorées en orange et les lysines pontées en rouge, reliées par un trait noir. Le panel (b) présente la position des lysines pontées de Rtt106p sur la structure cristallographique ; les zones identifiées en HDX-MS sont colorées en orange et les lysines pontées en rouge.



## 4. Conclusions

L'objectif initial de cette étude était de réaliser une caractérisation structurale la plus complète possible du complexe Bcd1p/Rtt106p pouvant intervenir dans la biogénèse des snoRNPs à boîte C/D. L'association entre ces deux partenaires avait dans un premier temps été mise en évidence par double hybride, toutefois aucune structure haute résolution de ce complexe n'a pu être déterminée par RMN ou cristallographie. De ce fait, la combinaison d'outils de MS structurale s'est ici révélée particulièrement informative :

- La MS native a permis dans un premier temps de confirmer l'interaction entre les deux partenaires Bcd1p<sup>FL</sup> et Rtt106p(65-320).
- Les expériences d'IM-MS natives ont mis en évidence un réarrangement structural important, dû à la formation du complexe.
- Les analyses HDX-MS ont permis d'orienter les changements conformationnels sur la protéine Bcd1p, mais aussi de déterminer des zones d'interactions potentielles pour les deux partenaires.
- Les zones 159-195 de Rtt106p et 139-158 de Bcd1p apparaissent être au centre de l'interaction. Ces dernières présentent un taux d'incorporation en deutérium moins important dans l'état complexé. De plus ces zones sont spatialement proches de par l'observation de peptides pontés dans ces régions.
- Pour la zone 159-195 de Rtt106, le fait qu'elle soit impliquée dans la zone d'interaction est d'autant plus probable que l'hélice  $\alpha$  159-174 et la boucle 175-182 ne sont pas présentes chez l'homologue structural Pob3, qui n'est pas en mesure d'interagir avec Bcd1p.

Si l'objectif final était de transposer l'ensemble des résultats de MS structurale en contraintes spatiales afin de proposer une série de modèles structuraux du complexe [17, 19], dans le cadre de cette étude, nous rencontrons plusieurs problèmes. En effet, l'absence de structure haute résolution du partenaire Bcd1p, ou d'homologue structural est un premier frein à la proposition d'un modèle [19]. De plus, les probables nombreux réarrangements conformationnels opérant sur Bcd1p amènent un degré de complexité supplémentaire.

Une stratégie possible pour pallier ce problème, serait de combiner des agents pontants de différentes tailles, et de comparer les peptides pontés –intra entre les formes libres des protéines et l'état complexé, de façon à caractériser des zones protéiques qui deviendraient plus proches dans l'espace.

## 5. Valorisation

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

### **Publication :**

Terral G., Bragantini B., Saliou JM., Van Dorsselaer A., Manival X., Charpentier B., Cianférani S. « Combining Native MS, IM-MS and HDX-MS for Structural Characterization of Bcd1p/Rtt106p complex involved in the box C/D snoRNPs Assembly Machinery ». *Article en cours de rédaction.*

### **Communication orale :**

Terral G., Bragantini B., Saliou JM., Van Dorsselaer A., Manival X., Charpentier B., Cianférani S. « Combining Native MS, IM-MS and HDX-MS for Structural Characterization of Bcd1p/Rtt106p complex involved in the box C/D snoRNPs Assembly Machinery ». Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, Septembre 2015, Ajaccio, France.

### **Communication par affiche :**

Terral G., Bragantini B., Saliou JM., Van Dorsselaer A., Manival X., Charpentier B., Cianférani S. « Combining Native MS, IM-MS and HDX-MS for Structural Characterization of Bcd1p/Rtt106p complex involved in the box C/D snoRNPs Assembly Machinery ». 63<sup>rd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, Juin 2015, Saint Louis (MO), Etats-Unis.

## *Conclusion de cette partie*

Les travaux réalisés dans cette partie se sont focalisés sur le développement de méthodes de MS structurale, pour la caractérisation de sous-complexes impliqués dans la maturation des snoRNPs à boîte C/D. La machinerie d'assemblage de ces particules repose sur un réseau d'interactions complexes entre différents partenaires (protéines, ARN), qu'il est important de caractériser afin de comprendre les mécanismes cellulaires qui y sont associés.

Dans ce contexte, une étude structurale à large échelle a été entreprise, et deux objectifs généraux ont été établis :

- Caractériser les sous-complexes formés entre le co-chaperon RPAP3 et les protéines chaperonnes Hsp70 ou Hsp90.
  - Caractériser le sous-complexe Bcd1p/Rtt106p.
- Concernant le premier objectif, la régulation de l'activité ATPase des Hsp par RPAP3 était démontré, toutefois le processus d'assemblage n'était pas caractérisé.
- Dans un premier temps, le développement de méthodes de MS native a permis de conforter les tendances des constantes de dissociation observées en RMN. Des expériences de titrations entre les domaines individuels de la protéine RPAP3 (TPR) et les peptides Hsp ont permis de mettre en évidence l'affinité préférentielle du premier TPR pour le peptide Hsp70, et du deuxième TPR pour les peptides Hsp90s. Ces observations ont ensuite été confirmées sur le tandem-TPR, par des expériences de compétitions directes et indirectes.
  - Finalement, la mise au point de méthodes de MS native pour des plus hauts poids moléculaires, a permis de mettre en évidence une stœchiométrie d'interaction de 2 pour 2 entre le chaperon Hsp90 $\beta$  et le co-chaperon RPAP3. Des modèles d'assemblages ont alors pu être élaborés, et sont en cours de validation.

Cette première partie a donc permis de montrer la complémentarité de la MS native pour la détermination de  $K_d$ , mais aussi pour la détermination de la stœchiométrie d'interaction entre les partenaires RPAP3 et Hsp90 sous sa forme entière. En effet, la masse de ce complexe avoisine les 230 kDa, et de ce fait, est non-compatible pour une analyse RMN.

➤ Concernant le sous-complexe Bcd1p/Rtt106p, peu d'informations étaient disponibles au début de ces travaux, sur sa fonction et sa structure. D'un point de vue fonctionnel la protéine Rtt106p était connue pour être un facteur de remodelage de la chromatine, alors que l'absence de Bcd1p conduisait à une chute du taux des snoRNPs à boîte C/D. Concernant les données structurales, seul le fragment 65-320 de Rtt106p était cristallisé et l'interaction directe entre ces deux partenaires restait à prouver. Les essais de cristallisation du complexe, ou résolution de la structure par RMN se sont révélés infructueux. Dans ce contexte, nous avons mis en place une stratégie analytique visant à utiliser des approches de MS structurale :

- La MS native a permis de valider l'association de ces deux partenaires, et d'élucider la stœchiométrie d'interaction de 1 pour 1.
- L'IM-MS native a permis de déterminer les CCS des partenaires individuels et du complexe, et a ainsi permis de mettre en avant des réarrangements conformationnels suite à l'assemblage de ces deux partenaires.
- Des zones potentielles de changement conformationnel, ainsi que des zones d'interaction ont pu être déterminées par HDX-MS ; ces dernières ayant été validées par la combinaison de l'approche XL-MS.

La caractérisation du sous-complexe Bcd1p/Rtt106p a permis d'illustrer la complémentarité de la MS structurale, alors que les techniques biophysiques les plus résolutes n'ont pas permis d'accéder à la structure de ce dernier. Si l'étape de modélisation structurale s'est révélée complexe dans ce cas, l'apport de la combinaison de techniques de MS structurale a ici été démontré, en accédant à un niveau de caractérisation particulièrement informatif.

Ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes pour la caractérisation d'autres sous-complexes impliqués dans la biogénèse des snoRNPs à boîte C/D. En effet, l'application de cette approche multi-technique permettrait d'élargir la caractérisation structurale de ce réseau d'assemblage, impliquant notamment des protéines en interaction avec des ARNs.

## Références bibliographiques

1. <https://sites.google.com/a/lycee-smdn.org/toutous/home/premiere-s/theme-1a>.
2. Kressler, D., E. Hurt, and J. Baßler, *Driving ribosome assembly*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2010. **1803**(6): p. 673-683.
3. Narla, A. and B.L. Ebert, *Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3196-3205.
4. Dupuis-Sandoval, F., M. Poirier, and M.S. Scott, *The emerging landscape of small nucleolar RNAs in cell biology*. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2015. **6**(4): p. 381-397.
5. Aittaleb, M., et al., *Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins*. Nature Structural & Molecular Biology, 2003. **10**(4): p. 256-263.
6. Boulon, S., et al., *The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery*. The Journal of cell biology, 2008. **180**(3): p. 579-595.
7. Pal, M., et al., *Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1*. Structure, 2014. **22**(6): p. 805-818.
8. Kakihara, Y. and W.A. Houry, *The R2TP complex: discovery and functions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2012. **1823**(1): p. 101-107.
9. Kressler, D., et al., *Synthetic lethality with conditional dbp6 alleles identifies rsa1p, a nucleoplasmic protein involved in the assembly of 60S ribosomal subunits*. Molecular and cellular biology, 1999. **19**(12): p. 8633-8645.
10. Peng, W.-T., et al., *A panoramic view of yeast noncoding RNA processing*. Cell, 2003. **113**(7): p. 919-933.
11. Hiley, S.L., T. Babak, and T.R. Hughes, *Global analysis of yeast RNA processing identifies new targets of RNase III and uncovers a link between tRNA 5' end processing and tRNA splicing*. Nucleic acids research, 2005. **33**(9): p. 3048-3056.
12. Dobbyn, H.C., et al., *Analysis of pre-mRNA and pre-rRNA processing factor Snu13p structure and mutants*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **360**(4): p. 857-862.
13. Matias, P.M., et al., *Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(50): p. 38918-38929.
14. Quinternet, M., et al., *Structure/Function Analysis of Protein-Protein Interactions Developed by the Yeast Pih1 Platform Protein and Its Partners in Box C/D snoRNP Assembly*. Journal of molecular biology, 2015. **427**(17): p. 2816-2839.
15. Morgan, R.M., et al., *Tah1 helix-swap dimerization prevents mixed Hsp90 co-chaperone complexes*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2015. **71**(5): p. 1197-1206.
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. Benesch, J.L. and B.T. Ruotolo, *Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology*. Current opinion in structural biology, 2011. **21**(5): p. 641-649.
19. Politis, A., et al., *A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes*. Nature methods, 2014. **11**(4): p. 403-406.
20. 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.

21. Rey, M., et al., *Mass spec studio for integrative structural biology*. Structure, 2014. **22**(10): p. 1538-1548.
22. Russel, D., et al., *Putting the pieces together: integrative modeling platform software for structure determination of macromolecular assemblies*. PLoS Biol, 2012. **10**(1): p. e1001244.
23. Politis, A., et al., *Integrating ion mobility mass spectrometry with molecular modelling to determine the architecture of multiprotein complexes*. PloS one, 2010. **5**(8): p. e12080.
24. Baldwin, A.J., et al., *The polydispersity of  $\alpha$ B-crystallin is rationalized by an interconverting polyhedral architecture*. Structure, 2011. **19**(12): p. 1855-1863.
25. 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.
26. Politis, A. and A.J. Borysik, *Assembling the pieces of macromolecular complexes: Hybrid structural biology approaches*. Proteomics, 2015. **15**(16): p. 2792-2803.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Boulon, S., et al., *HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II*. Molecular cell, 2010. **39**(6): p. 912-924.
31. Jørgensen, T.J., P. Roepstorff, and A.J. Heck, *Direct determination of solution binding constants for noncovalent complexes between bacterial cell wall peptide analogues and vancomycin group antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, 1998. **70**(20): p. 4427-4432.
32. Tjernberg, A., et al., *Determination of dissociation constants for protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2004. **76**(15): p. 4325-4331.
33. 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.
34. McCombie, G., S. Wendt, and R. Zenobi, *Mass spectrometric determination of association constants of adenylate kinase with two noncovalent inhibitors*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 442-448.
35. Jecklin, M.C., et al., *Which electrospray-based ionization method best reflects protein-ligand interactions found in solution? a comparison of ESI, nanoESI, and ESSI for the determination of dissociation constants with mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(3): p. 332-343.
36. Gabelica, V., et al., *Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry, 2003. **38**(5): p. 491-501.
37. Marcoux, J. and S. Cianfèrani, *Towards integrative structural mass spectrometry: Benefits from hybrid approaches*. Methods, 2015. **89**: p. 4-12.
38. Huh, W.-K., et al., *Global analysis of protein localization in budding yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 686-691.



39. Huang, S., et al., *Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(38): p. 13410-13415.
40. Huang, S., et al., *A novel role for histone chaperones CAF-1 and Rtt106p in heterochromatin silencing*. The EMBO journal, 2007. **26**(9): p. 2274-2283.
41. Imbeault, D., et al., *The Rtt106 histone chaperone is functionally linked to transcription elongation and is involved in the regulation of spurious transcription from cryptic promoters in yeast*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(41): p. 27350-27354.
42. Rothé, B., *Etude des processus de biogénèse des petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires à boîtes C/D (snoRNP C/D) chez la levure Saccharomyces cerevisiae. Caractérisation fonctionnelle et structurale d'une machinerie dédiée à l'assemblage de ces RNP*. 2012.
43. Liu, Y., et al., *Structural analysis of Rtt106p reveals a DNA binding role required for heterochromatin silencing*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(6): p. 4251-4262.
44. 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. 2851-2861.
45. Uetrecht, C., et al., *Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(5): p. 1633-1655.
46. van Duijn, E., et al., *Native tandem and ion mobility mass spectrometry highlight structural and modular similarities in clustered-regularly-interspaced short-palindromic-repeats (CRISPR)-associated protein complexes from Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(11): p. 1430-1441.
47. 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.
48. 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.
49. Jarrold, M.F., *Peptides and proteins in the vapor phase*. Annual review of physical chemistry, 2000. **51**(1): p. 179-207.
50. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility–mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nature protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.
51. Jarrold, M.F., *Unfolding, refolding, and hydration of proteins in the gas phase*. Accounts of chemical research, 1999. **32**(4): p. 360-367.
52. Hao, G., et al., *Epitope characterization of an anti-PD-L1 antibody using orthogonal approaches*. Journal of Molecular Recognition, 2015. **28**(4): p. 269-276.
53. Diestel, U., et al., *Identification of a Novel TGF- $\beta$ -Binding Site in the Zona Pellucida C-terminal (ZP-C) Domain of TGF- $\beta$ -Receptor-3 (TGFR-3)*. PloS one, 2013. **8**(6): p. e67214.
54. Wei, H., et al., *Isomerization and Oxidation in the Complementarity-Determining Regions of A Monoclonal Antibody: A Study of the Modification-Structure-Function Correlations by Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2016.
55. Wei, H., et al., *Using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry to study conformational changes in granulocyte colony stimulating factor upon PEGylation*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(3): p. 498-504.



56. VanDemark, A.P., et al., *The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition*. Molecular cell, 2006. **22**(3): p. 363-374.
57. Schmidt, C. and C.V. Robinson, *A comparative cross-linking strategy to probe conformational changes in protein complexes*. Nature protocols, 2014. **9**(9): p. 2224-2236.
58. Yang, B., et al., *Identification of cross-linked peptides from complex samples*. Nature methods, 2012. **9**(9): p. 904-906.
59. <http://structurems.ucalgary.ca/software/>.

## *Conclusion générale*



## *Conclusion générale*

Ce travail de thèse s'est articulé autour de développements méthodologiques en spectrométrie de masse structurale pour la caractérisation d'édifices multi-protéiques non-covalents. L'implication de ces derniers dans de nombreux processus de régulation cellulaire, nécessite de caractériser leurs réseaux d'interactions de manière à expliquer les mécanismes biologiques associés. L'introduction bibliographique de ce travail de thèse a permis de rappeler la diversité des interactions mises en jeu dans l'assemblage de ces complexes supramoléculaires. Si à l'heure actuelle de nombreux outils biophysiques permettent d'analyser ces systèmes à différents niveaux, les techniques à résolution atomique comme la RMN et la cristallographie ne permettent pas toujours de les caractériser. Dans la perspective d'analyser des édifices de complexité croissante, et de pallier aux limitations des techniques haute résolution, le concept de MS structurale a émergé. En effet, la combinaison des outils de protéomique et de MS native génère des informations complémentaires, et permet de caractériser des complexes non-covalents avec une résolution remarquable.

Au niveau de l'approche protéomique structurale, nous retrouvons notamment la méthode d'échange hydrogène/deutérium couplé à la MS (HDX-MS). Cette technique différentielle permet de déterminer des zones d'interaction, localiser des changements conformationnels, et accède à une certaine dynamique protéique. Si le principe de cette technique a été décrit au début des années 1950, son couplage à la MS, ainsi que les développements méthodologiques et bio-informatiques dont elle a fait l'objet, ont fortement contribué à son essor depuis une dizaine d'années.

Dans ce contexte, plusieurs objectifs ont été atteints au cours de ces travaux de thèse :

- Implanter la technologie HDX-MS au laboratoire.
- Evaluer l'apport de l'HDX-MS en protéomique structurale.
- Evaluer l'apport de la MS structurale dans son ensemble pour caractériser des complexes non-covalents réfractaires à une analyse structurale haute résolution par DRX ou RMN.
- Développer en parallèle l'approche MS native haute résolution pour la caractérisation d'anticorps thérapeutiques.

Un premier objectif de ce travail de thèse a été d'implanter au laboratoire l'approche HDX-MS. A travers l'évaluation et la mise en place d'un test de performance pour ce système, nous avons pu mettre en avant l'importance des optimisations expérimentales et instrumentales pour générer des sets de données les plus complets et fiables qui soient. Si les développements de logiciels adaptés ont facilité le retraitement des données, il semblerait désormais que, face à la complexification croissante des systèmes étudiés, l'intégration d'outils statistiques permettraient d'augmenter l'indice de confiance quant aux résultats proposés.

Un autre enjeu de mon travail de thèse a consisté à développer des méthodologies de MS structurale pour la caractérisation d'anticorps thérapeutiques, et de leurs complexes associés.

- Un premier axe de travail a consisté, à évaluer l'apport de la spectrométrie de masse à haute résolution pour la caractérisation « d'Antibody Drug Conjugate ». Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'intérêt de cette approche pour la caractérisation d'ADCs non-covalents (brentuximab vedotin), mais aussi pour les ADCs covalents (trastuzumab emtansine). En effet, la capacité de l'Orbitrap Exactive plus EMR à discriminer des espèces, de masses très proches, permet de caractériser les profils de distribution Dn et DAR moyen avec une meilleure précision que les instruments jusqu'alors disponibles. De plus, la résolution effective accrue de cet instrument permet d'accéder à des précisions de mesures de masses remarquables ( $< 10$  ppm pour le trastuzumab emtansine, et  $< 40$  ppm pour le brentuximab vedotin).
- Le deuxième axe de cette partie, s'est porté sur la caractérisation d'épitopes par HDX-MS. La détermination de la zone d'interaction d'un anticorps au niveau de l'antigène est primordiale pour expliquer les mécanismes immunitaires engendrés, mais aussi d'un point de vue de la propriété intellectuelle. Les techniques généralement utilisées sont chronophages et/ou nécessitent des manipulations génétiques. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en avant la complémentarité de la MS native et de l'HDX-MS. En effet, la première technique nous a permis de déterminer des stœchiométries d'interaction différentielles entre un même antigène et trois anticorps différents ; alors que l'HDX-MS a permis de caractériser les épitopes de chacun d'eux, et expliquer ces stœchiométries particulières. Un avantage particulier de la technique HDX-MS a ici été souligné, avec notamment sa capacité à déterminer des épitopes conformationnels.

Le travail décrit dans cette partie ouvre des perspectives avantageuses pour la MS structurale dans l'industrie pharmaceutique. En effet, la combinaison de la MS native et de l'HDX-MS

est particulièrement performante pour la caractérisation d'épitopes, et se présente désormais comme un outil de choix pour l'étude des structures quaternaires (« Higher Order structure » - HOS) de complexes immuns. De plus, les développements méthodologiques réalisés en MS native à haute résolution, montrent tout l'intérêt de cette approche pour la détermination, en une analyse, des profils de distribution, DARs moyens, et masses des composés avec grande précision. Si la force de cette technique est ici démontrée, des améliorations doivent être apportées au niveau des logiciels de retraitement, de manière à ne pas discriminer les espèces de bas rapports  $m/z$  et automatiser le retraitement (calcul DAR, Dn).

Enfin, la force de la combinaison d'approches de MS structurale a été illustrée pour la caractérisation de sous-complexes impliqués dans la biogénèse des snoRNPs à boîte C/D.

- Si la régulation de l'activité ATPase des protéines Hsp70 et Hsp90s par le co-chaperon RPAP3 était connue, le mode d'assemblage de ces partenaires demeurait hypothétique. Le développement de méthodes de MS natives spécifiques, a permis de caractériser les affinités différentielles entre, les deux domaines TPRs de la protéine RPAP3 et les peptides représentant les domaines de liaisons de Hsp70 et Hsp90s. De plus l'analyse des protéines entières a permis de déterminer la stœchiométrie d'interaction du complexe, et de proposer des modèles d'assemblages.
- Le dernier axe d'étude s'est porté sur la caractérisation structurale détaillée du complexe Bcd1p/Rtt106p. Ce dernier, pouvant faire un lien entre biogénèse des snoRNPs et régulation de la transcription, était totalement réfractaire à une analyse par les techniques biophysiques haute résolution. La combinaison d'approches de MS structurale (MS native, IM-MS, HDX-MS et XL-MS) a permis d'atteindre un niveau de caractérisation structurale notable grâce à l'obtention d'informations complémentaires, comme : la stœchiométrie d'interaction du complexe, son évolution conformationnelle, ainsi que les zones potentielles d'interaction.

Le travail présenté dans cette partie a donc permis de développer des stratégies analytiques complémentaires à la RMN pour la détermination de constantes de dissociation, voire orthogonales aux techniques de biologie structurale haute résolution pour la caractérisation structurale détaillée de complexes protéiques non-covalents.

En conclusion, ce travail de thèse s'est porté sur l'apport de la MS structurale, et plus particulièrement de l'HDX-MS pour la caractérisation de complexes non-covalents

réfractaires à une analyse par les techniques biophysiques à haute résolution. L'évaluation du système implanté au laboratoire, associé à des optimisations expérimentales et instrumentales ont constitué le cœur de ce travail de thèse. Les développements méthodologiques spécifiques réalisés au cours de ces travaux, ont montré de nombreuses perspectives pour la caractérisation de HOS, en répondant notamment à des problématiques biologiques particulières.

D'un point de vue plus général, les systèmes HDX-MS aujourd'hui commercialisés sont fonctionnels et relativement robustes. Toutefois nous avons pu constater, comme il est décrit dans ce manuscrit, qu'il est nécessaire d'y apporter un entretien régulier. La nature diverse des échantillons analysables, l'automatisation de leur préparation, la mise sous contrôle précis de la température du système et le développement d'outils de retraitement semi-automatisés ont constitué des points cruciaux dans l'essor de cette technique. Si ces développements ont considérablement réduit les temps d'expériences (analyse + retraitement), il n'en demeure pas moins que chaque complexe protéique nécessite une optimisation expérimentale particulière. Cette technique s'inscrit donc dans une approche à moyen débit. Dans un but d'augmenter la vitesse de retraitement mais aussi le degré de confiance quant aux résultats générés, l'utilisation de traitements statistiques devraient y contribuer. En effet, avec un nombre très important de données (plusieurs conditions, temps d'incubations, états de charge), l'application de tests statistiques permettrait de valider une différence d'incorporation significative avec plus de sûreté.

Si l'HDX-MS ne peut prétendre atteindre des résolutions atomiques, plusieurs approches peuvent être envisagées pour augmenter la résolution des résultats, ces derniers se situant généralement à une échelle peptidique. Dans cette quête de résolution améliorée, la combinaison de plusieurs protéases acides permettrait d'affiner cette résolution. Cette approche nécessitera cependant, une diversification de l'offre commerciale de ce type d'enzymes immobilisées. Les méthodes de fragmentation ETD constituent un autre moyen d'améliorer la précision des zones impactées, avec une résolution située au niveau de l'acide aminé, et devraient désormais être envisagées de façon plus systématique.

La MS structurale constitue désormais une solution alternative pour contourner les problèmes rencontrés en RMN ou DRX, toutefois il serait bénéfique d'introduire ce type d'approche dès le début d'un projet et de la caractérisation structurale d'un complexe. En effet, la combinaison de techniques de MS structurale se révèle particulièrement informative et permet de caractériser des systèmes de natures très diverses. Ceci est notamment illustré dans ce travail de thèse, avec le succès de la caractérisation de complexes immuns, ou du complexe



Bcd1p/Rtt106p. Désormais avec le développement d'outils bio-informatiques dédiés, il devient possible de transposer l'ensemble des données de MS structurale en contraintes spatiales pour la proposition de modèles structuraux. Néanmoins, cette approche est encore limitée à certains laboratoires spécialisés ; et sa démocratisation passera par le développement de plateformes bio-informatiques plus intuitives.

Toutefois, les efforts qui y sont actuellement apportés, couplés aux développements méthodologiques et instrumentaux continus, font que l'approche MS structurale prend, et prendra une place de plus en plus importante en biologie structurale.



## Partie expérimentale

Cette partie décrit les conditions de préparation et d'analyses des différents échantillons utilisés au cours de ces travaux de thèse.

Les concentrations des protéines ont été mesurées par lecture d'absorbance à 280 nm sur un spectrophotomètre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Les coefficients d'extinction molaires ont été déterminés à partir des séquences théoriques et du logiciel Protparam (Expasy). Enfin la concentration est déterminée par application de la loi de Beer-Lambert [1].

### 1) Caractérisation des « Antibody Drug Conjugates » (partie 3 chapitre 1)

Protéine	Masse moléculaire théorique (Da)	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
trastuzumab emtansine	148056.2 (DAR0, G0F/G0F)	AcONH <sub>4</sub> 150mM pH7.5	5 cycles de dessalage par ultrafiltration (Vivaspin, MWCO = 30kDa)	Chaîne légère : DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
				Chaîne lourde : EVQLVESGGGLVQP GGS LRLS CAAS GFNPKDTHHWVRQAPGKGLLEWVARNP TNGYTRYADS VKGRFTIS ADTS KNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSNWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSNHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVS VLVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
brentuximab vedotin	148079.7 (DAR0, G0F/G0F)	AcONH <sub>4</sub> 150mM pH7.5	5 cycles de dessalage par ultrafiltration (Vivaspin, MWCO = 30kDa)	Chaîne légère : DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSYMNWYQQKPGQPPKVLIAASNLESGIPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQS NEDP WTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
				Chaîne lourde : QQQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFDYYIHWVQKPGQGLEWIGWYFGSNTKYNEKFKGKATLVDTSSSTAFMQLSLSTSEDYAVYFCANYGNWFAYWGQGTQVTVS AASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSNWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSNHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVS VLVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

Les échantillons sont infusés sur le :

- Synapt G2 HDMS (Waters) :
  - o brentuximab vedotin → V<sub>c</sub> : 80 V, Trap et Transfer CE : 20 et 10 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar.

- trastuzumab emtansine ( $\pm 10$  mM imidazole)  $\rightarrow$  V<sub>c</sub> : 180 V, Trap et Transfer CE : 20 et 10 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar
- Exactive Plus EMR (ThermoScientific) :
  - brentuximab vedotin  $\rightarrow$  CID : 75 eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V, P<sub>UHV</sub> : 7, R<sub>nom</sub> : 35000.
  - trastuzumab emtansine  $\rightarrow$  CID : 75 eV, CE : 0 eV, injection-inter-bent flatapôles : 8-7-6 V, P<sub>UHV</sub> : 7, R<sub>nom</sub> : 35000

## 2) Caractérisation complexe antigène/anticorps (partie 3 chapitre 2)

Les séquences des mAbs et antigène sont confidentielles.

$\Rightarrow$  MS native

Les fragments Fabs ont été générés selon la procédure décrite dans Beck *et al.*, [2]. L'antigène-A (Ag-A) a été dessalé par 2 cycles de filtration sur gel par gravitation (NAP-5), et les fragments Fabs par 2 cycles filtration sur gel par centrifugation (Zeba). Les stœchiométries d'interactions sont déterminées en incubant 5  $\mu$ M d'antigène-A avec 1, 2, 4 et 6 équivalents en Fabs. Les échantillons ont ensuite été analysés sur le Synapt G2 HDMS (Waters) (V<sub>c</sub> : 120 V, Trap et Transfer CE : 10 et 30 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar).

$\Rightarrow$  Expériences HDX-MS

L'Ag-A et les complexes Ag-A/mAb1, Ag-A/mAb2 (ratio molaire 2 : 1) et Ag-A/mAb3 (ratio 1 : 1.5), sont dilués 20 fois avec un tampon d'équilibration (phosphate de potassium 10 mM, pH 7.0), ou deutéré (phosphate de potassium 10 mM, pD 7.0). Après dilution, les échantillons ont été incubés à 20 ° C pour plusieurs temps d'incubation (0 s pour les expériences non deutérées et 30 s, 2, 10, 30 et 60 minutes pour les expériences deutérées), puis « quenchés » en ajoutant un volume égal de tampon de « quench » (100 mM phosphate de potassium, 100 mM TCEP, 2M GndHCl, pH 2.4) à 1°C pendant 30 s. Les échantillons (100 pmol) ont été digérés à 20°C, sur cartouche de pepsine immobilisée pendant 3 min dans une solution aqueuse acide (H<sub>2</sub>O, HCOOH 0,1%) à un débit de 200  $\mu$ L/min.

Les peptides digérés ont été piégés et dessalés sur pré-colonne UPLC (ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard pré-colonne, 2.1 mm de diamètre x 5 mm, diamètre de particule 1.7 $\mu$ M,

Waters) et séparés sur une colonne UPLC (ACQUITY UPLC BEH C18 1.0 mm ID x 100 mm, diamètre de particule 1.7 $\mu$ M, Waters) à 0°C. L'élution est réalisée en appliquant un gradient de solvant A (H<sub>2</sub>O, HCOOH 0,1%) et de solvant B (ACN, HCOOH 0,1%) [2% à 40% de B (7 min), 40% -85% de B (0,5 min) et 85% de B (1 min)] à un débit de 40  $\mu$ L/min. Les analyses ont été effectuées sur un Synapt G2 HDMS (Waters) en utilisant la GFP comme étalon interne. Le séquençage des peptides a été réalisé par acquisition MS<sup>E</sup> en alternant des scans (0.3 s) basse (Trap CE : 4 eV) et haute énergie (Trap CE : 15→40 eV). L'identification des ions fragments a été réalisée avec ProteinLynxGlobalServer 2.5.2 (Waters) avec une tolérance automatique sur le précurseur et les fragments. Le logiciel Dynamx 3.0 (Waters) permet ensuite de valider les peptides identifiés et de calculer le taux d'incorporation en deutérium. La validation est réalisée en retenant uniquement les peptides identifiés dans les 3 réplicats, avec un nombre minimum de fragment par acide aminé de 0.3.

### 3) Caractérisation des complexes RPAP3/Hsp70, Hsp90 (partie 4 chapitre 1)

Protéine	Masse moléculaire théorique (Da)	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés	
RPAP3 (133-255) TPR1	14467,4	AcONH <sub>4</sub> 150mM pH7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0.5 mL)	GP HMALVLKEKGKGYFKQGKYDEAIDCYTKGMDADP YNP VLP TNR AS AYFRLKKFAVAES DCNLAVALNRS YTKAYS RRGAAARFALQKLEE AKKDYERVLELEP NNFEATNELRKIS QALAS KENS Y	
RPAP3 (133-255) TPR1	13346,2			GP HMQAIS EKDRGNGFFKEGKYERAIECYTRGIAADGANALLP ANRAMAYLKIQKYEEAEKDC TQAILLDGS YS KAFARRGTARTFLGKLNKAEK QDFETVLLLEP G NKQAVTELS KIKKK	
RPAP3 (133-396)	30223,3			GP HMALVLKEKGKGYFKQGKYDEAIDCYTKGMDADP YNP VLP TNR AS AYFRLKKFAVAES DCNLAVALNRS YTKAYS RRGAAARFALQKLEE AKKDYERVLELEP NNFEATNELRKIS QALAS KENS YP KEADIVKS TEG ERKQIEAQNKQQAIS EKDRGNGFFKEGKYERAIECYTRGIAADGAN ALLP ANRAMAYLKIQKYEEAEKDC TQAILLDGS YS KAFARRGTARTFLGKLNKAEKQDFETVLLLEP G NKQAVTELS KIKKK	
Peptide Hsp70	945,9			-	SGPTIEEVD
Peptide Hsp90 $\alpha$	1081,1			-	DTSRMEEVD
Peptide Hsp90 $\beta$	1051			-	DASRMEEVD
Hsp70	70052,2				

Hsp90 $\alpha$	88238,6	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0.5 mL)	MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMASLEVLFGGPMPEETQTQDQPM EEEEVETFAFQAEIAQLMSLINTFYSNKEIFLRELISNSDALDKIRYES LTDP SKLDS GKELHNLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKS GTKAFMEALQAGADISMGQFGVGFYSAYLVAEKVTITKHNDDEQY AWESSAGGSFTVRTDTGEPMGRGTKVILHLKEDQTEYLEERRIKEIVK KHSQFIGYPITLVEKERDKEVSDDEAEKEKDEKEEKEEKEESDKP IEDVGSDEEEKKDGDKKKKKKIKEKYIDQEELNKTIPWTRNPDDITN EYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVRRAPFDLFE NRKKNNIKLYVRRVFMNDCEELIPEYLNFRIGVVDS EDLP LNISREML QQSKILKVRKNLVKCLLELFTLAEDKENYKFFYEQFSKNKLG IHED SQNRKLS ELLRYYSASGDEMVS LKDYCTRMKENQKHYYITGETK DQVANS AFVERLRKHGLEVIYMIPEIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKE GLELP EDEEEKKQEEKTKFENLCKMKDILEKKVEKVVVS NRLVTS PCCIVTS TYGWANMERIMKAQALRDNS TMGYMAAKKHLEINP DHS II ETLRQKAEADKNDKS VKDLVILLYETALLS S GFS LEDP QTHANRIR IKLGLGIDEDDP TADDTSAAVTEEMPPLEGDDDSRMEEVD
Hsp90 $\beta$	84864,9		MRGSHHHHHHGMASMP EEVHHGEEVETFAFQAEIAQLMSLINTFY SNKEIFLRELISNASDALDKIRYESLTDP SKLDS GKELKIDIPNPQERTL TLVDTGIGMTKADLNNLGTIAKS GTKAFMEALQAGADISMGQFGVGF FYSAYLVAEKVVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRADHGEP IGRG TKVILHLKEDQTEYLEERRVKEVVKHSQFIGYPITLVEKEREKESDD EAEKEKGEKEEEDKDDEEKPKIEDVGSDEEDDS GKDKKKKTKKIKEKY IDQEELNKTIPWTRNPDDITQEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVE GQLEFRALLFVRRAPFDL FENKKNKNIKLYVRRVFMDSCEDELPEY LNFIRIGVVDS EDLP LNISREMLQQSKILKVRKNLVKCLLELFS ELAEDK ENYKFFYEAFS KNLKLG IHEDS TNRRRLS ELLRYHYSQS GDEMVSLS EYVSRMKETQKS IYITGES KEQVANS AFVERVRKRGFEVVMTEPID EYCVQQLKEFDGKSLVSVTKEGLELP EDEEEKKMEESKAKFENLCK LMKEILDKKEKVTIS NRLVSPCCIVTS TYGWANMERIMKAQALRD NS TMGYMAAKKHLEINP DHP IVETLRQKAEADKNDKAVKDLVLLFE TALLS S GFS LEDP QTHS NRIYRMKLGIDEEVAEEPPNAAVPDEIP PLEGDEASRMEEVD

La concentration des peptides est déterminée par une mesure de l'absorbance à 205 nm [3].

