

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

[ UMR7178 ]

# THÈSE

présentée par

**Stéphanie BÉCARD**

soutenue le : **10 décembre 2012**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie Analytique

**Développements méthodologiques  
en spectrométrie de masse et en mobilité ionique  
pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. Alain Van Dorsselaer**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Pr. Catherine Lange**

Professeur Emérite de l'Université de Rouen

**Dr. Nicolas Sommerer**

Ingénieur de Recherche, Inra Montpellier

---

**MEMBRES DU JURY :**

**Dr. Alain Van Dorsselaer**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

**Dr. Sarah Cianférani**

Chargée de Recherche CNRS, Strasbourg

**Pr. Catherine Lange**

Professeur Emérite de l'Université de Rouen

**Dr. Nicolas Sommerer**

Ingénieur de Recherche Inra, Montpellier

**Dr. Alain Wagner**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

**Dr. Jean-Paul Renaud**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg



**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

[ UMR7178 ]

# THÈSE

présentée par

**Stéphanie BÉCARD**

soutenue le : **10 décembre 2012**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie Analytique

**Développements méthodologiques  
en spectrométrie de masse et en mobilité ionique  
pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. Alain Van Dorsselaer**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Pr. Catherine Lange**

Professeur Emérite de l'Université de Rouen

**Dr. Nicolas Sommerer**

Ingénieur de Recherche, Inra Montpellier

---

**MEMBRES DU JURY :**

**Dr. Alain Van Dorsselaer**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

**Dr. Sarah Cianférani**

Chargée de Recherche CNRS, Strasbourg

**Pr. Catherine Lange**

Professeur Emérite de l'Université de Rouen

**Dr. Nicolas Sommerer**

Ingénieur de Recherche Inra, Montpellier

**Dr. Alain Wagner**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

**Dr. Jean-Paul Renaud**

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg



**À mes parents et à ma soeur,**

**À Florian et Claire,**

*« Dans la vie, il n'y a pas de problèmes et d'obstacles ; il n'y a que des défis et des épreuves. »*

*Michel Bouthot*

*« Nous avons besoin les uns des autres. L'être humain n'est pas fait pour s'isoler, mais pour partager. »*

*Alice Parizeau*



# Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg, au sein du Département des Sciences Analytiques de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg (UMR 7178, IPHC-DSA-LSMBO).

Je tiens à remercier en tout premier lieu, Alain Van Dorsselaer qui pour m'avoir offert l'opportunité de découvrir la spectrométrie de masse dans un cadre agréable permettant l'épanouissement scientifique et personnel. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité ainsi que pour les discussions que nous avons pu avoir et qui m'ont beaucoup appris.

Je tiens ensuite à remercier, Sarah Sanglier-Cianféran qui m'a accompagnée pendant ces 3 années et qui m'a fait découvrir les joies de la MS supramoléculaire. Merci pour ton soutien et pour les conseils que tu m'as donnés tout au long de cette thèse. Je te remercie de m'avoir fait confiance suite à notre rencontre à Paris et de m'avoir permis de me rapprocher de l'Alsace. Je te remercie aussi de m'avoir permis d'initier des étudiants à la MS supramoléculaire.

Je remercie vivement Catherine Lange, Nicolas Sommerer, Jean-Paul Renaud et Alain Wagner d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je souhaite aussi remercier Laurence Sabatier pour m'avoir permis de faire de l'enseignement à l'ECPM. Cette expérience a été très enrichissante et a confirmé mon envie de devenir enseignant-chercheur. Ton dynamisme et ta disponibilité sont une véritable source d'inspiration pour les gens qui t'entourent. Je remercie aussi vivement Véronique Delval qui m'a accompagnée dans cet apprentissage de l'enseignement. Ton soutien pendant ces derniers mois a été très rassurant. J'ai beaucoup apprécié les moments que nous avons passé ensemble que ce soit d'un point de vue professionnel comme personnel.

Je souhaiterais vivement remercier Cédric Atmanene qui m'a permis de découvrir la MS supramoléculaire ainsi que l'IM-MS. Son professionnalisme et sa rigueur sont exemplaires, et se mélangent subtilement à une pointe d'humour. Merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble et qui m'ont beaucoup appris.

Merci aussi à François Delalande (maîtriser le bois est un art) pour les ballades que nous avons faites, nos discussions et notre collaboration sur le projet P1. Grâce à toi, nous avons pu montrer la complémentarité entre la MS supramoléculaire et les approches protéomiques.

Je souhaiterais remercier Jean-Marc Strub, toujours prêt à aider, de jour comme de nuit. Merci de m'avoir transmis une partie de ton savoir.

Merci beaucoup à Christine Carapito pour son dévouement et sa disponibilité d'un point de vue professionnel comme personnel. Tu es vraiment une personne formidable qui mérite le meilleur. Merci beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi ces 3 dernières années.

Merci à tous les étudiants du LSMBO, les anciens : Nicolas, Daniel, Guillaume, Agnès, Bertrand, Cyril et Simona ; et les actuels : Sébastien, Goerg, Diego, Anna, Elie, Gilles.

Un merci tout particulier à Marine (toujours là quand il faut, les 10 heures passées à 4 dans ta micra (la voiture qui ne brûle pas) resteront gravées dans ma mémoire), petite Sarah (vivement que je recommence à jouer de la bombarde) et Amandine (toujours à fond pour le club jeune) pour tous les moments que nous avons passés ensemble. Merci aussi pour vos petits cadeaux de ces derniers mois qui m'ont beaucoup touchée.

Merci à la team non-covalent : Jean-Michel et François Debaene. J'ai beaucoup apprécié le fait de travailler avec vous. Vous sortirez vainqueur de la bataille menée contre les machines capricieuses.

Merci à Danièle Thiersé et à Hélène Diemer avec qui les séances de sport ont été un véritable plaisir.

Merci aussi à Kévin pour sa disponibilité et son aide pour toutes les formalités administratives.

Enfin merci à Christine Schaeffer-Reiss, Alexandre (le pro des macros) et les Fabrices (la team barbecue, toujours avec le sourire).

Merci à tous pour votre bonne humeur et votre humour qui font de ce labo un endroit où il fait bon vivre.

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

Un immense merci à ma famille, à celui qui partage ma vie et à notre petite Claire. Merci beaucoup pour votre soutien et vos encouragements de tous les instants.

---

# *Plan général*

---

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	3
CHAPITRE 1 : L'ANALYSE DE COMPLEXES SUPRAMOLÉCULAIRES EN BIOLOGIE .....	5
CHAPITRE 2 : LA MS, UNE TECHNIQUE CENTRALE POUR L'ÉTUDE DES COMPLEXES DE BIOMOLÉCULES.....	13
CHAPITRE 3 THÉORIE ET INSTRUMENTATION EN MS SUPRAMOLÉCULAIRE.....	21
CHAPITRE 4 : THÉORIE ET INSTRUMENTATION EN IM-MS.....	33
PARTIE 2 : OPTIMISATIONS EXPÉRIMENTALES ET INSTRUMENTALES POUR L'ANALYSE PAR MS ET IM-MS DE COMPLEXES SUPRAMOLÉCULAIRES.....	45
CHAPITRE 1 : PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS POUR LA MS ET L'IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRES.....	47
CHAPITRE 2 : OPTIMISATIONS INSTRUMENTALES EN MS SUPRAMOLÉCULAIRE SUR LE SYNAPT HDMS G2.....	55
CHAPITRE 3 : OPTIMISATIONS INSTRUMENTALES EN IM-MS SUR LES INSTRUMENTS DE TYPE SYNAPT HDMS .....	63
CHAPITRE 4 : LES INFORMATIONS DÉDUITES DES ANALYSES PAR MS ET IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRES .....	79
CHAPITRE 5 : COMPARAISONS DES DONNÉES OBTENUES SUR LES SYNAPT G1 ET G2 PAR MS ET IM-MS .....	97
PARTIE 3: DE LA MS À L'IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRE POUR LA CARACTÉRISATION DE SYSTÈMES PROTÉINE/LIGAND .....	107
CHAPITRE 1 : ÉTUDE DES INTERACTIONS D'UNE PROTÉINE À DOIGTS DE ZINC : INTERACTIONS P1/ZN <sup>2+</sup> .....	109
CHAPITRE 2 : ÉTUDE D'UN COMPLEXE PROTÉINE/ACIDES NUCLÉIQUES : LE SYSTÈME TGT/ARN.....	127
CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES PARAMÈTRES INSTRUMENTAUX DU COUPLAGE IM-MS POUR LA DÉTECTION DE FAIBLES CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS : ÉTUDE DU SYSTÈME BCL-XL/ABT-737 .....	145
CHAPITRE 4 : CARACTÉRISATION FINE PAR MS ET IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRES D'UN SYSTÈME PROTÉINE/LIGANDS : EXEMPLE DU SYSTÈME PDF1B/LIGANDS.....	155
PARTIE 4 : VERS UNE INFORMATION CONFORMATIONNELLE POUR L'ÉTUDE DE COMPLEXES DE TRÈS HAUTS POIDS MOLÉCULAIRES .....	185
CHAPITRE 1 : DIFFICULTÉS LIÉES À L'ANALYSE DE COMPLEXES DE HAUTS POIDS MOLÉCULAIRES .....	187
CHAPITRE 2 : LA MOBILITÉ IONIQUE ET L'ANALYSE DE COMPLEXES DE TRÈS HAUTS POIDS MOLÉCULAIRES.....	205
CHAPITRE 3 : DONNÉES PRÉLIMINAIRES ISSUES DE L'ANALYSE DE RIBOSOMES PAR MS SUPRAMOLÉCULAIRE .....	213
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	227

<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>231</b>
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>249</b>
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>253</b>

---

# Plan détaillé

---

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : L'ANALYSE DE COMPLEXES SUPRAMOLÉCULAIRES EN BIOLOGIE.....</b>	<b>5</b>
1 L'IMPORTANCE DES LIAISONS ET INTERACTIONS EN BIOLOGIE.....	5
1.1 <i>Liaisons covalentes</i>	5
1.2 <i>Liaisons non-covalentes</i>	6
2 LES PRINCIPALES METHODES BIOCHIMIQUES ET BIOPHYSIQUES UTILISEES LORS DE L'ETUDE DE COMPLEXES BIOLOGIQUES.....	7
2.1 <i>Dichroïsme circulaire</i>	8
2.2 <i>Résonance plasmonique de surface (SPR)</i>	8
2.3 <i>Spectroscopie de fluorescence</i>	9
2.4 <i>Microcalorimétrie</i>	10
2.5 <i>Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)</i>	10
2.6 <i>Microscopie cryo-électronique</i>	11
2.7 <i>Résonance magnétique nucléaire (RMN)</i>	11
2.8 <i>Cristallographie aux Rayons X (RX)</i>	11
2.9 <i>Comparaison des techniques biophysiques utilisées pour l'étude des biomolécules</i>	12
3 CONCLUSION .....	12
<b>CHAPITRE 2 : LA MS, UNE TECHNIQUE CENTRALE POUR L'ÉTUDE DES COMPLEXES DE BIOMOLÉCULES.....</b>	<b>13</b>
1 L'ANALYSE PROTEOMIQUE AU SERVICE DE LA CARACTERISATION DE COMPLEXES.....	13
1.1 <i>Identification des protéines constitutives de complexes par des approches protéomiques</i>	13
1.2 <i>L'échange hydrogène/deutérium (HDX)</i>	14
1.3 <i>Le marquage par oxydation (OFP)</i>	15
1.4 <i>Utilisation du Cross-Linking (CXL)</i>	15
1.5 <i>Conclusion</i>	15
2 LES APPROCHES MS SUPRAMOLECULAIRES POUR L'ETUDE DE COMPLEXES NON-COVALENTS.....	16
2.1 <i>Les développements instrumentaux en MS supramoléculaire</i>	16
2.2 <i>Vers une information conformationnelle en MS supramoléculaire (IM-MS)</i>	16
2.3 <i>Évolution de la diversité des échantillons biologiques analysés par MS et IM-MS supramoléculaires</i>	18
2.4 <i>Conclusion</i>	19
<b>CHAPITRE 3 THÉORIE ET INSTRUMENTATION EN MS SUPRAMOLÉCULAIRE.....</b>	<b>21</b>
1 INSTRUMENTATION EN SPECTROMETRIE DE MASSE SUPRAMOLECULAIRE.....	21
1.1 <i>Présentation générale</i>	21
1.2 <i>Source d'ionisation électrospray (ESI)</i>	22
1.3 <i>Interface</i>	24
1.4 <i>L'analyseur de type temps de vol (TOF-Time Of Life)</i>	26
1.5 <i>Les différents types de détecteurs</i>	27
1.6 <i>La digitalisation du signal</i>	29
1.7 <i>Présentation des instruments utilisés en MS supramoléculaire</i>	31
<b>CHAPITRE 4 : THÉORIE ET INSTRUMENTATION EN IM-MS.....</b>	<b>33</b>
1 LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES DE MOBILITE IONIQUE.....	33

1.1	<i>Présentation des différentes cellules de mobilité ionique</i>	33
1.2	<i>Caractéristiques des différentes cellules de mobilité</i>	35
2	CARACTERISTIQUES DES CELLULES DE MOBILITE IONIQUE DE TYPE TWIMS .....	36
2.1	<i>Description et principe de fonctionnement de la cellule TWIMS du Synapt HDMS G1</i>	37
2.2	<i>Comparaison des cellules IMS des Synapt G1 et G2 HDMS</i>	40
2.3	<i>Acquisition et représentation des données</i>	42
<b>PARTIE 2 : OPTIMISATIONS EXPÉRIMENTALES ET INSTRUMENTALES POUR L'ANALYSE PAR MS ET IM-MS DE COMPLEXES SUPRAMOLÉCULAIRES EN BIOLOGIE.....</b>		<b>45</b>
<b>CHAPITRE 1 : PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS POUR LA MS ET L'IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRES.....</b>		<b>47</b>
1	CHOIX DU TAMPON .....	47
1.1	<i>Nature du tampon d'échange</i>	47
1.2	<i>Choix de la force ionique du tampon</i>	47
1.3	<i>Effet du pH sur la stabilité des complexes étudiés</i>	48
1.4	<i>Composés non volatils incompatibles avec la MS supramoléculaire</i>	50
2	CHOIX DE LA METHODE DE DESSALAGE .....	50
3	LES LIGANDS ET LEUR SOLUTION DE STOCKAGE : COMPATIBILITE AVEC L'ESI .....	52
<b>CHAPITRE 2 : OPTIMISATIONS INSTRUMENTALES EN MS SUPRAMOLÉCULAIRE SUR LE SYNAPT HDMS G2.....</b>		<b>55</b>
1	DESOLVATATION – MAINTIEN DES INTERACTIONS NON-COVALENTES EN PHASE GAZEUSE, UNE QUESTION DE COMPROMIS.....	55
1.1	<i>Potentiel d'accélération (Vc)</i>	55
1.2	<i>Pression dans l'interface (Pi)</i>	57
1.3	<i>Température en source</i>	57
2	PARAMETRES CRUCIAUX POUR LA TRANSMISSION DES COMPLEXES EN PHASE GAZEUSE .....	58
2.1	<i>Rôle du potentiel d'accélération et de la pression dans l'interface</i>	58
2.2	<i>Optimisation des paramètres de transmission du quadripôle (Quad Profile)</i>	59
2.3	<i>Tensions d'accélération des guides d'ions (Trap CE et Transfer CE)</i>	59
2.4	<i>Conclusion concernant les optimisations expérimentales</i>	61
3	CHOIX DU MODE DE DIGITALISATION DU SIGNAL .....	61
4	IMPORTANCE DE L'ÉTALONNAGE ET CHOIX DES ETALONS .....	62
<b>CHAPITRE 3 : OPTIMISATIONS INSTRUMENTALES EN IM-MS SUR LES INSTRUMENTS DE TYPE SYNAPT HDMS .....</b>		<b>63</b>
1	NATURE ET VALIDITE DES RESULTATS OBTENUS PAR IM-MS .....	63
1.1	<i>Différence de temps de passage des ions dans la cellule IMS et pouvoir séparateur</i>	63
1.2	<i>Les données quantifiables en IMS : les sections efficaces rotationnelles (CCS)</i>	64
2	L'OPTIMISATION DES PARAMETRES DE MOBILITE IONIQUE, UNE ETAPE CLE .....	71
2.1	<i>Compromis entre énergie transmise aux ions et transmission des ions</i>	71
2.2	<i>Compromis entre séparation IM-MS et temps de passage des ions dans la cellule IMS</i>	75
2.3	<i>Compromis entre séparation par IM-MS et énergie transmise aux ions</i>	76
2.4	<i>Stratégie d'optimisation en IM-MS : une question de compromis</i>	78
<b>CHAPITRE 4 : LES INFORMATIONS DÉDUITES DES ANALYSES PAR MS ET IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRES .....</b>		<b>79</b>
1	DIVERSITES DES INFORMATIONS OBTENUES PAR MS SUPRAMOLECULAIRE .....	79
1.1	<i>Détermination de stœchiométrie d'interaction et d'état d'oligomérisation d'une protéine</i>	79
1.2	<i>Évaluation de l'affinité des complexes en solution</i>	80
1.3	<i>Cinétique de formation des complexes</i>	82
1.4	<i>Évaluation de la force des interactions mises en jeu</i>	83
1.5	<i>Étude de l'association de complexes multiprotéiques par des expériences de dissociation suivies par MS supramoléculaire</i>	84

1.6	<i>Étude de la dynamique d'assemblage de protéines et de complexes non-covalents</i>	85
1.7	<i>Comparaisons des données de MS avec les données obtenues en solution</i>	86
2	INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES APPORTÉES PAR LES ANALYSES IM-MS .....	88
2.1	<i>Amélioration de la qualité des spectres IM-MS grâce au «Spectrum Cleaning»</i>	88
2.2	<i>Mise en évidence de l'hétérogénéité conformationnelle d'échantillons biologiques</i>	89
2.3	<i>Suivi de changements conformationnels par IM-MS</i>	91
2.4	<i>Comparaison de formes de protéines et de complexes non-covalents</i>	91
2.5	<i>Étude de la stabilité conformationnelle de biomolécules en phase gazeuse</i>	92
2.6	<i>Comparaison de données structurales de haute résolution aux données IM-MS</i>	93
<b>CHAPITRE 5 : COMPARAISONS DES DONNÉES OBTENUES SUR LES SYNAPT G1 ET G2 PAR MS ET IM-MS.....</b>		<b>97</b>
1	COMPARAISON DES SYNAPT G1 ET G2 PAR MS SUPRAMOLÉCULAIRE.....	97
2	COMPARAISON DES SYNAPT G1 ET G2 EN IM-MS.....	98
2.1	<i>Étude d'un système protéine/ligand par IM-MS sur les Synapt G1 et G2 HDMS.</i>	98
2.2	<i>Comparaison des séparations IM-MS sur les Synapt G1 et G2 HDMS lors de l'étude de peptides isobares ou de masses très proches</i>	100
2.3	<i>Conclusion</i>	104
2.4	<i>Valorisation</i>	105
<b>PARTIE 3: DE LA MS À L'IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRE POUR LA CARACTÉRISATION DE SYSTÈMES</b>		
<b>PROTÉINE/LIGAND .....</b>		<b>107</b>
<b>CHAPITRE 1 : ÉTUDE DES INTERACTIONS D'UNE PROTÉINE À DOIGTS DE ZINC : INTERACTIONS P1/ZN<sup>2+</sup> .....</b>		<b>109</b>
1	CONTEXTE BIOLOGIQUE DE L'ÉTUDE DE LA PROTEINE P1 .....	109
2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	110
3	STRATÉGIE ANALYTIQUE ET RÉSULTATS OBTENUS .....	111
3.1	<i>Caractérisation des interactions P1/Zn par MS supramoléculaire et par IM-MS</i>	111
3.2	<i>Essais préliminaires de localisation des acides aminés impliqués dans les doigts de zinc de la protéine P1</i>	116
3.3	<i>Effet d'un milieu oxydant sur la protéine P1</i>	122
4	CONCLUSION .....	123
5	VALORISATION .....	123
<b>CHAPITRE 2 : ÉTUDE D'UN COMPLEXE PROTÉINE/ACIDES NUCLÉIQUES : LE SYSTÈME TGT/ARN.....</b>		<b>127</b>
1	CONTEXTE BIOLOGIQUE DE L'ÉTUDE DE TGT.....	127
2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	129
3	RÉSULTATS .....	129
3.1	<i>Analyse de la protéine TGT seule</i>	129
3.2	<i>Déstabilisation de l'interface du dimère de la protéine TGT Zymomonas mobilis</i>	130
3.3	<i>Caractérisation de la protéine TGT Mus musculus (mTGT)</i>	133
3.4	<i>Caractérisation de la protéine TGT Humaine (hTGT)</i>	140
4	CONCLUSION .....	142
5	VALORISATION .....	143
<b>CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES PARAMÈTRES INSTRUMENTAUX DU COUPLAGE IM-MS POUR LA DÉTECTION DE FAIBLES CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS : ÉTUDE DU SYSTÈME BCL-XL/ABT-737 .....</b>		<b>145</b>
1	CONTEXTE BIOLOGIQUE DE L'ÉTUDE DES INTERACTIONS BCL-xL/ABT-737.....	145
2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	147

3	RESUME DE LA STRATEGIE MISE EN ŒUVRE ET DES RESULTATS OBTENUS .....	147
3.1	<i>Optimisation fine des paramètres instrumentaux</i>	147
3.2	<i>Une nouvelle méthode d'étalonnage pour un calcul plus précis des CCS</i>	150
3.3	<i>Mise en évidence de changements conformationnels fins par IM-MS</i>	151
4	CONCLUSION .....	152
5	VALORISATION .....	152

## CHAPITRE 4 : CARACTÉRISATION FINE PAR MS ET IM-MS SUPRAMOLÉCULAIRES D'UN SYSTÈME

### PROTÉINE/LIGANDS : EXEMPLE DU SYSTÈME PDF1B/LIGANDS.....155

1	PRESENTATION DU SYSTEME PDF1B/LIGANDS.....	155
1.1	<i>Intérêt de la recherche de ligands pour la protéine PDF1B</i>	155
1.2	<i>Les ligands et leurs caractéristiques</i>	156
1.3	<i>Objectifs de cette étude</i>	158
2	CARACTERISATION DES INTERACTIONS PDF1B/LIGANDS PAR MS SUPRAMOLECULAIRE.....	158
2.1	<i>Caractérisation de la protéine PDF1B par MS supramoléculaire</i>	158
2.2	<i>Détermination des stœchiométries d'interaction</i>	159
2.3	<i>Stabilité des interactions protéine/ligands en phase gazeuse (Vc50)</i>	161
2.4	<i>Détermination des affinités protéine/ligands en solution</i>	163
2.5	<i>Conclusion</i>	165
3	EXISTE-T-IL UN SECOND SITE DE FIXATION DU LIGAND RAS358 SUR LA PROTEINE PDF1B ?.....	165
3.1	<i>Spécificité des interactions entre PDF1B et les ligands Actinonine, RAS358 ou AB47</i>	165
3.2	<i>Compétition indirecte de deux ligands pour le site de fixation de la protéine PDF1B</i>	166
3.3	<i>Conclusion</i>	169
4	À LA RECHERCHE DE PREUVES DE L'EXISTENCE DU MECANISME DE SLOW TIGHT BINDING.....	170
4.1	<i>Expériences de compétitions indirectes en MS supramoléculaire</i>	170
4.2	<i>Utilisation du couplage IM-MS pour la caractérisation de changements conformationnels fins</i>	170
4.3	<i>Étude par IM-MS du système PDF1B/Ligands</i>	173
4.4	<i>Étude par IM-MS de l'effet de la mutation de la Glycine 41</i>	177
4.5	<i>Conclusion</i>	178
4.6	<i>Valorisation</i>	179
4.7	<i>Outils d'aide à la caractérisation des complexes protéine/ligands par MS : PLS</i>	179

## PARTIE 4 : VERS UNE INFORMATION CONFORMATIONNELLE POUR L'ÉTUDE DE COMPLEXES DE TRÈS HAUTS

### POIDS MOLÉCULAIRES.....185

## CHAPITRE 1 : DIFFICULTÉS LIÉES À L'ANALYSE DE COMPLEXES DE HAUTS POIDS MOLÉCULAIRES.....187

1	LES DIFFICULTES LIEES A L'ANALYSE DE PROTEINES DE HAUTS ET TRES HAUTS POIDS MOLECULAIRES PAR MS OU IM-MS. ....	187
1.1	<i>Préparation de l'échantillon</i>	187
1.2	<i>Choix du mode d'ionisation</i>	190
1.3	<i>Transmission des ions de m/z élevés sur les Synapt G1 et G2</i>	192
1.4	<i>Importance des modes de détection et de digitalisation pour l'étude des protéines de hauts poids moléculaires</i>	196
1.5	<i>Problématique liée à l'interprétation des spectres MS de ces protéines</i>	197
1.6	<i>Conclusion</i>	200
2	COMPARAISON DES SYNAPT G1 ET G2 POUR L'ANALYSE DE COMPLEXES DE TRES HAUTS POIDS MOLECULAIRES.....	201
2.1	<i>Étude du Csl par MS supramoléculaire</i>	201
2.2	<i>Étude de la protéine GroEL par MS supramoléculaire</i>	202

## CHAPITRE 2 : LA MOBILITÉ IONIQUE ET L'ANALYSE DE COMPLEXES DE TRÈS HAUTS POIDS MOLÉCULAIRES.....205

1	LES DIFFICULTES LIEES A L'ANALYSE DE PROTEINES DE HAUTS POIDS MOLECULAIRES PAR IMS.....	205
---	---	-----

1.1	<i>Perte de sensibilité lors du passage du mode MS au mode IMS</i>	205
1.2	<i>Optimisation de la transmission des ions en IMS</i>	205
1.3	<i>Diffusion dans la cellule de mobilité</i>	206
2	ÉTUDE DE LA PROTEINE GROEL PAR IM-MS .....	206
2.1	<i>Comparaison des Synapt G1 et G2</i>	206
2.2	<i>Comparaison de nos résultats à ceux de la littérature</i>	207
3	APPLICATION A UN SYSTEME INCONNU : EXEMPLE DE TSA-SRX.....	208
3.1	<i>Contexte biologique de l'étude</i>	208
3.2	<i>Analyse par MS supramoléculaire des complexes TsaSO<sub>2</sub>-Srx</i>	208
3.3	<i>Analyse par IM-MS supramoléculaire des complexes TsaSO<sub>2</sub>-Srx</i>	209
<b>CHAPITRE 3 : DONNÉES PRÉLIMINAIRES ISSUES DE L'ANALYSE DE RIBOSOMES PAR MS SUPRAMOLÉCULAIRE .....</b>		<b>213</b>
1	CONTEXTE BIOLOGIQUE DE L'ÉTUDE DES RIBOSOMES.....	213
2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	214
3	RÉSULTATS .....	215
3.1	<i>Analyse du ribosome par MS supramoléculaire</i>	215
3.2	<i>Essais préliminaires d'interaction entre le ribosome et la protéine TF</i>	221
4	CONCLUSION .....	223
5	VALORISATION .....	224
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>		<b>227</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>231</b>
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</b>		<b>249</b>
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE .....</b>		<b>253</b>



# Liste des principales abréviations

<b>AcNH<sub>4</sub></b> : Acétate d'ammonium	<b>NEM</b> : N-EthylMaleimide
<b>ADC</b> : <i>Analog-to-digital convertor</i>	<b>NME</b> : <i>N-terminale Methionine Excision</i>
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>PA</b> : <i>Projection approximation</i>
<b>Apo</b> : Protéine non liée (sans ligand)	<b>PDF1B</b> : <i>PeptideDeformylase 1B</i>
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>Pi</b> : Pression dans la première zone de pompage
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>PTM</b> : <i>PostTranslationalModification</i>
<b>CCS</b> : <i>Collision Cross Section</i>	<b>Q</b> : Quadripôle
<b>CID</b> : <i>Collision-Induced Dissociation</i>	<b>RF</b> : Radiofréquence
<b>CsI</b> : Iodure de Césium	<b>Rs</b> : Pouvoir séparateur
<b>DMSO</b> : <i>DiMethylSulfOxide</i>	<b>SRIG</b> : <i>Stacked Ring Ion Guide</i>
<b>DTT</b> : <i>DiThioThrétol</i>	<b>t<sub>D</sub></b> : Temps de passage des ions dans la cellule IMS
<b>EDTA</b> : <i>Ethylene diamine tetra-acétique</i>	<b>TDC</b> : <i>Time-to-digital convertor</i>
<b>EHSS</b> : <i>Exact Hard Sphere Scattering</i>	<b>TF</b> : <i>Trigger Factor</i>
<b>ESI</b> : Ionisation électrospray	<b>Tgt</b> : <i>tRNA-guanine transglycosylase</i>
<b>FWHM ou H<sub>1/2</sub></b> : largeur des pics à mi-hauteur ( <i>Full width at half maximum</i> ).	<b>TM</b> : <i>Trajectory Method</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Peroxide d'hydrogène	<b>TOF</b> : <i>Time-Of-Flight</i>
<b>HEPES</b> : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	<b>Transfer CE</b> : Tension appliquée à l'entrée de la cellule de transfert du Synapt HDMS
<b>Holo</b> : Protéine en interaction avec un ligand	<b>Trap Bias</b> : Tension appliquée entre la cellule de collision et la cellule de mobilité du Synapt
<b>IAA</b> : <i>IodoAcétAmide</i>	<b>Trap CE</b> : Tension appliquée à l'entrée de la cellule de collision du Synapt
<b>IMS</b> : Spectrométrie de mobilité ionique	<b>Tris</b> : 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol
<b>IM-MS</b> : Couplage mobilité ionique-spectrométrie de masse	<b>Vc</b> : Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage
<b>MAP</b> : <i>Methionine AminoPeptidase</i>	<b>ZnF</b> : Protéine à doigts de zinc
<b>MCP</b> : <i>Multichannel plate</i>	
<b>MS</b> : Spectrométrie de masse	
<b>MS/MS</b> : Spectrométrie de masse en tandem	



## Introduction générale

---

L'ensemble des processus cellulaires de notre organisme fait intervenir de nombreux complexes multiprotéiques. Ces derniers agissent de concert grâce à l'existence d'interactions non-covalentes, dont la force et la durée varient au cours du temps<sup>1</sup>. Par conséquent, la compréhension de ces interactions et de leurs dynamiques d'assemblage permettrait de mieux comprendre ces processus et ainsi d'apporter des informations essentielles pour la santé humaine.

Parmi les différentes techniques analytiques permettant d'étudier des systèmes macromoléculaires complexes et dynamiques, la spectrométrie de masse (MS) occupe une place prépondérante grâce aux développements de techniques d'ionisation douce telles que l'électrospray<sup>2</sup>. L'approche protéomique permet d'identifier les protéines et de les caractériser finement grâce à l'étude de leur structure primaire. Depuis l'apparition des approches d'échange hydrogène/deutérium, la MS permet également d'aborder l'étude des zones en interaction au sein des biomolécules. En parallèle, l'approche MS supramoléculaire permet d'étudier les interactions non-covalentes entre les protéines. L'évolution de cette approche, développée au début des années 1990<sup>3,4</sup>, est étroitement liée aux développements instrumentaux réalisés ces dernières années. Elle a été largement développée au sein de notre laboratoire et est actuellement en plein essor, tant dans l'industrie pharmaceutique<sup>5</sup> que dans le milieu académique<sup>6</sup>. Cette technique robuste offre de nombreuses applications telles que l'étude d'états d'oligomérisation de protéines, l'étude de stœchiométries, d'affinités et de spécificités d'interactions, ou encore l'étude de réseaux d'interactions par reconstitution progressive de complexes<sup>6-8</sup>. En 2006, le développement du couplage mobilité ionique-spectrométrie de masse (IM-MS) a permis d'obtenir des informations sur la conformation des biomolécules et de leurs complexes associés. Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont permis de suivre des changements conformationnels induits par la fixation de petites molécules sur des complexes multiprotéiques de hauts poids moléculaires (100-300 kDa)<sup>9</sup>. Toutefois, de nombreux développements méthodologiques sont encore nécessaires pour amener cette technologie vers une utilisation plus adaptée en biologie. En effet, le succès actuel de cette technique dépend en grande partie des optimisations, mais aussi des développements instrumentaux, réalisés ces dernières années.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de contribuer au développement des approches MS et IM-MS supramoléculaires pour la caractérisation de complexes non-covalents sur des instruments de différentes générations (Synapt G1 et G2 HDMS, Waters). Plus particulièrement,

il s'agit de développer des stratégies d'analyse et d'optimisation instrumentales et de les mettre en application dans différentes problématiques biologiques, allant de la caractérisation de complexes protéine/ligands jusqu'à la caractérisation de complexes de hauts et de très hauts poids moléculaires, composés de partenaires de natures différentes. Ces développements méthodologiques ont ensuite été appliqués à la caractérisation de changements conformationnels subtils ou à l'étude de complexes de très hauts poids moléculaires par IM-MS.

⇒ **La première partie** a pour but de replacer ce travail de thèse dans le contexte actuel des connaissances et des compétences acquises en MS et IM-MS supramoléculaires grâce à une étude bibliographique.

⇒ **La deuxième partie** est consacrée aux optimisations expérimentales et instrumentales pour l'analyse par MS et IM-MS supramoléculaires de complexes en biologie. Nous détaillerons au cours de cette partie l'une des étapes clés des analyses MS qu'est la préparation des échantillons. Puis nous aborderons les différentes optimisations instrumentales en MS et IM-MS, sur un instrument de nouvelle génération : le Synapt HDMS G2. Enfin, nous présenterons les informations déduites des analyses MS et IM-MS et plus particulièrement l'apport du couplage IM-MS pour la séparation de mélanges complexes.

⇒ **La troisième partie** se rapporte à l'analyse par MS et IM-MS en conditions natives de complexes protéine/ligands. Divers exemples portant sur l'étude de complexes protéine/métaux, protéine/acides nucléiques et protéine/petites molécules seront abordés dans cette partie. Ils permettront de montrer l'apport des techniques MS et IM-MS pour le suivi de la dynamique de formation de complexes et pour la caractérisation fine de changements conformationnels très faibles notamment dans le contexte d'études de criblage de ligands.

⇒ **La quatrième partie de ce travail** est finalement consacrée aux développements méthodologiques en MS et IM-MS supramoléculaires pour l'analyse de complexes de hauts et très hauts poids moléculaires. Les différents développements méthodologiques et instrumentaux nécessaires à ces analyses seront développés au travers de différents exemples d'application tels que la protéine chaperone GroEl (800 kDa) ou les ribosomes (2.3 Millions de Daltons).

---

# *Partie 1 : Introduction Bibliographique*

---

**Chapitre 1 : L'analyse de complexes supramoléculaires en biologie**

**Chapitre 2 : La MS, une technique centrale pour l'étude des complexes de biomolécules**

**Chapitre 3 : Théorie et instrumentation en MS supramoléculaire**

**Chapitre 4 : Théorie et instrumentation en IM-MS**



# Chapitre 1 : L'analyse de complexes supramoléculaires en biologie

---

Ce premier chapitre a pour but de rappeler l'importance des différentes interactions et liaisons qui existent en biologie ainsi que les principales méthodes biochimiques et biophysiques actuellement disponibles pour les mettre évidence.

## 1 L'importance des liaisons et interactions en biologie

---

Au cours de la vie, la plupart de nos cellules vont se diviser, se différencier, puis entrer en sénescence. D'autres adhéreront ou encore migreront au sein de notre organisme. Toutes ces fonctions essentielles sont coordonnées grâce à la présence de facteurs extra- et intracellulaires auxquels la cellule est capable de répondre<sup>10</sup>. Les interactions permettant la reconnaissance et l'assemblage de différents partenaires (protéines, oligonucléotides, ligands naturels, métaux ou peptides) sont des interactions non-covalentes de faibles énergies. Elles jouent notamment un rôle essentiel dans le maintien de la structure tridimensionnelle des biomolécules, souvent à l'origine de leur activité cellulaire<sup>11</sup>. Les interactions non-covalentes sont dites faibles par opposition aux liaisons covalentes dites fortes. En effet, contrairement aux liaisons covalentes où les atomes partagent un ou plusieurs électrons, les liaisons faibles non-covalentes résultent de forces d'attraction et de répulsion, n'impliquant pas de partage d'électrons entre les atomes impliqués dans l'interaction.

### 1.1 Liaisons covalentes

---

Ces liaisons de l'ordre de quelques centaines de  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  permettent le maintien de la structure primaire des protéines. En effet, les différents acides aminés constituant les protéines sont liés par des liaisons amides entre les groupements  $\alpha\text{-COOH}$  et  $\alpha\text{-NH}_2$  de deux acides aminés.

D'autres liaisons covalentes peuvent se former au niveau des acides aminés. C'est notamment le cas des liaisons disulfures qui se forment entre deux groupements thiols de cystéines oxydées. Ces liaisons peuvent se former entre des cystéines d'une même protéine et jouent un rôle structural en guidant le repliement de la chaîne polypeptidique (structure secondaire des protéines) ou entre protéines, conduisant à la formation d'un complexe covalent<sup>12</sup>. En fonction de l'environnement de certaines protéines, les cystéines peuvent se trouver sous forme oxydées ou réduites. Cette alternance peut alors avoir un rôle dans l'activité de ces protéines<sup>13, 14</sup>.

## 1.2 Liaisons non-covalentes

Les liaisons non-covalentes sont des liaisons dont l'énergie est comprise entre 0 et 40 kJ.mol<sup>-1</sup>, qui jouent un rôle important dans la formation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines. Elles sont de natures très diverses (Figure 1) et diffèrent notamment en terme de forces d'interactions.

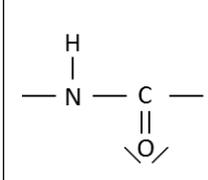
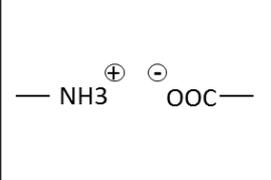
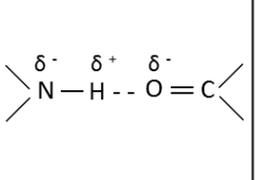
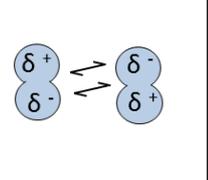
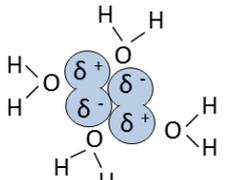
Liaisons covalentes	Liaisons électrostatiques	Liaisons hydrogènes	Liaisons Van der Waals	Interactions hydrophobes
				

Figure 1: Présentation des différentes interactions covalentes et non-covalentes rencontrées en biologie.

### a. Interactions de type électrostatiques (ou ioniques)

Ces liaisons résultent de l'attraction forte qui existe entre deux charges ponctuelles de signes opposés. Ces interactions sont fonction de la distance interatomique et de la permittivité du milieu. Ainsi, plus la distance entre les atomes est importante, plus les interactions seront faibles. La distance optimale pour des interactions électrostatiques est de l'ordre de 3 Å. Ces interactions faibles en milieu aqueux deviennent aussi fortes que des liaisons covalentes dans le vide<sup>15</sup>.

### b. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes résultent de l'interaction entre un atome fortement électronégatif (O, N, S et F), portant au moins un doublet non liant, et un atome d'hydrogène lié à un atome fortement électronégatif. Ces liaisons orientées sont d'autant plus fortes que le donneur et l'accepteur d'hydrogène sont alignés. Elles permettent de stabiliser la structure secondaire des protéines telle que les hélices  $\alpha$  ou encore de stabiliser les doubles brins d'ADN.

### c. Interaction de type Van der Waals

Les interactions de type Van der Waals sont le résultat d'interactions entre des dipôles permanents ou induits. Elles sont classées en 3 catégories en fonction de la nature des dipôles<sup>15</sup>.

- **Les interactions de Keesom** (interaction entre dipôles permanents) interviennent entre des molécules polaires et sont d'autant plus fortes que le moment dipolaire des molécules est élevé.
- **Les interactions de Debye** (interaction entre un dipôle et un dipôle induit) apparaissent lorsqu'une molécule polaire provoque la polarisation du nuage électronique d'une

moléculaire apolaire. Ces interactions sont d'autant plus fortes que le moment dipolaire de l'espèce polaire est grand et que la polarisabilité de l'espèce apolaire est grande.

- **Les interactions de London** (interaction entre dipôles induits) interviennent entre des molécules apolaires. La dissymétrie du nuage électronique de l'une des molécules provoque la déformation du nuage électronique de l'autre molécule. Ces interactions entre deux espèces apolaires sont d'autant plus fortes que les espèces considérées sont polarisables.

Les interactions de type Van der Waals sont des forces attractives, non spécifiques qui existent même en absence de charges. Ces interactions sont faibles, prises individuellement, mais de par leur nombre, leur contribution est non négligeable en phase gazeuse. Ainsi, ce type de liaisons peut jouer un rôle important dans la stabilité et le repliement des protéines.

#### d. Interactions de type hydrophobe

Les interactions hydrophobes correspondent à l'agrégation des molécules non polaires en milieu aqueux. Ces liaisons non spécifiques permettent le repliement des protéines sous forme d'oligomères et participent à la formation des bicouches lipidiques au niveau des membranes. La force de ces interactions diminue considérablement lors du passage dans le vide du fait de l'absence de solvant.

#### e. Interactions totales d'attraction et de répulsion (liaisons de coordinations)

Ces interactions s'établissent entre une base de Lewis, donnant un électron, et un acide de Lewis accepteur d'électrons. Ces interactions sont souvent rencontrées lors des interactions entre une protéine et un cation métallique accepteur d'électrons. Ces interactions sont relativement fortes et varient de quelques  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  à quelques centaines de  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

## 2 Les principales méthodes biochimiques et biophysiques utilisées lors de l'étude de complexes biologiques

---

Les liaisons non-covalentes jouent un rôle très important d'un point de vue structural, mais aussi fonctionnel au sein des complexes protéiques. Bien que ces complexes puissent être détectés au sein d'une cellule, les relations qui existent entre les différents partenaires d'un complexe sont peu connues. En effet, il est difficile d'obtenir des informations sur ces complexes qui évoluent de manière dynamique dans le temps et dans l'espace, tant au niveau de leur organisation que de leur composition<sup>16</sup>. De plus, ces complexes peuvent avoir des fonctions diverses et être régulés par des liaisons avec différents partenaires telles que des petites molécules<sup>17</sup>, des ions métalliques<sup>18</sup> ou encore par des modifications post-traductionnelles (PTM)<sup>19</sup>.

Dans un premier temps, un certain nombre de techniques biochimiques peuvent être utilisées pour identifier les partenaires d'un complexe puis les séparer. Les différents partenaires peuvent

notamment être identifiés par co-immunoprécipitation puis être séparés en fonction de leur taille, par filtration sur gel ou centrifugation ; en fonction de leur charge, grâce à des colonnes échangeuses d'ions ; ou en fonction de leur affinité pour des ligands notamment par chromatographie d'affinité.

Afin d'obtenir des informations plus précises, plusieurs techniques biophysiques, qui diffèrent en fonction de leur résolution, de la taille des protéines étudiées et des temps d'analyse, peuvent ensuite être mises en œuvre pour étudier les interactions qui existent au sein de ces complexes biologiques.

## **2.1 Dichroïsme circulaire**

---

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'un échantillon à absorber différemment la lumière polarisée circulaire droite et gauche. Le spectre dichroïque obtenu correspond à la différence d'absorbance entre ces deux types de lumière, pour chaque longueur d'onde.

Dans le cas des protéines, les signaux dichroïques dans l'UV lointain (gamme 180-260 nm, zone d'absorption de la liaison peptidique) permettent d'obtenir des informations sur leurs structures secondaires (hélices  $\alpha$  et feuilletts  $\beta$ ) ; ceux obtenus dans l'UV proche (250-330 nm, zone d'absorption des acides aminés aromatiques) fournissent des informations sur l'environnement de ses acides aminés aromatiques. Cette technique permet d'estimer la quantité de différentes conformations présentes en solution, d'étudier l'effet de l'environnement (pH, température, effet de ligands, etc..) sur la structure d'une molécule.

## **2.2 Résonance plasmonique de surface (SPR)**

---

La résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance*- SPR) est une technique permettant de suivre l'association et la dissociation de deux molécules en temps réel afin de déterminer des stœchiométries d'interaction et des constantes d'affinités entre deux molécules. Un récepteur est greffé sur un biocapteur en verre, recouvert d'une fine couche de métal riche en électrons libres, mis en contact avec un analyte ligand, circulant en flux continu à la surface du biocapteur. L'interface métal/liquide est ensuite illuminée par une lumière polarisée pour laquelle il existe un angle d'incidence capable d'entraîner l'entrée en résonance des électrons libres du métal. Cet angle de résonance, qui dépend de l'indice de réfraction de l'environnement proche de l'interface métal/liquide, conduit à une chute de l'intensité de l'onde réfléchie. Par conséquent, lors d'interactions entre le récepteur immobilisé et le ligand en solution, une variation de l'angle de résonance, proportionnelle à la quantité d'analyte fixé sur le récepteur immobilisé, sera mise en évidence<sup>20, 21</sup> (Figure 2).

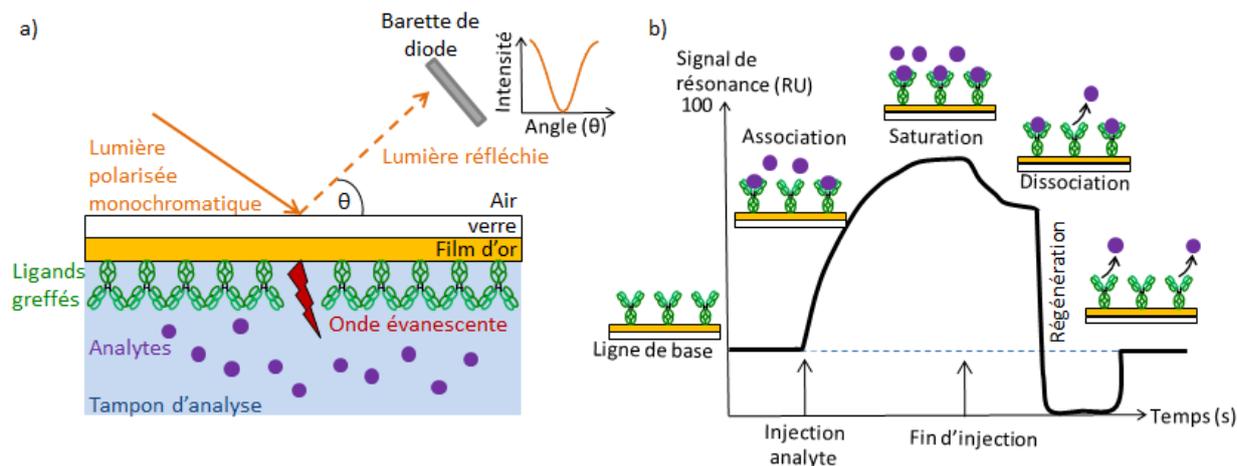


Figure 2 : Présentation du principe de la SPR (a) et des résultats déduits de cette technique (b).

Le suivi en temps réel de l'étape d'association (flux de ligand dilué dans le tampon d'analyse), puis de l'étape de dissociation (flux de tampon seul) du complexe permet de déterminer à la fois des stœchiométries d'interaction, ainsi que des constantes cinétiques d'association et de dissociation. L'ensemble de ces informations permet ensuite d'accéder à la constante d'affinité de complexes non-covalents (Figure 2). L'une des limitations de cette technique provient du greffage de l'un des partenaires sur le biocapteur, ce qui peut induire des biais lors d'études d'interactions, en réduisant la flexibilité de la molécule immobilisée ou en altérant les interactions entre le récepteur et son ligand.

### 2.3 Spectroscopie de fluorescence

Les méthodes spectroscopiques sont souvent utilisées pour mettre en évidence des interactions moléculaires. Cette technique est basée sur l'excitation, par un faisceau lumineux UV ou visible, des électrons d'un analyte qui passent alors d'un état fondamental à un état excité de plus haute énergie. La spectroscopie de fluorescence mesure la quantité de lumière émise lors du retour des électrons excités à l'état fondamental.

Parmi ces techniques, la technique de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) permet de mettre en évidence l'existence d'un transfert d'énergie entre des fluorophores à proximité l'un de l'autre ( $< 10$  nm). Il est alors possible de mettre en évidence des transferts de fluorescences entre deux partenaires proches ou lors de changements conformationnels au sein d'une molécule<sup>22,23</sup>. Enfin, cette technique permet d'étudier des interactions protéine/protéine directement au sein des cellules vivantes<sup>24</sup>.

Les techniques basées sur la fluorescence sont très sensibles et peu consommatrices en matériel biologique. Cependant, lorsque l'une des molécules étudiées ne possède pas de propriétés de fluorescences intrinsèques, une sonde fluorescente doit être greffée, pouvant induire des biais lors des études d'interactions.

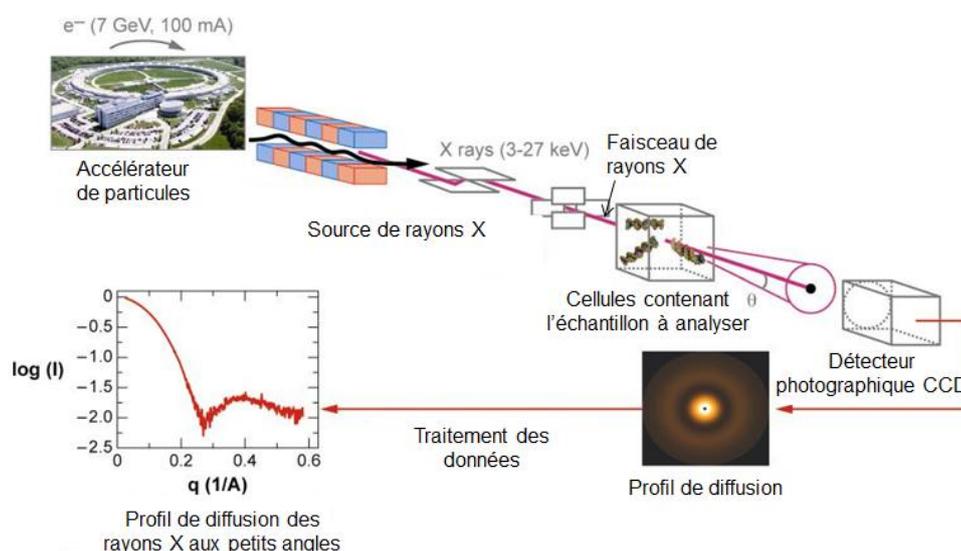
## 2.4 Microcalorimétrie

La microcalorimétrie isotherme (*Isothermal Titration Calorimetry, ITC*) est une technique biophysique permettant de mesurer la formation et la dissociation de complexes moléculaires. Elle est basée sur la mesure des échanges thermiques se produisant au cours d'une réaction de complexation entre un ligand et un récepteur. Les quantités de chaleur mesurées au cours de la complexation permettent d'obtenir une isotherme de liaison et de déterminer les paramètres thermodynamiques de la réaction (variations d'énergie libre ( $\Delta G$ ), d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'entropie ( $\Delta S$ )), permettant alors le calcul de constantes d'affinité et de stœchiométries d'interaction. L'ITC permet notamment de préciser la nature des forces contribuant à la formation des complexes (électrostatiques ou hydrophobes).

Cette technique fiable, rapide et ne nécessitant pas de marquage s'est particulièrement développée ces dernières années notamment avec la commercialisation de nanoITC permettant d'utiliser de faibles quantités d'échantillons<sup>25, 26</sup>.

## 2.5 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles (*Small angle X-ray scattering- SAXS*) consiste à mesurer l'intensité des rayons X diffusés par un échantillon en solution (Figure 3)<sup>27</sup>.



**Figure 3 : Schéma du principe de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).** Les données de SAXS présentent l'intensité du signal enregistrée en fonction du vecteur d'onde  $q$  (où  $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$  où  $2\theta$  correspond à une diffusion totale et où  $\lambda$  correspond à la longueur des rayons X). D'après<sup>28</sup>.

Cette technique permet de déterminer le rayon de gyration de biomolécules et d'accéder, après modélisation, à des informations de basse résolution sur la structure tridimensionnelle de biomolécules en solution<sup>28, 29</sup>.

## 2.6 Microscopie cryo-électronique

---

Cette technique consiste à observer un échantillon conservé à basse température. Elle permet l'examen d'un échantillon biologique non marqué, hydraté et non fixé, directement sous microscopie électronique à transmission. En pratique, une suspension aqueuse d'un échantillon est appliquée en un film extrêmement fin sur une grille puis refroidit à l'azote liquide. La combinaison d'une centaine d'images permet ensuite de reconstituer un modèle tridimensionnel de l'échantillon étudié avec une résolution quasi atomique. Cette technique particulièrement développée ces dernières années a notamment été utilisée lors de l'étude de ribosomes<sup>30-32</sup>.

## 2.7 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

---

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique basée sur l'interaction entre un champ magnétique et des noyaux atomiques à spin non nul. Cette technique permet de déterminer la structure tridimensionnelle de biomolécules en solution. Elle permet ainsi de déterminer les surfaces d'un complexe qui interagissent entre elles. Longtemps limitée aux protéines ayant une masse inférieure à 30 kDa, elle peut désormais être utilisée pour des protéines de masses plus élevées<sup>33, 34</sup>. De plus, la RMN a récemment été mise en œuvre pour mettre en évidence des changements conformationnels de l'ordre de la milliseconde<sup>35</sup>. Cependant, cette technique consomme des quantités importantes de matériel biologique, de l'ordre du milligramme par analyse et ne permet d'analyser que des interactions avec une affinité de l'ordre du millimolaire ou de quelques micromolaires.

## 2.8 Cristallographie aux Rayons X (RX)

---

La cristallographie aux rayons X est la technique la plus résolutive pour étudier la structure tridimensionnelle des biomolécules en phase gazeuse. Cette technique, basée sur la diffraction des rayons X par un échantillon cristallisé, permet d'obtenir des informations structurales à l'échelle atomique. L'étude précise de la structure de ces biomolécules permet ainsi d'identifier les zones d'interactions entre différentes molécules, mais aussi d'identifier d'éventuels sites de fixation de ligands de synthèse. La cristallographie est la technique la plus utilisée dans les étapes de « *drug design* » pour sélectionner les meilleures molécules actives. Cependant, l'obtention de cristaux et la nécessité de disposer de quantités importantes d'échantillons restent les principales limitations de cette technique<sup>36</sup>. Afin de faciliter le criblage de ligands d'une protéine cible, les systèmes et étapes de cristallisation ont été miniaturisés et automatisés ces dernières années.

## 2.9 Comparaison des techniques biophysiques utilisées pour l'étude des biomolécules

---

Bien que l'ensemble des techniques présentées précédemment permette d'obtenir des informations concernant les stœchiométries et affinités d'interaction en solution, mais aussi concernant la structure tridimensionnelle de complexes, la mise en œuvre de ces techniques présente quelques inconvénients tels que :

- **les importantes quantités de matériel nécessaires.** Les analyses par cristallographie et RMN nécessitent notamment des quantités de protéines purifiées de l'ordre du milligramme.
- **Les difficultés liées à la préparation d'échantillons.** L'obtention de cristaux de haute qualité pour les études de cristallographie reste l'un des obstacles majeurs de cette technique. La fixation de molécules fluorescentes sur les analytes étudiés ou l'immobilisation des analytes sur des supports fonctionnalisés sont des obstacles à l'analyse par FRET ou SPR.
- **La diversité des résolutions obtenues.** Seules la cristallographie et la RMN permettent d'obtenir des informations à l'échelle atomique. Parmi l'ensemble des autres techniques, seules les techniques de dichroïsme circulaire, de microscopie cryo-électronique et de fluorescence permettent d'obtenir des informations détaillées sur la topologie des complexes étudiés (mise en évidence de structures secondaires).
- **La variation des temps d'analyse.** Ils varient d'une technique à l'autre et doivent être pris en compte lors de l'analyse de composés par des techniques analytiques classiques.
- **La complexité des interprétations.** Certaines de ces techniques nécessitent l'utilisation de modèles mathématiques complexes pour l'obtention d'informations de stœchiométrie et de constantes d'affinité.

## 3 Conclusion

---

Le fonctionnement des systèmes biologiques est basé sur l'existence de complexes protéiques capables d'interagir entre eux. Les mécanismes d'assemblage et de reconnaissance de ces complexes impliquent de nombreuses interactions non-covalentes. L'identification et la compréhension des liens qui existent entre ces complexes sont actuellement un défi scientifique notamment en raison de l'évolution constante de ces interactions au niveau cellulaire. Afin d'obtenir des informations concernant ces interactions, plusieurs techniques analytiques ont été développées ces dernières années. Toutefois, ces approches directes ne permettent pas d'étudier facilement un système dynamique (problèmes d'hétérogénéité des échantillons, de flexibilité, de polydispersité) et nécessitent de grandes quantités d'échantillons ainsi que des complexes hautement purifiés<sup>1, 37, 38</sup>. Les recherches ont donc évolué vers le développement de technologies hauts débits capables d'évaluer la topologie et la structure des complexes<sup>37</sup> telle que la spectrométrie de masse (MS).

## Chapitre 2 : La MS, une technique centrale pour l'étude des complexes de biomolécules

---

Les approches classiques de biologie structurale ne permettent pas de répondre à l'ensemble des questionnements en biologie notamment en ce qui concerne la compréhension des réseaux d'interactions qui existent au niveau cellulaire. En effet, la caractérisation structurale de complexes multiprotéiques nécessite l'association d'analyses permettant d'étudier des mélanges complexes, hétérogènes et évolutifs. Dans ce contexte, les avancées récentes en terme de sensibilité, de rapidité et de précision de mesure ont permis de placer la MS comme une technique clé dans le domaine de la biologie structurale en apportant des informations essentielles concernant les complexes multiprotéiques (dynamique, structure) présents au niveau physiologique. En parallèle des développements instrumentaux, l'intégration de nouvelles techniques analytiques et chimiques a permis de renforcer les capacités de la MS pour la caractérisation d'échantillons hétérogènes et l'obtention d'informations structurales.

### 1 L'analyse protéomique au service de la caractérisation de complexes

---

Différentes approches utilisant la MS ont donc été développées au cours de ces dernières années pour permettre l'étude structurale des complexes protéiques supramoléculaires. Parmi ces différentes approches, nous citerons : la technique d'échange hydrogène-deutérium (HDX)<sup>39-43</sup>, les expériences de crosslinking (CXL)<sup>44-46</sup>, le marquage oxydatif (OFP)<sup>47,48</sup>, la protéolyse limitée<sup>49,50</sup>, la purification par affinité<sup>51,52</sup> et la mobilité ionique (IMS)<sup>53</sup>.

#### 1.1 Identification des protéines constitutives de complexes par des approches protéomiques

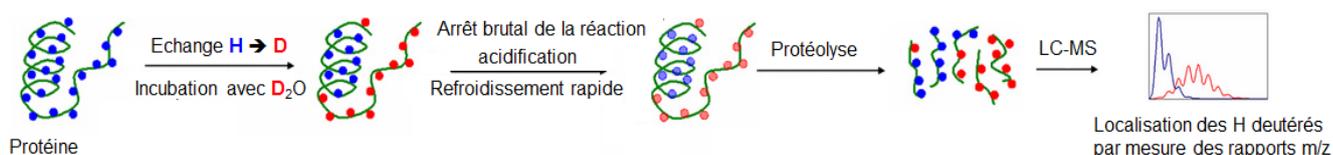
---

L'une des premières étapes dans l'étude de complexes multiprotéiques est l'identification des différents partenaires du complexe. Pour cela, les complexes, isolés par des techniques chromatographiques ou électrophorétiques en conditions non-dénaturantes, sont soumis à une séparation sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes afin de séparer les différentes protéines de ces derniers. Les approches MS vont ensuite jouer un rôle prépondérant dans l'identification et la caractérisation de la structure primaire de ces protéines<sup>51</sup>, par combinaisons de digestions enzymatiques et d'analyses MS des peptides produits (= *Bottom-Up*)<sup>54</sup> ou par des techniques de *Top Down* (traitement de protéines intactes)<sup>55</sup>.

Une nouvelle technique est actuellement en cours de développement en MS, il s'agit de la LC-IMS-MS<sup>56-58</sup>. Cette technique a pour but d'augmenter le nombre de peptides identifiés au cours de l'analyse d'un mélange complexe grâce à une étape de séparation supplémentaire par mobilité ionique. Nous verrons dans la suite de ce travail de thèse que l'utilisation de l'IMS permet de simplifier l'interprétation des spectres MS/MS grâce à la présence d'une cellule de mobilité.

## 1.2 L'échange hydrogène/deutérium (HDX)

Le couplage HDX-MS permet de déterminer quantitativement le nombre d'hydrogènes échangés en présence d'un solvant deutéré<sup>39-43</sup> dans le but de réaliser l'analyse topologique d'une protéine au sein d'un complexe supramoléculaire (Figure 4). En effet, les protons situés en surface ou ne participant pas à des liaisons intermoléculaires seront rapidement échangés alors que ceux impliqués dans une liaison s'échangeront plus lentement. Le taux d'incorporation du deutérium varie donc selon les régions de la protéine. Cet échange réalisé en conditions non-dénaturantes, doit être arrêté par abaissement brutal du pH et de la température pour éviter les phénomènes de ré-échange. Les échantillons deutérés et non deutérés sont ensuite analysés par des techniques de LC-MS classiques puis comparés afin de mettre en évidence les zones d'interactions existantes au sein d'un complexe protéique.



**Figure 4 : Principe du couplage HDX-MS.** 1) les atomes d'hydrogène non engagés dans des interactions moléculaires sont échangés avec le solvant deutéré dans lequel les protéines sont incubées. L'échange des atomes d'H par des atomes D conduit à une augmentation de la masse des protéines au cours du temps. La probabilité qu'un atome d'H soit échangé est fonction de la structure de la protéine et de son accessibilité au solvant. 2) arrêt brutal de la réaction 3) digestion enzymatique des protéines 4) séparation et identification des peptides par LC-MS.

Cette technique présente un certain nombre de difficultés telles que la dilution des échantillons lors de l'échange HDX, des problèmes de reproductibilité du marquage, des problèmes liés à la digestion en milieu acide ainsi que des difficultés liées à l'interprétation des données HDX<sup>11</sup>. Des développements, permettant d'améliorer cette technique, ont donc été réalisés ces dernières années telles que l'optimisation des conditions d'échange et de digestion<sup>59, 60</sup>, ainsi que l'utilisation de techniques de fragmentation telles que l'ETD (*Electron Transfer Dissociation*) ou l'ECD (*Electron Capture Dissociation*)<sup>61, 62</sup>. Ces récents développements ont permis d'étudier des changements conformationnels induits par la fixation de ligands<sup>63, 64</sup> et de suivre la dénaturation puis la renaturation de protéines<sup>65, 66</sup>. De plus, cette technique semble prometteuse pour l'étude des protéines membranaires comme le montrent les résultats obtenus sur des récepteurs couplés aux protéines G<sup>67</sup>.

### 1.3 Le marquage par oxydation (OFP)

---

Le couplage OFP-MS (*Oxidative FootPrinting-MS*) permet l'étude de l'état conformationnel d'un complexe protéique grâce une oxydation chimique modifiant de manière covalente des acides aminés exposés au solvant<sup>68</sup>. Cette oxydation dépend donc de la surface exposée et de la réactivité des acides aminés. L'analyse des fragments peptidiques obtenus après digestion permet ensuite d'obtenir une information structurale et dynamique concernant les protéines en solution.

### 1.4 Utilisation du Cross-Linking (CXL)

---

La technique de CXL-MS<sup>69</sup> permet de déterminer les interactions présentes au niveau de régions flexibles des protéines en solution, par réticulation ou marquage chimique (*Cross-Linking*). Elle permet ainsi d'identifier les zones d'interaction au sein d'une protéine et entre protéines. Le développement de nouveaux agents pontants a permis d'étendre les applications de cette technique à l'étude de la structure quaternaire des protéines *in vivo*<sup>70,71</sup>.

Cette technique est prometteuse pour l'étude structurale des protéines, mais nécessite encore de développements notamment en ce qui concerne le contrôle des réactions de marquage, la détection des peptides pontés ainsi que les difficultés liées au manque d'outils bio-informatiques pour l'interprétation automatique des données<sup>45</sup>.

### 1.5 Conclusion

---

Les différentes approches présentées dans cette partie présentent un fort potentiel pour la caractérisation de complexes supramoléculaires et pour l'obtention d'informations structurales à des niveaux de résolutions variables.

De plus, ces techniques présentent l'avantage de pouvoir être appliquées à des échantillons hétérogènes présents à des concentrations physiologiques et dont la composition est transitoire. Cependant, l'ensemble de ces techniques présente encore un certain nombre d'inconvénients. Les conditions expérimentales sont délicates à mettre en œuvre (choix des agents pontants (CXL) et des espèces réactives (OPF), maîtrise des conditions d'échanges (HDX)) et la compréhension précise des interconnexions existant au sein des complexes est très longue à obtenir. Des développements bio-informatiques sont donc encore nécessaires pour faciliter l'interprétation des données obtenues après CXL ou échange HDX notamment en cas de réaction incomplète. De plus, il est souvent nécessaire de disposer d'informations structurales pour la réalisation de modèle tridimensionnel par homologie. Enfin, l'ensemble de ces techniques est soumis à tous les inconvénients liés aux approches protéomiques classiques (difficultés liées à la préparation d'échantillons, existence des protéines dans les banques de données, discrimination des faux positifs...).

En parallèle de ces différentes techniques basées sur l'analyse des complexes protéiques en conditions dénaturantes, notre laboratoire ainsi que d'autres ont développé depuis plusieurs années des approches de MS supramoléculaire pour l'étude de complexes non-covalents.

## 2 Les approches MS supramoléculaires pour l'étude de complexes non-covalents

---

### 2.1 Les développements instrumentaux en MS supramoléculaire

---

Depuis les expériences de Thomson réalisées à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle marquant les débuts de la MS avec la découverte de l'électron puis la construction en 1912 du premier spectromètre de masse, de nombreux développements instrumentaux et expérimentaux ont été réalisés en MS, notamment dans les domaines électroniques et informatiques <sup>72, 73</sup>.

Les principaux développements instrumentaux en MS supramoléculaire sont rappelés ci-dessous :

- ⇒ **1984** : Développement de l'ionisation ESI pour l'étude de biomolécules (Fenn J : Prix Nobel 2002) <sup>74</sup>. Le concept de cette source ayant été proposé par Dole en 1968 <sup>75</sup>.
- ⇒ **1987** : Élaboration d'un analyseur TOF à **accélération orthogonale** des ions (oaTOF) <sup>76</sup>.
- ⇒ **1991** : Débuts de la MS supramoléculaire grâce à Chait et Henion <sup>3,4</sup>.
- ⇒ **1994** : Présentation de la source **nanospray** (nanoESI) par Mann <sup>77</sup>.
- ⇒ **1997** : Description des premières **puces microfluidiques pour l'ionisation nanospray** en spectrométrie de masse par Karger <sup>78</sup> et de Ramsey <sup>79</sup>.
- ⇒ **2000** : Élaboration d'un système **nanoESI sur puce microfluidique** par Zhang et Henion qui sera intégré en 2002 à un injecteur automatique d'échantillons (Nanomate 100, Advion Biosciences) <sup>80, 81</sup>.

### 2.2 Vers une information conformationnelle en MS supramoléculaire (IM-MS)

---

Les développements réalisés en MS supramoléculaire ont permis, en parallèle, le développement du couplage mobilité ionique-spectrométrie de masse (IM-MS) qui consiste à séparer des ions en fonction de leur capacité à se déplacer à travers un gaz inerte, sous l'effet d'un champ électrique faible <sup>53</sup>.

L'intérêt grandissant pour l'étude des polluants atmosphériques et des armes chimiques a fortement contribué au développement de la mobilité ionique. Ainsi, dans les années **1950-1960**, le **premier tube de mobilité à champ électrique faible** a été développé par Mc Daniel <sup>82</sup> et Kebarle <sup>83</sup>.

- ⇒**1962** : **Premier couplage IM-MS** permettant d'étudier les propriétés de petites molécules telles que des isotopes ou des ions métalliques.
- ⇒**1970** : Développement d'un système de couplage IM-MS à pression réduite : le RPIMS. Émergence de l'**IMS** comme **outils analytique** grâce aux études de Karasek sur différents composés organiques <sup>84, 85</sup>.
- ⇒**1988** : Mason <sup>86</sup> et Mc Daniel <sup>87</sup> décrivent le **processus de diffusion des ions dans un gaz sous l'effet d'un champ électrique**, permettant ainsi le développement instrumental de l'IMS. Lorsque l'énergie due aux collisions gaz-molécule est supérieure à celle du champ électrique, il existe une relation de proportionnalité entre la vitesse des ions et le champ électrique ( $v = KE$ ,  $v$ = vitesse des ions  $m.s^{-1}$ ,  $K$  = mobilité ( $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ ),  $E$ = champ électrique ( $V.m^{-1}$ )).

Les groupes de Bowers <sup>88</sup> et de Jarrold <sup>89</sup> ont ensuite modifié le couplage IM-MS développé par Bohringer et Arnold <sup>90</sup> pour permettre de sélectionner un ion de  $m/z$  donné avant l'injection dans un tube de mobilité à pression réduite (1-10 Torr).

- ⇒**1988** : Développement d'un nouveau couplage IM-MS permettant l'analyse des ions en flux continu: le FAIMS (*High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry*).
- ⇒**1997** : Clemmer et Jarrold décrivent pour la première fois **l'analyse par IM-MS de petites protéines** <sup>91, 92</sup>. C'est à partir de cette période que les développements instrumentaux et les applications en IM-MS se sont rapidement développés pour l'analyse de molécules biologiques.

Les cellules de mobilité ionique ont ensuite été couplées à différents analyseurs MS tels que des quadripôles <sup>93,94</sup> et des analyseurs TOF <sup>95, 96</sup> et plus récemment à des trappes ioniques ou des instruments de types FTICR <sup>97</sup>. Les différents développements instrumentaux ont ainsi permis d'étendre les possibilités offertes par le couplage IM-MS à l'étude de la conformation des ions en phase gazeuse, sur des échantillons de natures diverses telles que des protéines, des peptides ou encore des acides nucléiques.

- ⇒**2004** : Développement de la technique **TWIMS** (*Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*) rapporté par Giles et Bateman
- ⇒**2006** : **Commercialisation** par la société Waters du **Synapt HDMS G1** intégrant la technologie *Travelling Wave* <sup>98</sup>.
- ⇒**2009** : Commercialisation du **Synapt HDMS G2**, plus résolutif en masse et en mobilité ionique.

La mise sur le marché d'un instrument commercial a permis le développement de l'IM-MS pour l'étude de complexes protéiques intacts. Ruotolo *et al*, ont ainsi pu mettre en évidence le rôle de l'IM-MS pour l'étude de la conformation et de la stabilité des protéines en phase gazeuse<sup>99</sup>. De plus, le couplage IM-MS est une technique qui nécessite peu d'échantillons et qui permet d'obtenir rapidement des informations sur des changements conformationnels.

### ***2.3 Évolution de la diversité des échantillons biologiques analysés par MS et IM-MS supramoléculaires***

---

A son invention au début du XXe siècle, la MS était considérée essentiellement comme un outil analytique pour les chimistes et les physiciens, pour l'étude de petites molécules et de composés volatils. À la fin des années 1980, les applications de la MS ont été élargies à l'analyse d'échantillons d'origine biologique. Les premières analyses MS sur des complexes non-covalents ont alors été rapportées dans la littérature avec l'étude des interactions protéine/ligands<sup>3, 4</sup> puis protéine/protéine<sup>100</sup>. Depuis ces premières études, les développements instrumentaux et méthodologiques ont permis d'élargir la gamme des échantillons analysables par MS<sup>101</sup>. En effet, l'augmentation de la pression au niveau de l'interface de l'instrument a permis une meilleure thermalisation et focalisation des ions de hauts m/z avant l'entrée dans l'analyseur TOF. De même, l'utilisation de faibles fréquences au niveau des quadripôles et de l'analyseur TOF a permis d'améliorer la sélection, la transmission et la détection des ions de hauts rapports m/z<sup>102, 103</sup>. Il est désormais possible d'étudier par MS des échantillons plus hétérogènes et de plus hauts poids moléculaires qu'auparavant. Toutefois, il est encore nécessaire de développer de nouvelles méthodes d'étude afin d'obtenir des informations concernant les complexes et leurs sous-complexes par MS/MS. Grâce aux développements instrumentaux réalisés ces dernières années dans les domaines de la MS et de l'IM-MS, les domaines d'applications accessibles à ces techniques ont pu être étendus. En effet, depuis les années 2000, des études de MS supramoléculaires ont rapporté l'étude de structures de hauts poids moléculaires plus ou moins complexes telles que les ribosomes<sup>104</sup> ou les capsides virales<sup>105, 106</sup>, l'étude d'échantillons hydrophobes tels que des complexes membranaires<sup>107, 108</sup>, l'étude d'échantillons très hétérogènes et dynamiques<sup>109-112</sup>.

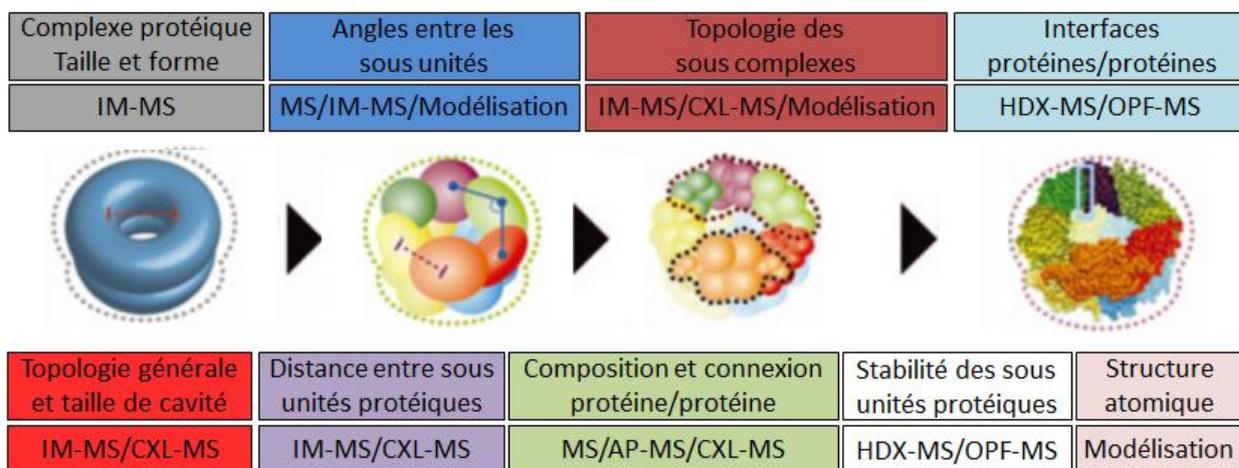
Il existe cependant un certain nombre de difficultés liées à l'analyse des protéines de hauts poids moléculaires qui seront abordées au cours de ce travail de thèse. Parmi les défis de la MS, l'analyse de protéines membranaires reste encore difficile bien qu'essentielle à la compréhension de nombreux processus fondamentaux tels que les cascades de signalisation cellulaire.

En ce qui concerne l'IM-MS, cette technique émergente présente un fort potentiel pour l'étude structurale des protéines cependant de nombreux problèmes restent posés d'un point de vue

instrumental notamment le manque de résolution des cellules IMS et la transmission des ions de hauts poids moléculaires. En parallèle, cette technique récente nécessite le développement de méthodes d'étalonnage plus adaptées à l'étude d'une large gamme de protéines ainsi que le développement de méthodes de modélisation moléculaire adaptées aux données IM-MS.

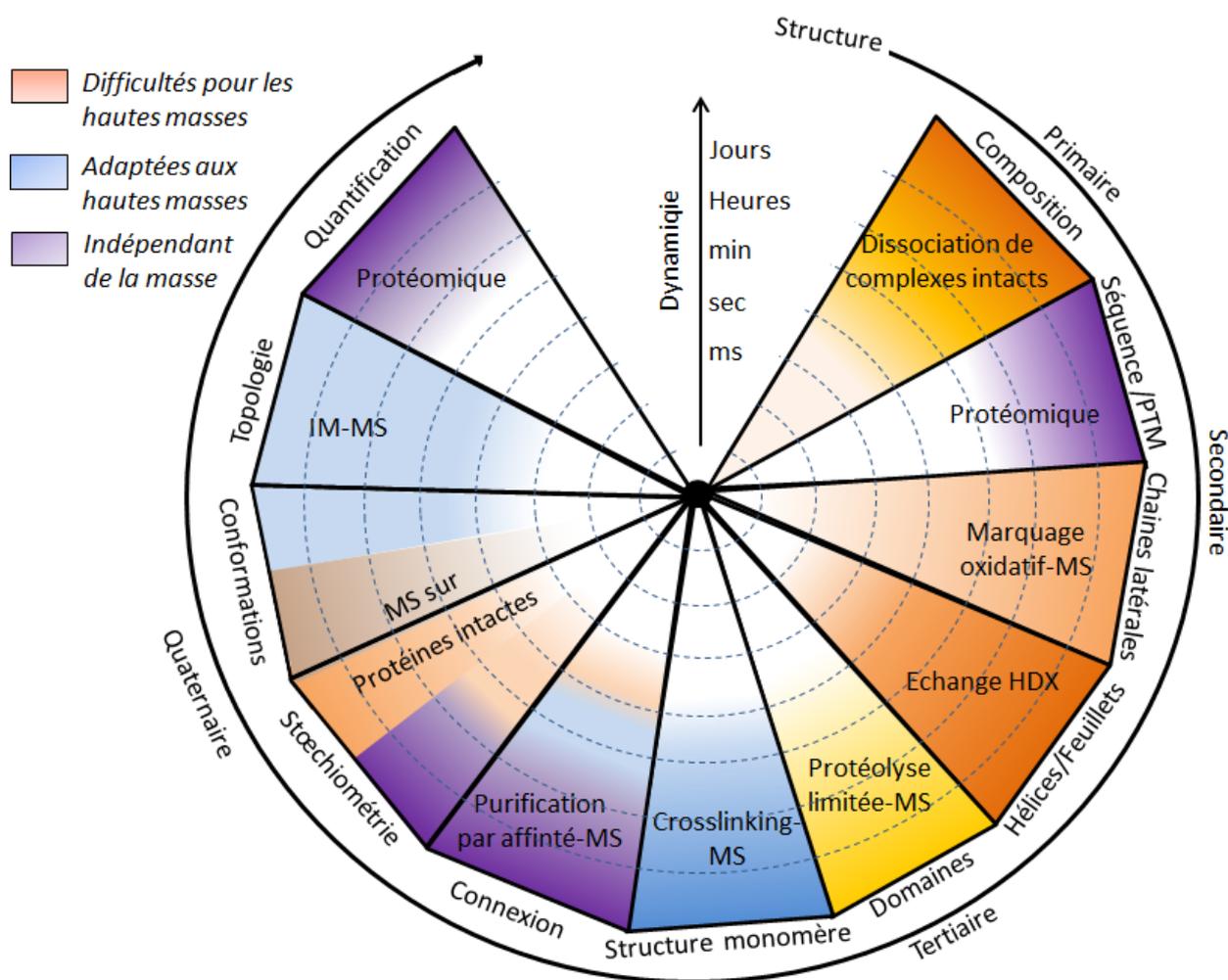
## 2.4 Conclusion

Les différents développements instrumentaux et méthodologiques réalisés ces dernières années offrent la possibilité d'obtenir des informations structurales grâce à la combinaison de différentes approches de MS (Figure 5).



**Figure 5 : Présentation des différentes informations structurales déduites d'approches basées sur la MS.** La partie centrale de la figure représente le même complexe à des niveaux de résolutions variables et montre les informations structurales accessibles par MS grâce aux couleurs utilisées. Ces couleurs correspondent à celles utilisées dans les parties hautes et basses de cette figure. IM (mobilité ionique), HDX (échange hydrogène/deutérium), OPF (marquage oxydatif), CXL (*CrossLinking*), AP (purification par affinité). D'après <sup>113</sup>.

Au cours de leur existence, les protéines sont soumises à différentes modifications telles que des modifications post-traductionnelles ou des différences d'association au sein de complexes. Ces processus s'effectuent sur des échelles de temps variables et peuvent affecter l'ensemble de l'organisation des protéines, de la structure primaire à la structure quaternaire. L'ensemble des techniques basées sur des approches MS permet donc d'obtenir un certain nombre d'informations essentielles pour comprendre la dynamique des changements structuraux. La Figure 6 permet de rendre compte de l'importance de ces différentes approches qu'il s'agisse de méthodes « *Bottom-Up* » où les peptides produits par protéolyses sont analysés ou qu'il s'agisse de méthodes « *Top Down* » où les protéines et assemblages intacts sont analysés en phase gazeuse. Enfin, il est important de prendre conscience de la capacité de ces différentes techniques à analyser des protéines de plus ou moins hauts poids moléculaires.



**Figure 6 : Informations structurales et dynamiques déduites des approches basées sur la MS.** Les protéines subissent des changements dynamiques au cours du temps. Ces processus s’effectuent sur des échelles de temps différentes (cercles au centre de la roue) et à des niveaux structuraux différents (contour de la roue). L’ensemble des approches basées sur la MS (indiquées dans les zones triangulaires) permet d’obtenir des informations de natures différentes (précisées à l’extrémité de chaque zone). Ces approches sont regroupées en fonction de leur dépendance vis-à-vis de la masse des composés analysés. D’après <sup>114</sup>.

# Chapitre 3 Théorie et instrumentation en MS supramoléculaire

## 1 Instrumentation en spectrométrie de masse supramoléculaire

### 1.1 Présentation générale

Un spectromètre de masse est composé de 4 grandes parties (Figure 7) ayant pour but de permettre l'ionisation et la transmission des ions au sein de l'instrument jusqu'à l'analyseur puis le détecteur. Ceci est possible grâce aux gradients de pression et aux champs électriques qui règnent dans les différentes parties de l'instrument.

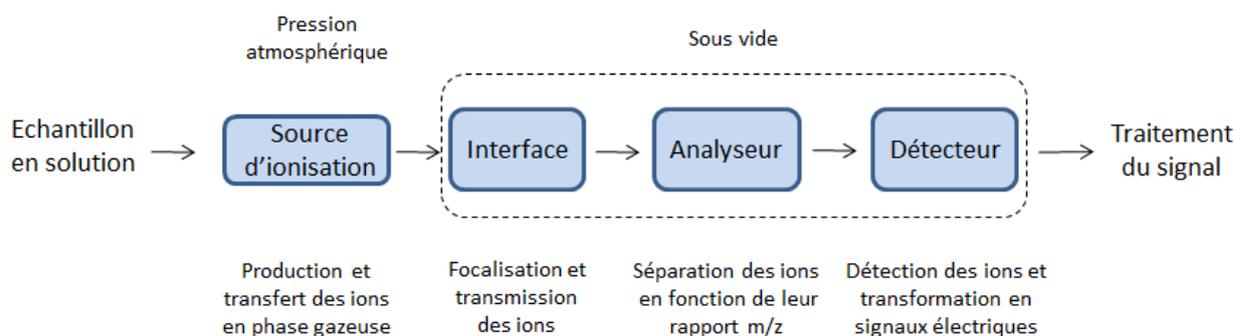


Figure 7 : Présentation schématique d'un spectromètre de masse

Il existe différents spectromètres de masse qui diffèrent notamment par leur source d'ionisation (MALDI, ESI, etc.) et le type d'analyseur (Quadripôle, Temps de vol).

Pour réaliser des analyses par MS supramoléculaire, il est important de préserver les interactions non-covalentes c'est pourquoi, une source d'ionisation douce telle que, le MALDI ou l'ESI sont nécessaires. La source ESI, qui permet d'analyser des échantillons en solution et qui produit des ions multichargés, permettant l'étude de complexes protéiques de plus en plus hauts poids moléculaires, reste actuellement la plus utilisée en MS supramoléculaire. Parmi les analyseurs, le temps de vol est celui qui correspond le mieux aux attentes de la MS supramoléculaire puisqu'il permet d'analyser des composés allant de quelques daltons à plusieurs millions de daltons avec une bonne précision de mesure. Par conséquent, l'ensemble de ce travail de thèse a été réalisé sur des instruments de type ESI-Q-TOF.

## 1.2 Source d'ionisation électrospray (ESI)

---

### 1.2.1 Principe de l'électrospray

---

Le processus ESI est le processus qui permet le passage de molécules de la phase soluble à la phase gazeuse. Ce processus se décompose en trois étapes principales :

- **la production de gouttelettes chargées** à partir d'un analyte en solution <sup>115-119</sup>.
- **la production de gouttelettes de plus petite taille (ou gouttelettes « filles »)** par explosions coulombiennes <sup>117, 120, 121</sup>.
- **Le transfert des ions en phase gazeuse** <sup>75, 122, 123</sup>.

### 1.2.2 Sources nanoESI « classique »

---

La source ESI nécessite l'utilisation de grandes quantités d'échantillons compte tenu du débit de liquide utilisé (1 et 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Étant donné que la sensibilité des sources ESI ne dépend pas du débit de liquide, mais de la concentration en analyte, des sources nanoESI à plus faibles débits (quelques dizaines de  $\text{nL}/\text{min}$ ) ont été développées <sup>124</sup>. L'une des conséquences de la diminution du débit de liquide est une diminution du rayon des gouttelettes obtenues par nanoESI (100 nm) qui sont 10 fois plus petites que celles produites par des sources ESI conventionnelles (1-2  $\mu\text{m}$ ) <sup>77, 125</sup>. En effet, il a été montré qu'il existait une relation de proportionnalité entre de faibles débits de liquide et l'obtention de gouttelettes chargées de faibles rayons <sup>125-127</sup>. La réduction du débit de liquide dans les sources nanoESI a donc pour conséquence non seulement de diminuer la consommation d'échantillon, mais aussi d'augmenter la sensibilité de la technique. En effet, les gouttelettes obtenues par nanoESI, ayant un grand rapport surface/volume, engendrent un gain de sensibilité significatif lors de l'analyse de molécules polaires qui ne présentent qu'une faible activité de surface <sup>128-130</sup>.

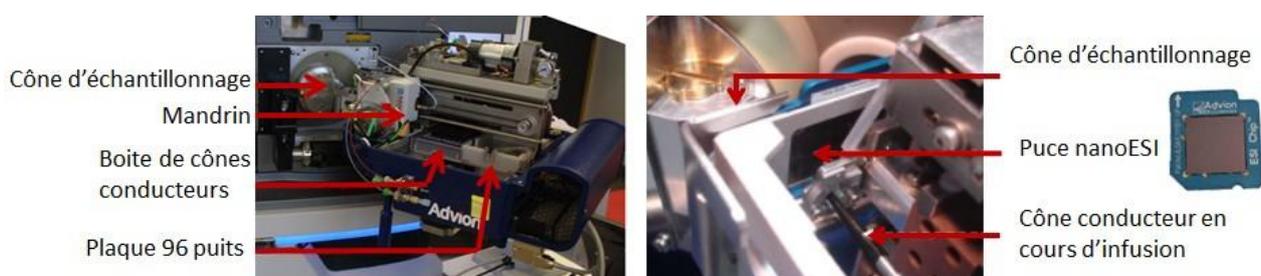
La source nanoESI contrairement à la source ESI présente donc de nombreux avantages. Cependant, l'optimisation des sources nanoESI classiques reste difficile notamment à cause des difficultés liées à l'optimisation du positionnement des aiguilles nanoESI. De plus, la qualité du spray dépend de la composition de l'échantillon à ioniser.

### 1.2.3 Source nanospray sur puce microfluidique

---

Malgré les avantages incontestables des sources nanoESI, l'élaboration manuelle de capillaires nanoESI en verre nécessite une certaine technicité et est à l'origine de problèmes de reproductibilité inter-échantillons. C'est pourquoi, afin de bénéficier des avantages du nanospray sans ses inconvénients, des développements technologiques ont été menés afin d'intégrer des émetteurs nanosprays dans des puces microfluidiques. L'automatisation de la fabrication de ces

puces permet ainsi de garantir une certaine reproductibilité tout en préservant les avantages des émetteurs nanoESI. Parmi les quelques systèmes commercialisés<sup>131-133</sup>, le robot Triversa Nanomate (Advion Biosciences) présente de nombreux avantages tels que l'automatisation des mélanges, l'absence de contaminations inter-échantillons et l'incubation d'échantillons ainsi que leurs analyses par nanoESI sur puce microfluidique<sup>80, 81, 134-136</sup> (Figure 8). Brièvement, ce système est composé de plusieurs parties : une plaque 96 puits contenant les échantillons, un mandrin mobile muni d'une seringue et capable de se fixer sur des cônes conducteurs en graphite recouvert d'une surface chimiquement inerte et une puce microfluidique. Cette puce microfluidique, recouverte d'une couche de silicium dopé la rendant conductrice, est composée de 400 émetteurs nanospray. L'ionisation au niveau des émetteurs nanospray se fait grâce à la formation d'une différence de potentiel entre le liquide présent dans le cône conducteur et la puce qui est connectée à la terre. L'infusion nanospray est ensuite initiée en appliquant sur le liquide une tension (1,5-2,5 kV), ainsi qu'une légère contre-pression (0,5- 2 psi). Cet injecteur automatique d'échantillon peut être couplé à un spectromètre de masse afin de faciliter la réalisation d'études par MS supramoléculaire.



**Figure 8 : Photographies du Triversa Nanomate couplé à un spectromètre de masse.** À gauche : une vue d'ensemble de l'injecteur automatique en cours de couplage avec un spectromètre de masse. À droite : un agrandissement de la zone de la zone de contact entre le cône conducteur et la puce microfluidique en cours d'infusion.

Ce système a particulièrement été utilisé au cours de ce travail de thèse, permettant de mieux comprendre les paramètres à optimiser lors d'une analyse par MS supramoléculaire. Parmi les paramètres à optimiser, la tension appliquée sur le liquide ( $V_{ESI}$ ) et la contre-pression ( $P_{ESI}$ ) sont très importantes. En effet, ces deux paramètres forment un couple qui doit être optimisé finement pour permettre la formation d'un spray stable en évitant de rompre les interactions non-covalentes lors de l'ionisation. Ce couple  $V_{ESI}$  et  $P_{ESI}$  doit notamment être optimisé en fonction de la viscosité du liquide à ioniser. Pour des solutions acétonitrile/eau/acide 50/50/1, les valeurs couramment utilisées pour la formation du spray sont  $V_{ESI} = 1,55$  kV et  $P_{ESI} = 0,55$  psi alors que pour des solutions aqueuses, ces valeurs sont respectivement de 1,75 kV et 0,75 psi. De plus, contrairement aux sources nanoESI classiques, le robot Triversa Nanomate mesure en continu l'intensité du courant d'ions émis à partir de l'émetteur nanoESI. Ainsi, il est possible de suivre la stabilité du spray pendant l'infusion et de réajuster les valeurs de  $V_{ESI}$  et  $P_{ESI}$  en cas de besoin.

Lors de chaque analyse réalisée avec ce système d'injection automatique, il est indispensable de suivre les valeurs de  $V_{ESI}$  et de  $P_{ESI}$  utilisées, afin de pouvoir comparer des résultats obtenus en MS à différents moments.

### 1.3 Interface

L'interface d'un spectromètre de masse a pour rôle de transmettre les ions sous l'effet de champs électriques, de la source d'ionisation à pression atmosphérique vers l'analyseur sous vide ( $10^{-6}$  mbar). Les interfaces sont développées de manière à permettre une transmission optimale des ions. Parmi les différents systèmes disponibles au laboratoire, nous différencierons les multipôles constitués de barreaux disposés parallèlement à l'axe de déplacement des ions et les guides d'ions SRIG (*Stacked ring ion guide*) composés de lentilles annulaires alignées perpendiculairement à l'axe de déplacement des ions.

Afin de pouvoir focaliser les ions et les transmettre au sein de l'instrument, des tensions continues et alternatives sont appliquées sur les barreaux ou les lentilles de ces guides d'ions. Lors du transfert des ions au sein de l'interface, une fraction de l'énergie translationnelle des ions est convertie en énergie interne par collisions avec les molécules de gaz <sup>137</sup>.

Lorsque ces collisions sont de basses énergies, elles favorisent la thermalisation des ions grâce à l'effet des pseudo-potentiels créés par les guides d'ions <sup>137, 138</sup>. Ce processus permet d'augmenter l'efficacité de transmission des ions dans l'interface <sup>139, 140</sup>, d'améliorer la résolution des analyseurs à temps de vol sur une large gamme de rapports  $m/z$  <sup>138, 141</sup> et favorise le maintien des complexes non-covalents en phase gazeuse <sup>142-144</sup> (Figure 9).

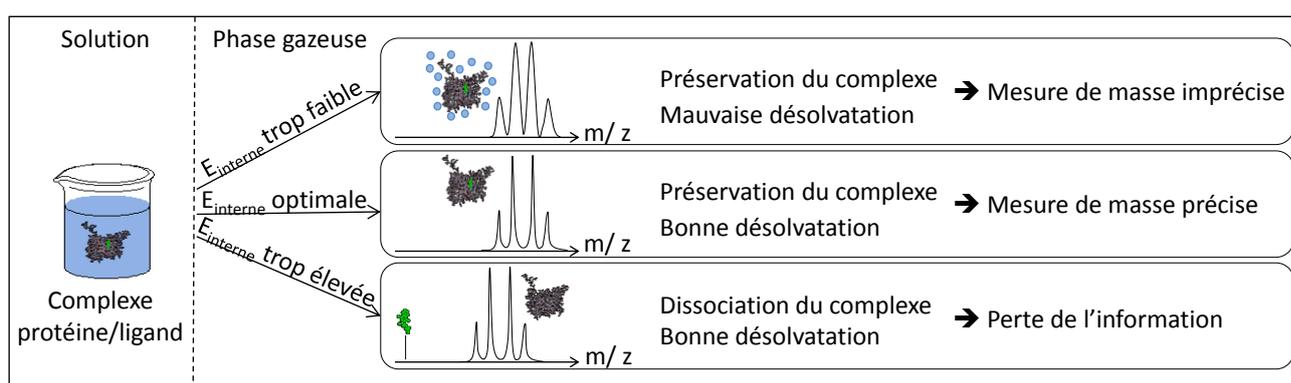


Figure 9: Conséquences des collisions ions-molécules de gaz lors du passage des complexes non-covalents en phase gazeuse

Au contraire, lorsque ces collisions sont de plus hautes énergies, l'énergie interne accumulée par les ions permettra la dissociation des adduits non spécifiques de solvant, améliorant la désolvatation des ions <sup>144</sup>. Dans certains cas, ces collisions peuvent aussi conduire à la dissociation des interactions non-covalentes spécifiques (Figure 9) ainsi qu'à la rupture des liaisons covalentes. Ce processus

appelé dissociation en source (CID) est mis à profit dans des expériences de MS/MS<sup>103</sup>, mais aussi pour caractériser les interactions non-covalentes.

### 1.3.1 Les guides d'ions multipolaires

Les guides d'ions multipolaires peuvent être constitués de deux (quadripôles) ou de quatre paires de barreaux parallèles (octopôles) ayant une section circulaire ou hyperbolique. Les barreaux opposés sont connectés électriquement au même potentiel ( $\Phi_0$  ou  $-\Phi_0$ ), de sorte que deux barreaux adjacents soient de potentiels opposés. Le potentiel  $\Phi_0$  appliqué sur les barreaux comprend une composante continue  $U$  superposée à une composante sinusoïdale d'amplitude  $V$  et de fréquence  $\omega$  (Figure 10). Le champ électrique créé confère aux ions un mouvement oscillatoire entre les barreaux du multipôle<sup>145, 146</sup>. La trajectoire des ions dans un quadripôle, décrite par les équations de Mathieu, se traduit graphiquement par un diagramme de stabilité représentant les valeurs de  $U$  et  $V$  pour lesquelles un ion de rapport  $m/z$  donné aura une trajectoire stable et pourra être transmis dans le quadripôle (Figure 10). Les quadripôles peuvent fonctionner selon deux modes en fonction de la tension continue  $U$ .

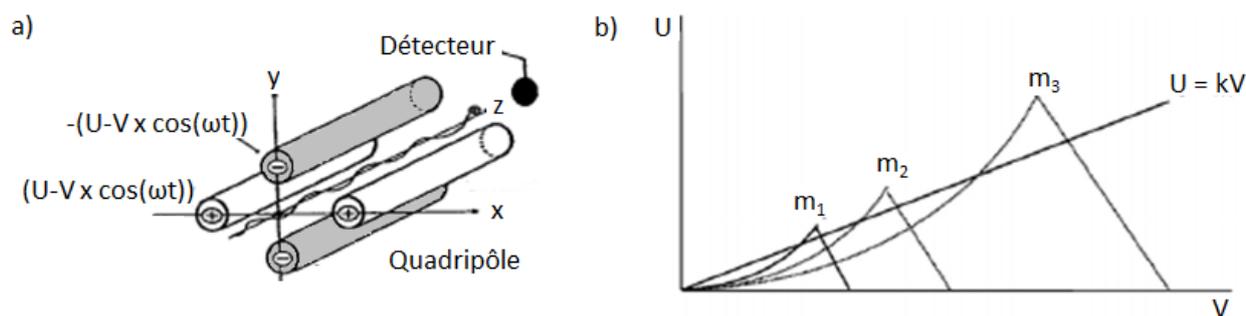


Figure 10 : a) Schéma d'un analyseur quadripolaire avec la représentation de la trajectoire des ions selon l'axe  $z$ , d'après Campana *et al.*<sup>146</sup>. b) Diagramme de stabilité des ions (de masses  $m_1$ ,  $m_2$  et  $m_3$ ) en fonction de  $U$  et  $V$  dans un quadripôle.

Lorsque la tension  $U$  est nulle, le quadripôle fonctionne en tant que guide d'ions (mode *RF-only*). Dans ce cas, si on augmente la valeur de  $V$  de manière à dépasser la zone de stabilité  $m_1$ , tous les ions de masses inférieures ou égales à  $m_1$  auront une trajectoire instable et tous ceux d'une masse supérieure à  $m_1$  auront une trajectoire stable<sup>147</sup>. Dans ce cas, le quadripôle transmet les ions sans pouvoir les filtrer.

Lorsque la tension  $U$  est non nulle, le quadripôle fonctionne comme un analyseur. Un balayage suivant une droite maintenant le rapport  $U/V$  constant permet de détecter successivement les différentes masses. La résolution sera d'autant meilleure que la pente  $k$  sera élevée. Dans ces conditions, il est possible de ne laisser passer que les ions ayant un rapport  $m/z$  donné<sup>148</sup>.

### 1.3.2 Les guides d'ions de types Stacked Ring Ion Guide

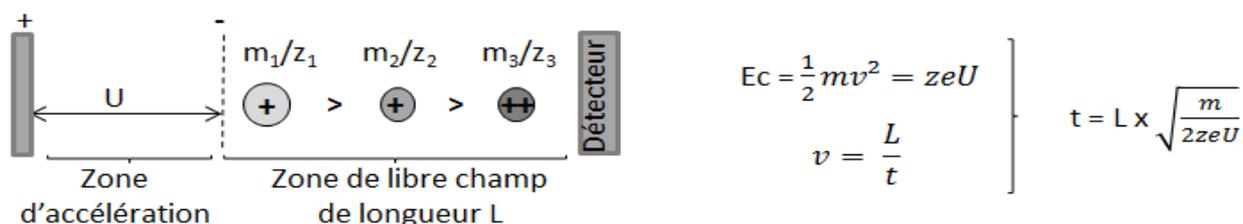
Les guides d'ions de type SRIG sont constituées d'une juxtaposition de lentilles annulaires identiques formant un tunnel coaxial à la trajectoire des ions<sup>145, 149</sup>. Le principe de fonctionnement des guides d'ions SRIG est basé sur l'application de potentiels radiofréquences en opposition de phase sur les différentes lentilles, de sorte à obtenir une alternance de lentilles positivement et négativement chargées. Les radiofréquences sont choisies de manière à obtenir un champ permettant de repousser les ions au centre du guide d'ions, indépendamment de la polarité de l'ion<sup>145, 150, 151</sup>. Toutefois, des puits de potentiel transversaux, observables à proximité des lentilles sont capables de piéger les ions empêchant ainsi leur progression au sein du guide d'ions<sup>152</sup>. Afin de limiter ce piégeage, une tension continue se déplaçant de paires de lentilles en paires de lentilles peut être superposées à la radiofréquence, permettant d'entraîner les ions vers la sortie du guide d'ions. Cette technologie, particulièrement utilisée dans les instruments de type Synapt, sera décrite de manière plus détaillée dans le chapitre 4 de cette partie<sup>153, 154</sup>.

Contrairement au quadripôle, les octopôles et les guides d'ions de types SRIG, où la thermalisation des ions est favorisée, permettent d'atteindre des rendements de transmission supérieures<sup>151, 152, 155, 156</sup>. Par conséquent, l'utilisation de guides d'ions multipolaires et de SRIG est particulièrement importante en MS supramoléculaire où l'intégrité des complexes non-covalents doit être préservée en phase gazeuse. Toutefois, afin de pouvoir étudier des ions de m/z donné tout en conservant des niveaux de sensibilité importants, les instruments actuels sont équipés de ces différents guides d'ions.

## 1.4 L'analyseur de type temps de vol (TOF-Time Of Life)

### 1.4.1 Principe de l'analyseur de type temps de vol

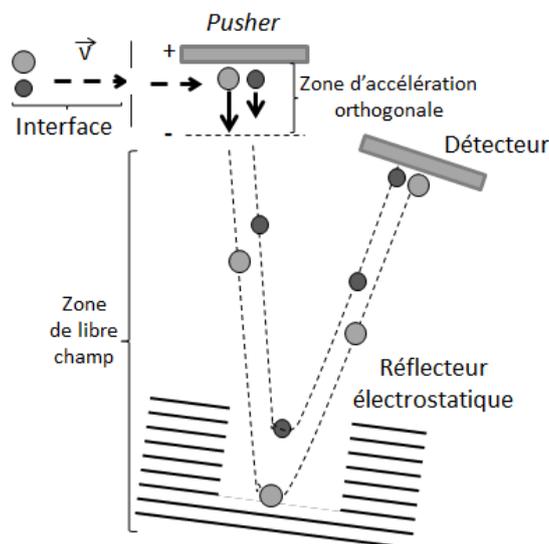
L'analyseur à temps de vol est constitué de deux zones, une zone d'accélération des ions où s'applique des potentiels élevés et une zone de libre de champ, dans lesquelles règne un vide poussé de l'ordre de  $10^{-6}$  mbar (Figure 11).



**Figure 11 : Principe de fonctionnement de l'analyseur de type temps de vol.** ( $E_c$  : énergie cinétique,  $U$  : différence de potentiel,  $t$  : temps de vol mesuré,  $L$  : longueur du trajet parcouru,  $m$ ,  $v$  et  $z$  : masse, vitesse, charge de l'ion,  $e$  : charge d'un électron)

Cet analyseur a pour but de séparer les ions en fonction de leur vitesse de déplacement au sein de la zone de libre champ appelée temps de vol. Dans le cas idéal où tous les ions ont la même énergie

cinétique initiale, le temps de vol des ions est proportionnel à la racine carrée de leur rapport  $m/z$  (Figure 11). Par conséquent, la mesure du temps mis par les ions pour traverser le tube de vol permet de déterminer le rapport  $m/z$  des ions analysés. Afin d'assurer une mesure de masse précise des temps de vol, il faut que les ions soient focalisés sur la « même ligne de départ » dans la zone d'accélération du TOF et que la vitesse initiale des ions soit nulle <sup>157</sup>.



**Figure 12 : Principaux développements instrumentaux de l'analyseur à temps de vol.** L'accélération orthogonale des ions dans un tube de vol permet aux ions d'acquies une vitesse dans le tube de vol égale à l'énergie initiale de l'ion à laquelle s'ajoute celle acquise lors de l'accélération <sup>138</sup>. Le réflecteur électrostatique permet de corriger la dispersion en énergie cinétique de deux ions de même rapport  $m/z$ .

Pour cela deux développements instrumentaux ont été apportés aux spectromètres de masse (Figure 12) :

- **L'injection orthogonale** <sup>76, 158</sup> : les ions arrivant en flux continu parallèlement à l'axe de l'interface seront soumis à une accélération perpendiculaire aux flux d'ions (*Pusher*) permettant d'échantillonner les ions pour chaque cycle TOF. En effet, c'est cette accélération qui permet de définir précisément le début de la mesure du temps de vol.
- **Le réflecteur électrostatique** <sup>159</sup> : il est composé d'une série d'anneaux ou de grilles sur lesquels sont appliqués des potentiels croissants qui définissent un champ électrique homogène. Ce champ s'oppose à la progression des ions et agit comme un miroir d'ions en les réfléchissant. Ce réflecteur permet donc la focalisation temporelle des ions de même  $m/z$  au niveau du détecteur. Ce dispositif permet d'allonger la distance de vol et d'augmenter la résolution en masse des instruments.

### 1.5 Les différents types de détecteurs

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur TOF doit être détecté et transformé en un signal mesurable. Pour cela, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique en un signal utilisable tels que les multiplicateurs d'électrons et les détecteurs à microcanaux.

Deux types de détecteurs ont été utilisés au cours de ce travail de thèse : les détecteurs MCP (*MultiChannel Plate*) dont sont équipés le LCT et le Synapt HDMS G1 et les détecteurs MagnéTOF dont sont équipés le MicroTOF et le Synapt HDMS G2. Ces détecteurs convertissent les courants d'ions provenant de la source en électrons secondaires qui seront amplifiés puis collectés.

### 1.5.1 Les détecteurs MCP

Le détecteur MCP est constitué d'une plaque percée de canaux cylindriques parallèles dont la surface interne est enduite d'un matériel semi-conducteur capable d'émettre des électrons secondaires<sup>160, 161</sup> (Figure 13).

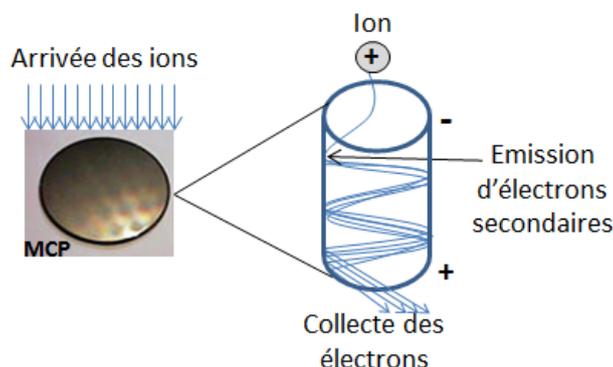


Figure 13 : Schéma de fonctionnement d'un MCP (*MultipleChannel Plate*)

Lorsqu'un ion pénètre dans le canal, son impact avec la surface va provoquer l'arrachement d'électrons secondaires. La tension appliquée sur le détecteur entraîne ensuite, l'accélération des électrons émis qui par collisions successives dans le canal vont permettre d'amplifier le signal qui sera finalement collecté par une anode métallique puis digitalisé. Après l'impact d'un ion dans un des canaux, il existe une certaine période pendant laquelle ce canal n'est plus capable de détecter de nouveaux ions, on parle alors de « temps mort ».

Cet inconvénient des détecteurs de type MCP doit être pris en compte lors des optimisations et interprétations, car il peut conduire à un décalage des massifs de masse, une diminution de l'intensité du signal et artificiellement à une meilleure largeur des pics à mi-hauteur (Figure 14).

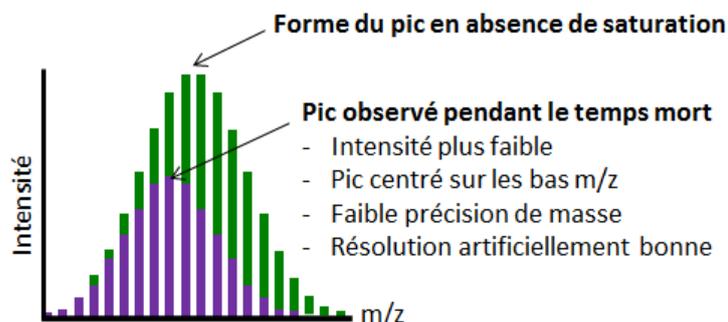


Figure 14 : Effet de la saturation du détecteur MCP sur la forme des pics de masse

Il est donc important de vérifier l'absence de saturation du détecteur lors d'analyses MS et plus particulièrement lors d'analyses quantitatives. D'autre part, il est important de mentionner que la probabilité qu'un ion incident donne lieu à l'émission d'ions secondaires est fonction de sa vitesse et non de son énergie cinétique. Par conséquent, l'intensité de réponse diminue lorsque la masse d'un ion augmente et que sa charge diminue <sup>162</sup>.

### 1.5.2 Le détecteur MagnéTOF

Le détecteur MagnéTOF est un multiplicateur d'électrons constitué d'une surface plane émettant des électrons secondaires suite à l'impact des ions provenant de la source. Grâce à la présence de potentiels électrostatiques, déformés par un champ magnétique, ces électrons sont ensuite entraînés vers une surface capable d'émettre de nouveaux électrons secondaires. La succession de ces réactions permet l'amplification du signal électronique qui est ensuite collecté puis digitalisé (Figure 15). Contrairement au détecteur MCP, le détecteur MagnéTOF ne présente pas d'effet de « temps mort ».

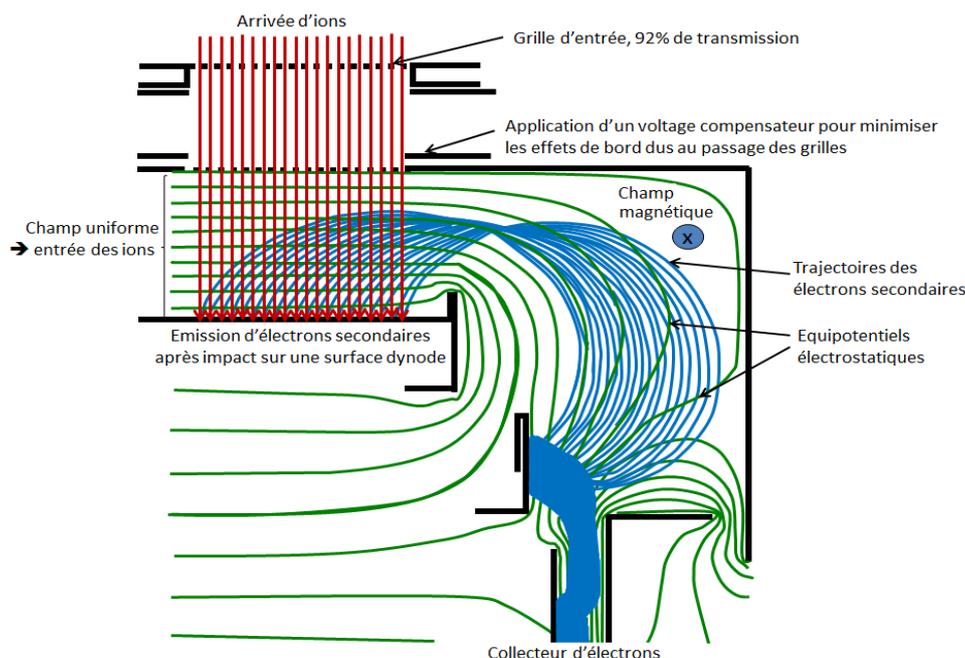


Figure 15 : Schéma du principe de fonctionnement du MagnéTOF. Adapté de <sup>163</sup>.

### 1.6 La digitalisation du signal

La digitalisation du signal consiste à convertir les signaux continus analogiques en signaux numériques (données discrètes). Cette transformation est réalisée à l'aide de digitaliseurs tels que les digitaliseurs ADC (*Analog to digital converter*) et TDC (*Time to digital converter*) qui sont généralement utilisés en MS. Cette opération s'effectue en deux temps :

- l'échantillonnage, qui transforme le signal continu en un signal discret
- la quantification, qui remplace des valeurs continues par des valeurs discrètes

### 1.6.1 Le digitaliseur TDC

Chaque ion qui heurte le détecteur produit une impulsion d'électrons qui est amplifiée puis expédiée vers un discriminateur. Lorsque l'impulsion est supérieure à un certain seuil, une impulsion est envoyée au convertisseur temps-numérique ou TDC. Le digitaliseur TDC mesure alors le temps passé entre l'impulsion de départ au niveau de l'analyseur (*pusher*) et chacune des impulsions d'arrêt provenant du discriminateur. Une liste des temps associés à la détection des signaux est alors enregistrée. La combinaison de plusieurs cycles TOF pendant un scan permet alors de remonter à un nombre de signaux digitalisés en fonction du temps (Figure 16). Le seuil de discrimination doit être judicieusement choisi pour permettre d'éliminer le bruit de fond sans pour autant induire des biais dans la détection de pics spécifiques <sup>164</sup>.

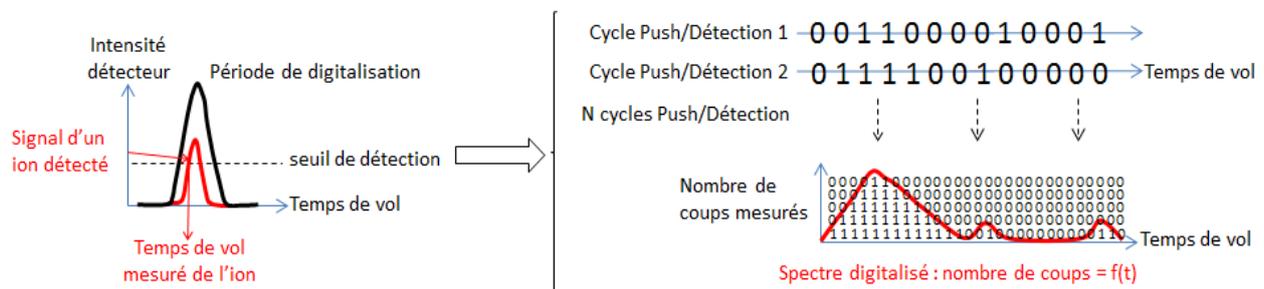


Figure 16 : Principe de digitalisation du signal et de reconstruction d'un spectre de masse avec un digitaliseur TDC. Les 1 correspondent à la détection d'un signal supérieur au seuil de détection et les 0, à l'absence de signal supérieur au seuil de détection. La somme des ions détections au cours de chaque cycle Push/Détection permet de reconstruire un spectre de masse.

### 1.6.2 Le digitaliseur ADC

Dans le cas des digitaliseurs ADC, chaque impulsion est enregistrée sans passer par le discriminateur. Il est alors possible de déterminer la correspondance entre une fenêtre de temps de vol et la liste des intensités observées lors de chaque cycle push/détection. La sommation des cycles au cours d'un scan permet ensuite de déterminer l'ensemble des intensités intégrées pour chaque fenêtre de temps et d'obtenir une intensité totale en fonction du temps de vol (Figure 17) <sup>164</sup>.

Il est important de noter que lorsque l'intensité issue du détecteur est supérieure à la fenêtre des intensités pouvant être digitalisées, le digitaliseur est à saturation et associera par défaut sa valeur d'intensité limite.

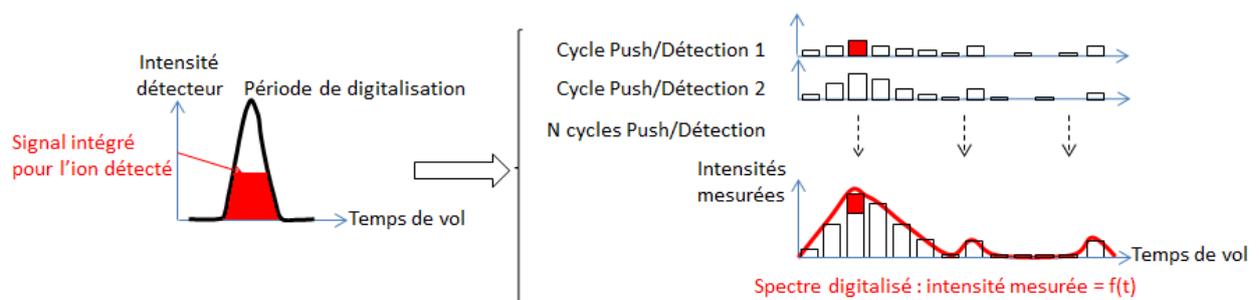


Figure 17 : Principe de digitalisation du signal et de reconstitution d'un spectre de masse avec le digitaliseur ADC. L'intensité du signal correspondant aux ions détectés lors de chaque cycle Push/Détection est enregistrée. La somme des intensités mesurées permet ensuite de reconstruire un spectre de masse.

Dans le cas des analyseurs de type ADC, la fréquence d'échantillonnage nécessaire à l'acquisition des données dépend de sa vitesse de balayage (gamme de masse par unité de temps) et de la résolution attendue. Ce type de système de digitalisation permet donc l'analyse sur une grande gamme dynamique, mais est limité par la présence de bruit électrique.

### 1.7 Présentation des instruments utilisés en MS supramoléculaire

Parmi les instruments utilisés pour la MS supramoléculaire au laboratoire (LCT, Synapt HDMS G1 et G2), le Synapt HDMS (*High Definition Mass Spectrometry*) G2 a particulièrement été utilisé au cours de ce travail de thèse. En effet, cet instrument ESI-Q-TOF de dernière génération offre une meilleure résolution en masse (FWHM de 20 000) que le LCT (FWHM de 5 000) ou le Synapt G1 (FWHM de 10 000).

Les instruments de type Synapt, sont pourvus d'une source ESI de type *Z-Spray*<sup>TM</sup> permettant d'éliminer les agrégats et les molécules neutres avant l'entrée des ions dans le spectromètre de masse, conférant ainsi à cette source une plus grande tolérance aux sels non volatils. Les ions formés au niveau de la source sont ensuite guidés au travers de l'instrument grâce à des guides d'ions de type SRIG. Le premier guide d'ions permet de confiner les ions au sein du spectromètre de masse évitant ainsi la diffusion radiale des ions. Un quadripôle fonctionnant ou non en mode RF only va ensuite permettre, selon les applications, de favoriser ou non la transmission de certains ions de rapports  $m/z$  donnés (Figure 18).

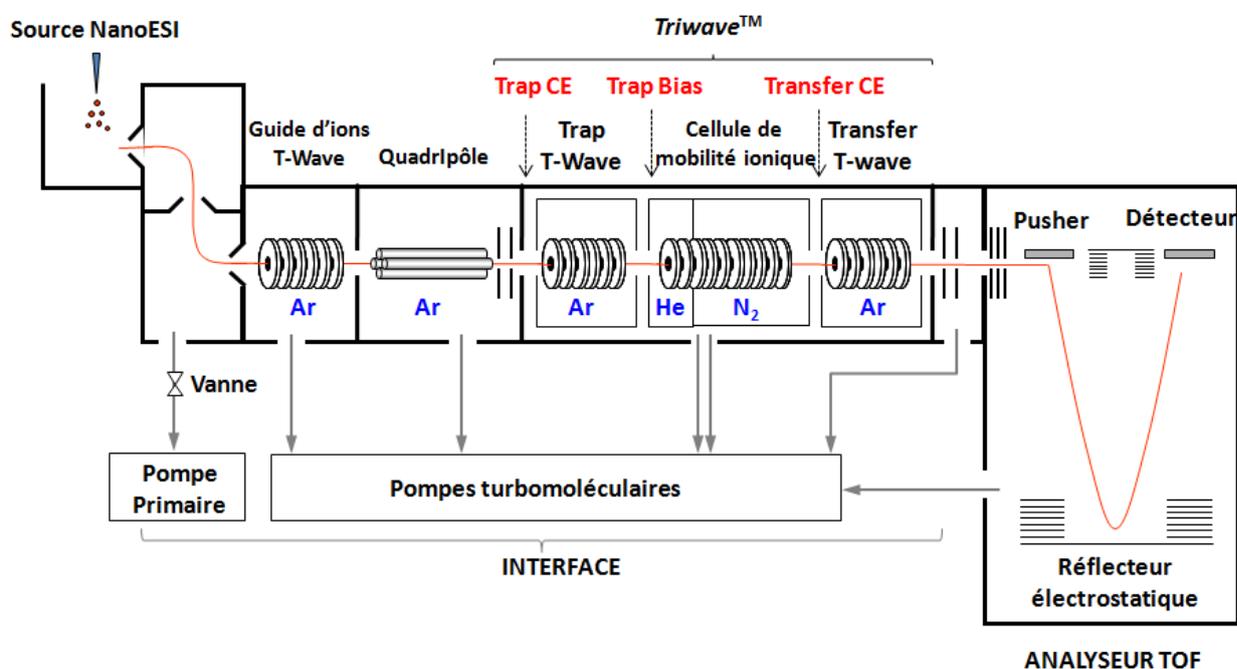


Figure 18 : Représentation schématique du Synapt HDMS G2

Cet instrument possède, comme tous les Synapt, une cellule de mobilité appelée *Triwave*<sup>TM</sup> permettant de réaliser des études par IM-MS. Cette cellule est composée de trois guides d'ions *T-*

Wave appelés Trap, IMS et Transfer. Les parties Trap et Transfer sont alimentées en argon et ont pour rôle de transmettre efficacement les ions au sein du guide d'ions. Elles peuvent aussi être utilisées comme des cellules de collisions. Lorsque l'instrument est utilisé en mode IMS, elles permettent respectivement le stockage des ions avant la cellule IMS et leur transfert après séparation dans la cellule IMS. La cellule IMS quant à elle, peut soit être alimentée en argon, dans ce cas elle agit comme les guides d'ions Trap et Transfer, soit en hélium et en azote servant alors de cellule de mobilité ionique. Afin de réguler le vide au sein de l'instrument, il est équipé d'une pompe primaire sèche à spirale et de 6 pompes turbomoléculaires.

Il existe différents modes de fonctionnement sur cet instrument de dernière génération : les modes résolution et sensibilité où le trajet des ions au sein du spectromètre de masse est en mode « V » et le mode haute résolution où le trajet des ions forme un « W ».

Le passage du mode résolution au mode haute résolution permet de doubler la résolution observée sur cet instrument (FWHM : 20 000 - 40 000) au détriment cependant de la sensibilité. Au contraire, le mode sensibilité permet d'augmenter l'intensité du signal, mais conduit à une perte de la résolution sur les spectres de masse (FWHM 10 000).

En MS supramoléculaire, les analyses sont réalisées en mode « V ». Le mode résolution est utilisé lors des analyses en conditions dénaturantes et lors d'analyses en conditions natives pour des protéines dont la masse est inférieure à 30 kDa. Dans le cas de protéines ayant une masse supérieure à 30 kDa, le mode sensibilité est préféré.

## Chapitre 4 : Théorie et instrumentation en IM-MS

### 1 Les différents types de cellules de mobilité ionique

L'IMS regroupe l'ensemble des techniques qui sont basées sur la séparation d'ions en phase gazeuse en fonction de leur mobilité. C'est grâce au développement du couplage entre des méthodes d'ionisation douces telles que l'ESI et des cellules IMS que les applications de la mobilité ionique ont pu être étendues à des échantillons biologiques en solution<sup>89</sup>. Les développements instrumentaux réalisés ces dernières années ont ainsi conduit à l'élaboration de différents types de cellules de mobilité ionique dont les principales sont présentées ci-dessous.

#### 1.1 Présentation des différentes cellules de mobilité ionique

##### a. Les cellules de type DTIMS (*Drift Tube Ion Mobility Spectrometry*)

Ces cellules sont les plus anciennes et sont basées sur les développements réalisés par Bradbury et Mc Daniel en 1950<sup>82</sup>. Ces cellules permettent la séparation des ions en fonction de leur taille et de leur forme dans un champ électrique faible, généré par des guides d'ions de types SRIG. Les ions sont injectés par paquets dans la cellule IMS grâce à des portes à ions. Les ions traversent ensuite la cellule de mobilité qui est remplie d'un gaz inerte (He, N<sub>2</sub> ou Ar) et où il règne une pression constante (1-15 mbar) (Figure 19).

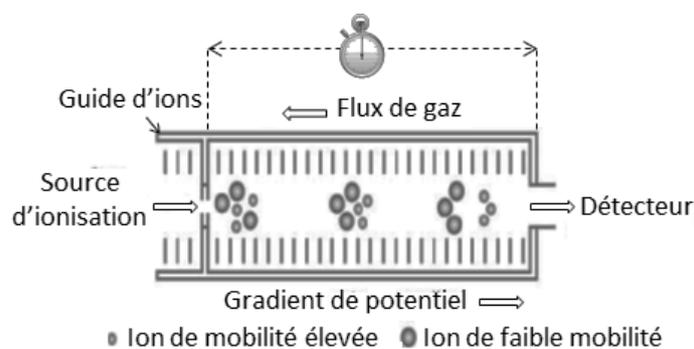


Figure 19 : Présentation de la cellule DTIMS. D'après<sup>53</sup>

La taille de ces cellules est comprise entre quelques centimètres et plus d'un mètre de long. L'ensemble des ions traversant le tube de mobilité est détecté à sa sortie. Le temps mis par les ions pour traverser le tube de mobilité est fonction de sa mobilité. Plus la mobilité d'ion sera grande, plus le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité sera court. Il s'agit des cellules les plus couramment utilisées<sup>97,165</sup>. Dans le cas des cellules DTIMS, le champ électrique est axial et le mouvement des ions est inverse à celui du gaz.

### b. Les cellules de type FAIMS (*High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry*) ou DMS (*Differential Mobility Spectrometry*)

Dans ces cellules, la mobilité des ions est dépendante de la force de champs électriques appliqués perpendiculairement aux ions, au niveau de deux électrodes entre lesquelles circule un flux de gaz transportant les ions (Figure 20).

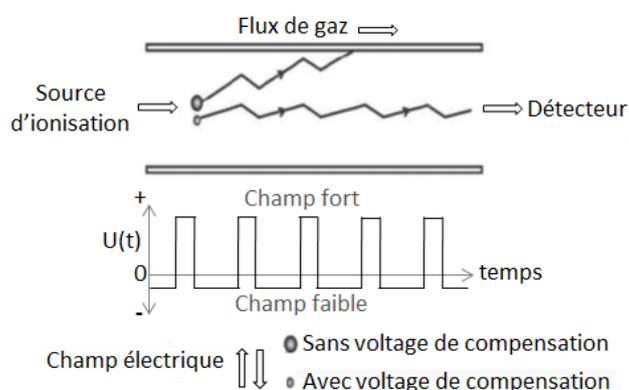


Figure 20 : Principe de fonctionnement de la cellule FAIMS. D'après <sup>53</sup>

En effet, une onde asymétrique est appliquée entre ces 2 électrodes soumettant les ions à deux champs de forces distinctes : l'un de courte durée et intense (champ fort), l'autre plus longue et faible (champ faible). En fonction de leur différence de mobilité entre champ fort et champ faible, les ions vont subir une déflexion vers l'une ou l'autre des électrodes. Afin de compenser cette déflexion et permettre la transmission des ions dans la cellule de mobilité, un voltage de compensation spécifique à un ion de mobilité donnée est appliqué. En balayant différentes valeurs de voltages de compensation, il est possible de séparer les ions en fonction de leur mobilité <sup>97, 165-167</sup>. Dans le cas de ces cellules, le flux d'ions analysé est continu. Les ions sont focalisés pendant leur séparation ce qui permet d'augmenter la sensibilité de ces cellules. Toutefois, celles-ci ne permettent de détecter qu'une seule espèce à la fois

### c. Les cellules de type AIMS (*Aspiration Ion Mobility Spectrometry*)

Dans ces cellules, les ions sont transportés par un flux laminaire de gaz, soumis à un champ électrique perpendiculaire provoquant leurs déflexions sur un détecteur (Figure 21). Un balayage des champs électriques va permettre de déterminer la mobilité d'un ion dans la cellule IMS. Pour un champ électrique donné, plus la mobilité d'un ion sera grande, plus le trajet de l'ion dans la cellule de mobilité sera court. La distance parcourue par les ions au sein de ces cellules de mobilité est mesurée grâce à l'utilisation d'un détecteur segmenté. Une autre alternative consiste à balayer différentes valeurs de champs électriques afin de dévier, tour à tour, les ions de différentes mobilités sur un détecteur unique <sup>97, 168</sup>.

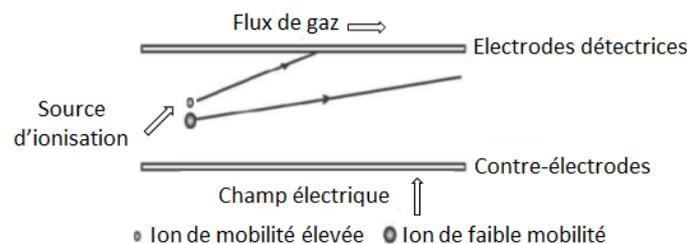


Figure 21 : Présentation du principe de fonctionnement de la cellule AIMS. D'après <sup>53</sup>

#### d. Les cellules de type TWIMS (*Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*)

Les cellules de type TWIMS sont les premières cellules de mobilité ionique couplées à un spectromètre de masse à avoir été commercialisées. Elle équipe notamment les instruments de type Synapt HDMS. Elle sera décrite en détail dans la deuxième partie de ce chapitre. Brièvement, dans le cas des cellules de type TWIMS, les ions sont séparés en fonction de leur vitesse de déplacement au sein d'un gaz sous l'effet du champ électrique créé par des impulsions de potentiels appliquées successivement sur les différentes lentilles d'un guide d'ions de type SRIG. Plus la mobilité d'un ion sera élevée, plus le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité sera court <sup>169-171</sup> (Figure 22).

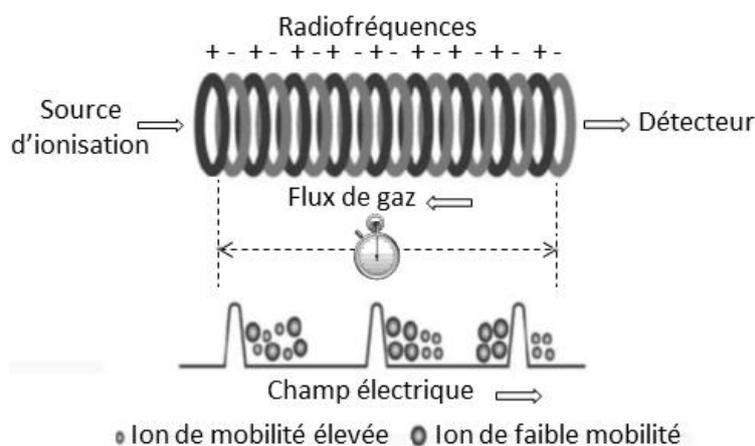


Figure 22 : Principe de fonctionnement de la cellule de mobilité de type TWIMS. D'après <sup>53</sup>.

### 1.2 Caractéristiques des différentes cellules de mobilité

Les différentes cellules de mobilité diffèrent par : leur résolution, leur sensibilité, la présence d'échantillonnage en amont de la cellule de mobilité, la pression de travail, la force des champs électriques appliqués, les informations déduites et leurs domaines d'applications.

Parmi les différentes cellules de mobilité, la cellule DTIMS, basée sur la mesure des temps de passage des ions dans la cellule IMS, est la plus résolutive et la seule permettant de calculer directement la section efficace d'un ion en phase gazeuse. Toutefois, cette cellule présente une mauvaise sensibilité notamment à cause de l'échantillonnage des ions en amont de la cellule de mobilité. Elle est cependant peu sensible en raison du fonctionnement par cycles et de la diffusion radiale des ions dans la cellule. Pour répondre à ces deux problématiques, des zones de stockage des

ions ont été ajoutées avant les cellules de mobilité, ainsi que des guides d'ions permettant de focaliser les ions avant et après la cellule de mobilité afin d'augmenter le rendement de transmission des ions en mobilité ionique<sup>172-176</sup>. La résolution de ces cellules réside en partie sur la taille des cellules DTIMS, ces cellules sont donc difficilement miniaturisables.

Les cellules AIMS et FAIMS sont des cellules peu résolutive, qui permettent l'analyse d'échantillon en flux continu, ce qui leur permet de bénéficier d'une meilleure sensibilité. Contrairement aux cellules DTIMS, ces cellules séparent les ions de mobilités différentes en fonction d'un voltage de compensation ou de la distance parcourue au sein de la cellule de mobilité.

Les cellules TWIMS du Synapt HDMS sont les moins résolutive, mais présentent une bonne sensibilité grâce à leur capacité de confinement des ions dans les 3 guides d'ions de type SRIG de la cellule Triwave. De même que les cellules DTIMS, ces cellules fonctionnent par cycles et différencient les ions en fonction de leur temps de passage au sein de la cellule de mobilité. Ces cellules permettent indirectement le calcul de section efficace grâce à une courbe d'étalonnage établie à l'aide d'analytes dont la section efficace a préalablement été déterminée par DTIMS<sup>177</sup>.

L'IMS peut se faire dans deux conditions de pression : soit à pression atmosphérique (DTIMS, APIMS, FAIMS), soit à pression réduite (DTIMS et TWIMS). Le fait de travailler à pression réduite permet une meilleure focalisation et une meilleure transmission des ions. En effet, dans le cas des cellules à pression atmosphérique, le transfert des ions d'une pression atmosphérique vers le vide entraîne une perte de sensibilité.

Alors que les cellules DTIMS et FAIMS sont plutôt réservées à l'analyse de protéines seules et aux petits agrégats non-covalents, les cellules TWIMS sont adaptées à une large gamme de masse de protéines et de complexes. Parmi les applications des cellules TWIMS en biologie, nous différencierons les applications analytiques permettant la séparation de différentes conformations en phase gazeuse, des applications structurales telles que la mesure de la taille de complexes permettant d'affiner les cartes d'interactions entre différents partenaires d'un complexe<sup>178-180</sup>, le suivi de changements conformationnels<sup>9, 106</sup>. l'obtention d'informations concernant la topologie et les stœchiométries d'interaction de peptides et de protéines oligomériques<sup>109, 181</sup>.

## 2 Caractéristiques des cellules de mobilité ionique de type TWIMS

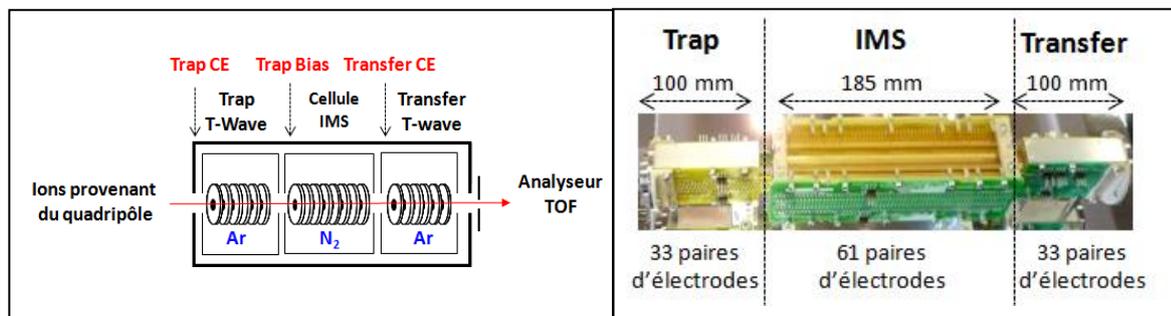
---

Lors de ce travail de thèse, nous avons utilisé deux instruments de générations différentes, les Synapt G1 et G2 HDMS. Ces instruments de type Quadripôle-TOF, couplés à une source nano-électrospray, sont munis d'une cellule de mobilité de type TWIMS.