⇒ Expériences d'affinité

Les expériences de détermination de  $K_d$ , de compétitions directes et indirectes ont été réalisées sur un LCT (Waters) ( $V_c$  : 90 V,  $P_i$  : 6 mbar).

⇒ Stœchiométrie d'interaction avec les protéines entières

Les déterminations de stœchiométries d'interaction entre le tandem RPAP3 et les formes entières des protéines Hsp ont été réalisées en infusant les échantillons sur le Synapt G2 HDMS (Waters) ( $V_c$  : 180 V,  $P_i$  : 6 mbar)

#### 4) Caractérisation du complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) (partie 4 chapitre 2)

Protéine	Masse moléculaire théorique (Da)	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
Bcd1pFL	42625,0	AcONH <sub>4</sub> 150mM pH7.5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0.5 mL)	GP HMAVLCG VCG I KEFKYKCP RCLVQ TCS LECS KKHKTRDNC S GQT HDP KEYS S EAL KQ ADDDKHERNA YVQRDYN YLTQLKRMVHVQKM DARMKNKRVLGP VGGHNS NFKKRRYDIEDDRDS TECQRIRRGVNC LM L P K G M Q R S S Q N R S K W D K T M D L F V V S V E W I L C P M Q E K G E K K E L F KHVS HRIKETDFLVQGMGKNVFKCCEFYRLAGTSS CIEGEDGS ETK EERTQLQKS GLKFYTKTFP YNTTHMDS KKLVELAIHEKCGELLKNTT VIEFP TIFVAMTEADLP EGYEVLHQEP RP LEHTS TLNKFIDNAREEEDA EEDS QP TEEP VQKETQDAS DS DS DS DDDYNP GLS MDFLTA
Rtt106(65-320)	29694,1			GP HMDEIS ETNTFKLEGVS VLS PLRKKLDLVFYLS NVDGSP VITLLK GNDRELS IYQLNKNKMAS FLP VP EKP NLILYLFMTYTS CEDNKFSEPV VMTLNKENTLNQFKNLGLLDS NVTDPEKCV EYRQKQAILTGFKS NPF VNS TLVDTDAEKINS FHLQCHRG TKEG TLYFLP DHIFGFKKP ILLFDA S DIES ITYS S ITRLTFNAS LVTKDGEKYEFS MIDQTEYAKIDDYVKKRQ MKDKS MS EELKAKS KSKG

L'ensemble des expériences de MS native, IM-MS native et HDX-MS ont été réalisées sur le Synapt G2 HDMS (Waters).

⇒ MS native → V<sub>c</sub> : 120 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar.

⇒ IM-MS native → V<sub>c</sub> : 100 V, P<sub>i</sub> : 6 mbar, Trap et Transfer CE : 4 et 2 V, Trap Bias : 44.5 V, Q<sub>He</sub>/Q<sub>N<sub>2</sub></sub> : 105/25 mL/min, WH : 40 V, WV : 1053 m/s.

⇒ HDX-MS :

Les espèces individuelles et le complexe Bcd1pFL/Rtt106p(65-320) ont été analysés dans les mêmes conditions expérimentales, instrumentales et bio-informatiques que dans la partie expérimentale 2 – détermination d'épitopes.

⇒ XL-MS :

L'agent de pontage chimique utilisé, était un mélange équimolaire de BS3 léger (d0) et lourd (d4). Pour les réactions de pontage, 3 ratios « complexe : BS3 d0/d4 » ont été testés : 1 : 0 (contrôle), 1 : 10, 1 : 50 et 1 : 100, pour une concentration finale en complexe de 40 μM. La réaction a lieu pendant 1 h à température ambiante, puis est stoppée par addition de 1.05 μL d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 400 mM. Les échantillons ont ensuite été déposés et séparés sur un gel SDS-PAGE acrylamide 10%.

Les bandes correspondant au complexe ponté ont été découpées, et soumises à une procédure de digestion *in gel*. Les bandes de gel ont été décolorées trois fois par ajout de 100 μL d'une solution 50/50 de bicarbonate d'ammonium 25 mM/acétonitrile. Ensuite, les bandes ont été déshydratées par ajout de 50 μL d'acétonitrile. Les protéines sont ensuite réduites par l'addition de 50 μL de DTT à 10 mM pendant 30 min à 60 ° C, puis alkylées par l'ajout de 50 μL d'iodoacétamide à 55 mM pendant 20 min à température ambiante dans le noir. Les bandes ont ensuite été lavées 3 fois avec un mélange 50/50 de bicarbonate d'ammonium 25



mM/acétonitrile. Elles sont enfin déshydratées 3 fois avec 50  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile, et stockées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les protéines sont ensuite digérées, une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$ , par l'addition de 25  $\mu\text{L}$  de trypsine à 4  $\text{ng}/\mu\text{L}$  dans 25 mM de bicarbonate d'ammonium. Les peptides tryptiques ont été extraits deux fois: i) avec 40  $\mu\text{L}$  d'une solution 40/60/0.1  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH}$  pendant 1 h, puis avec ii) 40  $\mu\text{L}$  d'ACN pendant 1 h. Les extraits recueillis ont été regroupés et l'excès d'ACN a été évaporé sous vide avec un SpeedVac (Thermo Scientific). Tous les peptides extraits ont été rassemblés par condition dans un puits, à nouveau évaporés sous vide, à un volume final de 57  $\mu\text{L}$ .

Le système nanoLC était composé d'une colonne C18 ACQUITY UPLC BEH130 (250 mm x 75  $\mu\text{M}$ , diamètre de particule 1.7  $\mu\text{M}$ , Waters) et d'une pré-colonne Symmetry C18 (20 mm x 180  $\mu\text{m}$ , diamètre de particule 5  $\mu\text{m}$ , Waters). 2  $\mu\text{L}$  (soit environ 750 ng) ont été chargés sur la colonne d'enrichissement pendant 5 minutes à 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  avec 99% de solvant A ( $\text{H}_2\text{O}$ , HCOOH 0.1%) et de 1% de solvant B (ACN, HCOOH 0.1%). L'élution des peptides a été effectuée à un débit de 450  $\mu\text{L}/\text{min}$  avec un gradient linéaire de 1 à 35% de solvant B en 79 min. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur un Orbitrap Q-Exactive Plus (Thermo Scientific), utilisant un mode d'acquisition DDA, avec une alternance de scan MS (50 ms/scan de 300 à 1800 m/z, à une résolution de 70000) et MS/MS (100ms/scan de 200 à 2200 m/z, à une résolution de 17500) top 10. Les identifications des peptides pontés ont été réalisées grâce aux logiciels p-Link et M Studio avec une tolérance de 10 ppm sur les précurseurs et fragments. Les peptides sont validés s'ils sont uniquement observés dans un ratio léger/lourd.

# *Annexes*

## Annexe 1

### Définitions de la résolution en masse et en mobilité ionique

#### 1) Résolution d'un analyseur de masse

La résolution se traduit par la capacité de l'analyseur à séparer des ions ayant une faible différence de masse. Elle peut alors être définie comme le rapport entre la valeur de  $m/z$  et la largeur du pic ( $\delta_{m/z}$ ) mesurée à 50% de sa hauteur (FWHM : « full width half maximum ») (figure 1).

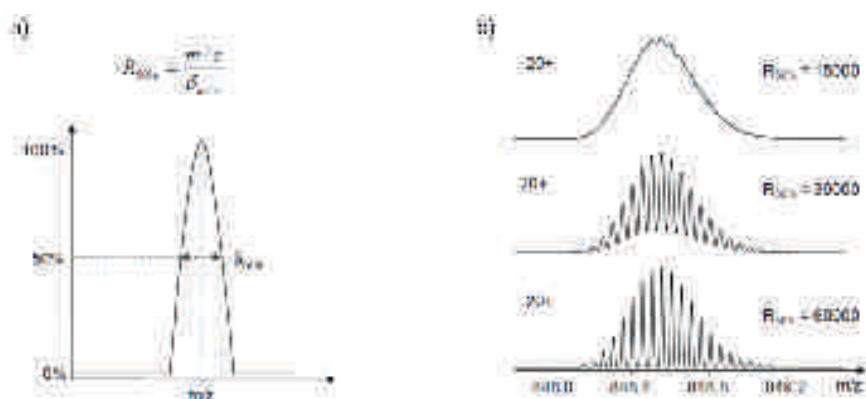


Figure 1. Détermination de la résolution à mi-hauteur d'un analyseur. (a) calcul de la résolution FWHM. (b) Simulation de l'état de charge 20+ de la myoglobine de cœur de cheval à différentes résolutions (adapté de [4]).

#### 2) Résolution d'une cellule IM

La résolution d'une cellule IM peut être assimilée à sa capacité à pouvoir séparer deux analytes de conformations très proches (pouvoir séparateur  $R_S$ ). Le pouvoir séparateur  $R_S$  est établi selon la relation suivante [5] :

$$R_S = 2 \times \frac{t_{d \text{ holo}} - t_{d \text{ apo}}}{\Delta t_{d \text{ holo}} + \Delta t_{d \text{ apo}}}$$

Où :  $t_d$  fait référence au temps de dérive de l'ion, et  $\Delta t_d$  la largeur du mobilogramme à 50% de la hauteur du pic (figure 2).

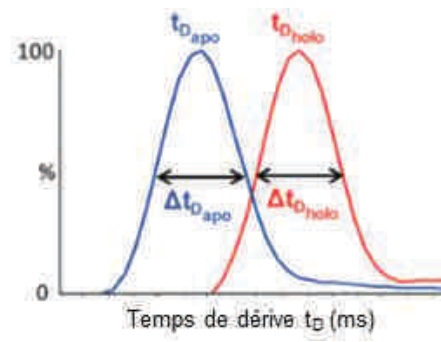


Figure 2. Représentation des grandeurs  $t_d$  et  $\Delta t_d$  utilisées pour le calcul du pouvoir séparateur  $R_s$  en mobilité ionique (adaptée à partir de [5]).

## Annexe 2

### *IM-MS native : explication détaillée de la mesure du temps de dérive et des calculs de CCS.*

#### 1) Correction du temps de dérive

Le couplage entre mobilité ionique et spectrométrie de masse permet de caractériser de façon simultanée le temps de passage des ions dans la cellule IMS, ainsi que les rapports  $m/z$  des ions analysés. Cette synchronisation est possible grâce aux échelles de temps compatibles entre les deux approches. Pour le Synapt G2 HDMS (Waters), un cycle d'analyse de la cellule IMS est compris entre 5 et 40 ms, alors que le temps de cycle de l'analyseur TOF a une durée de 30 à 200  $\mu\text{s}$ . Ainsi pour cet instrument, 200 cycles d'analyse TOF sont réalisés durant un cycle d'analyse IMS (figure 3). Si l'obtention du rapport  $m/z$  est réalisée par simple mesure du temps de vol, la détermination du temps de dérive  $t_d$  est réalisée par multiplication de la durée d'un cycle TOF avec le nombre de cycles TOF réalisés depuis l'injection des ions dans la cellule IMS. Ainsi le temps de dérive  $t_d$  d'un ion détecté dans un spectre de masse associé au  $n^{\text{ième}}$  cycle TOF sera calculé de la manière suivante (équation 1) :

$$t_d = n \times t_{TOF} \quad (1)$$

où  $t_D$  est le temps de dérive,  $n$  le numéro du cycle TOF dans lequel est détecté l'ion, et  $t_{TOF}$  la durée du cycle TOF.

Lorsque le cycle IMS se termine, après le 200<sup>ème</sup> cycle d'analyse TOF, un nouveau paquet d'ion est injecté dans la cellule IMS, et le comptage des cycles TOF est réinitialisé (figure 1).

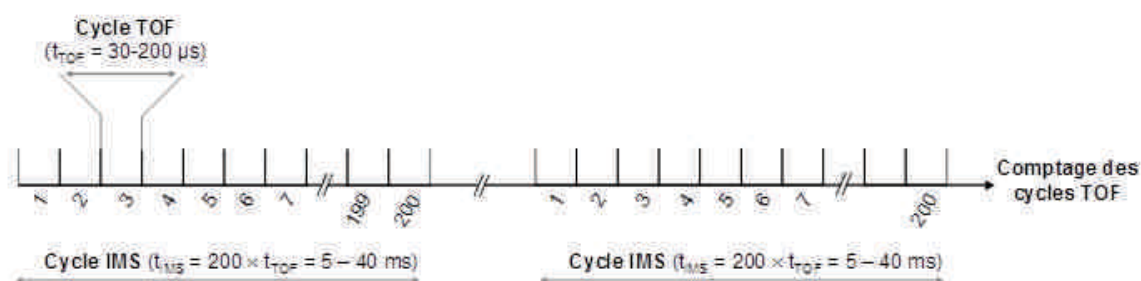


Figure 3. Représentation schématique de la synchronisation entre cycles d'analyses IMS et cycles d'analyse TOF.

Toutefois, la valeur de temps de dérive  $t_d$  mesurée, fait référence au temps mis par les ions pour aller de l'entrée de la cellule IMS jusqu'au détecteur de l'analyseur TOF. Pour remonter aux CCS à partir du temps de passage dans la cellule IMS, il conviendra donc de retirer au  $t_d$  le temps mis par les ions pour traverser la cellule « Transfer », les lentilles de transmission et l'analyseur TOF, de manière à aboutir à un temps corrigé  $t_d'$  reflétant uniquement le temps de passage des ions dans la cellule IMS [6]:

- Le temps de passage des ions dans la cellule « Transfer » ( $t_{transfer}$ ): ce dernier est directement relié à la vitesse de la vague « WV Transfer » (en l'absence de phénomènes de « roll over »), et à la longueur de ce guide d'ions ( $L_{transfer} = 10$  cm), selon l'équation 2 :

$$t_{transfer} = \frac{L_{transfer}}{WV_{transfer}} \quad (2)$$

- Le temps de passage entre la sortie du bloc « Transfer » et le « pusher » ( $t_{transfer-pusher}$ ): ce dernier dépend du rapport  $m/z$  et d'une constante instrumentale  $c$ , variant selon la gamme de masse étudiée. Elle est égale à 1.41 pour une gamme de masse inférieure à 5000 Th, et de 1.57 pour une gamme supérieure [7] ; et permet de définir l'équation 3 suivante :

$$t_{transfer-pusher} = c \times \frac{\sqrt{m/z}}{1000} \quad (3)$$

- Le temps de vol dans l'analyseur ( $t_{TOF}$ ): ce dernier est proportionnel à la racine carrée de son rapport  $m/z$ , et est défini selon l'équation 4 :

$$t_{TOF} = 0.044 \times \frac{\sqrt{m/z}}{1000} \quad (4)$$

## 2) Courbe d'étalonnage

Dans une cellule IM de type DTIMS, la mobilité d'un ion ( $K$ , exprimée en  $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ ) est définie selon le rapport entre sa vitesse dans la cellule ( $v_d$ ,  $m.s^{-1}$ ) et le champ électrique ( $E$ ,  $V.m^{-1}$ ). La vitesse  $v_d$  pouvant être déterminée à partir du temps de dérive corrigé ( $t_d'$ , s) et de la longueur de la cellule IM ( $L$ , m), l'équation 5 peut être établie :

$$K = \frac{v_D}{E} = \frac{L}{E \times t_d'} \quad (5)$$

La valeur de mobilité ionique  $K$  est ensuite normalisée en fonction des valeurs de température ( $T$ , en Kelvin) et de pression ( $P$ , en Torr) standards, pour être rapportée sous le terme de mobilité réduite  $K_0$  (équation 6) :

$$K_0 = K \times \frac{P}{P_0} \times \frac{T_0}{T} = K \times \frac{P}{760} \times \frac{273.15}{T} = \frac{L}{E \times t_{d'}} \times \frac{P}{760} \times \frac{273.15}{T} \quad (6)$$

L'équation de Mason-Schamp permet ensuite de déterminer une CCS à partir de la mobilité réduite  $K_0$  (équation 7) [8]. La mobilité réduite de l'ion est reliée à : la charge de l'électron ( $e = 1,6 \cdot 10^{-19}$  C), la constante de Boltzmann ( $k_b = 1,38 \cdot 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>), la température de la cellule IM ( $T$ , en K), la densité de nombre ( $N$ , m<sup>-3</sup>), la masse molaire du gaz utilisé ( $M_{gaz}$ , kg.mol<sup>-1</sup>), la masse molaire de l'ion ( $M_{ion}$ , kg.mol<sup>-1</sup>), ainsi que sa charge ( $z$ ), et sa section efficace ( $\Omega$ , m<sup>2</sup>) :

$$K_0 = \frac{3 \times e \times z}{16N} \times \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T} \times \left( \frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}} \right)} \times \frac{1}{\Omega} \quad (7)$$

Ainsi, en combinant l'équation 6 et 7, il est possible d'établir une relation pour la CCS ( $\Omega$ ) (équation 8), dans laquelle les seules grandeurs variables sont la charge de l'ion ( $z$ ), sa masse ( $M_{ion}$ ), ainsi que son temps de dérive ( $t_{d'}$ ). Tous les autres paramètres sont des constantes ( $e$ ,  $k_b$ ,  $\pi$ ), ou des paramètres instrumentaux fixes ( $N$ ,  $T$ ,  $P$ ,  $M_{gaz}$ ,  $L$ ,  $E$ ) :

$$\Omega = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T} \times \left( \frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}} \right)} \times \frac{z \times t_{d'} \times E}{L} \quad (8)$$

La cellule TWIMS utilisée au cours de ces travaux de thèse ne permet pas d'appliquer directement la relation (8). En effet, le champ électrique n'y est pas constant et la distance parcourue par les ions ne peut être déterminée. Par conséquent, une étape d'étalonnage doit être réalisée en utilisation des molécules dont les CCS sont connues. Ces droites d'étalonnage sont établies à partir de différentes étapes de calcul.

Dans un premier temps, en considérant  $N$ ,  $T$  et  $P$  constants pour la mesure de l'analyte et des étalons, l'équation de Mason-Schamp est exprimée à partir de  $\Omega'$ , définie par l'équation (9) :

$$\Omega' = \frac{\Omega}{z \times \sqrt{\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}}} = A \times \frac{t_{d'} \times E}{L} \quad (9)$$

Où :

$$A = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \quad (10)$$



Ainsi, à partir de l'équation (9) et des temps de dérive ( $t_d'$ ) des ions étalons, il est possible d'établir une relation de type  $\Omega' = f(t_d')$ , ajustable par une fonction de type puissance [9] (équation 11) :

$$\Omega' = a \times t_{d'}^b \quad (11)$$

D'où :

$$\ln(\Omega') = \ln(a) + b \times \ln(t_{d'}) \quad (12)$$

L'équation (12) permet alors d'établir un graphique, et de déterminer les paramètres mathématique  $a$  et  $b$  ; où  $a$  correspond à un facteur correctif de la température, et  $b$  à un facteur correctif de la non linéarité de la cellule TWIMS.

La détermination de ces paramètres permet alors d'obtenir une droite d'étalonnage en combinant les équations (11) et (9) :

$$\Omega = a \times t_d'' \quad (13)$$

Avec :

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

A partir de l'équation (13), et en connaissant la masse, la charge et le temps de dérive d'un ion, il est alors possible d'en déterminer la CCS.

1. Aitken, A. and M.P. Learmonth, *Protein determination by UV absorption*. The protein protocols handbook, 2002: p. 3-6.
2. Beck, A., et al., *Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells*. Journal of Chromatography B, 2005. **819**(2): p. 203-218.
3. Anthis, N.J. and G.M. Clore, *Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm*. Protein Science, 2013. **22**(6): p. 851-858.
4. Atmanene, C., *Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire*. 2009.
5. 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.
6. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility–mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nature protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.
7. Bécard, S., *Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et en mobilité ionique pour l'étude d'assemblages supramoléculaire en biologie*. 2012.
8. Gabelica, V., *Intérêt de la spectrométrie de mobilité ionique pour l'étude de la conformation et des assemblages non-covalents de biomolécules*. Spectra analyse, 2006. **251**.
9. 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.

## *Liste des communications*

### **Publications**

1. Beck A, Terral G, Debaene F, Wagner-Rousset E, Marcoux J, Janin-Bussat MC, Colas O, Van Dorsselaer A, Cianférani S. Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates. *Expert Review of Proteomics*, 2016, 13(2), 157-183.
2. Terral G, Beck A, Cianferani S. Insights from native mass spectrometry and ion mobility for antibody and antibody-based product characterization. *Journal of Chromatography B*, *juste acceptée*.
3. Terral G, Debaene F, Wagner-Rousset E, Broussas M, Janin-Bussat MC, Colas O, Corvaia Nathalie, Van Dorsselaer A, Beck A, Cianférani S. A combination of biophysical and mass spectrometry-based approaches to decipher mAb/antigen complexes with different binding stoichiometries. *mAbs, soumis*.
4. Terral G, Bragantini B, Saliou JM, Van Dorsselaer A, Manival X, Charpentier B, Cianférani S. Combining Native MS, IM-MS and HDX-MS for Structural Characterization of Bcd1p/Rtt106p complex involved in the box C/D snoRNPs Assembly Machinery. *article en cours de rédaction*.
5. Quinternet M, Terral G, Henri J, Maurizy C, Pradet-Balade B, Charpentier B Bertrand E, Meyer P, Cianférani S, Manival X. Structural characterization of RPAP3/HSPs complexes. *article en cours de rédaction*
6. Poignavent V, Terral G, Hoh F, Gillet FX, Lacombe E, Déméné H, Brugidou C, Cianferani S, Vignols F. Structural characterization of the viral suppressor of RNA silencing P1 of Rice Yellow Mottle Virus. *article en cours de rédaction*.

### **Communications orales**

1. Terral G, Van Dorsselaer A, Cianférani S. Caractérisation structurale de complexes protéiques non covalents par Echanges Hydrogène/Deutérium couplés à la spectrométrie de masse.

XIX<sup>èmes</sup> rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse, mars 2014, Dieppe, France.

2. Plumel M, Stojko J, Terral G, Westermann B. Characterization of protein complexes by structural MS. Journée des doctorants de l'IPHC, juin 2014, Strasbourg, France.
3. Terral G, Van Dorsselaer A, Cianférani S. Structural characterization of non-covalent protein complexes by mass spectrometry. 5th Student Symposium de l'IPHC, novembre 2014, Strasbourg, France.
4. Terral G, Bragantini B, Saliou JM, Van Dorsselaer A, Manival X, Charpentier B, Cianférani S. Combining Native MS, IM-MS and HDX-MS for Structural Characterization of Bcd1p/Rtt106p complex involved in the box C/D snoRNPs Assembly Machinery. Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, septembre 2015, Ajaccio, France.

### **Communications par poster**

1. Terral G, Poignavent V, Delalande F, Petiot-Bécard S, Brugidou C, Vignols F, Van Dorsselaer A, Cianférani S. Structural characterization of the viral suppressor of RNA silencing P1 of Rice Yellow Mottle Virus.
  - Workshop on Native Mass Spectrometry and Ion Mobility, avril 2014, Strasbourg, France.
  - Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, juillet 2014, Lyon, France.
  - Symposium on Structural Proteomics, novembre 2014, Anvers, Belgique.
2. Terral G, Bragantini B, Saliou JM, Van Dorsselaer A, Manival X, Charpentier B, Cianférani S. Combining Native MS, IM-MS and HDX-MS for Structural Characterization of Bcd1p/Rtt106p complex involved in the box C/D snoRNPs Assembly Machinery. 63<sup>rd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, juin 2015, Saint Louis (MO), Etats-Unis.
3. Terral G, Debaene F, Marcoux J, Colas O, Beck A, Cianferani S. Native MS and IM-MS for the characterization of Antibody Drug Conjugates. Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, septembre 2015, Ajaccio, France.

## Publication

**Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates.**

Beck A, Terral G, Debaene F, Wagner-Rousset E, Marcoux J, Janin-Bussat MC, Colas O, Van Dorsselaer A, Cianférani S.

*Expert Review of Proteomics*, 2016, 13(2), 157-183.



REVIEW

## Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates

Alain Beck<sup>a</sup>, Guillaume Terral<sup>b,c</sup>, François Debaene<sup>b,c</sup>, Elsa Wagner-Rousset<sup>a</sup>, Julien Marcoux<sup>b,c</sup>, Marie-Claire Janin-Bussat<sup>a</sup>, Olivier Colas<sup>a</sup>, Alain Van Dorsselaer<sup>b,c</sup> and Sarah Cianféran<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF), Saint-Julien-en-Genevois, France; <sup>b</sup>BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, Analytical Sciences Department, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>c</sup>IPHC, Analytical Sciences Department, CNRS, UMR7178, Strasbourg, France

### ABSTRACT

Antibody drug conjugates (ADCs) are highly cytotoxic drugs covalently attached *via* conditionally stable linkers to monoclonal antibodies (mAbs) and are among the most promising next-generation empowered biologics for cancer treatment. ADCs are more complex than naked mAbs, as the heterogeneity of the conjugates adds to the inherent microvariability of the biomolecules. The development and optimization of ADCs rely on improving their analytical and bioanalytical characterization by assessing several critical quality attributes, namely the distribution and position of the drug, the amount of naked antibody, the average drug to antibody ratio, and the residual drug-linker and related product proportions. Here brentuximab vedotin (Adcetris<sup>®</sup>) and trastuzumab emtansine (Kadcyla<sup>®</sup>), the first and gold-standard hinge-cysteine and lysine drug conjugates, respectively, were chosen to develop new mass spectrometry (MS) methods and to improve multiple-level structural assessment protocols.

### ARTICLE HISTORY

Received 14 September 2015  
Accepted 9 December 2015  
Published online 20 January 2016

### KEYWORDS

Antibody-drug-conjugate; bioanalysis; brentuximab vedotin; drug-to-antibody ratio; IdeS; ion mobility MS; native MS; mass spectrometry; trastuzumab emtansine

### Introduction

With advances in protein engineering technologies, monoclonal antibodies (mAbs) and their derivatives have emerged as the largest drug class in human therapeutics [1]. More than 60 antibody-based pharmaceuticals, such as antibody-drug-conjugates (ADCs), radio-immunoconjugates, bispecific antibodies, Fab fragments, Fc-fusion proteins, and peptides, have already been approved to treat cancer, autoimmune diseases, and, more recently, to lower cholesterol levels [2]. More than 50 others are under phase III clinical trials,[3] with an approval rate (~20%) that compares favorably with that of other new chemical entities (~5%). The success of mAbs stems from their unique properties, namely their high specificity and affinity (in the nM to pM range), their long circulating half-lives (up to 20 days), and their ability to induce immune cell effector response. For oncology therapy, however, first-generation mAbs are often inefficient or face resistance. To overcome these limitations, several families of armed antibodies are emerging – including radio-immunoconjugates,[4] ADCs,[5] immunotoxins,[6] and immunocytokines,[7] among which ADCs have so far proved to be the most successful, with two drugs already on the market. Brentuximab vedotin (BV,

marketed as Adcetris<sup>®</sup> by Seattle Genetics/Takeda) is indicated for the treatment of hematological malignancies (Hodgkin's lymphoma and systemic anaplastic large-cell lymphoma), while trastuzumab emtansine (T-DM1, marketed as Kadcyla<sup>®</sup> by Genentech/Roche) has been approved for the treatment of breast cancer patients resistant to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [8,9]. The ADCs in development target a wide range of cancers [10,11]. Many of these new compounds have emerged from a better understanding of structure–function relationships, which have mainly been achieved thanks to state-of-the art mass spectrometry (MS) methods [12,13] in combination with lessons learned from pharmaceutical and clinical developments. An example of this process is Mylotarg<sup>®</sup> (gemtuzumab ozogamicin), which, in 2000, became the first ADC to be approved by the US FDA but was then withdrawn by the sponsor in 2010. One of the motivations for its withdrawal was its poor chemistry, manufacturing and controls (CMC) characteristics, chiefly the presence of ~50% unconjugated mAbs competing with the ADC for antigen recognition and cell internalization [14–16]. This has been corrected for inotuzumab ozogamicin, another ADC from the same family, currently in clinical phase III, whose production process ensures the removal of naked antibodies.

**CONTACT** Alain Beck ✉ alain.beck@pierre-fabre.com; Sarah Cianféran ✉ sarah.cianferani@unistra.fr 📍 [Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF), 5 Av. Napoléon III, BP 60497, Saint-Julien-en-Genevois 74164, France]



The present review aims to draw an exhaustive picture of MS-based methodologies available for the characterization of ADCs at different levels, those of the intact conjugated protein, subunits thereof, peptides, and free drug-linker and related products (the top, middle, bottom, and drug-linker levels, respectively). A particular focus will be on MS approaches that allow ADCs to be analyzed in near-native conditions and provide an assessment of their higher-order structures.

## ADC architecture

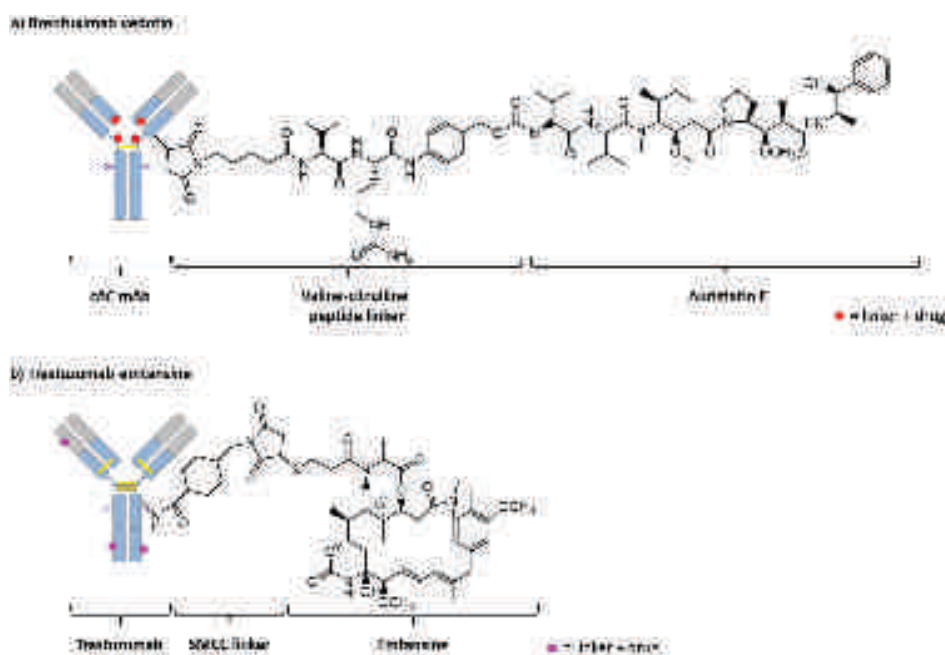
ADCs (~154 kDa) consist of a recombinant mAb (~148 kDa) covalently attached by a synthetic linker to a highly cytotoxic agent (0.3–1.5 kDa) [17]. The three structural components of an ADC are (Figure 1): (i) an antibody, which specifically recognizes cancer cells by binding to an overexpressed membrane antigen; (ii) a payload, which is a potent warhead that inhibits the growth of the cancer cells upon its release; and (iii) a cleavable or non-cleavable linker, which covalently binds the two moieties together. In ADCs, therefore, the proven antigen-specific selectivity of mAbs is complemented by the potency of the highly cytotoxic molecule [18]. As a result, the systemic toxicity associated with traditional chemotherapeutic treatments is reduced and the therapeutic index improved.