## 2.1 Description et principe de fonctionnement de la cellule TWIMS du Synapt HDMS G1

### a. Description de la cellule TWIMS du Synapt HDMS G1

Les cellules de mobilité *Triwave* sont constituées de 3 cellules appelées cellules Trap, IMS et Transfer formées de plusieurs guides d'ions de type SRIG (Figure 23).



**Figure 23 : Présentation de la cellule TWIMS du Synapt G1 HDMS.** Panel de gauche : schéma de la cellule *Triwave* Panel de droite : photo de la cellule *Triwave*.

Ces guides d'ions sont composés de plusieurs électrodes annulaires fonctionnant par paires dont l'épaisseur est de 0,5 mm, le diamètre interne de 5 mm et l'espacement de 1,5 mm. Les cellules Trap et Transfer sont constituées de 33 paires de lentilles réparties sur une longueur de 100 mm, alors que la cellule IMS est constituée de 61 paires d'électrodes sur une longueur de 185 mm<sup>98</sup> (Figure 23).

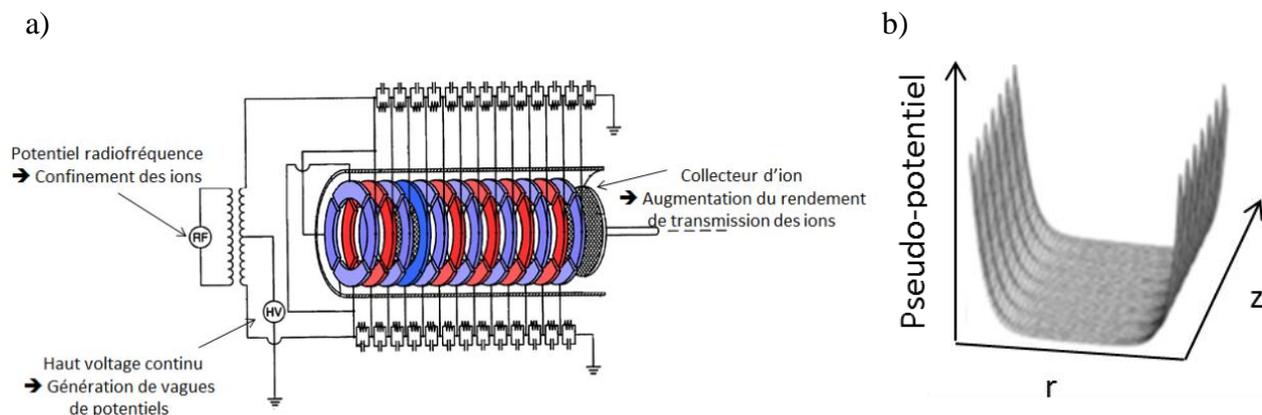
Les guides d'ions Trap et Transfer sont dans une même enceinte, remplie d'argon, dont la pression est de l'ordre de  $10^{-2}$  mbar, alors que la cellule IMS est située dans un compartiment fermé, rempli d'azote où la pression atteinte peut être comprise entre 0,2-0,9 mbar, permettant ainsi la séparation des ions en fonction de leur mobilité ionique.

### b. Principe de fonctionnement des guides d'ions des cellules TWIMS

Les ions traversant les guides d'ions sont soumis à deux types de voltage :

- le premier est alternatif et permet de confiner les ions au sein du guide d'ions,
- le second est continu créant des impulsions de potentiels qui se déplacent de paires de lentilles en paires de lentilles, permettant le transport des ions à travers le guide d'ions, grâce à une onde régulière dont la hauteur et la vitesse peuvent être contrôlées.

Le voltage alternatif est créé par l'application d'une radiofréquence en opposition de phase sur les différentes lentilles des guides d'ions de sorte que des lentilles adjacentes soient alternativement chargées positivement et négativement. L'application de ce voltage alternatif conduit à la création d'un puits de potentiel (Figure 24).



**Figure 24 : Guide d'ions.** a) Schéma représentatif du fonctionnement d'un guide d'ions de type T-wave. b) Représentation des puits de potentiels observés dans un guide d'ions T-wave. D'après <sup>153, 182</sup>.

Ce potentiel, minimum au centre du guide d'ions, augmente de manière exponentielle à proximité des lentilles, repoussant les ions en son centre, évitant ainsi les phénomènes de diffusion radiale <sup>153</sup>. En parallèle, des puits de potentiels transversaux, observables à proximité des lentilles, sont capables de piéger les ions ralentissant ou empêchant leur progression au sein des guides d'ions. La présence d'une tension continue appliquée entre l'entrée et la sortie du guide d'ions permet de limiter ce phénomène et assure une transmission optimale des ions.

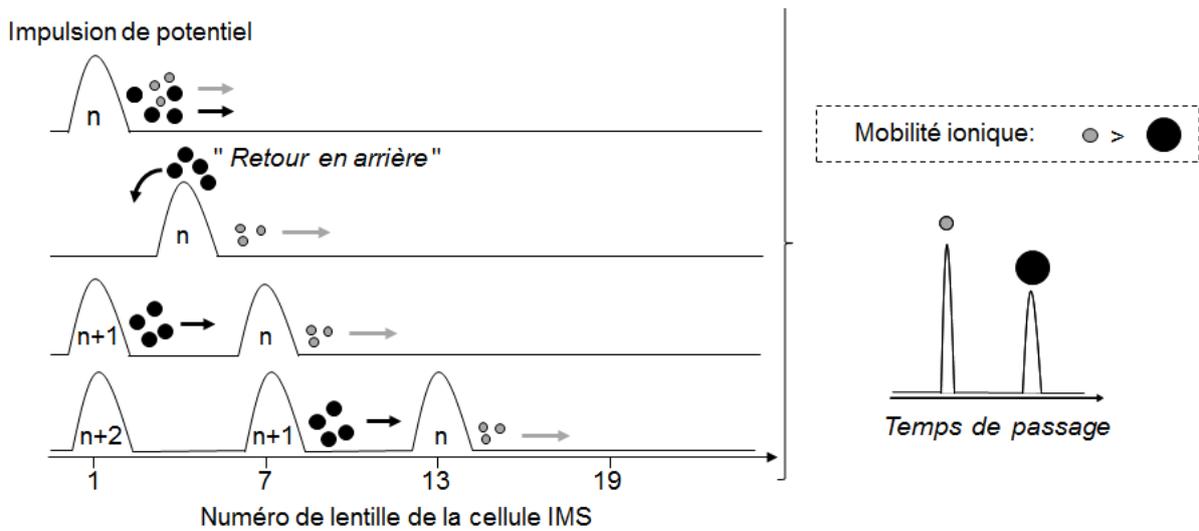
### c. Rôle des différents guides d'ions

La cellule IMS contrairement aux cellules Trap et Transfer fonctionne par cycle. Par conséquent, l'une des fonctions de la cellule Trap est de stocker les ions avant leur introduction dans la cellule IMS. Pour cela, la dernière électrode de la cellule Trap fonctionne en mode DC only et permet d'envoyer périodiquement des ions dans la cellule IMS grâce à une variation du potentiel de cette lentille de  $\pm 5 \text{ V}$  <sup>98</sup>. De plus, la tension Trap Bias, appliquée à l'entrée de la cellule IMS permet de fournir l'énergie cinétique nécessaire au transport des ions à travers la cellule IMS où la pression est de l'ordre de 0.5 mbar. Une fois séparé dans la cellule IMS, les ions sont transférés de manière continue au sein de la cellule Transfer dont le rôle est de maintenir la séparation des ions tout en transférant efficacement les ions vers l'analyseur TOF. Afin de permettre une meilleure transmission des ions, les premières et dernières lentilles des guides d'ions de type T-wave ne fonctionnent pas en mode *traveling wave* de manière à réduire l'énergie interne accumulée par les ions <sup>153</sup>.

### d. Séparation des ions dans la cellule IMS

La séparation des ions s'effectue au sein de la cellule IMS où la hauteur et la vitesse des vagues de potentiels sont contrôlées. Les ions injectés au sein de la cellule de mobilité sont entraînés par les vagues de potentiel qui se propagent au sein de la cellule IMS. Sous l'effet des collisions avec les molécules de gaz, ils seront freinés en fonction de leur mobilité et plus particulièrement en fonction de leur charge et de leur conformation en phase gazeuse. Ainsi, les ions ralentis ne pourront

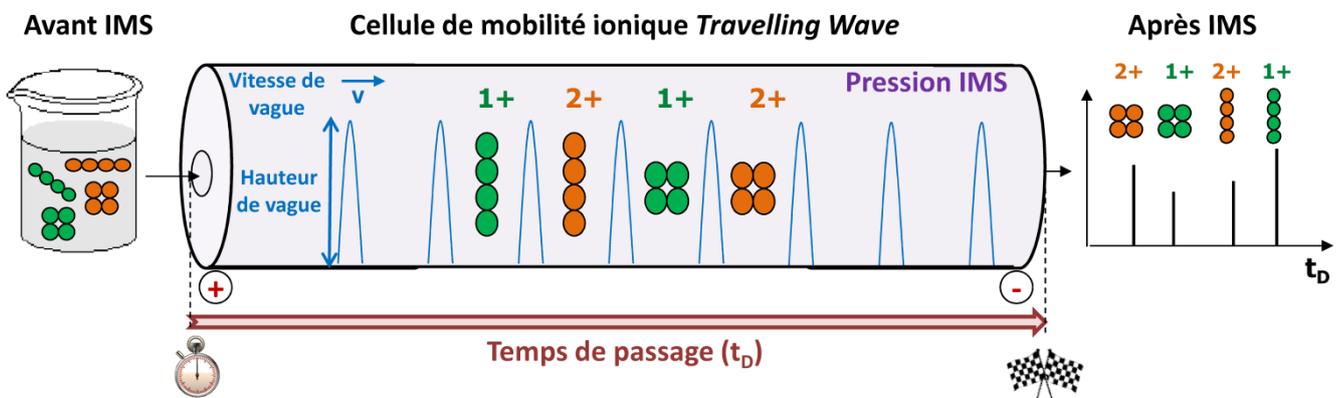
pas suivre la vague de potentiel  $n$ , subissant un mouvement de retour en arrière et seront finalement entraînés par la vague suivante  $n+1$  (Figure 25).<sup>98</sup>



**Figure 25 : Séparation des ions dans la cellule IMS.** Les vagues de potentiel successives ( $n$ ,  $n+1$  et  $n+2$ ) sont espacées de 6 lentilles au sein du guide d'ion SRIG sur une Synapt HDMS G1. D'après<sup>153, 183</sup>.

Les ions ayant une mobilité plus importante seront moins souvent soumis à ces mouvements de retour en arrière que les ions de faible mobilité. Par conséquent, ils seront drainés plus rapidement à travers la cellule IMS (Figure 25). Ainsi, plus la mobilité d'un ion est importante plus le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité sera court.

Pour un même état de charge, plus un ion aura une structure compacte, moins il sera ralenti par les molécules de gaz. Le nombre de mouvements de retour en arrière étant moins important que pour des structures étendues, le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité est donc plus court. Ainsi, pour des ions ayant les mêmes états de charge, le temps de passage des ions au sein de la cellule IMS augmente lorsque sa section efficace augmente (Figure 26).



**Figure 26 : Représentation schématique de fonctionnement d'une cellule de mobilité ionique de type *Traveling Wave*.**

Pour des ions de sections efficaces identiques, plus un ion sera chargé, plus il sera accéléré au sein de la cellule de mobilité sous l'effet du champ électrique et moins il subira de mouvements de retour en arrière. Ainsi, pour des ions de mêmes sections efficaces, le temps de passage des ions au sein de la cellule IMS augmente lorsque la charge diminue (Figure 26)<sup>153, 184</sup>.

## 2.2 Comparaison des cellules IMS des Synapt G1 et G2 HDMS

Bien que la cellule Triwave du Synapt HDMS G1 permette d'obtenir des résultats avec une bonne sensibilité, elle ne permet pas d'atteindre les résolutions obtenues avec des cellules de mobilité classique ( $R = 80$  pour une cellule DTIMS)<sup>185</sup>. Par conséquent, plusieurs améliorations de la cellule Triwave ont été réalisées par le constructeur Waters afin d'augmenter la résolution de leurs cellules de mobilité de type TWIMS. Ainsi un instrument de nouvelle génération, le Synapt HDMS G2 possédant cette nouvelle cellule, a été commercialisé en 2009. Afin de mieux comprendre les conséquences de ces améliorations, ce paragraphe sera consacré à la comparaison des cellules Triwave des Synapt G1 et G2 HDMS.

Afin d'augmenter la résolution de la cellule IMS, plusieurs axes de développement ont été envisagés : une augmentation de la taille de la cellule IMS, une augmentation du nombre de vagues de potentiels au sein de la cellule IMS ou une modification des paramètres de mobilité ionique.

### a. Augmentation de la taille de la cellule IMS

Sur les instruments de type TWIMS, les vagues sont formées grâce à l'application d'un potentiel continu se propageant de paires de lentilles en paires de lentilles, formant des vagues de potentiels. Afin d'améliorer la qualité des séparations par IMS, le nombre de vagues au sein de la cellule de mobilité doit être augmenté. Par conséquent, sur le Synapt G2, 18 paires de lentilles supplémentaires ont été ajoutées au niveau de la cellule IMS ce qui correspond à une augmentation de 69 mm de la cellule de mobilité (Figure 27)<sup>170, 185</sup>.

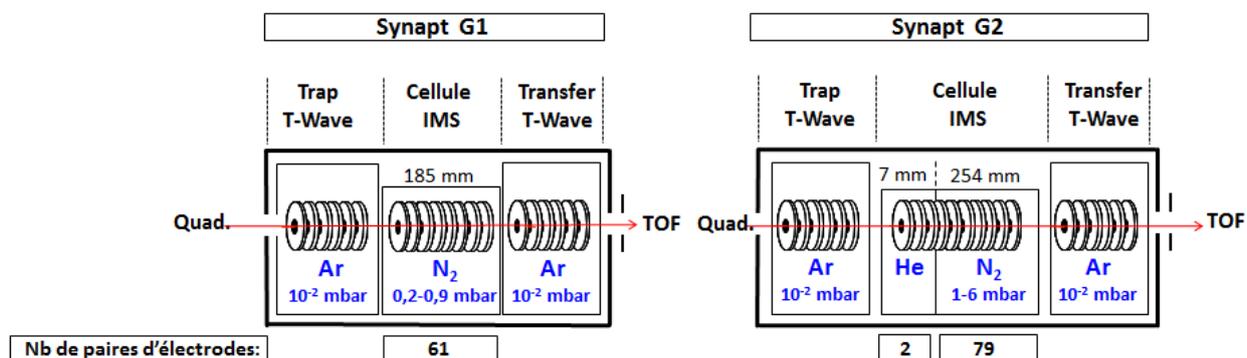
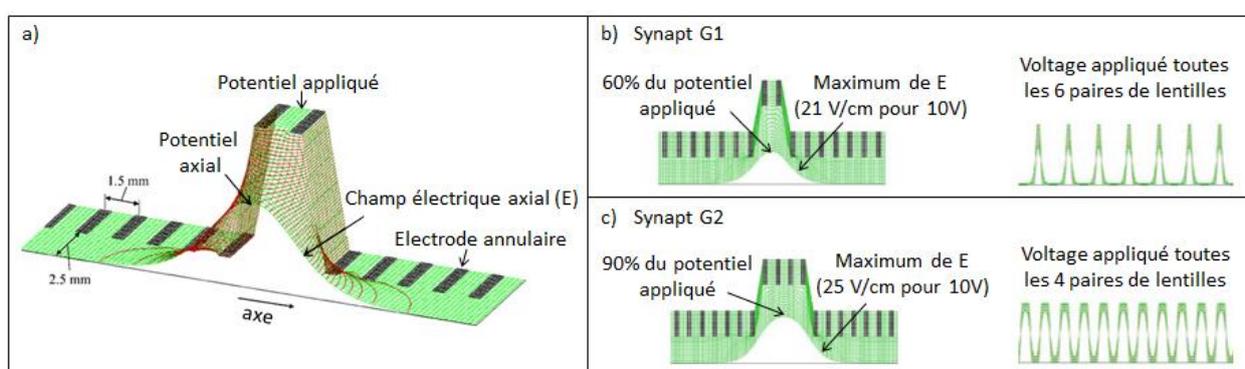


Figure 27 : Comparaison des cellules de mobilité des Synapt HDMS G1 et G2. Chaque cellule est formée de 3 compartiments appelés Trap T-Wave, cellule IMS et Transfer T-Wave. Les gaz présents au sein de ces cellules ainsi que les pressions appliquées sont indiquées en bleu. Le nombre de paires de lentilles ainsi que la dimension de la cellule IMS sont aussi précisés.

## b. Augmentation du nombre de vagues de potentiels au sein de la cellule IMS

Une simulation de la forme des vagues appliquées dans le Synapt G1 a permis de montrer que le potentiel appliqué au niveau des lentilles du guide d'ions SRIG décroît de manière importante pour atteindre un minimum au centre du guide d'ions égal à 60% de la valeur du potentiel appliqué (Figure 28, a et b) <sup>186</sup>. Étant donné que le potentiel appliqué au centre du guide d'ions est celui qui permet réellement la séparation des ions, pour augmenter la résolution en mobilité ionique, il a semblé intéressant d'augmenter ce potentiel. Afin d'augmenter la distance parcourue par les ions au centre des guides d'ions, les vagues de potentiels ne sont plus appliquées sur deux paires de lentilles, mais sur quatre, permettant d'appliquer 90% du potentiel choisi au centre des vagues (Figure 28, b et c) <sup>185</sup>.



**Figure 28 : Différence entre les vagues de potentiel des Synapt G1 et G2 HDMS.** a) Coupe transversale d'une vague de potentiel T-Wave de 10 V dans un SRIG modélisée par le logiciel SIMION. Comparaison des tensions appliquées sur les vagues T- Wave et des motifs de répétition entre les Synapt G1 (b) et G2 (c) HDMS. Adapté d'après <sup>185, 186</sup>.

De plus, afin d'augmenter la séparation par IMS, les vagues de potentiels sont espacées de 4 paires de lentilles au lieu de 6 (Figure 28, b).

## c. Augmentation de la pression dans la cellule IMS

Afin d'améliorer la résolution de la cellule de mobilité ionique, la pression dans la cellule IMS a été augmentée <sup>98</sup>. Toutefois, augmenter la pression en  $N_2$  impliquerait l'utilisation de potentiels plus énergétiques au point d'injection des ions dans la cellule de mobilité, conduisant à une perte des ions par diffusion ou fragmentation. Afin d'éviter ces problèmes, une chambre d'hélium a été ajoutée en amont de la cellule IMS (Figure 27). Les ions étant plus mobiles dans l'hélium que dans l'azote, les tensions d'accélération utilisées sont donc moins énergétiques, réduisant ainsi les phénomènes de fragmentation. Cette cellule d'hélium de 7 mm de long est composée de 4 électrodes annulaires en mode RF-only. Elle est séparée de la cellule IMS par une lentille dont le diamètre interne est de 2 mm pour éviter les diffusions de gaz de la cellule d'hélium à la cellule IMS. La présence de cette cellule d'hélium permet de travailler avec des pressions de l'ordre de 3 mbar dans la cellule IMS sans altérer la transmission des ions <sup>185</sup>.

#### d. Conclusion

L'augmentation de la longueur de la cellule IMS, l'augmentation des vitesses et hauteurs de vagues ainsi que l'augmentation de la pression de travail dans la cellule IMS ont permis de multiplier par 4 la résolution obtenue en mobilité ionique sur les instruments de nouvelle génération<sup>185</sup>.

Toutefois, l'ensemble des modifications apportées au niveau du Synapt G2 a conduit à une complexification de l'optimisation des paramètres de mobilité ionique qui sera détaillée dans troisième partie de cette thèse.

### 2.3 Acquisition et représentation des données

Le couplage IM-MS permet d'obtenir simultanément une information concernant le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité et les rapports  $m/z$  grâce à un unique détecteur situé après l'analyseur TOF. En effet, en l'absence de détecteur en sortie de cellule IMS, le paramètre qui est mesuré, est le temps mis par les ions pour aller de l'entrée de la cellule de mobilité jusqu'au détecteur. Afin d'assurer une mesure précise des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité, la cellule IMS et l'analyseur TOF fonctionnent de manière synchronisée (Figure 29).

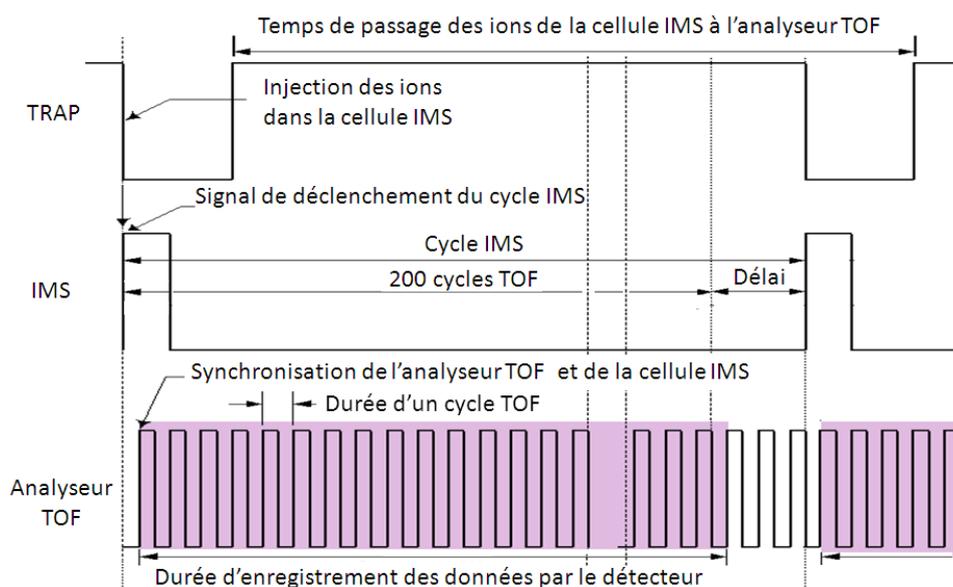


Figure 29 : Synchronisation des parties Trap et IMS avec l'analyseur TOF lors d'une analyse par IM-MS (D'après Waters). La partie colorée en rose correspond à la durée d'un cycle IMS (200 cycles TOF).

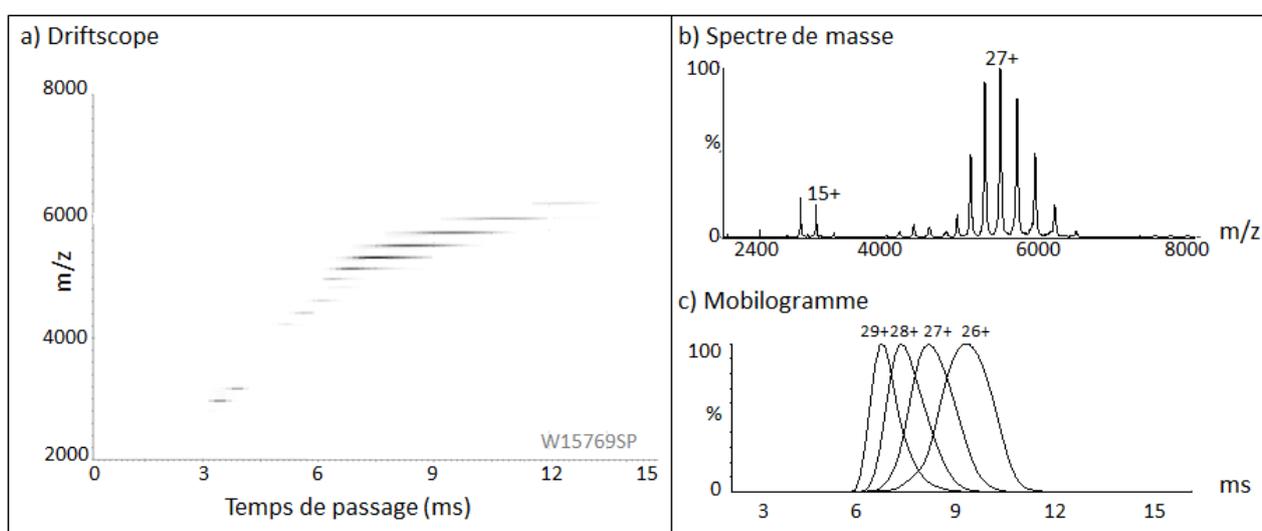
Cette synchronisation est nécessaire, car la cellule de mobilité ionique fonctionne par cycles de l'ordre de quelques millisecondes alors que les cycles de l'analyseur de type temps de vol sont de l'ordre de la microseconde.

Ainsi, sur les Synapt HDMS, un cycle IMS correspond à 200 cycles TOF. A chaque fin de cycle IMS, un nouveau paquet d'ions est injecté dans la cellule IMS et le nombre de cycles TOF est réinitialisé. Afin de déterminer le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité, il faut

multiplier le nombre de cycles TOF effectués depuis l'injection dans la cellule IMS par la durée d'un cycle TOF (ou *Pusher Cycle Time*).

À la fin d'une acquisition, les spectres obtenus au cours de chacun des 200 cycles TOF sont sommés de manière à fournir un spectre, appelé mobilogramme, représentant le temps de passage des différents ions dans la cellule de mobilité. Ce mobilogramme est divisé en 200 canaux correspondant aux nombres de cycles TOF ayant lieu pendant un cycle IMS.

A l'issue de chaque acquisition, les résultats obtenus peuvent être visualisés grâce à une représentation graphique appelée *Driftscope*, (Figure 30, a) représentant le spectre de masse ( $m/z$ ) (Figure 30, b) en fonction du temps de passage des ions dans la cellule de mobilité comme le montre la Figure 30.



**Figure 30 : Représentation graphique d'une acquisition en couplage IM-MS.** a) Driftscope : représentation du spectre de masse en fonction du temps de passage dans la cellule de mobilité (mobilogramme). b) Spectre de masse correspondant à l'analyse d'un anticorps. c) Mobilogrammes extraits des états de charges 26, 27, 28 et 29+ d'un anticorps analysé par IM-MS.

À partir du mobilogramme, il est possible d'extraire la mobilité d'un ion de  $m/z$  choisi afin de comparer plusieurs conditions expérimentales (Figure 30, c).

## Conclusion de cette partie

Cette étude bibliographique a eu pour but de présenter les différentes problématiques liées à l'étude des complexes et de leurs interactions. Nous avons souhaité présenter une vue d'ensemble des approches analytiques permettant l'étude de ces complexes multiprotéiques et plus particulièrement le rôle des approches analytiques basées sur des techniques MS.

Les développements instrumentaux et méthodologiques réalisés ces dernières années dans les domaines de la MS et de l'IM-MS supramoléculaires ont permis d'accéder à l'étude de complexes biologiques intacts en phase gazeuse par la mesure de leur masse, mais aussi par la détermination de leur conformation en phase gazeuse. Les avancées réalisées ces dernières années ont permis d'étendre les possibilités offertes par la MS grâce à l'amélioration de la résolution et de la sensibilité des instruments, mais aussi grâce à l'automatisation de systèmes d'injection nécessitant de faibles quantités d'échantillons.

Cependant, de nombreuses questions subsistent, car l'étude de l'ensemble des interactions existant au sein des cellules est relativement complexe et nécessite notamment le développement de la MS et de l'IM-MS pour l'étude de mélanges complexes et de très hauts poids moléculaires ainsi que l'amélioration des méthodes de préparation de ces échantillons.

---

## *Partie 2 : Optimisations expérimentales et instrumentales pour l'analyse par MS et IM-MS de complexes supramoléculaires en biologie*

---

Cette partie a pour but de présenter de manière détaillée les différentes étapes clés d'une analyse par MS et IM-MS supramoléculaires. Les différents instruments utilisés au cours de ce travail de thèse seront présentés de façon approfondie afin de mieux comprendre les différentes parties de ce travail. L'importance de l'optimisation des paramètres instrumentaux sera notamment illustrée au travers de différents exemples d'application.

### **Chapitre 1 : Préparation d'échantillons pour la MS et l'IM-MS supramoléculaires**

### **Chapitre 2 : Optimisations instrumentales en MS supramoléculaire sur le Synapt HDMS G2**

### **Chapitre 3 : Optimisations instrumentales en IM-MS sur les instruments de type Synapt HDMS**

### **Chapitre 4 : Les informations déduites des analyses par MS et IM-MS supramoléculaires**

### **Chapitre 5 : Comparaisons des données obtenues sur les Synapt G1 et G2 par MS et IM-MS**



# Chapitre 1 : Préparation d'échantillons pour la MS et l'IM-MS supramoléculaires

---

La plupart des échantillons biologiques que nous avons à analyser par MS sont produits puis purifiés dans des tampons adaptés aux protéines. Toutefois, ces tampons contiennent de nombreux composés non volatils (sels, détergents, réducteurs. ), non compatibles avec une analyse par MS. En effet, ces composés entraînent une suppression du signal et forment des adduits compliquant l'interprétation des spectres de masse<sup>187</sup>. L'une des premières étapes lors d'une analyse par MS supramoléculaire est donc l'échange du tampon de purification par un tampon compatible avec l'ionisation de type électrospray aussi appelé dessalage. Cette étape est importante, car elle conditionne la qualité des résultats obtenus. C'est pourquoi une optimisation rigoureuse du choix du tampon d'échange ainsi que de la méthode de dessalage est indispensable.

## 1 Choix du tampon

---

Lors du choix du tampon, il est important de prendre en compte la nature du tampon, sa force ionique ainsi que son pH afin de ne pas entraîner des modifications fortuites au niveau des échantillons analysés.

### 1.1 Nature du tampon d'échange

---

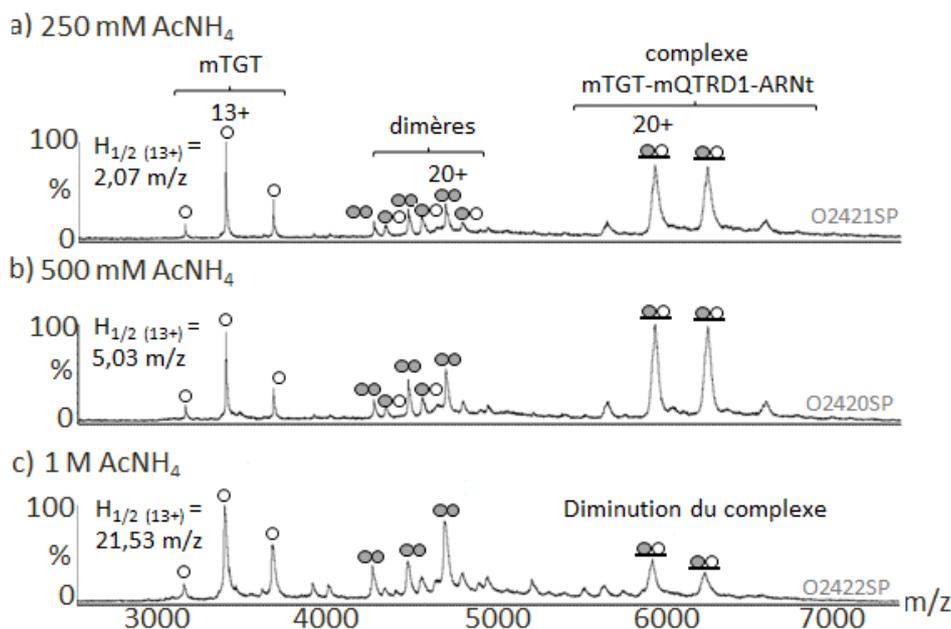
Plusieurs tampons sont couramment utilisés en MS, il s'agit de sels d'ammonium tels que le bicarbonate d'ammonium ou l'acétate d'ammonium<sup>187</sup>. Ces sels volatils compatibles avec l'ESI permettent de préserver la stabilité des protéines en solution et l'intégrité des complexes non-covalents. Dans certains cas, les protéines précipitent dans ces sels d'ammonium, nous avons alors recouru à d'autres sels comme le formiate d'ammonium, le bicarbonate de triéthylammonium ou l'acétate de pyridinium<sup>3, 188-190</sup>.

### 1.2 Choix de la force ionique du tampon

---

La force ionique du tampon doit être finement optimisée. En effet en fonction des échantillons, elle peut être de l'ordre de quelques mM à 1 ou 2 M. Par conséquent, il est important d'adapter la force ionique du tampon d'échange à la celle du tampon de purification. D'autre part, la force ionique du tampon joue un rôle important dans la stabilité de certains complexes tels que des complexes protéine/acides nucléiques. En effet, comme le montre la Figure 1, une augmentation de la force ionique de 250 mM à 1 M peut conduire à une déstabilisation d'un complexe multiprotéique

(mTGT-mQTRD1-ARNt) se caractérisant sur les spectres de masse par une diminution des signaux de ce complexe et une augmentation des signaux des partenaires seuls (mTGT et dimère mQTRD1). Cette analyse nous montre aussi l'influence de la force ionique sur la finesse des pics. En effet, avec un tampon acétate d'ammonium à 1 M, le pic de l'état de charge 13+ est plus large ( $H_{1/2} = 21.53$  m/z) qu'avec un tampon à 250 mM ( $H_{1/2} = 2.07$  m/z).



**Figure 1** : Effet de la force ionique du tampon sur la stabilité des complexes en phase gazeuse. Analyse d'un complexe protéines/ARN à différentes concentrations en acétate d'ammonium ( $V_c = 150$  V,  $P_i = 5.5$  mbar), ○, ●, ◐ et ◑ correspondent respectivement à mTGT, (mQTRD1)<sub>2</sub>, mTGT/mQTRD1 et mTGT/mQTRD1/ARNt).

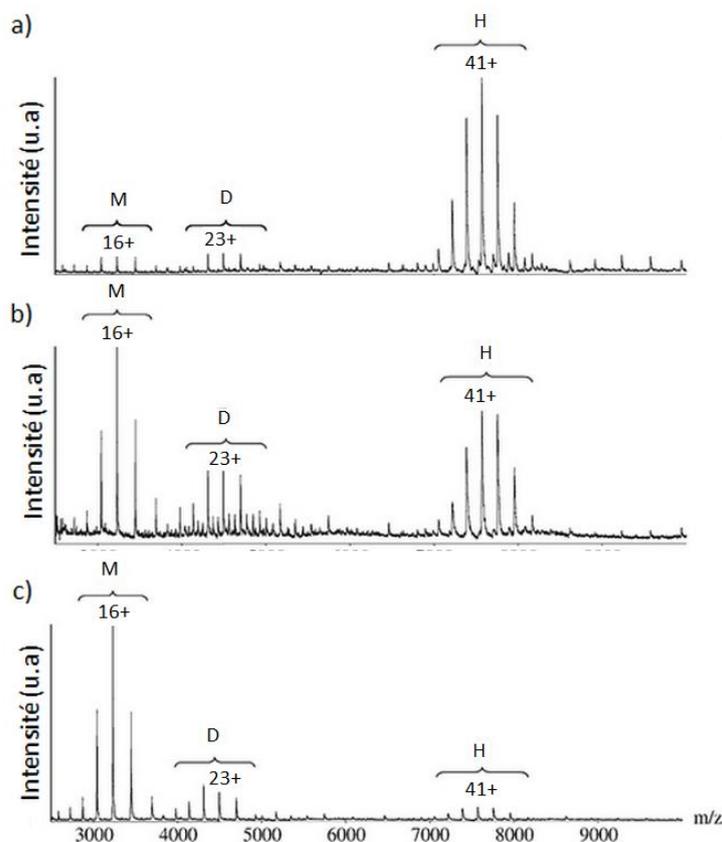
Inversement, nous avons mis en évidence lors de l'étude d'une protéine de haut poids moléculaire, détaillée dans la partie 4 de ce manuscrit, que l'augmentation de la force ionique permettait de stabiliser des états d'oligomérisation élevés.

Par conséquent, la force ionique du tampon doit être adaptée à chaque échantillon. Généralement, lors d'une première étude, la force ionique du tampon d'échange utilisé est identique à celle du tampon de purification de la protéine étudiée

### 1.3 Effet du pH sur la stabilité des complexes étudiés

Le dernier paramètre à prendre en compte est le pH de la solution. En effet, le pH peut avoir une incidence sur la conformation et la stabilité des protéines en solution. C'est pourquoi nous utilisons généralement des pH proches des valeurs physiologiques. Cependant la gamme de pH que nous pouvons explorer va des pH 4 à 9. Pour cela le pH de l'acétate d'ammonium est ajusté à l'aide d'acides et de bases compatibles avec la MS à savoir de l'acide formique ou une solution d'ammoniaque.

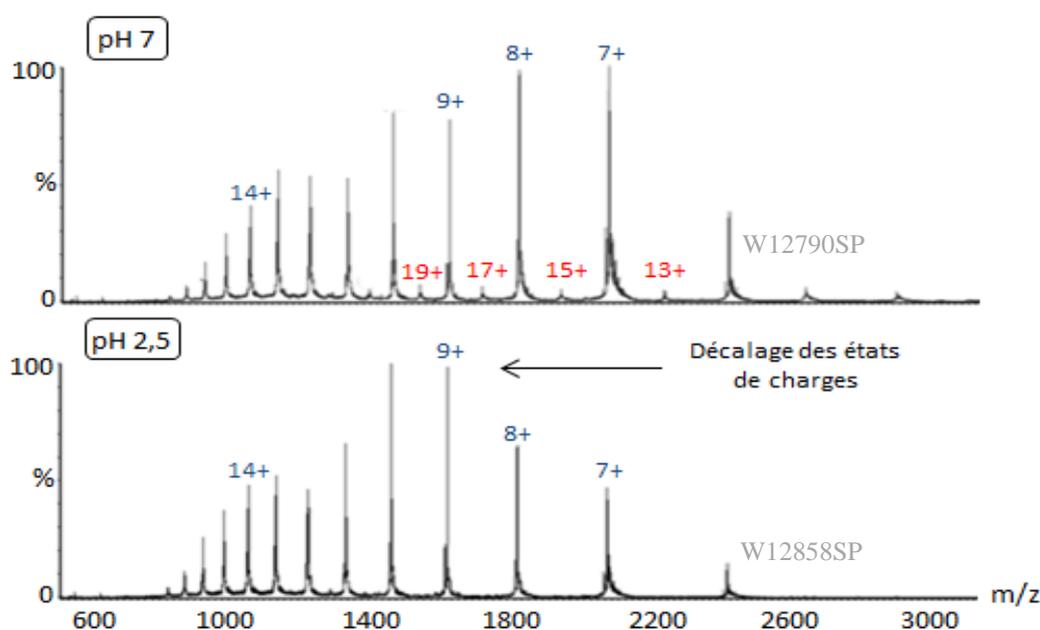
Une étude réalisée précédemment au sein du laboratoire a permis de mettre en évidence l'effet du pH sur la stabilité de l'héxamère non-covalent de HPrK/P (*Histidine-containing protein kinase/phosphatase*) (Figure 2).



**Figure 2 : Influence du pH sur la stabilité de l'héxamère de HPr K/P** (D'après <sup>143</sup>). Analyse de l'héxamère de HPrK/P diluée à 20  $\mu$ M dans un tampon acétate d'ammonium 10mM est ajusté à l'aide d'une solution d'ammoniaque,  $V_c = 200V$ ,  $P_i = 6.5$  mbar. a) pH 6.8, b) pH 8.5 c) pH9.5. M = monomérique, D = dimérique, H = héxamère de HPrK/P.

À pH 6.8 (Figure 2, a), l'héxamère HPrK/P est majoritairement observé (80%) alors qu'à pH 8.5, l'intensité correspondant à l'héxamère diminue (35%) au profit des formes monomériques (50%) et dimériques (15%) de HPrK/P (Figure 2, b). À pH 9.5 (Figure 2, c), la protéine est majoritairement sous forme monomérique (70%) et dimérique (20%). En conclusion, l'utilisation de pH basiques conduit à la dissociation de l'héxamère de HPrK/P sous forme de dimères et de monomères.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié une autre protéine sensible au pH, l'alpha synucléine. Cette protéine est présente minoritairement sous forme dimérique (en rouge) lorsqu'elle est étudiée à pH physiologique (Figure 3). À pH acide, cette forme dimérique disparaît, suggérant une déstabilisation des interactions non-covalentes. D'autre part, nous avons pu observer un décalage des états de charges de la protéine monomérique (en bleu) suggérant une ouverture de la protéine à pH acide. (Figure 3).



**Figure 3 :** Effet du pH sur l'ionisation de la protéine alpha-synucléine. La protéine alpha-synucléine dessalée deux fois par filtration sur gel (Zeba) a été analysée à pH 7 ou 2,5. (20  $\mu$ M,  $V_c = 60$  V,  $P_i = 4.5$  mbar).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Bowers MT sur cette protéine <sup>191</sup>.

En conclusion, il est important d'optimiser le pH du tampon d'échange afin de préserver les interactions non-covalentes existantes au sein des complexes étudiés par MS supramoléculaire.

### 1.4 Composés non volatils incompatibles avec la MS supramoléculaire

Afin de faciliter les étapes d'échanges de tampons, certains composés non compatibles avec la MS doivent être enlevés lors des étapes de purification des protéines.

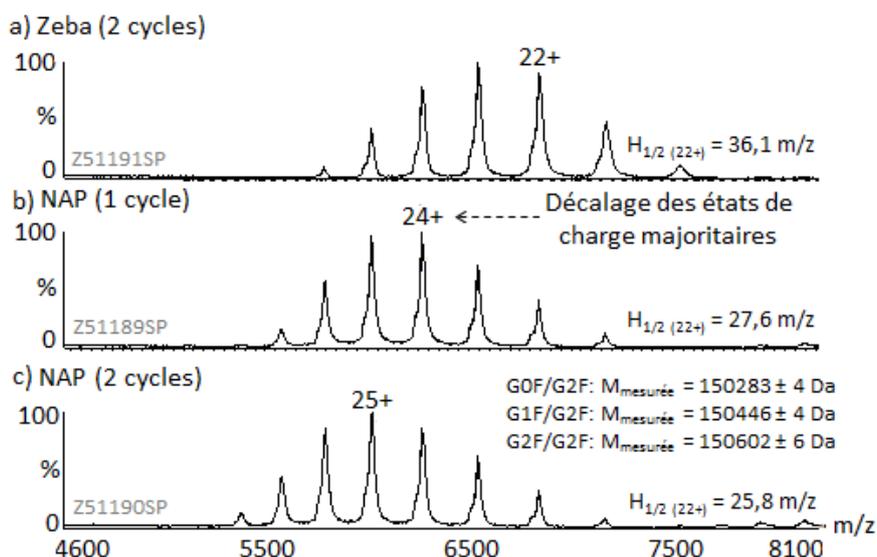
Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu observer qu'il était préférable de remplacer l'HEPES par du Tris qui ne perturbe pas les échanges de tampon. De même, nous avons pu mettre en évidence qu'il était préférable d'utiliser le DTT, comme agent réducteur, plutôt que le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui entraîne la formation d'adduits covalents de +78 Da sur les protéines. Enfin, le glycérol, qui est un agent de conservation ne doit pas être ajouté à des échantillons destinés à une analyse par MS, car il altère la qualité des spectres même après dessalage <sup>192</sup>.

## 2 Choix de la méthode de dessalage

Plusieurs méthodes de dessalage peuvent être utilisées telles que la filtration sur gel, l'ultrafiltration et la dialyse.

La **filtration sur gel** ou chromatographie d'exclusion stérique est une technique basée sur la différence de taille entre les molécules. Les colonnes de filtration sur gel sont composées de billes poreuses capables de retenir les petites molécules et non les grosses. Ainsi lors du passage de l'échantillon sur la colonne, les protéines ne seront pas retenues et sortiront rapidement de la colonne alors que la plupart des contaminants passant par les pores ne sortiront qu'en dernier. Nous disposons

de deux types de colonnes : les colonnes « Zeba » (ThermoFisherScientific) où la filtration sur gel est réalisée par centrifugation et les colonnes « NAP-5 » (GE Healthcare) où la filtration se fait par gravité. Les dessalages sur colonne Zeba sont rapides avec des rendements souvent plus élevés que sur les colonnes NAP-5 qui sont plus longs et qui conduisent à la dilution de l'échantillon. Cependant, pour certains échantillons tels que les anticorps, des dessalages sur NAP-5 sont plus efficaces que sur colonne Zeba comme en témoigne la diminution des largeurs des pics à mi-hauteur ( $H_{1/2}$ ) (Figure 4, a-c). Toutefois, dans le cas de l'anticorps Hz515VL2, un dessalage sur NAP-5 a conduit à une augmentation des états de charges majoritaires suggérant une dénaturation partielle de l'anticorps provoquée par l'échange de tampon.



**Figure 4: Effet de la méthode de dessalage sur la désolvation des protéines.** a-c) Analyse de l'anticorps Hz515VL2 2 $\mu$ M en conditions natives (Tampon AcNH<sub>4</sub> 150mM, pH 7.5, V<sub>c</sub> = 200 V, P<sub>i</sub> = 7 mbar).

L'**ultrafiltration** permet une séparation des molécules en fonction de leur taille grâce à une membrane dont la porosité est définie. Ainsi, toutes les molécules inférieures à la porosité choisie passeront à travers la membrane. Au laboratoire, nous utilisons des colonnes Vivaspins (Sartorius) qui sont utilisées pour les dessalages, mais aussi pour concentrer des échantillons. Le temps de dessalage par ultrafiltration est variable en fonction des échantillons et peut conduire dans certains cas à une précipitation des protéines sur la membrane. Toutefois, comme nous le verrons dans la dernière partie de cette thèse, cette technique est très utile pour le dessalage des protéines de hauts poids moléculaires.

La **dialyse** permet un échange de tampon par équilibre osmotique. Nous disposons de capsule de dialyse (Side A-Lyser, Thermo) possédant une membrane perméable dont la taille des pores doit être choisie en fonction de la protéine étudiée. Les molécules inférieures au diamètre des pores s'échangeront de part et d'autre de la membrane jusqu'à atteindre un équilibre osmotique. Cette méthode de dessalage est longue et peut conduire à une dilution de l'échantillon.

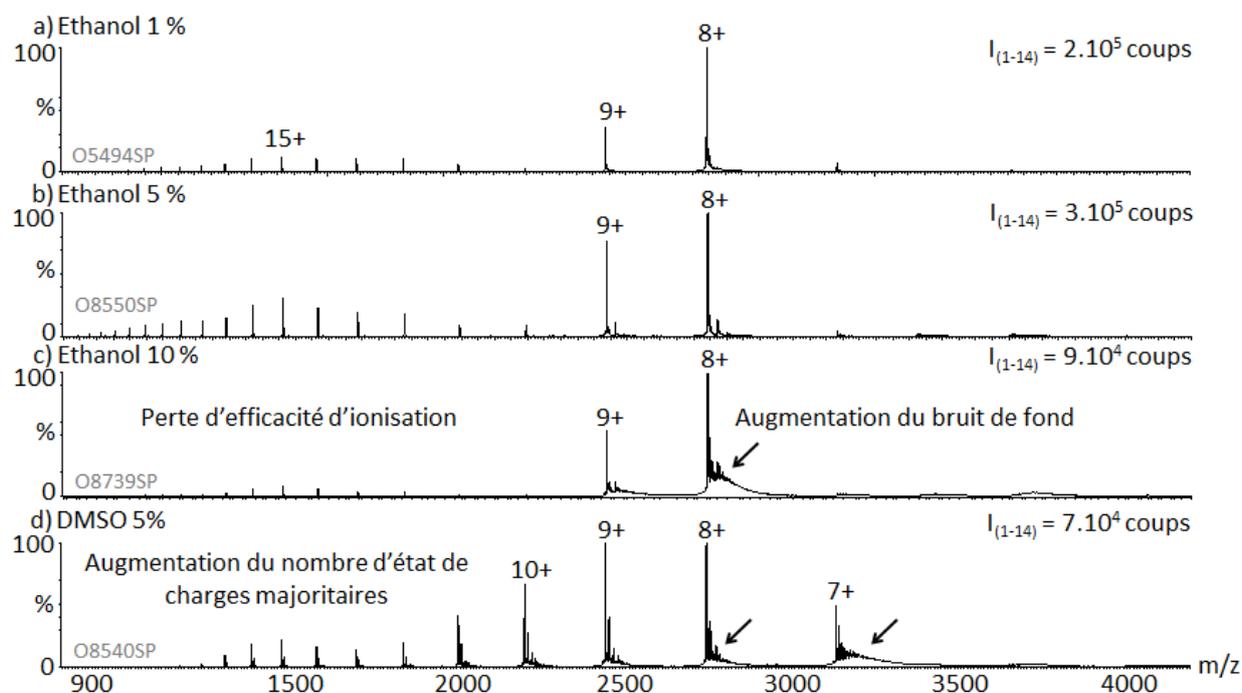
La technique de dessalage doit être finement optimisée pour obtenir le meilleur dessalage possible. Cette étape est primordiale pour garantir des spectres de bonne qualité et par conséquent les meilleurs résultats possibles.

Lors de l'initiation d'un nouveau projet, les différentes techniques de dessalage sont donc comparées afin de retenir la technique la plus rapide, permettant un dessalage correct de l'échantillon avec des états de charges les plus petits possible suggérant une conservation de l'état natif de la protéine.

### 3 Les ligands et leur solution de stockage : compatibilité avec l'ESI

D'autres types d'échantillons nécessitent aussi une grande attention, il s'agit des ligands de synthèse, souvent stockés dans du DMSO ou de l'éthanol. Toutefois, dans certains cas, le DMSO comme l'éthanol peuvent avoir des effets délétères sur les protéines.

La Figure 5 montre l'effet de ces deux composés sur la qualité des spectres de masse.



**Figure 5 :** Effet de l'éthanol et du DMSO sur la qualité des spectres de masse. La protéine PDF1B a été analysée en conditions natives après ajout de a) 1, b) 5 ou c) 10% d'éthanol ou d) de 5% de DMSO. Les courants d'ions totaux ont été enregistrés pendant 14 scans de 4 secondes ( $I_{(1-24)}$ ). Les flèches indiquent la présence de bruit de fond.

Lorsque la concentration en éthanol augmente (de 1 à 5%), une augmentation du courant d'ion total est observée (Figure 5 a, b). Toutefois, pour des concentrations plus élevées en éthanol (Figure 5, c), une augmentation du bruit de fond ainsi qu'une perte de l'efficacité d'ionisation sont observées comme le montre l'enregistrement du courant d'ion total (Diminution de l'intensité du signal de 30% entre 5 et 10% d'éthanol). Par conséquent, il est possible d'utiliser de l'éthanol lors d'étude d'interaction protéine/ligand. Toutefois, il est important de vérifier que ce dernier n'altère pas le spectre ESI-MS de la protéine étudiée.

De même, lorsque de fortes quantités de DMSO sont utilisées (5%), une diminution importante du courant d'ion total est observée (Figure 5, a et d). De plus, une augmentation de la distribution des états de charge est observée suggérant une augmentation des sites accessibles à la protonation. De fortes concentrations en DMSO peuvent donc conduire à des changements conformationnels comme l'a montré récemment l'équipe de Sterling<sup>193</sup>. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que le DMSO pouvait avoir un effet délétère sur l'efficacité d'ionisation des protéines ainsi qu'un effet sur la conformation de ces dernières (Figure 5, d).

Par conséquent, lorsque cela est possible, les ligands stockés dans du DMSO sont dilués dans de l'éthanol puis soumis à plusieurs étapes de séchage sous vide puis solubilisation dans l'éthanol. La plupart des protéines peuvent ensuite être analysées par MS avec des concentrations en éthanol inférieures à 5%. Toutefois, un contrôle doit systématiquement être réalisé pour vérifier la stabilité des protéines en présence d'éthanol ou de DMSO.



---

## Chapitre 2 : Optimisations instrumentales en MS supramoléculaire sur le Synapt HDMS G2

---

La seconde étape importante lors de la réalisation d'analyses par MS supramoléculaire est l'optimisation des paramètres instrumentaux. Il est donc essentiel de connaître le fonctionnement de chaque instrument et ses spécificités. Les optimisations réalisées au cours de ce travail de thèse seront présentées de manière détaillée sur le Synapt HDMS G2.

### 1 Désolvatation - maintien des interactions non-covalentes en phase gazeuse, une question de compromis

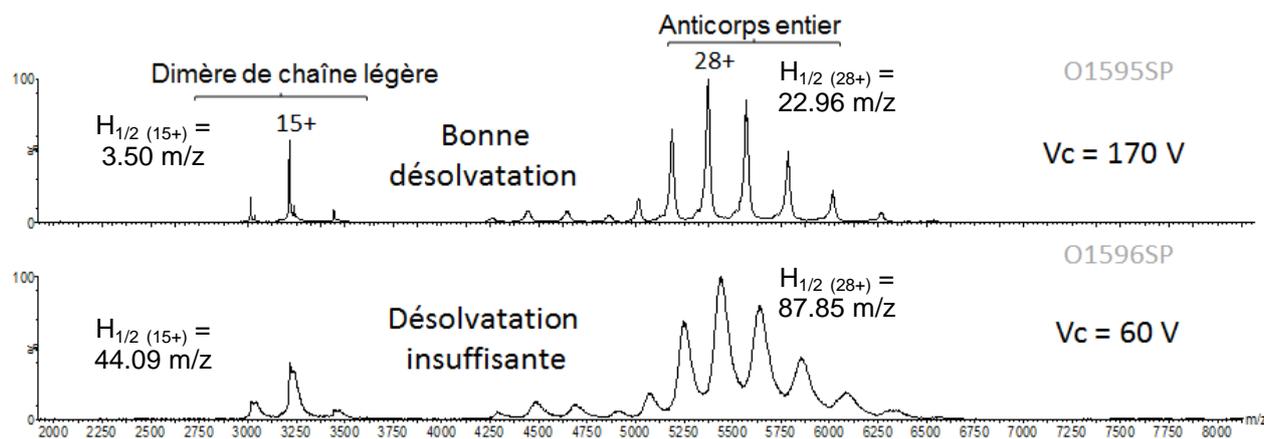
---

Lors de l'optimisation des paramètres instrumentaux, il est important de contrôler l'énergie cinétique transmise aux ions. En effet, pour obtenir des spectres de bonne qualité, permettant de mesurer des masses précises, il est important de communiquer aux ions une énergie cinétique suffisante pour permettre une bonne désolvatation des ions. Toutefois si cette énergie est trop importante, elle peut entraîner la dissociation des complexes en phase gazeuse. Par conséquent, il est important de trouver le bon compromis entre les paramètres jouant un rôle dans la désolvatation, à savoir, la tension d'accélération ( $V_c$ ), la pression de gaz dans l'interface ( $P_i$ ), mais aussi dans une moindre mesure la température de désolvatation.

#### 1.1 Potentiel d'accélération ( $V_c$ )

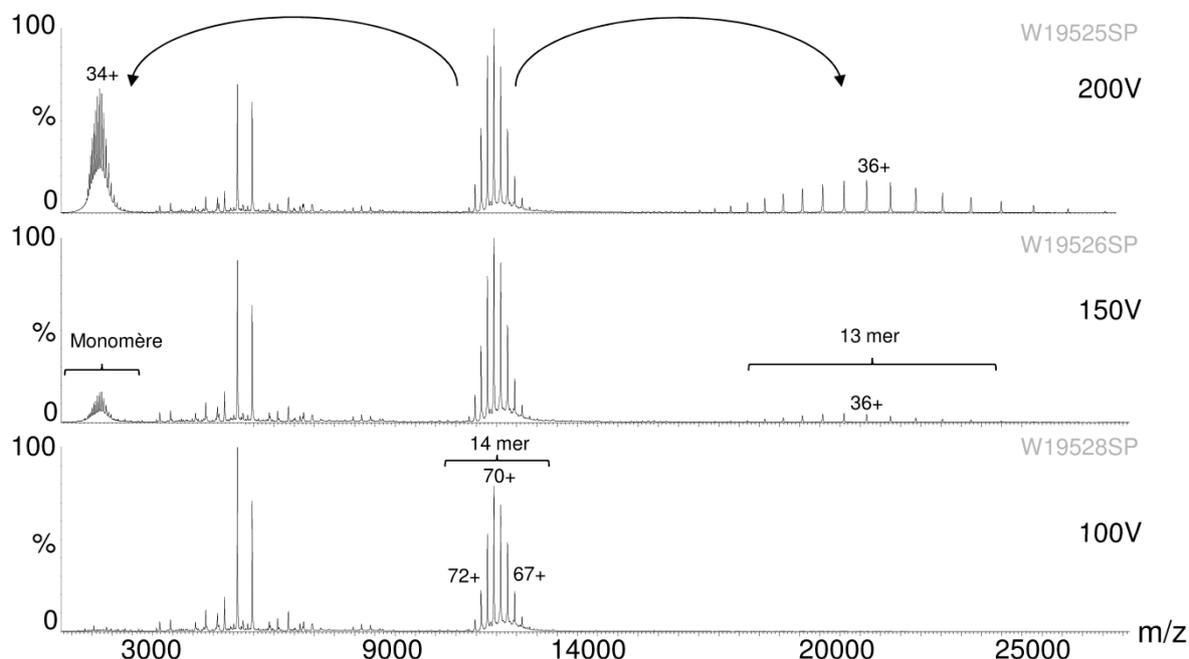
---

Le potentiel d'accélération est appliqué au niveau du cône d'échantillonnage et permet d'augmenter l'énergie cinétique des ions qui, lors des collisions avec les molécules de gaz, est convertie en énergie interne. L'augmentation de cette tension entraîne donc des collisions plus énergétiques entre les ions et les molécules de gaz environnantes, conduisant à une augmentation de l'énergie interne des ions, et par conséquent à leur désolvatation. Cette augmentation se traduit sur le spectre de masse par une diminution de la largeur de pics à mi-hauteur, permettant des mesures de masse précises ( $M_{\text{mesurée } 60V} = 150\,411 \pm 8 \text{ Da}$ ,  $M_{\text{mesurée } 170V} = 152\,157 \pm 36 \text{ Da}$ ,  $M_{\text{théorique}} = 150\,389 \text{ Da}$ ) (Figure 6).



**Figure 6 : Effet du potentiel d'accélération  $V_c$  sur la désolvatation des ions.** Analyse d'un anticorps entier (Hz515QVQ) dessalé deux fois par filtration sur gel (NAP-5) puis ultrafiltration (Vivaspin 30 kDa), infusé à 2  $\mu$ M en conditions natives (Tampon  $\text{AcNH}_4$  150 mM, pH 7,5,  $P_i$  = 7 mbar)

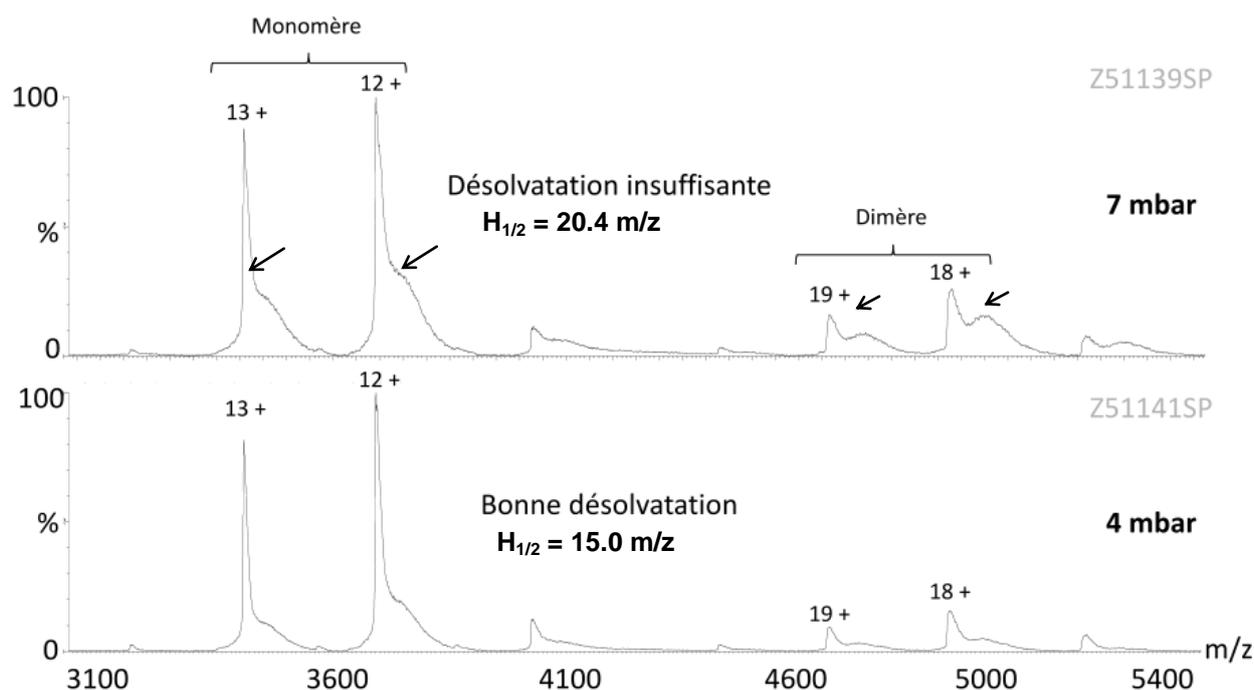
Toutefois, des énergies trop importantes peuvent conduire à la dissociation des complexes non-covalents comme l'illustre l'étude d'une protéine multimérique, la protéine chaperone GroEL (Figure 7). Nous avons pu mettre en évidence qu'une augmentation du potentiel d'accélération de 100 à 150V conduisait à une dissociation de cette protéine de 14-mer en une sous-unité monomérique possédant un nombre de charges élevé et un oligomère formé de 13 sous-unités. Cette dissociation est d'autant plus importante que le potentiel d'accélération est élevé.



**Figure 7 : Effet du potentiel d'accélération  $V_c$  sur la dissociation des complexes non-covalents en phase gazeuse.** Analyse de la protéine GroEL dessalée 10 fois par ultrafiltration (Vivaspin 2mL, 50 kDa) infusée à 2 $\mu$ M (Tampon  $\text{AcNH}_4$  200 mM, pH 6,9,  $P_i$  = 7 mbar).à différent  $V_c$  : 100, 150 et 200 V.

## 1.2 Pression dans l'interface (Pi)

La pression dans l'interface joue aussi un rôle important puisque l'augmentation de celle-ci entraîne une augmentation du nombre de molécules de gaz par unité de volume. Ainsi, les collisions ions-molécules de gaz sont plus nombreuses, toutefois, celles-ci sont moins énergétiques. Par conséquent, cette augmentation de pression permet de préserver l'intégrité des interactions non-covalentes<sup>144</sup>. Pour une tension d'accélération fixe, une diminution de la pression va permettre une diminution de la largeur des pics de masse à mi-hauteur (Figure 8).

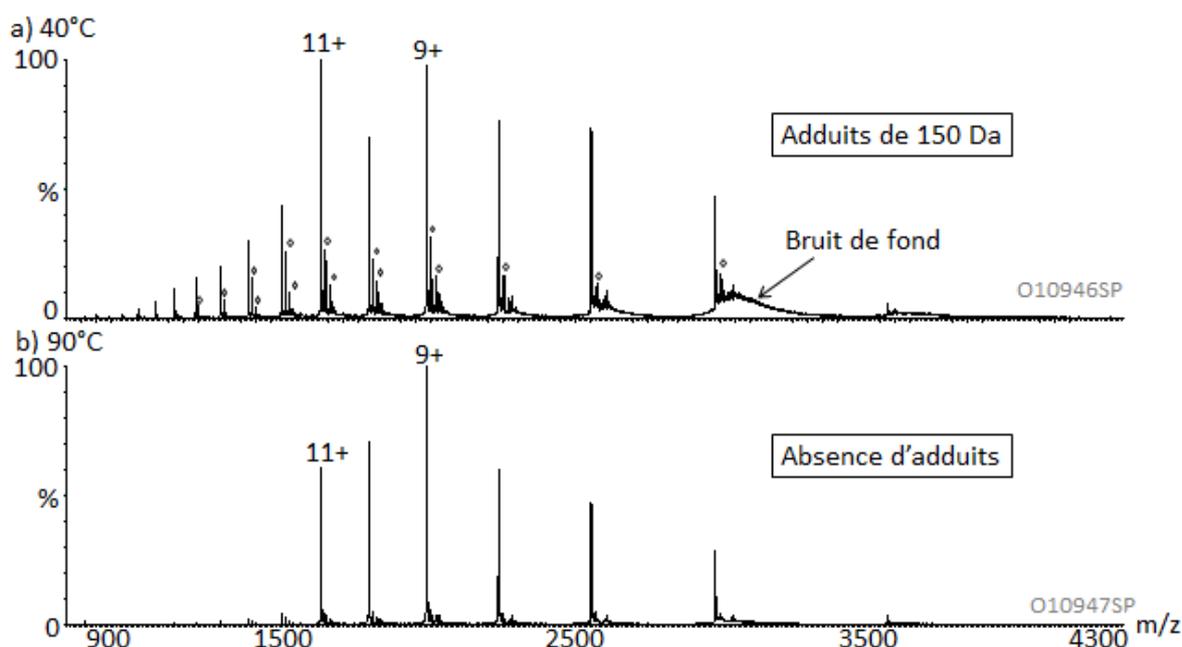


**Figure 8 : Effet de la pression dans l'interface sur la désolvatation des protéines en phase gazeuse.** Analyse de la protéine mTGT dessalée deux fois par filtration sur gel (Zeba), infusée à 15  $\mu$ M dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  150 mM  $V_c=140$ V.

Par conséquent, une optimisation rigoureuse de la pression doit être réalisée pour préserver les complexes non-covalents en phase gazeuse tout en conservant une bonne désolvatation des ions.

## 1.3 Température en source

Un autre paramètre ayant un rôle sur la désolvatation est la température en source. Afin de mettre en évidence l'effet de ce paramètre, nous avons analysé une protéine à deux températures différentes : 40 et 90°C (Figure 9). Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'à une faible température en source : 40°C, des adduits de 150 Da sont présents sur la protéine. Au contraire, une augmentation de la température de désolvatation permet une meilleure désolvatation des ions et donc permet d'éliminer les adduits présents sur la protéine. Cette augmentation de la désolvatation peut s'accompagner d'une diminution de la largeur des pics à mi-hauteur et donc d'améliorer la précision de mesure de masse<sup>194</sup>.



**Figure 9 : Effet de la température en source sur la présence d'adduits.** Analyse de la protéine FRMSR en conditions dénaturantes ( $V_c=40V$ ,  $P_i = 3$  mbar) avec des températures en source de 40°C (a) ou 90°C (b).  $\diamond$  correspond à des adduits de 150 Da.

Par conséquent, ce paramètre doit être optimisé pour permettre une désolvatation correcte des ions en phase gazeuse.

## 2 Paramètres cruciaux pour la transmission des complexes en phase gazeuse

Les ions formés au niveau de la source d'ionisation doivent ensuite être transmis de manière efficace vers l'analyseur. Afin d'augmenter le rendement de transmission des ions, différentes interfaces ont été commercialisées : les multipôles (quadripôle/hexapôle) et les guides d'ions de types SRIG. Les tensions électriques appliquées au niveau de ces guides d'ions vont permettre d'assurer la focalisation des ions, leur thermalisation et leur transmission.

Ce paragraphe a pour but de présenter les différents paramètres expérimentaux permettant l'observation de complexes non-covalents en phase gazeuse. Toutefois, les réglages nécessaires à la transmission et à la détection de complexes de très hauts poids moléculaires seront développés dans la dernière partie de ce manuscrit.

### 2.1 Rôle du potentiel d'accélération et de la pression dans l'interface

Parmi les paramètres à optimiser, la tension d'accélération ainsi que la pression dans l'interface jouent, à nouveau, un rôle important sur la transmission des ions. En effet, l'énergie cinétique communiquée aux ions lors de l'ionisation va permettre la transmission des ions dans la première partie de l'interface.

L'effet de la tension d'accélération sur la transmission peut être mis en évidence par l'évaluation du courant d'ion total. Ainsi, nous avons pu montrer lors de l'étude d'un anticorps (Figure 6) que le

courant d'ion total était multiplié par 4 lorsque la tension d'accélération était multipliée par 3 ( $I_{60V} = 2120$  coups,  $I_{170V} = 8160$  coups pour 15 scans de 4 secondes).

L'augmentation de la pression, quant à elle, va permettre de réduire l'énergie accumulée par les ions. Ce processus, appelé thermalisation des ions, va permettre une meilleure focalisation des ions et donc un meilleur rendement de transmission<sup>103, 138, 140, 142</sup>.

Ainsi, la pression et la tension d'accélération doivent être ajustées pour permettre une bonne transmission des ions de la source à l'analyseur.

## 2.2 Optimisation des paramètres de transmission du quadripôle (Quad Profile)

Le quadripôle peut fonctionner soit en mode « *RF only* » servant uniquement de guide d'ions et permettant de transmettre efficacement les ions sur une gamme réduite de  $m/z$ <sup>147, 195</sup>, soit en tant qu'analyseur. Dans ce dernier cas, au lieu d'appliquer une radiofréquence d'amplitude  $V$  fixe, une rampe de tension  $V$  est balayée en continu (Mode *Quad Profile*). Ainsi, en balayant plusieurs zones de  $m/z$ , il est possible d'élargir la fenêtre de transmission des ions. Lors de l'étude de composés de hauts poids moléculaires, le mode *Quad Profile* permet de favoriser la transmission des ions de hauts rapports  $m/z$  au détriment des ions de faibles  $m/z$ . L'effet de ce paramètre sera illustré dans la dernière partie de ce travail de thèse lors de l'étude de complexes de très hauts poids moléculaires.

## 2.3 Tensions d'accélération des guides d'ions (Trap CE et Transfer CE)

Afin d'augmenter le rendement de transmission des ions, une optimisation des paramètres de l'interface est nécessaire. Les Synapt HDMS, qui ont été les plus utilisés au cours de ce travail de thèse, possèdent à la fois un quadripôle permettant de favoriser ou non la transmission de certains ions, mais aussi plusieurs séries de guides d'ions (Figure 10).

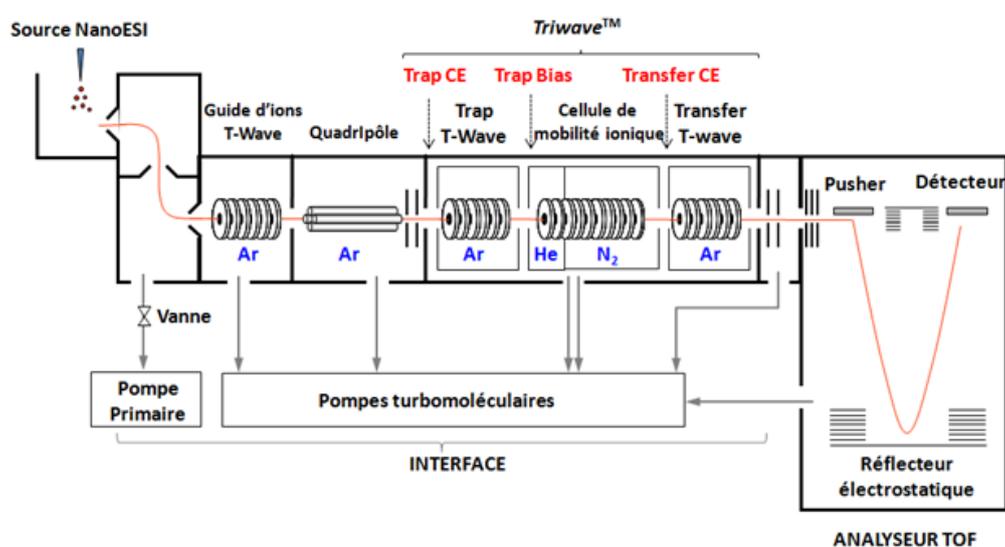
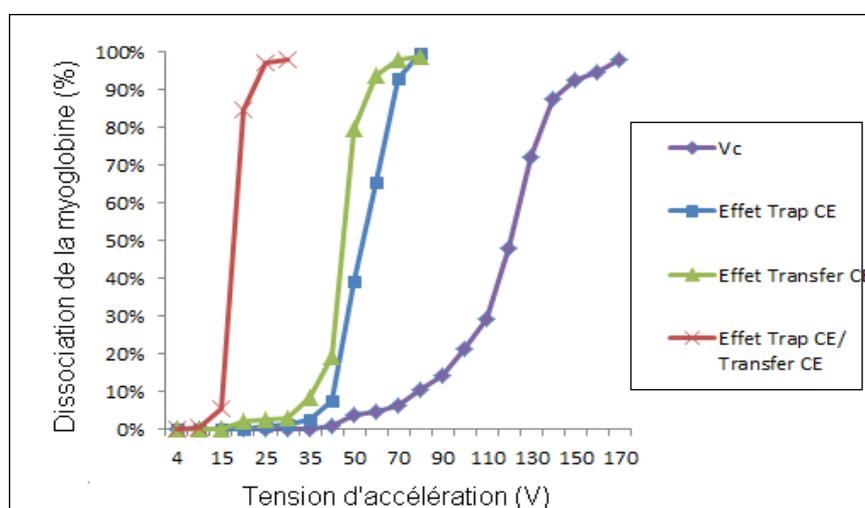


Figure 10 : Schéma du Synapt HDMS G2 représentant les différents guides d'ions intervenant dans la transmission des ions en phase gazeuse ainsi que les différents potentiels d'accélération appliqués au niveau de la cellule T-Wave (en rouge). D'après<sup>169</sup> (Ar : argon, He : Hélium, N<sub>2</sub> : azote).

Parmi les différentes tensions d'accélération, celles ayant une grande importance lors de la transmission des ions sont les potentiels d'accélération Trap CE et Transfer CE. Ces différences de potentiel vont fournir une énergie cinétique aux ions permettant ainsi d'augmenter le rendement de transmission des ions. Toutefois, comme précédemment, il est important de trouver un bon compromis entre transmission et dissociation des complexes non-covalents. En effet, ces tensions permettent d'augmenter la désolvatation et la transmission des ions toutefois, si l'énergie accumulée est trop importante, les liaisons faibles peuvent être rompues. Afin de mettre en évidence l'effet des potentiels d'accélération, nous avons suivi la dissociation du groupement prosthétique de la myoglobine de cœur de cheval (l'Hème) en fonction des paramètres  $V_c$ , Trap CE et Transfer CE (Figure 11).



**Figure 11 : Effet des tensions d'accélération  $V_c$ , Trap CE et Transfer CE sur la déstabilisation des interactions non-covalentes en phase gazeuse.** La myoglobine de cœur de cheval a été analysée en conditions natives ( $\text{AcNH}_4$  50 mM, pH6.8) sur le Synapt G2 HDMS. La dissociation du groupement prosthétique de la myoglobine a permis d'évaluer l'effet des tensions d'accélération  $V_c$ , Trap CE et Transfer CE.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la dissociation de 50% de l'hème de la myoglobine pour des valeurs de Trap et de Transfer CE de 54 V et 40 V respectivement. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles du  $V_c$  induisant 50% de dissociation ( $V_c = 121$  V). Les tensions d'accélération Trap et Transfer CE sont donc plus énergétiques que celles appliquées au niveau du cône d'échantillonnage.

D'autre part, lorsque les mêmes tensions Trap CE et Transfer CE sont appliquées simultanément, la dissociation de 50% de l'hème est observée pour des tensions plus faibles (Trap CE = 18 V et Transfer CE = 18 V).

Ces différents paramètres indépendants doivent donc être optimisés de manière coordonnée pour contrôler l'énergie communiquée aux ions et éviter la dissociation des complexes en phase gazeuse.

## 2.4 Conclusion concernant les optimisations expérimentales

En conclusion, lors de l'étude de complexes non-covalents par MS, la pression dans l'interface ainsi que les différentes tensions d'accélération doivent être optimisées finement de l'interface au temps de vol afin de trouver le meilleur compromis entre désolvatation, transmission des ions et préservation de l'intégrité des interactions non-covalentes (Figure 12).

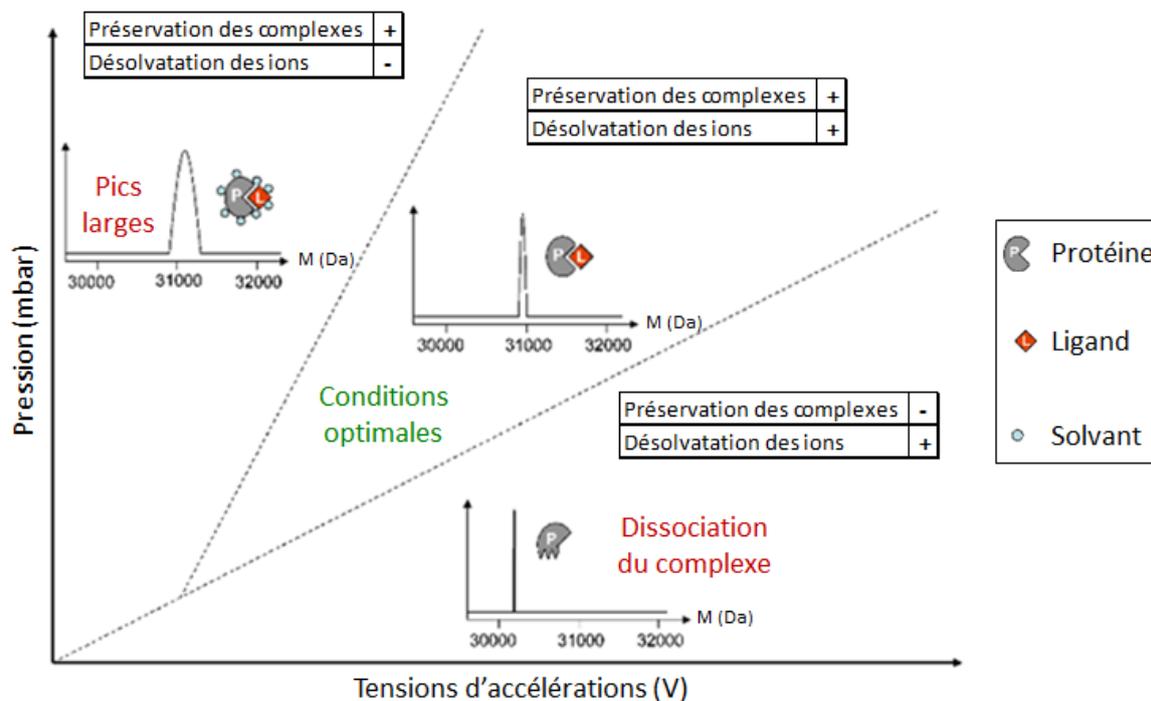


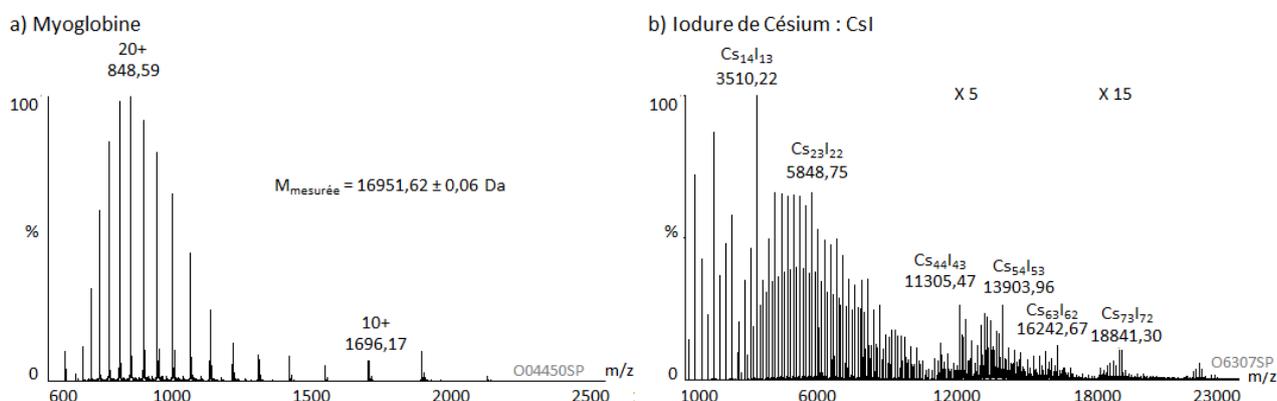
Figure 12 : Optimisation des tensions d'accélération et des pressions permettant une désolvatation et une transmission correctes des ions sans rompre les interactions non-covalentes. Adapté d'après <sup>190</sup>.

## 3 Choix du mode de digitalisation du signal

Depuis l'avènement de la MS supramoléculaire, seuls des détecteurs de type MCP couplés à des digitaliseurs de type TDC ont été utilisés. Cependant, les avantages liés à l'utilisation de détecteurs de type MagnéTOF couplés à des digitaliseurs de type ADC ont conduit les constructeurs à équiper leurs nouveaux instruments, tels que le Synapt G2, avec cette technologie <sup>163</sup>. En effet, le Synapt G2 HDMS est équipé d'un détecteur de type MagnéTOF couplé à deux systèmes de digitalisation, soit TDC, soit ADC. Le choix de l'un ou l'autre des digitaliseurs est primordial notamment pour l'étude de protéine de très hauts poids moléculaires. Les développements réalisés sur le Synapt G2 nous ont conduits à choisir le digitaliseur ADC uniquement pour l'étude de petites molécules chimiques, pour des complexes dont la gamme d'étude est comprise entre 500 et 6 000 m/z et pour les analyses protéomiques. Le choix du système de digitalisation sera illustré dans la dernière partie de ce travail de thèse.

#### 4 Importance de l'étalonnage et choix des étalons

L'une des premières étapes indispensables à l'étude de complexes non-covalents en MS est l'étalonnage des instruments qui doit être réalisé dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'échantillon à analyser. Le choix de l'étalon est d'une grande importance puisqu'il doit couvrir la totalité de la gamme de  $m/z$  étudiée. Lors de l'étude de petites molécules (50 - 500 Da), l'étalonnage doit être réalisé avec une solution d'acide phosphorique. Pour des échantillons dont la gamme de  $m/z$  s'étend de 500 à 2 500  $m/z$ , l'étalon de référence est la myoglobine de cœur de cheval diluée à 2  $\mu\text{M}$  dans une solution eau/acétonitrile/acide 50/50/1 (Figure 13, a). Pour des édifices de plus hauts poids moléculaires dont la gamme de  $m/z$  s'étend de 2 500 à 22 000  $m/z$ , une solution d'Iodure de Césium (CsI) formant des clusters d'ions multichargés de type  $\text{Cs}_{n+1}\text{I}_n$  permet d'étalonner correctement les instruments (Figure 13, b).



**Figure 13 : Gamme de  $m/z$  étalonnée en fonction des étalons choisis.** a) Spectre de masse de la myoglobine de cœur de cheval (diluée à 2  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  dans un mélange eau/acétonitrile/acide formique 50/50/1) :  $V_c = 40 \text{ V}$  et  $P_i = 2,0 \text{ mbar}$ . b) Spectre de masse d'une solution de CsI (diluée à 1  $\text{mg}/\text{ml}$  dans un mélange eau/isopropanol 50/50) :  $V_c = 200 \text{ V}$  et  $P_i = 6,5 \text{ mbar}$ .

D'autre part, lors de l'étalonnage des instruments, il est indispensable de s'assurer que la concentration des étalons utilisés n'induit pas une saturation du détecteur ou du digitaliseur. En effet, en cas de saturation, les masses mesurées sur les échantillons seront erronées. Cette observation a pu être faite sur un instrument de type Micro-TofQ lors de l'analyse de protéines entières.

## Chapitre 3 : Optimisations instrumentales en IM-MS sur les instruments de type Synapt HDMS

L'utilité du couplage IM-MS pour la séparation rapide de composés en phase gazeuse a été clairement démontrée ces dernières années<sup>97</sup>. Cette technique qui permet d'obtenir simultanément une information sur la masse (mesure des rapports  $m/z$ ) et la forme des composés (détermination de CCS) s'est particulièrement développée avec la commercialisation du Synapt G1 HDMS muni d'une cellule de mobilité ionique de type TWIMS<sup>98, 153, 184</sup>. Les développements méthodologiques réalisés ces dernières années ont ainsi permis l'introduction de cette technique dans de nombreux domaines tels que la recherche pharmaceutique<sup>196</sup>, la biologie structurale<sup>101, 197</sup> ou encore lors de l'étude de complexes protéiques en conditions natives<sup>9, 198</sup>. Ces cellules présentent une bonne sensibilité grâce à l'accumulation des ions avant la cellule IMS, mais aussi grâce aux confinements de ces derniers dans la cellule limitant ainsi le phénomène de diffusion radiale. Toutefois, cette première cellule commerciale ne permet pas d'obtenir des résolutions comparables aux cellules classiques de types DTIMS<sup>170</sup>. C'est pourquoi, de nouvelles avancées technologiques ont été réalisées permettant la mise sur le marché d'un instrument de nouvelle génération (Synapt G2 HDMS) offrant de meilleures performances en terme de résolution en MS et IM-MS. Ce chapitre sera consacré à l'optimisation des paramètres instrumentaux nécessaires aux études structurales par IM-MS en phase gazeuse sur les Synapt HDMS G1 et G2.

### 1 Nature et validité des résultats obtenus par IM-MS

#### 1.1 Différence de temps de passage des ions dans la cellule IMS et pouvoir séparateur

##### a. Les différences de temps de passage des ions dans la cellule de mobilité ( $\Delta t_D$ )

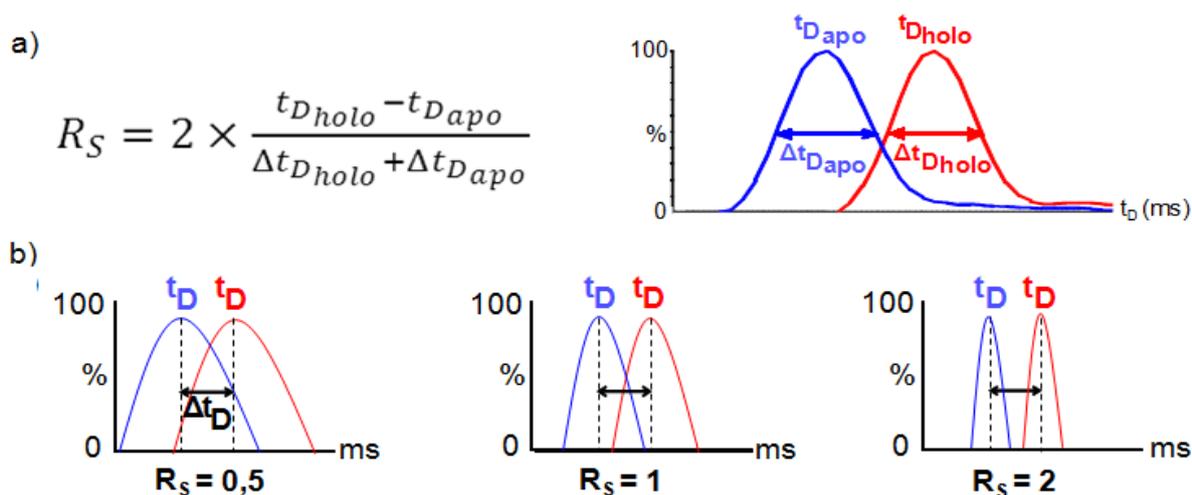
Lors d'une analyse par IM-MS, le paramètre mesuré est le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité ( $t_D$ ). Ce temps de passage permet de rendre compte de la mobilité d'un ion dans la cellule, celle-ci étant fonction de la forme de l'ion pour un état de charge et une masse donnée.

Afin de pouvoir mettre en évidence des changements conformationnels, les temps de passage des ions, de même état de charge, peuvent être comparés. Le paramètre  $\Delta t_D$  permet ainsi de rendre compte de la différence de mobilité entre 2 ions de même état de charge.

Il est important de noter que les temps de passage des ions dans la cellule de mobilité sont le reflet direct de la mobilité des ions analysés.

### b. Le pouvoir séparateur ( $R_s$ )

Lors de l'étude de changements conformationnels, l'analyse des différences de temps de passage des ions dans la cellule de mobilité ne permet pas de rendre compte de la qualité de la séparation obtenue. En effet, une importante différence de  $t_D$  ne correspond pas forcément à une bonne séparation comme le montre la Figure 14.



**Figure 14 : Paramètres permettant d'évaluer la séparation en IM-MS.** a) Définition du pouvoir séparateur  $R_s$  ; b) Relation entre la différence des temps de passage des ions dans la cellule IMS ( $\Delta t_D$ ) et le pouvoir séparateur ( $R_s$ ).

Dans le but de pouvoir qualifier la séparation observée en mobilité ionique, nous avons introduit un nouvel indicateur lors d'analyses IM-MS : le pouvoir séparateur noté  $R_s$ . Ce paramètre présente l'avantage de prendre en compte la différence de  $t_D$ , mais aussi la largeur des pics à mi-hauteur (Figure 14).

En conclusion, définir les conditions instrumentales permettant d'obtenir la meilleure séparation en mobilité ionique consiste à sélectionner la méthode permettant d'obtenir le meilleur  $R_s$  et la meilleure différence de  $t_D$ .

Une présentation détaillée de l'optimisation de la séparation en mobilité ionique sera illustrée au travers d'un exemple (Partie 3, Chapitre 3).

## 1.2 Les données quantifiables en IMS : les sections efficaces rotationnelles (CCS)

### 1.2.1 Détermination de CCS expérimentales à l'aide des données d'IM-MS

#### a. Calcul de section efficace rotationnelle dans une cellule de type DTIMS

La grandeur biophysique permettant une comparaison des données de cristallographie ou de RMN aux données d'IM-MS est la section efficace rotationnelle (CCS, notée  $\Omega$ ). Cette grandeur physique est reliée à la probabilité qu'un ion entre en collision avec les molécules de gaz de la cellule IMS et s'exprime sous forme d'unité de surface ( $\text{nm}^2$  ou  $\text{\AA}^2$ ).

Dans le cas des cellules de mobilité de type DTIMS, la mobilité d'un ion ( $K$ ,  $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ) peut être reliée directement au temps de passage des ions ( $t_D$ ) dans la cellule de mobilité grâce à l'équation 1 où  $L$  (m) et  $E$  ( $V \cdot m^{-1}$ ) correspondent respectivement à la longueur de la cellule de mobilité et au champ électrique auquel sont soumis les ions<sup>177</sup>.

$$(1) K = \frac{L}{E \times t_D}$$

Afin de pouvoir comparer des mesures de mobilité  $K$ , il est nécessaire de corriger les valeurs expérimentales en fonction de la température ( $T$  en Kelvin) et de la pression régnant dans la cellule de mobilité ( $P$  en Torr) afin d'obtenir une mobilité réduite ( $K_0$ ) (équation 2)<sup>177</sup>.

$$(2) K_0 = K \times \frac{P}{P_0} \times \frac{T_0}{T} = \frac{L}{E \times t_D} \times \frac{P}{760} \times \frac{273.15}{T}$$

Où  $P_0$  et  $T_0$  correspondent aux conditions normales de pression et de température.

L'équation de Mason-Schamp permet ensuite de relier la mobilité réduite d'un ion à sa section efficace (équation 3)<sup>86, 97, 199, 200</sup>.

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

Où  $e$  = charge électrique d'un électron (C),  $k_b$  = constante de Boltzmann ( $J \cdot K^{-1}$ ),  $N$  = densité du gaz ( $m^{-3}$ ),  $M$  = masse molaire ( $kg \cdot mol^{-1}$ ).

Par conséquent, l'équation 4 peut être déduite de la combinaison des équations 2 et 3. Elle permet ainsi de déterminer la section efficace d'un ion à partir de sa masse, de sa charge et de son temps de passage dans la cellule de mobilité<sup>198</sup>.

$$(4) \Omega = \frac{\sqrt{18\pi}}{16N} \times \frac{ze}{\sqrt{k_b T}} \times \sqrt{\frac{1}{M_{ion}} + \frac{1}{M_{gaz}}} \times \frac{760}{P} \times \frac{T}{273} \times \frac{t_D E}{L}$$

#### b. Calcul de sections efficaces rotationnelles dans une cellule de type TWIMS

Dans le cas des cellules de type TWIMS, l'équation 4 n'est pas directement applicable à cause de l'absence d'un champ électrique faible et d'une variation de la distance parcourue par les ions dans la cellule IMS en fonction de leur mobilité<sup>170, 171</sup>. Par conséquent, l'évaluation des sections efficaces est réalisée à partir de courbes d'étalonnages. Ces courbes sont obtenues à partir d'ions dont la CCS a préalablement été déterminée dans une cellule DTIMS<sup>177, 198</sup>. Pour cela, les étalons sont analysés dans des conditions expérimentales strictement identiques à celles utilisées pour l'échantillon d'intérêt. Il est ensuite nécessaire de déterminer la relation entre les sections efficaces théoriques des ions étalons et leurs temps de passage dans la cellule de mobilité.

### - Détermination du temps de passage corrigé des ions dans la cellule IMS ( $t_D'$ )

L'une des premières étapes est donc de déterminer le temps de passage réel des ions dans la cellule de mobilité. En effet, dans le cas des cellules TWIMS, l'absence de détecteur à la sortie de la cellule de mobilité nécessite la détermination d'un temps de passage corrigé des ions dans la cellule IMS noté  $t_D'$ . Il correspond au temps de passage des ions  $t_D$  retranché du temps mis par les ions pour aller de la sortie de la cellule IMS jusqu'au détecteur<sup>198</sup>. Étant donné que le temps mis par les ions pour traverser le guide d'ions Transfer et que le temps de vol des ions dans l'analyseur sont négligeables, le temps de passage corrigé  $t_D'$  correspond à  $t_D$  retranché du temps mis par les ions pour aller de la sortie du guide d'ion Transfer jusqu'au pusher (équation 5).

$$(5) t_D' = t_D - c \frac{\sqrt{m/z}}{1000}$$

La constante « c » est une constante instrumentale appelée « *EDC (Enhanced Duty Cycle) delay coefficient* » qui varie en fonction de la gamme de masse étudiée. Sur le Synapt HDMS G2, cette valeur est de 1.41 pour une gamme de masse allant jusqu'à 5 000 m/z et de 1.57 au-delà de 5 000 m/z.

### - Détermination de la relation entre la section efficace corrigée ( $\Omega'$ ) et $t_D'$

Étant donné que la mobilité d'un ion dépend de sa masse et de sa charge, il convient de déterminer une section efficace corrigée par rapport à sa masse et à sa charge ( $\Omega'$ ) (équation 6). De plus, Ruotolo *et al.*, ont pu montrer que la section efficace d'un ion était proportionnelle à  $t_D^X$  où X est un paramètre empirique qui dépend des conditions instrumentales appliquées dans la cellule de mobilité. Nous pouvons donc en déduire la seconde partie de cette équation où A est un facteur correctif de la température et X un facteur correctif de la non-linéarité de la cellule IMS<sup>171</sup>.

$$(6) \Omega' = \frac{\Omega}{z \times \sqrt{\frac{1}{M_{ion}} + \frac{1}{M_{gaz}}}} = A \times t_D'^X$$

D'où :

$$(7) \ln(\Omega') = \ln(A) + X \ln(t_D')$$

Par conséquent, le tracé de la droite  $\ln(\Omega') = f(\ln(t_D'))$  nous permet de déterminer les paramètres A et X. Il est important de noter que le coefficient de corrélation  $R^2$  de cette droite d'étalonnage doit être supérieur à 0.98 pour que celle-ci soit validée.

### - Détermination de la relation entre $t_D'$ et la section efficace $\Omega$

La droite d'étalonnage est finalement obtenue à partir de l'équation 6 (équation 8):

$$(8) \Omega = A \times \left[ t_D'^X \times z \times \sqrt{\frac{1}{M_{ion}} + \frac{1}{M_{gaz}}} \right] = A \times t_D''$$

Le tracé de la droite  $\ln(\Omega) = f(\ln(t_D))$  dont le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0.98 nous permet de valider l'étalonnage en reliant la section efficace au temps de passage des ions dans la cellule IMS. Finalement, connaissant la masse, la charge et le temps de passage d'un ion dans la cellule de mobilité, il est possible d'évaluer sa section efficace (équation 9).

$$(9) \Omega_{ion} = A \times \left[ t_D - c \frac{\sqrt{(m/z)_{ion}}}{1000} \right]^X \times Z \times \sqrt{\frac{1}{M_{ion}} + \frac{1}{M_{gaz}}}$$

### c. Importance de l'étalonnage et choix des étalons

L'étalonnage est une étape importante dans l'évaluation de la CCS d'un ion. Afin d'obtenir des résultats fiables, il convient donc de réaliser l'analyse des étalons dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les analytes d'intérêt et de s'assurer que la droite d'étalonnage possède un coefficient de corrélation supérieur à 0.98.

Lors du développement de la mobilité ionique de type TWIMS, peu d'étalons dont la CCS avait été déterminé par DTIMS étaient connus<sup>198</sup>. Au début de ce travail de thèse, trois étalons étaient utilisés en conditions dénaturantes : l'ubiquitine bovine, la myoglobine et le cytochrome C de cœur de cheval.

Toutefois, lors de l'analyse de protéines et de complexes en conditions natives, l'utilisation de ces étalons nous a posé plusieurs problèmes : d'une part, les mobilités de ces ions dénaturants étaient nettement inférieures aux mobilités des ions d'intérêt, d'autre part, certaines conditions expérimentales optimisées pour l'analyte d'intérêt ne permettaient pas la transmission correcte des ions étalons. De plus, les étalons dénaturants ayant de faibles rapports  $m/z$  n'auront pas la même température effective que les protéines natives ayant de hauts rapports  $m/z$ <sup>201</sup>. Par conséquent, les étalons disponibles dans la littérature ne permettaient pas de déterminer des CCS justes.

Afin d'améliorer la détermination des CCS théoriques, Bush *et al.*, ont cherché de nouveaux étalons couvrants une large gamme de  $m/z$  et dont la CCS a été déterminée en conditions dénaturantes et natives<sup>177</sup>.

Afin de pouvoir montrer l'importance d'étalonner la mobilité ionique dans des conditions natives, nous avons déterminé la CCS d'une protéine d'intérêt : la protéine PDF1B soit à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'étalons dénaturants, soit à partir d'étalons natifs (Tableau 1). Les deux courbes d'étalonnage présentent un coefficient de corrélation supérieur à 0.99 cependant, la CCS calculée à partir d'étalons dénaturants (27.73 nm<sup>2</sup>) n'est pas en accord avec la CCS théorique (19.53 nm<sup>2</sup>) contrairement à la CCS calculée à partir d'ions natifs (19.84 nm<sup>2</sup>). De plus, nous pouvons remarquer que les CCS déterminées en conditions natives mettent bien en évidence une augmentation de la CCS lorsque l'état de charge considéré augmente ce qui n'est pas le cas en utilisant les étalons dénaturants.

**Tableau 1 : Comparaison d'un étalonnage en conditions dénaturantes et en conditions natives.** La protéine PDF1B a été analysée en conditions natives (O7919SP). Deux courbes d'étalonnage ont ensuite été réalisées à partir d'étalons en conditions dénaturantes (O8527SP) ou en conditions natives (O8519SP). Dans les deux cas, le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage était supérieur à 0.99 ( $R^2$  dénaturant = 0.9943 ;  $R^2$  natif : 0.9972). La CCS théorique a été calculée à partir du logiciel Mobcal et de la méthode de projection EHSS.

<b>E T A L O N S</b>	Cytochrome C Ubiquitine Myoglobine	<b>Etalonnage en conditions dénaturantes</b>			<b>CCS théorique  19.53 nm<sup>2</sup></b>
		CCS 8+	CCS 9+	CCS moyenne	
		27.8 nm <sup>2</sup>	27.66 nm <sup>2</sup>	<b>27.73 nm<sup>2</sup></b>	
	Cytochrome C β- lactoglobuline	<b>Etalonnage en conditions natives</b>			
		CCS 8+	CCS 9+	CCS moyenne	
		19.66 nm <sup>2</sup>	20.02 nm <sup>2</sup>	<b>19.84 nm<sup>2</sup></b>	

Par conséquent, il est important d'étalonner la mobilité ionique à partir d'ions natifs lorsque la protéine d'intérêt est analysée dans des conditions natives.

Parmi l'ensemble des étalons dont la CCS théorique a été déterminée par DTIMS, tous ne peuvent pas être utilisés simultanément lors de l'étalonnage<sup>177, 185</sup>. C'est pourquoi il est important de choisir des étalons adaptés à la protéine étudiée. Par exemple, lors de l'étude de la protéine PDF1B, nous avons choisi parmi les étalons ceux qui avaient des CCS et des rapports m/z proches de ceux de notre protéine d'intérêt. Ainsi, nous avons pu obtenir une courbe d'étalonnage dont les bornes encadraient bien les temps de passage de notre analyte d'intérêt dans la cellule IMS.

Bien que nous disposions d'un nombre plus important d'étalons dont les CCS sont connues, il est nécessaire que de nouveaux étalons pour l'IM-MS soient disponibles notamment pour permettre une meilleure évaluation des CCS des protéines de hauts poids moléculaires. En effet, actuellement, seul un étalon : l'ADH peut être utilisée pour déterminer la CCS d'anticorps en conditions natives.

Afin de déterminer des CCS encore plus justes, nous avons proposé une nouvelle méthode d'étalonnage de la mobilité ionique qui sera développée dans la partie 3, chapitre 3 de ce manuscrit.

#### d. Détermination de CCS grâce à l'utilisation du logiciel Driftscope 2.2

Afin de faciliter la détermination des sections efficaces, la société Waters a développé un nouvel outil permettant de déterminer des CCS à partir des *driftscopes* obtenus (Driftscope 2.2, Waters).

Pour cela, les étalons choisis doivent être analysés simultanément dans les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon d'intérêt. Une courbe d'étalonnage ( $\Omega'$ ) =  $f(t_D')$  (équation 6) est ensuite réalisée par comparaison des couples expérimentaux (m/z,  $t_D$ ) et théoriques (m/z,  $\Omega$ ). De même que lors de l'étalonnage manuel, le coefficient directeur de la droite d'étalonnage doit être supérieur à 0.98 pour être validé. Cette droite d'étalonnage permet de déterminer les paramètres A et X nécessaires à la détermination de la CCS de l'échantillon d'intérêt.

Les paramètres d'étalonnage sont ensuite appliqués au *Driftscope* de l'échantillon d'intérêt, permettant d'obtenir directement la CCS expérimentale de l'échantillon analysé.

Afin de s'assurer de la robustesse de ce nouvel outil, les CCS déterminées manuellement ou à l'aide du Driftscope 2.2 (Tableau 2) ont été comparées.

Tableau 2 : Comparaison d'un étalonnage manuel à un étalonnage automatique à l'aide du logiciel Driftscope 2.2 (Waters)

Etalonnage manuel			
R <sup>2</sup>	A	X	CCS moyenne
0.998	8.045	0.165	<b>16.35 nm<sup>2</sup></b>
Etalonnage automatique			
R <sup>2</sup>	A	X	CCS moyenne
0.995	8.130	0.160	<b>16.35 nm<sup>2</sup></b>

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que les valeurs de CCS obtenues à l'aide du logiciel permettent d'obtenir des CCS identiques aux CCS déterminées manuellement.

Ce nouvel outil permet donc de calculer rapidement des CCS lors d'analyses par IM-MS.

### 1.2.2 Détermination des CCS théoriques

Les CCS expérimentales déterminées par IM-MS sont dépendantes de la forme des protéines ou complexes protéiques analysés. Cependant, les CCS sont le résultat de processus de collisions entre des ions et des molécules. Par conséquent, ces dernières doivent être prises en compte dans le calcul de CCS théoriques. Il a pu être démontré par Mason *et al.*, que la CCS théorique pouvait être définie à partir de la distance séparant les centres de masse de l'ion et du gaz (paramètre d'impact  $b$ ) grâce à une intégrale de collision, reliée aux angles de dispersion des ions dans le gaz ( $\chi$  = angle entre la trajectoire de l'ion avant et après collision avec le gaz)<sup>86</sup> (équation 10).

$$(10) \Omega = \frac{1}{4\pi^2} \int_0^{2\pi} d\theta \int_0^\pi d\varphi \sin\varphi \int_0^{2\pi} d\gamma \int_0^\infty db 2b(1 - \cos\chi(\theta, \varphi, \gamma, b))$$

Où :  $\theta$ ,  $\rho$  et  $\gamma$  sont les géométries de collisions et  $\chi$  ( $\theta$ ,  $\rho$  et  $\gamma$ ,  $b$ ) est l'angle de dispersion de la molécule après impact,  $b$  est la distance séparant les centres de masse de l'ion et du gaz<sup>202</sup>.

Toutefois, le calcul de ces intégrales est difficile notamment dans le cas de systèmes non sphériques. L'équipe de MF Jarrold a donc développé un programme appelé Mobcal<sup>202, 203</sup> qui consiste à déterminer l'ensemble des valeurs d'angles de dispersion  $\chi$  pour un paramètre d'impact  $b$  et des valeurs d'angles  $\theta$ ,  $\rho$  et  $\gamma$  aléatoires, de manière à obtenir une valeur théorique de la CCS.

Ce programme permet de calculer des CCS théoriques selon 3 méthodes : la méthode des projections (PA)<sup>91, 204-206</sup>, la méthode des sphères dures exactes (EHSS)<sup>202</sup> et la méthode des trajectoires (TM)<sup>203</sup>.

La méthode PA (*Projection Approximation*) a été développée par l'équipe de Bowers *et al.* Cette méthode permet d'obtenir une approximation de l'intégrale de collision, par le calcul de l'aire moyenne de la molécule projetée sur un plan dans différentes orientations. Cette méthode permet de déterminer rapidement des CCS, mais sous-estime leurs valeurs notamment pour de gros complexes, car les collisions avec les molécules de gaz ne sont pas prises en compte.

La méthode EHSS (*Exact Hard Sphere Scattering*) consiste à prendre en compte une partie des collisions se produisant entre les molécules de gaz et les ions dans la limite du modèle des sphères dures. Cette méthode permet de calculer en quelques heures la CCS théorique d'un ion. Toutefois, elle ne peut être utilisée pour déterminer la CCS théorique de petits systèmes, car les collisions avec les molécules de gaz sont supérieures à la géométrie de l'ion.

La méthode TM (*Trajectory Method*) est la méthode la plus fiable, car elle prend en compte l'ensemble des interactions entre les ions et les molécules de gaz, notamment les interactions Lennard-Jones et ion/dipôle induit. Cependant, cette méthode n'est pas recommandée pour des molécules de plus de 1000 atomes, car le calcul nécessite d'importantes ressources informatiques.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les CCS théoriques ont été déterminées à partir de fichiers issus d'une banque de données protéiques (*Protein Data Bank* : PDB) et à l'aide du programme Mobcal modifié selon les propositions de Ruotolo *et al.*<sup>198</sup>.

La méthode TM a été utilisée pour les systèmes biologiques dont la masse moyenne était inférieure à 30 kDa. La méthode EHSS, permettant d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus avec la méthode TM en moins de temps, a été utilisée pour déterminer rapidement des CCS théoriques notamment dans le cas de protéines de hauts poids moléculaires.

### 1.2.3 Répétabilité des résultats

---

#### a. L'analyse des temps de passage des ions dans la cellule IMS

Bien que des paramètres identiques soient utilisés, nous avons pu mettre en évidence une variation des valeurs absolues de  $t_D$  en fonction du temps. Par exemple, lors de l'étude de changements conformationnels induits par la fixation d'un ligand, nous avons observé des variations de  $t_D$  de 0.2 ms. Or, la différence de mobilité que nous observions entre la protéine seule et la protéine liant le ligand était du même ordre de grandeur. Par conséquent, il nous a paru important de mettre en place des contrôles permettant de valider nos résultats expérimentaux.

Ainsi, nous avons réalisé plusieurs expériences indépendantes à des temps différents et sur des répliquats différents (Partie 3, Chapitre 3). Nos résultats nous ont permis de montrer qu'au-delà de 6 répétitions, nous étions capables de mettre en évidence des différences significatives de  $t_D$  dans la cellule de mobilité.

Il est donc important de s'assurer pour chaque système étudié que le nombre de répétitions en IM-MS est suffisant pour garantir la validité des résultats obtenus.

#### b. La détermination des CCS expérimentales

Lors de la détermination de CCS expérimentales, il est impératif que les étalons soient analysés le même jour et dans les mêmes conditions que l'analyte étudié. Ces précautions permettent ensuite

de déterminer des CCS les plus justes possible. Grâce à cet étalonnage, les variations de  $t_D$  au cours du temps sont négligeables. Toutefois, il est recommandé de réaliser au moins 3 déterminations de CCS pour pouvoir valider les résultats obtenus.

En présence de données de biologie structurale concernant l'analyte étudié, il est aussi possible de comparer les CCS obtenues expérimentalement aux CCS théoriques déduites des données de cristallographie ou de RMN.

## 2 L'optimisation des paramètres de mobilité ionique, une étape clé

---

L'optimisation des paramètres de mobilité ionique est une étape clé pour réaliser des analyses IM-MS fiables et de bonne qualité. Au début de ce travail de thèse, un schéma d'optimisation des paramètres de mobilité ionique sur le Synapt HDMS G1 avait été proposé par un précédent étudiant en thèse : le Dr. Cédric Atmanene. Toutefois, ce schéma n'est pas adapté pour le Synapt HDMS G2 car ce dernier présente un plus grand nombre de paramètres de mobilité ionique. Les différentes étapes liées à l'optimisation de ces paramètres ainsi que leur importance seront présentées de manière détaillée au cours de ce paragraphe.

### 2.1 Compromis entre énergie transmise aux ions et transmission des ions

---

Les analyses par IM-MS consistent à séparer les ions en fonction de leur mobilité dans un gaz sous l'effet d'un champ électrique. Les différentes cellules de mobilité existantes diffèrent par la force des champs électriques ( $E$ ) appliqués ainsi que par la densité du gaz ( $N$ ) utilisé. Dans les cellules de mobilité classique de type DTIMS, un champ constant est appliqué avec un faible rapport  $E/N$ . Dans ce cas, les ions se déplacent dans la cellule de mobilité en fonction de leur mobilité  $K$ .

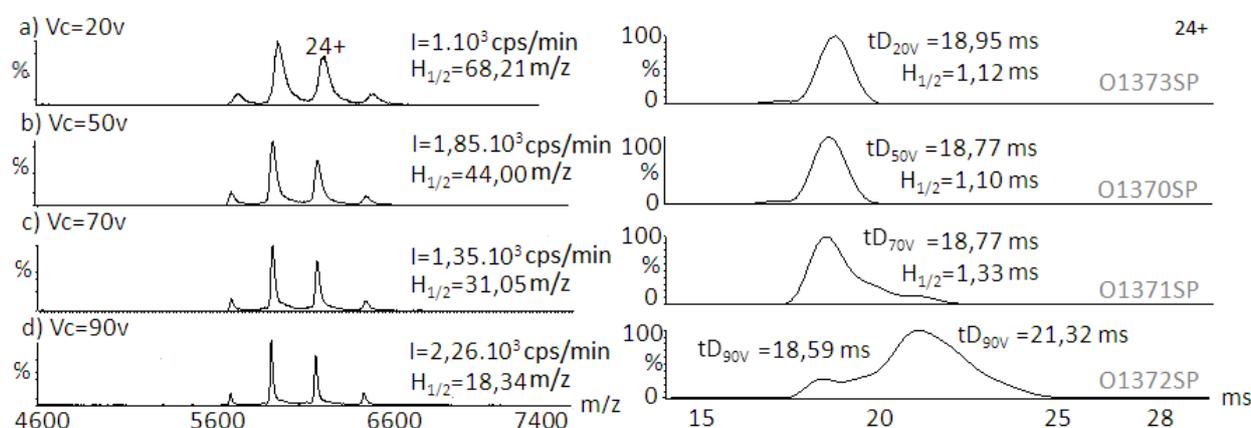
Au contraire, les instruments commercialement disponibles utilisent des méthodes à champ fort (rapports  $E/N$  élevés). Dans ce cas, les ions ne sont plus à la température du bain de gaz, mais à une température dite « effective » qui prend en compte la contribution du champ électrique. Le fait que cette température effective soit supérieure à la température du gaz lorsque le rapport  $E/N$  augmente peut avoir un effet délétère sur la conformation des protéines en phase gazeuse. De plus, les équations utilisées dans les cellules DTIMS pour le calcul des CCS ne sont plus applicables. C'est pourquoi le calcul de CCS dans les cellules TWIMS ne peut se faire que par l'établissement d'une courbe d'étalonnage réalisée à partir de composés dont les CCS théoriques sont connues. Il est important de rappeler que la masse et les états de charge des étalons choisis doivent être comparables à ceux de l'analyte. En effet, des étalons dénaturants ayant de faibles rapports  $m/z$  n'auront pas la même température effective que des protéines natives ayant de hauts rapports  $m/z$ <sup>201</sup>.

Afin de préserver la conformation native des protéines en phase gazeuse lors d'analyses IM-MS, il est donc important de contrôler l'énergie cinétique communiquée aux ions en phase gazeuse en utilisant des conditions expérimentales douces<sup>99, 198, 207-211</sup>.

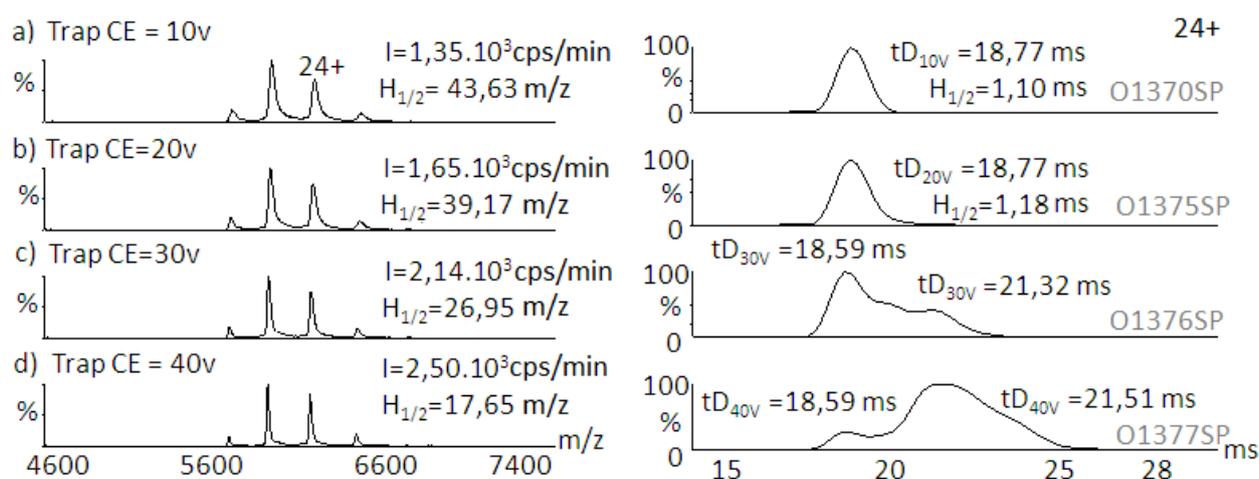
Dans un premier temps, nous avons donc évalué l'effet des paramètres de transmission (Vc, Bias, Trap et Transfer CE) sur la qualité des spectres MS et IM-MS de l'alcool deshydrogénase (ADH).

### - Effet du Vc et du paramètre Trap CE sur la mobilité ionique

L'augmentation des tensions d'accélération Vc (Figure 15) et Trap CE (Figure 16) se traduit sur les spectres MS par une diminution des largeurs des pics à mi-hauteur, résultant d'une meilleure désolvatation des ions ainsi qu'une meilleure transmission des ions comme le montre les courants d'ions enregistrés sur 19 scans de 4 secondes.



**Figure 15 : Effet de la tension d'accélération Vc sur les spectres MS et IM-MS.** Analyse de l'ADH (1  $\mu$ M en tétramère) dessalée 2 fois par filtration sur gel (Zeba, tampon AcNH<sub>4</sub> 150 mM pH 6.8). Panel de gauche : spectres de masse accumulés, sur 19 scans de 4 secondes. L'intensité est indiquée en coups/min. Panel de droite : mobilogrammes extraits de l'état de charge 24+. a-d) Effet de la tension d'accélération Vc (Trap CE = 10V, Transfer CE = 0V, Bias = 50V, Pi = 6 mbar, Q<sub>He</sub>/Q<sub>N2</sub> = 180/90).

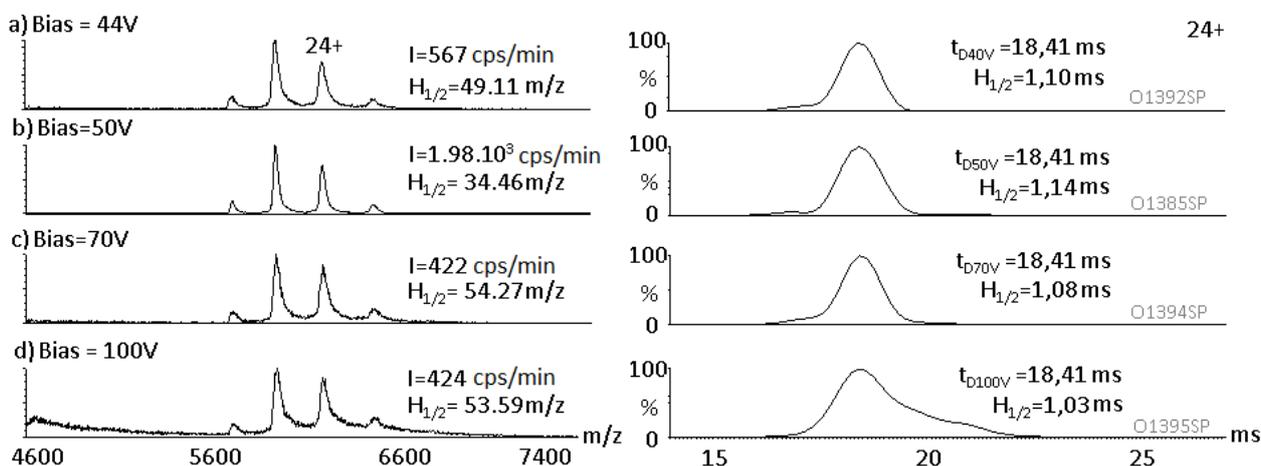


**Figure 16 : Effet de la tension d'accélération Trap CE sur les spectres MS et IM-MS.** Analyse de l'ADH (1  $\mu$ M en tétramère) dessalée 2 fois par filtration sur gel (Zeba, tampon AcNH<sub>4</sub> 150 mM pH 6.8). Panel de gauche : spectres de masse accumulés sur 19 scans de 4 secondes, l'intensité est indiquée en coups/min. Panel de droite : mobilogrammes extraits de l'état de charge 24+. a-d) Effet de la tension d'accélération Trap CE (Vc = 50V, Transfer CE = 0V, Bias = 50V, Pi = 6 mbar, Q<sub>He</sub>/Q<sub>N2</sub> = 180/90, WH = 38V, WV = 750 m.s<sup>-1</sup>).

Toutefois, à partir de  $V_c = 70$  V et Trap CE = 30V, l'amélioration de la désolvatation sur les spectres MS s'accompagne en mobilité ionique d'un élargissement des pics voire d'un dédoublement des pics. De plus, le temps de passage de la plupart des ions augmente ( $V_c$  :  $t_{D50V} = 18.77$  ms ;  $t_{D90V} = 21.32$  ms ; Trap CE :  $t_{D10V} = 18.77$  ms ;  $t_{D30V} = 21.32$  ms) suggérant un dépliement de la protéine. Cette observation permet de mettre en évidence qu'une augmentation de l'énergie transmise aux ions en phase gazeuse conduit à une modification de la conformation native des protéines. Par conséquent, ces deux paramètres doivent être optimisés de manière à éviter toute activation des ions en phase gazeuse.

#### - Effet du Trap Bias sur la mobilité ionique

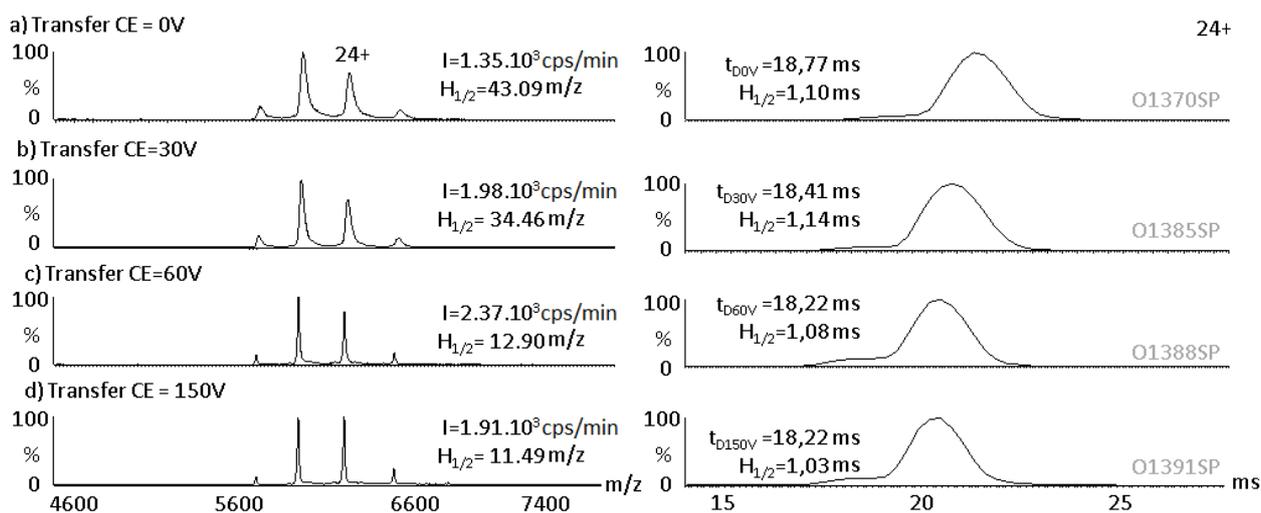
L'un des autres paramètres ayant un rôle dans la transmission des ions est le paramètre Trap Bias (Figure 17). L'énergie transmise aux ions à l'entrée de la cellule de mobilité doit être suffisamment importante pour permettre une transmission correcte des ions au sein de la cellule de mobilité sans pour autant être trop énergétique. Dans le cas de l'ADH, nous avons pu mettre en évidence un optimum de transmission des ions pour une valeur de 50 V, se traduisant sur les spectres MS par une augmentation de la transmission et une meilleure désolvatation. Notons que pour des valeurs de Trap Bias inférieures à 44 V, l'énergie transmise aux ions n'est plus suffisante pour permettre la transmission des ions au sein de la cellule IMS. De même que pour les autres tensions d'accélération s'appliquant avant la cellule de mobilité ionique, l'augmentation du paramètre Trap Bias conduit à une altération de la mobilité se traduisant par des pics de mobilité plus larges.



**Figure 17 : Effet de la tension d'accélération Trap Bias sur les spectres MS et IM-MS.** Analyse de l'ADH (1  $\mu$ M en tétramère) dessalée 2 fois par filtration sur gel (Zeba, tampon  $\text{AcNH}_4$  150 mM pH 6.8). Panel de gauche : spectres de masse accumulés sur 19 scans de 4 secondes. Panel de droite : mobiligrammes extraits de l'état de charge 24+. ( $V_c = 50$  V, Trap CE = 10V, Transfer CE = 30V,  $P_i = 6$  mbar,  $Q_{He}/Q_{N_2} = 180/90$ , WH = 38V, WV = 750  $\text{m.s}^{-1}$ ).

#### - Effet du transfert CE sur la mobilité ionique

De même que l'augmentation des paramètres  $V_c$  et Trap CE, l'augmentation du paramètre Transfer CE conduit à une meilleure désolvatation des pics de masse ce qui se traduit par une diminution des largeurs des pics à mi-hauteur en MS et en mobilité ionique (Figure 18).



**Figure 18 : Effet de la tension d'accélération Transfer CE sur les spectres MS et IM-MS.** Analyse de l'ADH (1  $\mu$ M en tétramère) dessalée 2 fois par filtration sur gel (Zeba, tampon AcNH<sub>4</sub> 150 mM pH 6.8). Panel de gauche : spectres de masse accumulés sur 19 scans de 4 secondes. Panel de droite : mobilogrammes extraits de l'état de charge 24+. (V<sub>c</sub> = 50 V, Trap CE = 10V, Bias = 50V, Pi = 6 mbar, Q<sub>He</sub>/Q<sub>N2</sub> = 180/90, WH = 38V, WV = 750 m.s<sup>-1</sup>).

Toutefois, nous n'observons pas de dédoublement des pics de mobilité. Ceci est dû au fait que cette tension s'applique après la cellule IMS. Par conséquent, il n'est pas possible de mettre en évidence l'effet de ce paramètre sur la conformation native des protéines en phase gazeuse. Cependant, nous pouvons remarquer que l'augmentation de cette tension conduit à une diminution du temps de passage des ions dans la cellule IMS ( $t_{D0V} = 18.77$  ms ;  $t_{D150V} = 18.22$  ms). Ce paramètre doit donc être optimisé finement de manière à éviter l'activation des ions en phase gazeuse tout en conservant une bonne transmission des ions. Il est important de noter que l'étalonnage de la mobilité ionique doit être réalisé dans les mêmes conditions que celles de l'analyse notamment en ce qui concerne le paramètre Transfer CE qui peut avoir une influence sur le temps de passage des ions après la séparation en mobilité ionique.

### - Conclusion

L'ensemble des paramètres V<sub>c</sub>, Bias, Trap CE et Transfer CE doit être optimisé de manière rigoureuse afin de transmettre au mieux les ions en utilisant des conditions expérimentales les plus douces possible.

En parallèle, Morsa *et al.*<sup>201</sup> ont pu montrer grâce à l'utilisation d'un ion thermomètre (le paraméthoxybenzylpyridinium) qu'une augmentation de ces différentes tensions entraîne une augmentation de la température effective des ions en amont de la cellule IMS, conduisant à une fragmentation des ions avant la cellule IMS pour les paramètres V<sub>c</sub>, Bias et Transfer CE et après la cellule IMS pour le paramètre Transfer CE.

**N.B :** L'effet de ces paramètres est généralisable à l'ensemble des systèmes protéiques étudiés. Cependant, certains effets peuvent être plus ou moins accentués en fonction des systèmes. Une optimisation fine de chacun de ces paramètres doit donc être réalisée pour chaque système étudié.

## 2.2 Compromis entre séparation IM-MS et temps de passage des ions dans la cellule IMS

Après avoir optimisé les paramètres de transmission des ions en prenant en compte l'énergie cinétique transmise aux ions, il est important d'optimiser les paramètres de séparation au sein de la cellule IMS: hauteur et vitesse des vagues de potentiels et pression dans la cellule IMS.

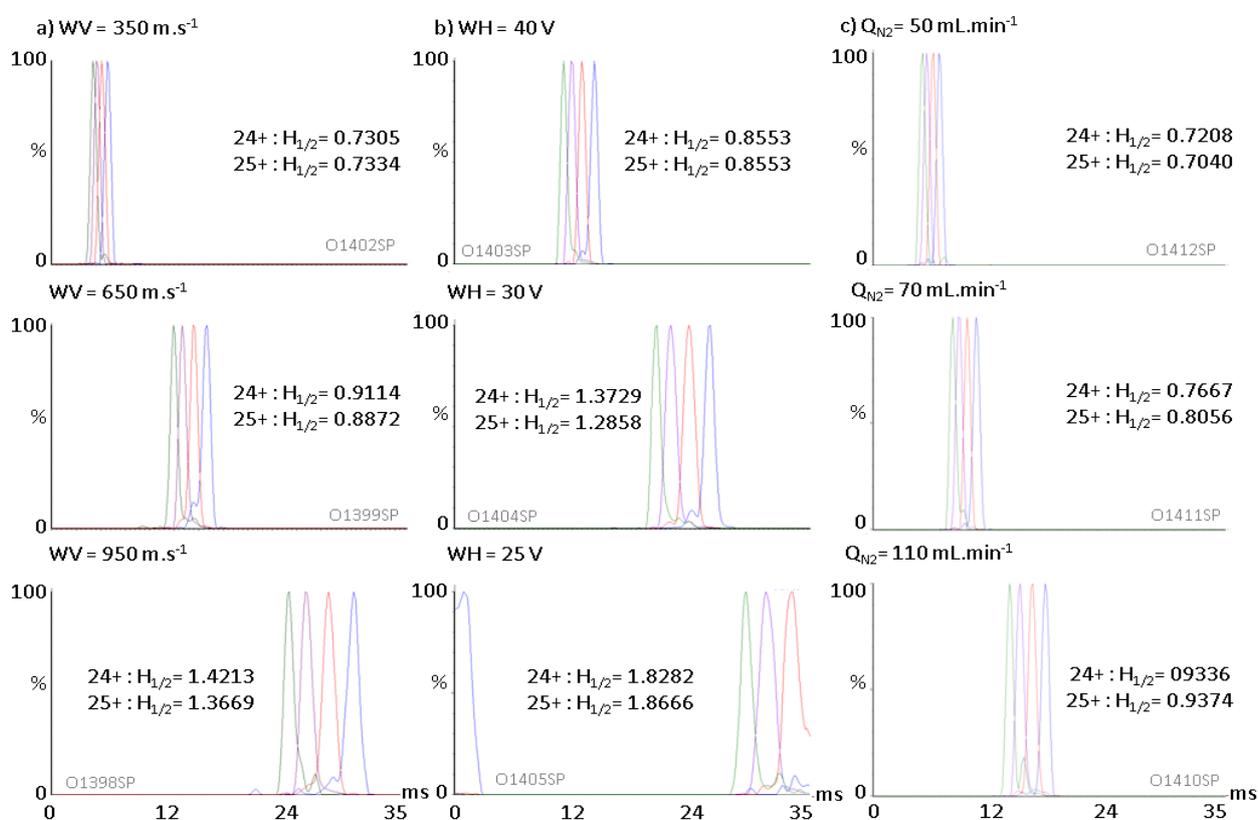
### - Vitesse (WV) et hauteur (WH) de vagues.

Une augmentation de la vitesse des vagues (WV) conduit à une augmentation du nombre de vagues par cycle IMS, augmentant ainsi le nombre de mouvements de retour en arrière qu'un ion peut effectuer par cycle IMS. Par conséquent, une augmentation de la WV conduit à une augmentation du temps de passage des ions dans la cellule de mobilité (Figure 19, a).

De même, une diminution de l'amplitude des vagues de potentiel (WH) conduit à une augmentation du nombre de retour en arrière possible par cycle IMS ayant pour conséquence une augmentation du temps de passage des ions dans la cellule IMS (Figure 19, b).

### -Pression dans la cellule IMS ( $P_{IMS}$ ) et notion de débits de gaz

Lorsque la pression augmente, la fréquence des collisions entre les molécules de gaz et les ions augmente, ralentissant la progression des ions au sein de la cellule IMS et conduisant à une augmentation du temps de passage des ions dans la cellule de mobilité (Figure 19, c).



**Figure 19 : Effet des paramètres WV, WH et  $P_{IMS}$  sur les mobilitégrams extraits des ions 23, 24, 25 et 26 de l'ADH.** a) : Effet de la vitesse de vague WV (WH = 38V,  $Q_{He}/Q_{N_2}$  = 180/90), b) Effet de la hauteur de vague WH (WV = 650 m.s<sup>-1</sup>,  $Q_{He}/Q_{N_2}$  = 180/90) et c) Effet du débit d'azote sur la séparation des états de charge de l'ADH. (Vc= 50 V, Trap CE=10V, Transfer CE=30V, Bias = 45V, Pi = 6 mbar, WV = 650 m.s<sup>-1</sup>, WH = 40V). Toutes les largeurs à mi-hauteur ( $H_{1/2}$ ) sont exprimées en millisecondes.

**NB :** Sur le Synapt G1, la pression lue dans la cellule IMS est proportionnelle au débit de gaz d'azote appliqué. Dans le cas du Synapt G2, une chambre alimentée en hélium a été ajoutée en amont de la cellule IMS conduisant dans certaines conditions à une diffusion de l'hélium vers l'azote. La jauge pirani étant étalonnée uniquement pour un gaz pur (ici, l'azote), la pression lue dans la cellule IMS ne correspond pas à la pression qui règne au sein de la cellule. Par conséquent, dans le cas du Synapt G2, nous ne discuterons pas de l'effet de la pression dans la cellule IMS, mais des rapports de débits de gaz d'hélium et d'azote ( $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$ ).

### **Pourquoi les ions doivent-ils se trouver dans le second tiers du mobilogramme ?**

Les paramètres WV, WH et  $P_{\text{IMS}}$  doivent être optimisés simultanément de manière à permettre une séparation optimale des ions tout en s'assurant que le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité est compris dans le second tiers de la cellule IMS (Figure 19).

Dans un premier temps, il faut s'assurer que les ions ne sortent pas sans être séparés par mobilité ionique. En effet, pour une pression donnée et des valeurs de WH élevées et de WV faibles, les ions sortiront dans le premier tiers de la mobilité ionique sans être séparés.

Dans un deuxième temps, les ions ne doivent pas traverser la cellule trop lentement pour éviter les phénomènes d'activation ou de diffusion des ions. En effet, pour des valeurs de WH faibles et de WV élevées, les ions sortiront dans le dernier tiers de la cellule de mobilité avec des pics larges.

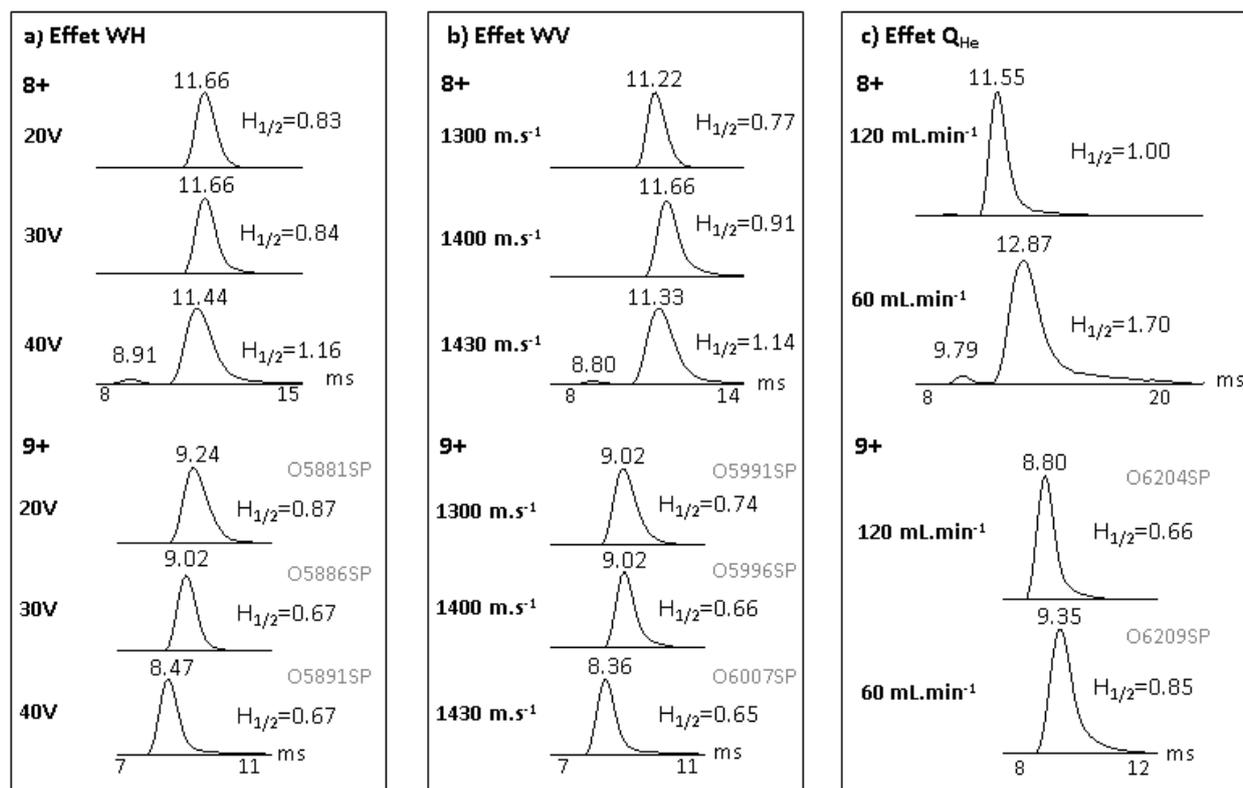
Par conséquent, les différents paramètres de mobilité ionique doivent être optimisés de sorte que le temps de passage des ions dans la cellule soit compris dans le deuxième tiers du mobilogramme. Ainsi, les ions seront séparés sans subir d'activation ou de diffusion.