## Antibody carrier

From a structural standpoint, therapeutic chimeric, humanized, and human G immunoglobulins (IgGs) are tetrameric glycoproteins with molecular weights of approximately 150 kDa. They comprise two heavy chains (~50 kDa each) and two light chains (~25 kDa each). Disulfide bridges (16 for IgG1 and IgG4; 18 for IgG2) and non-covalent interactions maintain their three-dimensional (3D) structure (H2L2 homoheterodimers). The heavy and light chains are linked by one disulfide bond and the heavy chains by two (for IgG1 and IgG4) or three (for IgG2) disulfide bonds located in a short hinge domain. The other 12 disulfide bridges are intramolecular and delimit six different globular domains. Antigen binding is mediated by the variable domains, mainly by three loops connecting individual  $\beta$ -strands in each domain, named 'complementarity determining regions'. Like natural IgGs, all recombinant antibodies contain an Asn-X-Ser/Thr-X' (where X and X' are any amino acid other than proline) consensus sequence for N-glycosylation in their heavy chain CH2 constant domain. On average, IgG glycans account for just 2–3% of the total mass of the antibody.

## Cytotoxic warheads

The vast majority of ADCs either approved or at the clinical trial stage utilize auristatin and maytansine



**Figure 1.** Schematic representation of the structure of the two US FDA- and European Medicine Agency (EMA)-approved ADCs, which comprise an antibody, a linker and a payload. (a) Brentuximab vedotin (auristatin, protease cleavable linker, Cys-conjugation); (b) trastuzumab emtansine (maytansinoid, non-reducible thioether linkage, Lys-conjugation).

derivatives – tubulin polymerization inhibitors – as payloads. Nevertheless, an increasing number of clinical-stage ADCs exploit calicheamycins (DNA cleaving agents), duocarmycins (DNA alkylating agents), doxorubicins (DNA intercalating agents), pyrrolbenzodiazepines (DNA cross-linking agents), or SN38, an irinotecan metabolite (topoisomerase I inhibitor). These compounds are all highly toxic for cells and are more hydrophobic than the antibodies [17,19].

### Linker properties

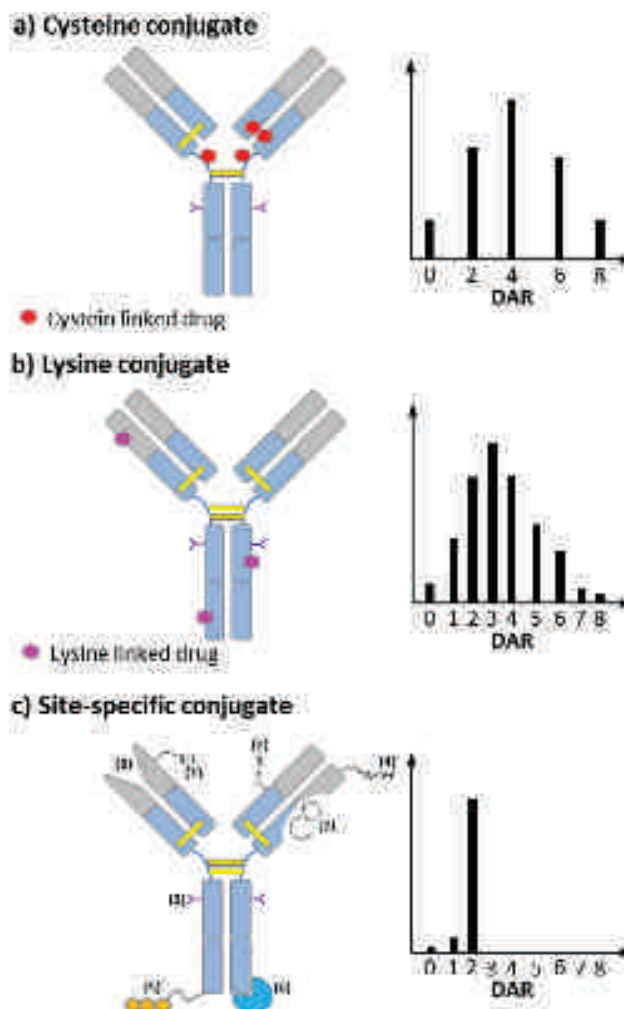
A plethora of linkers have been designed to connect the drug and antibody moieties. Most are stable in the bloodstream at physiological pH (7.4) and temperature but are labile once the ADC is inside the cells targeted by the antibody. They may contain conditional cleavage sites (acid-, lysosomal protease-, or glutathione-sensitive) or not (depend on degradation of the mAb component in the lysosomes). In addition, their polarity (the number of charged residues) can be optimized to limit aggregation and increase or reduce the number of bystander cells killed.

### Drug conjugation

Drug conjugation is most frequently achieved *via* reactions on side chains of two different amino acids: lysine side-chain amines or cysteine thiol groups, after reduction of the inter-chain disulfide bonds [20]. The conjugated drugs already on the market – BV, a hinge cysteine-linked ADC, and T-DM1, a surface-exposed lysine conjugate – are illustrative of two main ADC families currently in clinical trials (Figure 1).

Cysteine-linked ADCs are typically generated by partially reducing the inter-chain disulfides of the antibody hinge before alkylation with a cytotoxic agent, most frequently through maleimide chemistry [21,22]. This class of ADCs forms controlled mixtures of molecular species with a variable number of drug molecules per antibody (known as the drug-to-antibody ratio, DAR), a different location of the cytotoxic drug for a particular DAR, and a mixture of covalently and non-covalently associated light- and heavy-chain subdomains (Figure 2a).

Lysine conjugates are most commonly assembled *via* the formation of amide bonds between the epsilon amino group of endogenous lysine residues and activated esters [23,24]. Most IgGs contain ~90 lysine residues but only 32 cysteines, among which only eight are involved in the inter-chain disulfide bridges of chimeric, humanized, and human IgG1. Therefore, although the number of drug molecules incorporated on average per antibody is similar, [25] lysine conjugation yields a much more



**Figure 2.** Schematic representation of the different types of ADCs: (a) cysteine hinge, (b) lysine hinge and (c) site-specific ADCs, and their corresponding drug-to-antibody ratio (DAR) distributions. The strategies that have been proposed to date for site-specific conjugation include (1) the covalent labeling of engineered cysteines; (2) inserting non-natural amino acids; engineering (3) the glycans or (4) the N-terminus of heavy and light chains, (5) adding engineered tags; (6) non-covalent binding using the affinity properties of Fc-binding domain; (7) photoaffinity labeling on the nucleotide binding site; and (8) the conjugation of a pharmacophore on the catalytic site.

heterogeneous ADC population than cysteine conjugation does. In the reference lysine conjugate, T-DM1 for instance, 40 out of the 88 lysine residues were found to be solvent-exposed. Lysine conjugation of T-DM1 proceeds through the reaction of trastuzumab with the heterobifunctional linker succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), producing a linker-modified intermediate. The cytotoxic agent DM1, which contains a free thiol group, is added in a second step and reacts with the maleimide to produce the thioether-linked drug conjugate. This results in an average DAR of 3.5 for T-DM1.

The instability of the chemical link between the mAb and the drug in systemic circulation is problematic (e.g. retro-Michael deconjugation), however. This drug loss modifies the composition of the ADC, potentially diminishing both the amount of drug delivered to the tumor site and its off-target toxicity and overall safety. Other points of concern stem from current bioconjugation methods that yield mixtures of antibodies with different DARs, and within each DAR species, different conjugation sites, each species potentially having different toxicities and absorption, distribution, metabolism, and excretion properties [26]. Last but not least, the lack of high-resolution analytical techniques for their structural characterization is hampering the development of next-generation ADCs.

To extend the therapeutic window and to produce more homogeneous ADCs, a number of strategies have recently been developed, allowing more site-specific conjugation [27]. This can be achieved either by adding engineered cysteine residues at specific sites without disruption of the inter-chain disulfide bonds [28–31] or by adding engineered peptide tags recognized by microbial transglutaminases to specifically transamidate amine-containing drug-linkers attached to glutamine residues [32,33]. Alternatively, unnatural amino acids can be inserted into the primary sequence of mAbs to provide a chemical handle on their conjugation [34,35]. As an alternative to maleimide conjugation, moreover, the ongoing development of new heterobifunctional reagents should facilitate the production of more stable ADCs [36,37]. To our knowledge, two to four of these next-generation ADCs have already reached the stage of phase I clinical trials [31,38,39] and have shown an improved therapeutic index in preclinical toxicology studies [40].

### The ADC analytical toolbox: a combination of native and denaturing methods

A large number of orthogonal analytical and bioanalytical methods are needed for the characterization of ADCs [9,41]. Table 1 lists the analytical, structural, and functional assays reported in ADC quality control monographs as having been used either for batch release or for characterization and structural assessment [13,20,42,43].

### ADCs present an increased level of complexity compared to naked mAbs

As discussed above, most of the current clinical-stage ADCs consist of a heterogeneous population of species with a variable number of drug molecules per antibody (Figure 2a,b). Most frequently, an average number of four cytotoxic payloads are covalently attached to the mAb.

**Table 1.** Analytical, structural, and functional assays reported in quality control monographs for the characterization of ADCs. They may be used for drug substance/drug product batch release or characterization as well as for comparability, stability studies, and bioanalysis). MS-related methods appear in bold.

General aspect/ physico- chemistry	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Appearance</li> <li>• Color</li> <li>• Opalescence</li> <li>• pH</li> <li>• Osmolality</li> <li>• Water content (lyophilized)</li> </ul>
Identity/structure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Native ADC: HIC, native MS, native IM-MS, native CE-MS</li> <li>• Denaturated ADC (surfactant, solvent): SDS-PAGE, SDS-CE, <b>rpHPLC-UV/MS, MALDI-TOF</b></li> <li>• Subunits (reduced, IdeS+red.): SDS-PAGE, SDS-CE, <b>rpHPLC-UV/MS, ETD</b></li> <li>• Peptide mapping/disulfide bridges/conjugation sites (Lys-C, trypsin, Asp-N, Glu-C, chymotrypsin, SAP9): <b>rpHPLC-UV/MS, CE-MS</b></li> <li>• Higher order structures: CD, <b>HDX-MS</b>, DSC (Tm), FTIR, fluorescence</li> <li>• Immuno-identification: ELISA, immunoblots, FACS, SPR</li> </ul>
Quantification	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein quantitation: UV, BCA, Protein A HPLC, ELISA</li> <li>• Extinction coefficient: calculation, amino acid analysis</li> </ul>
Purity/impurities	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mass variants/Aggregates: SDS-CE, SDS-PAGE, SEC-UV/MALS/IR, LC-MS, A4F-UV/MALS/IR, DLS, SV-AUC, native MS, IM-MS</li> <li>• Subvisible/visible particles: light obscuration, MFI/MCM (flow cell microscopy)</li> <li>• Charge variants (pl): IEF, cIEF, icIEF/iCE, CEX</li> <li>• Drug loading and distribution, average DAR, positional isomers: UV, HIC, <b>LC-UV/MS (red; IdeS/red), 2D-LC-UV/MS, native MS</b></li> <li>• Free antibody: HIC, cIEF, icIEF/iCE</li> <li>• Free drug(linker) and related products: <b>LC-UV/MS, 2D-LC-UV/MS, ELISA</b></li> <li>• Free thiol groups: Ellman's reagent</li> <li>• Quenching agent (N-acetyl cysteine): <b>LC-UV/MS</b></li> <li>• Residual solvent: LC-UV, GC</li> <li>• Heavy metals: <b>ICP-MS</b></li> <li>• Endotoxins</li> <li>• Bioburden</li> </ul>
Functional assays/ potency	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antigen binding: ELISA, FACS, SPR, native MS</li> <li>• Cytotoxicity (IC50): cell-based assays (FACS, electroluminescence, UV-visible)</li> <li>• ADCC (when applied)</li> </ul>

A4F, asymmetrical flow field-flow fractionation; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; Asp-N, endoproteinase Asp-N; BCA, bicinchoninic acid; CD, circular dichroism; CE, capillary electrophoresis; CEX, cation exchange chromatography; DAR, drug-to-antibody ratio; 2D, 2 dimension; DSC, differential scanning calorimetry; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ETD, electron transfer dissociation; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FTIR, Fourier transform infrared; GC, Gas Chromatography; Glu-C, endoproteinase Glu-C; HDX, hydrogen/deuterium exchange; HIC, hydrophobic interaction chromatography; ICP, inductively coupled plasma; IdeS, the immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*; IM, ion mobility; IR, infrared; LC, liquid chromatography; Lys-C, endoproteinase Lys-C; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; MALS, multiangle light scattering; MFI/MCM, micro-flow imaging; MS, mass spectrometry; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; pl, isoelectric point; rpHPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; SAP9, secreted aspartic protease 9; SDS, sodium dodecyl sulphate; SEC, size exclusion chromatography; SPR, surface plasmon resonance; SV-AUC, sedimentation velocity analytical ultracentrifugation; TOF, time of flight; Tm, melting point; UV, ultraviolet.

For cysteine ADCs, for example, conjugates with zero, two, four, six, or eight cytotoxic payloads per mAb are obtained, such that the average DAR is four [22]. A discrete distribution of odd and even drug loads is observed for lysine ADCs as a result of the greater heterogeneity of the population. However, whereas lysine ADCs are assemblies maintained by covalent interactions between heavy and light chains (no reducing step that opens the disulfide bridges), cysteine ADC populations are mixtures of covalent and non-covalent compounds due to the presence of drugs at the inter-chain cysteine residues, making their analysis more complex. Analytical techniques and workflows therefore need to be adapted to obtain a clear and comprehensive understanding of the relationships between conjugation and the resulting product quality and heterogeneity.

### ***Main quality attributes for the characterization of ADCs***

The most important ADC characteristics required for process and formulation development, routine lot-release, and stability testing are the following [44]. The average DAR determines the amount of payload that can be delivered to the tumor cell and affects both the toxicity and safety of the ADC. The distribution of drug loads (i.e. the fraction of antibodies containing zero, one, two, three, ...  $n$  drugs) is also an important characteristic since the different forms may have different toxicological and pharmacological properties. Because the cytotoxic drugs linked to antibodies are hydrophobic, conjugates are more likely to aggregate during manufacturing and storage. Furthermore, size variants – in particular those with high molecular weights (aggregates) – can modify the pharmacokinetics (that is, accelerate clearance) and reduce drug exposure. Finally, the concentrations of free drug (from cleavable linkers) or drug-linker compounds (from non-cleavable linkers) have to be controlled, since the unconjugated drug and its related products may pose serious toxicity and safety threats. Residual quantities of unconjugated drug or drug-related impurities may remain in the final product as a result of incomplete purification or degradation during long-term storage. The proportion of unconjugated mAbs must also be controlled.

### ***State-of-the-art analytical methods for the characterization of ADCs***

#### ***Average DAR measurements***

A variety of methods have been used to measure the average DAR, the most appropriate depending on the properties of the cytotoxic drug and how it is linked to the antibody. The simplest method for estimating DARs

is based on ultraviolet/visible (UV/Vis) spectroscopy,[45] but the limitations of this approach (namely the UV photolability of calicheamicin, the lability of the linker, over-quantitation due to high concentrations of non-covalently bound drug) make confirmation using an orthogonal method necessary [46]. To measure the DAR of cysteine-linked drug conjugates, the most widely employed technique is hydrophobic interaction chromatography (HIC) [30,46–49]. This is performed under non-denaturing conditions at neutral pH with a gradient from high to low salt concentration. A low amount of organic modifier can also be included in the (low salt) mobile phase to improve the elution of mAbs loaded with lipophilic drugs. Under these conditions, each peak in the resulting chromatogram corresponds to an intact mAb species bound to a specific number of bound drug molecules (Figure 3b). Finally, native MS has recently emerged as an alternative technique in this context, as discussed below.

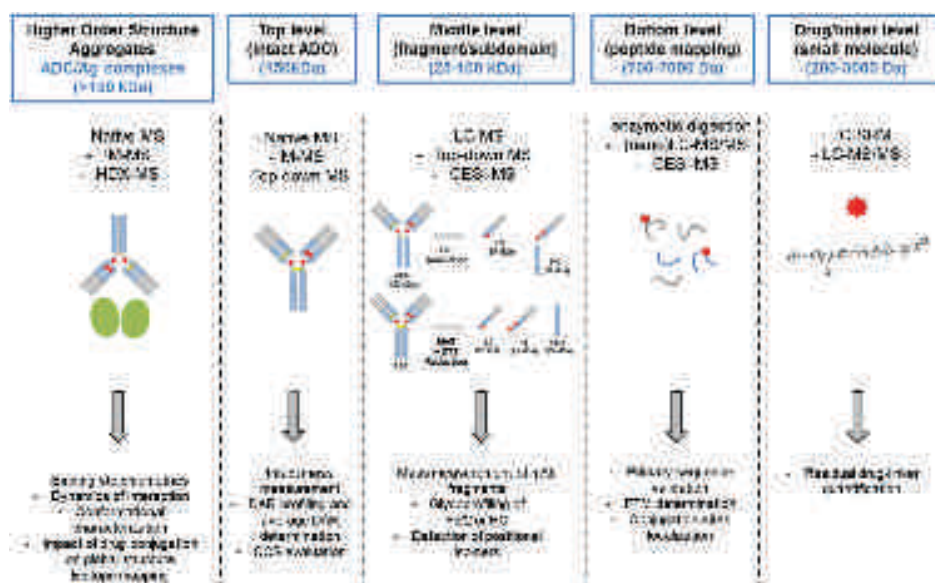
#### ***Drug-load distribution***

As for the average DAR, chromatography is the technique most commonly used to measure the drug-load distribution, sometimes coupled to MS. Chromatographic methods separate mAbs with different payloads based on the increased hydrophobicity imparted to the antibody upon conjugation with the drug-linker. When the drug is connected to the antibody through inter-chain disulfide bonds, HIC (performed under non-denaturing and non-reducing conditions) is the benchmark method used to resolve the drug-load variants [41,50]. Reversed phase liquid chromatography (rpHPLC) (under reducing conditions) and sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis (SDS-CE, under both non-reducing and reduction conditions) can serve as orthogonal techniques to confirm the drug-loading profile of cysteine ADCs [47,48]. When conjugation is made through lysine amine residues, ion isoelectrofocusing (IEF) or imaged capillary isoelectrofocusing (icIEF) can be used to resolve the different ADC products. In this case, conjugation decreases the net positive charge of the mAb by one for each attached drug-linker, if the drug-linker is itself uncharged. Finally, rpHPLC works well for ADC forms conjugated at specific sites (e.g. at inter-chain cysteines), but is less useful for more heterogeneous lysine-linked conjugates.

#### ***Size variants***

These are typically determined by size exclusion chromatography (SEC), as is the case for intact mAbs. It is worth mentioning, however, that regular SEC using phosphate buffered mobile phase yields poor peak





**Figure 3.** Multi-level workflow affording a comprehensive characterization of ADCs.

shapes for ADCs and an insufficient resolution between aggregates and monomeric ADC products [51]. This is probably the result of nonspecific interactions between the cytotoxic drugs and the surface of the stationary phase. To overcome these difficulties, various organic modifiers have been added to the SEC mobile phase – such as 25% propylene glycol [52] or 10% dimethyl sulfoxide [53] – to improve the shape of the resulting peaks. Alcohol-type organic modifiers may also prove valuable in improving the SEC performance of ADC products. For reduced fragments, on the other hand – that is, variants with reduced charge, namely light chains and heavy chains with different drug loads – generic rpHPLC has successfully been used [50].

### Free drug-linker quantification

Concentrations of free drug molecules can be determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and CE, but rpHPLC is currently considered the gold standard technique, since it often provides the best selectivity, sensitivity, and precision for cytotoxic drugs, which are typically lipophilic, low-molecular weight compounds [54]. This approach can be followed by UV/MS, allowing the identification and quantification of various cytotoxic species released from the conjugate in stability-testing studies.

In summary, the analytical methods most appropriate to characterize a given ADC strongly depend on the chemical properties of the linker, the cytotoxic payload, and the attachment anchor (i.e. lysine or inter-chain cysteines) to the antibody. One should bear in mind that the assay (cationic exchange chromatography, for instance) used for the parent mAb may not always work for the corresponding ADC.

### A multi-level workflow for the comprehensive characterization of ADCs

Dozens of mAb microvariants have been identified and reported in the literature, which differ in terms of their glycoform, charge, cysteine attachment, oxidation state, size, and gene sequence [55–58]. These microvariants and payloads-mAb conjugation both increase the structural complexity of the final drug substance, [59] with over-deamidation typically occurring due to conjugation at basic pHs [59].

Figure 3 presents a general workflow for determining the critical quality attributes of ADCs. This multi-level approach not only allows the quality and heterogeneity of ADCs to be assessed at the level of the primary structure, but also probes the changes to the higher-order structure arising from payload conjugation. The top level of the analysis involves mass measurements of intact ADCs (>150 kDa), typically using electrospray sources, either under native or classical denaturing conditions, which yield accuracies in the 30–100 ppm range and reveal the glycoform heterogeneity, drug-load profile, and the average DAR of covalent conjugates. If performed under classical denaturing conditions, this analysis is readily coupled to liquid chromatography (HPLC), enabling automated HPLC-MS experiments. On the other hand, native MS provides the drug or antigen-binding stoichiometries. Top-down approaches can also be used to sequence intact mAbs, without proteolytic digestion [60–62].

The next level of characterization (middle) involves the analysis of large ADC fragments (25–50 kDa). The subunits obtained by reduction or enzymatic cleavage are amenable

to LC-MS analysis, which, with latest-generation mass spectrometers, provides isotopic resolution and mass accuracies under 5 ppm. Improved fragmentation capabilities (using collision-induced dissociation, and/or electron transfer dissociation) make middle-level approaches less demanding than intact mAb/ADC top-down analysis [63].

A peptide level (bottom-level) analysis of the ADC (0.7–7 kDa fragments) is still required if information on the primary sequence and/or the conjugation site are required. Classically, the cysteines are reduced and alkylated before the ADC is digested (with trypsin or endoproteases such as Lys-C, Asp-N, Glu-C, or pepsin), and the resulting peptide fragments are identified through LC-MS/MS experiments and further searches in protein databases. Tandem MS is also usually performed to sequence the peptides and to locate posttranslational modifications such as glycosylation and the formation of disulfide bridges, notable at the conjugation sites.

The higher-order structures (HOSs) of proteins (secondary, tertiary, and quaternary arrangements) are often responsible for their uniqueness and can govern their function, by preventing binding to antigens or Fcγ receptors, for example. In this context, recent reports from the EMA or US FDA have pointed out that knowledge of the HOSs of biopharmaceutical compounds is crucial not only for meaningful comparative studies between innovator products, biosimilars, and biobetters, but also, in case of ADCs, to assess the impact of conjugation on the overall structure of the mAb. As discussed below, this structural assessment can be performed by ion mobility mass spectrometry (IM-MS) and hydrogen/deuterium exchange coupled to MS (HDX-MS).

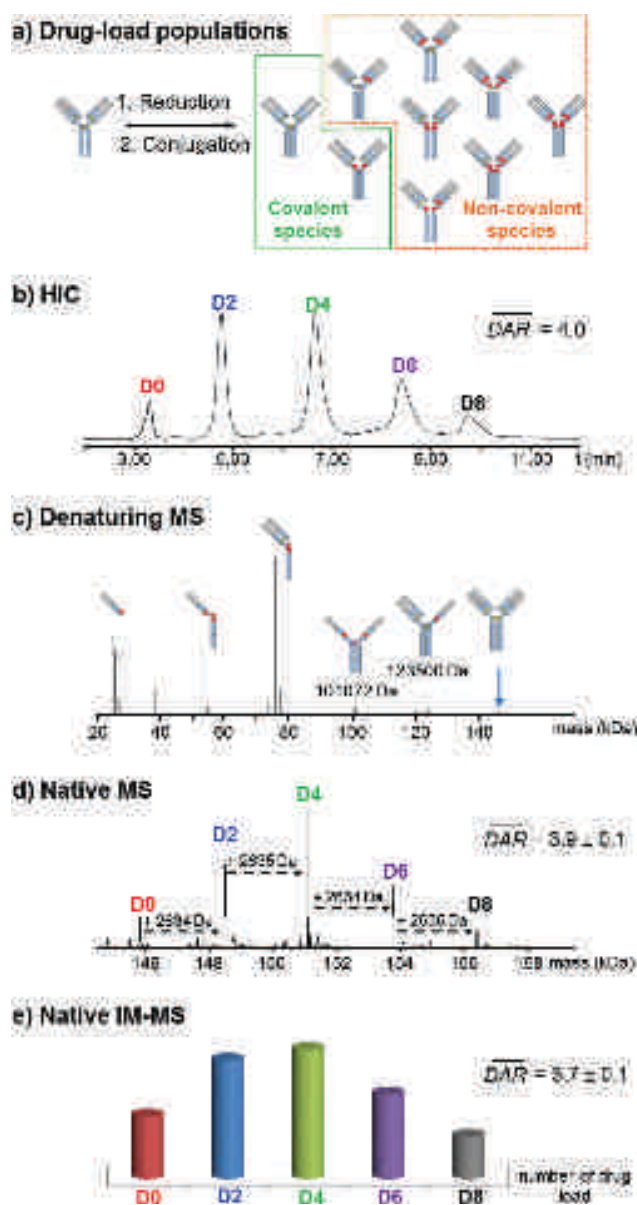
The fifth level of characterization presented here stems from the potential safety threats from residual drug-linker and related products in ADC batches, as mentioned above. These compounds can be quantified using the MS strategies for selected reaction monitoring (SRM) that have been developed for similar bioanalyses.

The relevance of this multi-level ADC characterization workflow is outlined in the next sections with two example applications, namely for BV and T-DM1.

### Hinge-cysteine linked ADCs: BV as a case study

BV is a potent ADC composed of the mAb cAC10, which targets the CD30 antigen on Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large-cell lymphoma cells; a highly stable valine-citrulline linker; and a potent chemotherapeutic agent monomethyl auristatin E, which inhibits microtubule polymerization (Figure 1a). The conjugation strategy used for BV involves partially reducing the inter-chain disulfides of the antibody prior to conjugation, yielding an ADC with 0–8 drug molecules

loaded per antibody and an average DAR of four [22]. The presence of drug molecules at the inter-chain cysteine residues means that BV is a composite of covalently and non-covalently associated light and heavy chain subdomains (Figure 4a).



**Figure 4.** Top level analysis of brentuximab vedotin (BV). (a) Schematic representation of cysteine-ADCs with a variable number of drug molecules per antibody. S-S bonds are represented by yellow lines while drug loads appear as red stars. (b) Reference hydrophobic interaction chromatogram revealing the drug loading profile and the average drug-to-antibody ratio (DAR). (c, d) Deconvoluted electrospray ionization mass spectra of deglycosylated BV (c) under classical denaturing conditions (H<sub>2</sub>O:ACN:FA 50:50:1) and (d) under native conditions (AcONH<sub>4</sub> 150 mM pH 7.4). (e) Ion mobility mass spectrometry (IM-MS) derived drug load profile for BV: relative intensities of each drug load as a function of the number of drug molecules loaded onto the mAb.

### Top level: intact BV analysis

#### Classical intact mass measurement under denaturing conditions is not appropriate for the characterization of cysteine-linked ADCs

The first step in the analysis of intact proteins is often a classical electrospray ionization (ESI)-MS analysis under denaturing conditions, typically in an acidified H<sub>2</sub>O/ acetonitrile solvent, either through direct infusion or by rpHPLC-MS analysis. For BV, however, these harsh solvent conditions disrupt the non-covalent interactions between the light and heavy chains, hampering the detection of the intact ADC. As a result, the most intense MS signals usually arise from drug-linked antibody fragments, from both the heavy and the light chains, while minor signals are obtained from the free unconjugated mAb (Figure 4c) [64,65]. This suggests that denaturing MS analyses are inappropriate for the characterization of intact cysteine-linked ADCs and that a one-step determination of the drug-load profile and average DAR is not possible for these compounds in classical denaturing conditions.

#### Native and ion mobility MS as alternative methods for drug-load profiling and average DAR measurements

Native MS has been used extensively for more than 25 years not only to study protein/ligand complexes from a variety of systems (for reviews, see [66,67]) but also to detect very large protein assemblies weighing several million Daltons [68,69]. It has more recently been shown to be a powerful technique for the analysis of intact mAbs [55,57,58,70–75]. Valliere-Douglass *et al.* were the first to report the use of ESI-MS coupled to SEC under native conditions to record the mass of a cysteine-linked ADC and assess the relative distribution of drug-linked species [64]. The masses of the SEC-desalted ADCs were determined using an ESI source and standard desolvation and ionization conditions, on a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) instrument for IgG1 mAbs conjugated with maleimidocaproyl-monomethyl Auristatin F (mcMMAF) and valine-citrulline-monomethyl Auristatin E (vcMMAE) at inter-chain cysteine residues. Elsewhere, Chen *et al.* employed nano- instead of conventional ESI in combination with limited enzymatic digestion to directly determine DARs [76]. Since then, several papers have used this technique to characterize the drug-load distribution and to evaluate the average DAR for several cysteine-linked ADCs, with results in good agreement with those obtained by HIC or UV/Vis spectroscopy [65,73,77,78]. More recently, Valliere-Douglas described how native SEC-MS could be used *in vivo* for DAR measurements

and for monitoring changes over time in the drug-load distribution [79]. Debaene *et al.* performed an extensive native MS characterization of BV in comparison with its unconjugated form brentuximab, highlighting the efficiency and accuracy (<30 ppm in routine analysis) of native MS over the latest high-resolution Orbitrap instruments for drug distribution profiling and the determination of average DARs [65]. A relatively simple but efficient analytical workflow was described, consisting of desalting, optional deglycosylation, then native MS analysis of the ADC, and semi-quantitative interpretation of the data obtained. The authors also highlighted the value of high-resolution native MS (Figure 4d) for one-shot ADC characterization, the limited overlap in the peak distribution obtained offering a unique description of intact glycosylated ADCs. Debaene *et al.* have also shown for the first time how native and IM-MS can be combined for the characterization of ADCs. The average DAR and the drug-load profile were obtained through a direct extrapolation of semi-quantitative IM-MS data (Figure 4e). The native MS and IM-MS measurements were confirmed by HIC (Figure 4b) demonstrating the analytical potential of native MS strategies.

The main advantage of using native MS to characterize cysteine-linked ADCs lies in its ability to detect non-covalent associations of light and heavy chains, as these are not revealed by classical rpHPLC-MS methods. Furthermore, native MS data obtained on most Q-TOF or orbitrap instruments are sufficiently resolved to confirm the identity of the ADCs, and the relative distributions of the drug-loaded species derived from these data are in good agreement with those measured by HIC. Two additional advantages of native MS are its efficiency – with measurements completed in minutes rather than an hour for HIC – and the limited sample handling that is required, which limits the risk of artifacts appearing in the data. The process could indeed be automated using one of several commercially available SEC-native MS workflows.

#### Native top-down MS of BV

Top-down MS is an emerging approach for the amino acid sequencing of intact proteins, providing valuable information on protein isoforms (proteoforms), [80,81] with the limited sample manipulation again reducing the occurrence of artifacts in the data. Top-down approaches have so far been largely performed on Fourier transform ion cyclotron resonance and Orbitrap instruments. While top-down analysis has been used to sequence mAbs, [60–62,82–84] their (large) size means that currently achievable resolutions only provide 30% sequence coverage at best and incomplete sequencing of the complementarity determining regions [60]. The top-down (middle-level)



analysis of smaller mAb fragments has proved more successful, however, with 70% sequence coverage having been achieved [63].

A recent interest in combining top-down proteoform analysis and structural characterization has led to native top-down approaches performed on either Q-TOF [85] or Orbitrap instruments [86]. Tandem native MS was successfully used by Dyachenko *et al.* for BV to show that drug conjugation takes place inhomogeneously at cysteine residues on both the light and heavy chains [86]. Thanks to the implementation of a high-mass quadrupole on a high-resolution Orbitrap instrument, precursor ions corresponding to one specific DAR were selected and then sequenced thanks to the MS/MS capabilities of the instrument. This located the conjugation site of the drugs in the antibodies and even revealed the positional isomers of the DAR 2 and DAR 6 species.

### Middle level: BV subunit analysis

Even if structural insights can be obtained for intact ADCs by native MS and IM-MS, the higher mass accuracy provided by the more straightforward rpHPLC-MS analysis of their subunits remains valuable. As for unconjugated mAbs, ADC profiles can be simplified by reduction [87] (yielding the light and heavy chains at ~25 and ~50 kDa, respectively) or enzymatic treatments, such as N-deglycosylation (IgGZERO<sup>®</sup> or PNGase-F), [88] carboxypeptidase B digestion, [87] or glutamyl-peptide cyclotransferase treatment [89]. Smaller mAb fragments can also be generated by papain digestion (producing ~50 kDa Fab/Fc fragments) or IdeS digestion (Fabricator<sup>®</sup>, the immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) followed by reduction with dithiothreitol (DTT, for Fc/2, LC, and Fd fragments of ~25 kDa), as illustrated in Figure 4. This approach has the advantages of being fast (requiring less than 2 h for the entire analysis, including digestion and rpHPLC-MS analysis), informative, and inexpensive in terms of materials. Reduction experiments leading to individual light and heavy chains or IdeS treatment are, to our knowledge, currently mostly used for middle-level analysis.

### Characterization of BV subunits under denaturing and reducing conditions (middle-level, 23–54 kDa fragments)

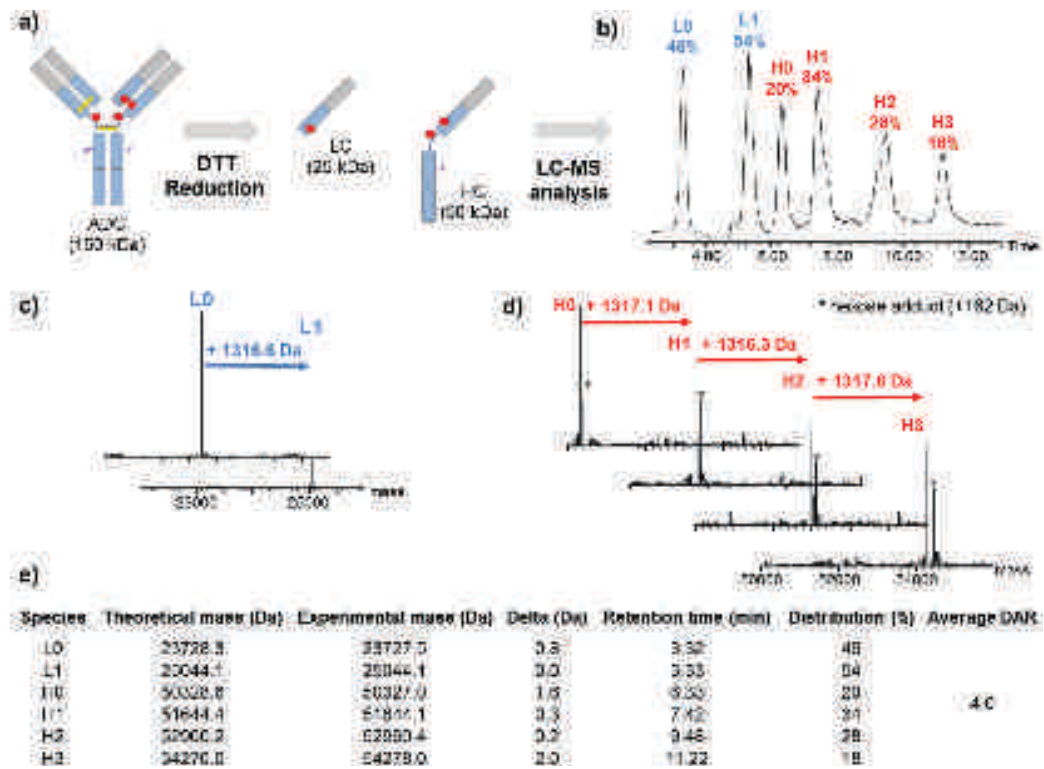
Reducing treatments are a routine way to divide the analysis of mAbs and ADCs into more manageable pieces. The drug-loading profile and average DAR can then be obtained by rpHPLC with MS, as an orthogonal method to HIC [90] – as for the latter, rp-HPLC relies on differences in hydrophobicity. This middle-up strategy

can be implemented on any current HPLC-MS instrumentation and is therefore available in most labs. Treatment of cysteine-linked ADCs with DTT or tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) fully reduces the remaining inter-chain disulfides and yields six species: light chains with zero or one drug molecule attached (L0 and L1), and heavy chains with zero, one, two, or three drug molecules attached (H0, H1, H2 and H3). These species are stable in the denaturing organic solvent and can be successfully separated on a reversed phase column. The percentage peak area from integration of the light chain and heavy chain peaks, combined with the assigned drug load for each peak, is used to calculate the weighted average DAR (Figure 5) [91,92].

### Characterization of BV subunits after enzymatic cleavage (middle-level, 23–28 kDa fragments)

Downsized mAb or ADC fragments can also be obtained by limited proteolytic cleavage under non-denaturing conditions in the hinge region of the heavy chain, yielding Fab or (Fab')<sub>2</sub>, and Fc fragments, whose reduction (with DTT) produces even smaller fragments of approximately 25 kDa: the light chain and the two halves of the heavy chain (Fc/2 and Fd). Formerly conducted with proteases with a limited specificity, such as papain, [93] pepsin, [94] and endoprotease Lys-C, [95] the enzymatic cleavage for middle-level analyses is mostly conducted using IdeS, a bacterial protease that specifically cleaves IgGs under the hinge region [96]. The potency of IdeS has been demonstrated for cysteine-linked ADCs on an antibody-fluorophore conjugate [88]. A rapid IdeS- and rpHPLC-MS-based procedure was also recently employed by Firth *et al.* for the characterization of two auristatin ADCs [97]. With IdeS, a complete middle-level characterization can be completed within a few hours, providing the primary sequence and the glycoprofiles of the Fab and Fc fragments. The data can also be used for biosimilar comparability studies and Fc-fusion protein studies. More recently, IdeS digestion has been shown to be preferable to DTT treatment for the characterization of BV, the LC fragments being better separated in the subsequent rpHPLC-MS analysis, allowing the identification of positional isomers (Figure 6) [92]. In addition to the seven expected major peaks (from the Fc/2, L0, L1, Fd0, Fd1, Fd2 and Fd3 fragments), two minor satellite peaks with identical masses are observed close to those from Fd1 and Fd2 (Figure 6) and tentatively assigned to positional isomers. This was confirmed by peptide mapping with nanoLC-MS/MS following the digestion with endoprotease Lys-C of isolated fragments, as discussed below.



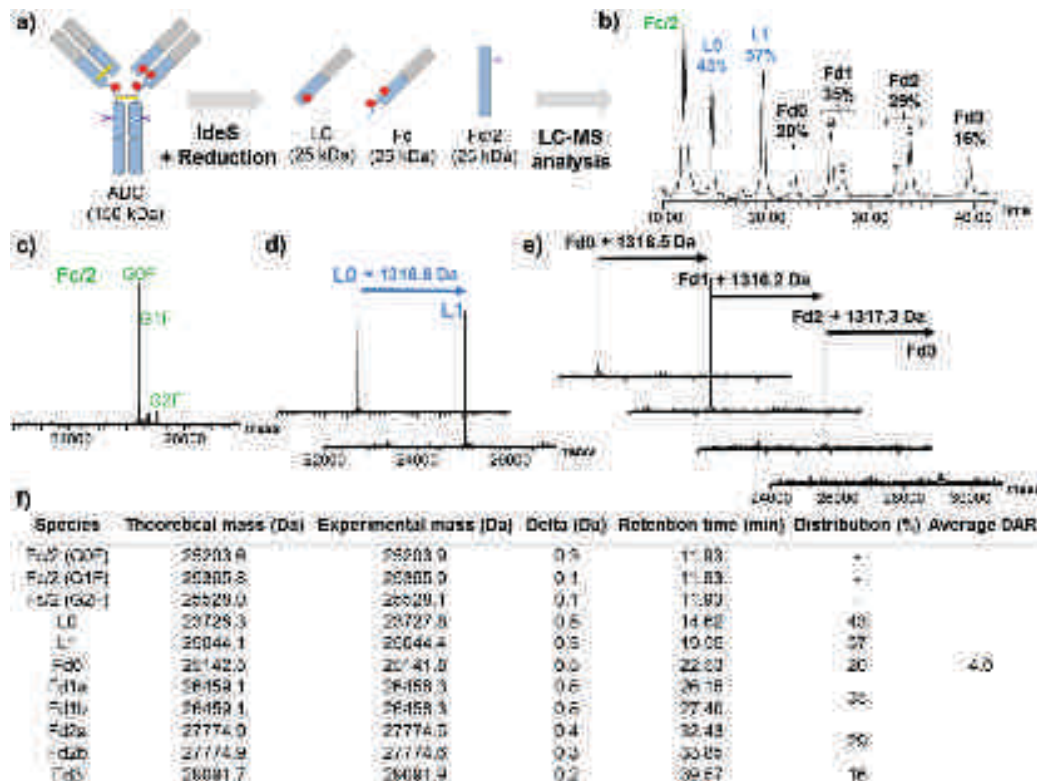


**Figure 5.** Middle level characterization of brentuximab vedotin (BV) after reduction. (a) Schematic representation of the workflow for middle-level analysis. (b) Reverse-phase high-pressure liquid chromatogram of BV fragments obtained after reduction with dithiothreitol and alkylation with iodoacetic acid. (c, d) Deconvoluted mass spectra of (c) the light- and (d) the heavy-chain fragments of BV. (e) Table listing the masses, proportions, and average drug-to-antibody ratios of the different BV fragments, as measured from the corresponding peak areas.

### Bottom level: peptide mapping of BV and the characterization of positional isomers (0.3–7 kDa fragments)

Following denaturation, reduction, and alkylation of the Cys residues, mAbs or recombinant proteins are commonly digested with trypsin or endoproteases such as Lys-C, Asp-N, or Glu-C. Samples can be prepared automatically, thus facilitating multiple analyses. The extra hydrophobicity from the drug molecule means, however, that peptide mapping is more difficult for cysteine-linked ADCs than for mAbs, especially for species bearing two or more conjugated drugs [44]. As a result, ADCs have seldom been characterized at the peptide level. Junutula *et al.* describe the site-specific conjugation of vcMMAE to an antibody through engineered cysteine substitutions on the light and heavy chains resulting in only three isoforms with zero, one, or two drug molecules and no positional isomer [30]. The tryptic peptide mapping of these conjugates, with LC-MS detection, identified four drug-conjugated peptides *via* a characteristic in-source fragmentation ion ( $m/z = 718.5$ ) that is observed in all the mass spectra of molecules containing vcMMAE. The peptides were all found to be fragments of either

complete or partial tryptic cleavage around the engineered cysteines. More recently, Janin-Bussat *et al.* reported an improved BV peptide mapping protocol that allows the drug-loaded peptides to be identified by LC-MS analysis [92]. Because of the hydrophobicity of the drug, all steps of the peptide mapping protocol were adjusted to maintain the hydrophobic drug-loaded peptides in solution and enable their unambiguous identification by LC-MS. In particular, solvents were added immediately before (10% acetonitrile) and after (40% isopropanol) the enzymatic digestion step. The resulting data showed that as expected, the drug molecules were linked to the inter-chain cysteines of the heavy and light chains. Furthermore, after IdeS digestion and reduction of the ADC, the positional isomers were identified for the first time by LC-MS/MS analysis, unambiguously demonstrating that when only one drug molecule binds, the link forms on Cys220 of the L15 peptide of the heavy chain. Conversely, when two drug molecules attach to the heavy chain, they bind preferentially to Cys226 and Cys229 of the L16 peptide [92]. Interestingly, Birdsall *et al.* recently demonstrated a rapid online method based on MS and multidimensional chromatography, which allowed them to



**Figure 6.** Middle level characterization of brentuximab vedotin (BV) after digestion with IdeS (the immunoglobulin-degrading enzyme from *Streptococcus pyogenes*). (a) Schematic representation of the workflow for middle level analysis. (b) Reversed-phase high-pressure liquid chromatogram of BV fragments obtained after IdeS cleavage and dithiothreitol reduction. (c–e) Deconvoluted mass spectra of (c) the light chain, (d) the Fc/2 and (e) the Fd fragments of BV. (f) Table listing the masses, proportions, and average drug-to-antibody ratios of the different BV fragments, as measured from the corresponding peak areas.

confirm the structure of a cysteine-conjugated ADC base on an IgG1 [98]. The HIC peaks in the first dimension were successfully assigned to specific subunits *via* MS following dissociation under denaturing reversed-phase conditions (the second dimension). Elsewhere, a comparative characterization by LC-MS of the cysteine-linked conjugation profiles of IgG1 and IgG2 ADCs has been performed by Wiggins *et al.* [99]. The results demonstrated that IgG1 mAbs favor conjugation to the cysteines between the light and heavy chains, whereas IgG2s link preferentially to cysteines in the hinge region. Finally, as an example, in an application of new enzymes that should also prove valuable for the characterization of ADCs, Szrentic *et al.* used secreted aspartic protease 9 (SAP9) from *C. albicans*, which generates 3–4 kDa peptide fragments, and bottom-up proteomics to achieve near-100% sequence coverage on a mAb in a single LC-MS run [100].

### Lysine-linked ADCs: T-DM1 as a case study

Trastuzumab emtansine is the third ADC to have received market approval and is indicated for the treatment of HER2-positive breast cancer patients [23].

Trastuzumab (Herceptin®), which mitigates the effects of HER2 overexpression, is coupled to a maytansine derivative (DM1), which inhibits the elongation of microtubules. In contrast with BV, T-DM1 can be conjugated without reduction, so that T-DM1 exists only as covalent species. Zero to eight drug molecules are attached, with an average DAR of 3.5 [101].

This suggests that T-DM1 is easier to characterize than BV; however, the methods (primarily HIC) that are used to determine the average DAR for cysteine-conjugates are difficult to adapt for the analysis of lysine-conjugates. Indeed, the high degree of heterogeneity that characterizes lysine ADCs, which have at least 40 lysines available for conjugation, makes UV/Vis spectroscopy and MS approaches more suitable [45]. The systems amenable to the former are rather few in number as (i) the drug must be detectable by UV/Vis wavelengths; (ii) the drug and mAb must have different maximum absorptions; and (iii) the absorption of light should not influence the interaction between the drug and the mAb. Lysine-linked conjugate species with different drug loads can be resolved by icIEF, but the presence of charge-associated variants of the antibody

intermediate and any cross-linking or differences in the UV responses of the differentially drug-loaded forms may prevent quantification [102,103].

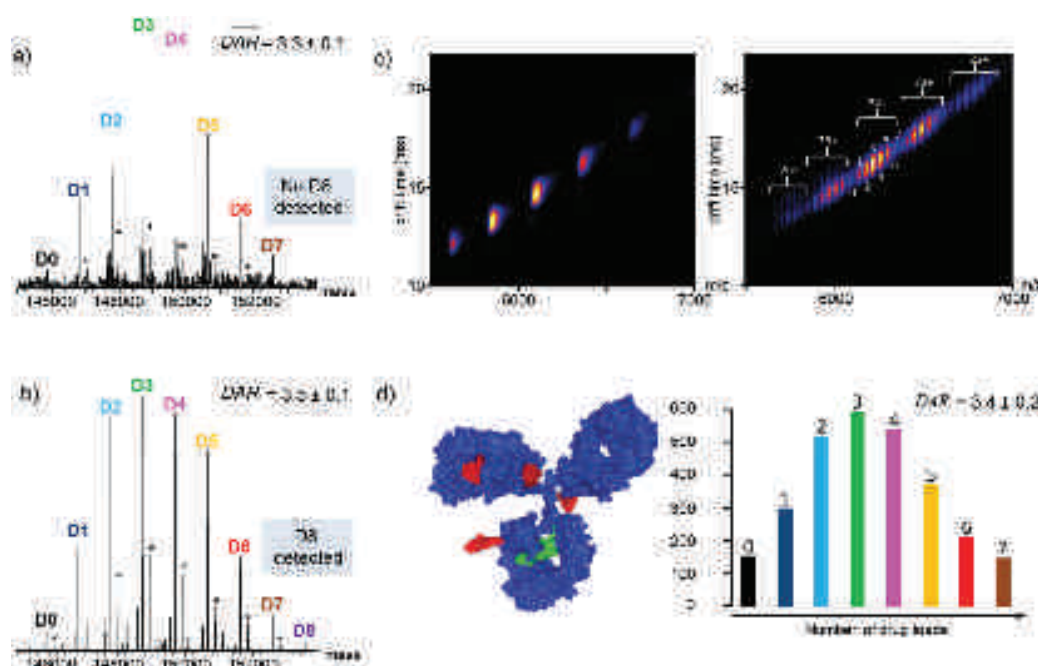
MS-based techniques are therefore pivotal for the characterization of lysine-conjugated ADCs [25,90,104–106]. Several papers have demonstrated the potential of LC-MS and SEC-MS to respectively measure the average DAR and drug-load distribution on maytansin-conjugated mAbs [25,90,101]. Marcoux *et al.* have recently demonstrated the ability of native MS and native IM-MS to characterize lysine-conjugated ADCs, notably T-DM1 [78]. These authors first compared the potential of native MS versus denaturing MS for the determination of average DARs and drug-load distributions. The presence of highly charged species of T-DM1 leads to charge state overlap, especially under denaturing conditions, such that only species with DARs of zero to seven (at best) can be observed (Figure 7a). High-resolution native MS is nonetheless beneficial as it reveals DAR 8 species at the intact protein level (Figure 7b). Charge reduction using imidazole also allows the detection of all the species from DAR 0 to DAR 8, and the average DAR thus obtained for T-DM1,  $3.5 \pm 0.1$ , is in agreement with the value reported by Lazar *et al.* [101]. As for cysteine ADCs, native IM-MS highlights the increase in heterogeneity that occurs when

trastuzumab is conjugated with DM1 (Figure 7c). The drug distribution profile obtained and the average DAR ( $3.4 \pm 0.2$ ) are consistent with values obtained from other MS methods. Huang *et al.* have also illustrated the potential of IM-MS in a routine rpHPLC-MS analysis of an IgG1 lysine conjugate, showing in particular how a ‘cleanup’ step significantly improves the signal-to-noise ratios in the mass spectra of the intact ADC, and increases the accuracy of the associated DAR measurements [107].

To assess drug-loading heterogeneity and the location of the drug conjugation site, Gautier *et al.* have reported the combined use of native MS and bottom-up proteomics for the characterization of IgG1 and IgG4 ADC-like components, using *N*-hydroxysuccinimide-based tandem mass tags as a mimic for ADC conjugation. Native MS allowed the detection and quantification of up to 69 conjugates, while bottom-up proteomics revealed some very reactive lysine conjugation sites, or ‘hot spots’ [108].

### Site-specific ADCs

As discussed and illustrated above, the three market-approved ADCs, and most of those under clinical trial, are controlled mixtures of molecules. In 2008, Junutula



**Figure 7.** Top level analysis of trastuzumab emtansine (T-DM1). (a) Deconvoluted electrospray ionization mass spectra obtained under denaturing conditions ( $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{FA}$  50:50:1) by direct infusion on a Q-TOF instrument of T-DM1 after deglycosylation. (b) Deconvoluted electrospray ionization mass spectra obtained under native conditions ( $\text{AcONH}_4$  150 mM pH 7.4) by direct infusion into a high resolution Orbitrap extended mass range instrument (nominal resolution: 17.5 k) of T-DM1 after deglycosylation and charge reduction with 40 mM imidazole. (c) Ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) driftscope plots obtained for trastuzumab (left) and T-DM1 (right) highlighting drug load heterogeneity. (d) Molecular model of trastuzumab conjugated with four DM1 payloads and drug load profile of deglycosylated T-DM1 obtained by IM-MS. The asterisks indicate +220 Da linker adducts.

*et al.* reported the design and production of a new class of homogeneous ADCs, thiomab-drug conjugates (TDCs), prepared by conjugation to engineered IgGs containing additional exposed cysteine residues, whose positions were identified using phage display methods [30]. After reducing the blocked cysteine residues and inter-chain disulfides, the latter were regenerated and maleimide reagents were conjugated to the reactive cysteine thiol group to generate site-specifically modified ADCs, with 92.1 % of the population having two loaded molecules and only 0.2, 3.3, and 4.3 % having zero, one, or three, respectively (average DAR = 2.0), as assessed by rpHPLC-MS. Importantly, these TDCs are better tolerated at higher doses in animals, indicating that their therapeutic index is higher than that of existing ADCs. A plethora of other site-specific techniques has subsequently been reported, as recently reviewed (amongst others) by Panowski *et al.*, [109] Agarwal and Bertozzi, [110] and Dennler *et al.*, [111] and summarized in Figure 2c. Interestingly, Junutula and colleagues published another paper, in 2012, [112] indicating that their first-generation TDCs were not very stable in the blood stream. Thanks to MS, the degradation mechanism was shown to be a retro-Michael reaction, resulting in the transfer of the drug-linker to circulating molecules bearing free thiol groups such as albumin and glutathione [113]. In addition, based again on mass shift measurements, succinimide ring hydrolysis was shown to stabilize the drug-linker on the antibody, with a mass increase of 18 Da (H<sub>2</sub>O). This ring opening was correlated with a positively charged local site. Succinimide hydrolysis has since been employed to improve the stability (and hence the safety) of several ADCs [114]; different strategies have been adopted, notably the process-favored mild method based on a basic pH treatment, [115] but also self-hydrolyzing maleimides [114] and electron withdrawal N-substituents [116].

Alternatively, the specific conjugation to N-glycans of IgG (at Asn297) can be achieved by periodate oxidation of fucose followed by hydrazone condensation, metabolic incorporation of 6-thiofucose and then maleimide conjugation [117]. The process is completed using specific enzymes such as enzymatic transfer of galactose and sialic acid followed by periodate oxidation and oxime condensation, enzymatic transfer of galactose and 9-azidosialic acid followed by Cu-free click reaction, enzymatic removal of terminal galactose followed by enzymatic transfer of GalNAz and Cu-free click reaction [118]. Each step in the reaction can be monitored by LC-MS, which can then also be used to assess the structures [119] and the glycoprofiles [120].

Conjugation can also be achieved through the incorporation of noncanonical amino-acids – such as p-acetylphenylalanine sometimes with an azido-lysine derivative – followed by oxime condensation and Cu-free click chemistry. The cell-free incorporation of p-azidomethylphenylalanine followed by Cu-free click chemistry, and the incorporation of selenocysteine followed by mild reduction and alkylation have also been described [121]. As for other site-specific conjugation techniques, the choice of attachment site may affect the stability of the resulting ADCs [39].

Conjugation methods based on the enzymatic modification of peptide tags have also been explored extensively. One method involves glycosidase treatment – to access Q295 (and N297Q mutants) – prior to the transglutaminase-mediated conjugation of amine-functionalized small molecules or drugs to engineered LLQGA sites [33]. The sortase-mediated conjugation of a glycine-functionalized chelator near the C-terminus of a single-chain antibody (scFv) and the formylglycine-generating enzyme-mediated conversion of cysteine to formylglycine followed by hydrazino-Pictet–Spengler ligation have also been successfully generated [122].

One of the caveats of these site-specific approaches is that many commonly used bioorthogonal reagents do not react stereospecifically and typically yield at least two diastereomeric products, resulting in several regioisomers. In addition, since these conjugation methods are applied to heterogeneous antibodies (e.g. glyco- and charge-variants), the homogeneity of the final products depends on the resolving power of the analytical and structural methods employed [58].

### ADC higher order structures (HOSs) and aggregates

The HOS of a protein, namely its secondary, tertiary, and quaternary assemblies, is often essential for its function [123,124]. While disruption of the native fold can also impact the function of the molecule, the main immunogenic consequences of misfolded proteins stem from their propensity to aggregate [125,126]. In solution, mAbs and ADCs tend to self-associate, forming a range species from oligomers to visible particles. Changes in the HOS of ADCs can alter their quality attributes, and thereby their safety, efficacy, and pharmacokinetics. A requirement of regulatory agencies is therefore that the effects of manufacturing, storage, and delivery on the HOSs of mAbs and ADCs be well characterized [127].

Determining the HOSs of proteins using analytical biophysical techniques is still challenging, however.



The classical methods for protein structure determination, namely X-ray diffraction (XRD) and nuclear magnetic resonance (NMR), [128] provide atomic resolution but can only tackle relatively small proteins, and consume large amounts of biological material. For mAbs and ADCs, furthermore, the flexibility of the hinge region hinders the growth of crystals (for XRD) and complicates NMR analyses. So far, only a small number of mAb crystal structures have been published [129] and no 3D structure of an ADC has been solved. In this context, lower-resolution methods, notably those based on MS (see Figure 8 and the following sections), can provide valuable insights.

### Native MS and IM-MS

Native MS has been used to reveal the presence of mAb multimers (dimers, trimers, tetramers) [130] and to study the structural dynamics of IgG4 [74]. As non-covalent interactions are maintained, a single native MS analysis can be used to both characterize the ADC (average DAR, drug-load distribution, proportion of unconjugated drug molecules) and check for the presence of multimers. Native MS has also been used to unambiguously determine antibody/antigen binding stoichiometries [131] and to monitor the dynamics of

IgG4 Fab-arm exchange [74]. Furthermore, Habeger *et al.* recently reported a linear correlation between the results obtained by quantitative native MS and IgG-FcRn functional analysis, with a larger amount of higher-order complexes being detected in the absence of methionine oxidation in both cases [132].

The structural analysis of proteins can also be facilitated by IM-MS [133–136]. In this approach, ions are separated based on their collisional cross section (CCS) as they drift through an inert buffer gas in an electrical field, providing information on the charge and conformation of a protein complementary to the associated mass data. The measured drift times can be converted into CCSs, which correspond to the averaged rotational projection on a 2D space of the biomolecular 3D structure. IM-MS adds an additional level of conformational characterization to that provided by native MS. The analysis of the HOSs of mAbs by IM-MS remains a relatively novel endeavor [56,57,72,74,131,137–140].

To our knowledge, only three publications have so far reported the use of native IM-MS for the characterization of ADCs [65,78,107]. Debaene *et al.* extensively analyzed the HOS characterization of BV by IM-MS, [65] comparing the heterogeneity of BV with that of unconjugated brentuximab. Five different species were observed, having zero to eight drug molecules attached

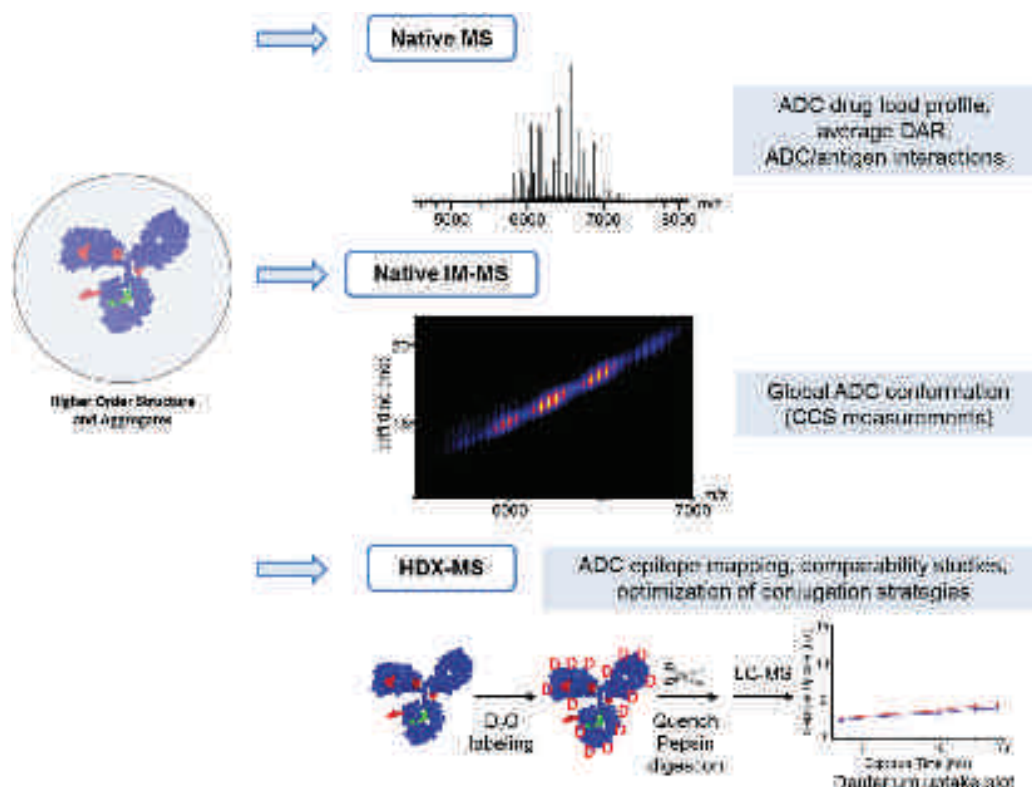


Figure 8. Mass spectrometry techniques for the analysis of higher order structure and aggregation for ADCs.

but similar gas phase conformations – viz. CCSs of  $71.1 \pm 0.1$  and  $68.1 \pm 0.1$  nm<sup>2</sup> for the DAR 8 and DAR 0 species, respectively. The constant shift in CCS between two consecutive even drug conjugates points to a small increase in mass rather than to structural changes and indicates that the conformation of the protein is not drastically altered upon binding.

Similarly, Marcoux *et al.* performed a global conformational analysis of T-DM1 [78] and presented the first-attempt 3D model of an ADC based on the structure of human IgG1 and the Fab structure of trastuzumab (PDB IDs 1HZH and 1N8Z, respectively). The CCSs derived from IM-MS were found to be slightly higher than those estimated from the masses of the species, but considerably lower than those expected from molecular modeling. These discrepancies, also observed for unconjugated mAb and attributed to a collapse of T-DM1 in the gas-phase,[65,138] contrast with the results obtained for BV, for which the values calculated assuming spherical proteins match those measured by IM-MS. This suggests that the surface exposure of lysine-linked payloads makes them more susceptible to gas-phase collapse than equivalent payloads in cysteine-linked conjugates. Each drug-loading event induced a CCS increment of  $\sim 25$  Å<sup>2</sup>, which matches the binding contribution expected from the mass of a single DM1 molecule ( $\sim 100$  Å<sup>2</sup>). This suggests that the conformational changes that occur in trastuzumab upon drug conjugation are very slight.

As mentioned above in the discussion of analytical methods for T-DM1, Huang *et al.* [107] have also employed IM-MS to perform DAR measurements. The protein drift time was used as a second dimension to monitor the changes in DAR in lot-to-lot analyses of both a site-specifically and randomly conjugated ADC.

Although it remains an emerging technique, native IM-MS offers a simple and direct means to assess the size and shape of ADCs and thereby obtain a rough conformational picture. The examples above also illustrate how IM-MS can be used to identify all the species with different drug loads present in solution and study the effects of drug conjugation on the global conformation of the mAb. In the medium term, the development of molecular dynamic algorithms able to cope with >150 kDa proteins should facilitate the structural interpretation of IM-MS data on mAbs and ADCs.

### HDX-MS

Technical developments over the past 10 years have brought HDX-MS to the forefront of methods for the structural characterization of proteins. Indeed, HDX-MS now fills a niche in their therapeutic analysis, not only

for epitope mapping and comparability studies,[141–147] but also in the investigation of mAb/Fc receptor interactions [148]. Papers have also been published on the use of HDX-MS to study mAb aggregation,[149–151] to optimize formulation stability,[152] to monitor reversible mAb self-assembly,[153] and to characterize the structural effects of glycosylation or chemical modifications on mAbs [154–157].

In a typical HDX-MS experiment, the protein of interest is deuterated over different lengths of time, after which the reaction is quenched under strong acidic conditions at low temperature (0°C). A classic proteolytic digestion is then performed using pepsin, which cleaves non-specifically but with a high reproducibility and under acidic conditions. The digested peptides are then analyzed by rPLC–MS to assess their level of deuteration. An additional level of IM separation can help to assign the peptides and increase the sequence coverage (Figure 8). HDX-MS can be performed on proteins or assemblies with only a dozen picomoles of material (vs. milligrams for crystallography) and no size limitations in theory (in practice, HDX-MS analysis of assemblies of up to 300 kDa was reported [151,158]). Its other main strength is its ability to monitor any structural changes that occur upon labeling in solution.

A field of application of HDX-MS not mentioned above is the study of mAb HOSs. Circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy, and differential scanning calorimetry (DSC) are the methods most frequently used at present [159,160]. For instance, Guo *et al.* reported similar CD profiles for vcMMAE and the isolated mAb (MMAE), suggesting that the secondary and tertiary structures of cysteine-linked ADCs do not differ significantly from those of the parent mAb [161]. However, a key limitation of these biophysical techniques is that the information obtained is an average of all the protein conformers in solution across the sequence of the protein. The better spatial resolution offered by HDX-MS (at the peptide level at least, and at the amino acid level when combined with electron transfer dissociation) and its capacity to generate dynamic data for solution samples make HDX-MS an attractive alternative to probe the HOSs of mAbs and ADCs.

By comparing the deuterium uptake plots of the conjugated and unconjugated MMAE, Pan *et al.* showed that almost 90% of the primary sequence of vcMMAE has the same HDX kinetics as its parent mAb, the only differences occurring for the two peptides in the Fc domain, which have faster kinetics after conjugation [162]. This suggests that vcMMAE and MMAE have very similar conformations and dynamics in solution. A detailed comparison of the HDX-MS profiles of the ADC and its corresponding TCEP-reduced mAb indicated

that the partial reduction of the IgG1 inter-chain disulfides induced some minor, local structural differences in the conformation and dynamics of the mAb Fc region. However, alkylation of the reduced cysteine residues by the drug molecule does not further impact the local structure of the domains where the differences were observed [163]. The same group also used HDX-MS to demonstrate that site-specific conjugation on engineered cysteine has only minor structural effects on other ADCs (with pyrrolbenzodiazepine or mcMMAF as the conjugated drug), the only difference being a slightly higher deuterium uptake after conjugation in the vicinity of the mutation (<sub>264</sub>VDSV) because of the destabilization of hydrogen bonds between C<sub>239</sub> and V<sub>264</sub> induced by the drug-linker [164].

Since HDX-MS can provide information on the conformations and dynamics of ADCs in solution – information that would be more difficult to obtain *via* other analytical methods – it should become a technique of choice for ADC comparisons, the optimization of conjugation sites, and the choice of the best drug-linkers in the development of therapeutic candidates.

### Aggregation

As aggregation is the main cause of drastic decrease in the therapeutic efficiency of proteins, with potentially deleterious effects on patient health, a crucial characteristic of ADCs is the proportion of aggregates in the final product [124]. Both mAbs and ADCs can become unstable during conjugation [160,165,166] or under environmental stress (from changes in temperature or ionic strength, exposure to light, etc.). However, aggregation is more common for ADCs, because the solubility of the mAb is reduced upon conjugation to hydrophobic drug-linkers [44,161].