## **2.3 Compromis entre séparation par IM-MS et énergie transmise aux ions**

Afin de pouvoir étudier l'effet des paramètres de la cellule IMS (WV, WH,  $Q_{\text{He}}$  et  $Q_{\text{N}_2}$ ) sur l'activation des ions en phase gazeuse, les différents paramètres de transmission ont été optimisés de manière à éviter l'activation des ions dans les autres parties de l'instrument. De plus, les temps de sortie des ions ont été optimisés de manière à se trouver dans le deuxième tiers de la cellule de mobilité.

### **a. Effet des hauteurs de vagues (WH)**

Lorsque la hauteur des vagues augmente pour un ratio de pression donnée, nous observons une activation des ions qui se traduit sur les mobilogrammes par un élargissement des pics de mobilité à mi-hauteur et l'apparition d'un pic de mobilité supplémentaire (Figure 20, a, état de charge 8+). Ainsi pour une valeur de WH de 40 V, un pic de mobilité apparaît en amont du pic principal de l'ion 8+. Le temps de passage des ions activés dans la cellule de mobilité étant plus court que ceux non activés, nous pouvons en conclure que l'augmentation de la hauteur des vagues a entraîné une compaction des ions en phase gazeuse. Cette observation est en accord avec les observations de Michaelevski *et al.*<sup>169</sup>.



**Figure 20 : Effet des paramètres WH, WV et  $Q_{He}$  sur l'activation des états de charge 8 et 9+ dans la cellule de mobilité ionique.** a) Effet de la hauteur des vagues ( $Q_{He}/Q_{N_2}=100/25$ , WH = 20, 30 et 40 V avec des vitesses de vagues respectives de 895, 1200 et 1430  $m.s^{-1}$ ), b) Effet de la vitesse des vagues. ( $Q_{He}=100$ , WH = 40 V), c) Effet du débit d'hélium (WH = 40V,  $Q_{N_2} = 30 mL.min^{-1}$  et  $WV_{120} = 1450 m.s^{-1}$  et  $WV_{60} = 1400 m.s^{-1}$ ). Toutes les largeurs à mi-hauteur ( $H_{1/2}$ ) sont exprimées en millisecondes.

De plus, nous avons pu mettre en évidence que l'effet des hauteurs de vagues est différent en fonction des états de charge. En effet, l'apparition d'un pic est observée pour l'état charge 8+ alors qu'aucune activation n'est observée pour l'état de charge 9+ (Figure 20, a). D'autre part, nous observons un élargissement des pics de mobilité de l'état de charge 8+ activé contrairement à ceux de l'état de charge 9+.

Il est donc important d'optimiser ce paramètre de manière à pouvoir éviter l'activation de l'ensemble des états de charge majoritaires.

### b. Effet des vitesses de vagues (WV)

De même, pour des vitesses de vagues croissantes et des hauteurs de vagues fixes, nous avons pu observer un élargissement des pics de mobilité de l'ion 8+ ainsi que l'apparition d'un pic de mobilité à 8.8 ms. Comme précédemment, la conformation native de l'ion 8+ est altérée pour des vitesses de vagues plus énergétiques (Figure 20, b).

### c. Effet du débit d'hélium ( $Q_{He}$ )

Lorsque le débit d'hélium diminue de 120 à 60  $mL.min^{-1}$  et que le débit en azote reste constant (30  $mL.min^{-1}$ ), une augmentation de la largeur des pics de mobilité à mi-hauteur est observée pour

les états de charge 8 et 9+. L'hélium ayant un rôle sur la thermalisation des ions, une diminution de son débit entraîne une activation des ions en phase gazeuse (Figure 20, c).

#### d. Conclusion

Les différents paramètres de séparation dans la cellule IMS jouent donc un rôle dans l'activation des ions en phase gazeuse. Il a d'ailleurs été montré par Morsa *et al.*<sup>201</sup> et Merenbloom *et al.*<sup>212</sup>, que cette activation des ions était la conséquence d'une augmentation de la température effective des ions lorsque la hauteur des vagues augmente et que le débit d'hélium diminue. Afin de se placer dans des conditions les plus douces possible, ils ont ainsi pu montrer qu'il fallait : diminuer la hauteur des vagues et le débit d'azote et augmenter le débit d'hélium.

De plus, ils ont mis en évidence que l'effet des différents paramètres sur la température effective des ions dépend des paramètres instrumentaux utilisés, mais aussi de nombreux facteurs tels que l'état de charge, la masse et la conformation de la protéine étudiée<sup>212</sup>.

### 2.4 Stratégie d'optimisation en IM-MS : une question de compromis

---

Dans un premier temps, l'étape d'optimisation consiste à diminuer l'effet des tensions d'accélération  $V_c$ , Bias, Trap et Transfer CE tout en conservant une bonne transmission des ions au sein de l'instrument.

Dans un second temps, les paramètres de mobilité ionique doivent être optimisés de manière à ce que les temps de passage des ions majoritaires de la protéine se situent dans le deuxième tiers de la cellule de mobilité ionique. Parmi les différents paramètres, nous avons pu montrer qu'une augmentation de la hauteur des vagues et des rapports  $Q_{He}/Q_{N_2}$  permettait d'obtenir une meilleure séparation des ions dans la cellule de mobilité ionique. Cependant ces mêmes paramètres doivent être finement optimisés pour ne pas induire l'activation des ions en phase gazeuse.

Il faut donc trouver le bon compromis entre une bonne transmission des ions et une bonne séparation de ces derniers par IM-MS, sans pour autant induire de changements conformations en phase gazeuse par échauffement des ions.

## Chapitre 4 : Les informations déduites des analyses par MS et IM-MS supramoléculaires

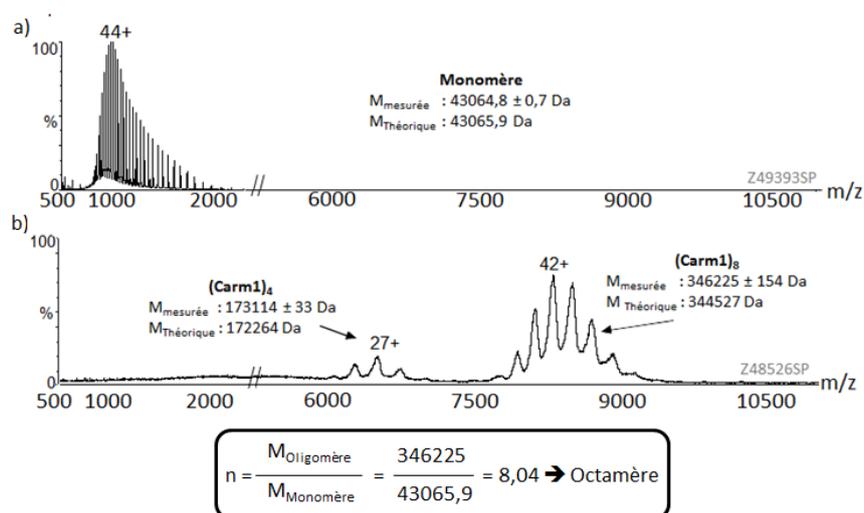
Cette partie a pour objectif de présenter les différentes informations qui peuvent être déduites des analyses par MS et IM-MS supramoléculaire ainsi que les contrôles nécessaires à la validation des données obtenues.

### 1 Diversités des informations obtenues par MS supramoléculaire

#### 1.1 Détermination de stœchiométrie d'interaction et d'état d'oligomérisation d'une protéine

La détermination de l'état d'oligomérisation de différents partenaires d'un complexe ainsi que leur stœchiométrie d'interaction sont des informations essentielles pour la caractérisation d'édifices biologiques non-covalents.

Dans un premier temps, les protéines sont analysées séparément en conditions dénaturantes de manière à déterminer la masse moléculaire de chacun des partenaires individuellement. Pour cela, la protéine est incubée dans une solution eau/acétonitrile 50/50 acidifiée avec 1% d'acide formique permettant de rompre les interactions non-covalentes et de dénaturer la protéine (Figure 21, a).

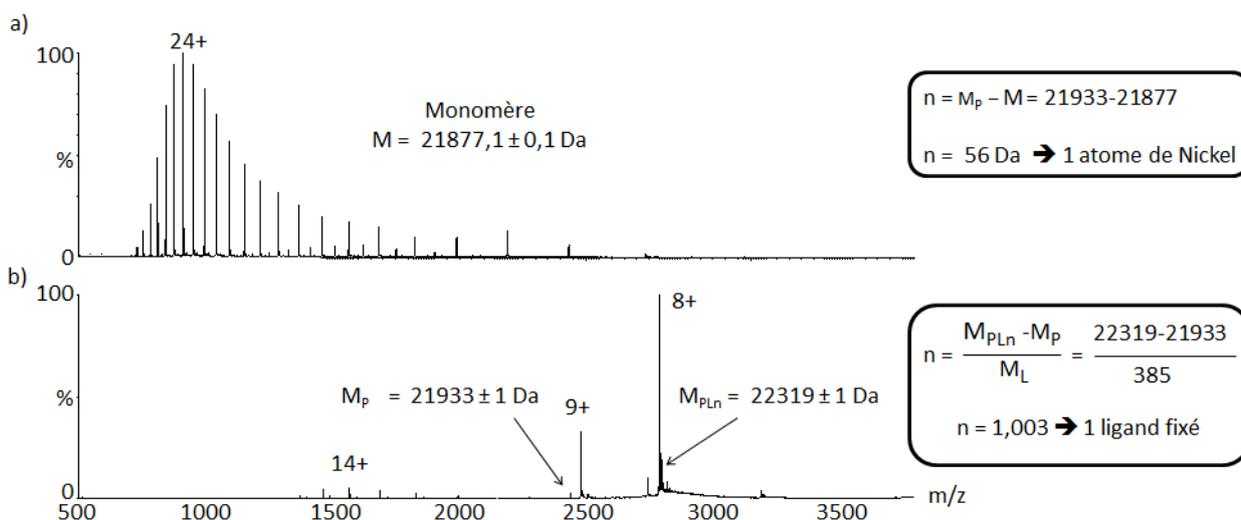


**Figure 21 : Détermination de l'état d'oligomérisation d'une protéine.** Analyse de la protéine Carm1 à 2  $\mu\text{M}$  en monomère a) dans un mélange eau/acétonitrile/acide formique 50/50/1 ( $V_c = 30\text{V}$ ,  $P_i = 1 \text{ mbar}$ ), b) dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  500mM pH6.8 ( $V_c = 200\text{V}$ ,  $P_i = 6 \text{ mbar}$ ).

Dans un deuxième temps, les protéines sont analysées individuellement dans des conditions natives préservant les interactions non-covalentes. Le quotient de la masse mesurée en conditions

natives par la masse mesurée en conditions dénaturantes permet de déterminer l'état d'oligomérisation de la protéine (Figure 21, b).

De plus, lors de l'analyse de plusieurs protéines en conditions natives, la différence de masse entre la mesure en conditions dénaturantes et en conditions natives permet d'obtenir directement la masse du ou des ligands en interaction (Figure 22). Le rapport de la différence de masse d'un complexe protéine/ligand et d'une protéine seule par la masse du ligand étudié permet de déterminer le nombre de ligands fixés par protéine.



**Figure 22 : Détermination de la stoechiométrie d'interaction d'un complexe protéine/ligand.** a) analyse en conditions dénaturantes de la protéine PDF1B diluée à 2  $\mu$ M dans une solution eau/Acétonitrile/acide formique 50/50/1 ( $V_c = 40V$  ?  $P_i = 1$  mbar) et b) analyse en conditions natives de la protéine PDF1B incubée avec l'Actinonine selon un ratio 1 :1.25 (5  $\mu$ M) dans un tampon  $AcNH_4$  100 mM pH 7.5 contenant 5% d'éthanol.

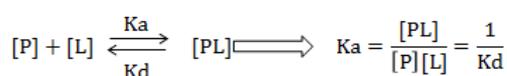
La précision des mesures de masse ( $< 0.01\%$ ) par MS permet de déterminer sans ambiguïté des stoechiométries d'interaction. De plus, contrairement aux autres techniques biophysiques, la MS supramoléculaire permet de visualiser directement et simultanément plusieurs espèces présentes en solution.

## 1.2 Évaluation de l'affinité des complexes en solution

La MS supramoléculaire permet aussi d'accéder à des informations importantes pour les biologistes à savoir l'affinité des complexes en solution. Dans ce cas, la MS permet de suivre des réactions se faisant en solution. Il est donc important de s'assurer que le passage en phase gazeuse ne modifie pas les interactions établies en solution. Deux stratégies permettent d'évaluer l'affinité des complexes en solution : d'une part des expériences de titrage et d'autre part des expériences de compétition<sup>5, 213</sup>.

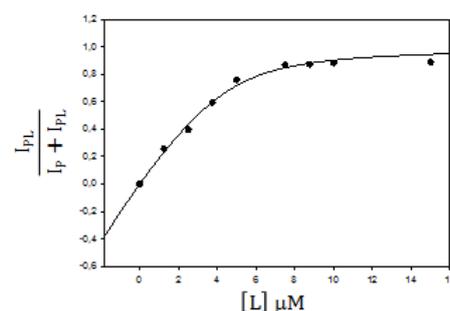
### 1.2.1 Expériences de titrage (Kd)

Ces expériences de titrage consistent à faire varier la concentration en ligands par rapport à une concentration fixe en protéine. En suivant l'évolution du pourcentage de complexes protéine/ligand formés en fonction de la concentration en ligands, il est possible de déterminer des constantes d'affinité (Ka) et de dissociation (Kd). Afin d'obtenir des résultats fiables, il est important d'étudier un nombre suffisant de concentrations en ligands (entre 10 et 15 conditions différentes) et de s'assurer de la reproductibilité de la détermination du Kd. De telles expériences ont été réalisées au cours de cette thèse afin de pouvoir comparer l'affinité de différents ligands pour la protéine PDF1B. (voir Partie 3, Chapitre 3).



Soit  $t$  le facteur réponse relatif :  $\frac{[PL]}{[P]} = \frac{t_{PL}}{t_P} \times \frac{I_{PL}}{I_P} = t \times \frac{I_{PL}}{I_P}$

$$\text{D'où : } \frac{I_{PL}}{I_P + I_{PL}} = \frac{C_L - Kd - C_P + \sqrt{C_L^2 + (Kd + C_P)^2 + 2 \cdot C_L \cdot (Kd - C_P)}}{2 \cdot Kd \cdot t + C_L - Kd - C_P + \sqrt{C_L^2 + (Kd + C_P)^2 + 2 \cdot C_L \cdot (Kd - C_P)}}$$



**Figure 23 : Détermination de constantes de dissociation par MS supramoléculaire en tenant compte du facteur réponse  $t$ .** P : protéine, L : ligand, P/L : protéine/ligand,  $I_{PL}$  ou  $I_P$  : somme des intensités des pics de complexe P/L ou de protéine seule,  $C_P$  ou  $C_L$  : concentration molaire totale de protéine ou de ligand. D'après <sup>214</sup>.

Il est important de noter que cette technique repose sur la possibilité de pouvoir comparer l'intensité relative de différentes espèces détectées sur un spectre MS, mais aussi sur le fait que celle-ci reflète bien les abondances relatives de ces espèces en solution. Lors de l'évaluation de l'abondance des espèces en solution, il est généralement admis que si la fixation d'un ligand de faible poids moléculaire sur une protéine de masse élevée ne modifie pas la charge de la protéine alors les intensités relatives du complexe et de la protéine libre sont considérées comme égales à leur abondance relative en solution <sup>214-217</sup>.

**NB : La gamme de constantes de dissociation accessible par MS supramoléculaire est comprise entre  $10^{-7}$  et  $10^{-4}$  M <sup>218, 219</sup>. En effet, pour des constantes de dissociation inférieures à  $10^{-7}$  M, les concentrations utilisées ne permettent plus d'évaluer de manière précise les signaux correspondants aux différents partenaires et pour des constantes de dissociation supérieures à  $10^{-4}$  M, la proportion de complexes formés est trop faible pour être correctement évaluée.**

### 1.2.2 Expériences de compétition

Afin de pouvoir comparer l'affinité de différents ligands pour une protéine, des expériences de compétition sont réalisées. Ces expériences peuvent être réalisées en deux temps : d'une part de manière directe, d'autre part de manière indirecte (Figure 24). Ces deux approches seront illustrées dans la partie 3, chapitre 4 de cette thèse.

Les expériences de compétition dites « directes » consistent à incuber la protéine d'intérêt avec différents ligands en concentrations équivalentes. L'abondance de chaque complexe protéine/ligand permet alors d'établir un classement des ligands en fonction de leur affinité pour la protéine<sup>220</sup>. Cette approche permet aussi de déterminer des constantes d'affinité en comparant les signaux des complexes protéine/ligand d'intérêt au signal d'un complexe de référence de constante d'affinité connue<sup>221</sup>. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir comparer simultanément l'affinité de plusieurs ligands de masses moléculaires différentes.

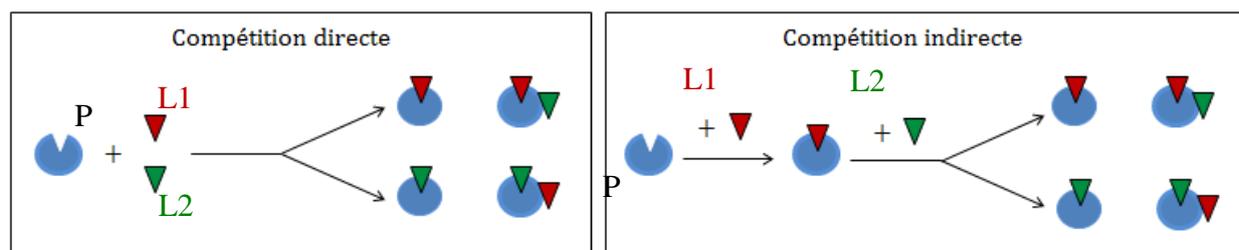


Figure 24 : Détermination de l'affinité de différents ligands (L1 et L2) pour une protéine cible (P) par des expériences de titration directes et indirectes.

Les expériences de compétition dites « indirectes » consistent à former un complexe entre la protéine et un ligand 1 puis à ajouter un deuxième ligand. Le suivi du remplacement du ligand 1 par le ligand 2 permet de comparer l'affinité de ces deux ligands vis-à-vis de la protéine étudiée, mais aussi de mettre en évidence l'existence de plusieurs sites de fixation sur une protéine.

Lors d'étude d'interaction protéine/ligand, il est important de vérifier la spécificité des interactions. Pour cela, il est indispensable de réaliser une étude détaillée des stœchiométries d'interaction de chaque ligand pour la protéine d'intérêt, à différentes concentrations en ligand. Il est aussi indispensable de s'assurer que les paramètres instrumentaux utilisés ne perturbent pas les interactions établies en solution. Seules une optimisation rigoureuse des différents paramètres et la réalisation de contrôles permettent de garantir des analyses fiables et reproductibles<sup>5</sup>.

### 1.3 Cinétique de formation des complexes

La MS supramoléculaire permet aussi de suivre la cinétique de formation de complexes non-covalents multiprotéiques ainsi que la dynamique d'échange des constituants d'un complexe<sup>8, 112, 222-224</sup>.

Afin de pouvoir suivre des cinétiques de changements conformationnels par MS supramoléculaire, il faut que :

- **l'échelle de temps** de la réaction soit compatible avec la technique (supérieure à 30 secondes). En effet, il faut que la réaction s'effectue dans un temps supérieur au temps nécessaire à la préparation et à l'infusion de l'échantillon. Cependant, il est possible

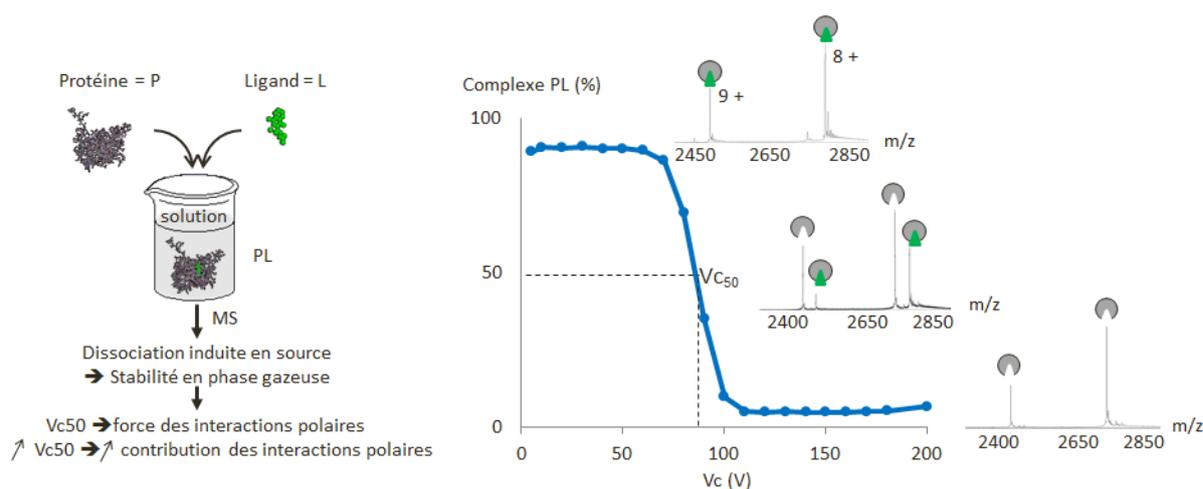
d'atteindre des temps réactionnels de l'ordre de la milliseconde grâce à l'utilisation de chambres de mélanges<sup>222, 225</sup>.

- les **différents intermédiaires réactionnels** soient suffisamment différents pour être distingués sur les spectres de masse. En effet, dans le cas de mélange, les résolutions des spectromètres de masse peuvent ne pas être suffisantes pour différencier différents intermédiaires. Lors de l'étude de dynamique d'échange, cette contrainte peut être contournée grâce à l'utilisation de protéines modifiées par un marquage isotopique (protéines marquées à l'azote lourd ou léger)<sup>223</sup> ou de différents variants d'une même protéine (protéines mutées ou tronquées)<sup>226, 227</sup>.

Plusieurs suivis de cinétiques de formation de complexes ont été réalisés au cours de ce travail de thèse et seront illustrés dans les chapitres 2 et 4 de la partie 3.

#### 1.4 Évaluation de la force des interactions mises en jeu

Afin de pouvoir évaluer les types d'interaction entre différents partenaires d'un complexe en phase gazeuse, des expériences de dissociation (CID) en source et/ou dans les cellules de collision du spectromètre de masse sont réalisées (Figure 25). Ces expériences consistent à augmenter l'énergie transmise aux ions en phase gazeuse de manière à induire la dissociation des partenaires d'un complexe non-covalent. De la même manière que pour l'obtention de l'IC50 en solution (concentration induisant une inhibition de 50% de l'interaction), il est alors possible de déterminer par MS supramoléculaire une tension appelée Vc50 pour laquelle une dissociation de 50% du complexe est observée<sup>228, 229</sup>.



**Figure 25 : Définition du paramètre Vc50.** Panel de gauche ; présentation des étapes de détermination du Vc50 par MS supramoléculaire. Panel de droite : présentation d'une courbe de dissociation Vc50 accompagnée des spectres de masse obtenus dans différentes conditions : 100%, 50% et 0% de complexes protéine/ligand.

Il a été montré par Rogniaux *et al.*, que les valeurs de Vc50 permettaient d'évaluer la contribution des interactions électrostatiques dans la stabilisation des complexes<sup>228</sup>. Ainsi, plus un

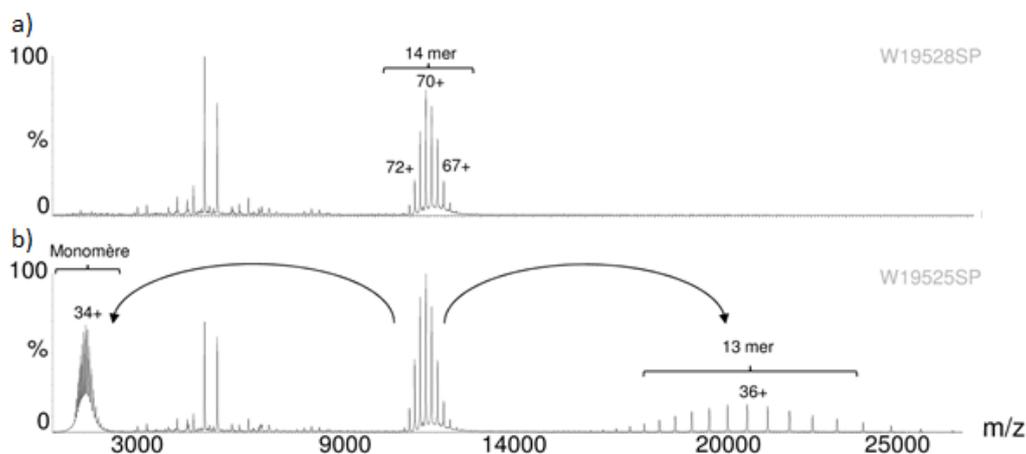
complexe est stabilisé en solution par des interactions électrostatiques, plus les valeurs de  $V_{c50}$  seront élevées<sup>230-232</sup>. La comparaison des valeurs de  $V_{c50}$  permet donc de rendre compte de la force des interactions protéine/ligand. Désormais, les valeurs de  $V_{c50}$  sont utilisées dans le cadre de criblages de ligands par MS supramoléculaire pour l'industrie pharmaceutique<sup>5</sup>.

### 1.5 Étude de l'association de complexes multiprotéiques par des expériences de dissociation suivies par MS supramoléculaire

Lors de l'étude de complexes multiprotéiques par MS supramoléculaire, il est généralement nécessaire de connaître les différents partenaires d'un complexe. Afin de pouvoir les identifier, différentes approches peuvent être mises en œuvre : des approches protéomiques visant à identifier les partenaires du complexe par LC-MS et LC-MS/MS, des approches supramoléculaires ayant recours à la dissociation des complexes en solution ou en phase gazeuse<sup>8, 233</sup>.

La dissociation des complexes multiprotéiques en solution est réalisée par modification du pH ou de la force ionique du tampon de la protéine ou encore par ajout de solvants organiques. Les sous-complexes générés sont ensuite analysés par MS moléculaire et supramoléculaire (Voir Partie 4, Chapitre 1, Paragraphe 1.1).

La dissociation en phase gazeuse quant à elle consiste à augmenter l'énergie cinétique transmise aux ions en phase gazeuse de manière à rompre les interactions non-covalentes au sein des complexes multiprotéiques. Cette dissociation est généralement asymétrique, car elle conduit en premier lieu à l'éjection des sous-unités situées en périphérie des complexes<sup>234-236</sup>. Par conséquent, cette méthode permet d'obtenir une information sur la topologie des complexes<sup>237, 238</sup>. L'analyse d'une protéine formée de 14 sous-unités soumise à des tensions d'accélération de 100 à 150 V, nous a permis de mettre en évidence une dissociation asymétrique du complexe, conduisant à l'éjection d'une sous-unité monomérique possédant un nombre de charges élevé (Figure 26).



**Figure 26 : Dissociation asymétrique de complexes multiprotéiques en phase gazeuse.** Analyse de la protéine GroEL dessalée 10 fois par ultrafiltration (Vivaspin 2mL, 50 kDa) infusée à 2 $\mu$ M (Tampon AcNH<sub>4</sub> 200 mM, pH 6,9,  $P_i$  = 7 mbar) a)  $V_c=100V$ , b)  $V_c=200V$ .

Le nombre de charges total du monomère et du 13-mer reste cependant identique à celui de la protéine sous forme 14-mer comme cela a été déjà montré par les travaux de Jurchen *et al.*<sup>235, 236</sup>.

De plus, la comparaison des énergies utilisées pour dissocier un complexe permet de mettre en évidence le rôle de modifications post-traductionnelles ou de mutations sur la stabilisation ou la déstabilisation d'un complexe<sup>104, 239, 240</sup>.

L'ensemble des possibilités offertes par la MS supramoléculaire permet de suivre la reconstruction de complexes multiprotéiques<sup>241</sup>, mais pourrait permettre d'obtenir des informations sur les réseaux d'interactions protéiques.

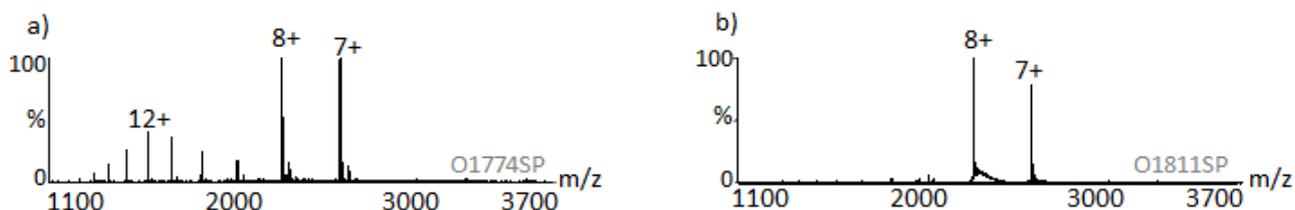
### 1.6 Étude de la dynamique d'assemblage de protéines et de complexes non-covalents

La MS supramoléculaire permet d'étudier la dynamique structurale de complexes supramoléculaires soumis à différents stimuli (modification de l'environnement rédox, du pH, de la force ionique, de la température ou lors de la fixation d'un ligand) grâce au suivi des changements intervenant au niveau des structures tertiaires et quaternaires des protéines<sup>242-244</sup>.

Sous l'effet de stimuli, des modifications de l'état d'oligomérisation des protéines ou de leurs stœchiométries d'interaction (Figure 27) peuvent être observées sur les spectres de masse<sup>143, 245</sup>.

Toutefois, tous les changements structuraux n'affectent pas forcément la masse des protéines. Dans ce cas, une analyse de la distribution des états de charge permet d'obtenir une information concernant un changement conformationnel<sup>246-250</sup>.

En effet, l'ionisation des protéines s'effectue, en fonction de l'état de repliement d'une protéine, sur les résidus protonables accessibles. Par conséquent, plus une protéine sera dépliée, plus elle présentera une distribution des états de charge étendue avec un nombre de charges élevé (Figure 27, a).



**Figure 27 : Effet d'un traitement EDTA sur une protéine à doigts de zinc.** Analyse en conditions natives de la protéine P1 en présence (a) ou non (b) d'EDTA ( $V_c = 120V$ ,  $P_i = 6$  mbar).

La protéine P1, qui possède 2 atomes de zinc, en perd un en présence d'EDTA. Le zinc ayant un rôle structural, la perte de ce dernier entraîne un dépliement de la protéine qui se caractérise sur le spectre de masse par une distribution étendue des états de charges (de 15+ à 7+).

Au contraire, une protéine ayant une conformation plus compacte présentera une distribution des états de charge plus étroite avec des états de charge plus faibles (Figure 27, b). En effet, la protéine P1 sans traitement EDTA possède uniquement deux états de charges majoritaires 8 et 7+.

### 1.7 Comparaisons des données de MS avec les données obtenues en solution

Bien qu'il soit maintenant admis que la MS supramoléculaire permet d'étudier des forces d'interaction en phase gazeuse, la question du maintien de la conformation des protéines en phase gazeuse est toujours présente lors d'analyses par MS supramoléculaire. En effet, lors du transfert d'un complexe en solution vers un milieu sans solvant des changements peuvent avoir lieu, il est donc important d'en avoir conscience pour interpréter les spectres MS de manière juste et approfondie.

#### a. Modifications de l'énergie des interactions non-covalentes lors du passage en phase gazeuse

Lors des analyses en conditions natives, il est important de s'assurer du maintien des interactions non-covalentes en phase gazeuse. En effet, le passage des ions d'un milieu aqueux à un milieu sans solvant s'accompagne d'une modification de la force de certaines interactions (Partie 1, Chapitre 1, Paragraphe 1.2). Les interactions électrostatiques sont notamment renforcées en phase gazeuse contrairement aux interactions hydrophobes qui sont affaiblies (Tableau 3)<sup>231, 251</sup>.

**Tableau 3 : Comparaison des principales interactions covalentes et non-covalentes rencontrées en biologie. Les interactions hydrophobes ne pouvant être quantifiées en milieu aqueux et dans le vide n'ont pas été présentées dans ce tableau. D'après<sup>15, 252-254</sup>.**

Types d'interaction	Force (kcal.mol <sup>-1</sup> )	
	Milieu aqueux	Dans le vide
Covalente	90	90
Electrostatique	3-7	> 80
Hydrogène	1	4
Van der Waals (par atome)	0.1	0.1

Par conséquent, la stabilité d'un complexe non-covalent en phase gazeuse n'est pas directement liée à sa stabilité en solution. De plus, il est essentiel d'appliquer des conditions instrumentales extrêmement douces lors de l'étude d'interactions non-covalentes faisant intervenir des effets hydrophobes.

#### b. Conformation des protéines en phase gazeuse

Comme cela a été évoqué précédemment, les solutions de stockage des protéines jouent un rôle essentiel dans le repliement des protéines. Par conséquent, la question du devenir de la conformation des protéines lors du passage en phase gazeuse se pose donc en MS supramoléculaire.

La comparaison de méthodes en solution avec des méthodes en phase gazeuse a permis de confirmer que les analyses réalisées par MS supramoléculaire étaient le reflet des analyses réalisées en solution<sup>228, 255</sup>. Toutefois, ce n'est qu'avec l'apparition du couplage IM-MS qu'il a été possible de répondre directement à cette question. Une étude IM-MS récente de Wytttenbach *et al.*, a permis de montrer que la protéine Ubiquitine conservait son état natif lors du processus ESI et que cette conformation était conservée pendant plus de 100 ms à 294 K dans un environnement sans solvant<sup>256</sup>. De plus, Breuker et McLafferty ont pu montrer, en combinant des données expérimentales à des données de dynamique moléculaire, que des changements structuraux mineurs interviennent quelques picosecondes après la désolvatation des biomolécules et que ces changements sont suivis de modifications plus importantes plusieurs millisecondes plus tard<sup>211</sup>.

Ces différentes études ont permis de montrer que lors du passage en phase gazeuse, les protéines étaient capables de conserver leur structure tridimensionnelle pendant plusieurs millisecondes ce qui correspond au temps mis par les ions pour atteindre le détecteur du spectromètre de masse<sup>200, 257</sup>. Ces études ont donc permis de confirmer qu'il est possible d'obtenir des informations sur la conformation des protéines en solution à partir d'analyses réalisées en phase gazeuse.

### c. Spécificité des complexes détectés en phase gazeuse

Lors des études d'interactions protéine/ligand, la question de la spécificité des complexes détectés est essentielle à l'interprétation des données de MS supramoléculaire.

Afin de s'assurer de la spécificité des complexes détectés, il est important de préserver l'intégrité des complexes présents en solution. Pour cela, il est important d'optimiser finement les conditions expérimentales (tampons, dessalages) et instrumentales.

D'autre part, il est nécessaire de réaliser des expériences de contrôle permettant de faire la différence entre une agrégation non spécifique et une association spécifique des ligands<sup>258-261</sup>. Parmi les expériences de contrôle, la détection d'une stœchiométrie unique est une preuve d'association spécifique contrairement à une fixation aléatoire d'un ligand, se caractérisant sur les spectres de masse par une distribution statistique des complexes. De même, dans le cas d'une association spécifique, une modification des conditions en solution (modification du pH ou de la force ionique) est sensée entraîner une modification des spectres de masse obtenus. Enfin, lors d'expériences de compétitions entre un ligand de référence et d'autres ligands supposés cibler le même site de fixation, l'absence de complexes avec les deux ligands permet de montrer la spécificité de l'interaction. De plus, dans le cas d'une interaction spécifique protéine/ligand, une modification du ligand ou de la protéine devrait entraîner une modification des interactions observées.

En conclusion, seule une optimisation fine des paramètres expérimentaux et instrumentaux associée à des expériences de contrôle permet de garantir la fiabilité des mesures réalisées en phase gazeuse.

#### d. Quantification en MS supramoléculaire

Lors de l'évaluation de l'affinité d'un complexe non-covalent en phase gazeuse, il est important d'être conscient que les différentes étapes de l'analyse ESI-MS (ionisation, transmission et détection) sont capables d'induire un biais dans la détermination des intensités relatives des espèces présentes sur un spectre de masse.

En effet, l'efficacité d'ionisation d'analytes portant des charges permanentes et des groupements ionisables sera plus importante que celle des autres analytes. D'autre part, les différentes espèces ne sont pas transmises avec la même efficacité, du fait des réglages instrumentaux (pressions, potentiels d'accélération et radiofréquences), car l'effet de ces différents paramètres varie en fonction de la masse et de la charge des ions.

Ainsi, lors de l'évaluation des abondances relatives des différentes espèces sur un spectre de masse, il est important de prendre en compte l'existence de ces différentes sources de biais possibles. Par conséquent, il est recommandé de comparer uniquement les abondances relatives d'espèces ayant des efficacités d'ionisation similaires. Il est généralement admis que la fixation d'un ligand de faible masse sur une protéine de masse élevée n'altère ni son efficacité d'ionisation, ni son efficacité de transmission et de détection. Les intensités relatives de la protéine seule ou liée au ligand sont donc considérées comme égales à leurs abondances relatives en solution<sup>125</sup>. Cette hypothèse sera notamment utilisée lors des études d'interactions protéine/ligand par MS supramoléculaire (Partie 3, Chapitre 3 et 4).

## 2 Informations complémentaires apportées par les analyses IM-MS

---

Le développement du couplage IM-MS pour l'analyse de protéines et de complexes protéiques a permis d'élargir le champ d'application de la MS supramoléculaire.

### 2.1 Amélioration de la qualité des spectres IM-MS grâce au «Spectrum Cleaning»

---

Lors de l'analyse de protéines entières par MS supramoléculaire, nous avons pu mettre en évidence l'importance du dessalage de l'échantillon. Toutefois, il est possible que des impuretés soient toujours présentes dans l'échantillon ce qui se caractérise sur les spectres de masse par un bruit de fond plus important dégradant la qualité des spectres. En effet, dans le cas d'une protéine traitée à l'EDTA puis dessalée par filtration sur gel, nous n'avons pas été capables d'obtenir un dessalage correct, conduisant à un spectre de masse de mauvaise qualité avec un important bruit de

fond dans la gamme des  $m/z$  500-1 500 (Figure 28). De manière intéressante, l'analyse de cet échantillon par IM-MS nous a permis de séparer les impuretés (zone 1) et la protéine d'intérêt (zone 2) grâce à la mobilité ionique (Figure 28). En extrayant le spectre de masse correspondant à la zone 2, nous avons alors pu obtenir un spectre sans bruit de fond, ni impuretés (Figure 28). Grâce à la différence de mobilité ionique qui existe entre des impuretés et des protéines, le couplage IM-MS permet d'améliorer la qualité des spectres de masse.

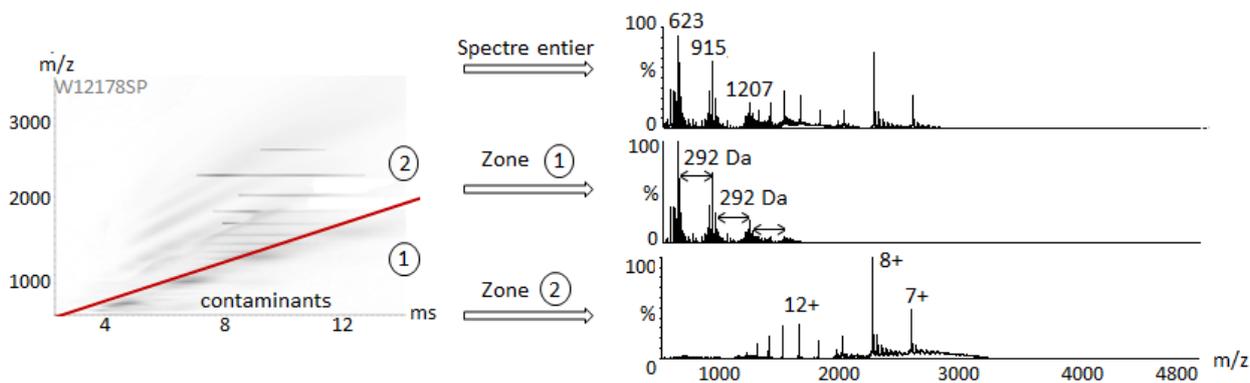


Figure 28 : Mise en évidence du nettoyage de spectre MS en utilisant le couplage IM-MS.

Ce procédé a notamment été utilisé au laboratoire par Cédric Atmanene<sup>183</sup> lors de l'étude d'un antigène. La présence de polyéthylène glycol dans l'échantillon conduisait à une augmentation du bruit de fond sur les spectres de masse perturbant les mesures de masses. Le nettoyage du spectre a permis de réduire le bruit de fond observé, mais aussi de mettre en évidence la présence d'une protéine contaminante non visible lors des premières analyses par MS supramoléculaire.

De la même manière, lors de l'étude des N-glycanes de la protéine Gp-120 du virus du Sida, Harvey *et al.*, n'arrivait pas à obtenir un spectre de masse exploitable à cause de la présence de détergents tels que le NP40. L'utilisation du couplage IM-MS a donc permis d'extraire le spectre de masse correspondant aux N-glycanes avec un bon rapport signal sur bruit<sup>262</sup>.

## 2.2 Mise en évidence de l'hétérogénéité conformationnelle d'échantillons biologiques

L'analyse d'échantillons par MS supramoléculaire ne permet pas de mettre directement en évidence de changements conformationnels. De plus, dans le cas de protéines à cystéines, le manque de résolution des spectromètres de masse ne nous permet pas de déterminer exactement le nombre de ponts disulfures formés. Étant donné que ces derniers jouent un rôle sur la structure des protéines, nous avons souhaité caractériser deux protéines à cystéines par IM-MS.

### a. Exemple d'une protéine traitée au DTT

Dans un premier temps, nous avons analysé une protéine possédant plusieurs cystéines : le lysozyme. L'analyse de cette protéine en conditions dénaturantes par IM-MS, nous a permis de

mettre en évidence deux populations sur le *Driftscope* : l'une correspondant aux états de charges 6 à 8+, compacte et l'autre, correspondant aux états de charge 8 à 10+ avec une conformation plus étendue. Il est intéressant de remarquer que l'état de charge 8+ est présent sous deux conformations plus ou moins compactes (Figure 29, a). La présence de ces deux populations suggère la présence d'une hétérogénéité de pontage des ponts disulfures. Afin de pouvoir s'en assurer, nous avons traité l'échantillon au DTT pendant 30 minutes à 37°C (Figure 29, b). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une différence de 8 Da entre la masse de la protéine non traitée ( $M_{\text{mesurée}}=14\,305.21 \pm 0.12$  Da) et celle de la protéine traitée ( $M_{\text{mesurée}}=14\,313.25 \pm 0.26$  Da) suggérant la réduction de 4 ponts disulfures. Cette réduction se traduit sur le *Driftscope* par l'apparition d'une nouvelle population dans une conformation plus étendue avec des états de charge plus élevés. L'utilisation de la mobilité ionique lors de l'étude de cette protéine nous a permis de mettre en évidence une hétérogénéité des pontages de la protéine conduisant à une structure plus compacte.

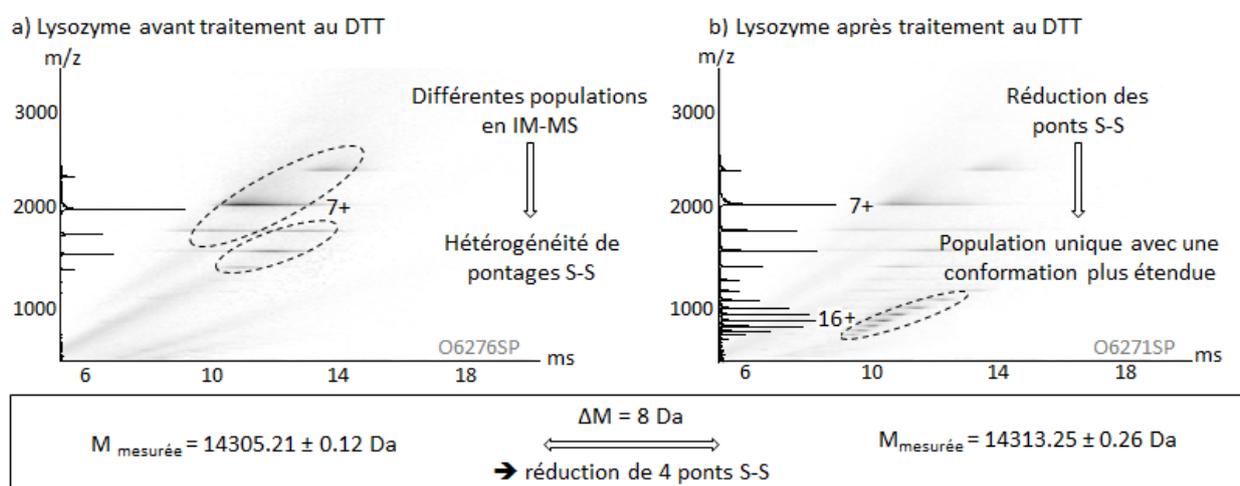


Figure 29 : Mise en évidence d'une hétérogénéité de pontage sur un échantillon biologique par IM-MS.

### b. Exemple d'une protéine traitée au peroxyde d'hydrogène

Nous nous sommes intéressés à l'oxydation d'une protéine possédant plusieurs cystéines libres. Lors de l'analyse de la protéine par IM-MS en milieu réducteur, nous avons pu mettre en évidence une seule population sur le *Driftscope* dont l'état de charge majoritaire est le 19+ (Figure 30, a). La protéine a ensuite été incubée dans un milieu oxydant en présence de 20  $\mu\text{M}$  de peroxyde d'hydrogène pendant 1 heure (Figure 30, b). L'analyse de cette protéine, traitée à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , par IM-MS nous a permis de mettre en évidence la formation d'un pont disulfure (différence de masse de 2 Da entre la protéine réduite et la protéine oxydée), mais aussi de mettre en évidence l'apparition de plusieurs populations sur le *driftscope* correspondant à des hétérogénéités de pontages. Il est important de noter que l'apparition d'une conformation plus compacte de la protéine en présence d'un pont disulfure s'accompagne d'un décalage des états de charge vers les états de charge plus faibles (état de charge 16+ majoritaire).

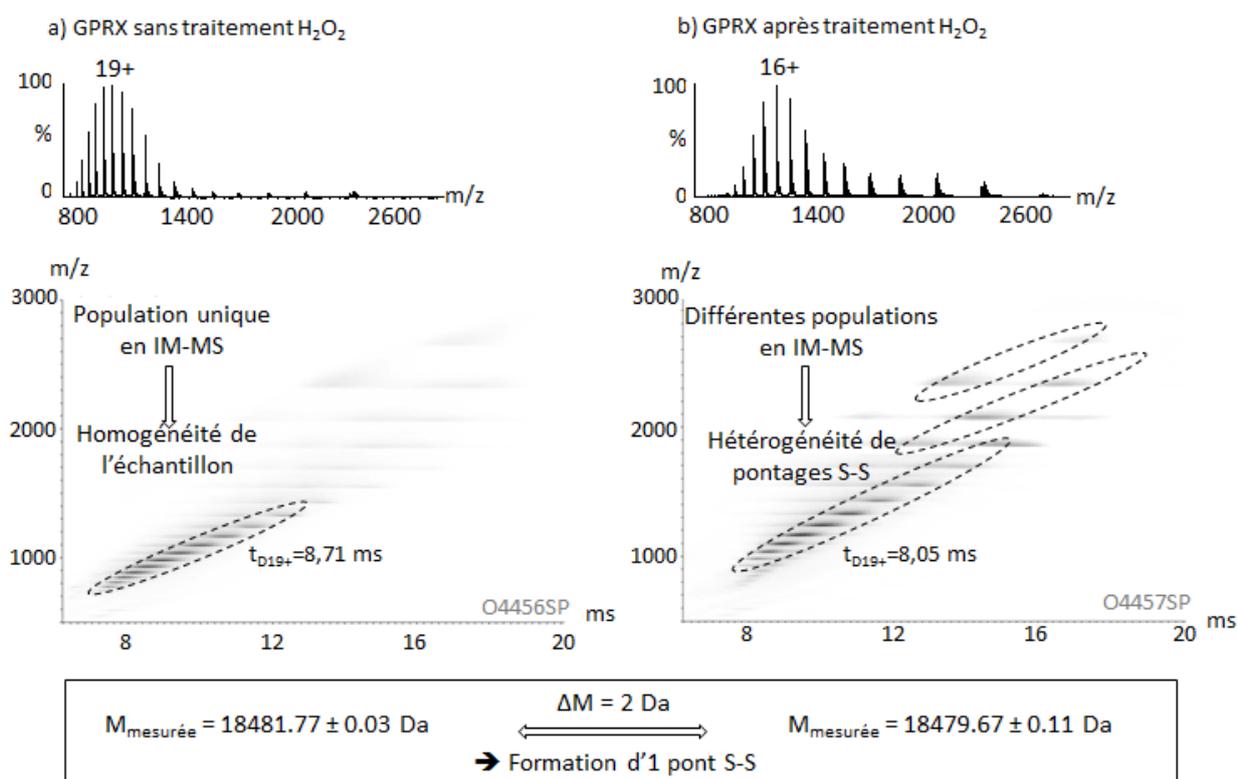


Figure 30 : Mise en évidence de l'apparition d'une hétérogénéité de pontage sur un échantillon biologique traité au peroxyde d'hydrogène par IM-MS

En conclusion, la mobilité ionique permet de mettre en évidence des hétérogénéités structurales au sein d'un même échantillon. Cette propriété du couplage IM-MS est particulièrement intéressante notamment lors du contrôle qualité de différents lots d'échantillons biologiques<sup>263</sup>. Elle permet aussi de rendre compte de l'effet de différents stimuli sur la conformation des protéines.

### 2.3 Suivi de changements conformationnels par IM-MS

L'une des applications principales de l'IM-MS est le suivi de changements conformationnels de biomolécules soumises à des modifications de leur environnement ou lors de la fixation de ligands. En effet, cette technique, rapide et sensible, est de plus en plus utilisée en complément d'études structurales notamment lorsque ces protéines n'ont pas pu être analysées par cristallographie ou RMN. L'étude de changements conformationnels sera abordée de manière détaillée dans la partie 3 de ce manuscrit de thèse.

### 2.4 Comparaison de formes de protéines et de complexes non-covalents

Le couplage IM-MS permet de différencier des protéines en fonction de leur forme et de leur taille en phase gazeuse. Par conséquent, il est intéressant d'évaluer le potentiel de ce couplage pour déterminer l'organisation structurale d'édifices biologiques. En effet, la MS supramoléculaire nous permet d'obtenir une information concernant les stœchiométries d'interaction au sein d'un complexe, mais ne nous permet pas de déterminer l'organisation des sous-unités constituant le complexe.

Afin de mettre en évidence cette propriété offerte par le couplage IM-MS, plusieurs études ont été réalisées ces dernières années par IM-MS sur des complexes multiprotéiques ayant des topologies différentes<sup>99, 197, 264-266</sup>. Ces différentes études ont permis de montrer qu'une augmentation des énergies d'activation en phase gazeuse conduisait à la compaction de protéines sous forme annulaire alors que la structure de protéines globulaires n'était pas modifiée<sup>99, 266</sup>. D'autre part, l'étude des états d'oligomérisation de la protéine  $\beta$ -amyloïde par IM-MS a permis de mettre en évidence qu'une augmentation de l'état d'oligomérisation de la protéine conduisait à une diminution des temps de passage des ions dans la cellule IMS suggérant une réorganisation structurale en fonction de l'état d'oligomérisation. Bernstein *et al.*, ont ainsi pu montrer que le couplage IM-MS permettait d'établir une relation entre la topologie d'un complexe et les temps de passage des ions dans la cellule IMS<sup>109</sup>.

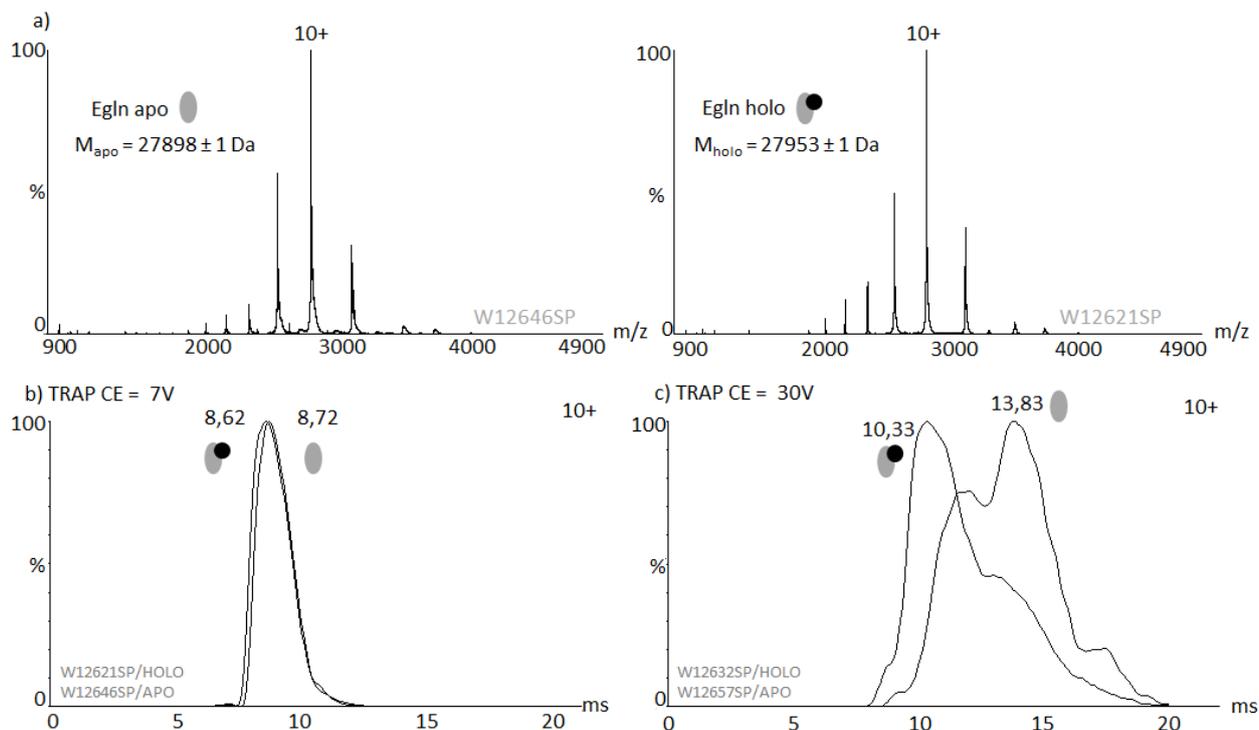
En conclusion, le couplage IM-MS permet d'évaluer l'organisation structurale d'édifices biologiques de manière directe ou en ayant recours à l'activation des ions en phase gazeuse.

### 2.5 Étude de la stabilité conformationnelle de biomolécules en phase gazeuse

Lors de l'optimisation des paramètres instrumentaux en IM-MS, des conditions les plus douces possible doivent être choisies de manière à ne pas induire l'activation des ions en phase gazeuse (voir Partie 2, Chapitre 3, Paragraphe 2.1). Toutefois, afin de mettre en évidence le rôle stabilisateur ou déstabilisateur d'un ligand sur une protéine, il est possible d'avoir recours à des expériences d'activation en phase gazeuse. De la même manière que pour l'étude de la stabilité des ions en phase gazeuse (expériences de Vc50), la tension d'accélération Trap CE va être augmentée pas à pas. Le suivi des changements conformationnels se produisant au niveau de la protéine apo ou holo, nous permettra d'évaluer le rôle des ligands sur la stabilité de la protéine en phase gazeuse<sup>99, 240, 267, 268</sup>.

Afin de pouvoir mettre en évidence l'apport du couplage IM-MS pour l'étude de la stabilité de complexes en phase gazeuse, nous avons étudié une protéine impliquée dans les fonctions de réponse à l'hypoxie : la protéine EglN-1. Cette protéine dont la masse mesurée en conditions dénaturantes est de  $27\,897.2 \pm 0.5$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 27\,897.5$  Da) présente un atome de fer (55.8 Da) en conditions natives ( $M_{\text{mesurée}} = 27\,953 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 27\,953$  Da). Nous avons donc souhaité étudier l'effet de cet atome de fer sur la stabilité de cette protéine par IM-MS.

Pour cela, nous avons soumis la protéine EglN a un traitement EDTA (10 mM) permettant d'obtenir la forme apo de la protéine ( $M_{\text{mesurée}}=27\,898 \pm 1$  Da ;  $M_{\text{théorique}}=27\,897$  Da) (Figure 31, a). La distribution des états de charge des protéines apo et holo EglN en conditions natives suggère que le fer n'a pas d'effet sur la conformation de cette protéine en phase gazeuse (Figure 31, a) ce qui a pu être confirmée par IM-MS dans des conditions douces (Trap CE = 7 V) (Figure 31, b).



**Figure 31 : Étude de la stabilité conformationnelle d'une protéine en phase gazeuse par IM-MS.** a) analyse de la protéine EglN sous forme apo et holo par MS supramoléculaire (5  $\mu$ M, tampon  $\text{AcNH}_4$  100 mM pH 7,5,  $V_c = 20$  V,  $P_i = 6$  mbar), b) analyse de la protéine EglN sous forme apo et holo sans activation dans la partie Trap CE (Trap CE = 7 V) et c) avec activation (Trap CE = 30 V, Bias = 15V, Transfer CE = 40V,  $P_{\text{IMS}} = 0,5$  mbar, WH = 400 V, WV = 9  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Dans ces conditions, les pics de mobilité observés pour les différents états de charge sont fins indiquant que la protéine a une conformation homogène. Nous avons ensuite comparé par IM-MS l'effet de différentes tensions d'accélération Trap CE sur la conformation des formes apo et holo EglN (Figure 31, b et c). Il a ainsi pu être mis en évidence que pour une valeur de Trap CE de 30 V, les valeurs de  $t_D$  augmentent et que la distribution des temps de passage des ions de la forme apo dans la cellule IMS était plus étendue que celle de la forme holo. La protéine apo est donc plus sensible à une activation des ions en phase gazeuse que la protéine holo. Par conséquent, ces expériences nous permettent de conclure que le fer a un rôle stabilisateur sur la protéine EglN.

Le couplage IM-MS permet donc d'étudier la stabilité conformationnelle de biomolécules en phase gazeuse. Cette application est particulièrement intéressante dans le cas d'étude de criblage de ligands.

## 2.6 Comparaison de données structurales de haute résolution aux données IM-MS

Les différents exemples d'applications développés dans cette partie ne nécessitent pas obligatoirement une comparaison des données IM-MS à des données structurales de hautes résolutions. Cependant, l'intégration de ce couplage dans des études de biologie structurale nécessite l'utilisation d'un paramètre permettant de comparer les résultats d'IM-MS à des données biophysiques classiques.

### a. Comparaison des CCS expérimentales aux CCS théoriques issues de données structurales

La comparaison des CCS théoriques avec les CCS expérimentales a permis lors du développement de la mobilité ionique de vérifier l'exactitude des données obtenues par IM-MS. Lors des premières études IM-MS, les CCS mesurées étaient inférieures aux CCS théoriques ce qui peut s'expliquer par une compaction des ions en phase gazeuse<sup>99</sup>. Cependant, cette observation pourrait trouver une explication par le fait que les étalons étaient analysés en conditions dénaturantes et n'étaient donc pas adaptés à la détermination de CCS en conditions natives<sup>177</sup>. De plus, les structures présentes dans la PDB ne sont pas toujours complètes, introduisant des biais dans le calcul de la CCS théorique. En effet, afin de faciliter la cristallisation de certaines molécules, certaines parties des protéines notamment les extrémités N- et C-terminales peuvent être tronquées ou modifiées. Enfin, il est important de noter que tous les atomes ne peuvent pas toujours être résolus par RMN ou cristallographie à cause de l'instabilité de certaines protéines. La comparaison des CCS théoriques et expérimentales doit donc être réalisée de manière rigoureuse.

Les développements réalisés en IM-MS ces dernières années permettent dorénavant d'utiliser des CCS expérimentales par les experts en biologie structurale pour obtenir rapidement des informations structurales notamment dans le cas de protéines non cristallisables.

### b. Détermination de contraintes structurales pour la modélisation moléculaire grâce aux CCS expérimentales

Depuis de nombreuses années, l'objectif des scientifiques est de comprendre le rôle des partenaires d'un complexe multiprotéique et de comprendre les interactions qui gouvernent des processus cellulaires critiques tels que l'apoptose. Afin de pouvoir répondre à ces questions, des études biochimiques ainsi que des études structurales ont été initiées. Cependant, de nombreuses protéines et réseaux d'interactions représentent un obstacle pour la caractérisation par RMN ou cristallographie. En effet, ces techniques nécessitent d'importantes quantités d'échantillons et impliquent que les protéines soient pures et stables en solution. Ces problèmes ont donc conduit au développement de méthodes rapides permettant d'obtenir des informations structurales telles que l'IM-MS. Toutefois, l'IM-MS reste une technique à faible résolution par comparaison aux techniques utilisées classiquement en biologie structurale.

C'est dans ce contexte qu'est apparue récemment l'utilisation de plusieurs méthodes permettant d'obtenir des informations structurales précises en se basant sur des données de cristallographie, des données de mobilité ionique et de modélisation moléculaire. Robinson *et al.*, ont pu montrer récemment que la combinaison d'approches IM-MS à des approches bio-informatiques pouvait être utilisée pour déterminer la structure de complexes multiprotéiques<sup>179, 233, 248</sup>. Les CCS déterminées

par IM-MS permettent d'orienter la modélisation moléculaire en imposant des contraintes conformationnelles. Ainsi, la structure d'oligomères a pu être déterminée. L'ensemble des outils développés par Robinson *et al.*, couplé à l'IM-MS, permettrait alors de pouvoir caractériser des systèmes multiprotéiques complexes.

La modélisation moléculaire permet aussi d'obtenir des informations structurales sur des protéines non cristallisables de manière à pouvoir compléter nos études IM-MS. Cependant, une maîtrise des différents paramètres de modélisation moléculaire est nécessaire pour garantir l'obtention de modèles justes. En effet, il est important de prendre en compte l'environnement de la protéine ainsi que les interactions qui existent au sein même des molécules.

L'IM-MS couplé à la modélisation moléculaire permettrait d'obtenir des informations importantes pour la compréhension de complexes multiprotéiques ou de réseaux d'interactions difficilement analysables par des techniques classiques de biologie structurale.

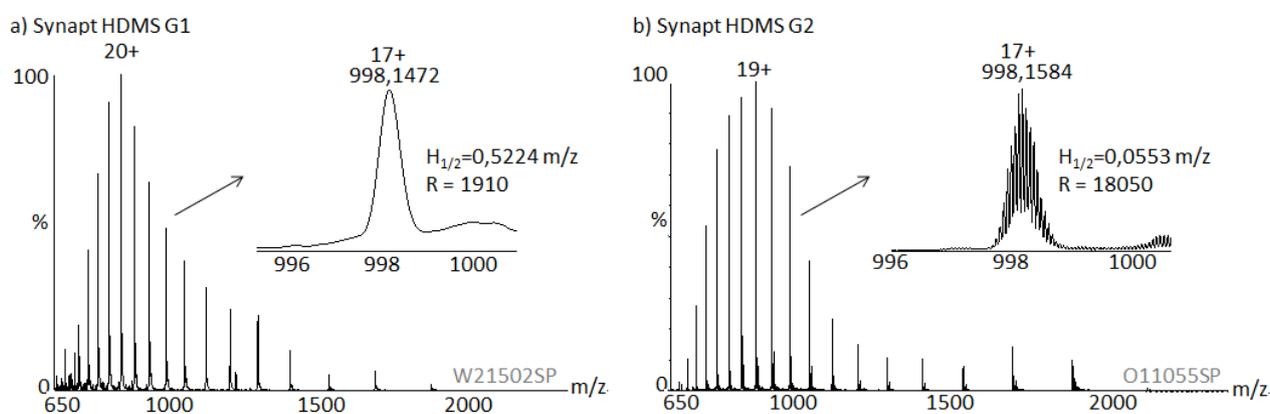


## Chapitre 5 : Comparaisons des données obtenues sur les Synapt G1 et G2 par MS et IM-MS

Afin de pouvoir évaluer les améliorations technologiques réalisées sur le Synapt G2, nous avons souhaité comparer les performances de ces deux instruments en MS et en IM-MS supramoléculaires au travers de différents exemples tels que l'analyse de protéines de bas et de hauts poids moléculaires et l'analyse de changements conformationnels par IM-MS. Cette partie ne traitera pas l'analyse des protéines de très hauts poids moléculaires qui sera abordée dans la dernière partie de ce manuscrit.

### 1 Comparaison des Synapt G1 et G2 par MS supramoléculaire

Afin d'étudier des mélanges encore plus complexes, la résolution, la transmission et la détection des instruments de nouvelle génération ont été améliorées. Lors de l'étude de la myoglobine de cœur de cheval en conditions dénaturantes sur le Synapt HDMS G1, la résolution obtenue est de 1 910 (Figure 32, a) contrairement au Synapt HDMS G2 où la résolution est de 18 050 (Figure 32, b). L'amélioration de la résolution sur le Synapt HDMS G2 se caractérise notamment par l'observation du massif isotopique de l'ion 998 m/z de la myoglobine. Le Synapt HDMS G2 est donc l'instrument de choix lors d'études MS nécessitant des résolutions supérieures à 15 000.



**Figure 32 : Comparaison des résolutions obtenues sur les Synapt HDMS G1 et G2.** Analyse de la myoglobine de cœur de cheval en conditions dénaturantes diluée à 2  $\mu$ M dans une solution eau/acétonitrile/acide formique 50/50/1. a) Synapt HDMS G1 (ionisation en aiguilles nanospray), b) Synapt HDMS G2 (ionisation source Advion).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons comparé la transmission obtenue sur les Synapt HDMS G1 et G2. Il est important de noter que contrairement au Synapt HDMS G1 qui possède uniquement deux modes de transmission : Résolution (mode V) et Haute Résolution (W), le Synapt HDMS G2 possède un mode Sensibilité. Lors de l'étude de protéines par MS supramoléculaire sur le Synapt HDMS G2, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la transmission des ions en mode Sensibilité par rapport au mode Résolution, lorsque la gamme de m/z est comprise entre

4 000 et 22 000 m/z. De plus, comme cela sera développé dans la partie 4 de ce manuscrit, il a pu être mis en évidence lors de l'étude du CsI par MS supramoléculaire que la transmission des ions de hauts rapports m/z est meilleure sur le Synapt HDMS G1 que sur le Synapt HDMS G2.

Il est important de rappeler que les modes de détection du Synapt G1 et G2 HDMS sont différents. Le Synapt G1 est équipé d'un détecteur de type MCP couplé à un digitaliseur TDC, alors que le Synapt G2 est équipé d'un détecteur de type MagnéTOF avec un système de digitalisation de type ADC ou TDC. Cette différence de détecteur et de mode de digitalisation a un impact important sur la qualité des spectres MS obtenus. En effet, il a pu être montré que pour étudier des protéines se trouvant dans la gamme de m/z (4 000-22 000), il est préférable d'utiliser un mode de digitalisation de type TDC où le rapport signal/bruit obtenu est meilleur qu'avec un système ADC.