For example, Becley *et al.* found increased aggregation of a cysteine-linked ADC at higher temperatures and for the species with a higher DAR [166]. This trend was attributed to the drug conjugation in the hinge region, as revealed by DSC and CD data. The authors note that for the species with a higher drug loading, while conjugation does not measurably alter the secondary structure, it does reduce the thermal stability of the CH2 domain, with high-molecular weight aggregates forming rapidly. Using SEC, Adem *et al.* showed that the aggregation propensity of an auristatin ADC increases with the ionic strength of the solution, especially again for the high drug-load species [167]. The authors then used DSC to correlate the thermal unfolding of the protein with the loading of the drug.

Regarding the photosensitivity of ADCs, although those currently on the market are conjugated with

non-photosensitive drugs, many of those under clinical trial contain photosensitive drugs such as doxorubicin or duocarmycin derivatives. Cockrell *et al.* reported that binding an eosin photosensitizer to trastuzumab promotes the formation of aggregates, with high-mass components being detected by SEC analysis and dynamic light scattering highlighting the formation of large soluble particles and aggregates [168]. Since aggregation occurred for the conjugate but not on the mAb control, this indicates that drug conjugation is specifically responsible for the observed aggregation.

The presence of charge variants can also affect the stability, solubility, pharmacokinetics, and tissue distribution of an ADC. Boylan *et al.* used SEC-MS to determine the DAR and evaluate the proportion of aggregates for different charge variants of a cysteine-linked Fc fragment, the heterogeneity originating from degradation and different drug-linkers and conjugation sites [106]. For a species at a given DAR, several acidic bands are observed in the IEF data, revealing the presence of charge variants. The authors did not find any correlation between particular conjugation sites and charge variants.

In the future, native MS approaches should become more widespread for the analysis of ADC and mAb aggregates, as the online coupling of SEC to native MS makes the analysis of aggregates straightforward. A few groups have already exploited HDX to study mAb aggregation. Zhang *et al.* used HDX-MS to compare the aggregation mechanism and the resulting aggregate structures of a mAb under freeze-thaw (F/T) and thermal stress, showing that bevacizumab aggregation increases with the number of F/T cycles and decreases with the protein concentration [150]. The reduced hydrogen exchange recorded for the three complementarity-determining regions suggests that these residues may form strong intermolecular bonds in the antibody aggregates, while the regions with enhanced HDX rates are most probably partially unfolded. An attempt was made to predict the aggregation patterns using several residue-level modeling methods, but this proved unsuccessful [150].

### Residual drug-linker and related products

As highlighted in Table 1 and already mentioned above as a potential health hazard, the amount of residual drug-linker and related products in ADC drug substance batches is a critical quality attribute. The unconjugated drug or drug-related impurities that remain in the final product are typically the result of incomplete purification downstream of the conjugation reaction. Related forms of the unconjugated drug, such as linker-drug



species or other degradation products, may also be released while the conjugate is in storage. Sensitive methods are therefore required in ADC development and production facilities to monitor and validate the cleaning procedures for cytotoxic products, both for the safety of operators and to demonstrate the absence of cross-contamination in multi-cytotoxic production plants [169].

Wakanhar *et al.* have reviewed ELISA, HPLC-UV/Vis, and capillary electrophoresis laser-induced fluorescence (CE-LIF) methods, which have been used to determine the concentrations of free drug molecules in various ADCs [44]. Chih *et al.* also emphasize the importance of monitoring drug-linker release with an example MS application [170]. This method was successfully used to explain an unexpected release of free drug during the stability testing of ADCs.

One of the major practical challenges of these kinds of analyses is removing the large ADC excess from the sample to allow the very small amounts of multiple small organic molecules to be quantified. This issue was solved by Fleming *et al.* for free DM1 dosages by directly injecting the ADC onto a single rpHPLC column without prior sample preparation [54]. The ADC flows through the column without interacting with the stationary phase, which combines a hydrophobic core with a hydrophilic outer layer. The hydrophilic layer shields the C18-like core from interactions with mAbs and ADCs, while the small organic molecules present in solution readily interact with the hydrophobic portion. Li *et al.* recently reported another elegant method based on two-dimensional LC-MS [171]. The SEC method in the first dimension separated the small-molecule impurities (the free drug, drug-linker, and drug-linker-*N*-Acetylcystein adduct) from the intact ADC, and simultaneously provided information on size variants, namely monomers, dimers, and aggregates. The small molecules giving rise to the peak in the first dimension were isolated and further analyzed by rpHPLC in a second dimension for identification and quantitation by MS.

### Bioanalysis of ADC biotransformation

Bioanalytical methods are rapidly being developed to quantitatively monitor the transformation of ADCs in various *in vitro* or *in vivo* biological matrices such as serum/plasma and tumor tissues [172]. Indeed, a crucial property of conjugates is their stability in biofluids as the release over time of cytotoxic drugs into the bloodstream constitutes a considerable health threat [173]. This drug loss also affects the composition of the ADC, potentially altering the amount of drug delivered to the tumor site and

posing another substantial safety risk because of its off-target toxicity [174]. Tumey *et al.* have recently published an interesting survey of the biotransformation events that have been elucidated in recent years,[175] as well as one of the resulting strategies to optimize the design of next-generation ADCs [115].

Traditionally, pharmacokinetic studies of mAb candidates are performed using ligand-binding assays (LBAs), [172,176,177] a technique also used to study the catabolites [178] and immunogenicity of ADCs [179,180]. The limitations of this approach are well known, however. The specific assay reagents required for LBA are often not available early on in a program; moreover, interference can occur from endogenous proteins, anti-drug antibodies, and soluble target ligands [176,181]. Complementary or alternative data from liquid chromatography coupled to MS-based methods can therefore facilitate the analysis of mAbs in biological matrixes. SRM-MS combined with stable isotope dilution is thus increasingly employed in pharmacokinetic studies of recombinant proteins, notably mAbs, in highly complex matrices (serum, plasma, tumor tissues, and other body fluids) [181–187]. In addition, while LC-SRM has been used for decades to quantify small molecules, tremendous improvements in the technique over the past few years have broadened its scope to include the quantitation of peptides and proteins, including ADC catabolites [188]. Optimized LC-SRM assays offer unequalled sensitivity, high analyte specificity, a high multiplexing capacity and precision, and robust quantitation of analytes down to high ng/ml–low µg/ml concentrations in unfractionated plasma.

Most of the methods described above rely on enzymatic digestion of the mAb to yield at least one peptide with a unique sequence to be quantified as a surrogate for the whole mAb [189]. Multidimensional chromatography or immunoenrichment can be used to separate the mAb of interest from those of the endogenous matrix, thereby increasing the relative concentration of the analyte of interest [190,191]. The quantitative bioanalysis of ADCs in plasma has also been achieved by hybrid immuno-capture LC-MS/MS [192,193].

ADCs are administered as intravenous infusions, and, following *in vivo* processing, multiple analytes are detected in systemic circulation. According to a recent paper from the American Association of Pharmaceutical Scientists ADC Working Group,[194] the most commonly observed analytes are conjugated antibodies (i.e. with a DAR of one or more), total antibodies (conjugated, partially or fully deconjugated), antibody-conjugated drugs (small molecules conjugated to an antibody), and unconjugated drug molecules. Metabolites of the drug molecule, with or without the

linker, may also be detected. As discussed above, most of the ADCs currently under clinical trial exist as a heterogeneous mixture of antibody species with DARs varying from zero to eight. Each of these species has its own distinct *in vivo* pharmacokinetic profile, efficacy, and safety,[46] and specific quantitative analytical workflows have to be developed. Pharmacokinetic profiling highlights the impact of the DAR and other perfectible parameters on the biological properties of ADCs, notably the rate of drug loss (from deconjugation and instability) and the clearance of the species with different DARs. Ultimately though, establishing the relationships between pharmacokinetic exposures and the efficacy and toxicity of the drug is the most helpful guide for the optimization and development of ADCs. This information is also mandatory for the pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling that helps to determine the first-in-human dosage for clinical trials [195–198]. In this context, Deslandes has recently compared the pharmacokinetics of ADCs in Phase I clinical studies,[199] while toxicology issues have been discussed by Saber and Leighton from the FDA [200].

## Final conclusions

The development and optimization of ADCs are increasingly reliant on the analytical and bioanalytical characterization of their main quality attributes, namely the drug-load distribution, proportion of naked antibody, and DAR. These needs have recently been fulfilled by a number of cutting-edge MS methods, with workflows optimized to be used at different levels. Electrophoretic and chromatographic methods, in association or not with MS, are still the main techniques used for the characterization of mAbs and ADC. However, recent developments in native MS mean that this technique, in combination with classical MS approaches, offers the means to complete a multi-level characterization of ADCs and other protein-based therapeutic agents.

At the top level, native MS and native IM-MS complement the data provided by HIC and rpHPLC-MS, the reference methods for the quality control of inter-chain cysteine- and lysine-linked ADCs, respectively.

At the middle level, the LC-MS analysis of reduced or IdeS-digested ADCs provides structural insights into the ADC subunits. The use of IdeS ensures the complete separation of the Fc/2 and Fd fragments. This facilitates the glycoprofiling of the Fc/2 fragment and the detection of any additional conjugation.

At the bottom level, high-quality ADC peptide mapping *via* improved (nano)HPLC-MS is now available in most analytical labs. This can be used to characterize the drug-loaded peptides and to identify positional

isomers at cysteine residues. Because of the hydrophobicity of the drug molecules, organic solvents are added at all stages of the bottom-up approach, including enzymatic digestion, to ensure that the drug-loaded peptides remain in solution.

For studies of aggregation and the HOSs of ADCs, native MS and IM-MS along with HDX-MS are emerging as promising techniques to complement already established methods such as SEC.

Regarding MS-based quantitation, finally, it is noteworthy that SRM-MS now offers the same sensitivity as ELISA assays, but with a superior specificity.

## Expert commentary & five-year view

The state-of-the-art MS methods currently used to characterize mAbs, notably for bottom-level analysis, [201] are readily applicable for the study of ADCs. Capillary electrophoresis coupled to MS is now established as a valuable method, orthogonal to LC, for peptide mapping at the bottom [202–204] and middle [205] levels, and progress toward top-level analysis is forthcoming, including under native conditions. Another emerging technique, CE-UV/MALDI-MS/MS (MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization), has recently been applied to study mAbs [206] and should prove valuable in the future.

Top-down MS and sequencing,[207] middle-down MS with electron transfer dissociation fragmentation, [63] and extended bottom-up proteomics with enzymes [100] are all in constant progress. An alternative middle-down avenue toward a full sequence coverage of IdeS-digested and reduced fragments of IgG may be LC-MALDI with in-source decay [207]. A common objective of all approaches based on MS/MS is to limit both the number of sample preparation steps and the use of enzymes for peptide mapping to avoid the introduction of artifacts into the data (e.g. over-deamidation from the use of trypsin at basic pH).

Two-dimensional LC-MS should facilitate future studies of large molecules such as antibodies and ADCs, the extra resolution enabling the direct identification of different species. The first dimension can be adapted to the problem at hand *via* a plethora of chromatographic techniques developed for the characterization of antibodies, while rpHPLC is frequently used in the second dimension as it desalts the sample before its introduction into the mass spectrometer. Recent applications of this approach reported by Li *et al.*,[171] Stoll *et al.*,[208] and Birdsall *et al.* [98] have involved SEC × rpHPLC-MS, CEX × rpHPLC-MS, and HIC × rpHPLC-MS, respectively. Recent improvements made to chromatographic methods such as SEC,[209] cation exchange,[210] rpHPLC,

#### Key issues

- High-resolution native MS provides accurate mass measurements (within 30 ppm) of intact ADCs, and can also yield the average DAR and drug-load distribution. Native MS is furthermore unique in its ability to simultaneously detect covalent and non-covalent species in a mixture.
- Native IM-MS reveals the drug-loading profile of ADCs, the CCCs of each payload species highlighting slight conformational differences.
- As an orthogonal method, LC-MS following IdeS digestion of ADCs can be used to measure the drug-load distribution on light chain and Fc fragments, as well as the average DAR for both monomeric and multimeric species. In addition, the Fc fragment can be analyzed in the same run, providing a complete glycoprofile and demonstrating the presence or absence of additional conjugation.
- Because the drug molecules are hydrophobic, all enzymatic digestion steps used to prepare the sample for peptide mapping have to be adapted to keep the drug-loaded peptides soluble. When this procedure is properly optimized, however, unambiguous maps are obtained by LC-MS, while the positional isomers of the cytotoxic drug can be determined by rpHPLC after digestion with IdeS and reduction.

[211] and HIC (Fekete S et al, submitted) will no doubt also benefit the application of 2D-LC-MS for the analysis of mAbs, ADCs, and related products.

Imaging MS has successfully been used to reveal the spatial distribution of small drugs and metabolites in biological tissues,[212] and has recently been demonstrated for the study of large biological molecules,[213] notably to monitor mAbs in brain tumors [214]. One assumes therefore that this technique will also be applied for the characterization of ADCs.

Focusing now on the samples under study, while on the one hand, next-generation ADCs should be more homogeneous and thereby easier to characterize, their more complex formulation will pose new analytical questions. Indeed, bi-specific antibody conjugates, [215] antibody-dual-conjugates,[216] treatment combinations (e.g. ADCs + immune check points mAbs) as well as alternatives to IgG formats [217] have already been developed.

Finally, a feasible objective for the analytical methods used to study ADCs during pharmaceutical development is that they should be translated to the bioanalytical field for the analysis of blood and/or tumor tissues. This would allow the quantitation of known and unknown catabolites for large and small molecules and help to optimize the next generation of ADCs.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank all the members of the CIPF and LSMBO that have been involved in the characterization of ADCs: A. Boeuf, M. Excoffier, L. Maurel-Chevillet, C. Klinguer-Hamour, T. Champion, M. Dillenbourg, M. Fumex, S. Tanguy, F. Delalande, H. Diemer, J.-M. Strub, C. Carapito and C. Schaeffer.

They would also like to thank Paul Guerry from Green Grow Scientific for editing of the manuscript.

#### Financial and competing interests disclosure

*This work was supported by the bioclusters of the OptimAbs network (the Lyon Biopole and Alsace Biovalley) and sponsors (DGClS,*

*Oseo, Feder, Région Rhône-Alpes, Région Alsace, Communauté Urbaine de Strasbourg, CNRS, and the Université de Strasbourg).*

*We thank GIS IBI SA and Région Alsace for financial support in purchasing respectively a Synapt G2 HDMS instrument and a Exactive Plus EMR Orbitrap spectrometer.*

*François Debaene is an employee of Sanofi. The other authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.*

#### References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
  - of considerable interest
1. Beck A, Wurch T, Bailly C, et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):345–352.
  2. Reiner Ž. PCSK9 inhibitors – past, present and future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11(10):1517–1521. doi:10.1517/17425255.2015.1075506
  3. Jm R. Antibodies to watch in 2015. *MAbs.* 2015;7(1):1–8.
  4. Kraeber-Bodere F, Bodet-Milin C, Rousseau C, et al. Radioimmunoconjugates for the treatment of cancer. *Semin Oncol.* 2014;41(5):613–622.
  5. Beck A, Haeuw JF, Wurch T, et al. The next generation of antibody-drug conjugates comes of age. *Discov Med.* 2010;10(53):329–339.
  6. Madhumathi J, Devilakshmi S, Sridevi S, et al. Immunotoxin therapy for hematologic malignancies: where are we heading?. *Drug Discov Today.* 2015 Jun 4. pii: S1359-6446(15) 00178-6. doi:10.1016/j.drudis.2015.05.002. [Epub ahead of print].
  7. Danielli R, Patuzzo R, Ruffini PA, et al. Armed antibodies for cancer treatment: a promising tool in a changing era. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(1):113–121.
  8. Mendes D, Alves C, Afonso N, et al. The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer – a systematic review. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):140.
  9. Beck A. Review of Antibody-Drug Conjugates, *Methods in Molecular Biology series: a book edited by Laurent Ducry.* *MAbs.* 2014;6(1):30–33.

10. Klinguer-Hamour C, Strop P, Shah DK, et al. World antibody-drug conjugate summit, October 15–16, 2013, San Francisco, CA. *MAbs*. 2014;6(1):18–29.
11. Beck A, Reichert JM. Antibody-drug conjugates: present and future. *MAbs*. 2014;6(1):15–17.
12. Sochaj AM, Swiderska KW, Otlewski J. Current methods for the synthesis of homogeneous antibody-drug conjugates. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6 Pt 1):775–784.
13. Beck A, Senter P, Chari R. World antibody drug conjugate summit Europe: February 21–23, 2011; Frankfurt, Germany. *MAbs*. 2011;3(4):331–337.
14. Maeda E, Urakami K, Shimura K, et al. Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin. *J Chromatogr*. 2010;1217(45):7164–7171.
15. Labrijn AF, Buijsse AO, Van Den Bremer ET, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol*. 2009;27(8):767–771.
16. Bross PF, Beitz J, Chen G, et al. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001;7(6):1490–1496.
17. Chari RV, Miller ML, Widdison WC. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014;53(15):3796–3827.
18. Ornes S. Antibody-drug conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(34):13695–13695.
19. Flygare JA, Pillow TH, Aristoff P. Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer. *Chem Biol Drug Des*. 2013;81(1):113–121.
20. Beck A, Lambert J, Sun M, et al. Fourth world antibody-drug conjugate summit: February 29–March 1, 2012, Frankfurt, Germany. *MAbs*. 2012;4(6):637–647.
21. Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, et al. Erratum: Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy (vol 21, pg 778, 2003). *Nat Biotechnol*. 2003;21(8):941–941.
22. Senter PD, Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):631–637.
- **Adcetris®: from bench to the FDA approval.**
23. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*. 2008;68(22):9280–9290.
24. Blanc V, Bousseau A, Caron A, et al. SAR3419: an anti-CD19-maytansinoid immunoconjugate for the treatment of B-cell malignancies. *Clin Cancer Res*. 2011;17(20):6448–6458.
25. Wang L, Amphlett G, Blattler WA, et al. Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci*. 2005;14(9):2436–2446.
26. Roberts SA, Andrews PA, Blanset D, et al. Considerations for the nonclinical safety evaluation of antibody drug conjugates for oncology. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013;67(3):382–391.
27. Gordon M, Canakci M, Li L, et al. A field guide to challenges and opportunities in antibody-drug conjugates for chemists. *Bioconjug Chem*. 2015.
28. McDonagh CF, Turcott E, Westendorf L, et al. Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment. *Protein Eng Des Sel*. 2006;19(7):299–307.
29. Hartley JA, Hamaguchi A, Coffills M, et al. SG2285, a novel C2-aryl-substituted pyrrolobenzodiazepine dimer pro-drug that cross-links DNA and exerts highly potent antitumor activity. *Cancer Res*. 2010;70(17):6849–6858.
30. Junutula JR, Raab H, Clark S, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*. 2008;26(8):925–932.
- **Reference paper for site-specific antibody drug conjugates.**
31. Kung Sutherland MS, Walter RB, Jeffrey SC, et al. SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML. *Blood*. 2013;122(8):1455–1463.
32. Dennler P, Chiotellis A, Fischer E, et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconjugate Chem*. 2014;25(3):569–578.
33. Farias SE, Strop P, Delaria K, et al. Mass spectrometric characterization of transglutaminase based site-specific antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem*. 2014;25(2):240–250.
34. Axup JY, Bajjuri KM, Ritland M, et al. Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(40):16101–16106.
35. Smith EL, Giddens JP, Iavarone AT, et al. Chemoenzymatic Fc glycosylation via engineered aldehyde tags. *Bioconjug Chem*. 2014;25(4):788–795.
36. Kolodych S, Koniev O, Baatarkhuu Z, et al. CBTF: new amine-to-thiol coupling reagent for preparation of antibody conjugates with increased plasma stability. *Bioconjug Chem*. 2015;26(2):197–200.
37. Koniev O, Kolodych S, Baatarkhuu Z, et al. MAPN: First-in-class reagent for kinetically resolved thiol-to-thiol conjugation. *Bioconjug Chem*. 2015;26(9):1863–1867. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00440. Epub 2015 Sep 3.
38. Jeffrey SC, Burke PJ, Lyon RP, et al. A potent anti-CD70 antibody-drug conjugate combining a dimeric pyrrolobenzodiazepine drug with site-specific conjugation technology. *Bioconjug Chem*. 2013;24(7):1256–1263.
39. Dorywalska M, Strop P, Melton-Witt JA, et al. Effect of attachment site on stability of cleavable antibody drug conjugates. *Bioconjug Chem*. 2015;26(4):650–659.
40. Strop P, Delaria K, Foletti D, et al. Site-specific conjugation improves therapeutic index of antibody drug conjugates with high drug loading. *Nat Biotechnol*. 2015;33(7):694–696.
- **Site-specific drug conjugation technology that overcomes the previously reported limitations of conventional high-loaded ADCs.**
41. Alley SC, Anderson KE. Analytical and bioanalytical technologies for characterizing antibody-drug conjugates. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(3):406–411.
42. Jm R, Beck A, Aa L, et al. 9th annual European antibody congress, November 11–13, 2013, Geneva, Switzerland. *MAbs*. 2014;6(2):309–326.
43. Hamilton GS. Antibody-drug conjugates for cancer therapy: the technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids. *Biologicals*. 2015.
44. Wakankar A, Chen Y, Gokarn Y, et al. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs*. 2011;3(2):161–172.



- **Reference review for analytical characterization of ADCs.**
- 45. Chen Y. Drug-to-antibody ratio (DAR) by UV/vis spectroscopy. *Methods Mol Biol.* 2013;1045:267–273.
- 46. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res.* 2004;10(20):7063–7070.
- 47. Le LN, Moore JMR, Ouyang J, et al. Profiling antibody drug conjugate positional isomers: a system-of-equations approach. *Anal Chem.* 2012;84(17):7479–7486.
- **Mathematical approach using inputs from capillary electrophoresis and hydrophobic interaction chromatography to determine the positional isomer distribution within a population of ADCs.**
- 48. Ouyang J. Drug-to-antibody ratio (DAR) and drug load distribution by hydrophobic interaction chromatography and reversed phase high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* 2013;1045:275–283.
- 49. Haverick M, Mengisen S, Shameem M, et al. Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: overview and applications. *MAbs.* 2014;6(4):852–858.
- **Reference review for hydrophobic interaction chromatography of mAbs and ADCs.**
- 50. Sun MM, Beam KS, Cerveny CG, et al. Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides. *Bioconjug Chem.* 2005;16(5):1282–1290.
- **Reference research paper for inter-chain cysteine-drug conjugates characterization.**
- 51. King HD, Dubowchik GM, Mastalerz H, et al. Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched peptide linkers: inhibition of aggregation by methoxytriethyleneglycol chains. *J Med Chem.* 2002;45(19):4336–4343.
- 52. Hollander I, Kunz A, Hamann PR. Selection of reaction additives used in the preparation of monomeric antibody-calicheamicin conjugates. *Bioconjug Chem.* 2008;19(1):358–361.
- 53. Quiles S, Raisch KP, Sanford LL, et al. Synthesis and preliminary biological evaluation of high-drug-load paclitaxel-antibody conjugates for tumor-targeted chemotherapy. *J Med Chem.* 2010;53(2):586–594.
- 54. Fleming MS, Zhang W, Lambert JM, et al. A reversed-phase high-performance liquid chromatography method for analysis of monoclonal antibody-maytansinoid immunoconjugates. *Anal Biochem.* 2005;340(2):272–278.
- 55. Beck A, Sanglier-Cianferani S, Van Dorselaer A. Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry. *Anal Chem.* 2012;84(11):4637–4646.
- 56. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem.* 2013;85(2):715–736.
- **Comprehensive review of mAbs analytical and structural characterization.**
- 57. Beck A, Diemer H, Ayoub D, et al. Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. *Trac-Trend Anal Chem.* 2013;48:81–95.
- 58. Beck A, Debaene F, Diemer H, et al. Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies. *J Mass Spectrom.* 2015;50(2):285–297.
- 59. Beck A, Cianferani S. Harnessing the benefits of mass spectrometry for in-depth antibody drug conjugates analytical characterization. *LCGC. Advan Biopharm Analysis.* 2015 [cited 2016 Jan 6]. Available from: <http://www.chromatographyonline.com/harnessing-benefits-mass-spectrometry-depth-antibody-drug-conjugates-analytical-characterization-0>
- 60. Fornelli L, Damoc E, Thomas PM, et al. Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation orbitrap FTMS. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(12):1758–1767.
- 61. Tsybin YO, Fornelli L, Stoermer C, et al. Structural analysis of intact monoclonal antibodies by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83(23):8919–8927.
- 62. Mao Y, Valeja SG, Rouse JC, et al. Top-down structural analysis of an intact monoclonal antibody by electron capture dissociation-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85(9):4239–4246.
- 63. Fornelli L, Ayoub D, Aizikov K, et al. Middle-down analysis of monoclonal antibodies with electron transfer dissociation orbitrap Fourier transform mass spectrometry. *Anal Chem.* 2014;86(6):3005–3012.
- 64. Valliere-Douglass JF, McFee WA, Salas-Solano O. Native intact mass determination of antibodies conjugated with monomethyl Auristatin E and F at interchain cysteine residues. *Anal Chem.* 2012;84(6):2843–2849.
- **First research paper on native MS of ADCs**
- 65. Debaene F, Boeuf A, Wagner-Rousset E, 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. *Anal Chem.* 2014;86(21):10674–10683.
- **First research paper on native ion mobility MS of ADCs.**
- 66. Schmidt C, Robinson CV. Dynamic protein ligand interactions – insights from MS. *FEBS J.* 2014;281(8):1950–1964.
- 67. Pacholarz KJ, Garlish RA, Taylor RJ, et al. Mass spectrometry based tools to investigate protein-ligand interactions for drug discovery. *Chem Soc Rev.* 2012;41(11):4335–4355.
- 68. Rajabi K, Ashcroft AE, Radford SE. Mass spectrometric methods to analyze the structural organization of macromolecular complexes. *Methods.* 2015;89:13–21. doi:10.1016/j.jymeth.2015.03.004. Epub 2015 Mar 14.
- 69. Bereszcak JZ, Havlik M, Weiss VU, et al. Sizing up large protein complexes by electrospray ionisation-based electrophoretic mobility and native mass spectrometry: morphology selective binding of Fabs to hepatitis B virus capsids. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(5):1437–1446.
- 70. Rosati S, Yang Y, Barendregt A, et al. Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2014;9(4):967–976.
- **Detailed protocol for mAbs native MS analytical characterization.**
- 71. Thompson NJ, Hendriks LJ, De Kruijff J, et al. Complex mixtures of antibodies generated from a single production qualitatively and quantitatively evaluated by native orbitrap mass spectrometry. *MAbs.* 2014;6(1):197–203.

72. Zhang H, Cui W, Gross ML. Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 2014;588(2):308–317.
73. Thompson NJ, Rosati S, Heck AJ. Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies. *Methods.* 2014;65(1):11–17.
74. Debaene F, Wagner-Rousset E, Colas O, et al. Time resolved native ion-mobility mass spectrometry to monitor dynamics of IgG4 Fab arm exchange and “bispecific” monoclonal antibody formation. *Anal Chem.* 2013;85(20):9785–9792.
75. Rosati S, Rose RJ, Thompson NJ, et al. Exploring an orbitrap analyzer for the characterization of intact antibodies by native mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(52):12992–12996.
- **Benefits of high resolution native MS on an orbitrap for mAb characterization. Demonstration that baseline separation of different species with small mass differences allows confident qualitative and potentially quantitative characterization of mixtures of antibodies.**
76. Chen J, Yin S, Wu Y, et al. Development of a native nano-electrospray mass spectrometry method for determination of the drug-to-antibody ratio of antibody-drug conjugates. *Anal Chem.* 2013;85(3):1699–1704.
77. Rosati S, Van Den Bremer ET, Schuurman J, 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. *MAbs.* 2013;5(6):917–924.
78. Marcoux J, Champion T, Colas O, et al. Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate. *Protein Sci.* 2015;24(8):1210–1223.
- **First research paper of Kadcyca® native ion mobility MS characterization.**
79. Hengel SM, Sanderson R, Valliere-Douglass J, et al. Measurement of in vivo drug load distribution of cysteine-linked antibody-drug conjugates using micro-scale liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Chem.* 2014;86(7):3420–3425.
- **First demonstration that native MS characterization of ADCs may be used as a potent bioanalysis method.**
80. Smith LM, Kelleher NL. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods.* 2013;10(3):186–187.
81. Tran JC, Zamdborg L, Ahlf DR, et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature.* 2011;480(7376):254–258.
82. Zhang Z, Shah B. Characterization of variable regions of monoclonal antibodies by top-down mass spectrometry. *Anal Chem.* 2007;79(15):5723–5729.
83. Bondarenko PV, Second TP, Zabrouskov V, et al. Mass measurement and top-down HPLC/MS analysis of intact monoclonal antibodies on a hybrid linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009;20(8):1415–1424.
84. Ren D, Pipes GD, Hambly D, et al. Top-down N-terminal sequencing of immunoglobulin subunits with electrospray ionization time of flight mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2009;384(1):42–48.
85. Lermyte F, Sobott F. Electron transfer dissociation provides higher-order structural information of native and partially unfolded protein complexes. *Proteomics.* 2015;15(16):2813–2822.
86. Dyachenko A, Wang G, Belov M, et al. Tandem native mass-spectrometry on antibody-drug conjugates and submillion Da antibody-antigen protein assemblies on an orbitrap EMR equipped with a high-mass quadrupole mass selector. *Anal Chem.* 2015;87(12):6095–6102.
- **Use of native tandem mass spectrometry to localize the drug molecules in intact brentuximab vedotin.**
87. Beck A, Bussat MC, Zorn N, et al. Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;819(2):203–218.
88. Wagner-Rousset E, Janin-Bussat MC, Colas O, et al. Antibody-drug conjugate model fast characterization by LC-MS following IdeS proteolytic digestion. *MAbs.* 2014;6(1):273–285.
- **First research report showing that IdeS may be used for ADCs subunit characterization by MS.**
89. Xu W, Peng Y, Wang F, et al. Method to convert N-terminal glutamine to pyroglutamate for characterization of recombinant monoclonal antibodies. *Anal Biochem.* 2013;436(1):10–12.
90. Basa L. Drug-to-antibody ratio (DAR) and drug load distribution by LC-ESI-MS. *Methods Mol Biol.* 2013;1045:285–293.
91. Lyon RP, Meyer DL, Setter JR, et al. Conjugation of anticancer drugs through endogenous monoclonal antibody cysteine residues. *Method Enzymol.* 2012;502:123–138.
92. Janin-Bussat MC, Dillenbourg M, Corvaia N, et al. Characterization of antibody drug conjugate positional isomers at cysteine residues by peptide mapping LC-MS analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;981-982:9–13.
- **First research report on Adcetris® peptide mapping.**
93. Yan B, Valliere-Douglass J, Brady L, et al. Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1164(1–2):153–161.
94. Gadgil HS, Bondarenko PV, Pipes G, et al. The LC/MS analysis of glycation of IgG molecules in sucrose containing formulations. *J Pharm Sci.* 2007;96(10):2607–2621.
95. Gadgil HS, Bondarenko PV, Pipes GD, et al. Identification of cysteinylated of a free cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis. *Anal Biochem.* 2006;355(2):165–174.
96. Chevreux G, Tilly N, Bihoreau N. Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2011;415(2):212–214.
97. Firth D, Bell L, Squires M, et al. A rapid approach for characterization of thiol-conjugated antibody-drug conjugates and calculation of drug-antibody ratio by liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2015;485:34–42.
98. Birdsall RE, Shion H, Kotch FW, et al. A rapid on-line method for mass spectrometric confirmation of a cysteine conjugated antibody-drug-conjugate structure using multidimensional chromatography. *MAbs.* 2015 in press.

- **First 2D-LC characterization of cysteine ADCs positional isomers.**
- 99. Wiggins B, Liu-Shin L, Yamaguchi H, et al. Characterization of cysteine-linked conjugation profiles of immunoglobulin g1 and immunoglobulin g2 antibody-drug conjugates. *J Pharm Sci.* 2015;104(4):1362–1372.
- 100. Srzentic K, Fornelli L, Laskay UA, et al. Advantages of extended bottom-up proteomics using Sap9 for analysis of monoclonal antibodies. *Anal Chem.* 2014;86(19):9945–9953.
- 101. Lazar AC, Wang LT, Blattler WA, et al. Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 2005;19(13):1806–1814.
- **Key paper for the MS characterization of antibody maytansinoid conjugates.**
- 102. Lin J, Lazar AC. Determination of charge heterogeneity and level of unconjugated antibody by imaged cIEF. *Methods Mol Biol.* 2013;1045:295–302.
- 103. Kim MT, Chen Y, Marhoul J, et al. Statistical modeling of the drug load distribution on trastuzumab emtansine (Kadcyla), a lysine-linked antibody drug conjugate. *Bioconjug Chem.* 2014;25(7):1223–1232.
- 104. Lu SX, Takach EJ, Solomon M, et al. Mass spectral analyses of labile DOTA-NHS and heterogeneity determination of DOTA or DM1 conjugated anti-PSMA antibody for prostate cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2005;94(4):788–797.
- 105. Wang L, Amphlett G, Lambert JM, et al. Structural characterization of a recombinant monoclonal antibody by electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Pharm Res.* 2005;22(8):1338–1349.
- 106. Boylan NJ, Zhou W, Proos RJ, et al. Conjugation site heterogeneity causes variable electrostatic properties in Fc conjugates. *Bioconjugate Chem.* 2013;24(6):1008–1016.
- 107. Huang RY, Deyanova EG, Passmore D, et al. Utility of ion mobility mass spectrometry for drug-to-antibody ratio measurements in antibody-drug conjugates. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2015;26(10):1791–1794. doi:10.1007/s13361-015-1203.
- 108. Gautier V, Boumeester AJ, Lössl P, et al. Lysine conjugation properties in human IgGs studied by integrating high-resolution native mass spectrometry and bottom-up proteomics. *Proteomics.* 2015;15(16):2756–2765.
- 109. Panowski S, Bhakta S, Raab H, et al. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs.* 2014;6(1):34–45.
- 110. Agarwal P, Bertozzi CR. Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjug Chem.* 2015;26(2):176–192.
- 111. Dennler P, Fischer E, Schibli R. Antibody conjugates: from heterogeneous populations to defined reagents. *Antibodies.* 2015;4:197–224.
- 112. Shen BQ, Xu K, Liu L, et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol.* 2012;30(2):184–189.
- **Key paper to understand retro-Michael deconjugation of ADCs in vivo.**
- 113. Alley SC, Benjamin DR, Jeffrey SC, et al. Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* 2008;19(3):759–765.
- 114. Lyon RP, Setter JR, Bovee TD, et al. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol.* 2014;32(10):1059–1062.
- **Technology that improved ADC antitumor activity and reduced neutropenia.**
- 115. Tumey LN, Charati M, He T, et al. Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy. *Bioconjug Chem.* 2014;25(10):1871–1880.
- 116. Fontaine SD, Reid R, Robinson L, et al. Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates. *Bioconjug Chem.* 2015;26(1):145–152.
- 117. Okeley NM, Toki BE, Zhang XQ, et al. Metabolic engineering of monoclonal antibody carbohydrates for antibody-drug conjugation. *Bioconjugate Chem.* 2013;24(10):1650–1655.
- 118. Van Geel R, Wijdeven MA, Heesbeen R, et al. Chemoenzymatic conjugation of toxic payloads to the globally conserved N-glycan of native mAbs provides homogeneous and highly efficacious antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem.* 2015;26(11):2233–2242. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00224.
- 119. Qasba PK. Glycans of antibodies as a specific site for drug conjugation using glycosyltransferases. *Bioconjug Chem.* 2015;26(11):2170–2175. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00173. Epub 2015 Jun 23.
- 120. Janin-Bussat MC, Tonini L, Huillet C, et al. Cetuximab Fab and Fc N-glycan fast characterization using IdeS digestion and liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2013;988:93–113.
- 121. Hallam TJ, Smider VV. Unnatural amino acids in novel antibody conjugates. *Future Med Chem.* 2014;6(11):1309–1324.
- 122. Perez HL, Cardarelli PM, Deshpande S, et al. Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discov Today.* 2014;19(7):869–881.
- 123. Joubert MK, Hokom M, Eakin C, et al. Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses. *J Biol Chem.* 2012;287(30):25266–25279.
- 124. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 2006;8(3):E501–507.
- 125. Joubert MK, Luo Q, Nashed-Samuel Y, et al. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *J Biol Chem.* 2011;286(28):25118–25133.
- 126. Van Beers MM, Bardor M. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol J.* 2012;7(12):1473–1484.
- 127. Valliere-Douglass JF, Lewis P, Salas-Solano O, et al. Solid-state mAbs and ADCs subjected to heat-stress stability conditions can be covalently modified with buffer and excipient molecules. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):652–665.
- **Demonstration that freeze-dried mAbs and ADCs can be covalently modified with buffer and excipient molecules on the side chains of Glu, Asp, Thr and Ser amino acids when subjected to temperature stress.**



128. Poppe L, Jordan JB, Rogers G, et al. On the analytical superiority of 1D NMR for fingerprinting the higher order structure of protein therapeutics compared to multidimensional NMR methods. *Anal Chem.* 2015;87(11):5539–5545.
129. Rayner LE, Hui GK, Gor J, et al. The solution structures of two human IgG1 antibodies show conformational stability and accommodate their C1q and FcγR ligands. *J Biol Chem.* 2015;290(13):8420–8438.
130. Kukrer B, Filipe V, Van Duijn E, et al. Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography. *Pharm Res.* 2010;27(10):2197–2204.
131. Atmanene C, Laux A, Glattard E, et al. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit.* 2009;15(7):BR178–187.
132. Haberger M, Heidenreich AK, Schlothauer T, et al. Functional assessment of antibody oxidation by native mass spectrometry. *MAbs.* 2015;7(5):891–900. doi:10.1080/19420862.2015.1052199. Epub 2015 May 22.
133. Hall Z, Politis A, Bush MF, et al. Charge-state dependent compaction and dissociation of protein complexes: insights from ion mobility and molecular dynamics. *J Am Chem Soc.* 2012;134(7):3429–3438.
134. Scarff CA, Patel VJ, Thalassinou K, et al. Probing hemoglobin structure by means of traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009;20(4):625–631.
135. Bowers MT, Kemper PR, Vonhelden G, et al. Gas-phase ion chromatography – transition-metal state selection and carbon cluster formation. *Science.* 1993;260(5113):1446–1451.
136. Ruotolo BT, Giles K, Campuzano I, et al. Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science.* 2005;310(5754):1658–1661.
137. Bagal D, Valliere-Douglass JF, Balland A, et al. Resolving disulfide structural isoforms of IgG2 monoclonal antibodies by ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82(16):6751–6755.
- **First research report showing that IM-MS is able to resolve human IgG2 hinge-cysteine linked isoforms.**
138. Pacholarz KJ, Porrini M, Garlish RA, et al. Dynamics of intact immunoglobulin G explored by drift-tube ion-mobility mass spectrometry and molecular modeling. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(30):7765–7769.
139. Jones LM, Zhang H, Cui W, et al. Complementary MS methods assist conformational characterization of antibodies with altered S-S bonding networks. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013;24(6):835–845.
140. Pritchard C, Groves KJ, Biesenbruch S, et al. Quantification of human growth hormone in serum with a labeled protein as an internal standard: essential considerations. *Anal Chem.* 2014;86(13):6525–6532.
141. Houde D, Berkowitz SA, Engen JR. The utility of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry in biopharmaceutical comparability studies. *J Pharm Sci.* 2011;100(6):2071–2086.
- **Reference research report for antibody comparability studies using HDX-MS.**
142. Kaltashov IA, Bobst CE, Abzalimov RR, et al. Conformation and dynamics of biopharmaceuticals: transition of mass spectrometry-based tools from academe to industry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21(3):323–337.
143. Guan X, Noble KA, Tao Y, et al. Epitope mapping of 7S cashew antigen in complex with antibody by solution-phase H/D exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2015;50(6):812–819.
144. Faleri A, Santini L, Brier S, et al. Two cross-reactive monoclonal antibodies recognize overlapping epitopes on *Neisseria meningitidis* factor H binding protein but have different functional properties. *FASEB J.* 2014;28(4):1644–1653.
145. Sevy AM, Healey JF, Deng W, et al. Epitope mapping of inhibitory antibodies targeting the C2 domain of coagulation factor VIII by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. *J Thromb Haemost.* 2013;11(12):2128–2136.
146. Obungu VH, Gelfanova V, Huang L. Epitope mapping of antibodies by mass spectroscopy: a case study. *Methods Mol Biol.* 2013;988:291–302.
147. Pandit D, Tuske SJ, Coales SJ, et al. Mapping of discontinuous conformational epitopes by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and computational docking. *J Mol Recognit.* 2012;25(3):114–124.
148. Jensen PF, Larraillet V, Schlothauer T, et al. Investigating the interaction between the neonatal Fc receptor and monoclonal antibody variants by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(1):148–161.
149. Zhang A, Qi W, Singh SK, et al. A new approach to explore the impact of freeze-thaw cycling on protein structure: hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HX-MS). *Pharm Res.* 2011;28(5):1179–1193.
150. Zhang A, Singh SK, Shirts MR, et al. Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange. *Pharm Res.* 2012;29(1):236–250.
151. Iacob RE, Bou-Assaf GM, Makowski L, et al. Investigating monoclonal antibody aggregation using a combination of H/DX-MS and other biophysical measurements. *J Pharm Sci.* 2013;102(12):4315–4329.
- **Reference research report for antibody structural changes induced by aggregation using HDX-MS.**
152. Majumdar R, Middaugh CR, Weis DD, et al. Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry as an emerging analytical tool for stabilization and formulation development of therapeutic monoclonal antibodies. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):327–345.
153. Arora J, Hickey JM, Majumdar R, et al. Hydrogen exchange mass spectrometry reveals protein interfaces and distant dynamic coupling effects during the reversible self-association of an IgG1 monoclonal antibody. *MAbs.* 2015;7(3):525–539.
154. Houde D, Peng Y, Berkowitz SA, et al. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(8):1716–1728.
155. Burkitt W, Domann P, O'Connor G. Conformational changes in oxidatively stressed monoclonal antibodies studied by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Sci.* 2010;19(4):826–835.

156. Zhang A, Hu P, MacGregor P, et al. Understanding the conformational impact of chemical modifications on monoclonal antibodies with diverse sequence variation using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and structural modeling. *Anal Chem.* 2014;86(7):3468–3475.
157. Tsuchida D, Yamazaki K, Akashi S. Characterization of stress-exposed granulocyte colony stimulating factor using ELISA and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2014;25(10):1747–1754.
158. Engen JR, Wales TE. Analytical aspects of hydrogen exchange mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2015;8:127–148.
- **Reference review for HDX-MS.**
159. Ionescu RM, Vlasak J, Price C, et al. Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Sci.* 2008;97(4):1414–1426.
160. Wakankar AA, Feeney MB, Rivera J, et al. Physicochemical stability of the antibody-drug conjugate Trastuzumab-DM1: changes due to modification and conjugation processes. *Bioconjug Chem.* 2010;21(9):1588–1595.
161. Guo J, Kumar S, Prashad A, et al. Assessment of physical stability of an antibody drug conjugate by higher order structure analysis: impact of thiol-maleimide chemistry. *Pharm Res.* 2014;31(7):1710–1723.
162. Pan LY, Salas-Solano O, Valliere-Douglass JF. Conformation and dynamics of interchain cysteine-linked antibody-drug conjugates as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem.* 2014;86(5):2657–2664.
- **First research report of the use of HDX-MS for ADC HOS characterization.**
163. Valliere-Douglass JF, Hengel SM, Pan LY. Approaches to interchain cysteine-linked ADC characterization by mass spectrometry. *Mol Pharm.* 2015;12(6):1774–1783.
- **Key review for interchain cysteine-linked ADC characterization.**
164. Pan J, Zhang S, Chou A, et al. Fast comparative structural characterization of intact therapeutic antibodies using hydrogen-deuterium exchange and electron transfer dissociation. *Anal Chem.* 2015;87(12):5884–5890.
165. Acchione M, Kwon H, Jochheim CM, et al. Impact of linker and conjugation chemistry on antigen binding, Fc receptor binding and thermal stability of model antibody-drug conjugates. *MAbs.* 2012;4(3):362–372.
166. Beckley NS, Lazzareschi KP, Chih HW, et al. Investigation into temperature-induced aggregation of an antibody drug conjugate. *Bioconjug Chem.* 2013;24(10):1674–1683.
167. Adem YT, Schwarz KA, Duenas E, et al. Auristatin antibody drug conjugate physical instability and the role of drug payload. *Bioconjugate Chem.* 2014;25(4):656–664.
168. Cockrell GM, Wolfe MS, Wolfe JL, et al. Photoinduced aggregation of a model antibody-drug conjugate. *Mol Pharm.* 2015;12(6):1784–1797.
169. Singh SK, Luisi DL, Pak RH. Antibody-drug conjugates: design, formulation and physicochemical stability. *Pharm Res.* 2015.
170. Chih HW, Gikanga B, Yang Y, et al. Identification of amino acid residues responsible for the release of free drug from an antibody-drug conjugate utilizing lysine-succinimidyl ester chemistry. *J Pharm Sci-U.S.* 2011;100(7):2518–2525.
171. Li Y, Gu C, Gruenhagen J, et al. A size exclusion-reversed phase two dimensional-liquid chromatography methodology for stability and small molecule related species in antibody drug conjugates. *J Chromatogr A.* 2015;1393:81–88.
172. Gorovits B. Bioanalysis of antibody-drug conjugates. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1559–1560.
- **Reference review for ADCs bioanalysis.**
173. Zhou Q, Kim J. Advances in the development of site-specific antibody-drug conjugation. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(7):828–836.
174. Rao C, Rangan VS, Deshpande S. Challenges in antibody-drug conjugate discovery: a bioconjugation and analytical perspective. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1561–1564.
175. Tumej LN, Rago B, Han X. In vivo biotransformations of antibody-drug conjugates. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1649–1664.
176. Kumar S, King LE, Clark TH, et al. Antibody-drug conjugates nonclinical support: from early to late nonclinical bioanalysis using ligand-binding assays. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1605–1617.
177. Kelley M, Stevenson L, Golob M, et al. Workshop report: AAPS workshop on method development, validation, and troubleshooting of ligand-binding assays in the regulated environment. *Aaps J.* 2015;17(4):1019–1024.
178. Salomon PL, Singh R. Sensitive ELISA method for the measurement of catabolites of antibody-drug conjugates (ADCs) in target cancer cells. *Mol Pharm.* 2015;12(6):1752–1761.
179. Carrasco-Triguero M. Insights on the immunogenicity of antibody-drug conjugates. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1565–1568.
180. Carrasco-Triguero M, Yi JH, Dere R, et al. Immunogenicity assays for antibody-drug conjugates: case study with ado-trastuzumab emtansine. *Bioanalysis.* 2013;5(9):1007–1023.
181. Ezan E, Bitsch F. Critical comparison of MS and immunoassays for the bioanalysis of therapeutic antibodies. *Bioanalysis.* 2009;1(8):1375–1388.
- **Reference review for the complementarity of MS and ILA method of the bioanalysis of mAbs.**
182. Dubois M, Becher F, Herbet A, et al. Immuno-mass spectrometry assay of EPI-HNE4, a recombinant protein inhibitor of human elastase. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(3):352–358.
183. Hagman C, Ricke D, Ewert S, et al. Absolute quantification of monoclonal antibodies in biofluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80(4):1290–1296.
184. Heudi O, Barteau S, Zimmer D, et al. Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80(11):4200–4207.
- **Reference research paper for quantification by LC-MS/MS mAbs in complex biological matrixes.**
185. Lesur A, Varesio E, Hopfgartner G. Accelerated tryptic digestion for the analysis of biopharmaceutical monoclonal antibodies in plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2010;1217(1):57–64.

186. Mesmin C, Fenaille F, Ezan E, et al. MS-based approaches for studying the pharmacokinetics of protein drugs. *Bioanalysis*. 2011;3(5):477–480.
187. Becher F, Dubois M, Fenaille F, et al. Mass spectrometry protocol for the absolute quantification of a monoclonal antibody in serum with immunopurification. *Methods Mol Biol*. 2013;988:345–352.
188. Saad OM, Shen BQ, Xu K, et al. Bioanalytical approaches for characterizing catabolism of antibody-drug conjugates. *Bioanalysis*. 2015;7(13):1583–1604.
- **Key review for ADC catabolism.**
189. Lebert D, Picard G, Beau-Larvor C, et al. Absolute and multiplex quantification of antibodies in serum using PSAQ (TM) standards and LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2015;7(10):1237–1251.
- **Demonstration of the usefulness of PSAQ for multiplex quantification of mAbs.**
190. Ezan E, Dubois M, Becher F. Bioanalysis of recombinant proteins and antibodies by mass spectrometry. *Analyst*. 2009;134(5):825–834.
191. Liu H, Manuilov AV, Chumsae C, et al. Quantitation of a recombinant monoclonal antibody in monkey serum by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2011;414(1):147–153.
192. Xu K, Liu L, Saad OM, et al. Characterization of intact antibody-drug conjugates from plasma/serum in vivo by affinity capture capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2011;412(1):56–66.
193. Liu A, Pasquali M. Acidified acetonitrile and methanol extractions for quantitative analysis of acylcarnitines in plasma by stable isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;827(2):193–198.
194. Gorovits B, Alley SC, Bilic S, et al. Bioanalysis of antibody-drug conjugates: American Association of Pharmaceutical Scientists Antibody-Drug Conjugate Working Group position paper. *Bioanalysis*. 2013;5(9):997–1006.
195. Lu D, Jin JY, Girish S, et al. Semi-mechanistic multiple-analyte pharmacokinetic model for an antibody-drug-conjugate in cynomolgus monkeys. *Pharm Res*. 2015;32(6):1907–1919.
196. Xu K, Liu L, Dere R, et al. Characterization of the drug-to-antibody ratio distribution for antibody-drug conjugates in plasma/serum. *Bioanalysis*. 2013;5(9):1057–1071.
- **Key paper to understand ADC deconjugation in vivo.**
197. Khot A, Sharma S, Shah DK. Integration of bioanalytical measurements using PK-PD modeling and simulation: implications for antibody-drug conjugate development. *Bioanalysis*. 2015;7(13):1633–1648.
198. Wang H, Rangan VS, Sung MC, et al. Pharmacokinetic characterization of BMS-936561, an anti-CD70 antibody-drug conjugate, in preclinical animal species and prediction of its pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos*. 2015 Apr 13. doi:10.1002/bdd.1953.
199. Deslandes A. Comparative clinical pharmacokinetics of antibody-drug conjugates in first-in-human Phase 1 studies. *MAbs*. 2014;6(4):859–870.
- **Reference translational review for ADCs moving from the preclinic to FIH.**
200. Saber H, Leighton JK. An FDA oncology analysis of antibody-drug conjugates. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;71(3):444–452.
- **Reference survey of ADCs toxicity.**
201. Ayoub D, Bertaccini D, Diemer H, et al. Characterization of the N-terminal heterogeneities of monoclonal antibodies using in-gel charge derivatization of alpha-amines and LC-MS/MS. *Anal Chem*. 2015;87(7):3784–3790.
202. Gahoual R, Burr A, Busnel JM, et al. Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *MAbs*. 2013;5(3):479–490.
- **Reference research paper for the characterization of mAbs by CESI-MS.**
203. Gahoual R, Biacchi M, Chicher J, et al. Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *MAbs*. 2014;6(6):1464–1473.
204. Gahoual R, Busnel JM, Beck A, et al. Full antibody primary structure and microvariant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2014;86(18):9074–9081.
205. Biacchi M, Gahoual R, Said N, et al. Glycoform separation and characterization of cetuximab variants by middle-up off-line capillary zone electrophoresis-UV/electrospray ionization-MS. *Anal Chem*. 2015;87(12):6240–6250.
206. Biacchi M, Bhajun R, Said N, et al. Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface. *Electrophoresis*. 2014;35(20):2986–2995.
207. Ayoub D, Jabs W, Resemann A, et al. Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques. *MAbs*. 2013;5(5):699–710.
208. Stoll DR, Harnes DC, Danforth J, et al. Direct identification of rituximab main isoforms and subunit analysis by online selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*. 2015;87(16):8307–8315.
209. Fekete S, Beck A, Veuthey JL, et al. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:161–173.
- **Comprehensive review of the use of SEC for mAbs characterization.**
210. Fekete S, Beck A, Fekete J, et al. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;102:33–44.
211. Fekete S, Beck A, Wagner E, et al. Adsorption and recovery issues of recombinant monoclonal antibodies in reversed-phase liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2015;38(1):1–8.
212. Zhao YS, Li C. Mass spectrometry imaging: applications in drug distribution studies. *Curr Drug Metab*. 2015;16(9):807–815.
213. Neubert P, Walch A. Current frontiers in clinical research application of MALDI imaging mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*. 2013;10(3):259–273.
214. Ait-Belkacem R, Berenguer C, Villard C, et al. Monitoring therapeutic monoclonal antibodies in brain tumor. *MAbs*. 2014;6(6):1385–1393.
- **First demonstration that MALDI imaging can be applied to mAbs.**

215. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today*. 2015;20(7):838–847.
216. Li X, Patterson JT, Sarkar M, et al. Site-specific dual antibody conjugation via engineered cysteine and selenocysteine residues. *Bioconjug Chem*. 2015;26(11):2243–2248. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00244. Epub 2015 Jul 24.
217. Merten H, Brandl F, Pluckthun A, et al. Antibody-drug conjugates for tumor targeting—novel conjugation chemistries and the promise of non-IgG binding proteins. *Bioconjug Chem*. 2015;26(11):2176–2185. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00260. Epub 2015 Jul 8.



## **Publication**

**Insights from native mass spectrometry and ion mobility for antibody and antibody-based product characterization.**

Terral G, Beck A, Cianferani S.

*Journal of Chromatography B, juste acceptée.*







Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)



# Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization

Guillaume Terral<sup>a,b</sup>, Alain Beck<sup>c</sup>, Sarah Cianféroni<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

<sup>b</sup> IPHC, CNRS, UMR7178, 67087 Strasbourg, France

<sup>c</sup> Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF), 5 Av. Napoléon III, BP 60497, 74164 Saint-Julien-en-Genevois, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 February 2016

Received in revised form 28 March 2016

Accepted 30 March 2016

Available online xxx

### Keywords:

Native mass spectrometry

Ion mobility mass spectrometry

Monoclonal antibody

Antibody-drug-conjugate

Bispecific antibody

Antibody/antigen complex

## ABSTRACT

Over the past 15 years, monoclonal antibodies (mAbs) have emerged as the most successful class of therapeutics. Their specific structural and functional properties make them highly effective treatments for various diseases. Most therapeutic mAbs are based on chimeric, humanized or human G immunoglobulins (IgGs) selected from three isotypes (1, 2 and 4). IgGs are large and highly complex multimeric glycoproteins. They are constituted of a mixture of isoforms including macro and micro-variants that must be extensively characterized prior to their investigation as a drug candidate in clinical trials. The IgG backbone is also used to design more potent but also more complex biopharmaceuticals such as antibody-drug conjugates, bispecific antibodies, Fc-fusion proteins, and antibody mixtures to name a few. Mass spectrometric approaches in combination with electrophoretic and chromatographic separation methods play a central role in the analytical and structural multi-level (top, middle and bottom) characterization of these compounds. Importantly, techniques allowing the characterization of intact mAbs and related products under non-denaturing conditions are attracting increasing interest. Here, we review the current state of the art in native mass spectrometry and ion mobility methods for the characterization of mAbs and mAb-based products.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The number of protein biopharmaceuticals approved for the treatment of diseases ranging from cancer, cardiovascular diseases, diabetes, infection, inflammatory, and autoimmune disorders continues to increase [1]. Of these drugs, monoclonal antibodies (mAbs) and their related compounds make up the largest class in human therapeutics [2,3]. The success of mAbs in this context stems notably from their high specificity and affinity (in the nM to pM range), their long circulating half-lives (up to 20 days), their ability to induce immune cell effector response, and their structural versatility. More than 70 mAb-based pharmaceuticals have already been approved in different forms, such as antibody-drug-conjugates (ADCs), radio-immunoconjugates, bispecific mAbs (bsAbs), antibody mixtures, scFv fragments, Fab

fragments and Fc-fusion proteins or peptides. More than 50 others are under phase III clinical trials [4], with an expected approval rate of ~20%.

Although the engineered formats differ, these protein therapeutics mostly share a common immunoglobulin G (IgG) scaffold. Canonical mAbs are 150 kDa tetrameric glycoproteins, the covalent assembly of two light chains and two heavy chains. Depending on the isotype, the number of disulfide bridges in the hinge region that links the two heavy chains varies from two for IgG1 and IgG4 to four for IgG2, the other 12 disulfide bridges being intramolecular [5].

In many cases however, canonical mAbs show a limited efficacy or face resistance, so several families of either armed antibodies (such as ADCs) or bsAbs have been developed to overcome these limitations. ADCs are tripartite molecules consisting of a mAb onto which highly cytotoxic small molecules are conjugated by cleavable or non-cleavable linkers. The specificity of the mAb helps to deliver the highly cytotoxic drug to the targeted cancer cells. To date, two ADCs have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and European Medicine Agency (EMA) for use in humans [6]. Brentuximab vedotin (marketed as Adcetris® by

\* Corresponding author at: BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.  
E-mail address: [sarah.cianferani@unistra.fr](mailto:sarah.cianferani@unistra.fr) (S. Cianféroni).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.044>

1570-0232/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Seattle Genetics/Takeda) is indicated for the treatment of hematological malignancies (Hodgkin's lymphoma and systemic anaplastic large-cell lymphoma) [7], while trastuzumab emtansine (T-DM1, marketed as Kadcyla<sup>®</sup> by Genentech/Roche) has been licensed as a single agent for the treatment of patients with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive metastatic breast cancer who previously received trastuzumab and a taxane, separately or in combination. The indications are that patients should have either received prior therapy for metastatic disease or developed disease recurrence during or within six months of completing adjuvant therapy [8]. In addition, gemtuzumab ozogamicin has been approved in Japan [9].

The other class of compounds being developed to overcome the inefficiency of single-target mAbs in immunotherapy, bsAbs, are designed to target two different antigens [10,11]. The advantages of bsAbs are as follows [12,13]: (i) they can redirect specific immune cells to the tumor cells to kill more of the latter; (ii) they allow two different mediators/pathways that exert unique or overlapping functions in pathogenesis to be blocked simultaneously; and (iii) their ability to interact with two different cell-surface antigens (instead of one) may confer an increased binding specificity. Hampered for a long time by production issues, the availability of bsAbs has improved through the development of new, more stable, and easier to produce formats. More than 30 bsAbs are currently in clinical development, with two of these catumaxomab (anti-EpCAM × anti-CD3, Removab<sup>®</sup>, Fresenius Biotech, Trion Pharma,) [14] and blinatumomab (anti-CD19 × anti-CD3, Blincyto<sup>®</sup>, Amgen) [15] having already been approved for marketing.

Last but not least, with the first licensed mAbs coming off-patent, new generic versions of mAbs called biosimilars should spread across the market [16]. Obtaining sufficiently close copies of 150 kDa, highly heterogeneous (glycoforms, deamidations, disulfide bridge pairing, etc.), multimeric glycoproteins is very challenging. This is why regulatory agencies are strict in evaluating biosimilars based on their level of similarity with the originator [17]. To date nonetheless, more than 20 biosimilars have been approved in Europe, including two mAb biosimilars of infliximab (anti-TNF $\alpha$ , Remsima<sup>®</sup>, Celltrion and Inflectra, Hospira) which have recently received marketing authorization [18] as well etanercept as an Fc-fusion protein (anti-TNF $\alpha$ , Benepali<sup>®</sup>, Biogen).

The analytical characterization of mAbs, ADCs, bsAbs and related products is challenging and requires the use of a plethora of orthogonal techniques, typically chromatography, electrophoresis and mass spectrometry. Several recent papers have extensively reviewed the advantages, drawbacks and complementarity of such approaches [16,19–22]. The analytical characterization of mAbs (ADCs, bsAbs) usually follows a multi-level workflow, where biopharmaceuticals are studied at the intact protein (top) level, after enzymatic digestion into smaller mAb subdomains (the middle level), or after proteolytic digestion using a combination of enzymes to generate peptides (the bottom level). The middle and bottom levels require preliminary sample treatment in order to reduce the micro-heterogeneity of the mAbs, which can affect the quality of the final product (increased deamidation, oxidation, generation of aggregates, etc.). Top level methods that operate on intact mAbs are thus of utmost interest, as they require less sample handling, but are still in their infancy. We will focus here on native mass spectrometry (MS) and ion mobility (IM-MS), as emerging techniques for the analysis of intact mAbs.

## 2. Native mass spectrometry

Native mass spectrometry has been developed since the early 90s [23,24] and involves analyzing non-covalent complexes directly in the gas phase of the mass spectrometer. Initially applied

to the study of protein/ligand systems [25–30], native MS is now widely used to investigate protein/protein [31–33] and protein/nucleic acid complexes [34,35] ranging in size from a few hundreds to thousands of kDa [36–38]. Native MS is of particular interest to the biopharmaceutical industry for the characterization of recombinant proteins and for the analysis of monoclonal antibodies [39].

### 2.1. Native MS workflow for mAb analysis

The native MS workflow for the analysis of mAbs and related products (ADCs, bsAbs, etc.) is quite straightforward and rapid (Fig. 1) [40,41]. The observation of intact mAbs in native MS is the most direct approach available to characterize an antibody. The only specific requirement for native MS analysis is buffer exchange (also called the “desalting” step), whereby the storage mAb buffer is exchanged against volatile ammonium salts (mostly ammonium acetate) amenable to electrospray analysis under native conditions [42]. Prior to the desalting step, deglycosylation (using either PNGase-F or IgGZero) can be performed in order to reduce mAb heterogeneity, a step that is particularly valuable for the characterization of ADCs. The mAb sample is next infused into an electrospray ionization (ESI) mass spectrometer for native MS analysis. Infusion can be achieved either through direct syringe pump injection, through a chip-based automated device or, as is becoming increasingly popular, by coupling size exclusion chromatography (SEC) to native MS.

Even though mAbs are built around covalent interactions between light and heavy chains, the charge state reduction and subsequent ease of data interpretation afforded by native conditions make native MS preferable over classical denaturing MS (or LC–MS). Indeed, ESI under native conditions generates mass spectra with a narrower charge state distribution shifted towards higher  $m/z$  values (Fig. 2a and b). This charge state reduction intrinsically reduces peak overlap in the high  $m/z$  range. While native MS has historically been performed on time-of-flight (TOF) and quadrupole (Q)-TOF instruments, one can now conduct these experiments on higher-resolution Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) [43] and Orbitrap spectrometers [44,45], which also yield higher mass accuracies.

### 2.2. Bispecific mAbs and ADCs

Native MS is even more beneficial for the analysis of bsAbs and ADCs, which potentially comprise noncovalent interactions. For example, the bsAb formed by Fab-arm exchange of two IgG4 antibodies consists of mixtures of covalent and noncovalent species, a result of flexibility in the hinge region [46]. Instead of the usual disulfide bonds connecting two heavy chains (covalent bonds maintain heavy chains), intra-heavy chain disulfide bonds may form, resulting in bsAbs maintained by noncovalent interactions between heavy chains. These noncovalent bonds can break under the harsh solvent conditions used for LC–MS analysis, leading to the detection of half-mAb moieties (Fig. 2c). In contrast, native MS analysis, during which noncovalent interactions are preserved, allows the detection of a unique and homogeneous population of the intact bsAb (Fig. 2d). Native MS also appears to be able to detect intact bsAbs resulting from IgG4 recombination [47,48].