## 2 Comparaison des Synapt G1 et G2 en IM-MS

### 2.1 Étude d'un système protéine/ligand par IM-MS sur les Synapt G1 et G2 HDMS.

Dans un premier temps, nous avons étudié un système protéine/ligand sur le Synapt G1 HDMS qui n'est pas couplé au système d'injection automatique Advion. Les paramètres d'ionisation (tension capillaire et gaz de nébulisation) et de transmission (tensions d'accélération Vc, Trap Bias, Trap et Transfer CE) ont été optimisés de manière à obtenir un spray stable et une transmission correcte des ions avec les paramètres les moins énergétiques possible.

Par la suite, nous avons optimisé les paramètres de mobilité ionique suivants : débit de gaz d'azote dans la cellule de mobilité, hauteurs et vitesses de vagues. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi de modifier les paramètres de hauteurs et de vitesses de vagues par paire, de manière à obtenir des temps de passage des ions dans la cellule IMS compris dans le deuxième tiers du mobilogramme (7-14 ms). Les deux variables que nous avons suivies sont les différences de temps de passage des ions dans la cellule de mobilité ( $\Delta t_D$ ) et le pouvoir séparateur ( $R_s$ ) (Tableau 4).

**Tableau 4 : Évaluation de la séparation entre la protéine seule et la protéine liée au ligand pour les états de charge 8 et 9+ de la protéine.** Une variation des couleurs allant du bleu foncé à l'orange foncé correspond à une variation des séparations allant des moins bonnes aux meilleures.

Débit d'azote (mL.min <sup>-1</sup> )	25	25	35	35	40
Vitesse de vague (m.s <sup>-1</sup> )	300	400	400	800	800
Hauteur de vague (V)	7	9	11	24	25
$\Delta t_D$ (état de charge 9+)	0,10	0,20	0,10	0,20	0,20
$R_s$ (état de charge 9+)	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20
$\Delta t_D$ (état de charge 8+)	0,40	0,50	0,50	0,30	0,40
$R_s$ (état de charge 8+)	0,20	0,20	0,30	0,30	0,30

Les paramètres utilisés lors de cette étude nous ont permis d'obtenir une meilleure séparation pour l'état de charge 8+ que pour l'état de charge 9+. Cette observation est notamment due au fait que les  $t_D$  des ions 8+ sont plus importants, permettant une meilleure séparation de ces ions. Il est

donc important lorsque l'on réalise une étude par IM-MS de s'intéresser à tous les états de charge majoritaires et d'optimiser la séparation sur le plus petit état de charge. De cette manière, l'ensemble des temps de passage des ions dans la cellule IMS sera dans le deuxième tiers du mobilogramme et les meilleures séparations seront obtenues pour les états de charge les plus faibles.

Ces résultats nous permettent d'autre part de conclure que la gamme de pouvoir séparateur accessible sur le Synapt G1 est comprise entre 0,10 et 0,20 pour l'état de charge 9+ et entre 0,20 et 0,30 pour l'état de charge 8+. De plus, il est important de rappeler que les meilleures séparations IMS sont obtenues pour les meilleurs couples ( $\Delta t_D$ ,  $R_s$ ). Dans le cas de cette étude, il s'agit donc de la condition suivante :  $WV : 800 \text{ m.s}^{-1}$ ,  $WH : 25 \text{ V}$  et  $Q_{N_2} : 40 \text{ mL.min}^{-1}$  dans le cas de cette étude.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié ce même système sur le Synapt G2 (Tableau 5).

**Tableau 5 : Évaluation de la séparation entre la protéine seule et la protéine liée au ligand pour les états de charge 8 et 9+ de la protéine.** Une variation des couleurs allant du bleu foncé à au rouge correspond à une variation des séparations allant des moins bonnes aux meilleures.

Débit d'azote ( $\text{mL.min}^{-1}$ )	70	50	50	40	33	30
Vitesse de vague ( $\text{m.s}^{-1}$ )	400	600	800	1350	1400	1200
Hauteur de vague (V)	20	20	20	40	40	30
(état de charge 9+)	0,10	0,20	0,20	0,30	0,30	0,40
$R_s$ (état de charge 9+)	0,10	0,20	0,20	0,50	0,40	0,60
(état de charge 8+)	0,10	0,30	0,40	0,40	0,60	0,60
$R_s$ (état de charge 8+)	0,20	0,30	0,50	0,60	0,60	0,70

Cette étude nous a permis de montrer que la gamme de  $R_s$  accessible sur le Synapt G2 HDMS est comprise entre 0,10 et 0,60 pour les états de charge 8+ et 9+. Cette gamme étant donc deux fois plus étendue que celle observée sur le Synpat G1 HDMS. De plus, dans la meilleure condition expérimentale nous avons obtenu un couple de valeurs ( $\Delta t_D$ ,  $R_s$ ) de (0,60, 0,70) pour l'état de charge 8+ montrant les améliorations obtenues en IMS sur l'instrument de nouvelle génération. Ces meilleurs  $R_s$  ont pu être obtenus en augmentant la vitesse et la hauteur des vagues sur le Synapt G2 HDMS. Les débits de gaz d'azote ne peuvent être comparés entre les deux instruments, car la pression dans la cellule IMS sur le Synapt G2 ne dépend pas uniquement du débit de gaz en azote.

Une des différences importantes entre les mobilités observées sur les Synapt G1 et G2 est la largeur des pics à mi-hauteur. En effet, alors que sur le Synapt G2, celles-ci sont en moyenne inférieures à 1 ms, celles-ci sont supérieures à 1 ms sur le Synapt G1.

Les modifications apportées au Synapt G2 ont donc permis d'obtenir des pics plus fins et d'améliorer la séparation des ions dans la cellule de mobilité. Les applications de l'IM-MS vont donc pouvoir être étendues à l'étude de changements conformationnels plus fins jusqu'alors non accessibles par IM-MS.

## 2.2 Comparaison des séparations IM-MS sur les Synapt G1 et G2 HDMS lors de l'étude de peptides isobares ou de masses très proches

### a. Étude de peptides possédants des modifications post-traductionnels. (PTM)

Malgré la multiplicité des stratégies analytiques et les importants développements instrumentaux réalisés ces dernières années en MS, notamment au niveau de la sensibilité de détection, la caractérisation fine et la localisation de PTM restent encore délicates<sup>269-272</sup>. Toutefois, ces PTM jouent des rôles importants au niveau cellulaire notamment lors de la division cellulaire, de la transduction du signal ou de la régulation fine des voies métaboliques<sup>273</sup>. Le développement de méthodes analytiques permettant de les caractériser est donc indispensable.

Les difficultés liées à l'étude de ces PTM proviennent de la faible abondance de ces protéines modifiées dans une cellule, des problèmes de digestion à proximité des PTM, de la faible efficacité d'ionisation des peptides modifiés<sup>274, 275</sup> et de la perte des PTM par CID<sup>276</sup>. De plus, la localisation des PTM est difficile en présence d'un mélange de peptides modifiés<sup>277-280</sup>. L'identification de ces modifications par MS devient donc un véritable défi dans le cas de peptides isobares (peptides de mêmes masses) ou de masses très proches.

### b. Objectif de l'étude

Nous avons souhaité évaluer le potentiel du couplage IM-MS pour la caractérisation et la localisation de PTM sur des peptides isobares et de masses très proches sur les Synapt G1 et G2.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de peptides phosphorylés isobares (DpSSEEKFLR, DSpSSEEKFLR : 1 189.524 Da) ou à des peptides tri-méthylés (TARK(Me<sub>3</sub>)pSTGGKAPRC : 1 453.722 Da) ou acétylés (TARK(Ac)pSTGGKAPRC : 1 453.686 Da) de masses très proches par IM-MS-MS.

### c. Caractérisation fine par couplage IM-MS de peptides possédant différentes PTM

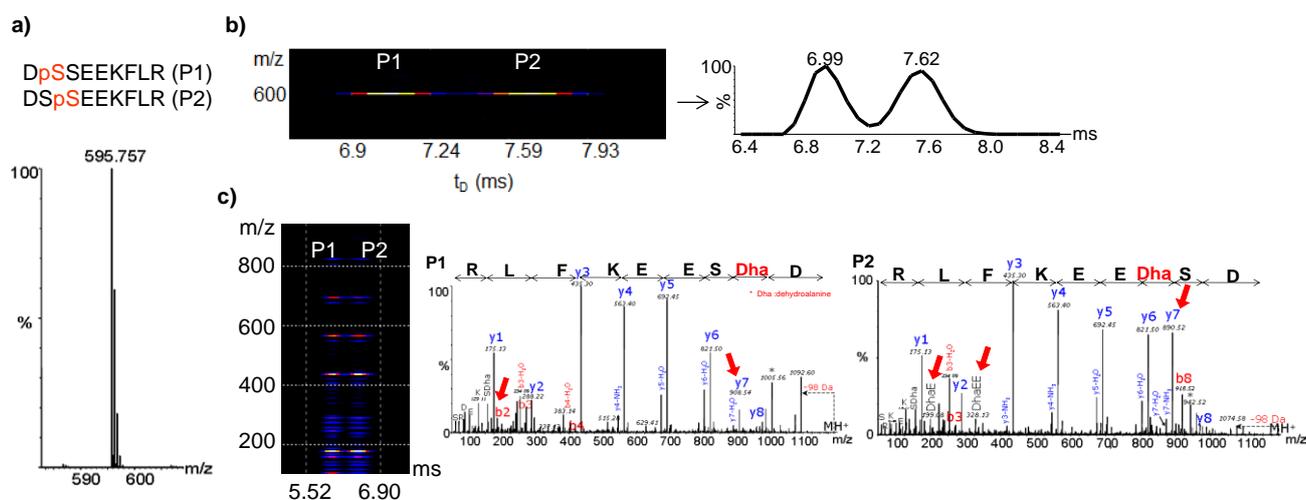
#### - Analyse des peptides isobares phosphorylés

L'analyse des peptides phosphorylés (DpSSEEKFLR et DSpSSEEKFLR) par MS ne nous a pas permis de les séparer à l'aide du Synapt HDMS G2, même avec une résolution en masse de 19 000 (Figure 33, a).

Au contraire, l'optimisation de paramètres IM-MS nous a permis d'obtenir une séparation des 2 peptides par mobilité ionique, le peptide DpSSEEKFLR (P1) a un temps de passage dans la cellule de mobilité de 6.99 ms alors que le temps de passage du peptide DSpSSEEKFLR (P2) est de 7.62 ms (Figure 33, b). La position de la phosphorylation induit donc un changement conformationnel en

phase gazeuse. Des peptides présentant des états de phosphorylation différents pourront donc être séparés par mobilité ionique (Figure 35, a).

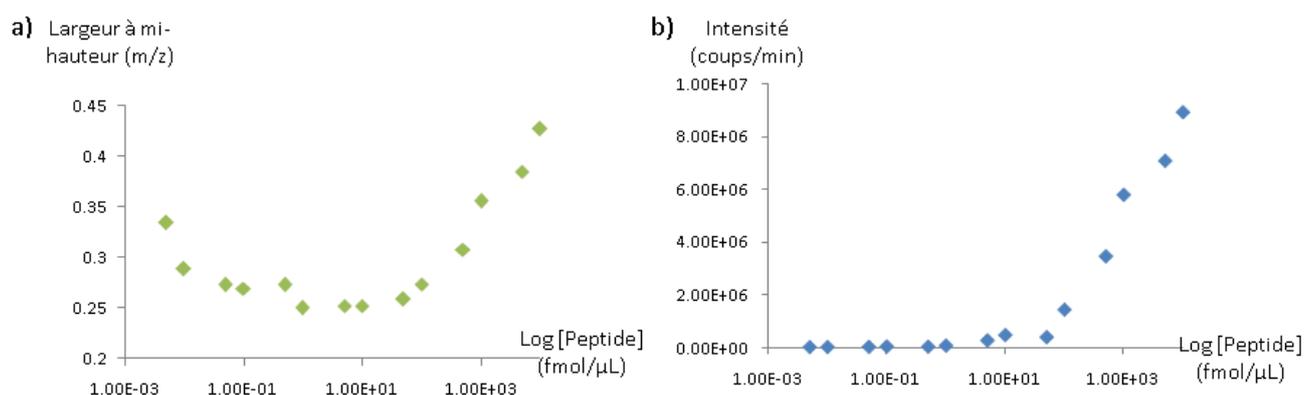
Les peptides isobares ainsi séparés par IMS ont été soumis à des énergies de collision croissantes dans la cellule Transfer du Synapt G2. Ainsi, nous avons pu obtenir des spectres de fragmentation de chacun des peptides séparés par IMS pour une tension d'accélération de 40V (Figure 33, c). Les rapports m/z observés pour l'ion y7 nous ont permis de caractériser les deux peptides isobares en mélange. En effet, l'ion y7 du peptide 1 est observé à 908.54 m/z alors que celui du peptide 2 est observé à 890.52 m/z. De plus, d'autres ions permettent de confirmer l'identification du peptide 2 tels que les ions Dha-E (199.08 m/z) et Dha-EE (328.13 m/z).



**Figure 33 : Caractérisation de peptides isobares phosphorylés par IM/MS/MS.** a) analyse des peptides isobares par MS en conditions dénaturantes (1 pmol/ $\mu$ L). b) séparation des peptides isobares par IM-MS (à gauche : driftscope ; à droite : mobilogramme) ; c) fragmentation des peptides isolés par IM-MS dans la cellule Transfer (Transfer CE = 40 V) (à gauche : driftscope ; à droite : spectre MS/MS).

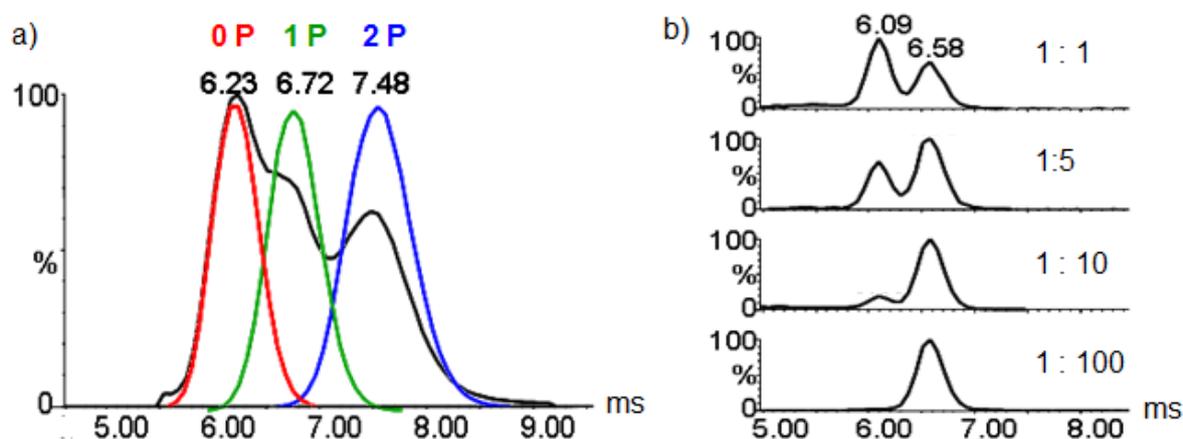
L'analyse de ces peptides isobares nous a permis de montrer que le couplage IM-MS permettait de simplifier la caractérisation des spectres de masse grâce à l'obtention de spectres de fragmentation pour chacun des peptides.

Au cours de cette étude, nous avons souhaité étudier la sensibilité de détection du Synapt G2 HDMS lors d'analyses IM-MS. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que pour des concentrations en peptides de 1 et 50 fmol/ $\mu$ L, la largeur à mi-hauteur des pics de mobilité est identique et égale à 0.25 m/z. Par contre, pour des concentrations comprises entre 0.1 et 10 pmol/ $\mu$ L, la largeur des pics augmente en fonction de la concentration (Figure 34, a). Il est important de noter que pour des concentrations inférieures à 1 fmol/ $\mu$ L, la largeur des pics de mobilité augmente à nouveau et que le rapport signal sur bruit diminue, suggérant que la limite de détection en IM-MS est atteinte à partir de cette concentration (Figure 34, b).



**Figure 34 :** Effet de la concentration en peptides sur la largeur à mi-hauteur des pics de mobilité (a) et sur l'intensité du signal en masse (b).

Afin d'évaluer la gamme dynamique en IM-MS, nous avons analysé ces mêmes peptides isobares par IM-MS à des ratios identiques ou différents (Figure 35).



**Figure 35 :** Gamme dynamique en IM-MS a) Séparation par mobilité ionique de peptides 0, 1 et 2 fois phosphorylés (0P, 1P et 2P) analysés en concentrations équimolaires. Le mobilogramme noir correspond à la mobilité des 3 formes de phosphorylation. L'intensité des pics diminue lorsque le nombre de phosphorylations augmente. b) Analyse d'un mélange de peptides isobares une fois phosphorylé selon différents ratios. Le peptide de référence étant analysé à 10 fmol/μL.

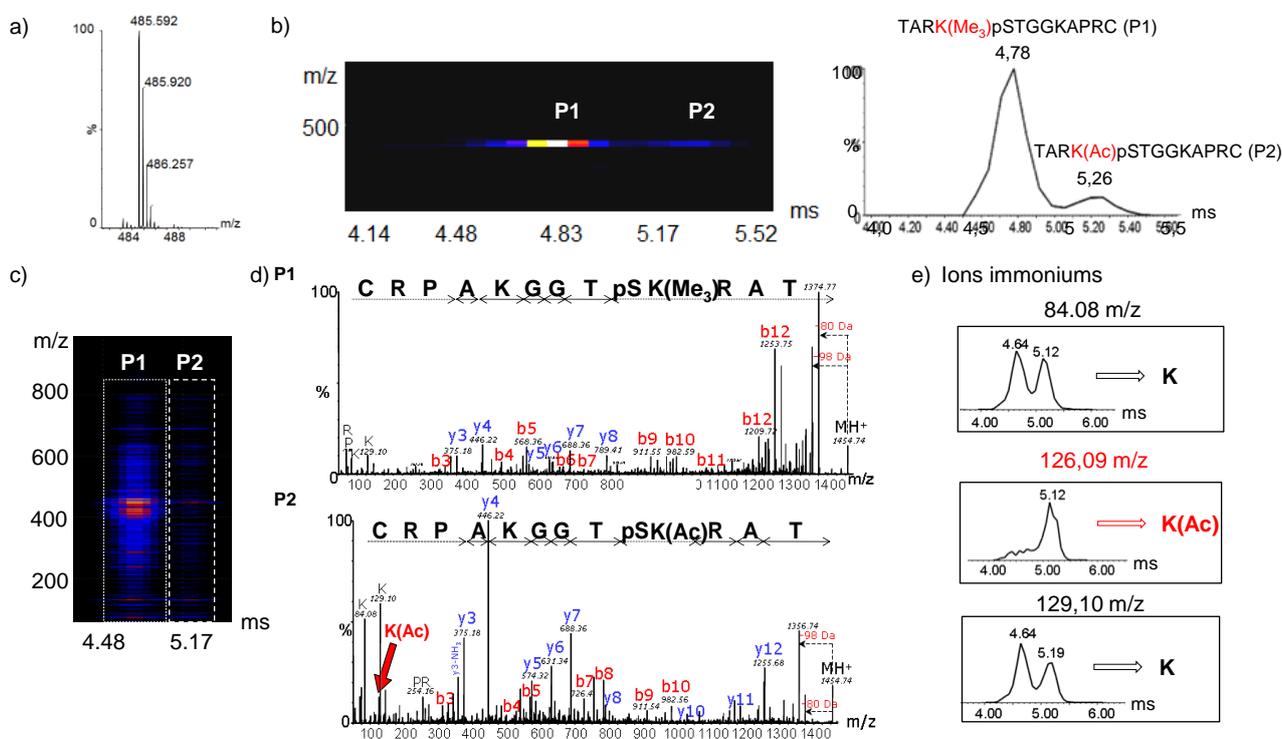
L'analyse par IM-MS d'un mélange équimolaire des 3 peptides (0, 1 et 2 fois phosphorylés), nous a permis de les séparer et de mettre en évidence une diminution de l'intensité des pics de mobilité lorsque le nombre de phosphorylations augmente (Figure 35, a). La faible efficacité d'ionisation des peptides phosphorylés en MS est donc retrouvée lors des analyses par IM-MS.

Nous avons aussi pu mettre en évidence que l'intensité des pics de mobilité était liée à la concentration en peptides à analyser (Figure 35, b). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence qu'il est possible de différencier par IM-MS des peptides isobares 1 fois phosphorylés lorsque le ratio est au maximum de 1 pour 10 à 10 fmol/μL.

Ces différentes contraintes devront être prises en compte lors de l'analyse par IM-MS de peptides possédant des PTM.

### - Analyse des peptides de masses très proches tri-méthylés ou acétylés

De même, nous avons étudié des peptides de masses très proches présentant différentes modifications post-traductionnelles. L'analyse des peptides TARK(Me<sub>3</sub>)pSTGGKAPRC (1 453.722 Da) et TARK(Ac)pSTGGKAPRC (1 453.686 m/z) par MS ne nous a pas permis de les séparer en fonction de leur rapport m/z malgré une résolution en masse de 19 000 (Figure 36, a). Au contraire, ces peptides ont pu être séparés par IM-MS comme le montre la Figure 36, b. Comme précédemment, après avoir séparé ces deux peptides par IM-MS, nous avons été capables de séquencer chacun des peptides individuellement (Figure 36, c et d). La mise en évidence de l'ion à 126 m/z caractéristique des lysines acétylés<sup>281</sup>, nous a permis d'identifier le peptide 2. Les mobilogrammes extraits des différents ions immoniums des lysines, nous ont permis de confirmer que cet ion à 126 m/z est bien caractéristique de la lysine acétylée (Figure 36, e).

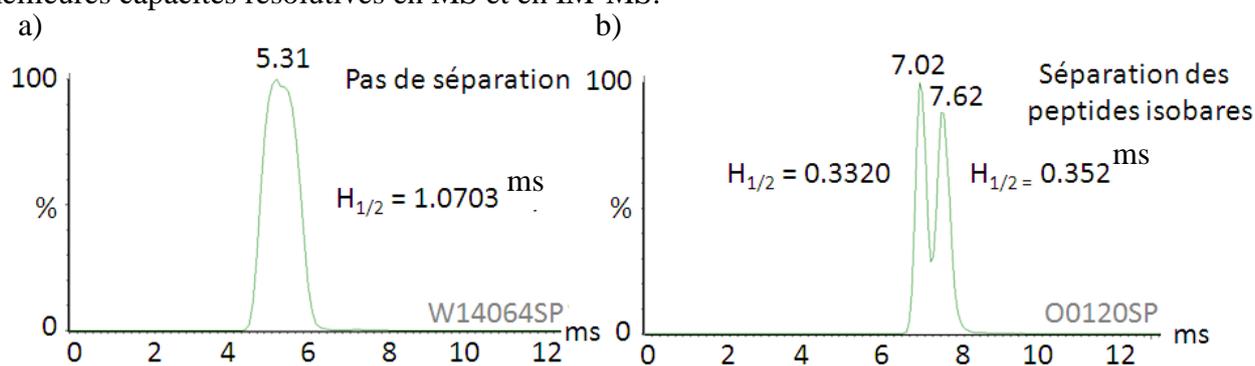


**Figure 36 : Caractérisation de peptides de masses très proches par IM-MS/MS.** a) analyse des peptides TARK(Me<sub>3</sub>)pSTGGKAPRC et TARK(Ac)pSTGGKAPRC par MS en conditions dénaturantes (1 pmol/μL). b) séparation des peptides par IM-MS (à gauche : driftscope ; à droite : mobilogramme) ; c) Driftscope de fragmentation des peptides isolés par IM-MS dans la cellule Transfer (Transfer CE = 31 V), d) Spectre MS/MS des peptides tri-méthylés et acétylés, e) mobilogrammes extraits des ions immoniums des lysines 4 et 9.

### - Comparaison des résolutions en mobilité ionique du Synapt G1 et G2

Afin de pouvoir évaluer l'amélioration de la séparation en IM-MS entre les Synapt G1 et G2, nous avons comparé les séparations de ces peptides isobares ou de masses très proches sur ces deux instruments (Figure 37). Alors que ces peptides peuvent être séparés sur l'instrument de nouvelle génération (Figure 37, b), ces mêmes peptides ne peuvent être séparés sur le Synapt G1 (Figure 37,

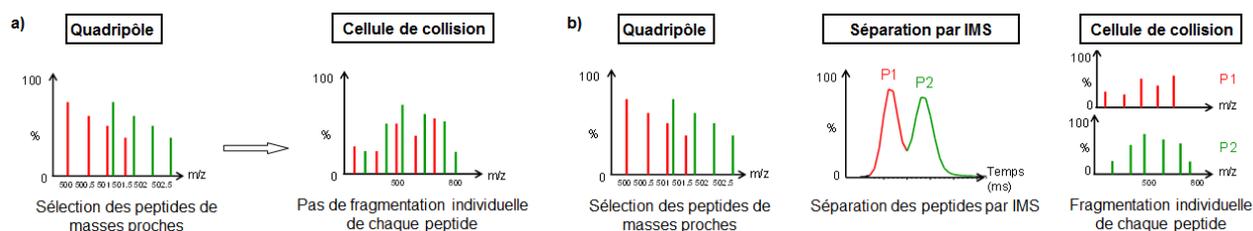
a). Par conséquent, l'analyse de mélanges complexes doit être réalisée sur le Synapt G2 qui offre de meilleures capacités résolutive en MS et en IM-MS.



**Figure 37 : Analyse d'un mélange de peptides isobares sur les Synapt G1 (à gauche) et G2 (à droite) par IM-MS.** a)  $V_c = 30V$ ,  $P_{IMS} = 0.66$  mbar, Trap CE = 6V, Transfer CE = 10V, Bias = 10V WV = 600 m/s, WH = 12 V. b)  $V_c = 20V$ ,  $P_{IMS} = 2.3$  mbar, Trap CE = 6V, Transfer CE = 0V, Bias = 33V WV = 400 m/s, WH = 18 V.

## 2.3 Conclusion

Les deux exemples présentés dans ce paragraphe permettent de montrer le potentiel du couplage IM-MS pour la séparation et la caractérisation de peptides isobares ou de masses très proches, possédant ou non des modifications post-traductionnelles. L'utilisation de la mobilité ionique permet d'apporter un niveau de séparation supplémentaire permettant d'obtenir des spectres MS/MS de haute qualité. En effet, lors de l'étude de peptides de masses très proches, ceux-ci ne peuvent être isolés dans le quadripôle conduisant après fragmentation à l'obtention d'un spectre de masse complexe où les fragments des deux peptides sont mélangés (Figure 38, a).



**Figure 38 : Réponse du couplage IM-MS pour la caractérisation de peptides isobares ou de masses très proches (1-3 Da).** Analyse MS/MS de peptides de masses très proches en absence (a) ou avec (b) une séparation par IMS.

La séparation par IM-MS des peptides isolés dans le quadripôle permet, après fragmentation dans la cellule de collision Transfer CE, d'obtenir un spectre de masse pour chacun des peptides simplifiant la caractérisation de ces derniers (Figure 38, b).

L'utilisation de la séparation par mobilité ionique lors d'analyses de mélanges complexes par LC-MS-MS présente donc un fort potentiel analytique notamment dans le cas de mélanges complexes.

## 2.4 Valorisation

---

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

### Communications orales :

- **Petiot S**, Diemer H, Van Dorsselaer A et Sanglier-Cianféran S. **Characterization of isobaric peptides using ion mobility mass spectrometry (IM-MS)**. *Congrès de la SFEAP*. 6-8 Septembre 2010, Marseille.
- **Petiot S**, Diemer H, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S. **Application of ion mobility-MS : from peptide to large protein analysis**. *Réunion des utilisateurs Waters*. 7 décembre 2010, Paris.
- **Petiot S**, Diemer H, Van Dorsselaer A et Sanglier-Cianféran S. **Characterization of isobaric/close MWs peptides with different post-translational modifications using ion mobility-mass spectrometry (IM-MS)**. *Journées MassProt'INRA*. 9 Février 2011, Montpellier.

### Communications par affiche :

- **Petiot S**, Diemer H, Van Dorsselaer A et Sanglier-Cianféran S. **Apport du couplage IM-MS pour la caractérisation de peptides isobares** *Congrès de la SFEAP*. 6-8 Septembre 2010, Marseille. *Congrès de la SFSM*. 13-16 septembre 2010, Clermond-Ferrand.

## Conclusion de cette partie

C'est la maîtrise des différentes étapes d'une analyse MS ou IM-MS supramoléculaires qui permet d'obtenir des informations fiables.

**La préparation des échantillons** est une étape cruciale qui permet d'éliminer les sels incompatibles avec l'ESI-MS. Le tampon utilisé et la méthode de dessalage doivent être choisis de manière à préserver l'intégrité des complexes non-covalents en phase gazeuse.

**L'optimisation des paramètres instrumentaux** est également indispensable. En effet, l'énergie transmise aux ions dans l'instrument lors des analyses MS et IM-MS doit être finement contrôlée pour éviter toute activation des ions en phase gazeuse, tout en conservant une désolvatation et une transmission correctes des ions. Les différentes expériences réalisées au cours de ce travail de thèse nous ont permis de développer une nouvelle stratégie d'optimisation en IM-MS.

Les développements expérimentaux et instrumentaux réalisés ont permis d'obtenir de nombreuses informations par MS (stœchiométrie, spécificité et affinité d'interactions) et par IM-MS (suivi de changements conformationnels, mise en évidence d'hétérogénéité conformationnelle). Afin de s'assurer de la validité de ces informations, des expériences de contrôle doivent être réalisées.

Le respect de ces différentes étapes a permis de comparer des instruments de différentes générations : les Synapt HDMS G1 et G2. Nous avons ainsi pu montrer que le Synapt G2 permettait d'obtenir une meilleure résolution en MS et en IM-MS par rapport au Synapt G1. Les possibilités offertes par le Synapt HDMS G2 seront donc principalement développées dans ce manuscrit.

## *Partie 3: De la MS à l'IM-MS supramoléculaire pour la caractérisation de systèmes protéine/ligand*

---

Cette partie est consacrée à l'étude des interactions protéine/ligand par MS supramoléculaire. Différents exemples faisant intervenir des ligands de natures différentes (acides nucléiques, métaux et molécules chimiques) seront développés. L'apport du couplage IM-MS pour la caractérisation fine de ces interactions sera ensuite détaillé.

**Chapitre 1: Étude des interactions d'une protéine à doigts de zinc : interactions P1/Zn<sup>2+</sup>**

**Chapitre 2: Étude d'un complexe protéine/acides nucléiques : le système TGT/ARN**

**Chapitre 3: Optimisation des paramètres instrumentaux du couplage IM-MS pour la détection de faibles changements conformationnels : étude du système Bcl-xL/ABT-737**

**Chapitre 4: Caractérisation fine par MS et IM-MS supramoléculaires d'un système protéine/ligands : exemple du système PDF1B/Ligands**



## Chapitre 1 : Étude des interactions d'une protéine à doigts de zinc : interactions P1/Zn<sup>2+</sup>

---

Les interactions protéine/ions métalliques jouent un rôle important en biologie, car un tiers des protéines nécessite un substituant métallique pour assurer leurs fonctions biologiques<sup>282</sup>. La MS joue un rôle important lors de l'analyse de ces interactions, car elle permet d'obtenir des informations concernant, les séquences en acides aminés des protéines liant des métaux, mais aussi de déterminer les sites probables de fixation de ces derniers<sup>283</sup>. En parallèle, une analyse par MS supramoléculaire permet de déterminer les stœchiométries et spécificités d'interaction entre le métal et la protéine<sup>284, 285</sup>. Toutefois, actuellement, aucune étude par MS n'a permis de caractériser de manière très précise les sites de fixation des atomes de zinc sur une protéine à doigts de zinc.

Cette partie sera donc consacrée au développement d'une méthode d'analyse par MS pour la caractérisation fine d'une protéine à doigts de zinc : la protéine P1, une protéine exprimée par le virus de la panachure jaune du riz (RYMV).

### 1 Contexte biologique de l'étude de la protéine P1

---

Le RYMV, du genre *Sobemovirus*, est présent sur tous les continents. Il est endémique en Afrique où il infecte principalement deux espèces de riz : *Oryza sativa* et *Oryza glaberrima*<sup>286</sup>. Parmi les 5 protéines du RYMV, la plus étudiée est la protéine P1 qui joue un rôle important dans la pathogénicité du virus en affectant le développement de la plante<sup>287</sup>. Il a ainsi été montré que cette protéine était nécessaire à la réplication du virus, mais aussi à sa migration de cellules en cellules<sup>288</sup>. Plus récemment, il a été montré que la protéine P1 était capable d'activer<sup>287</sup> ou de supprimer les mécanismes de défense de la plante en piégeant des ARN interférents<sup>289</sup>. La protéine P1 régulerait la propagation du virus dans la plante en contrôlant le développement de la plante et celui du virus.

La protéine P1 (MW = 17 929 Da) (Figure 1), appartenant à la famille des suppresseurs viraux des ARN interférents (VSR), est une protéine possédant deux régions riches en cystéines, extrêmement conservées au sein de cette famille protéique, et ayant un rôle fonctionnel<sup>289</sup>. La plupart des cystéines conservées dans une famille protéique ont un rôle structural ou régulateur et peuvent être impliquées dans la formation de ponts disulfures ou dans la liaison à un métal. De plus, elles peuvent réagir face à des modifications chimiques ou dans des réactions rédox<sup>290-292</sup>. Toutefois, le rôle des cystéines de la famille des protéines VSR riches en cystéines n'a pas été étudié jusqu'à présent.

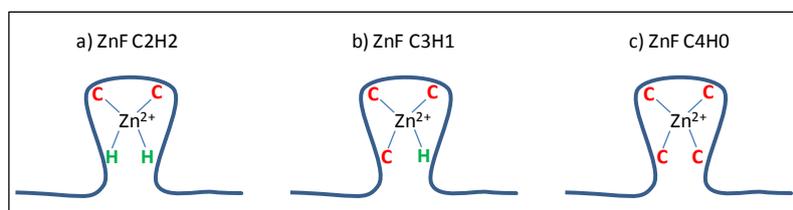
Séquence de la protéine P1:

1	MTRLEVLIRP	TEQTAAKANA	VGYTHALTWV	WHSQTWDVDS	VRDPSLRADF	NPEKVGWVSV
61	SFACTQCTAH	YYTSEQVKYF	TNIPPVHFDV	VCADCERSVQ	LDDEIDREHQ	ERNAEISACN
121	ARALSEGRPA	SLVYLSRDAC	DIPEHSGRCR	FVKYLNF		

**Figure 1 : Séquence de la protéine P1 (157 acides aminés).** Les 7 cystéines et les 6 histidines présentes dans la séquence de la protéine P1 ont respectivement été colorées en rouge et en vert.

La protéine P1 a été proposée comme étant une protéine à doigts de zinc (ZnF)<sup>288</sup>, toutefois, aucune preuve expérimentale de la fixation du zinc n'a été rapportée.

La première partie de cette étude sera donc consacrée à la validation expérimentale de cette hypothèse par MS moléculaire et supramoléculaire. Dans le cas des protéines ZnF, le métal peut avoir un rôle structural<sup>293</sup> et/ou fonctionnel<sup>294-296</sup>. Il se lie par tétra-coordination aux protéines, le plus souvent grâce aux groupements thiols des cystéines ou imidazoles des histidines selon un modèle  $Zn(Cys)_{4-x}(His)_x$  ( $x=0, 1$  ou  $2$ ) (Figure 2)<sup>291, 297, 298</sup>.



**Figure 2 : Représentation schématique des différents types de doigts de zinc.**

Dans une seconde partie, nous développerons une approche permettant de caractériser finement les ZnF de la protéine P1. Récemment, ce site  $Zn(Cys)_{4-x}(His)_x$  a été proposé comme régulateur biologique de l'activité rédox dans certains processus cellulaires<sup>299-301</sup>. L'oxydation des cystéines des ZnF par des espèces réactives de l'oxygène (ERO) permettrait donc de déclencher une réponse à un stress oxydatif<sup>302</sup>. Étant donné que l'infection d'une plante par un virus entraîne généralement un stress chez l'hôte, cette propriété des ZnF pourrait s'appliquer dans le cas de la protéine P1 du RYMV. Afin de mieux comprendre l'implication des ZnF dans les mécanismes de défense contre un stress oxydatif, il est important de caractériser les domaines de liaison au zinc de ces protéines.

## 2 Objectifs de l'étude

Dans ce contexte, nous avons initié une collaboration avec l'équipe des Dr. Christophe Brugidou et Florence Vignols (IRD Montpellier, France) afin de caractériser finement les régions riches en cystéines de la protéine P1 du RYMV. Dans un premier temps, nous avons déterminé par MS supramoléculaire la stœchiométrie d'interaction de cette protéine avec le zinc ainsi que la réversibilité de cette fixation. Afin de compléter cette étude, nous avons étudié l'effet de la présence des atomes de zinc sur la conformation de cette protéine par mobilité ionique. Dans un second temps,

des analyses MS supramoléculaires ont été combinées à des approches protéomiques pour déterminer les cystéines impliquées dans la fixation des atomes de zinc. Enfin, nous avons suivi l'effet d'un stress oxydant sur l'oligomérisation de la protéine P1 et sur la formation de ponts disulfures.

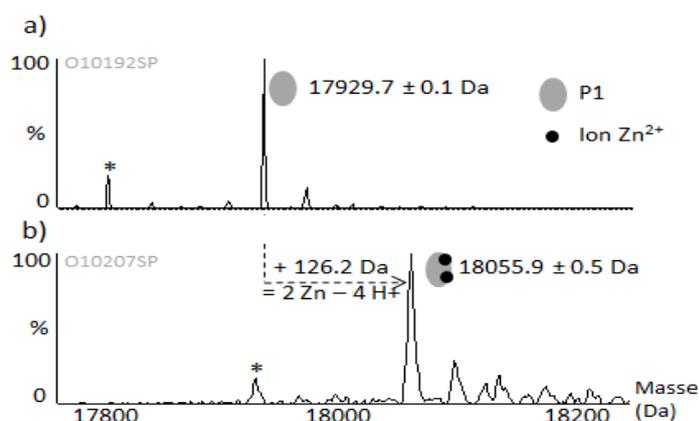
### 3 Stratégie analytique et résultats obtenus

#### 3.1 Caractérisation des interactions P1/Zn par MS supramoléculaire et par IM-MS

##### 3.1.1 Détermination de la stœchiométrie d'interaction entre le zinc et la protéine P1

###### a. Mise en évidence de la présence de zinc par MS supramoléculaire

Afin de valider l'hypothèse proposée par Bonneau *et al.*,<sup>288</sup> nous avons analysé la protéine P1 par MS supramoléculaire. Une analyse de la protéine P1 réalisée en conditions dénaturantes nous a permis de vérifier la masse de la protéine P1 ( $M_{\text{mesurée}} = 17\,929.7 \pm 0.1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 17\,929.0$  Da). L'analyse réalisée en conditions natives, nous a ensuite permis de mettre en évidence la fixation de deux molécules de zinc par protéine P1 ( $M_{\text{mesurée}} = 18\,056 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 17\,929 + (2 \times 63.5) = 18\,056$  Da) (Figure 3). La fixation des deux molécules de zinc ( $2 \times 65.5$  Da) a eu pour conséquence la perte des atomes d'hydrogène (4 Da) conduisant à une différence de masse entre la forme dénaturée et la forme native de la protéine de  $2 \times 63.5$  Da soit 127 Da.

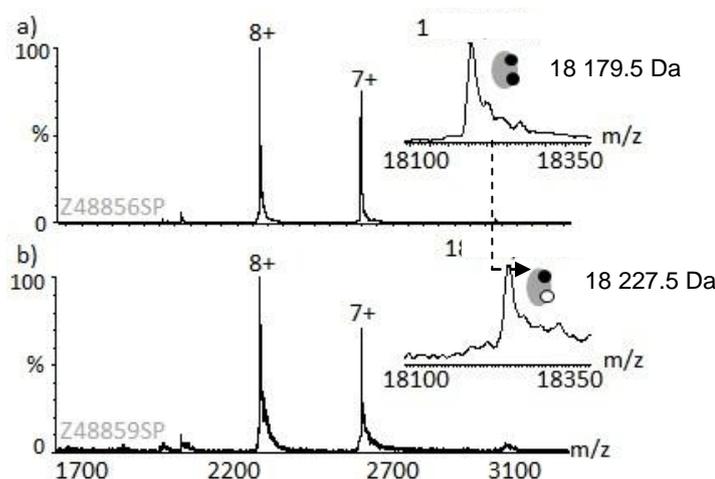


**Figure 3: Caractérisation de la protéine P1 par MS supramoléculaire.** Spectres de masse déconvolués de la protéine P1 dessalée 2 fois par filtration sur gel (Zeba) dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  50 mM pH 8. a) en conditions dénaturantes à  $2\ \mu\text{M}$  dans un mélange eau/acétonitrile/acide 50/50/1 ( $V_c=40\text{V}$ ,  $P_i=2\text{mbar}$ ), b) en conditions natives à  $5\ \mu\text{M}$  dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  50 mM pH 8. La différence de masse entre les conditions dénaturantes et natives correspond à la fixation de 2 atomes de zinc (126,2 Da). L'astérisque (\*) indique la présence de protéine P1 sans la méthionine N-terminale (-131 Da) ( $V_c = 100\text{V}$ ,  $P_i = 6\text{mbar}$ ).

###### b. Déplacement du zinc par un autre ion divalent : le Cadmium

Un autre moyen de mettre en évidence la présence de doigts de zinc et de vérifier la spécificité des atomes de zinc est l'utilisation de cadmium. En effet, ce métal divalent est capable de remplacer les ions zinc des protéines à doigts de zinc<sup>285, 303, 304</sup>. Nous avons donc réalisé un test de compétition avec de l'acétate de cadmium (Figure 4). Cette expérience a été réalisée sur une protéine P1,

légèrement modifiée en N-terminale lors d'optimisation de la production de cette protéine, et dont la masse en conditions natives est de 18 180 Da (présence de 2 atomes de zinc fixés). Cette expérience nous a permis de mettre en évidence le déplacement du pic correspondant à la protéine P1 ( $M_{\text{mesurée}} = 18\,180 \pm 1$  Da) de 47 Da ( $M_{\text{mesurée}} = 18\,227 \pm 1$  Da) (Figure 4). Cette différence de masse correspond à la fixation d'un atome de cadmium (112.5 Da) à la place d'un atome de zinc (65.5 Da) cette méthode nous a permis d'obtenir majoritairement la protéine avec un seul atome de cadmium. Pour des concentrations plus élevées en cadmium, nous n'avons pas pu obtenir de spectres interprétables.



**Figure 4: Déplacement du zinc présent sur la protéine P1 par du cadmium.** a) analyse de la protéine P1 dessalée par 2 cycles de filtration sur gel (Zeba) en conditions natives à 10  $\mu\text{M}$  dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  50 mM pH 8 ou b) après ajout de 0.5  $\mu\text{M}$  d'acétate de cadmium. ( $\bullet$  et  $\circ$  correspondent respectivement à la protéine avec deux atomes de zinc et à la protéine avec un atome de zinc et un atome de cadmium).

### c. Étude des ions métalliques constitutifs de la protéine P1 par ICP-MS

Étant donné que nous n'avons pas pu mettre clairement en évidence la présence de deux atomes de zinc grâce à l'acétate de cadmium, une analyse par spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS)<sup>305</sup> a été réalisée par le Dr. Bertrand Chaumande. Cette analyse, nous a permis de mettre en évidence une stœchiométrie de 2 zinks par protéine confirmant que le deuxième atome fixé sur la protéine est bien un atome de zinc et non un autre ion métallique de masse très proche comme le cuivre.

#### 3.1.2 Étude de la réversibilité de la fixation du zinc sur la protéine P1

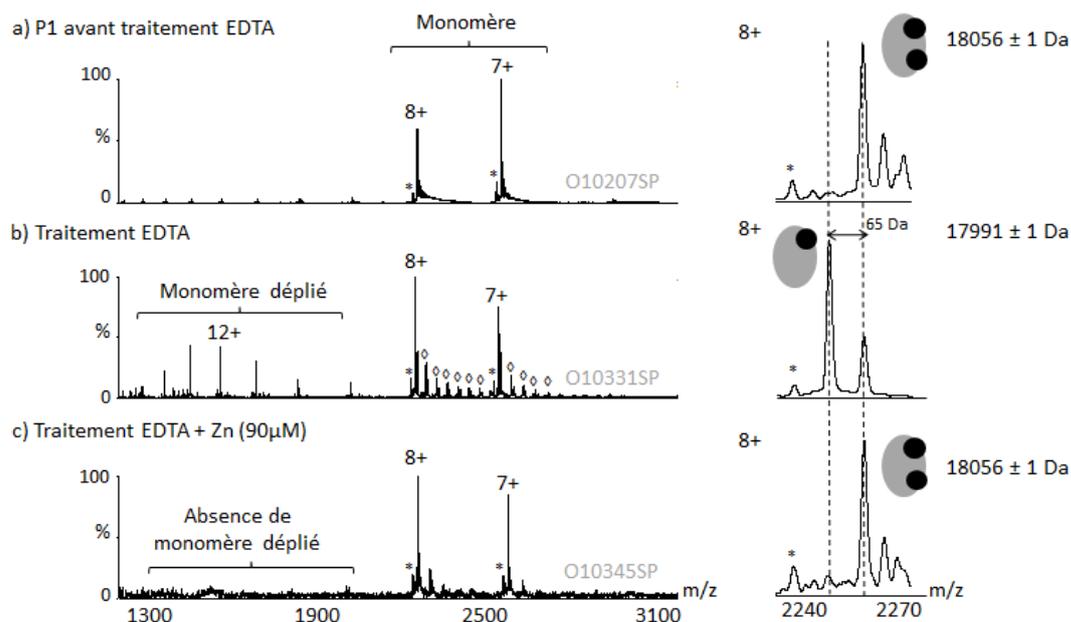
Afin de caractériser plus finement la fonction de ces doigts de zinc de la protéine P1, nous avons souhaité évaluer la réversibilité de la fixation du zinc.

##### a. Traitement par un chélateur des ions divalents : l'EDTA

Dans un premier temps, nous avons étudié la chélation du zinc par un chélateur des ions divalents : l'EDTA. Plusieurs optimisations ont été nécessaires pour permettre cette analyse. En effet, l'incubation de la protéine avec l'EDTA à température ambiante a conduit à la précipitation de

la protéine P1, de même que l'incubation de la protéine dessalée avec l'EDTA à 4°C. L'ensemble de nos optimisations nous a permis de conclure que la chélation des ions divalents  $Zn^{2+}$  par l'EDTA devait être réalisée sur un échantillon non dessalé pendant une nuit à 4°C.

La concentration en EDTA utilisée a dû être optimisée en fonction du tampon et du temps de stockage de la protéine, pour permettre la chélation des ions  $Zn^{2+}$ . L'analyse de l'échantillon traité à l'EDTA nous a permis de mettre en évidence de façon majoritaire la perte d'un atome de zinc ( $M_{mesurée} = 17\,991 \pm 1$  Da,  $M_{Théorique} = 17\,991$  Da) (Figure 5, b).



**Figure 5: Réversibilité de la fixation du zinc sur la protéine P1.** a) analyse de la protéine P1 dessalée en conditions natives à 5  $\mu$ M dans un tampon  $AcNH_4$  50 mM pH 8, b) protéine P1 50  $\mu$ M traitée avec 20 mM EDTA pendant une nuit à 4 °C puis dessalée et infusée à 5  $\mu$ M seule ou c) après addition de 90  $\mu$ M d'acétate de zinc. Les spectres de droite correspondent à un agrandissement de l'état de charge 8+ ( $V_c = 100$ V,  $P_i = 6$ mbar). L'astérisque (\*) indique la présence de protéine P1 sans la méthionine N-terminale (-131 Da). Le symbole ( $\diamond$ ) correspond à des adduits d'EDTA (+291 Da) fixée sur la protéine P1.

Contrairement à la protéine P1 détectée sous 2 états de charge (7 et 8+) (Figure 5, a), la protéine P1 ayant un seul atome de zinc affiche une distribution plus large des états de charge. Les états de charge minoritaires (12 et 13+) observés dans la gamme des m/z (1 300-1 500) sont plus faibles que ceux observés en conditions dénaturantes suggérant la présence d'une structure partiellement dépliée de la protéine en l'absence d'un atome de zinc (Figure 5, b). En effet, étant donné que l'ionisation des protéines s'effectue sur les résidus protonables accessibles et que l'accessibilité d'un site est fonction de l'état de repliement d'une protéine, alors l'analyse de la distribution des états de charge permet d'obtenir une information concernant la conformation des protéines<sup>246-250</sup>.

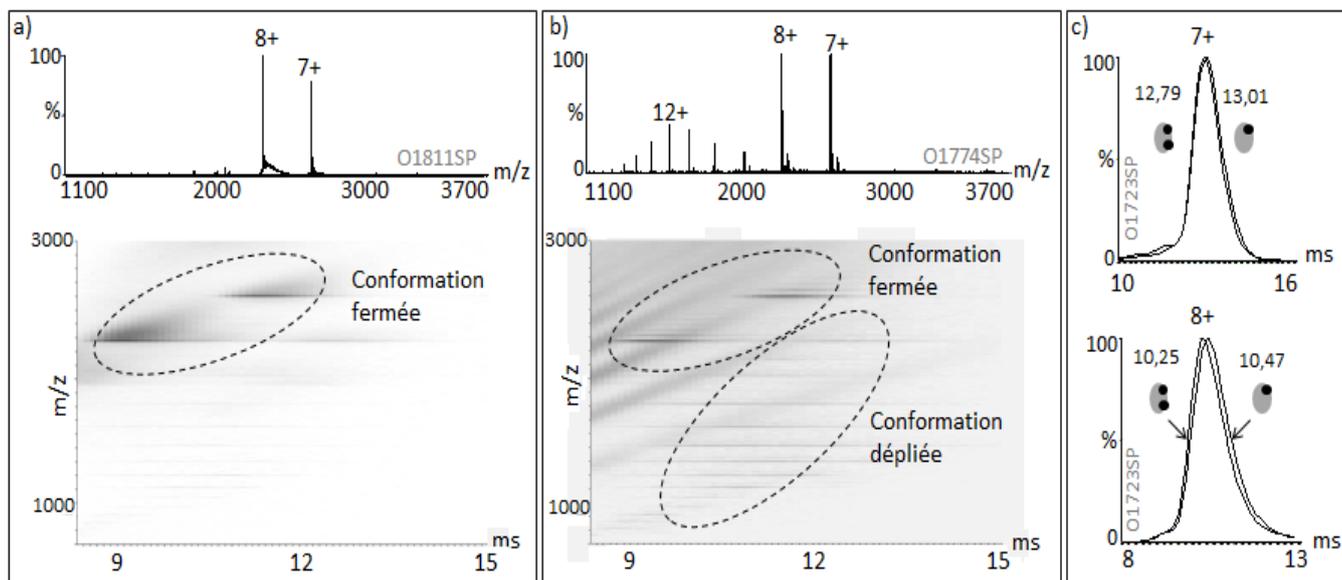
Afin de mettre en évidence le caractère réversible de la fixation du zinc, nous avons mis la protéine traitée à l'EDTA en présence de différentes concentrations d'acétate de zinc (entre 15 et 90  $\mu$ M). Ainsi, pour une concentration de 90  $\mu$ M, nous avons pu re-déplacer l'équilibre protéine/zinc vers la formation du complexe avec 2 atomes de zinc ( $M_{mesurée} = 18\,056 \pm 1$  Da). De plus, ce

changement s'accompagne d'une disparition de la protéine P1 sous forme ouverte (Figure 5, c). Ces observations suggèrent que l'atome de zinc chélaté par l'EDTA a un rôle structurant au sein de la protéine P1 comme cela a pu être mis en évidence pour de nombreuses protéines ZnF<sup>293, 306</sup>.

Il est intéressant de noter que le deuxième atome de zinc, insensible à l'EDTA, reste fixé à la protéine sous forme partiellement dépliée. Pour des concentrations en EDTA plus élevées, la protéine précipite, ne nous permettant pas de mettre en évidence la perte de cet atome de zinc. Le fait que ce deuxième atome de zinc ne soit pas sensible à l'EDTA peut s'expliquer de différentes manières : soit l'affinité de l'atome de zinc pour la protéine est très élevée et nécessite des agents chélatants plus forts, soit la conformation de la protéine rend le zinc inaccessible aux agents chélatants. Afin de déterminer si l'affinité du deuxième atome de zinc pour la protéine est responsable de son maintien en présence d'EDTA, de nouvelles expériences seront réalisées à l'aide d'un agent chélatant plus fort : le TPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine). En effet, il a été montré récemment que cet agent permettait de chélater des atomes de zinc insensibles à l'EDTA<sup>302, 307</sup>.

#### b. Effet de la fixation des atomes de zinc sur la conformation de la protéine P1

Étant donné que la perte d'un atome de zinc conduit à l'apparition d'une forme dépliée de la protéine P1 (état de charge 7 - 15+) sur les spectres de masse (Figure 6, a et b), nous avons souhaité étudier, par IM-MS, l'effet de la perte de cet atome de zinc sur la conformation de la protéine P1.



**Figure 6: Étude de l'effet du zinc sur la structure tridimensionnelle de la protéine P1.** Spectres de masse et driftscope de la protéine P1 en conditions natives (5  $\mu$ M,  $V_c = 50$  V,  $P_i = 5,4$  mbar, Trap CE = 10 V, Trap Bias = 36 V,  $P_{IMS} = 3,52$  mbar ( $Q_{He} = 180$  mL/min<sup>-1</sup>,  $Q_{N_2} = 90$  mL.min<sup>-1</sup>), IMS WH = 40V, IMS WV = 850 m/s, Transfer CE = 0 V) avant (a) et après traitement EDTA (b). c) mobilogrammes extraits des états de charges 7 et 8+ de la protéine P1 traitée à l'EDTA. ● et ● correspondent à la protéine P1 avec 1 ou 2 atomes de zinc.

L'analyse de cette protéine par IM-MS conduit à l'obtention de deux états de charge 7 et 8+ ayant des temps de passage dans la cellule de mobilité de 10,25 et 12,79 ms (Figure 6, c). Après traitement de la protéine P1 à l'EDTA, nous avons pu mettre en évidence sur le *driftscope* la

présence de deux populations principales qui diffèrent par leur mobilité ionique (Figure 6). L'une correspond aux états de charge 7 et 8+ et l'autre aux états de charge plus élevés (9 à 15+).

Alors que pour les états de charge 9 à 15+, le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité augmente lorsque la charge diminue, celui-ci diminue pour l'état de charge 8+. La diminution de la mobilité des ions d'états de charge 8+ n'est donc pas liée à leurs charges, mais à un changement conformationnel. Les ions d'états de charge 7 et 8+ présentent donc des conformations plus compactes (dites « fermées ») que les états de charges plus élevés qui correspondent à une conformation dépliée de la protéine. Afin de mettre en évidence les changements conformationnels observés pour ces différents états de charge, les CCS expérimentales ont été déterminées pour la protéine P1 avec 1 et 2 atomes de zinc (Tableau 1).

**Tableau 1: Sections efficaces expérimentales de la protéine P1 avec 1 ou 2 atomes de zinc calculées à partir des données de mobilité ionique obtenues sur le Synapt G2 HDMS (O1724SP).** L'étalonnage de la mobilité ionique (O1797SP) a été réalisé à l'aide d'un mélange protéique (Cytochrome C et myoglobine de cœur de cheval et Ubiquitine bovine).  $V_c = 50V$ ,  $P_i = 5,4$  mbar, Trap CE = 10 V, Trap Bias = 36 V,  $P_{IMS} = 3,52$  mbar ( $Q_{He} = 180$  mL/min-1,  $Q_{N_2} = 90$  mL.min-1), IMS WH = 40V, IMS WV = 850 m/s, Transfer CE = 0 V).

	P1 (2 Zincs)		P1 (1 Zinc)				
Etats de charge	7+	8+	7+	8+	11+	12+	13+
m/z	2598	2273	2589	2266	1648	1511	1395
$t_D$ (ms)	11,47	11,58	9,26	9,37	10,92	10,14	11,36
CCS ( $\text{\AA}^2$ )	1584	1593	1595	1606	2419	2526	2628

Les CCS calculées pour les états de charge 7 et 8 + des protéines P1 avec 1 et 2 atomes de zinc ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet de la perte d'un atome de zinc sur la conformation de la protéine P1 ( $\Delta CCS < 1\%$ ). Toutefois, pour des états de charge plus élevés (9 – 15+), une augmentation de la CCS est observée, mettant en évidence la présence d'une conformation ouverte de la protéine en absence d'un atome de zinc. Le zinc perdu a donc un effet structurant sur la protéine P1 qui ne peut être mis en évidence que sur la forme ouverte de la protéine.

### c. Conclusion

L'analyse de la distribution des états de charge ainsi que la mesure des sections efficaces nous ont permis de démontrer que le zinc permet de stabiliser la structure tridimensionnelle de la protéine P1. Toutefois, l'analyse de ce système sur le Synapt G2 HDMS, ne nous a pas permis d'observer de différence de mobilité ionique entre les états de charge 7 et 8+ de la protéine P1 complexée à un ou deux atomes de zinc. Afin de pouvoir valider nos optimisations instrumentales, l'analyse d'un système protéine/métal bien caractérisé tel que le système calcium/calmoduline devra être réalisée.

### 3.2 Essais préliminaires de localisation des acides aminés impliqués dans les doigts de zinc de la protéine P1

La deuxième étape de cette étude est de caractériser finement les acides aminés impliqués dans la formation des doigts de zinc. Cette partie de l'étude a été réalisée en étroite collaboration avec le Dr. François Delalande notamment en ce qui concerne les approches protéomiques. Il est important de noter qu'avant chaque analyse par LC-MS ou LC-MS/MS, une vérification de la masse des protéines entières est réalisée en conditions dénaturantes et/ou natives. De plus, afin de disposer de tous les contrôles nécessaires pour l'interprétation de nos données, chaque échantillon a été digéré soit après traitement DTT puis IAA, soit après traitement IAA seul ou sans traitement préalable.

#### 3.2.1 Empreinte peptidique massique de la protéine P1 par LC-MS/MS

Dans un premier temps, la protéine P1 a été caractérisée par LC-MS/MS après digestion tryptique (digestion après les lysines et les arginines) ou Glu-C (digestion après les acides aspartiques et glutamiques). Ces analyses ont permis d'identifier la protéine P1 avec des taux de recouvrement respectifs de 97 et 63% (Figure 7). Le faible taux de recouvrement observé avec l'enzyme Glu-C est notamment dû au fait que cette digestion est souvent plus difficile et que la réaction de clivage n'est pas totale.

Séquence de la protéine P1:	
1	<u>M</u> TRLEVLIRP <b>TEQ</b> TAAKANA VGY <b>T</b> HALGWV <b>W</b> HSQTWDVDS VRDPSLRADF <b>N</b> PEKVGWVS <b>V</b>
61	<b>S</b> FACT <b>Q</b> CTA <b>H</b> <u>Y</u> YTSE <b>Q</b> VKYF <u>T</u> NIP <b>P</b> V <b>H</b> FDV <b>V</b> CAD <b>C</b> ERSV <b>Q</b> LDDEIDRE <b>H</b> Q ERNAEISAC <b>N</b>
121	<b>A</b> RALSEGRPA SLVYLSRDAC <b>D</b> IPE <b>H</b> SGR <b>C</b> R FVKYL <b>N</b> F

Figure 7: Recouvrement de la protéine P1 après digestion à la trypsine (en gras) ou après digestion à la Glu-C (souligné).

De plus, cette analyse nous a permis de confirmer la présence des 7 cystéines de la protéine P1 (C64, C67, C92, C95, C119, C140 et C149), mais n'a pas permis d'identifier les cystéines faisant parties des mêmes ZnF. Nous avons donc souhaité combiner des approches supramoléculaires aux approches protéomiques pour caractériser finement les cystéines impliquées dans la liaison au zinc. Nous avons donc réalisé des alkylations différentielles des cystéines en utilisant deux agents alkylants réagissant avec les thiols des cystéines libres pour former une liaison covalente: d'une part le N-éthylmaléimide (NEM, 125 Da), d'autre part l'iodoacétamide (IAA, 185 Da) (Figure 8).

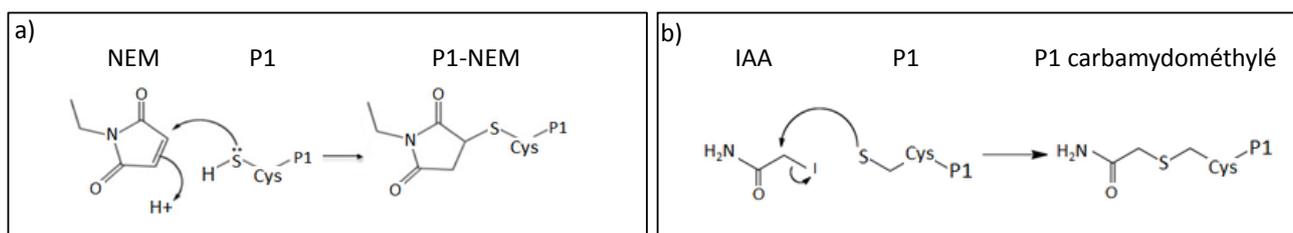
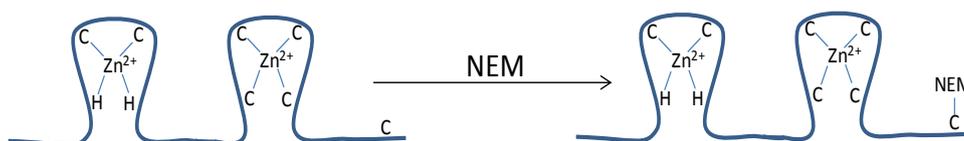


Figure 8: Schéma réactionnel de l'alkylation des cystéines libres par le N-éthylmaléimide (a) ou par l'Iodoacétamide (b).

### 3.2.2 Effet du marquage au NEM de la protéine P1

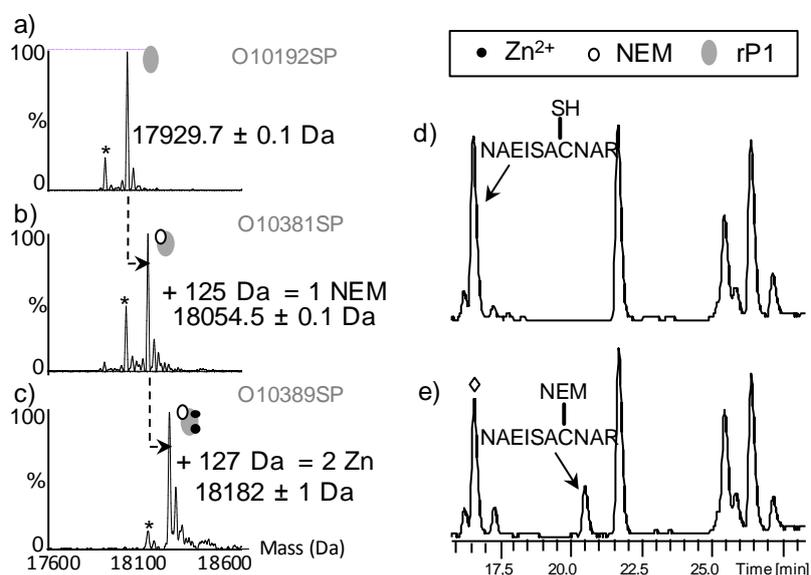
#### a. Mise en évidence de cystéines libres par marquage au NEM

La protéine P1 est purifiée dans un tampon contenant 1 mM de DTT. Par conséquent, nous avons réalisé deux cycles de dessalage par filtration sur gel afin que la réaction avec le NEM soit quantitative. La protéine P1 (5  $\mu$ M) a ensuite été traitée avec différentes concentrations de NEM (2.5, 5, 10, 25, 50 et 100  $\mu$ M) puis analysée par MS supramoléculaire et par LC-MS (Figure 9).



**Figure 9:** Mise en évidence de cystéines libres par réaction d'alkylation au NEM de la protéine P1 dessalée. Une analyse par MS supramoléculaire de la protéine avant et après réaction permet de mettre en évidence le nombre de molécules de NEM fixées. Une analyse LC/MS/MS permet en parallèle d'identifier les cystéines marquées au NEM

Les expériences réalisées en conditions dénaturantes nous ont permis de montrer que la protéine P1 (Figure 10, a) est capable de fixer une molécule de NEM lorsque celle-ci est incubée avec ce dernier selon un ratio 1 : 1 ( $M_{\text{mesurée}} = 18\,054.5 \pm 0.1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 18\,054$  Da) (Figure 10, b). Une analyse en conditions natives nous a ensuite permis de confirmer la présence des deux atomes de zinc sur cet échantillon. ( $M_{\text{mesurée}} = 18\,182 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 18\,181$  Da) (Figure 10, c).



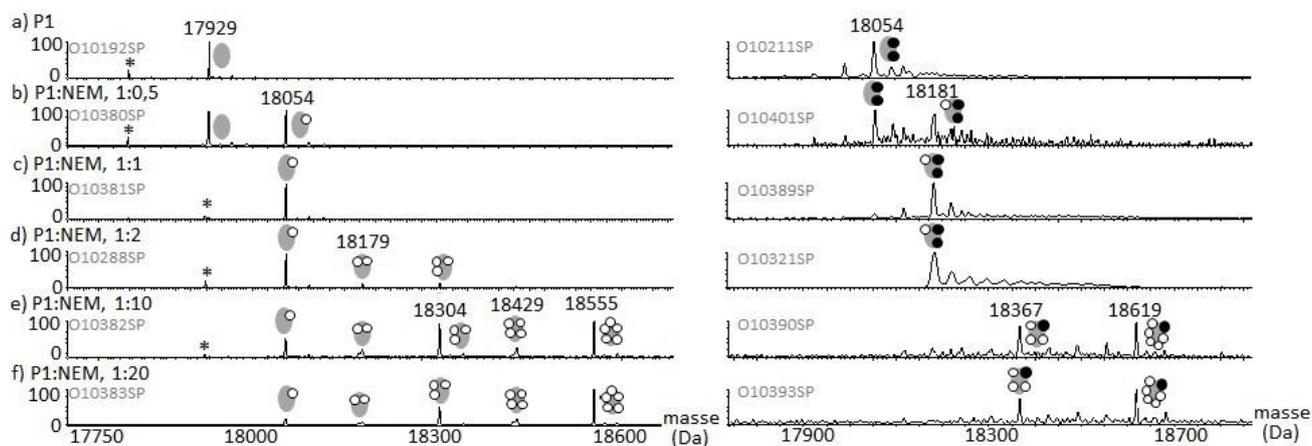
**Figure 10:** Mise en évidence d'une cystéine libre par des approches combinées de MS supramoléculaire et LC/MS. Spectres déconvolués de la protéine P1 en conditions dénaturantes 2  $\mu$ M ( $V_c=40$ V,  $P_i=2$  mbar) seule (a) ou après traitement au NEM (ratio 1:1) (b).. c) Spectre déconvolué de la protéine P1 traitée avec 1 équivalent NEM en conditions natives (5  $\mu$ M,  $\text{AcNH}_4$  50 mM pH 8,  $V_c = 100$ V,  $P_i = 6$  mbar) \* indique la présence de P1 sans la méthionine N-terminale (-131 Da). Chromatogrammes microLC-MS de l'échantillon P1 avant (d) et après traitement au NEM (e) mettant en évidence la détection d'un unique peptide marqué au NEM à un temps de rétention de 20.5 min. Le pic annoté  $\diamond$  correspond à un peptide ayant le même temps de rétention que le peptide NAEISACNAR sans NEM.

Ces deux informations nous permettent donc de conclure que la cystéine marquée au NEM après traitement avec 5  $\mu$ M de NEM est une cystéine libre qui n'est pas impliquée dans la fixation du zinc.

L'analyse microLC-MS des fragments tryptiques de l'échantillon traité au NEM, obtenus après réduction au DTT et alkylation à l'IAA, a révélé un seul peptide contenant une molécule de NEM (NAEISAC<sub>119</sub>NAR : 1 173,52 Da) (Figure 10, d et e). L'ensemble de ces observations nous a donc permis de conclure que parmi les 7 cystéines de la protéine P1, 6 sont impliquées dans la liaison au zinc alors que la cystéine 119 est libre.

### b. Effet de fortes concentrations en NEM sur la protéine P1

L'utilisation de concentrations en NEM de 25 et 50  $\mu$ M, nous a permis de mettre en évidence la fixation de 2 à 5 molécules de NEM par protéine ( $M_{\text{mesurées}} = 18\ 177.0 \pm 0.3$  Da,  $18\ 304.0 \pm 0.1$  Da,  $18\ 428.4 \pm 0.3$  Da et  $18\ 555.2 \pm 0.2$  Da) (Figure 11, panel de gauche). Parmi les cystéines fixant du NEM, les formes avec 3 et 5 molécules de NEM sont majoritairement représentées. Ces expériences nous ont donc permis de mettre en évidence que les cystéines liées au zinc sont sensibles à l'alkylation en présence de fortes concentrations en agent alkylant. Cependant, la présence de fortes concentrations en NEM entraîne une perte d'efficacité d'ionisation rendant difficiles les analyses en conditions natives. Toutefois, les résultats obtenus nous permettent de mettre en évidence la perte d'un atome de zinc en présence de 3 et 5 NEM sur la protéine P1 ( $M_{\text{mesurées}} = 18\ 367$  ( $18\ 304 + 63.5$ ) Da et  $18\ 619$  ( $18\ 555.2 + 63.5$ ) Da). (Figure 11, panel de droite).



**Figure 11: Effet de fortes concentrations en agents alkylants sur la protéine P1.** a)-e) correspondent respectivement à l'incubation de la protéine P1 (5  $\mu$ M) avec 2.5, 5, 10, 50 et 100  $\mu$ M de NEM. Spectres déconvolués de la protéine P1 en conditions dénaturantes 2  $\mu$ M ( $V_c = 40$ V,  $P_i = 2$  mbar Panel de gauche) ou en conditions natives 5  $\mu$ M ( $V_c = 200$ V,  $P_i = 6$  mbar, Panel de droite). \* correspond à la protéine P1 sans la méthionine N-terminale

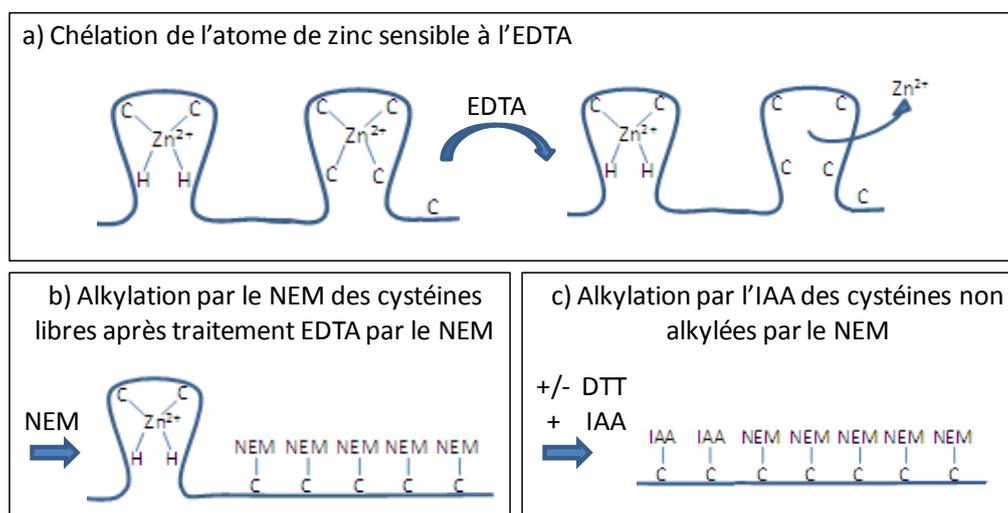
L'échantillon P1 : NEM, 1 : 10 a ensuite été analysé par LC-MS après réduction au DTT et alkylation à l'IAA. Toutefois, malgré deux cycles de dessalage de cet échantillon, nous n'avons pas été capables de discriminer les cystéines impliquées dans le doigt de zinc sensible à de fortes concentrations en NEM, car l'ensemble des cystéines est marqué (Tableau 2). Nous supposons donc que le NEM présent sous forme de trace dans l'échantillon a pu réagir lors des étapes de réduction et d'alkylation avec les cystéines impliquées dans le doigt de zinc restant.

**Tableau 2: Analyses par LC-MS des échantillons traités ou non à l'EDTA puis alkylés différemment par le NEM et l'IAA et digérés à la trypsine.** La protéine P1 a été dessalée puis incubée à 5  $\mu$ M avec 5 ou 50  $\mu$ M de NEM pendant 40 minutes à température ambiante. Les échantillons obtenus ont été dessalés puis analysés par MS supramoléculaire et par LC-MS. Les couleurs verte, bleue et orange correspondent respectivement aux peptides contenant un pont disulfure, alkylés ou liant le NEM.

Peptides	m/z ( $\pm 0.1$ )	RT (min) ( $\pm 0.5$ )	P1	P1 + 1 NEM	P1 + 10 NEM
DAC <sub>140</sub> DIPEHSGR-SS-C <sub>149</sub> R	737,81	16,2	X	X	X
DAC <sub>140</sub> DIPEHSGR-IAA	628,77	16,6	X	X	X
NAEISAC <sub>119</sub> NAR-IAA	553,25	16,6	X	X	X
NAEISAC <sub>119</sub> NAR-NEM	587,27	20,5		X	X
DAC <sub>140</sub> DIPEHSGR-NEM	662,78	20,7			X
VGWVSVSFAC <sub>64</sub> TQC <sub>67</sub> TAHYTSEQVK-2 IAA	936,76	28,9	X	X	X
YFTNIPPVHFDVVC <sub>92</sub> ADC <sub>95</sub> ER- 2 IAA	1170,00	30	X	X	X
VGWVSVSFAC <sub>64</sub> TQC <sub>67</sub> TAHYTSEQVK-2 NEM	982,11	32,4			X
YFTNIPPVHFDVVC <sub>92</sub> ADC <sub>95</sub> ER- 2 NEM	1238,06	33,1			X

### 3.2.3 Caractérisation des doigts de zinc par alkylation différentielle

Afin d'identifier les cystéines impliquées dans le doigt de zinc sensible à l'EDTA, nous avons réalisé une alkylation différentielle des cystéines grâce à l'action successive de deux agents alkylants : le NEM puis l'IAA sur un échantillon préalablement traité ou non à l'EDTA (Figure 12).



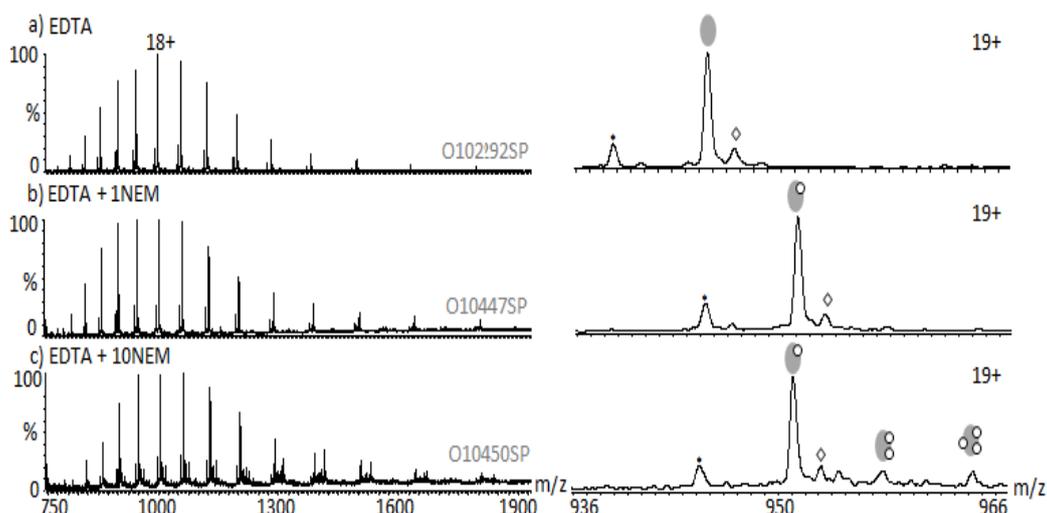
**Figure 12: Alkylation différentielle des cystéines de la protéine P1 traitée à l'EDTA, à l'aide des agents alkylants NEM et IAA.**

#### a. Marquage des cystéines libres après traitement EDTA à l'aide de l'alkylant 1 : le NEM

La protéine P1 a donc été soumise à un traitement EDTA permettant d'obtenir majoritairement la chélation d'un des deux atomes de zinc de la protéine P1 (Figure 5, b). Dans un second temps, cet échantillon a été incubé avec du NEM selon des ratios : 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5 et 1 : 10 (Figure 13).

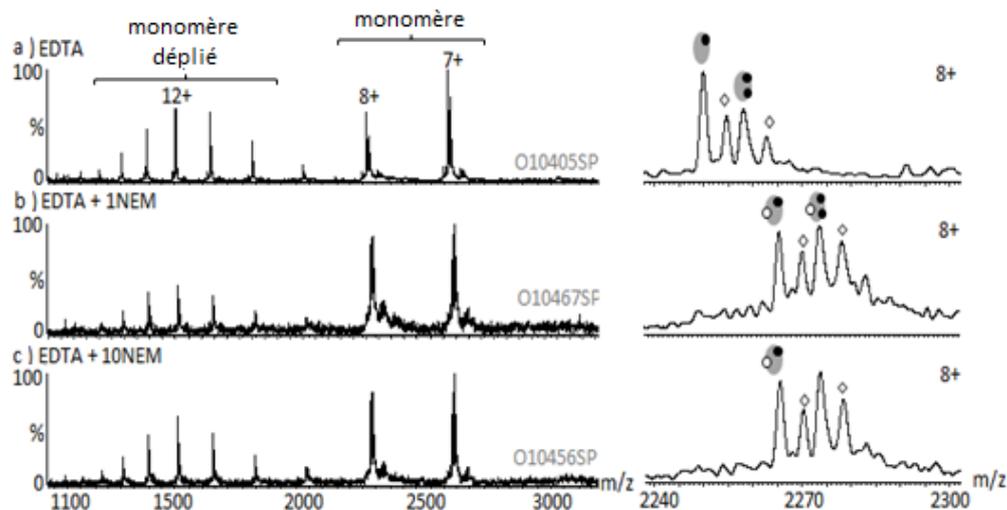
L'analyse de ces échantillons en conditions dénaturantes nous a permis de mettre en évidence la fixation d'une molécule de NEM par protéine P1 traitée à l'EDTA ( $M_{\text{mesurée}} = 18\,053.3 \pm 0.4$  Da) pour des ratios P1 :NEM 1 : 1 (Figure 13), 1 : 2 et 1 : 5 (non présentés ici). Le fait qu'une seule

molécule de NEM soit fixée même pour un ratio 1 : 5 peut s'expliquer par le traitement EDTA qui a permis la réaction du NEM sur la cystéine libre, mais aussi sur les cystéines impliquées dans le premier doigt de zinc. Nous observons donc que la protéine P1 est majoritairement marquée une fois par du NEM sur la cystéine libre ou sur une cystéine impliquée dans le doigt de zinc sensible à l'EDTA. À partir d'un ratio P1 : NEM 1 : 10, la fixation de 2 et 3 molécules de NEM est observée en faible proportion ( $M_{\text{mesurées}} = 18\ 176.8 \pm 1.6$  Da et  $18\ 302.4 \pm 1.1$  Da) par comparaison au marquage observé en absence de traitement à l'EDTA (Figure 11, e).



**Figure 13: Effet du traitement de la protéine P1 à l'EDTA sur la fixation d'un agent alkylant : le NEM.** a)-c) Analyse de la protéine P1 en conditions dénaturantes (2  $\mu$ M, eau/acétonitrile/Acide 50/50/1,  $V_c = 40$ V,  $P_i = 2$  mbar) après un traitement EDTA (200 équivalents) (a), puis après ajout de 5 (b) ou 50  $\mu$ M (c) de NEM. ●, ○, ● et ◇ correspondent respectivement à la protéine P1, à une molécule de NEM, à un atome de zinc et à des adduits de 38 Da). Panel de droite : agrandissement de l'état de charge 19+.

L'analyse de ces échantillons en conditions natives nous a permis de mettre en évidence la fixation d'une molécule de NEM sur la forme P1 avec 1 atome ( $M_{\text{mesurée}} = 18\ 115 \pm 2$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 18\ 117$  Da) ou 2 atomes de zinc ( $M_{\text{mesurée}} = 18\ 181 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 18\ 181$  Da) (Figure 14).



**Figure 14: Effet du traitement de la protéine P1 à l'EDTA sur la fixation d'un agent alkylant : le NEM.** a)-c) Analyse en conditions natives (5  $\mu$ M, tampon  $\text{AcNH}_4$  50 mM pH 8,  $V_c = 120$ V,  $P_i = 6$  mbar) de la protéine P1 respectivement après un traitement EDTA (a) (200 équivalents), puis après ajout de 5 (b) ou 50  $\mu$ M (c) de NEM. ●, ○, ● et ◇ correspondent respectivement à la protéine P1, à une molécule de NEM, à un atome de zinc et à des adduits de 38 Da). Panel de droite : agrandissement de l'état de charge 8+.

## b. Marquage différentielle des cystéines restantes, à l'aide de l'alkylant 2 : l'IAA

Les échantillons traités ou non à l'EDTA ont été incubés selon des ratios 1 : 1 et 1 : 10 avec du NEM. Les échantillons ont ensuite été réduits au DTT puis alkylés à l'IAA avant d'être soumis à une digestion trypsique. Ils ont enfin été analysés par LC-MS de manière à identifier les cystéines liées au NEM ou à l'IAA (Tableau 3).

**Tableau 3: Analyses par LC-MS des échantillons traités ou non EDTA puis alkylés différemment par le NEM et l'IAA et digérés à la trypsine.** La protéine P1 (50  $\mu$ M) incubée pendant une nuit à 4°C avec 10 mM EDTA a été dessalée puis incubée à 5  $\mu$ M avec 5 ou 50  $\mu$ M de NEM pendant 40 minutes à température ambiante. Les échantillons obtenus ont été dessalés puis analysés par MS supramoléculaire et par LC-MS. Les couleurs verte, bleue et orange correspondent respectivement aux peptides contenant un pont disulfure, alkylés ou liant le NEM.

Peptides	m/z ( $\pm 0.1$ )	RT (min) ( $\pm 0.5$ )	P1	P1 + 1 NEM	P1+ EDTA	P1 + EDTA + 1 NEM	P1 + 10 NEM	P1 + EDTA + 10 NEM
DAC <sub>140</sub> DIPEHSGR-SS-C <sub>149</sub> R	737,81	16,2	X	X			X	
DAC <sub>140</sub> DIPEHSGR-IAA	628,77	16,6	X	X	X	X	X	X
NAEISAC <sub>119</sub> NAR-IAA	553,25	16,6	X	X	X	X	X	X
NAEISAC <sub>119</sub> NAR-NEM	587,27	20,5		X		X	X	X
DAC <sub>140</sub> DIPEHSGR-NEM	662,78	20,7				X	X	X
VGWVSVSFAC <sub>64</sub> TQC <sub>67</sub> TAHYTSEQVK-2 IAA	936,76	28,9	X	X	X	X	X	X
YFTNIPPVHFDVVC <sub>92</sub> ADC <sub>95</sub> ER- 2 IAA	1170,00	30	X	X	X	X	X	X
VGWVSVSFAC <sub>64</sub> TQC <sub>67</sub> TAHYTSEQVK-2 NEM	982,11	32,4				X	X	X
YFTNIPPVHFDVVC <sub>92</sub> ADC <sub>95</sub> ER- 2 NEM	1238,06	33,1					X	X

Malgré un traitement préalable de l'échantillon au DTT, nous avons pu observer la présence d'un pont disulfure entre les cystéines C140 et C149 de la protéine P1 en absence de traitement EDTA suggérant que ces deux cystéines seraient impliquées dans le même doigt de zinc.

L'analyse de la protéine P1 incubée avec de l'EDTA puis avec 1 équivalent NEM nous a permis de mettre en évidence l'alkylation des cystéines C64, C67 et C140 par le NEM (lignes oranges du Tableau 3, colonne P1+EDTA+1 NEM). La présence d'alkylation de ces cystéines par l'IAA provient du fait que la chélation de l'atome de zinc sensible à l'EDTA n'est pas complète (Figure 5). Par conséquent un mélange de peptides marqués et non marqués au NEM peut être observé.

Au contraire, les cystéines C92 et C95 ne sont alkylées que par l'IAA suggérant que ces cystéines sont impliquées dans le doigt de zinc résistant à l'EDTA.

Le traitement de l'échantillon P1 à la trypsine ne nous a pas permis de mettre en évidence la cystéine 149. En effet, cette dernière n'est observable qu'en présence d'un pont disulfure avec la cystéine 140, suggérant son appartenance au doigt de zinc sensible à l'EDTA. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une digestion des précédents échantillons avec l'enzyme Glu-C. En effet, la digestion de la protéine P1 par la Glu-C nous a permis d'obtenir un fragment peptidique observable (HSGRC<sub>149</sub>RFVKYLNF) contenant la cystéine 149. Toutefois, bien que nous ayons pu observer la cystéine 149 liée au NEM (peptide 2+, :m/z = 876.44, RT = 29.51 min), nous ne pouvons pas valider nos résultats, car le NEM a été observé avec et sans traitement EDTA bien que les analyses contrôles réalisées par MS supramoléculaire soit validées. De plus, la digestion à la Glu-C

ne permet pas d'obtenir des fragments peptidiques facilement exploitables à cause de sites non-clivés. L'expérience devra donc être réalisée à nouveau pour confirmer la présence de la cystéine C149 dans le doigt de zinc sensible à l'EDTA.

### 3.3 Effet d'un milieu oxydant sur la protéine P1

En parallèle, nous avons étudié l'effet d'un milieu oxydant sur la protéine P1. La protéine P1 a donc été soumise à des concentrations croissantes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 1.5, 2.5 et 5 mM (Tableau 4).

**Tableau 4: Analyse de la protéine P1 après un traitement avec 0, 1.5, 2.5 ou 5 mM de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). ND : non déterminé, ?: ponts intra ou intermoléculaires**

Concentrations H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Masses mesurées (Da)	Interprétation	Nb ponts S-S	Types de ponts
0 mM	17798,15 ± 0,09	Monomère	0	
	17929,38 ± 0,09	Monomère	0	
1,5 mM	17797,11 ± 0,27	Monomère	≈ 1	intra
	17928,11 ± 0,27	Monomère	≈ 1	intra
	35724,15 ± 0,34	Dimère	≈ 2	1 inter + 1 ?
	35855,76 ± 0,47	Dimère	≈ 2	1 inter + 1 ?
2,5 mM	17796,70 ± 0,39	Monomère	1	intra
	17927,47 ± 0,32	Monomère	1	intra
	35722,99 ± 0,38	Dimère	2	1 inter + 1 ?
	35854,33 ± 0,34	Dimère	2	1 inter + 1 ?
	53781,61 ± 0,57	Trimère	3	1 inter + 2 ?
	53650 ± 1	Trimère	3	1 inter + 2 ?
	71709 ± 1	Tétramère	ND	ND
107562 ± 3	Hexamère	ND	ND	
5 mM	17795,22 ± 0,82	Monomère	≈ 2	2 intra
	17926,49 ± 0,72	Monomère	≈ 2	2 intra
	35852,10 ± 0,66	Dimère	≈ 4	2 intra + 2 ?
	71704 ± 1	Tétramère	ND	ND
	107557 ± 7	Hexamère	ND	ND

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la modification de l'état d'oligomérisation de la protéine P1, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en conditions dénaturantes grâce à la formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Il est intéressant de noter que la résolution de notre instrument n'étant pas suffisante pour séparer des protéines différentes de 2 Da, nous mesurons une masse intermédiaire correspondante à un mélange de forme avec plus ou moins un pont disulfure. C'est notamment le cas lors de traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1.5 ou 5 mM. Des analyses LC-MS réalisées en parallèle sur ces échantillons ont permis de mettre en évidence la présence de ponts disulfures intramoléculaires entre les cystéines C64-C67, C92-C95 et C140-C149 et des ponts intra- ou intermoléculaires entre les cystéines C119-C140. Des ponts disulfures intermoléculaires ont aussi pu être mis en évidence entre 2 cystéines libres C119. Toutefois, afin d'obtenir de plus amples informations concernant les doigts de zinc de la protéine P1 ainsi que les ponts disulfures formés en conditions oxydantes, nous poursuivrons notre étude sur plusieurs formes tronquées de la protéine. De plus, des expériences de modélisation moléculaire sont en cours afin de valider nos hypothèses concernant les cystéines impliquées dans les deux doigts de zinc.

## 4 Conclusion

---

L'ensemble de cette étude nous a permis de caractériser finement des domaines à doigts de zinc. Dans un premier temps, cette étude nous a permis de mettre en évidence une différence de réactivité des atomes de zinc vis-à-vis d'un traitement à l'EDTA. En effet, l'EDTA ne permet la chélation que d'un atome de zinc, l'autre étant résistant à la chélation. Cette caractéristique de la protéine nous a permis de caractériser les deux doigts de zinc grâce au développement d'une méthode couplant la MS supramoléculaire à des approches moléculaires. L'utilisation d'une alkylation différentielle des cystéines impliquées dans le doigt de zinc sensible à l'EDTA nous a permis de déterminer que la cystéine C119 est une cystéine libre, que les cystéines 64, 67, 140 et probablement 149 font partie du doigt de zinc sensible à l'EDTA et enfin que les cystéines C92 et C95 font parties du doigt de zinc résistant à l'EDTA. Le doigt de zinc sensible à l'EDTA serait donc formé de 4 cystéines alors que celui résistant à l'EDTA serait formé de deux cystéines et de deux histidines. Cette observation semble en accord avec les précédents travaux réalisés par O. Sénèque *et al.*, montrant que les doigts de zinc  $ZnC_4H_0$  sont plus sensibles à l'EDTA que les doigts de zinc  $ZnC_3H_1$  et  $ZnC_2H_2$ <sup>307</sup>.

En parallèle, afin de poursuivre cette étude, une analyse par cristallographie de cette protéine sera réalisée. Toutefois, face aux différents problèmes liés à la cristallisation de cette protéine, des tronçons de la protéine possédant des domaines individuels de liaison au zinc seront produits puis analysés par MS supramoléculaire et par LC-MS/MS.

La protéine P1 dont la fonction est contrôlée par l'environnement de la plante présente une modification de son état d'oligomérisation en présence de peroxyde d'hydrogène. L'effet de cette modification sur la capacité de cette protéine à se lier à un ARN sera notamment évalué par des études biochimiques, mais aussi par MS supramoléculaire.

Enfin, les données obtenues par MS et IM-MS supramoléculaires pourront être comparées aux données obtenues par des méthodes biophysiques plus résolutive.

## 5 Valorisation

---

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

### Publication :

François-Xavier Gillet, Diego Ignacio Cattoni, **Stéphanie Petiot-Bécard**, François Delalande, Vianney Poignavent, Jean-Paul Brizard, Alain Van Dorsselaer, Yannick Bessin, Nathalie Declerck, Sarah Sanglier-Cianferani, Christophe Brugidou, Florence Vignols. - **The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a Zinc-binding protein with redox-dependent flexibility**- Biochemistry. 2012. Soumis

### Communication orale :

**Stéphanie Petiot**, François Delalande, François-Xavier Gillet, Jean-Paul Brizard, Florence Vignols, Christophe Brugidou, Alain Van Dorsselaer, Sarah Sanglier-Cianferani **Can we combine ion mobility with supramolecular mass spectrometry to characterize protein/metal complexes?** Club Jeunes de la Société Française Spectrométrie de Masse. 26-30 avril 2010, Saint-Jean-Saint-Nicolas.



## Publication

**The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a Zinc-binding protein with redox-dependent flexibility**

François-Xavier Gillet, Diego Ignacio Cattoni, Stéphanie Petiot-Bécard, François Delalande, Vianney Poignavent, Jean-Paul Brizard, Alain Van Dorselaer, Yannick Bessin, Nathalie Declerck, Sarah Sanglier-Cianferani, Christophe Brugidou et Florence Vignols

*Biochemistry, 2012, Soumis*



## The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a Zinc-binding protein with redox-dependent flexibility

François-Xavier Gillet<sup>1</sup>, Diego Ignacio Cattoni<sup>2</sup>, Stéphanie Petiot-Bécard<sup>3</sup>, François Delalande<sup>3</sup>, Vianney Poignavent<sup>1</sup>, Jean-Paul Brizard<sup>1</sup>, Yannick Bessin<sup>2</sup>, Alain Van Dorsselaer<sup>3</sup>, Nathalie Declerck<sup>2</sup>, Sarah Sanglier-Cianferani<sup>3</sup>, Christophe Brugidou<sup>1</sup>, Florence Vignols<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, IRD de Montpellier, UMR 186 IRD-CIRAD-Université de Montpellier II, CNRS, Montpellier, France

<sup>2</sup> Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM UMR U554, Université de Montpellier, CNRS UMR 5048, Montpellier, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), Université de Strasbourg, IPHC, Strasbourg, France, and CNRS, UMR7178, Strasbourg, France.

Address correspondence to: Florence Vignols, IRD Institute, Laboratoire Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, UMR186 IRD-CIRAD-UM2, 911 avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, Tel: (33) 4 67 41 62 61. E-mail: florence.vignols@ird.fr

\*Running title: Redox regulation of P1 conformation and zinc-binding

F.-X.G. and V. P. were supported by PhD internships from the French Ministry of Education and Scientific Research (Sibaghe School, University of Montpellier-II, France). This work was funded by the CNRS, the IRD Institute, the University of Strasbourg Uds, the Region Alsace, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the GIS IBI SA. S.P. was supported by a studentship from the CNRS and NovAliX (Illkirch, Strasbourg) for financial support.

**Abbreviations :** CD, circular dichroism, CMV, cucumber mosaic virus, CRR, cysteine rich region, dsRNA, Cys, cysteine, double strand RNA, DTT, dithiothreitol, EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry, HIV, human immunodeficiency virus, Hsp33, heat shock protein 33, IAA, iodoacetamide, IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, malPEG, methoxypolyethylene glycol-maleimide, microLC-MS, microflow liquid chromatography mass spectrometry, Ncp7, nucleocapsid protein 7, NEM, N-ethylmaleimide alkylating, PAR, 4-(2-pyridylazo) resorcinol, RNS, reactive nitrogen species, ROS, reactive oxygen species, Tat, trans-activator, TFIIS, transcription factor IIS, Trp, tryptophan, rP1, recombinant P1, RYMV, rice yellow mottle virus, SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, TEV, tobacco etch virus, VSR, viral suppressors of RNA interference

**Keywords:** Gene silencing, Oxidative stress, Viral suppressor of RNAi, Zinc-binding, RYMV, *Oryza sativa*

### ABSTRACT

Viral suppressors of RNA interference (VSRs) target host gene silencing pathways, thereby operating important roles in the viral cycle and in host cells, in which they counteract host innate immune responses. However, the molecular mechanisms of VSRs are poorly understood. We provide here biochemical and biophysical features of the dual suppressor/activator VSR P1 protein encoded by the *rice yellow mottle virus*. *In silico* analyses of P1 suggested common features with zinc finger proteins and native mass spectrometry unambiguously confirmed that recombinant P1 binds reversibly two zinc atoms, each with a different strength. Additionally, we demonstrate that the reaction of P1 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to zinc release, disulfide bond formation and protein oligomerization. A reversible protein modification by redox alterations has only been described for a limited number of zinc finger proteins and has never been reported for VSRs. Those reported here for P1 might be a general feature of Cys-rich VSRs, and could be a key regulatory mechanism for the control of RNA silencing.

## INTRODUCTION

RNA silencing consists of pan-eukaryotic, sequence-specific processes whereby non-coding short RNAs (sRNAs) cause gene inactivation (1, 2). It operates a broad set of biological functions essential to development and to the maintenance of eukaryotic genome integrity (3, 4). RNA silencing also functions as an immune response to invading pathogens. It has been particularly described as an important antiviral mechanism whereby viruses initiate and are the targets of RNA silencing (5). In turn, to evade host immune responses, viruses have evolved viral suppressors of RNA silencing (VSRs) that block host RNA-silencing defenses to prevent degradation of their genomic RNA or mRNAs (6). Double strand RNA (dsRNA) binding is a common strategy to suppress RNA silencing (5,6). Remarkably, some VSRs are multi-functional capable of modulating silencing pathways at different steps. For instance, the *tobacco etch virus* (TEV)-encoded HcPro operates by binding dsRNA and by interacting with the host protein calmodulin (7, 8), and the *cucumber mosaic virus* (CMV)-encoded 2b protein suppress RNA silencing by dsRNA binding and inhibiting Ago1 cleavage activity (9, 10). However, the molecular mechanisms whereby VSRs switch from one function to another remain largely unknown, mostly because of the lack of biochemical data.

The VSR P1 encoded by the *rice yellow mottle virus* (RYMV) genome (11) is a small 18-kDa protein, initially described as an infectivity factor involved in both viral replication and in spreading (12). P1 protein was among the first plant suppressors of RNA silencing discovered (13). In previous work, we have shown that in addition to inhibiting host RNA silencing pathways, P1 could also act as a systemic activator of RNA silencing (14), a property not described for other VSRs. One critical question is to elucidate the biochemical mechanisms by which P1 regulates the suppression or the activation of silencing, and affects viral replication and spreading processes. P1 does not resemble any other known proteins or protein domains with defined functions. Yet the occurrence of two cysteine-rich regions allowed us to assign P1 to the so-called cysteine-rich VSR family (Cys-rich VSR) (15). These cysteine residues are strictly conserved

in all P1 proteins from RYMV isolates, despite the high sequence diversity observed in this protein family (15), and thus could have a key function in P1. In fact, two cysteine residues in P1 were shown to play critical roles in cell-to-cell movement and in local silencing (15). Interestingly, a role of cysteine residues has also been suggested in other Cys-rich VSRs. Mutations of cysteines were notably shown to impair RNA-silencing (16-19) and to abolish RNA- or DNA-binding properties (20-23), subcellular localization (16) and gene transactivation (16, 18, 24, 25). Cysteines residues can form structural or regulatory disulfides bonds (S-S), and can bind metals, thereby affecting proteins structure and function (26, 27, 28). In the case of the Cys-rich VSR proteins, how the conserved cysteines contribute to protein function remains to be investigated.

Here, we analyzed the biochemical and biophysical properties of the pathogenicity factor P1 from RYMV in order to get insights into the structural basis of this Cys-rich VSR. We report that P1 is an atypical zinc-binding protein that binds and releases zinc in a redox-dependent manner. We also show that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a conformational change in P1 through disulfide formation. Such capacity for being structurally and reversibly modified by redox alterations has only been described for about a limited number of zinc-binding proteins (28) and has never been reported for eukaryotic VSRs.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

***In silico* sequence analyses.** Sequences analyzed in this study are given in Supplemental Table 1. All protein sequences were obtained using BlastP by similarity searches against the non-redundant protein database available at the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA). Accession numbers were obtained from UniProtKB. PredictProtein (29) program was used to define secondary structure models. Proteins were run in the different programs either as full-length proteins or truncated polypeptides. Multiple sequence alignments were obtained using ClustalW2 at the European Bioinformatics Institute (EBI) and checked using T-Coffee (30).

**Construction of P1 clones.** The open reading frame (ORF) of P1 originating from the Tanzanian3 (Tz3) viral isolate was used (15). The P1 ORF was amplified using GoTaq polymerase (Promega, France) using NdeI-P1.F (CGCCATATGACACGGTTGGAAGTTCT) and BamHI-P1.R (GCGGGATCCTCAGAAA-TTGAGGTACTTAACAAAC) restriction site-containing primers, and cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega, France) for sequencing. The P1 ORF was excised from pGEM-T using NdeI and BamHI enzymes and ligated into the pET3b vector (Novagen, MerckBiosciences, France). All DNAs were sequenced on both strands.

**Expression and purification of rP1.** *E. coli* strain BL21 (DE3) (Novagen, MerckBiosciences, France) cells were inoculated at an OD<sub>600</sub> of 0.5 at 30°C for 3h in LB medium with ampicillin (100 µg/mL) and IPTG (0.4 mM). The BL21 supernatant was loaded onto 1 mL Q-sepharose Fast Flow pre-equilibrated with buffer A (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM DTT). The column was washed with buffer A, and rP1 was eluted with buffer B (buffer A + 1 M NaCl). Elution fractions containing rP1 were pooled and loaded into a Superdex 75 Hiload 26/60 column (GE Healthcare) equilibrated with buffer C (25 mM Tris-HCl pH7.5, 75 mM NaCl, 1 mM DTT, 300 µM ZnSO<sub>4</sub>). The purified proteins were vacuum-concentrated and kept at 4°C until use. Protein concentrations in the cell extracts were determined by Bradford assay using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin as a standard. The concentration of purified rP1 was determined by measuring absorbance at 280 nm using the calculated value of 31,315 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> with a Nanodrop spectrophotometer (Labsystem).

**Circular dichroism spectroscopy.** Far-UV CD spectra of reduced or oxidized rP1 (12 µM) were acquired at 20°C in 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.5, 300µM ZnSO<sub>4</sub> using a Chirascan circular dichroism spectrophotometer (Applied Photophysics Ltd, United Kingdom). Spectra were collected in the 190- to 250-nm wavelength range with a 1-nm increment in a 1-cm path length quartz cuvette using a scan speed of 20 nm/min with a time constant of 1 s. For all experiments, molar ellipticity was

calculated as described (31), and an average of three independent measurements was used.

**SDS-PAGE sample preparation and analysis.** For bacterial fraction analyses, samples were treated in Laemmli buffer (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 50 mM DTT, 7.5% glycerol, 0.003% bromophenol blue) and analyzed by SDS-PAGE in denaturing conditions using 15% acrylamide gels (37.5/1 ratio acrylamide:bis-acrylamide, 40%). Purified rP1 (25 µM) was analyzed similarly; non-reducing SDS-PAGE was also performed without DTT. rP1 under different redox conditions was incubated at 20°C for 45 min with either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or DTT at different concentrations (see Text) prior to SDS-PAGE analysis. Incubations were performed in different buffers depending on the experiment (see figure legends). Free thiols were detected by alkylation using 1.6 mM malPEG (32). For MS analysis, gels were incubated in 50 mM iodoacetamide for 30 min at 20°C in the dark. For zinc chelation, 20 mM EDTA was used to incubate rP1. After treatments, samples were boiled at 100°C for 5 min with Laemmli buffer, and rP1 isomers were separated by SDS-PAGE (37.5/1 ratio acrylamide:bis-acrylamide, 40%) in non-reducing conditions at 20°C. *In-gel* detection of zinc in rP1 after SDS-PAGE was performed using the zinc-complexing probe 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) according to Lee and Helmann (2006) (33). For plant protein analyses, samples were extracted in native conditions in an extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Triton, 25 mM glucose and 5% glycerol.

**Characterization of rP1 by native mass spectrometry.** Before mass spectrometry experiments, purified rP1 was buffer-exchanged against 50 mM ammonium acetate pH 8.0 (adjusted with ammonia) using microcentrifuge gel-filtration columns (Zeba 0.5 mL, ThermoScientific, Rockford, IL). Protein concentrations were determined with the Bradford assay using 2 g.L<sup>-1</sup> BSA standard solutions.

Native MS experiments were performed on a high-resolution electrospray quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Synapt G2, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated chip-based nanoelectrospray

device (TriversaNanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY). Calibration was performed with the multiply charged ions produced by 2  $\mu\text{M}$  horse heart myoglobin diluted in 1:1 (v:v) acetonitrile:water with 1% formic acid. Molecular mass, integrity and homogeneity of rP1 were first checked in denaturing conditions by diluting rP1 down to 2  $\mu\text{M}$  in 1:1 (v:v) acetonitrile:water acidified with 1% formic acid. Analyses in native conditions were carried out using 5  $\mu\text{M}$  rP1 in 50 mM ammonium acetate pH 8.0. Optimal acceleration voltages applied on the sample cone (Vc) and a well-adapted pressure in the interface (Pi) was used to preserve weak noncovalent interactions in the gas phase. For oxidation experiments, rP1 was incubated with 2.5 mM of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 45 minutes at room temperature. For EDTA treatment, rP1 was incubated overnight at 4°C with 20 mM EDTA and 1 mM DTT. For dynamic monitoring of zinc reversibility, EDTA-treated rP1 was incubated with 90  $\mu\text{M}$  zinc acetate addition. Characterization of rP1 cysteine carrying a free thiol was performed by treating of reduced rP1 with 1 molar equivalent of N-ethylmaleimide alkylating reagent (NEM). All samples were buffer-exchanged against ammonium acetate (50 mM, pH 8.0) using microcentrifuge gel-filtration columns (Zeba 0.5 mL, ThermoScientific, Rockford, IL) before MS analyses. ICP-MS analyses of rP1 are provided as Supplementary experimental procedures.

**Characterization of disulfide bridges by mass spectrometry.** Disulfide bridges were determined from SDS-PAGE bands of interest or liquid digestion with or without NEM treatment, subjected to alkylation and trypsin digestion and analyzed by MALDI-MS and microLC-MS. More details are provided as Supplementary experimental procedures.

**Fluorescence spectroscopy.** Tryptophan fluorescence was recorded using a TECAN Safire2 spectrophotometer (TECAN France, Lyon, France). Steady-state emission spectra of reduced and oxidized P1 were recorded between 305 and 420 nm after excitation at 295 nm with excitation and emission bandwidths set at 5 nm. For time-course measurements, 55  $\mu\text{L}$  of 5- $\mu\text{M}$  purified protein were rapidly mixed with 5  $\mu\text{L}$  of increasing

concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , with an excitation wavelength of 295 nm and an emission wavelength of 335 nm. Both excitation and emission bandwidths were set at 10 nm. The buffer solution for all measurements (60  $\mu\text{L}$ /well) consisted of Tris-HCl 25mM pH7.5, 75 mM NaCl and 100  $\mu\text{M}$  DTT at 20°C. All experiments were performed in triplicate. Time-course data analysis is detailed in supplementary experimental procedures.

**Measurement of Zinc<sup>2+</sup> release using PAR probe.** Zinc-binding domain reactivity was measured using the zinc-complexing PAR probe in 96-well plates. Reactions (100  $\mu\text{L}$ /well) contained increasing concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.25 to 25 mM), Tris-HCl 25mM pH7.5, 75 mM NaCl, 50  $\mu\text{M}$  PAR and 100  $\mu\text{M}$  DTT at 20°C. Reactions were initiated by rapid addition of 5  $\mu\text{M}$  rP1 and were followed at 497 nm using a microplate reader (TECAN Safire2) with the UV-vis absorbance module. Because DTT is a strong zinc chelator (34), possibly interfering with zinc binding at concentrations higher than 500  $\mu\text{M}$  in the presence of PAR (35), we performed a control experiment to evaluate the possibility that DTT competes with PAR for zinc chelation. In this control experiment, a gradient of DTT (10  $\mu\text{M}$  to 250  $\mu\text{M}$ ) was assayed in a solution containing 50  $\mu\text{M}$  PAR, 25 mM TrisHCl pH7.5, NaCl 75 mM and 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  and absorbance at 497 nm ( $A_{497}$ ) was measured. No significant decrease in  $A_{497}$  could be monitored after the addition of DTT up to 150  $\mu\text{M}$  values, indicating that DTT used at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  in our assays was unable to disturb the  $\text{Zn}(\text{PAR})_2$  complex formation. All experiments were performed in triplicate. For each experiment, the relative absorbance values were plotted on the standard curve in which a gradient of zinc (0-15  $\mu\text{M}$ ) was added to the reaction buffer without rP1. Time-course data analysis is detailed in the supplementary experimental procedures.

## RESULTS

**P1 is a zinc-binding protein.** P1 contains 7 cysteine residues and 6 histidines residues conserved in all RYMV isolates (Figure 1A). Cysteines are concentrated in two Cysteine Rich Regions (CRR1 and CRR2), which contain 4 and 3 cysteines, respectively. By sequence

homology modeling, we found that the CRR1 region presents similarities with the CxxC-type zinc finger (ZF) domains (Figure 1B) and is surrounded by uncharged and mostly aliphatic and aromatic residues are present in the P1 sequence (Figure 1B) as observed in most ZF proteins (26). The predicted CRR1 secondary structure (Figure 1A) resembles those encountered in zinc ribbon ZFs as well (26). Outside CRR1, the remaining P1 cysteine and histidine residues of P1, including those of CRR2, did not align with any known ZF proteins.

Experimental evidence for the presence of zinc in P1 came first when attempting to purify the recombinant P1 protein (noted as rP1) in *Escherichia coli*. Although expressed at high levels, rP1 primarily accumulated in insoluble fractions (Figure 2A, left panel) and was poorly detected in soluble extracts unless zinc was added to the bacterial cell growth medium. Moreover, zinc supplementation promoted rP1 solubility in a concentration-dependent manner, without affecting the total amount of rP1 expressed (Figure 2A, upper panels). Extracellular zinc was proportionally incorporated into rP1 protein, as revealed by the zinc-binding probe 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) (Figure 2A, right lower panel). During protein purification under native conditions, zinc remained associated to a monomeric form of rP1 throughout the procedure that included ion exchange chromatography and gel filtration (Figure S1A).

Purified rP1 protein exhibited a circular dichroism (CD) spectrum typical of a globular protein of mixed alpha/beta secondary structures (Figure S1B) that fitted with *in silico* predictions (Figure 1A). Characterization of rP1 by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) under denaturing conditions revealed a major species ( $17929.7 \pm 0.1$  Da) with a mass in perfect agreement with the theoretical molecular weight calculated from rP1 amino acid sequence (17929 Da), and a minor species ( $17798.9 \pm 0.5$  Da) that corresponded to rP1 trimmed of its N-terminal methionine (17798 Da) (Figure 2B upper spectrum). By native MS (36) we detected the presence of zinc in rP1 by revealing a major species at  $18055.9 \pm 1$  Da consistent with the theoretical mass of monomeric rP1 containing two bound zinc

atoms (18055 Da) (Figure 2, lower spectrum). This result was confirmed by an ICP-MS analysis of rP1 (Figure S2).

**Zinc-binding to rP1 involves six cysteine residues.** Residues that coordinate zinc are usually histidine, glutamine, asparagine and cysteine (37). *In silico* results suggested that the P1 CRR1 cysteine residues might form a zinc-finger like motif, but could not exclude that the cysteines and histidines in CRR2 formed also a zinc-binding motif. To test the importance of cysteine residues in zinc coordination, we treated rP1 with excess of the cysteine-reactive agent iodoacetamide (IAA) (rP1:IAA ratio = 1:2000). SDS-PAGE analysis showed that this treatment provoked a shift in rP1 electrophoretic mobility (Figure 3A, upper panel), and completely abolished PAR probe zinc detection (Figure 3A, lower panel), indicating that one or more Cys residues labeled by IAA contribute to zinc coordination. Analysis of tryptic peptides of IAA-treated rP1 by MALDI-TOF MS revealed that 6 Cys-containing peptides had a mass increase compatible with cysteine carbamidomethylation. The last Cys-containing peptide was too short (2 amino acids) to be detected by MALDI-TOF MS (Figure 3B, lower panel).

We next sought assessing the number of rP1 free Cys residues using the cysteine-alkylating agent malPEG (5 kDa) at the highest concentration that would not displace bound zinc atoms (rP1:malPEG ratio = 1:64), as established in preliminary titration experiments (not shown). Reaction of rP1 with malPEG produced a single additional SDS-PAGE band at an apparent molecular weight consistent with rP1 being alkylated by only one malPEG molecule (Figure 4A, upper panel), without affecting zinc-binding, as indicated by PAR labeling (Figure 4A, lower panel). Therefore, at least one out of the 7 rP1 Cys residues is in the free thiol form, while the other six remain inaccessible to malPEG modification due either to steric hindrance or to zinc-binding. Denaturing ESI-MS analysis of rP1 reacted with N-ethylmaleimide (rP1:NEM ratio = 1:1) showed that rP1 contained one NEM molecule ( $+125$  Da, measured molecular mass of  $18054.5 \pm 0.1$  Da) (Figure 4B, compare mid panel to upper panel). Further, native MS analysis confirmed that two zinc atoms still

remained bound to NEM-treated rP1 (Figure 4B, lower panel). Finally, microLC-MS analysis of tryptic fragments of NEM-treated rP1 that were reduced by DTT and alkylated by IAA revealed NAEISAC<sub>119</sub>NAR as the unique Cys-containing peptide carrying a NEM molecule (measured mass of 1173.52 Da) (Figure 4C), which indicate that in zinc-bound rP1, Cys 119 is in the free thiol form. Of note, except for Cys119, mutation of all other P1 cysteine residues lead to insoluble rP1 variants (data not shown), which suggest that all these residues, but Cys119, might bind zinc and/or contribute to the P1 structure.

By combining these data with those of the rP1 *in silico* analyses (see Figure 1A and B), it is now thus possible to predict the involvement of the rP1 cysteines residues in zinc-binding in two domains: the CRR1 zinc-binding domain comprising residues [C64-X<sub>2</sub>-C67-X<sub>24</sub>-C92-X<sub>2</sub>-C95], and a second possible zinc-binding domain CRR2, with atypical features (26), including residues in CRR2 [H109-X<sub>34</sub>-C140-X<sub>4</sub>-H145-X<sub>3</sub>-C149].

**rP1 possesses two zinc-binding sites of distinct affinity.** The release of zinc from rP1 was first investigated by competition with the metal chelator EDTA. As shown in Figure 4A, EDTA at 20 mM caused a clear rP1 SDS-PAGE electrophoretic mobility shift, indicating the occurrence of a conformational change. However rP1 was still labeled by PAR, but showing a lower intensity band, which indicates that rP1 still contains zinc, but in amount lower than in EDTA-unreacted protein (Figure 5A, lower panel). We next monitored EDTA-induced zinc release from rP1 by native MS. Addition of 20 mM EDTA led to partial zinc removal, and produced a major ion series corresponding to rP1 containing one zinc atom (measured mass 17991 ± 1 Da), and a minor one corresponding to rP1 with its two zinc ions (Figure 5B and 5C, middle spectrums). The presence of a distribution of charged states in the lower m/z range of the mass spectrum also indicated partial unfolding. Higher EDTA concentrations (up to 30 mM,  $K_{\text{EDTA}} \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ) could not induce complete zinc release (data not shown), suggesting that one of the zinc atoms is tightly bound to the protein. Finally, when the EDTA-treated rP1 was incubated with 90 μM zinc acetate, the equilibrium was displaced

towards the formation of the species containing two zinc atoms, as shown by native MS. Interestingly, zinc re-binding was accompanied by a nearly complete disappearance of the ion distribution in the lower m/z range of the ESI mass spectrum, indicating the concomitant refolding of the partially unfolded protein (Figures 5B and 5C, lower spectra).

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced rP1 oxidation leads to total zinc release and disulfide formation.** Since P1 is synthesized during RYMV infection, it might be exposed to reactive oxygen species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that may impact protein structure and function. We therefore analyzed the influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on rP1 conformation.

Upon incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 5 mM, rP1 SDS-PAGE migration was shifted from a unique band to several slower migrating species. However, zinc was not detected in any of the P1 migrating species, in contrast to what was observed after EDTA treatment (Figure 6A, second lane). When H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidized rP1 was treated with 10 mM DTT, it recovered both the zinc-binding and the electrophoretic properties of reduced rP1 (Figure 6A, third lane). Denaturing ESI-MS analysis of an rP1 sample treated with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> confirmed the existence of higher covalent oligomeric forms. In addition to monomeric oxidized rP1 (17927.5 ± 0.3 Da), dimeric (35854.3 ± 0.3 Da) and trimeric (quite minor species, 53781.6 ± 0.6 Da) rP1 forms were detected (Figure 6B). These data account for the formation of both intra-molecular disulfide bridges (loss of 2 Da in the monomeric form compared to reduced rP1) and inter-molecular disulfide bridges. Analyses of proteolytic peptides obtained from oxidized rP1 revealed the presence of 5 disulfide bridges (Figure 6C). Those engaging the Cys64-Cys67 and Cys92-Cys95 residue pairs were intra-molecular, whereas those engaging Cys119, Cys140 and Cys149 could be either intra- or inter-molecular. No disulfide bonds were detected between the two peptides comprising Cys64/Cys67 and Cys92/Cys95.

Non-reducing SDS-PAGE titrations of rP1 reacted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations from 30 μM up to 8 mM, showed that 1mM was sufficient to provoke full Zn release (rP1:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ratio = 1:40, Figure 7A). However, change in rP1 oligomeric state was only detected

starting from 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rP1:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ratio = 1:80, Figure 7A). The reactivity of rP1 towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was further assessed by measuring zinc release measured by spectrophotometry at 497 nm using the PAR assay. In this experiment 5 μM of the protein was titrated against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations ranging from 27 μM to 25 mM. Figure 7B shows that Zn release is accelerated when increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. From pseudo first-order kinetics fitting (Supplementary Equation 1), we obtained a Zn release rate constant of  $0.08 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Upon reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zinc release and protein oxidation of the model redox-regulated zinc-binding protein Hsp33 is seen at a protein:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ratio of 1:40 (38), which appears similar to the one established for P1. However, in the case of P1, this response is seen at 20°C, whereas in the case of Hsp33, reactivity is only observed when the experimental temperature is augmented up to 43°C.

**P1 oxidation leads to secondary and tertiary structure modifications.** All P1 proteins among RYMV isolates contain four conserved tryptophan (Trp) residues that can be used as sensitive probes of conformational changes (39). We found that the total intensity of rP1 Trp fluorescence spectra dramatically decreased upon oxidation (Figure 7C), suggesting a major change in the tertiary structure of rP1. Because the zinc release rate was directly correlated with increasing oxidant concentrations, we next studied the kinetics of the conformational changes reported by Trp fluorescence. Trp fluorescence decreased following a single-exponential behavior with time-course coefficients in the same order of magnitude of zinc release rate constant obtained from zinc release quantified with the PAR assay. The single exponential describing the fluorescence changes suggests a “two-state” mechanism of conformational change (P1<sub>red</sub> to P1<sub>ox</sub>) independent of oxidant concentration. Finally, the assessment of secondary structure changes monitored by circular dichroism showed that an important decrease in the helical content also occurred upon rP1 oxidation (Figure 7D and Table S2).

## DISCUSSION

The mechanisms whereby RNAi suppressors and activators perform their multiple functions remain largely uncharacterized, first because they belong to very different protein families despite their common VSR function, and second because of insufficient information regarding their biochemical and structural properties. In this paper we have analyzed the biochemical features of the RYMV-encoded VSR P1. This protein operates both as a local suppressor (13) and as a systemic activator (14) of RNA silencing, and has several other activities in viral and host cellular machineries (13, 15). As it belongs to the class of Cys-rich VSRs, better knowledge acquired on this Cys-VSR could also improve our understanding of the mechanisms whereby other VSRs interact with viral and host cell machineries. Our main goals were to acquire information about the biochemical features of P1 and to investigate how these biochemical/biophysical properties might provide the basis for a possible regulation of the protein by a change of conformation. We show that the Cys-rich VSR P1 binds two zinc atoms with different affinity and demonstrate that zinc-binding and release occur in a reversible, redox-dependent manner. We also show that zinc release provoked by oxidizing environments generates conformational changes in P1.

That P1 could bind zinc atoms was initially suggested by Bonneau et al. (1998) (12), but had not been demonstrated until now, due to the difficulty in obtaining soluble protein for biochemical analyses. The two key modifications of the procedure used by Bonneau et al (12) were first to extract and purify rP1 in the presence of DTT, and second to supply ZnSO<sub>4</sub> during bacterial growth all along the rP1 biosynthesis process. These modifications allowed the production of high amounts of soluble rP1, and provided a first indication of the key structural role of zinc in P1. By mass spectroscopy we next established that P1 binds two zinc atoms. Displacement of only one atom of zinc upon reacting millimolar amounts of EDTA ( $K_{\text{EDTA}} \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ) with micromolar amounts of rP1 indicates that one of the two atoms is bound with a constant significantly higher than  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ . Interestingly, both zinc atoms were released

upon reacting rP1 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a ratio of 1:40, suggesting that release of the first low affinity binding atom and the ensuing oxidation of the protein leads to a conformation change that destabilize the EDTA-resistant high affinity binding zinc atom. In contrast to Hsp33, a model zinc-binding redox regulated prokaryotic chaperone, in which an elevated temperature of 43°C is needed for the release of zinc and the oxidation of the protein by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (38), P1 zinc release and oxidation occurred at the low temperature of 20°C. Such difference between P1 and Hsp33 might be due to the presence of the low affinity zinc-binding site in the former protein that favors the reaction of its cysteine residues with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This study enlightens the role of P1 cysteines zinc coordination. *In silico* analyses predicted the presence of at least one zinc-binding domain in CRR1 of the form [C64-X<sub>2</sub>-C67-X<sub>24</sub>-C92-X<sub>2</sub>-C95]. This motif is also found in zinc ribbon TFIIS and ZF transcription factors, which carries, as P1, conserved uncharged aromatic and aliphatic residues in its close vicinity (26 and Table S1). The second predicted zinc-binding site in CRR2 is more atypical and comprises residues in the long C-terminal region containing the [H109-X<sub>34</sub>-C140-X<sub>4</sub>-H145-X<sub>3</sub>-C149] stretch. The occurrence of an atypical zinc-binding site is not uncommon as other atypical zinc-binding domains have also been described in other viral proteins such as Ncp7 (40) and the HIV virus VSR Tat (41, 42). The analysis of several cysteine and histidine mutant P1 proteins is currently under progress to investigate the role of individual residues in zinc-binding. Another major result of the present study is the demonstration that rP1 can undergo several redox-dependent conformational changes *in vitro*. They include reduced monomeric and oxidized monomeric and oligomeric forms associated with zinc-binding and zinc release, respectively. Interestingly, different electrophoretic mobility in forms of P1 were observed in RYMV infected rice (12) that could correspond to the redox conformers obtained here upon protein oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We found that part of the complex P1 patterns in RYMV-infected leaves as observed in non-reducing SDS-PAGE (Supplementary results section and Figure S3) corresponded to different oxidized states of P1, most probably exhibiting different disulfide bond

organization. Several Cys-rich viral proteins including VSRs have been also described as multimeric bands during *in vitro* or *in vivo* analyses (16, 43-46), but no link with their redox state was demonstrated except for Tat whose redox state was found to play a direct role on its functions (46-49). Interestingly, some of these works highlight the role of key cysteine residues for VSR and other viral functions (16, 46). As for P1 and Tat, redox modifications associated with zinc-binding and zinc release could be a general feature common to many Cys-rich VSRs.

Redox polymorphic structural rearrangements such as those observed for P1 have been proposed to generate functional multiplicity (50) and could provide several advantages to VSRs. The production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) (51-53) is among the earliest events following pathogen recognition. In plants, quantitative components of ROS signalling monitor several resistance mechanisms against pathogens, including a programmed cell death termed hypersensitive response (54) and a systemic acquired resistance (55). A key player in ROS signalling networks in both mammalian and plant cells is NADPH oxidase (NOX), which contributes to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pathogen infections (53, 55). While the intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration ranges from 1 to 100 µM in plants cultured under standard conditions (56), it was reported that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production could be increased by 3 to 20 times its initial concentration upon pathogen infection (57; 58). Consequently, a high content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and of others ROS and RNS compounds influences dithiol/disulfide balance in both host and pathogenicity proteins. Host inflammatory and immune responses have been shown to modulate positively or negatively several viral functions, such as virion assembly and maturation (59-61), host entry and infectivity (62, 63), replication (64, 65), as well as transactivation (24, 66, 67). Our biochemical study shows the ability of the VSR P1 to switch from a reduced, zinc-bounded monomeric form to complex oxidized monomers and oligomers in the presence H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations compatible with that observed during pathogen infections (above 500 µM considering a P1 concentration of 25 µM, Supplemental Figure S3), with conformational changes detected by spectral

studies even at lower levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This suggests a potential role of the cellular redox state on structural and most probably functional regulations of P1 in an infection context. This protein is likely to constitute a new class of zinc-binding proteins, acting as a redox-reactive protein capable of conformational switches in response to environmental redox imbalances. Future investigations are now needed to establish the processes whereby cellular redox imbalances modify the functions of P1. Several proteins capable of sensing redox imbalances rapidly, such as OxyR and Yap1 factors (68) and the zinc-binding proteins Hsp33 and RsrA (69) are known to exhibit the property of switching from one function to another. Whether P1 could exhibit such a redox sensor property also needs to be assessed.

### Acknowledgments

The authors thank Dr. Michel Toledano for insightful discussions and for his helpful critical revision of the manuscript. We are also grateful to Gilles Labesse for *in silico* expertise. The authors also thank Dr. Bertrand Chaumande and Prof. Laurence Sabatier for ICP-MS analyses.

### Supporting information

Supplemental experimental procedures: Characterization of disulfide bridges in P1 by mass spectrometry; time-course analysis of zinc release by PAR detection and of P1 conformational changes by Trp fluorescence measurements.

Supplemental results: rP1 purification (Figure S1); ICP-MS analysis of rP1 (Figure S2); P1 redox patterns during rice seedling infection by RYMV (Figure S3). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

### REFERENCES

- (1) Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants, *Nature* 431, 356–363.
- (2) Vaucheret, H. (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations, *Genes Dev.* 20, 759–771.
- (3) Chapman, E. J., and Carrington, J. C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways, *Nat. Rev. Genet.* 8, 884–896.

- (4) Wutz, A. (2011) RNA-mediated silencing mechanisms in mammalian cells, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 101, 351–376.
- (5) Ding, S.-W., and Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs, *Cell* 130, 413–426.
- (6) Song, L., Gao, S., Jiang, W., Chen, S., Liu, Y., Zhou, L., and Huang, W. (2011) Silencing suppressors: viral weapons for countering host cell defences, *Protein Cell* 2, 273–281.
- (7) Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing, *J. Virol.* 80, 5747–5756.
- (8) Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J. M. J., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V. B. (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants, *Science* 290, 142–144.
- (9) Zhang, X., Yuan, Y.-R., Pei, Y., Lin, S.-S., Tuschl, T., Patel, D. J., and Chua, N.-H. (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense, *Genes Dev.* 20, 3255–3268.
- (10) Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., and Masuta, C. (2007) Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities, *Plant cell physiol.* 48, 1050–1060.
- (11) Abo, M. E., Alegbejo, M. D., Sy, A. A., and Misari, S. M. (2000) An Overview of the Mode of Transmission, Host Plants and Methods of Detection of Rice Yellow Mottle Virus, *J. Sustain. Agr.* 17, 19–36.
- (12) Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R. N., and Fauquet, C. (1998) Expression of the rice yellow mottle virus P1 protein in vitro and in vivo and its involvement in virus spread, *Virology* 244, 79–86.
- (13) Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14147–14152.
- (14) Lacombe, S., Bangratz, M., Vignols, F., and Brugidou, C. (2010) The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing, *Plant J.* 61, 371–382.
- (15) Siré, C., Bangratz-Reyser, M., Fargette, D., and Brugidou, C. (2008) Genetic diversity and silencing suppression effects of Rice yellow mottle virus and the P1 protein, *Virol. J.* 5, 55.
- (16) Yang, X., Baliji, S., Buchmann, R. C., Wang, H., Lindbo, J. A., Sunter, G., and Bisaro, D. M. (2007) Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction, *J. Virol.* 81, 11972–11981.
- (17) Valli, A., Dujovny, G., and García, J. A. (2008) Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor p1b from cucumber vein yellowing ipomovirus, *J. Virol.* 82, 974–986.

- (18) Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E. J., Veluthambi, K., Hohn, T., and Pooggin, M. M. (2005) Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes, *J. Virol.* *79*, 2517–2527.
- (19) Van Wezel R., Liu, H., Wu, Z., Stanley, J., and Hong, Y. (2003) Contribution of the Zinc Finger to Zinc and DNA Binding by a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing, *J. Virol.* *77*, 696–700.
- (20) Rakitina, D. V., Yelina, N. E., and Kalinina, N. O. (2006) Zinc ions stimulate the cooperative RNA binding of hordeiviral gammab protein, *FEBS Lett.* *580*, 5077–5083.
- (21) Valli, A., Dujovny, G., and García, J. A. (2008) Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor p1b from cucumber vein yellowing ipomovirus, *J. Virol.* *82*, 974–986.
- (22) Van Wezel R., Dong, X., Liu, H., Tien, P., Stanley, J., and Hong, Y. (2002) Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression, *Mol. Plant Microbe Interact.* *15*, 203–208.
- (23) Donald, R. G., and Jackson, A. O. (1996) RNA-binding activities of barley stripe mosaic virus gamma b fusion proteins, *J. Gen. Virol.* *77*, 879–888.
- (24) Aras, S., Singh, G., Johnston, K., Foster, T., and Aiyar, A. (2009) Zinc coordination is required for and regulates transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1, *PLoS Pathog.* *5*, e1000469.
- (25) Garber, M. E., Wei, P., Kewal Ramani, V. N., Mayall, T. P., Herrmann, C. H., Rice, A. P., Littman, D. R., and Jones, K. A. (1998) The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein, *Genes Dev.* *12*, 3512–3527.
- (26) Krishna, S. S. (2003) Structural classification of zinc fingers: SURVEY AND SUMMARY, *Nucleic Acids Res.* *31*, 532–550.
- (27) Craik, D.J. (2011) The folding of disulfide-rich peptides, *Antioxid. Redox Sign.* *14*, 61–64.
- (28) Maret, W., and Li, Y. (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins, *Chem. Rev.* *109*, 4682–4707.
- (29) Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J. (2004) The PredictProtein server, *Nucleic Acids Res.* *32*, W321–6.
- (30) Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, *J. Mol. Biol.* *302*, 205–217.
- (31) Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* *1751*, 119–139.
- (32) Makmura, L., Hamann, M., Areopagita, A., Furuta, S., Muñoz, A., and Momand, J. (2001) Development of a sensitive assay to detect reversibly oxidized protein cysteine sulfhydryl groups, *Antioxid. Redox Sign.* *3*, 1105–1118.
- (33) Lee, J.-W., and Helmann, J. D. (2006) Biochemical characterization of the structural Zn<sup>2+</sup> site in the Bacillus subtilis peroxide sensor PerR, *J. Biol. Chem.* *281*, 23567–23578.
- (34) Cornell, N. W., and Crivaro, K. E. (1972) Stability constant for the zinc-dithiothreitol complex, *Anal. Biochem.* *47*, 203–208.
- (35) Zhou, Z. S., Peariso, K., Penner-Hahn, J. E., and Matthews, R. G. (1999) Identification of the zinc ligands in cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from Escherichia coli, *Biochemistry* *38*, 15915–26.
- (36) Potier, N., Rogniaux, H., Chevreux, G., and Van Dorsselaer, A. (2005) Ligand-metal ion binding to proteins: investigation by ESI mass spectrometry, *Methods Enzymol.* *402*, 361–389.
- (37) Auld, D. S. (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites, *BioMetals* *14*, 271–313.
- (38) Ilbert, M., Horst, J., Ahrens, S., Winter, J., Graf, P. C. F., Lilie, H., and Jakob, U. (2007) The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 556–563.
- (39) Beechem, J. M., and Brand, L. (1985) Time-resolved fluorescence of proteins, *Annu. Rev. Biochem.* *54*, 43–71.
- (40) Roques, B. P., Morellet, N., de Rocquigny, H., Déméné, H., Schueler, W., and Jullian, N. (1997) Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7, *Biochimie* *79*, 673–680.
- (41) Tahirov, T. H., Babayeva, N. D., Varzavand, K., Cooper, J. J., Sedore, S. C., and Price, D. H. (2010) Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb, *Nature* *465*, 747–751.
- (42) Huang, H. W., and Wang, K. T. (1996) Structural characterization of the metal binding site in the cysteine-rich region of HIV-1 Tat protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *227*, 615–621.
- (43) Yelina, N. E., Erokhina, T. N., Lukhovitskaya, N. I., Minina, E. A., Schepetilnikov, M. V., Lesemann, D.-E., Schiemann, J., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2005) Localization of Poa semilatifolia virus cysteine-rich protein in peroxisomes is dispensable for its ability to suppress RNA silencing, *J. Gen. Virol.* *86*, 479–489.
- (44) Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O., and Richards, K. E. (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus, *Plant J.* *29*, 555–567.
- (45) Ruiz-Ferrer, V., Goytia, E., Martínez-García, B., López-Abella, D., and López-Moya, J. J. (2004) Expression of functionally active

helper component protein of Tobacco etch potyvirus in the yeast *Pichia pastoris*, *J. Gen. Virol.* **85**, 241–249.

(46) Pierleoni, R., Menotta, M., Antonelli, A., Sfara, C., Serafini, G., Dominici, S., Laguardia, M. E., Salis, A., Damonte, G., Banci, L., Porcu, M., Monini, P., Ensoli, B., and Magnani, M. (2010) Effect of the redox state on HIV-1 tat protein multimerization and cell internalization and trafficking, *Mol. Cell. Biochem.* **345**, 105–118.

(47) Campbell, G. R., and Loret, E. P. (2009) What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine?, *Retrovirology* **6**, 50.

(48) Cohen, S. S., Li, C., Ding, L., Cao, Y., Pardee, A. B., Shevach, E. M., and Cohen, D. I. (1999) Pronounced acute immunosuppression in vivo mediated by HIV Tat challenge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10842–10847.

(49) Tosi, G., Meazza, R., De Lerma Barbaro, A., D'Agostino, A., Mazza, S., Corradin, G., Albini, A., Noonan, D. M., Ferrini, S., and Accolla, R. S. (2000) Highly stable oligomerization forms of HIV-1 Tat detected by monoclonal antibodies and requirement of monomeric forms for the transactivating function on the HIV-1 LTR, *Eur. J. Immunol.* **30**, 1120–1126.

(50) Fan, S. W., George, R. A., Haworth, N. L., Feng, L. L., Liu, J. Y., and Wouters, M. A. (2009) Conformational changes in redox pairs of protein structures, *Protein. Sci.* **18**, 1745–1765.

(51) Kotchoni, S. O., and Gachomo, E. W. (2006) The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants, *J. Biosci.* **31**, 389–404.

(52) Forman, H. J., and Torres, M. (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signalling, *Amer. J. Resp. Crit. Care Med.* **166**, S4–8.

(53) Jiang, F., Zhang, Y., and Dusting, G. J. (2011) NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair, *Pharmacol. Rev.* **63**, 218–242.

(54) Levine, A., Tenhaken, R., and Lamb, C. (1994) H2O2 from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response, *Cell* **79**, 583–593.

(55) Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., and Mittler, R. (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signalling, *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 691–699.

(56) Foyer, C. H., and Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant cell* **17**, 1866–1875.

(57) Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells, *Plant physiol.* **143**, 1817–1826.

(58) Torres, M. A., Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. (2002) AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 517–522.

(59) Cobbold, C., Windsor, M., Parsley, J., Baldwin, B., and Wileman, T. (2007) Reduced redox potential of the cytosol is important for African swine fever virus capsid assembly and maturation, *J. Gen. Virol.* **88**, 77–85.

(60) Záborská, H., Tůma, R., Kluch, I., Svatos, A., Ruml, T., Hrabal, R., and Pichová, I. (2007) The role of the S-S bridge in retroviral protease function and virion maturation, *J. Mol. Biol.* **365**, 1493–1504.