Similarly, native MS is mandatory for the characterization of cysteine-linked ADCs, which consist of a broad population of noncovalent assemblies. Native MS can provide accurate estimates of the three main quality attributes of ADCs, namely, the drug load profile and distribution, the average drug-to-antibody ratio (DAR), and the proportion of unconjugated mAbs [49]. The analysis of cysteine-ADCs by native MS was pioneered by Valliere-Douglass et al., first in vitro [50] and more recently in vivo for DAR mea-

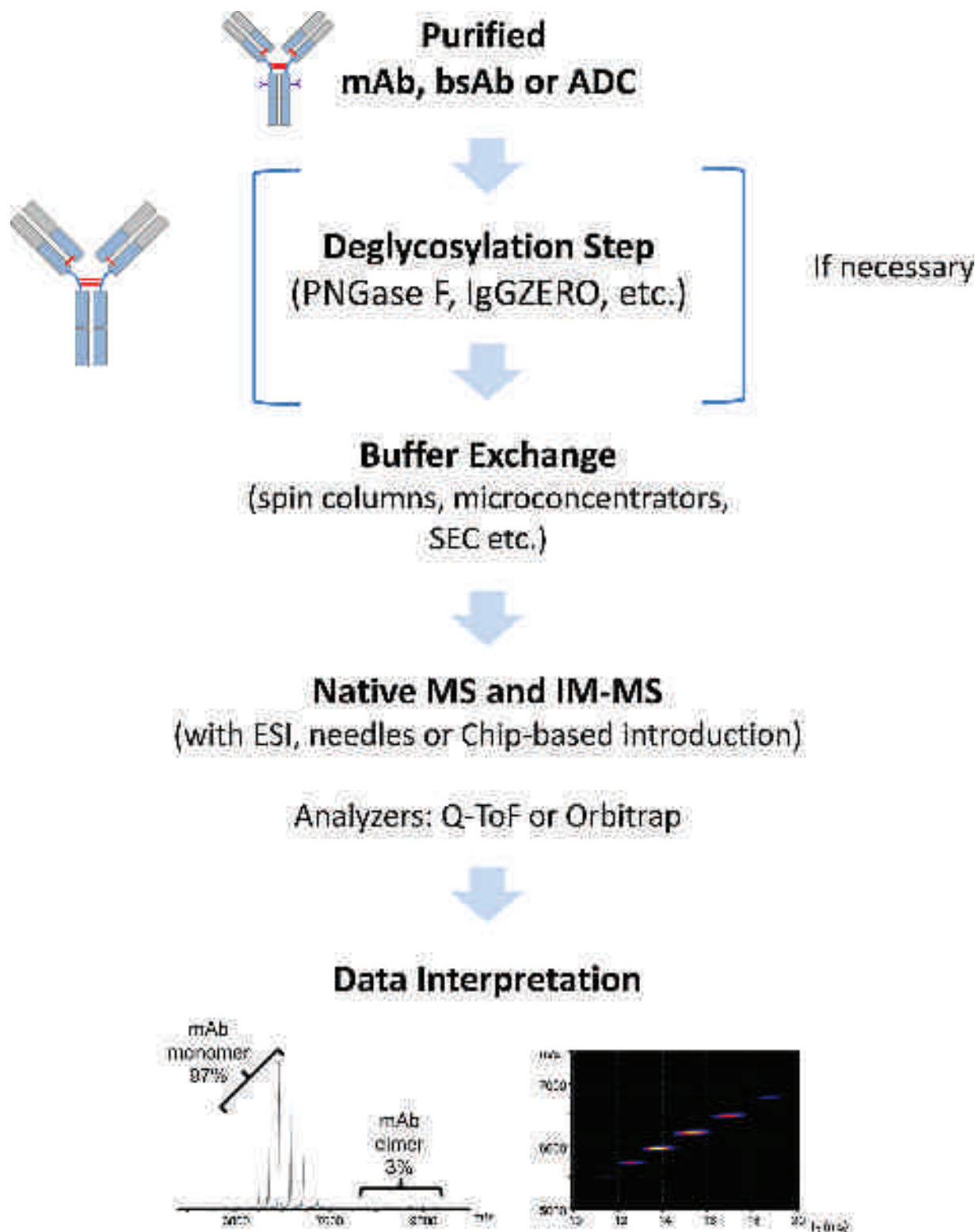
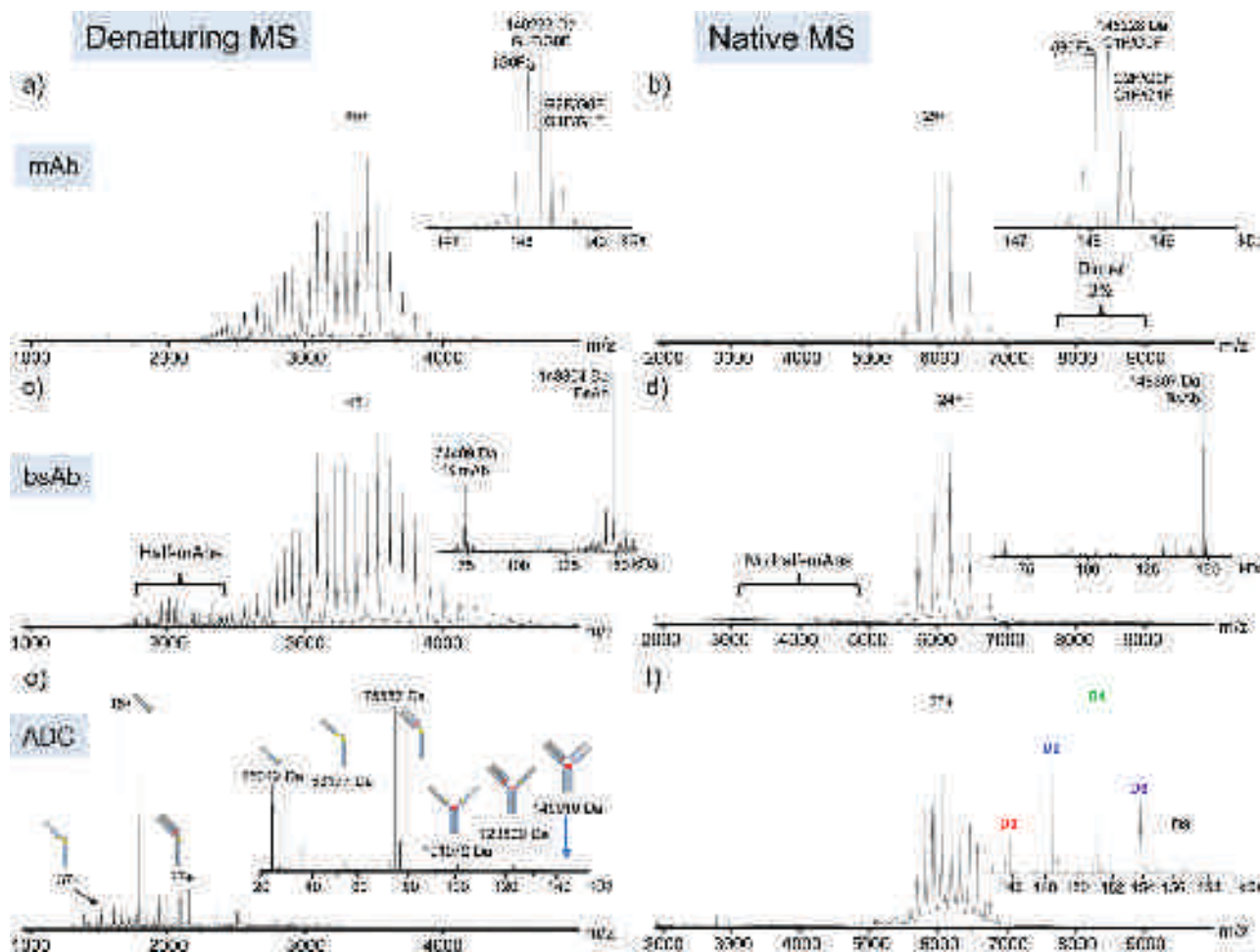


Fig. 1. Schematic workflow for the native mass spectrometry (MS) or ion-mobility mass spectrometry (IM-MS) analysis of monoclonal antibodies (mAbs) and related products—bispecific mAbs (bsAbs) and antibody-drug conjugates (ADCs).

measurements and to monitoring changes over time in the drug load distribution [51]. Native MS is now well established as a versatile technique to determine average DARs, as reported by several groups [52–55]. For the reference cysteine-ADC, brentuximab vedotin, the intact ADC is not detected by denaturing MS (Fig. 2e), but native MS allows a direct determination of the drug load profile,

the average DAR (deduced from MS peak intensities), and the relative quantities of the different species (including the unconjugated mAb) (Fig. 2f). Surprisingly, Marcoux et al. [55] have reported how native MS also proved advantageous for the analysis of the reference lysine-ADC, T-DM1, which consists of a highly heterogeneous mixtures of covalent species. Native MS is now well established



**Fig. 2.** Denaturing and native mass spectrometry (MS) analysis of monoclonal antibody (mAb)-based products. (a, c, e) Denaturing and (b, d, f) native MS analysis of (a and b) intact trastuzumab, (c and d) a bispecific mAb (bsAb), and (e and f) the antibody–drug conjugate (ADC) brentuximab vedotin. The insets show the deconvoluted mass spectra and the masses of the monomeric mAbs corresponding to each peak.

and easy to implement in ADC characterization workflows, with measurements completed in minutes (rather than an hour for chromatographic methods) and with limited sample handling.

### 2.3. Oligomeric forms and aggregation

The aggregation of mAbs or their derivatives can drastically reduce drug efficacy and potentially increases their toxicity and the risk of adverse reactions. This problem is even more common for ADCs, because conjugation to hydrophobic drug-linkers reduces the solubility of the mAb [49,56]. Studying aggregation in mAbs is therefore a crucial part of the drug development process. Here again, native MS—either in directly infused samples or (preferably) coupled to SEC—can be of great benefit for the characterization of mAb aggregation. K ukrer et al. report the off-line SEC MS analysis of a pH-stressed IgG1: each SEC fraction was buffer exchanged and injected into a ESI-TOF instrument resulting in the detection of high molecular weight oligomers (up to tetramers) [57].

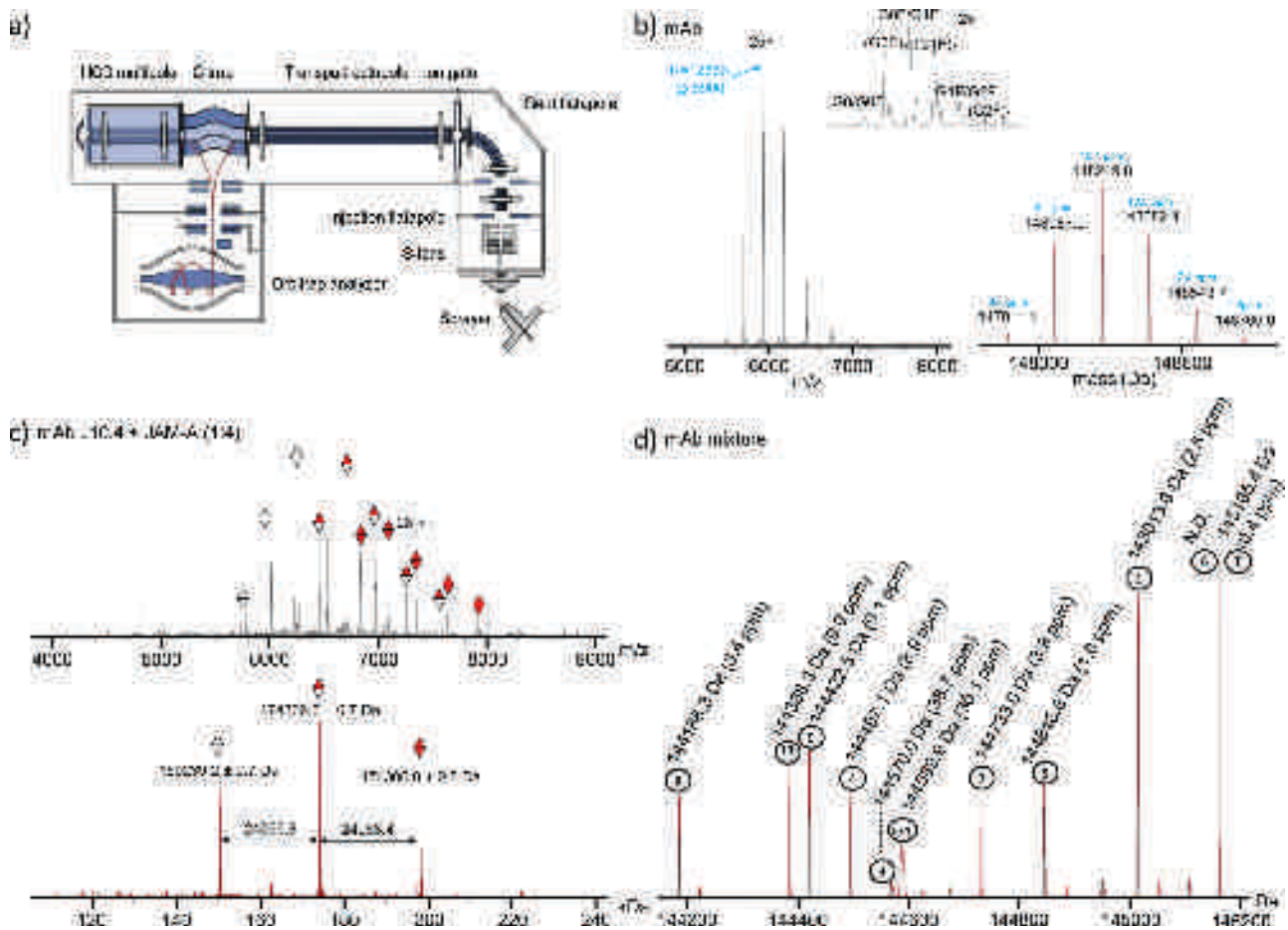
Progress has been made in the online coupling of SEC to native MS. One particular problem that has recently been solved is the correlation between the SEC-measured and native MS-deduced oligomer ratios. Indeed, high molecular weight oligomers have lower ionization efficiencies than monomeric mAbs do. Habegger et al. have developed an approach combining ultra-pressure (HP)-SEC separation and native MS for the simultaneous formation, identification and quantification of the high molecular

weight aggregates in bsAb samples that form because of elevated temperatures and storage exposures [58,59]. These authors also demonstrate that HP-SEC with native MS not only facilitates the detailed analysis of low-abundant noncovalent size variants for process characterization/validation studies, but is also essential as a means to validate HP-SEC as a worthwhile technique for the pharmaceutical industry. These advances suggest that native MS approaches will soon be more commonly used for the analysis of ADC and mAb aggregates.

### 2.4. Immune complex analysis

Knowledge of mAb/antigen (Ag) binding stoichiometries is of primary importance to understand the recognition mechanisms involved in immune complexes and to gain insights in possible mechanisms of action. The recognition specificity of immune complexes is governed by the complementarity in shape between a mAb and its target Ag, allowing specific noncovalent interactions between the two. Several noncovalent mAb/Ag immune complexes involving FDA- and EMA-approved mAbs have been characterized using SEC with ultraviolet detection (SEC/UV) [60]. Native MS is well-suited to study these systems and several groups have obtained the binding stoichiometries and affinities of mAb/antigen complexes in this way [61–64], the advantage of native MS being the more accurate mass measurements it provides compared with SEC/UV, surface plasmon resonance spectroscopy or isothermal





**Fig. 3.** High resolution native mass spectrometry (MS) for monoclonal antibody (mAb) analysis. (a) Schematic representation of an Orbitrap-based instrument (Exactive Plus EMR, Thermo Fisher Scientific), adapted from [41]. (b) Antibody glycoform profiling by Orbitrap native MS. The full-scan native mass spectra of 5  $\mu$ M trastuzumab showing that six main charge states is presented on the left. The accurate masses determined for each glycoform are indicated on the deconvoluted mass spectrum on the right. The mass accuracies range from 5 to 10 ppm. Inset: 25+ charge state with baseline resolution of all the glycoforms. (c) The analysis of a noncovalent mAb/antigen complex. After incubation of the J10.4 mAb with its antigen (JAM-A), an Orbitrap native mass spectrum of the mixture was recorded. Three populations are observed: the unbound J10.4 mAb, the mAb bound to a single JAM-A molecule, and the mAb bound to two JAM-A molecules. (d) The analysis of mAb mixtures. Deconvoluted native mass spectrum of a mixture of 11 PNGase-F deglycosylated mAbs.

titration calorimetry, which only yield weighted averages. From titration experiments in which the mAb/Ag molar ratios are varied, accurate mass measurements allow the binding stoichiometry to be determined unambiguously, while the peak intensities reveal the relative affinities of each species. Tito et al. were the first to report the use of nanoESI-MS under native conditions to determine the 1:2 binding stoichiometry of a recombinant V antigen from *Yersinia pestis* to its specific mAb [65]. Since then, with the advent of higher resolution TOF analyzers, several groups have reported the convenience of native MS to determine binding stoichiometries [40,61,66] and even binding affinities in comparability studies involving Ag constructs of different sizes [67,68]. Binding stoichiometries involving bispecific mAbs have also been measured in this way [48].

The great interest aroused by mAbs in the field of therapeutics is largely due to their high selectivity toward their target antigen. A critical issue in mAb/Ag characterization is thus the specificity of the detected species. Specific setups involving the targeted mAb and different antigens (or targeted antigens and non-related mAbs) can serve as control experiments [42,61,65]. Such a strategy allowed Atmanene et al. to unambiguously conclude that the unexpected 1:4 stoichiometry detected by native MS between the mAb 6F4 and the JAM-A antigen was not an artifact but results from a specific interaction [42,61]. Unexpected mAb/Ag binding

stoichiometries have also been reported by Arthur et al., the 3:2 stoichiometry being due to the trimeric nature of the antigen [66].

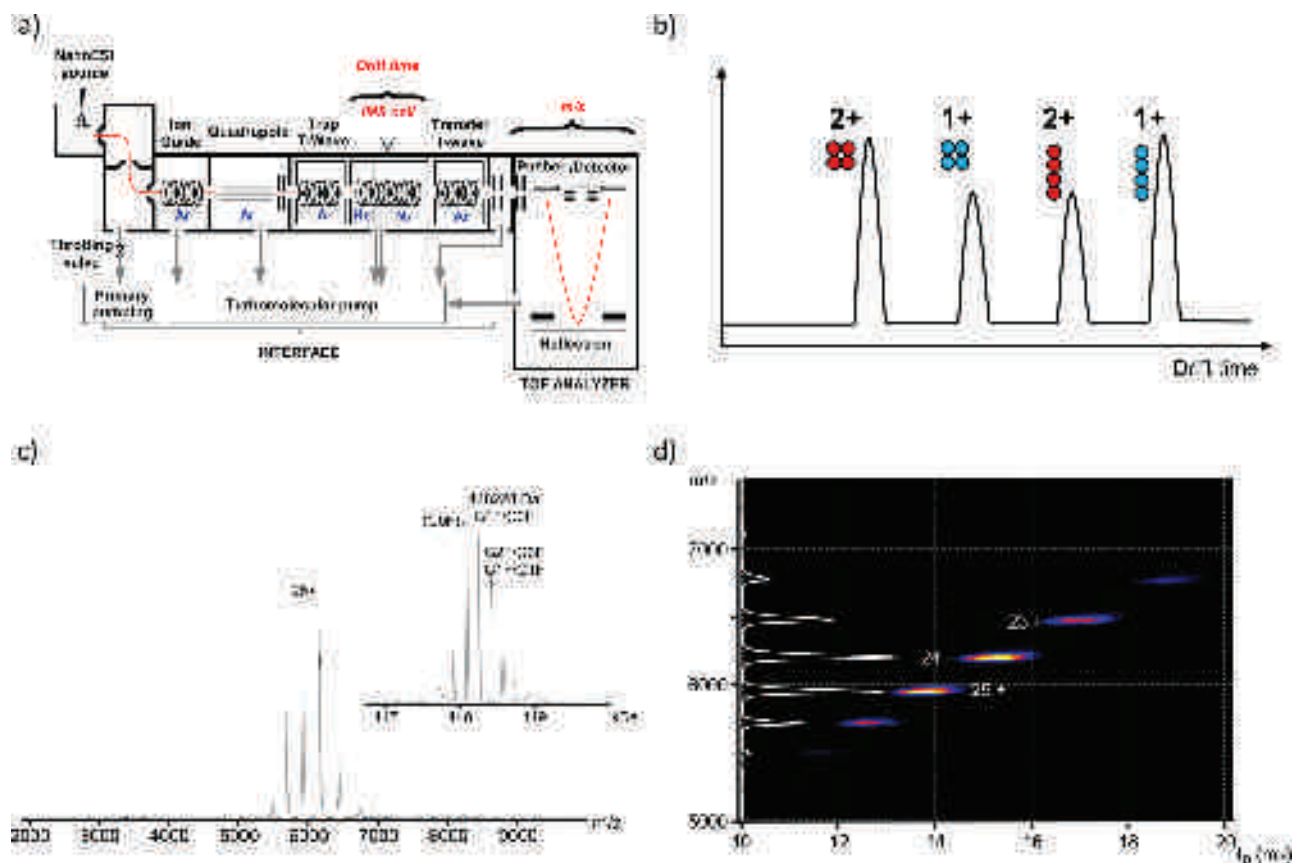
Altogether, the variety of questions tackled by native MS highlights its utility and versatility for the study of mAbs and their related product and complexes. Its ability to accurately reveal both the exact stoichiometry by mass and the heterogeneity of these complexes is particularly valuable.

### 3. High resolution native MS

As mentioned previously, native MS spectra can now be acquired in high resolution thanks to FTICR [43] and Orbitrap [44,45,63] instruments. Although native MS data obtained on most Q-TOF instruments are sufficiently resolved for the characterization of most mAbs and ADCs, in some cases (to detect low abundant impurities at the intact protein level or to distinguish overlapping peak shapes) a higher resolution is mandatory.

#### 3.1. The Orbitrap mass analyzer for high resolution native MS

In 2012, Rose et al. described for the first time the use of a modified Orbitrap mass analyzer to measure protein assemblies of molecular weights approaching one megadalton with a sensitivity allowing the detection of single ions [45]. The modified commercial



**Fig. 4.** (a) Schematic representation of an ion-mobility (IM) quadrupole time-of-flight (TOF) mass spectrometer, with a nano electrospray ionization (ESI) source. (b) An illustration of how ions are separated by charge and shape in IM experiments. (c) When the IM mode is off, the spectrometer can be used for native MS analysis; here, the full-scan native mass spectrum of trastuzumab is shown. Inset: the corresponding deconvoluted spectrum with the masses of trastuzumab and its main glycoforms. (d) A full driftscope plot of trastuzumab obtained by IM-MS under native conditions.

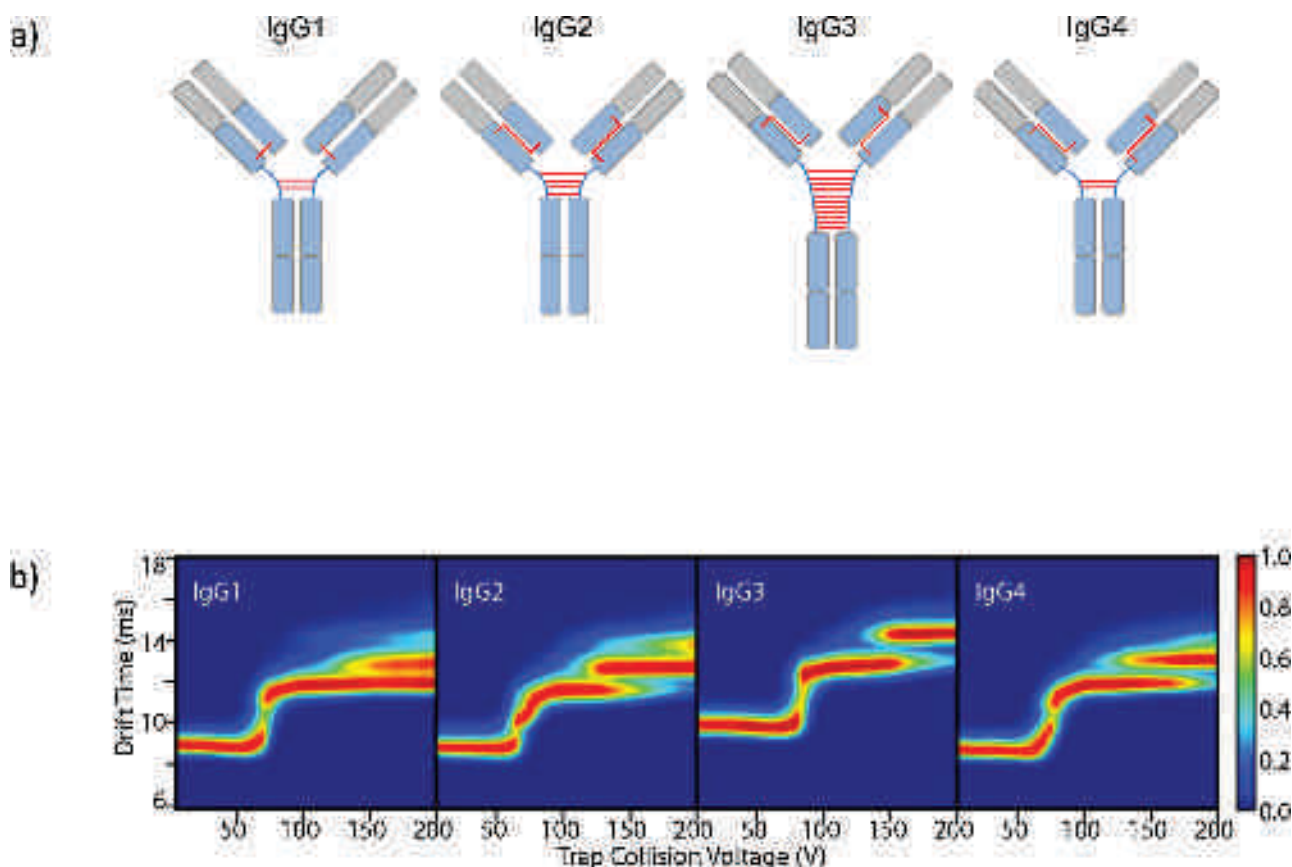
Orbitrap was sensitive to ions in the high  $m/z$  range ( $m/z > 6000$  Th). The radiofrequency voltages applied to transport multipoles could be tuned, as could the pressure in the high-energy collision dissociation (HCD) cell, leading to improved ion-transmission and desolvation capabilities (Fig. 3a). Mass resolutions of 25,000 at  $m/z$  5000 and 16,000 at  $m/z$  10,000 were obtained on this device, much higher than the resolution (5000) on a Q-TOF instrument. This opened the door to intact mAb analysis with unprecedented mass accuracies (10 ppm, 2 Da) and with baseline separation of all glycoforms. This substantially outperforms current TOF-based native mass spectrometry platforms (resolution typically  $\sim 1000$ ) and allows even complex glycosylation patterns to be resolved. The Orbitrap analyzer is clearly also a valuable tool to identify and quantify mAb heterogeneity, with routine mass accuracies of 10–30 ppm at a nominal resolution of 17,500 or 35,000. These high sensitivities and mass resolutions allow more in-depth and detailed information to be gained than is currently possible with native mass spectrometry, within a few seconds what's more, and with just a few femtomoles of sample.

The versatility of the Orbitrap platform for the characterization of mAbs has been reviewed by Rosati et al. [63], who point out that most of the critical problems in mAb studies can be addressed and solved using the Orbitrap, as it allows: (i) the accurate assignment of glycan identities, because glycoforms are baseline-resolved; (ii) the confident assignment of modifications to covalent mAbs that lead to micro-heterogeneities (such as glycosylation, C-terminal lysine cleavage, and primary sequence mutations) [53] (Fig. 3b) thanks to accurate mass measurements (10–30 ppm as routine and resolutions  $> 5000$  at  $m/z$  6000 Th)[53]; (iii) the analysis of noncovalently

assembled mAb structures (including ADCs and bsAbs) and mAb/Ag complexes (Fig. 3c); and (iv) the quantitative and qualitative analysis of mixtures of up to 15 mAbs in a single native high-resolution experiment without prior deglycosylation [69] (Fig. 3d). Similarly, benefits of high resolution native MS at have also been demonstrated for the two predominant ADC classes, cysteine [53,54] and lysine conjugates [55]. In both cases high resolution native MS performed on Orbitrap instruments afforded a better identification of the ADCs and revealed the relative distributions of the drug-loaded species. In particular, Debaene et al. performed an extensive native MS characterization of brentuximab vedotin in comparison with its unconjugated form (brentuximab), highlighting the efficiency and accuracy ( $< 30$  ppm in routine analysis) of native MS on the latest high-resolution Orbitrap instruments, which provided the average DARs of the species [54]. Similarly, Marcoux et al. demonstrated that high-resolution native MS methods are mandatory to detect very low abundance D8 species in the lysine conjugate T-DM1 [55]. The authors also highlighted the impact of high resolution on the quality of the deconvoluted data from which the average DARs are usually determined. The Orbitrap platform may indeed become the instrument of choice when dealing with complex heterogeneous mAb mixtures or whenever the ability to discriminate between two species very close in mass is essential.

### 3.2. Charge state reduction as an alternative route to high resolution native MS

The benefits of the Orbitrap device notwithstanding, approaches yielding high mass-spectral resolution on TOF and Q-TOF instru-



**Fig. 5.** Collision-induced unfolding experiments to characterize the conformations of mAb isotypes. (a) Illustrations of four IgG subtypes, which differ in terms of the number and pattern of disulfide bonds (red lines). (b) Collision-induced unfolding fingerprints of IgG1 $\kappa$ , IgG2 $\kappa$ , IgG3 $\kappa$  and IgG4 $\kappa$  from human myeloma. The differences in the patterns correlate with the differences in the number of disulfide bonds in each antibody. However, the fingerprints for IgG1 $\kappa$  and IgG4 $\kappa$  differ, even though they have the same number of disulfide bridges. Reproduced from Ref. [86]. Copyright 2015 American Chemical Society. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ments are also of interest. These alternative techniques rely on charge state reduction (using various reagents). Indeed, charge state reduction has been proposed as a means to separate close or overlapping peaks [70,71]—a lower charge states having already been mentioned in Section 2 as one of the benefits of native over classical MS analysis. Marcoux et al. successfully reduced the charge state of the reference lysine ADC, TDM-1, by supplementing the ADC sample with imidazole in increasing concentrations (10–40 mM). With 40 mM imidazole, the charge state was reduced from 23+ to 16+, separating the previously overlapping DAR distributions [55]. Imidazole improved both the separation of the different Dn species and the desolvation of the samples, leading to sharper peaks within each charge state. However, longer acquisition times were required as the sensitivity was lower. These authors also show how charge reduction can be applied in synergy with Orbitrap mass analyzers for the characterization of highly heterogeneous mAb samples [55]. Similar effects have been reported by Pacholarz et al. on cysteine-ADCs, for which triethylammonium acetate induces a charge reduction (from 24+ to 17+) and increases the gas phase stability of the ADC [72].

### 3.3. The next challenge: combining high resolution native MS with top-down sequencing for systematic mAb and ADC characterization

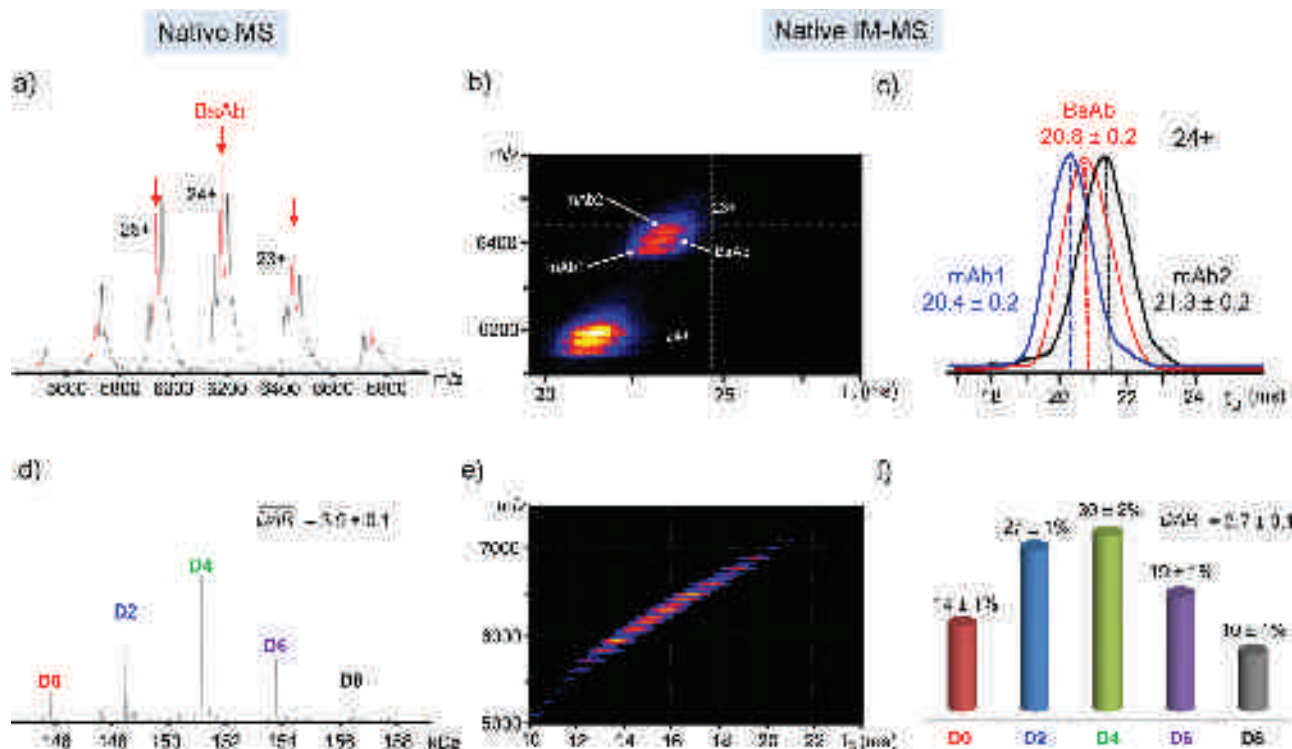
This presentation of the first generation of high-resolution Orbitrap platforms may give the impression that they have revolutionized the field of native MS; however, their limitations should

also be pointed out. The first experiments were conducted on a modified commercial Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer, which lacked a quadrupole mass filter that would have allowed ion isolation and tandem MS (MS/MS). In particular, native MS/MS in this context can potentially reveal the drug conjugation or post-translational modification sites of mAbs and related products, as well as their monosaccharide stereoisomers and glycan branching in a single run (using HCD or ETD).

Gautier et al. [73] have shown that post-translational modification or drug conjugation sites cannot be determined by native top-down MS in a single experiment [73]. These authors combined native MS and bottom-up proteomics to monitor and quantify the overall drug load and site-specific lysine reactivity of several mAbs. While native MS allowed them to monitor and quantify 69 lysine-tagged molecules in human IgGs, complementary bottom-up proteomics was essential for the identification of very reactive “hot-spot” conjugation sites.

The pioneering work discussed in the preceding paragraphs has paved the way for new instrumental improvements that have overcome the original limitations. Indeed, the recently introduced Orbitrap ExactivePlus EMR (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer [74], which incorporates a high-mass quadrupole mass selector, has allowed Dyachenko et al. to conduct MS analysis and a top down sequencing of brentuximab vedotin under native conditions [64]. The native MS revealed the drug load distribution and average drug load, while the native top down experiments revealed that the drug conjugation takes place nonhomogeneously to cysteine residues on both the light and heavy chains.





**Fig. 6.** Native mass spectrometry (MS) and ion-mobility (IM)-MS analysis of (a–c) a bispecific monoclonal antibody (bsAb) and (d–f) brentuximab vedotin, a cysteine antibody–drug conjugate. (a) Time-resolved nano-electrospray ionization native mass spectrum of Fab-arm exchange between two IgG4 molecules after 24 h incubation with glutathione. The arrival time distributions (ATDs) corresponding to the 24+ charge state of G0F/G1F glycoform of IgG4<sub>1</sub> (black), and of IgG4<sub>2</sub> (blue) overlap with that of the newly formed bsAb (red). (b) Driftscope plot of Fab-arm exchange between the two IgG4 monoclonal antibodies (mAbs) after 8 h reaction in glutathione. (c) Overlay of arrival time distributions (ATDs) from the two initial mAbs and the formed bsAb. (d) Deconvoluted native mass spectrum of brentuximab vedotin. (e) Driftscope plot of brentuximab vedotin highlighting its conjugation heterogeneity. (f) The IM-MS derived drug load profile of brentuximab vedotin: relative proportion of each drug load species as a function of the number of drug molecules loaded onto the mAb. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In brentuximab vedotin, and more generally in cysteine-ADCs, the drug localization sites can be distributed across eight different cysteine residues on the surface of the mAb, producing positional isomers with two, four and six drug loads. Since each of these positional isomers has the same mass, native MS is unable to discriminate between them. In contrast, tandem MS can decipher positional isomers (each one yielding a unique spectrum) and is therefore a valuable tool for the MS analysis of more heterogeneous mixtures. Another advantage of this new Q-Orbitrap instrument is the possibility it offers to simultaneously select all the ions belonging to the same charge state distribution (e.g. all the D2 ions) and submit them to MS/MS activation and fragmentation through a spectral multiplexing technique [64]. This type of experiment suggests that a series of exiting questions related to mAb and ADC characterization could be answered using a single native MS(/MS) experiment.

#### 4. Ion mobility coupled to mass spectrometry for mAb characterization

As a logical evolution from native MS, ion-mobility native MS (IM-MS) was developed first for the structural characterization of protein assemblies [70,75–77], but soon after for biopharmaceutical analysis [78]. Ion mobility spectrometry is a charge and shape-selective separation technique, based on the gas phase separation of ions drifting under a weak electric field through a chamber filled with an inert gas [79]. Gas phase IM-MS separation is thus a form of capillary electrophoresis in the gas phase, which outputs the ion drift times as arrival time distributions (ATDs). In turn, these can be converted directly (for linear drift tubes) or after appropriate

calibration (for traveling-wave IM cells) into collisional cross section (CCS) distributions, which are two-dimensional projections of the three-dimensional shapes of the ions. Indeed, ions with larger or extended conformations drift more slowly than those with more compact shapes, and therefore produce larger CCSs (Fig. 4a and b). Ions with identical charges can thus be separated in terms of their shapes (Fig. 4b). IM-MS has been used to probe the native state of proteins and protein complexes in the gas phase [75] and to investigate large protein assemblies, including membrane complexes [80,81] and biopharmaceuticals. An example of native MS and IM-MS analysis of trastuzumab is given in Fig. 4c and d.

##### 4.1. Glycosylation heterogeneity

IM-MS has also been employed under denaturing conditions (organic solvent and acid) to characterize the glycosylation heterogeneities of mAbs, either as intact molecules (150 kDa, revealing the heterogeneity of the glycoprofiles) or after dithiothreitol reduction and IM separation of the light and heavy chains. It can also be used to accurately measure the mass of the subunits [82]. In another study [83], IM-MS was used after sequential fragmentation to measure the overall glycosylation profile and identify the glycosylation site after trypsin digestion of trastuzumab, highlighting the value of IM-MS as a tool for batch-to-batch heterogeneity studies [83].

##### 4.2. Disulfide bond heterogeneity

A particularly interesting application of IM-MS is for the study of heterogeneous disulfide bonding. Atmanene et al. used IM-MS under both denaturing and native conditions to evidence the het-

erogeneous disulfide bridge pairings of a recombinant antigen [61]. In this study, IM-MS was the only analytical technique able to detect disulfide bridge heterogeneity within two different recombinant antigen preparations [61]. Elsewhere, Bagal et al. conducted a pioneering study of disulfide variants in intact IgG2, for which native IM-MS revealed the existence of two to three gas-phase conformer populations [78]. For an IgG1 antibody and a C232S mutant IgG2 in contrast, a single gas-phase conformer was identified [78]. IgG2 has a longer drift time than IgG1 and gave two distinct peaks in the ATDs of each charge state. When a reducing agent was used, one unique ATD population with a drift time similar to the one obtained for IgG1 was measured, providing strong evidence that the observed IgG2 gas-phase conformers were the result of disulfide bond heterogeneity [78]. In a similar context, Jones et al. have used IM-MS to rapidly provide information on the higher order structure of mAbs [84]. The three studies mentioned here clearly demonstrate the value of shape-selective separation as provided by IM-MS to detect disulfide bond heterogeneity in large (150 kDa), intact IgG antibodies [84].

#### 4.3. Global conformation and isotype classification

Given that IM-MS gives a global view of conformational differences, it is a good choice for preliminary investigations of mAb conformations where the shape and size of the molecule are of interest. Different groups have attempted to attribute CCSs to given mAb and isotype conformations and even to particular conformational heterogeneities. Pritchard et al. used this approach to detect three monomer conformations (CCSs ranging from 6100 to 7600 Å<sup>2</sup>) and two dimers (10,600–11,500 Å<sup>2</sup> CCSs) for a commercial rhGH-specific antibody [62]. A quantitative analysis of the ATDs revealed that ~80% of the species present in the sample were in the second monomer conformation (6807 ± 280 Å<sup>2</sup>). Furthermore, Pacholarz et al. reported structural differences between IgG1 and IgG4 based on IM-MS measurements [85]. Interestingly, the <sup>DT</sup>CCS<sub>He</sub> values obtained on a linear drift tube IM instrument in helium (61.1–83.2 nm<sup>2</sup>) were in agreement with those measured on traveling wave IM instruments by other groups for different IgGs, which demonstrates the robustness of the CCSs calculated from properly calibrated IM-MS data. Note that for the higher charge states, the observed CCSs for IgG4 molecules are larger than those measured for IgG1 mAbs. More generally, all IM-MS papers report a compaction in the gas phase of the mAbs, since the IM-MS-derived CCSs are smaller than those expected from the mass of the molecules or from MD simulations.

Advanced IM-MS methodologies designed for the study of intact mAbs have recently been reported, based on collision-induced unfolding (CIU) [86] or temperature variable IM-MS [87]. The former involve collisional heating in the gas-phase to unfold the protein, which is subsequently separated by IM and then analyzed by MS [88]. As for collision-induced dissociation, CIU experiments provide specific unfolding fingerprints that can be used to distinguish similar conformations, for instance mAb isotypes (IgG1 vs IgG2 vs IgG3 vs IgG4) [86] with different numbers and/or patterns of disulfide bonding and levels of glycosylation (Fig. 5). Similarly, the thermal stability of three types of intact IgG molecules (with the same antigen binding specificity) has been probed by variable-temperature IM-MS [87]. In these experiments, mass spectra and IM plots are acquired while the temperature of the helium gas in the drift tube is increased (from 300 to 550 K). While the native mass spectra showed no significant change as the temperature was increased (other than improved desolvation), the <sup>DT</sup>CCS<sub>He</sub> of the IgG1 and IgG4 isotypes decreased because of compaction. The maximum collapse occurred at a higher temperature for IgG1 (400 K) than for IgG4 (360 K), in agreement with solution-phase studies in which IgG1 was found to be more thermally stable than IgG4 [87].

Differences in the extent of unfolding (an increase and widening of <sup>DT</sup>CCS<sub>He</sub>) among the IgG subclasses were also observed at high buffer gas temperatures, IgG4 unfolding at a lower temperature and to a greater extent than IgG1 did.

IM-MS on intact mAbs can also provide interesting data for comparability studies and may be useful as a means to routinely fingerprint higher order structures. IM-MS measurements can be adapted to investigate the conformational changes induced in individual mAb isoforms upon antigen binding. Beck et al. used IM-MS to compare originator and biosimilar (generic) versions of trastuzumab [16]. IM-MS driftscope plots immediately revealed the greater heterogeneity of the biosimilar (molecules bearing zero or one glycan per Fc were detected).

#### 4.4. Dynamics and real-time IM-MS

IM-MS has recently been employed to monitor dynamic processes such as the IgG4 Fab-arm exchange that produces bsAbs [48]. As mentioned in the introduction, bsAbs are composed of two different half-antibody arms, each of which recognizes a distinct antigen, a particularly valuable property for therapeutic applications. In combination with time-resolved native MS, ion mobility was used to monitor the formation of the bsAb in real time [48], the CCSs of the bsAb (66.9 nm<sup>2</sup>) being intermediate to those of the original mAbs (65.6 and 69.6 nm<sup>2</sup>, Fig. 6).

#### 4.5. Conjugation heterogeneity in ADCs

The first application of native IM-MS to characterize drug conjugation heterogeneity was reported by Debaene et al. [54], for the marketed cysteine immunoconjugate brentuximab vedotin. Multiple drug loads were identified and the different CCSs of the species evidenced the slight conformational changes that occur upon payload binding. The IM-MS data was interpreted semi-quantitatively to directly determine the average DAR. The value obtained, 3.7 ± 0.1 (vs 4.0 expected) is consistent with values obtained from other MS methods and the DAR distribution. In addition, hydrophobic interaction chromatography (HIC) fractions were collected and analyzed individually by IM-MS to assess the conformational homogeneity of the species corresponding to each HIC peak [54]. Marcoux et al. performed a similar study on trastuzumab emtansine (T-DM1), a lysine ADC already on the market [55]. The detailed structural picture provided by IM-MS was complemented by molecular modeling [55]. As for brentuximab vedotin, native IM-MS highlights the increase in heterogeneity that occurs when trastuzumab is conjugated with DM1. The resulting drug distribution profile and average DAR (3.4 ± 0.2) are consistent with values obtained from other MS methods (average DAR: 3.5).

These two studies illustrate the potential of native IM-MS as a tool to measure drug load profiles and calculate average DARs, and highlight the value of this technique for the rapid assessment of structural conjugation heterogeneity in ADCs.

## 5. Conclusions

The development and optimization of mAbs and mAb-related products are increasingly reliant on adequate analytical and bioanalytical characterization. These needs have recently been fulfilled by a number of cutting-edge MS methods, with workflows optimized for implementation at different levels [16,21]. Electrophoretic and chromatographic methods, in association or not with MS, are still the main techniques used for the characterization of mAbs and their related products. However, recent developments in native MS have promoted this technique for the analysis of intact mAbs. In combination with classical denaturing MS approaches,

native MS offers the means to complete a multi-level characterization of mAbs, ADCs and other protein-based therapeutics without extensive sample preparation (avoiding artifacts like overdeamidation, oxidation, etc.) and within just a few minutes of analysis.

At the top level, native MS and native IM-MS complement the data provided by chromatographic and electrophoretic methods performed under classical denaturing conditions, providing easy access to accurate mass measurements (10–100 ppm as routine depending on the type of MS analyzer) and straightforward binding stoichiometry/conjugation information. For aggregation studies and the analysis of higher-order structures for mAb-related products, native MS and IM-MS along with hydrogen-deuterium exchange MS are promising techniques that could complement already established methods such as SEC. Although native top-down analysis is still in its infancy, we predict that the ongoing progress in instrumentation, fragmentation techniques (e.g. ultraviolet photodissociation and infrared multiphoton dissociation), and software tools, will substantially increase the popularity of this technique over the next few years. The direct online coupling of chromatographic (SEC or HIC) and electrophoretic (capillary and capillary zone electrophoresis) methods to native MS and IM-MS also holds great potential. A feasible objective for the native MS methods used to study mAb-related products during pharmaceutical development is that they should be made routine bioanalytical techniques applicable to the analysis of blood and/or tumor tissues.

Native MS should also play a major role in the characterization of next-generation mAb-based products, whether more homogeneous, such as site-specific ADCs, or more complex, such as bsAbs [10], antibody-dual-conjugates [89], alternatives to IgG formats [90], or treatment combinations (e.g. ADCs with immune checkpoint mAbs) [90].

## Acknowledgements

The authors would like to thank all the members of the CIPF and LSMBO that have been involved in the characterization of mAbs and mAb-related products by native MS and IM-MS: A. Boeuf, D. Ayoub, F. Debaene, J. Marcoux, J. Stojko and S. Erb. This work was supported by the bioclusters of the OptimAbs network (the Lyon Biopole and Alsace Biovalley) and several sponsors (DGCIS, Oseo, Feder, Région Rhône-Alpes, Région Alsace, Communauté Urbaine de Strasbourg, CNRS, and the Université de Strasbourg). We thank GIS IBiSA and Région Alsace for financial support in purchasing respectively a Synapt G2HDMS instrument and an Exactive Plus EMR Orbitrap spectrometer. G. Terral acknowledges Novalix and the Région Alsace for funding of his PhD fellowship. We would also like to thank Green Grow Scientific for editing the manuscript.

## References

- [1] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2014, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 992–1000.
- [2] J.C. Elvin, R.G. Couston, C.F. van der Walle, Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing, *Int. J. Pharm.* 440 (2013) 83–98.
- [3] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs* 7 (2015) 9–14.
- [4] J.M. Reichert, Antibody to watch in, *mAbs* 8 (2016) 197–204.
- [5] A. Resenmann, W. Jabs, A. Wiechmann, E. Wagner-Rouset, O. Colas, W. Evers, E. Belau, L. Vorwerg, C. Evans, A. Beck, D. Suckau, Full validation of therapeutic antibody sequences by middle-up mass measurements and middle-down protein sequencing, *mAbs* 8 (2016) 318–330.
- [6] A. Beck, J.M. Reichert, Antibody-drug conjugates: present and future, *MAbs* 6 (2014) 15–17.
- [7] P.D. Senter, E.L. Sievers, The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma, *Nat. Biotechnol.* 30 (2012) 631–637.
- [8] J.M. Lambert, R.V. Chari, Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6949–6964.
- [9] A. Beck, J.F. Haeuw, T. Wurch, L. Goetsch, C. Bailly, N. Corvaia, The next generation of antibody-drug conjugates comes of age, *Discov. Med.* 10 (2010) 329–339.
- [10] R.E. Kontermann, U. Brinkmann, Bispecific antibodies, *Drug Discov. Today* 20 (2015) 838–847.
- [11] C. Spiess, Q. Zhai, P.J. Carter, Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies, *Mol. Immunol.* 67 (2015) 95–106.
- [12] E. Dhimolea, J.M. Reichert, World Bispecific Antibody Summit September 27–28, 2011, Boston, MA, *MAbs* 4 (2012) 4–13.
- [13] G. Fan, Z. Wang, M. Hao, J. Li, Bispecific antibodies and their applications, *J. Hematol. Oncol.* 8 (2015) 130.
- [14] C.M. Kurbacher, O. Horn, J.A. Kurbacher, S. Herz, A.T. Kurbacher, R. Hildenbrand, R. Bollmann, Outpatient intraperitoneal catumaxomab therapy for malignant ascites related to advanced gynecologic neoplasms, *Oncologist* 20 (2015) 1333–1341.
- [15] M.B. May, A. Glode, Blinatumomab: a novel bispecific, T-cell engaging antibody, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 73 (2016) e6–e13.
- [16] A. Beck, F. Debaene, H. Diemer, E. Wagner-Rouset, O. Colas, A. Van Dorsselaer, S. Cianferani, Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 285–297.
- [17] M.S. Epstein, E.D. Ehrenpreis, P.M. Kulkarni, Biosimilars: the need the challenge, the future: the FDA perspective, *Am. J. Gastroenterol.* 109 (2014) 1856–1859.
- [18] A. Beck, J.M. Reichert, Approval of the first biosimilar antibodies in Europe: a major landmark for the biopharmaceutical industry, *MAbs* 5 (2013) 621–623.
- [19] J.F. Valliere-Douglass, S.M. Hengel, L.Y. Pan, Approaches to interchain cysteine-linked ADC characterization by mass spectrometry, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 1774–1783.
- [20] S. Fekete, D. Guillaume, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic electrophoretic, and mass spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals, *Anal. Chem.* 88 (2016) 480–507.
- [21] A. Beck, G. Terral, F. Debaene, E. Wagner-Rouset, J. Marcoux, M.C. Janin-Bussat, O. Colas, A. Van Dorsselaer, S. Cianferani, Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates, *Expert Rev. Proteomics* 13 (2016) 157–183.
- [22] A. Beck, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaer, Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4637–4646.
- [23] V. Katta, B.T. Chait, Observation of the heme globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8534–8535.
- [24] S.K. Chowdhury, B.T. Chait, Method for the electrospray ionization of highly conductive aqueous solutions, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1660–1664.
- [25] S. Sanglier, C. Atmanene, G. Chevreux, A.V. Dorsselaer, Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries, *Methods Mol. Biol.* 484 (2008) 217–243.
- [26] J. Stojko, S. Fieulaine, S. Petiot-Becard, A. Van Dorsselaer, T. Meinel, C. Gigliome, S. Cianferani, Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes, *Analyst* 140 (2015) 7234–7245.
- [27] 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, K. Thalassinou, An integrative approach combining ion mobility mass spectrometry, X-ray crystallography, and nuclear magnetic resonance spectroscopy to study the conformational dynamics of alpha 1-antitrypsin upon ligand binding, *Protein Sci.* 24 (2015) 1301–1312.
- [28] H.J. Maple, O. Scheibner, M. Baumert, M. Allen, R.J. Taylor, R.A. Garlish, M. Bromirski, R.J. Burnley, Application of the Exactive Plus EMR for automated protein-ligand screening by non-covalent mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 1561–1568.
- [29] C. Schmidt, C.V. Robinson, Dynamic protein ligand interactions—insights from MS, *FEBS J.* 281 (2014) 1950–1964.
- [30] K.J. Pacholarz, R.A. Garlish, R.J. Taylor, P.E. Barran, Mass spectrometry based tools to investigate protein-ligand interactions for drug discovery, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4335–4355.
- [31] S. Jakobi, P.T. Nguyen, F. Debaene, S. Cianferani, K. Reuter, G. Klebe, 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 Chem. Biol.* 10 (2015) 1897–1907.
- [32] J. Snijder, A.J. Heck, Analytical approaches for size and mass analysis of large protein assemblies, *Annu. Rev. Anal. Chem.* (Palo Alto Calif.) 7 (2014) 43–64.
- [33] E. van Duijn, I.M. Barbu, A. Barendregt, M.M. Jore, B. Wiedenheft, M. Lundgren, E.R. Westra, S.J. Brouns, J.A. Doudna, J. van der Oost, A.J. Heck, 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*, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) 1430–1441.
- [34] J.M. Saliou, X. Manival, A.S. Tillault, C. Atmanene, C. Bobo, C. Branlant, A. Van Dorsselaer, B. Charpentier, S. Cianferani, Combining native MS approaches to decipher archaeal box H/ACA ribonucleoprotein particle structure and activity, *Proteomics* 15 (2015) 2851–2861.
- [35] D. Martinez-Zapien, J.M. Saliou, X. Han, C. Atmanene, F. Proux, S. Cianferani, A.C. Dock-Bregeon, Intermolecular recognition of the non-coding RNA 7SK and HEXIM protein in perspective, *Biochimie* 117 (2015) 63–71.



- [36] J.Z. Bereszczak, I.M. Barbu, M. Tan, M. Xia, X. Jiang, E. van Duijn, A.J. Heck, Structure, stability and dynamics of norovirus P domain derived protein complexes studied by native mass spectrometry, *J. Struct. Biol.* 177 (2012) 273–282.
- [37] J.Z. Bereszczak, M. Havlik, V.U. Weiss, M. Marchetti-Deschmann, E. van Duijn, N.R. Watts, P.T. Wingfield, G. Allmaier, A.C. Steven, A.J. Heck, Sizing up large protein complexes by electrospray ionisation-based electrophoretic mobility and native mass spectrometry: morphology selective binding of Fabs to hepatitis B virus capsids, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1437–1446.
- [38] J. Snijder, R.J. Rose, D. Velesler, J.E. Johnson, A.J. Heck, Studying 18 MDa virus assemblies with native mass spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 4020–4023.
- [39] H. Zhang, W. Cui, M.L. Gross, Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *FEBS Lett.* 588 (2014) 308–317.
- [40] N.J. Thompson, S. Rosati, A.J. Heck, Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies, *Methods* 65 (2014) 11–17.
- [41] S. Rosati, Y. Yang, A. Barendregt, A.J. Heck, Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 9 (2014) 967–976.
- [42] C. Atmanene, E. Wagner-Rousset, N. Corvaia, A. Van Dorsseleer, A. Beck, S. Sanglier-Cianferani, Noncovalent mass spectrometry for the characterization of antibody/antigen complexes, *Methods Mol. Biol.* 988 (2013) 243–268.
- [43] L. Fornelli, E. Damoc, P.M. Thomas, N.L. Kelleher, K. Aizikov, E. Denisov, A. Makarov, Y.O. Tsybin, Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation Orbitrap FTMS, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) 1758–1767.
- [44] L. Fornelli, D. Ayoub, K. Aizikov, A. Beck, Y.O. Tsybin, Middle-down analysis of monoclonal antibodies with electron transfer dissociation Orbitrap fourier transform mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3005–3012.
- [45] R.J. Rose, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A.J. Heck, High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies, *Nat. Methods* 9 (2012) 1084–1086.
- [46] A.F. Labrijn, A.O. Buijse, E.T. van den Bremer, A.Y. Verwilligen, W.K. Bleeker, S.J. Thorpe, J. Killestein, C.H. Polman, R.C. Aalberse, J. Schuurman, J.G. van de Winkel, P.W. Parren, Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 767–771.
- [47] R.J. Rose, A.F. Labrijn, E.T. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P.H. van Berkel, J.G. van de Winkel, J. Schuurman, P.W. Parren, A.J. Heck, Quantitative analysis of the interaction strength and dynamics of human IgG4 half molecules by native mass spectrometry, *Structure* 19 (2011) 1274–1282.
- [48] F. Debaene, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorsseleer, A. Beck, S. Cianferani, Time resolved native ion-mobility mass spectrometry to monitor dynamics of IgG4 Fab arm exchange and bispecific monoclonal antibody formation, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9785–9792.
- [49] A. Wakankar, Y. Chen, Y. Gokarn, F.S. Jacobson, Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates, *MAbs* 3 (2011) 161–172.
- [50] J.F. Valliere-Douglass, W.A. McFee, O. Salas-Solano, Native intact mass determination of antibodies conjugated with monomethyl Auristatin E and F at interchain cysteine residues, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2843–2849.
- [51] S.M. Hengel, R. Sanderson, J. Valliere-Douglass, N. Nicholas, C. Leiske, S.C. Alley, Measurement of in vivo drug load distribution of cysteine-linked antibody-drug conjugates using microscale liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3420–3425.
- [52] J. Chen, S. Yin, Y. Wu, J. Ouyang, Development of a native nano-electrospray mass spectrometry method for determination of the drug-to-antibody ratio of antibody-drug conjugates, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1699–1704.
- [53] S. Rosati, E.T. van den Bremer, J. Schuurman, P.W. Parren, J.P. Kamerling, A.J. Heck, 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, *MAbs* 5 (2013) 917–924.
- [54] F. Debaene, A. Boeuf, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorsseleer, A. Beck, S. Cianferani, Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: high resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10674–10683.
- [55] J. Marcoux, T. Champion, O. Colas, E. Wagner-Rousset, N. Corvaia, A. Van Dorsseleer, A. Beck, S. Cianferani, Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate, *Protein Sci.* 24 (2015) 1210–1223.
- [56] J. Guo, S. Kumar, A. Prashad, J. Starkey, S.K. Singh, Assessment of physical stability of an antibody drug conjugate by higher order structure analysis: impact of thiol-maleimide chemistry, *Pharm. Res.* 31 (2014) 1710–1723.
- [57] B. Kukrer, V. Filipe, E. van Duijn, P.T. Kasper, R.J. Vreeken, A.J. Heck, W. Jiskoot, Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography, *Pharm. Res.* 27 (2010) 2197–2204.
- [58] M. Habberger, A.K. Heidenreich, T. Schlothauer, M. Hook, J. Gassner, K. Bomans, M. Yegres, A. Zwick, B. Zimmermann, H. Wegele, L. Bonnington, D. Reusch, P. Bulau, Functional assessment of antibody oxidation by native mass spectrometry, *MAbs* 7 (2015) 891–900.
- [59] M. Habberger, M. Leiss, A.K. Heidenreich, O. Pester, G. Hafenmair, M. Hook, L. Bonnington, H. Wegele, M. Haindl, D. Reusch, P. Bulau, Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry, *MAbs* 0 (2015).
- [60] D.S. Rehder, D. Chelius, A. McAuley, T.M. Dillon, G. Xiao, J. Crouse-Zeineddini, L. Vardanyan, N. Perico, V. Mukku, D.N. Brems, M. Matsumura, P.V. Bondarenko, Isomerization of a single aspartyl residue of anti-epidermal growth factor receptor immunoglobulin  $\gamma 2$  antibody highlights the role avidity plays in antibody activity, *Biochemistry-Us* 47 (2008) 2518–2530.
- [61] C. Atmanene, E. Wagner-Rousset, M. Malissard, B. Chol, A. Robert, N. Corvaia, A. Van Dorsseleer, A. Beck, S. Sanglier-Cianferani, Extending mass spectrometry contribution to therapeutic monoclonal antibody lead optimization: characterization of immune complexes using noncovalent ESI-MS, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6364–6373.
- [62] C. Pritchard, K.J. Groves, S. Biesenbruch, G. O'Connor, A.E. Ashcroft, C. Arsene, D. Schulze, M. Quaglia, Quantification of human growth hormone in serum with a labeled protein as an internal standard: essential considerations, *Anal. Chem.* 86 (2014) 6525–6532.
- [63] S. Rosati, R.J. Rose, N.J. Thompson, E. van Duijn, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A.J. Heck, Exploring an Orbitrap analyzer for the characterization of intact antibodies by native mass spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) 12992–12996.
- [64] A. Dyachenko, G. Wang, M. Belov, A. Makarov, R.N. de Jong, E.T. van den Bremer, P.W. Parren, A.J. Heck, Tandem native mass spectrometry on antibody-drug conjugates and submillimolar antibody-antigen protein assemblies on an Orbitrap EMR equipped with a high-mass quadrupole mass selector, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6095–6102.
- [65] M.A. Tito, J. Miller, N. Walker, K.F. Griffin, E.D. Williamson, D. Despeyroux-Hill, R.W. Titball, C.V. Robinson, Probing molecular interactions in intact antibody: antigen complexes, an electrospray time-of-flight mass spectrometry approach, *Biophys. J.* 81 (2001) 3503–3509.
- [66] K.K. Arthur, J.P. Gabrielson, N. Hawkins, D. Anafi, J. Wypych, A. Nagi, J.K. Sullivan, P.V. Bondarenko, In vitro stoichiometry of complexes between the soluble RANK ligand and the monoclonal antibody denosumab, *Biochemistry-Us* 51 (2012) 795–806.
- [67] M. Oda, S. Uchiyama, M. Noda, Y. Nishi, M. Koga, K. Mayanagi, C.V. Robinson, K. Fukui, Y. Kobayashi, K. Morikawa, T. Azuma, Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes, *Mol. Immunol.* 47 (2009) 357–364.
- [68] M. Oda, S. Uchiyama, C.V. Robinson, K. Fukui, Y. Kobayashi, T. Azuma, Regional and segmental flexibility of antibodies in interaction with antigens of different size, *FEBS J.* 273 (2006) 1476–1487.
- [69] N.J. Thompson, L.J. Hendriks, J. de Kruijff, M. Throsby, A.J. Heck, Complex mixtures of antibodies generated from a single production qualitatively and quantitatively evaluated by native Orbitrap mass spectrometry, *MAbs* 6 (2014) 197–203.
- [70] Z. Hall, A. Politis, M.F. Bush, L.J. Smith, C.V. Robinson, Charge-state dependent compaction and dissociation of protein complexes: insights from ion mobility and molecular dynamics, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 3429–3438.
- [71] S. Mehmood, J. Marcoux, J.T. Hopper, T.M. Allison, I. Liko, A.J. Borysik, C.V. Robinson, Charge reduction stabilizes intact membrane protein complexes for mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 17010–17012.
- [72] K.J. Pacholarz, P.E. Barran, Use of a charge reducing agent to enable intact mass analysis of cysteine-linked antibody-drug-conjugates by native mass spectrometry, *Eupa Open Proteomics* 11 (2016) 23–27.
- [73] V. Gautier, A.J. Boumeester, P. Lossi, A.J. Heck, Lysine conjugation properties in human IgGs studied by integrating high-resolution native mass spectrometry and bottom-up proteomics, *Proteomics* 15 (2015) 2756–2765.
- [74] M.E. Belov, E. Damoc, E. Denisov, P.D. Compton, S. Horning, A.A. Makarov, N.L. Kelleher, From protein complexes to subunit backbone fragments: a multi-stage approach to native mass spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11163–11173.
- [75] B.T. Ruotolo, K. Giles, I. Campuzano, A.M. Sandercock, R.H. Bateman, C.V. Robinson, Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water, *Science* 310 (2005) 1658–1661.
- [76] C. Uetrecht, R.J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen, A.J. Heck, Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1633–1655.
- [77] C.A. Scarff, V.J. Patel, K. Thalassinou, J.H. Scrivens, Probing hemoglobin structure by means of traveling-wave ion mobility mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 625–631.
- [78] D. Bagal, J.F. Valliere-Douglass, A. Balland, P.D. Schnier, Resolving disulfide structural isoforms of IgG2 monoclonal antibodies by ion mobility mass spectrometry, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6751–6755.
- [79] M.T. Bowers, P.R. Kemper, G. von Helden, P.A. van Koppen, Gas-phase ion chromatography: transition metal state selection and carbon cluster formation, *Science* 260 (1993) 1446–1451.
- [80] N.P. Barrera, N. Di Bartolo, P.J. Booth, C.V. Robinson, Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum, *Science* 321 (2008) 243–246.
- [81] J. Marcoux, A. Politis, D. Rinehart, D.P. Marshall, M.I. Wallace, L.K. Tamm, C.V. Robinson, Mass spectrometry defines the C-terminal dimerization domain and enables modeling of the structure of full-length OmpA, *Structure* 22 (2014) 781–790.
- [82] P. Olivova, W.B. Chen, A.B. Chakraborty, J.C. Gebler, Determination of N-glycosylation sites and site heterogeneity in a monoclonal antibody by electrospray quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22 (2008) 29–40.

- [83] C.W. Damen, W. Chen, A.B. Chakraborty, M. van Oosterhout, J.R. Mazzeo, J.C. Gebler, J.H. Schellens, H. Rosing, J.H. Beijnen, Electrospray ionization quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometry as a tool to distinguish the lot-to-lot heterogeneity in *N*-glycosylation profile of the therapeutic monoclonal antibody trastuzumab, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 2021–2033.
- [84] L.M. Jones, H. Zhang, W. Cui, S. Kumar, J.B. Sperry, J.A. Carroll, M.L. Gross, Complementary MS methods assist conformational characterization of antibodies with altered S–S bonding networks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 835–845.
- [85] K.J. Pacholarz, M. Porrini, R.A. Garlish, R.J. Burnley, R.J. Taylor, A.J. Henry, P.E. Barran, Dynamics of intact immunoglobulin G explored by drift-tube ion-mobility mass spectrometry and molecular modeling, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 7765–7769.
- [86] Y. Tian, L. Han, A.C. Buckner, B.T. Ruotolo, Collision induced unfolding of intact antibodies: rapid characterization of disulfide bonding patterns, glycosylation, and structures, *Anal. Chem.* 87 (2015) 11509–11515.
- [87] K. Pacholarz, S.J. Peters, R.A. Garlish, A.J. Henry, R.J. Taylor, D.P. Humphreys, P.E. Barran, Molecular insights to the thermal stability of mAbs with variable temperature ion mobility mass spectrometry, *ChemBioChem* (2015).
- [88] S.J. Hyung, C.V. Robinson, B.T. Ruotolo, Gas-phase unfolding and disassembly reveals stability differences in ligand-bound multiprotein complexes, *Chem. Biol.* 16 (2009) 382–390.
- [89] X. Li, J.T. Patterson, M. Sarkar, L. Pedzisa, T. Kodadek, W.R. Roush, C. Rader, Site-specific dual antibody conjugation via engineered cysteine and selenocysteine residues, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 2243–2248.
- [90] H. Merten, F. Brandl, A. Pluckthun, U. Zangemeister-Wittke, Antibody-drug conjugates for tumor targeting—novel conjugation chemistries and the promise of non-IgG binding proteins, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 2176–2185.



# Guillaume TERRAL



**Apports de l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse en protéomique structurale pour la caractérisation de complexes multi-protéiques.**

## Résumé

Ce travail de thèse porte sur développement de méthodes en spectrométrie de masse structurale pour l'analyse de protéines recombinantes et de leurs complexes associés. L'objectif central s'est porté sur des développements méthodologiques en échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS). Les techniques biophysiques de caractérisation structurale à haute résolution comme la cristallographie ou la RMN se heurtent régulièrement à des problèmes de productions de cristaux, de taille de complexes analysables ou encore de quantité de matériel nécessaire importante. Le développement de méthodes spécifiques HDX-MS a permis de réaliser une caractérisation structurale de systèmes protéiques variés, et réfractaires aux approches haute résolution. La combinaison de cette approche à différents outils de MS structurale est aussi illustrée, et montre tout son intérêt pour l'obtention d'informations à résolution augmentée.

Mots-clés : spectrométrie de masse structurale, échange Hydrogène/Deutérium, spectrométrie de masse native, protéines, anticorps thérapeutiques, ribonucléoprotéines.

## Résumé en anglais

This thesis work focuses on development of structural mass spectrometry methods for the analysis of recombinant proteins and their associated complex. The central objective has focused on the development of hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry approaches (HDX-MS). The high resolution biophysical techniques for structural characterization such as crystallography or NMR regularly face problems of crystal productions, size analyzable complex or quantity of material required. The development of specific HDX-MS methods allowed the characterization of various, and refractory protein systems to high resolution approaches. The combination of this approach with complementary structural MS tools is also illustrated, and shows its interest to obtain increased resolution information.

Key words: structural mass spectrometry, Hydrogen/Deuterium exchange, native mass spectrometry, proteins, therapeutic antibodies, ribonucleoproteins.