(61) Senkevich, T. G., White, C. L., Koonin, E. V., and Moss, B. (2002) Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6667–6672.

(62) Conway, M. J., Cruz, L., Alam, S., Christensen, N. D., and Meyers, C. (2011) Differentiation-dependent interpentameric disulfide bond stabilizes native human papillomavirus type 16, *PLoS One* **6**, e22427.

(63) Jain, S., McGinnes, L. W., and Morrison, T. G. (2009) Role of thiol/disulfide exchange in Newcastle disease virus entry, *J. Virol.* **83**, 241–249.

(64) Valyi-Nagy T, and Dermody, T. S. (2005) Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system, *Histol. Histopathol.* **20**, 957–967.

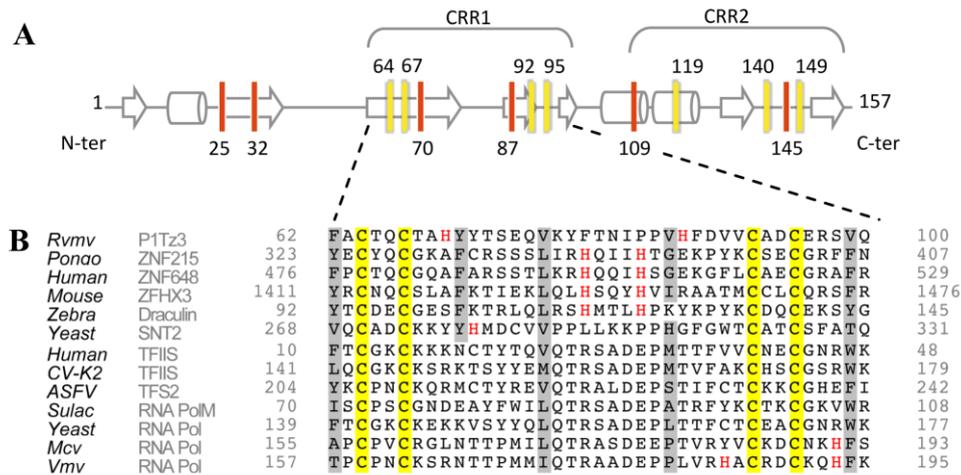
(65) Voehler, M. W., Eoff, R. L., McDonald, W. H., Guengerich, F. P., and Stone, M. P. (2009) Modulation of the structure, catalytic activity, and fidelity of African swine fever virus DNA polymerase X by a reversible disulfide switch, *J. Biol. Chem.* **284**, 18434–18444.

(66) Sahaf, B., Atkuri, K., Heydari, K., Malipatlolla, M., Rappaport, J., Regulier, E., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (2008) Culturing of human peripheral blood cells reveals unsuspected lymphocyte responses relevant to HIV disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5111–5116.

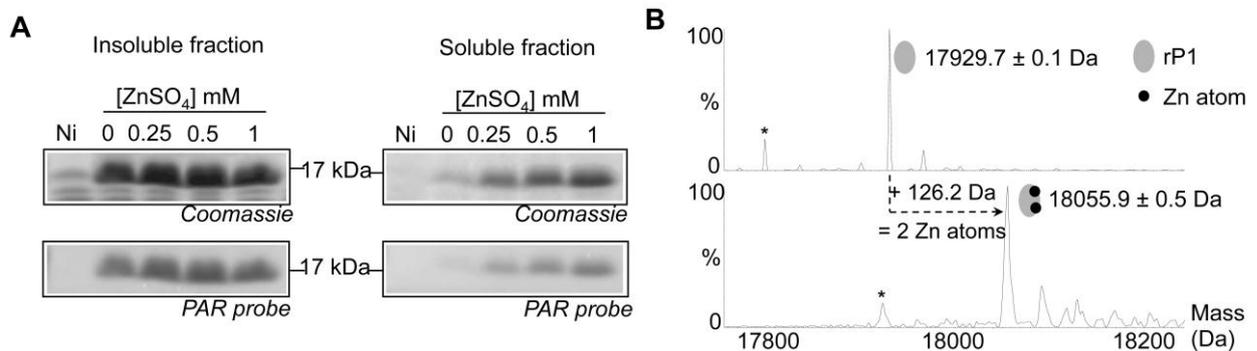
(67) Washington, A. T., Singh, G., and Aiyar, A. (2010) Diametrically opposed effects of hypoxia and oxidative stress on two viral transactivators, *Virol. J.* **7**, 93.

(68) Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004) Microbial H2O2 sensors as archetypical redox signaling modules, *Trends Biochem. Sci.* **29**, 351–357.

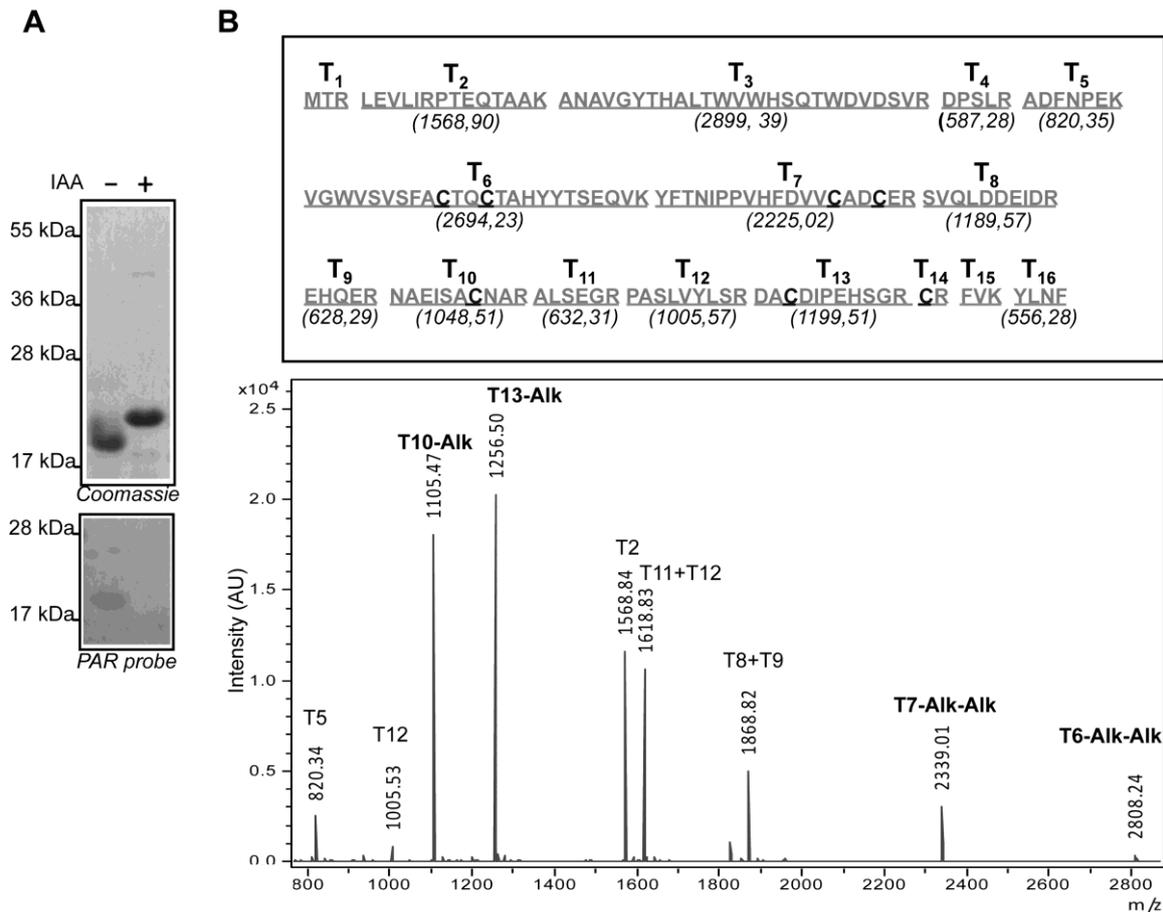
(69) Ilbert, M., Graf P. F. and Jakob U. (2006) Zinc center as redox switch – new function for an old motif. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 835–846.



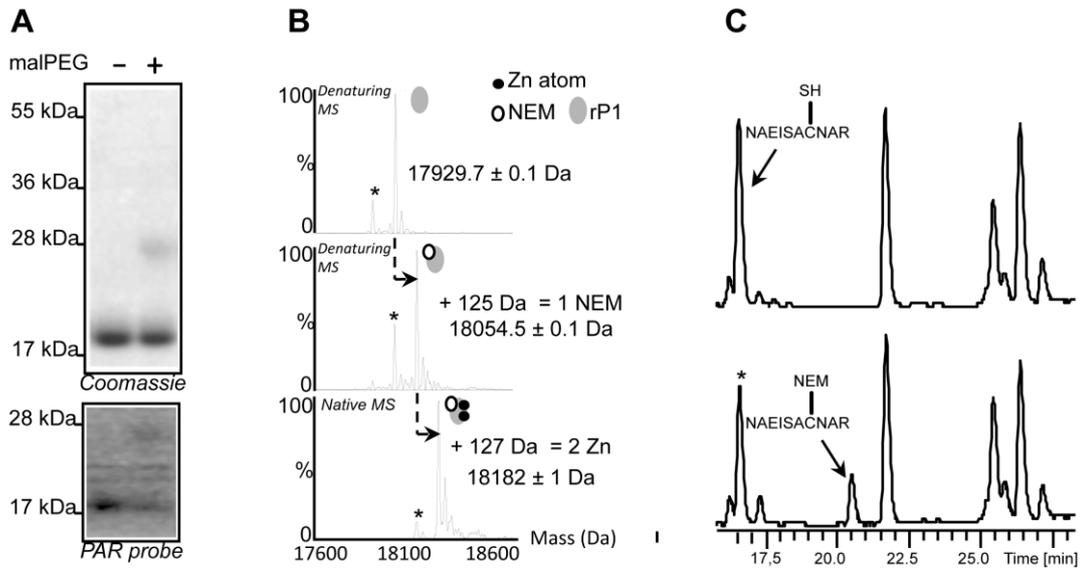
**Figure 1. *In silico* analysis of the RYMV-encoded P1.** (A) Positions of conserved cysteines (yellow) and histidines (red) in RYMV P1 isolates and secondary structure prediction. The two Cysteine Rich Regions (CRR1 and CRR2) are indicated. Beta-strands are displayed as arrows and alpha-helices as cylinders. (B) Alignment of P1 CRR1 primary sequence with representative protein sequences of zinc finger fold groups. UniProtKB entry names and related starting and ending residue numberings are indicated. Uncharged residues surrounding zinc coordination site (all amino acids except D,E,K,R) in mostly hydrophobic sites and common to zinc finger groups are highlighted in grey. UniProtKB accession numbers are given in Table S1.



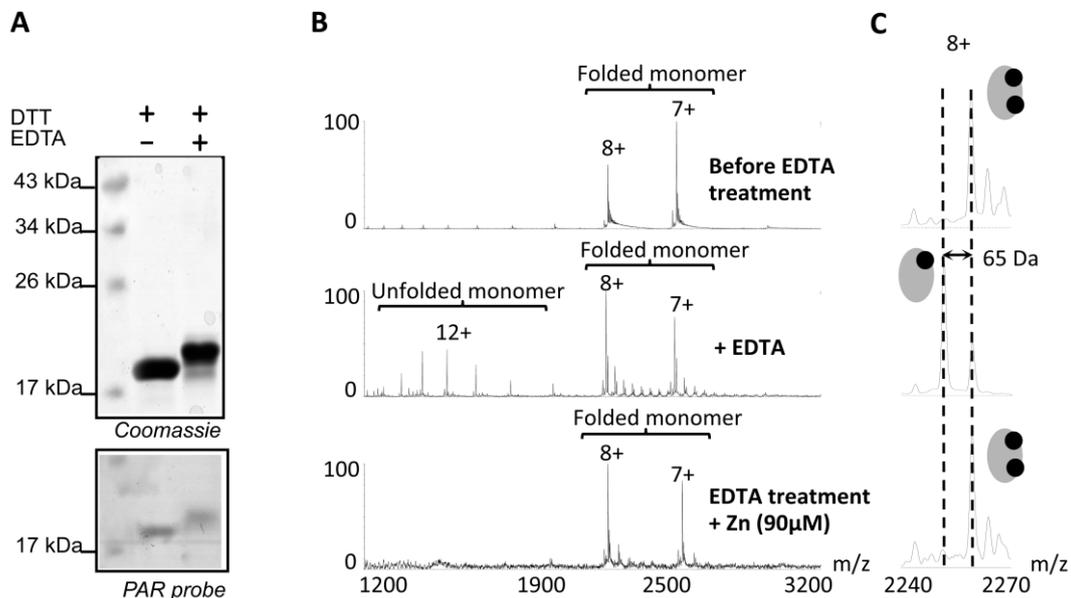
**Figure 2. rP1 is a zinc-binding protein.** (A) SDS-PAGE analysis (upper panels) showing that extracellular zinc supplied as  $ZnSO_4$  incorporates into rP1 during production in *E. coli* and promotes rP1 solubility. rP1 protein produced in BL21 strain in the absence of  $ZnSO_4$  mostly accumulated in insoluble fractions (left upper panel) whereas very low protein amounts were detected in the soluble fractions (right upper panel). Increasing  $ZnSO_4$  concentration up to 1 mM during bacterial culture greatly enhanced rP1 accumulation in soluble fractions. Zinc detection using the PAR probe indicates that zinc detection co-localizes with rP1 (lower panels). Ni: Cells carrying an empty pET3b vector. (B) Deconvoluted ESI mass spectra obtained under denaturing conditions (upper spectrum) and native conditions (lower panel). Mass difference between denaturing and native rP1 corresponds to 2 Zinc atoms binding to rP1 (126.2 Da). Asterisks indicate the detection of minor rP1 without its N-terminal methionine (-131 Da).



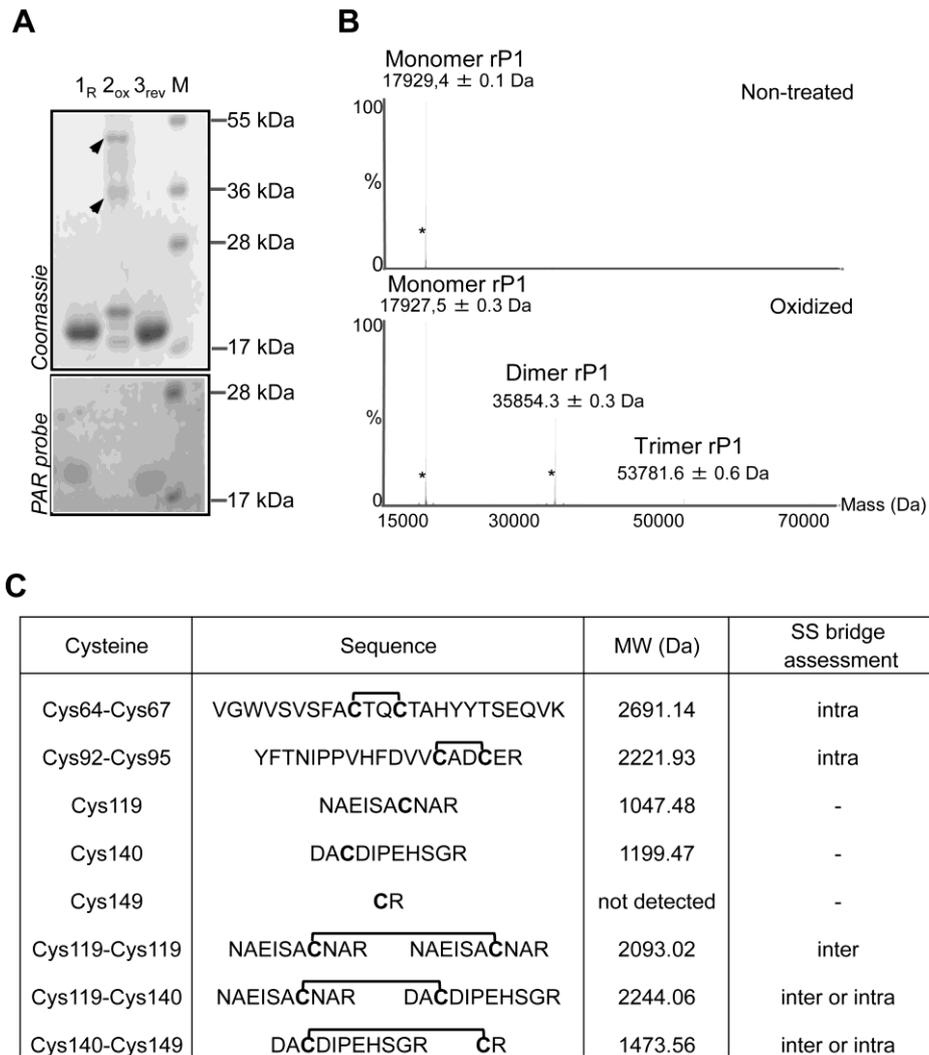
**Figure 3. Six cysteines of rP1 are involved in zinc-binding.** (A) SDS-PAGE of purified rP1 (lane 1) treated with 50 mM IAA (lane 2). IAA treatment of rP1 induces a change in its electrophoretic mobility and in zinc release. The gel was stained with Coomassie blue (Upper Panel) or using the PAR probe (lower panel). (B) Maldi-TOF MS analysis of rP1 after thiol labeling by IAA. Upper panel shows tryptic fragments (from T1 to T16) mapping to rP1. Peptides T1, T14 and T15 remained undetectable. Lower panel shows Maldi-TOF MS spectrum of rP1 prior to IAA treatment. Peptides T10 (containing Cys119), T13 (containing Cys140), T7 (containing Cys92 and Cys95) and T6 (containing Cys64 and Cys67) display a 114 Da mass increase by comparison with their respective calculated mass values, that corresponds to a carboxyamidomethylation of reduced Cys (marked Alk for each modified cysteine). Dipeptide T14 (containing Cys149) was undetectable but observations converge to suggest that Cys149 is also reduced when rP1 binds zinc atoms: a majority of rP1 was firstly observed as a monomer when treated with IAA (Figure A) suggesting lower intermolecular disulfide bond formation in this condition. Secondly, all other cysteines were detected as free thiols suggesting that cys149 could not be involved in intramolecular disulfide bond formation.



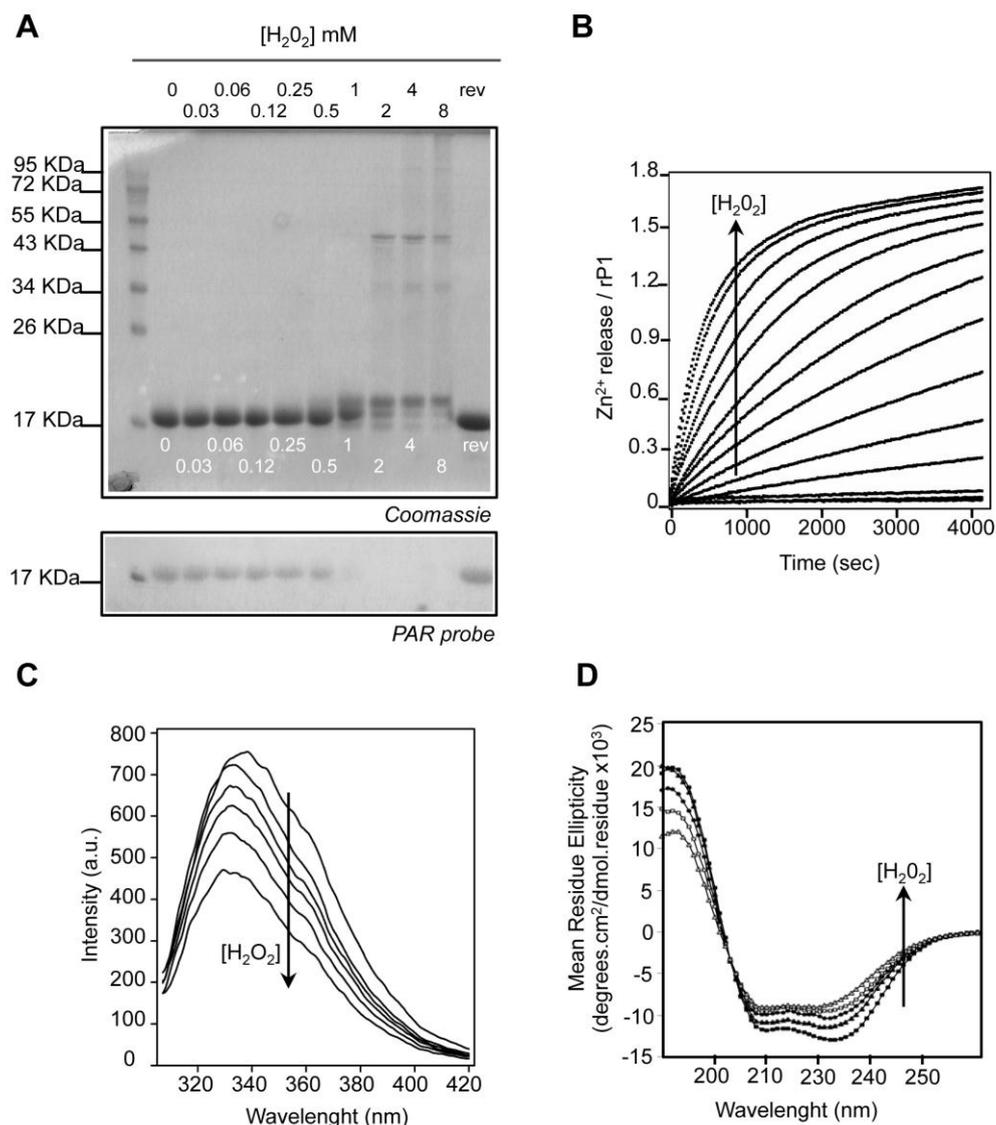
**Figure 4. Reduced rP1 contains one free Cys residue.** (A) SDS-PAGE of purified rP1 (control, lane 1) treated with 1.6 mM of malPEG (lane 2). MalPEG treatment of rP1 induces a change in its electrophoretic mobility. (B) Deconvoluted denaturing mass spectra of rP1 before (upper panel) or after (middle panel) NEM treatment (1:1 ratio). The mass difference between the upper and middle panel corresponds to the binding of 1 NEM molecule. Deconvoluted native mass spectrum of rP1 after NEM treatment is presented in the lower panel: 2 zinc ions are still detected after NEM treatment. Asterisks indicate the detection of minor rP1 without its N-terminal methionine (-131 Da). (C) MicroLC-MS identification of the free Cys residue after NEM treatment. microLC chromatograms are presented before (upper panel) and after (lower panel) NEM treatment, indicating the detection of the NEM-labeled NAEISAC<sub>(NEM)</sub>NAR peptide with a retention time of 20.5 min.



**Figure 5. Zinc-binding in rP1 is a reversible process.** (A) SDS-PAGE rP1 reduced with 5 mM DTT or treated with 20 mM EDTA (upper panel) and colocalization of zinc with rP1 revealed by PAR probe (lower panel). (B) Native ESI mass spectra of reduced rP1 (upper spectrum), reduced rP1 sample treated with 20 mM EDTA (middle panel), and EDTA-treated rP1 samples after addition of 90  $\mu$ M zinc acetate addition (lower panel). Right-hand panels correspond to enlargements of 8+ charge states of full-scale mass spectra.



**Figure 6. Effect of different redox environments on rP1 conformations.** (A) SDS-PAGE colocalization analysis of rP1 revealed by Coomassie blue staining (upper panel) and using the PAR probe (lower panel). rP1 treated with 1 mM DTT (lane 1R), 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lane 2ox), or 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during 45min followed by 5 mM DTT addition (lane 3rev). (B) ESI-MS detection of rP1 oligomeric forms. Deconvoluted rP1 ESI mass spectra obtained under denaturing conditions of reduced rP1 (upper spectrum) or after rP1 treatment with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lower panel): reduced rP1 appeared as a unique monomeric form, whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidized rP1 formed covalent dimers and trimers. Asterisks indicate the detection of minor rP1 without its N-terminal methionine (-131 Da). (C) Identification of peptides containing disulphide bridges by proteomic analysis. Proteolytic peptides containing cysteines residues identified and position of disulfide bonds (intramolecular or intermolecular) in rP1 are summarized in the table.



**Figure 7. Kinetics of Zinc release and structural changes upon oxidation of rP1.** Increasing concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were added to rP1 at  $20^\circ\text{C}$ . (A) rP1 conformation sensitivity towards low concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . rP1 was dialyzed overnight against a DTT-free buffer (lane 1), and treated with increasing concentrations (from  $30\ \mu\text{M}$  to  $8\ \text{mM}$ ) of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 20 min at  $20^\circ\text{C}$ . Samples were then analyzed by SDS-PAGE in a 15% acrylamide gel and stained with Coomassie blue (upper panel) and with PAR (lower panel). The Rev 7 lane shows conformational reversion of oxidized rP1 (treated with  $2\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$ ) following a treatment with  $10\ \text{mM}\ \text{DTT}$  for 15 min at  $20^\circ\text{C}$ . (B) Zinc release time-courses versus  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration (from  $27\ \mu\text{M}$  to  $25\ \text{mM}$ ). (C) Changes in the Trp fluorescence spectra of rP1 upon oxidation. (D) CD spectra of reduced and oxidized rP1. The quantification of alpha-helix changes upon oxidation is detailed in Supporting Table 2.

## Chapitre 2 : Étude d'un complexe protéine/acides nucléiques : le système TGT/ARN

Les interactions protéine/acides nucléiques jouent un rôle crucial dans divers processus biologiques (transcription, traduction, transports vers des compartiments cellulaires spécifiques, etc.). Plusieurs techniques biochimiques ont été développées pour permettre l'étude de ces interactions comme : l'analyse de complexes par retard sur gel<sup>308</sup> (*electrophoretic shift mobility assay*), par empreinte<sup>22</sup> (*foot printing*) ou par co-immunoprécipitation<sup>309</sup> (*RNA pull down assay*). La MS intervient également comme une technique d'analyse des interactions protéine/acides nucléiques. Une analyse par MS moléculaire va permettre d'identifier les partenaires protéiques ayant une affinité pour un acide nucléique cible et de caractériser les sites d'interactions protéine/acides nucléiques<sup>310,311</sup>. Une fois les partenaires identifiés, une analyse par MS supramoléculaire permettra de détecter en conditions natives les complexes protéine/acides nucléiques, mais aussi de déterminer leur stœchiométrie et spécificité d'interaction ainsi que leurs affinités en phase gazeuse<sup>190</sup>.

L'étude des interactions protéine/acides nucléiques par MS supramoléculaire sera abordée au travers de l'étude de la *tRNA-guanine transglycosylase* (TGT).

### 1 Contexte biologique de l'étude de TGT

La Shigellose ou dysenterie bacillaire est une infection intestinale invasive aiguë, endémique dans les régions tropicales, qui se manifeste cliniquement par une diarrhée souvent sanglante<sup>312,313</sup>. Chaque année au moins 80 millions de cas de diarrhée sanglante sont recensés dont 700 000 décès. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus touchés puisqu'ils représentent environ 70% des cas de Shigellose avec environ 60% des décès. Cette maladie est provoquée par des bactéries appartenant au genre *Shigella* au sein desquelles l'espèce *S. flexneri* est la principale cause de shigellose endémique dans les pays en voie de développement. Plusieurs traitements antibiotiques ont été utilisés contre cette maladie depuis des années et ont conduit à l'émergence de souches multi-résistantes. Par conséquent, de nouveaux antibiotiques dits « de réserve », tels que la Ciprofloxacine, ont été mis sur le marché. Il a donc été nécessaire de rechercher de nouveaux traitements utilisant de nouveaux principes actifs afin de disposer d'un nouvel antibiotique de réserve. Les différentes études portant sur le pathogène *Shigella Flexneri* ont permis de mieux comprendre sa pathogénicité et de mettre en évidence un gène fortement impliqué dans sa virulence et codant pour l'enzyme TGT<sup>314</sup>. Cette enzyme, impliquée dans la biosynthèse d'ARNt hypermodifié, catalyse l'échange de la Guanine 34 de la boucle anticodon des ARNt spécifiques des acides aminés Asp, Asn, His et Tyr, par les bases

modifiées preQ1 (7-aminométhyl-7-déazaguanine) ou Queuine (Q, 7-(3,4-trans-4,5-cis-dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminométhyl)-7-déazaguanine) (Figure 15).

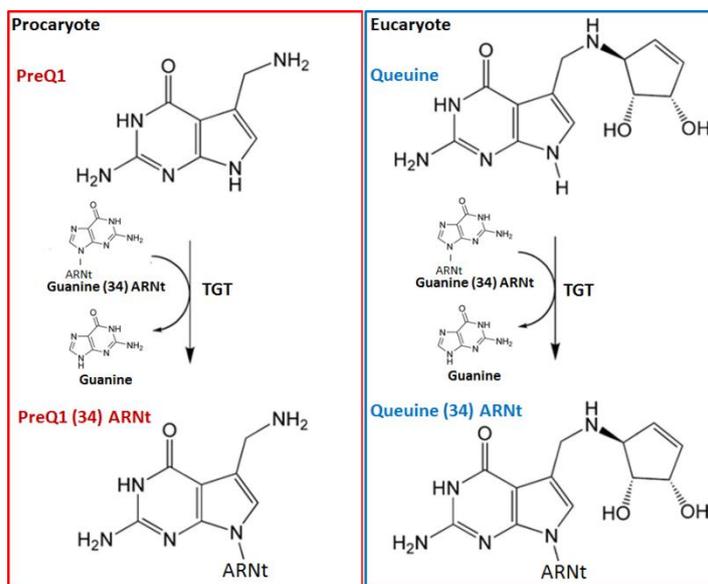


Figure 15: Échange de la Guanine 34 de la boucle anticodon des ARNt spécifiques des acides aminés Asp, Asn, His et Tyr par les bases modifiées preQ1 et Queuine chez les organismes Procaryotes et Eucaryotes. D'après <sup>315</sup>.

La protéine TGT joue ainsi un rôle dans la traduction de l'ARN messager virF, qui code pour une protéine ayant un rôle clé dans la régulation de la virulence du pathogène <sup>316</sup>.

La mutation du gène codant pour la protéine TGT entraîne donc une réduction significative de la pathogénicité de la bactérie *S. flexneri*. Comme aucune dépendance des facteurs de virulence des pathogènes bactériens vis-à-vis de la base modifiée preQ1 n'a été observée à ce jour, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des ARNt hypermodifiés sont des cibles de choix pour la synthèse de médicaments sélectifs <sup>316</sup>. L'enzyme TGT est donc une cible pour le développement d'inhibiteurs spécifiques capables de réduire la virulence des Shigelles.

Une première série d'études a été menée au laboratoire par le Dr. C. Atmanene sur la protéine TGT de *Zymomonas mobilis* par MS supramoléculaire et a permis de confirmer l'état d'oligomérisation de cette protéine et sa stœchiométrie d'interaction avec l'ARNt. En effet, cette protéine contenant un atome de zinc est présente sous forme dimérique et est capable de fixer une molécule d'ARNt <sup>317</sup>. De nouvelles stratégies d'inhibition reposant sur la déstabilisation de l'interface dimérique ou la dissociation de l'interaction TGT/ARNt ont alors été proposées par le Pr. Klebe. Il a été montré par MS supramoléculaire et par des techniques enzymatiques que des mutations au niveau de la zone d'interaction protéine/protéine permettaient la dissociation partielle du dimère TGT et l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme. D'autre part, des inhibiteurs ciblant l'interface du dimère de TGT ont permis d'empêcher les interactions TGT/ARNt sans pour autant que le dimère de TGT seul ne soit déstabilisé.

## 2 Objectifs de l'étude

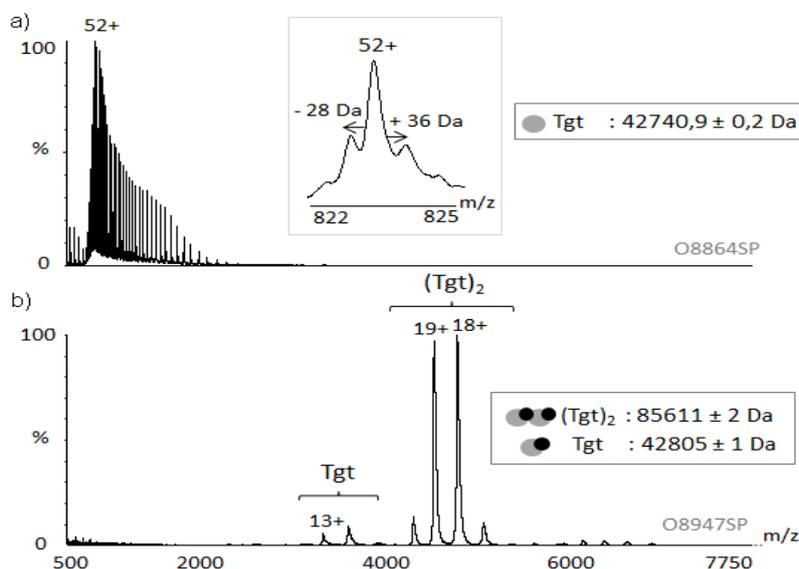
Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps poursuivi la collaboration précédemment engagée avec l'équipe du Pr Gerhard Klebe (Philipps-Universität, Marburg, Allemagne) pour suivre l'effet de mutations ou l'effet d'inhibiteurs sur la stabilité de l'interface du dimère de la protéine TGT de *Zymomonas mobilis*.

Dans le cas de développement d'inhibiteurs thérapeutiques de protéines bactériennes, il est essentiel de s'assurer de l'innocuité de ces inhibiteurs sur des protéines de Mammifère et plus particulièrement chez l'Homme. Dans un second temps, nous avons donc déterminé l'état d'oligomérisation de la protéine mTGT de *Mus musculus* ainsi que celui de la protéine mQTRD1 avec laquelle elle interagit. Nous avons ensuite étudié les stœchiométries d'interaction de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1 avec un ARNt. Enfin, nous avons démarré l'étude de la protéine TGT humaine.

## 3 Résultats

### 3.1 Analyse de la protéine TGT seule

Dans un premier temps, notre étude a été menée sur la protéine TGT de *Zymomonas mobilis* dont nous avons vérifié la masse moléculaire de la protéine en conditions dénaturantes et natives ainsi que l'homogénéité de l'échantillon et l'état d'oligomérisation de la protéine sur le Synapt G2 (Figure 16).



**Figure 16: Étude de l'état d'oligomérisation de la protéine TGT de *Zymomonas mobilis*.** La protéine a été dessalée deux fois par gel filtration (Zeba) avec un tampon  $\text{AcNH}_4$  1M pH 8.0. a) Analyse en conditions dénaturantes de la protéine TGT (2  $\mu\text{M}$ ) diluée dans une solution eau/acétonitrile/acide 50/50/1 ( $V_c=40\text{V}$ ,  $P_i = 2$  mbar). Cadre : agrandissement de l'état de charge 52+ mettant en évidence l'hétérogénéité de la protéine TGT, b) analyse de la protéine TGT en conditions natives (10  $\mu\text{M}$  en monomère) diluée dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  500mM ( $V_c=80\text{V}$ ,  $P_i = 6$  mbar). (● et ● correspondent à TGT seule et TGT avec ion  $\text{Zn}^{2+}$ )

Bien que la masse observée en conditions dénaturantes soit en accord avec la masse théorique ( $M_{\text{mesurée}} = 42\,740.9 \pm 0.2$  Da ;  $M_{\text{théorique}} = 42\,738.5$  Da), l'échantillon est assez hétérogène comme le montre la Figure 16. L'analyse de la protéine en conditions natives permet de mettre en évidence, la

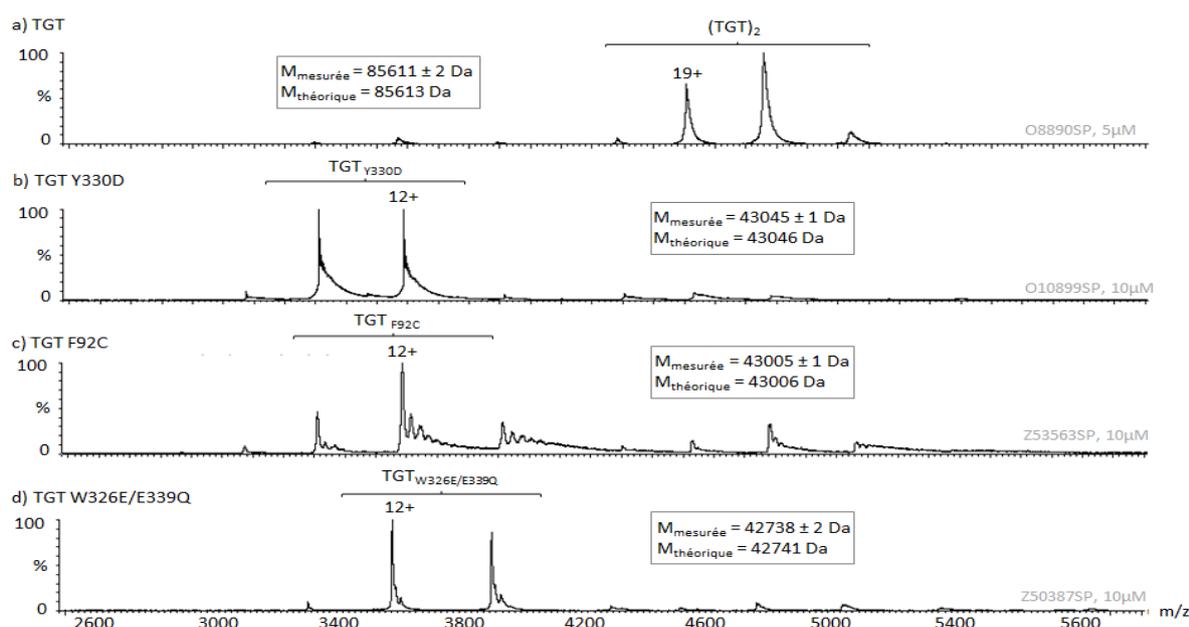
formation quantitative d'un dimère de TGT fixant un ion  $Zn^{2+}$  par sous-unité ( $M_{mesurée} = 85\ 611 \pm 2$  Da ;  $M_{théorique} = 85\ 613$  Da). L'hétérogénéité observée en conditions dénaturantes conduit en conditions natives à l'obtention de pics larges ( $H_{1/2} = 30$  m/z en moyenne). Cette protéine, qui n'est stable qu'à des forces ioniques élevées (1 à 2 M NaCl), est difficile à dessaler et nécessite l'utilisation d'un tampon acétate d'ammonium 1 M ce qui altère la qualité des spectres MS. L'hétérogénéité de l'échantillon ainsi que la force ionique du tampon utilisée entraîne un élargissement des pics du dimère de TGT. Néanmoins, l'état d'oligomérisation de la protéine peut être clairement défini.

L'un des procédés permettant l'inhibition de cette protéine serait la déstabilisation de l'interface de dimérisation. Pour cela, plusieurs mutants de la protéine TGT ont été réalisés afin d'identifier les résidus essentiels à la dimérisation. Dans un second temps, grâce à des études de modélisations moléculaires, des inhibiteurs ciblant ces résidus ont été développés.

### 3.2 Déstabilisation de l'interface du dimère de la protéine TGT *Zymomonas mobilis*

#### a. Mise en évidence de résidus essentiels à la dimérisation de la protéine TGT

Grâce à des études de dynamique moléculaire, différents acides aminés impliqués dans la zone de dimérisation de la protéine TGT ont été identifiés. Ainsi, plusieurs mutants ont été produits puis purifiés avant d'être analysés par MS supramoléculaire, afin de vérifier leurs masses moléculaires, mais aussi de déterminer leur état d'oligomérisation. Il est important de vérifier l'homogénéité des préparations, car la production de simples et de doubles mutants conduits souvent à des mélanges hétérogènes se traduisant sur les spectres par des pics plus larges ou supplémentaires (Figure 17).



**Figure 17: Déstabilisation de l'interface de dimérisation de la protéine TGT par mutation de résidus spécifiques.** Analyse en conditions natives des mutants TGT Y330D (b), TGT F92C (adduits de 340 Da) (c) et TGT W326E/E339Q (d) dessalés 2 fois par gel filtration (Zeba) dans un tampon  $AcNH_4$  1M pH7.5. ( $V_c = 100V$ ,  $P_i = 6$  mbar).

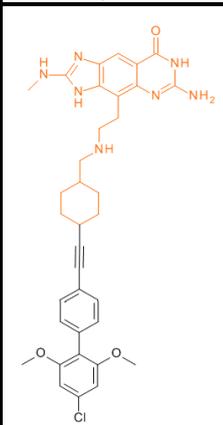
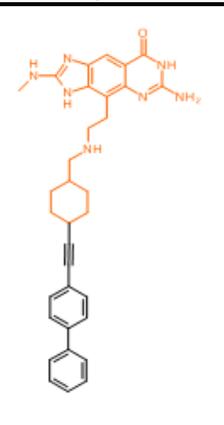
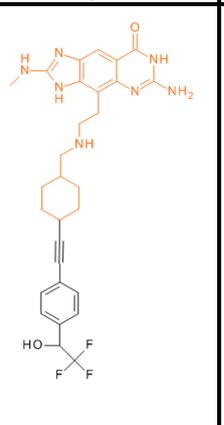
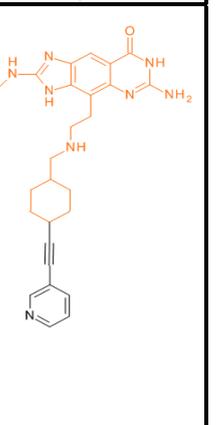
Parmi les mutants étudiés, les mutants TGT Y330D, TGT F92C et le double mutant TGT W326E/E339Q ont été observés majoritairement sous forme monomérique suggérant que la mutation de ces acides a un rôle important dans la dimérisation de la protéine TGT (Figure 17). Les résultats obtenus par MS supramoléculaire sont en accord avec les données de modélisation moléculaire suggérant que ces mutations entraîneraient la dissociation de l'homodimère TGT. Des études cristallographiques ont ensuite été réalisées par nos collaborateurs sur ces mutants afin de mieux comprendre les modifications structurales associées à ces mutations. Ainsi, l'importance d'un réseau d'acides aminés aromatiques a pu être mise en évidence. La mutation de ces résidus par des acides aminés très polaires permet d'augmenter l'énergie de solvation de cette région et induit par conséquent la déstabilisation du complexe TGT. En parallèle, des études enzymatiques ont permis de montrer une diminution de l'activité de la protéine TGT en présence de la mutation F92C. Ces résultats suggèrent que la phénylalanine 92 joue un rôle important dans la structure et la fonction de cet homodimère.

#### b. Recherche d'inhibiteurs déstabilisant l'interface de dimérisation de la protéine TGT

L'étude de ces mutants a permis de mieux comprendre les acides aminés essentiels à la dimérisation de la protéine TGT. Dans un deuxième temps, nos collaborateurs ont développé de nouveaux inhibiteurs de la protéine TGT dirigés contre ces résidus dans le but de déstabiliser l'interface dimérique.

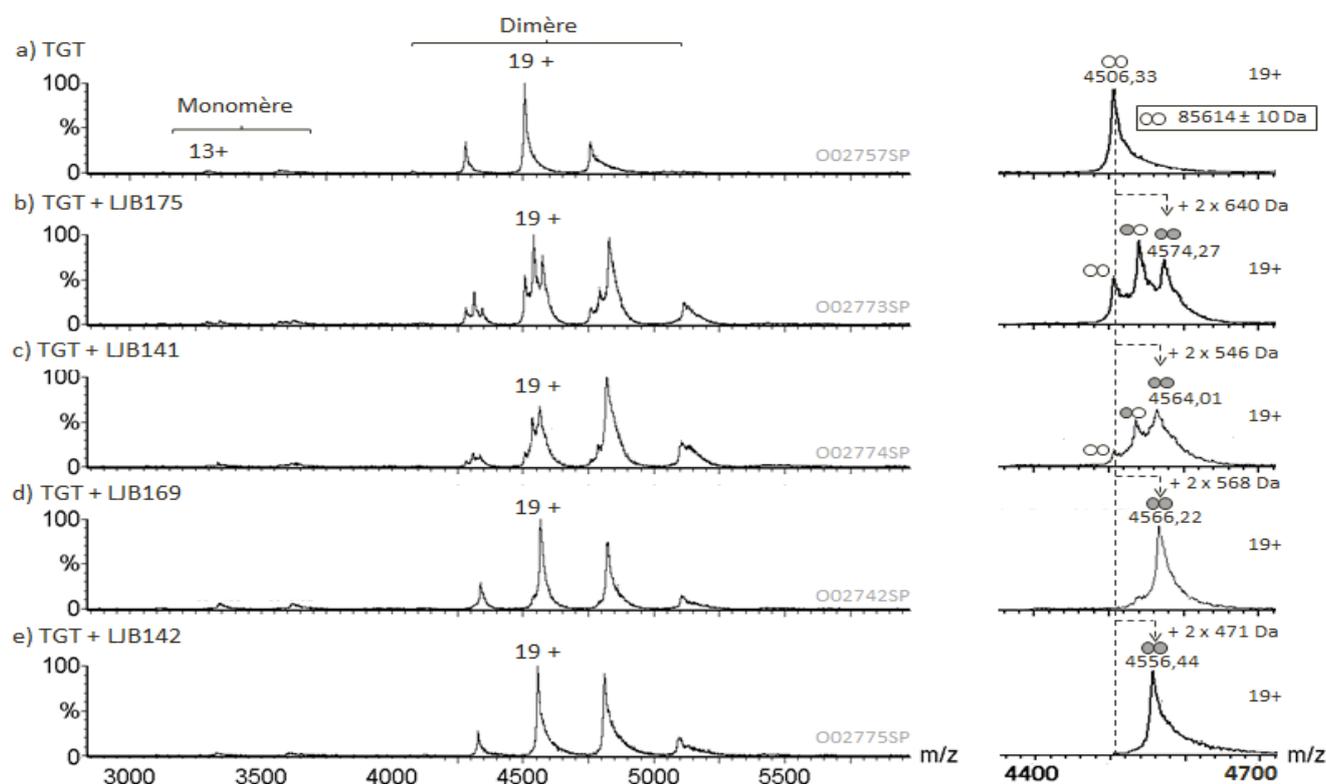
Des inhibiteurs susceptibles de déstabiliser le dimère TGT ont donc été développés grâce à des modèles de modélisation moléculaire : LJB175, LJB141, LJB169 et LJB142 (Tableau 5).

**Tableau 5: Ligands susceptibles de déstabiliser le dimère TGT.**

LJB175	LJB141	LJB169	LJB142
640,17 Da	545,68 Da	567,61 Da	470,57 Da
			

Les interactions entre ces différents ligands et TGT ont ensuite été étudiées par MS supramoléculaire afin de trouver un inhibiteur capable de déstabiliser le dimère de la protéine TGT (Figure 18). Pour cela, les différents ligands ont été incubés avec la protéine TGT puis analysés dans

des conditions expérimentales strictement identiques. Ainsi, les intensités relatives des différents ligands pourront être comparées.



**Figure 18: Déstabilisation de l'interface de dimérisation de la protéine TGT par ajout de ligands.** La protéine TGT, dessalée deux fois par filtration sur gel (Zeba) avec un tampon  $\text{AcNH}_4$  1M pH7.5 a été incubée seule à  $5 \mu\text{M}$  en dimère (a) ou avec  $50 \mu\text{M}$  de ligands (b) LJB175, (c) LJB141, (d) LJB169 ou (e) LJB142. Les spectres de masse de droites correspondent à un agrandissement de l'état de charge 19+. (○, ● et ●● correspondent au dimère de TGT seul, au complexe 2 : 1 TGT : inhibiteur et au complexe 2 : 2 TGT : inhibiteur. ( $V_c=60\text{V}$ ,  $P_i = 5.5 \text{ mbar}$ )).

L'analyse des interactions protéine/ligands nous a permis de différencier les ligands LJB175 et LJB141 qui présentent des stœchiométries d'interaction TGT : ligands 2 : 1 et 2 : 2 (Figure 18, b et c), des ligands LJB169 et LJB142 qui se fixent uniquement selon un ratio 2 : 2 TGT : ligands (Figure 18, d et e). Ces expériences nous ont donc permis de mettre en évidence des différences d'affinité entre les ligands et la protéine TGT dimérique. En effet, les ligands LJB169 et LJB142, qui se fixent de manière totale au dimère de TGT, présentent une meilleure affinité vis-à-vis de la protéine que les ligands LJB175 et LJB141, ne se fixant pas totalement à la protéine TGT. Toutefois, aucune augmentation significative des signaux correspondant à la forme monomérique (Tableau 6) en présence de ces ligands n'a pu être observée.

**Tableau 6: Comparaison des pourcentages de dimères de TGT en absence ou en présence de différents ligands capables de déstabiliser l'interface du dimère de TGT.**

	TGT	TGT + LJB145	TGT + LJB141	TGT + LJB169	TGT + LJB142
% monomère	5%	6%	5%	4%	4%
% dimère	95%	94%	95%	96%	96%

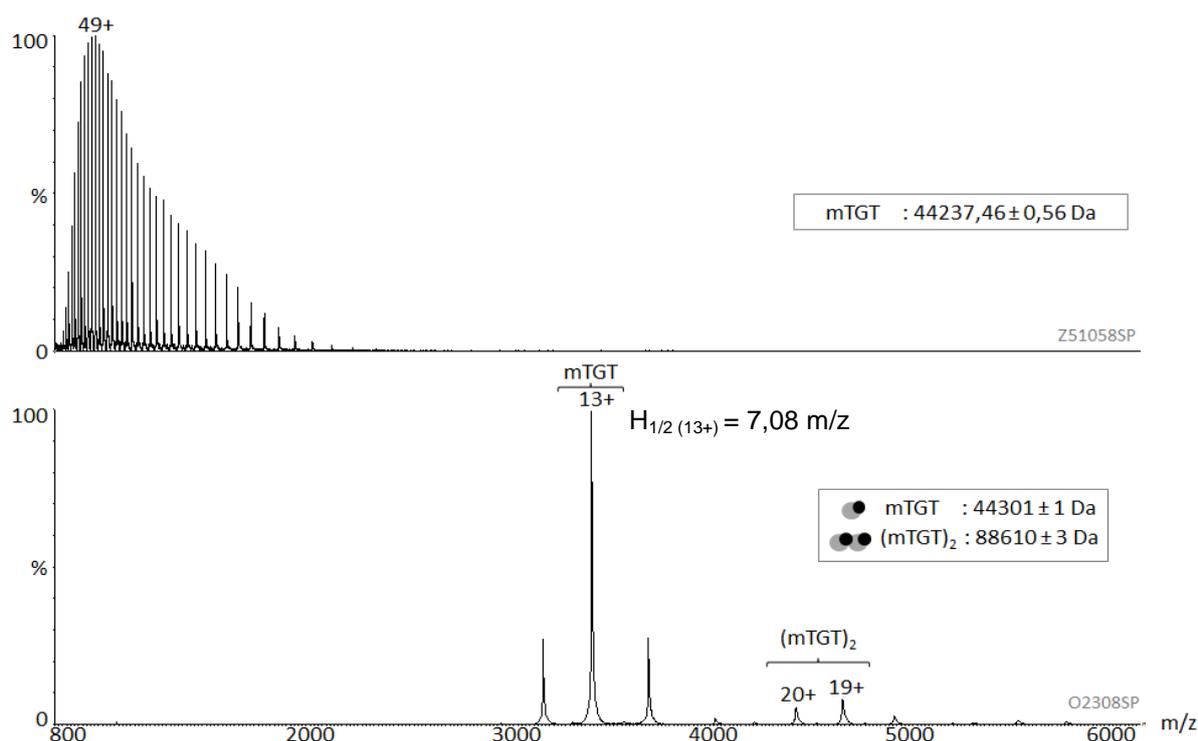
Ces ligands ne permettent donc pas de déstabiliser le dimère de TGT. De nouveaux ligands censés déstabiliser l'interface du dimère de TGT sont en cours de synthèse.

### 3.3 Caractérisation de la protéine TGT *Mus musculus* (mTGT)

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la protéine TGT Eucaryote par MS supramoléculaire. La compréhension de la structure et du fonctionnement de cette protéine Eucaryote est une étape essentielle pour s'assurer de l'innocuité des inhibiteurs qui auront préalablement été sélectionnés grâce au modèle Procaryote.

#### 3.3.1 Détermination de l'état d'oligomérisation de la protéine mTGT

L'analyse de la protéine mTGT par MS supramoléculaire nous a permis de vérifier la masse de la protéine mTGT ( $M_{\text{mesurée}} = 44\,237.46 \pm 0.56$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 44\,237$  Da). L'analyse de la protéine mTGT en conditions natives, nous a permis de montrer que contrairement à la protéine TGT Procaryote, la protéine mTGT est majoritairement sous forme monomérique et fixe un ion  $\text{Zn}^{2+}$  ( $M_{\text{mesurée}} = 44\,301 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 44\,301$  Da) (Figure 19).

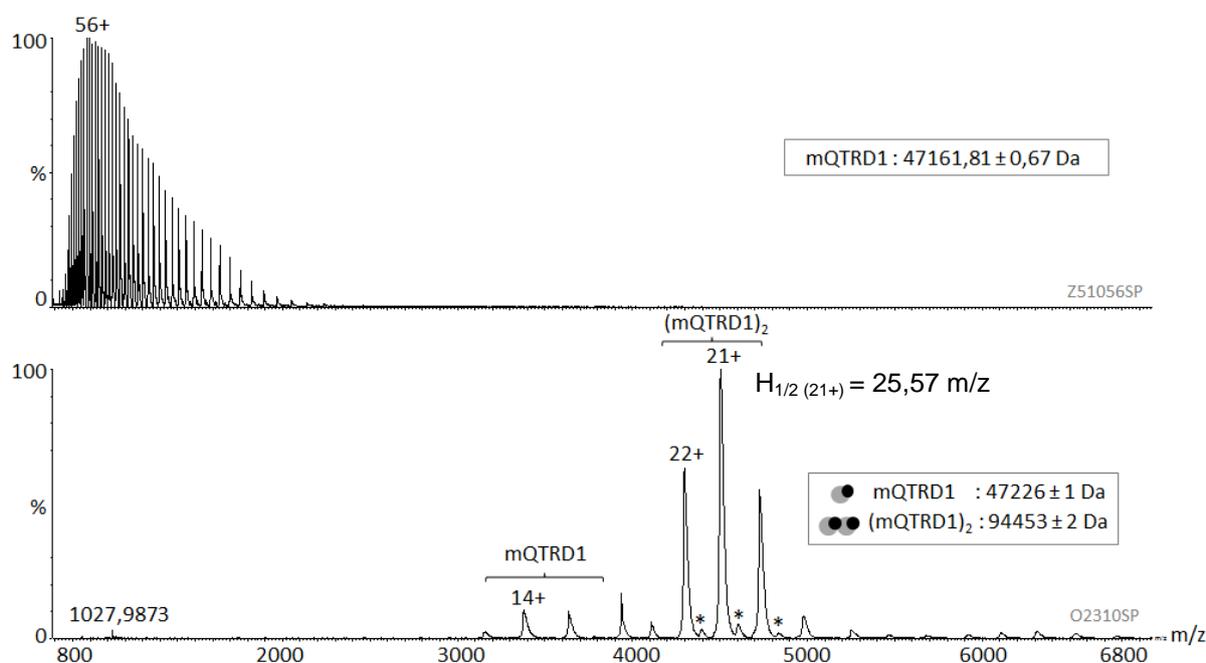


**Figure 19: Étude des états d'oligomérisation de la protéine mTGT.** La protéine mTGT a été dessalée par filtration sur gel (Zeba), avec un tampon  $\text{AcNH}_4$  500 mM pH7.5 puis ont été analysées (a) en conditions dénaturantes (2  $\mu\text{M}$ ,  $V_c = 20\text{V}$ ,  $P_i = 1$  mbar) et (b) en conditions natives (5  $\mu\text{M}$  monomère,  $V_c = 150\text{V}$ ,  $P_i = 5$  mbar).

#### 3.3.2 Détermination de l'état d'oligomérisation de la protéine mQTRD1

Contrairement à la protéine TGT Procaryote, la protéine *Mus musculus* forme un hétérodimère avec la protéine : mQTRD1 (*Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit 1 Isoform 1*)<sup>318</sup>. Toutefois,

aucun cristal de cet hétérodimère n'est actuellement disponible. La protéine mQTRD1 a donc été analysée par MS supramoléculaire. Cette protéine, dont la masse mesurée en conditions dénaturantes est de  $47\,161.81 \pm 0.67$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 47\,161$ Da), est majoritairement sous forme dimérique ( $M_{\text{mesurée}} = 94\,461 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 94\,450$  Da) fixant un ion  $\text{Zn}^{2+}$  par sous-unité en conditions natives (Figure 20). La préparation de cet échantillon a nécessité de nombreuses optimisations en ce qui concerne le choix du tampon ainsi que la méthode de dessalage. Par conséquent, la force ionique du tampon a dû être augmentée pour éviter que celle-ci ne précipite totalement et la protéine a été dessalée par filtration sur gel sur une colonne NAP-5. Des optimisations instrumentales ont aussi été nécessaires afin de permettre la formation d'un spray stable ( $V_{\text{ESI}} = 1.8$  kV,  $P_{\text{ESI}} = 0.8$  psi). Malgré nos différentes optimisations, nous n'avons pas pu obtenir des pics plus fins sur les spectres de masse de la protéine mQTRD1. Toutefois, les largeurs de pic observées nous permettent de poursuivre notre étude.



**Figure 20: Étude des états d'oligomérisation de la protéine mQTRD1.** La protéine mQTRD1 a été dessalée par filtration sur gel (NAP-5), avec un tampon  $\text{AcNH}_4$  500 mM pH 7.5 puis ont été analysées a) en conditions dénaturantes (2  $\mu\text{M}$ ,  $V_c = 20\text{V}$ ,  $P_i = 1$  mbar) et b) en conditions natives (5  $\mu\text{M}$  monomère,  $V_c = 150\text{V}$ ,  $P_i = 5$  mbar), \* correspond à un adduit de 2 040 Da.

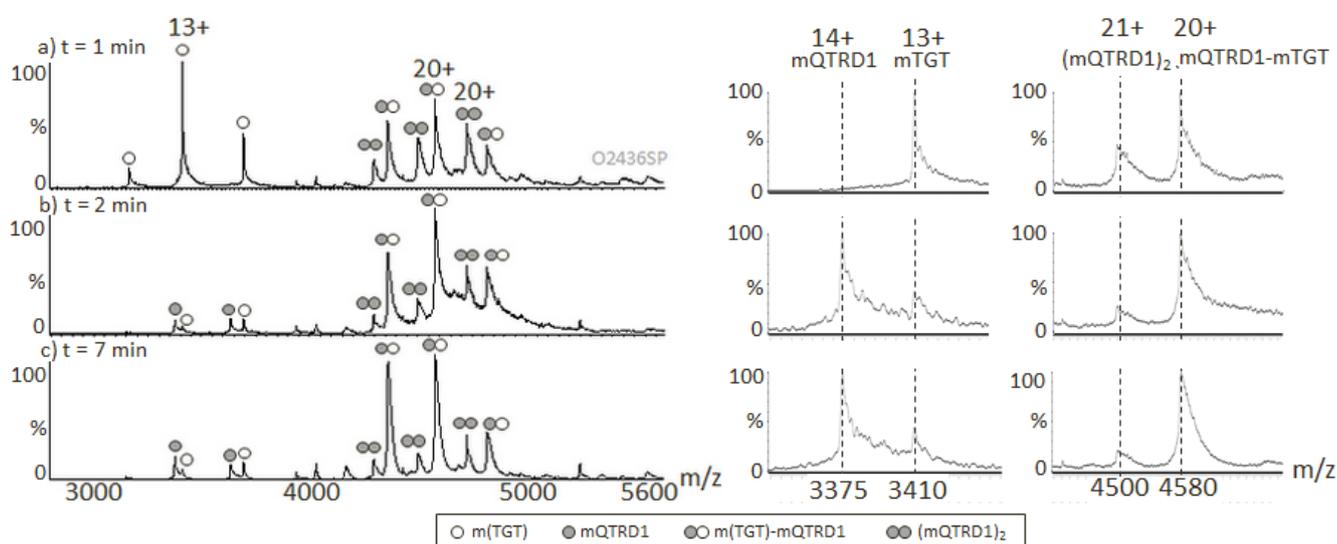
### 3.3.3 Étude de la formation de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1

Dans le but de caractériser la forme TGT de *Mus musculus*, nous avons suivi les interactions se produisant entre les deux protéines mTGT et mQTRD1.

Ces deux protéines ont donc été incubées selon un ratio 1 : 1 puis analysées directement par MS supramoléculaire (Figure 21). Ainsi après 1 minute d'incubation des deux protéines à 5  $\mu\text{M}$  en monomère, un hétérodimère 1/1 mTGT/mQTRD1 apparaît avec une masse de  $91\,528 \pm 3$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 91\,527$  Da). Cette première observation suggère que l'homodimère de mQTRD1 a été

déstabilisé, permettant l'association d'une sous-unité de mQTRD1 au monomère de mTGT. La formation de cet hétérodimère n'est cependant pas quantitative à ce stade puisque chaque partenaire libre est encore visible dans la zone 3 000-5 000 m/z. À partir de 2 minutes d'incubation, l'intensité des pics correspondant à l'hétérodimère augmente au détriment de celle du monomère de mTGT et de l'homodimère de mQTRD1. Il est cependant intéressant de noter qu'à 2 minutes, une forme monomérique de la protéine mQTRD1 apparaît ( $M_{\text{mesurée}} = 47\,225 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 47\,226$  Da). Cette observation confirme que l'homodimère mQTRD1 se dissocie et qu'une de ses sous-unités se réassocie à la protéine mTGT.

Nous pouvons donc conclure qu'il y a bien formation d'un hétérodimère de TGT *Mus musculus*, formé du monomère de mTGT et d'une sous-unité de l'homodimère mQTRD1, et que ce phénomène nécessite au moins 5 minutes.



**Figure 21: Suivi de formation de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1 1/1.** Panel de gauche: mTGT et mQTRD1 incubés à 5  $\mu\text{M}$  en monomère de 1 à 5 minutes dans un tampon acétate d'ammonium 250 mM pH 7.5.  $V_c = 150$  V;  $P_i = 5.5$  mbar. Agrandissement de la zone des monomères (Panel central: 3300-3500 m/z) et de la zone des dimères (Panel de droite: 4000-4600 m/z). Les lignes pointillées indiquent les différents espèces présentes.

### 3.3.4 Formation d'un complexe ternaire impliquant mTGT, mQTRD1 et l'ARNt<sup>Tyr</sup>

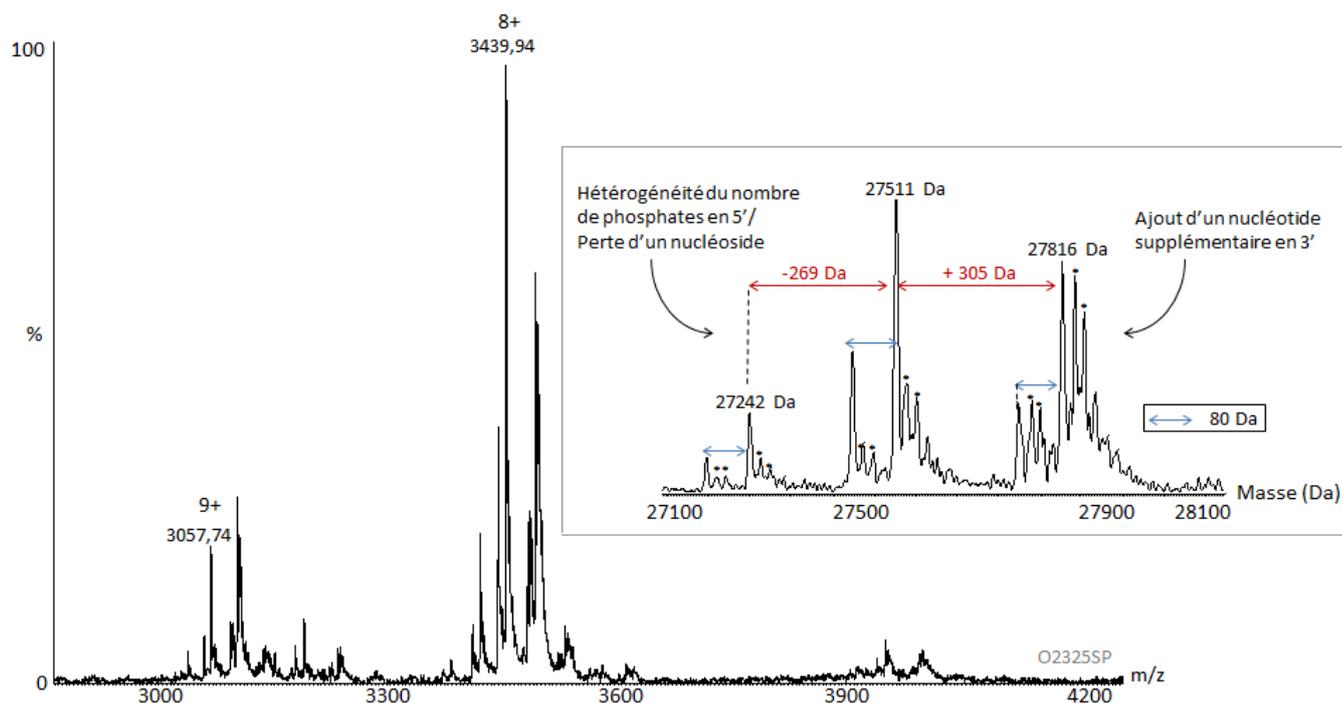
De la même manière que le complexe TGT *Zymomonas mobilis*/ARNt<sup>Tyr</sup> a été reconstruit<sup>317</sup>, nous avons étudié les interactions qui existent entre l'hétérodimère mTGT/mQTRD1 et l'ARNt<sup>Tyr</sup> obtenu par transcription *in vitro*.

#### a. Étude de l'ARNt<sup>Tyr</sup> par MS supramoléculaire

Afin de s'assurer de la qualité de l'ARNt<sup>Tyr</sup> produit, ce dernier a été analysé par MS supramoléculaire. L'analyse des ARN par MS supramoléculaire n'est pas triviale, car des hétérogénéités dues à la méthode de production des ARN ainsi que des problèmes de dessalage peuvent être rencontrés. Le dessalage des ARN est une étape importante, car les nombreux

groupements chargés négativement qui le composent interagissent avec des cations incompatibles avec l'ionisation ESI. Trois cycles de dessalage par filtration sur gel (colonne NAP, tampon acétate d'ammonium 250 mM pH 8) ont donc été nécessaires pour permettre un dessalage correct de l'ARNt<sup>Tyr</sup> bien que quelques adduits de sodium soient encore observés (Figure 22).

Toutefois, l'analyse de cet ARNt<sup>Tyr</sup> en conditions natives nous a permis de mettre en évidence une hétérogénéité du nombre de phosphates en 5' ainsi que la perte ou l'ajout de nucléotides supplémentaires en 3'. Ces hétérogénéités sont dues au mode de production des ARN par transcription *in vitro*. (Figure 22).



**Figure 22: Analyse en conditions natives de l'ARNt<sup>Tyr</sup> produits par transcription *in vitro*.** L'ARNt (5 $\mu$ M) a été dessalé par 3 cycles de dessalage par filtration sur gel (NAP-5) contre un tampon AcNH<sub>4</sub> 250 mM pH 8.0. Vc=120V, Pi =6mbar. Le spectre de masse en insert a été obtenu à l'aide de l'algorithme de déconvolution Maxent I (Waters). Les astérisques (\*) correspondent à des adduits de sodium ou de potassium.

La qualité de l'ARNt<sup>Tyr</sup> est un facteur important à prendre en compte lors de l'étude d'interactions protéine/ARN. En effet, plus l'échantillon est hétérogène plus l'interprétation des spectres de masse sera difficile.

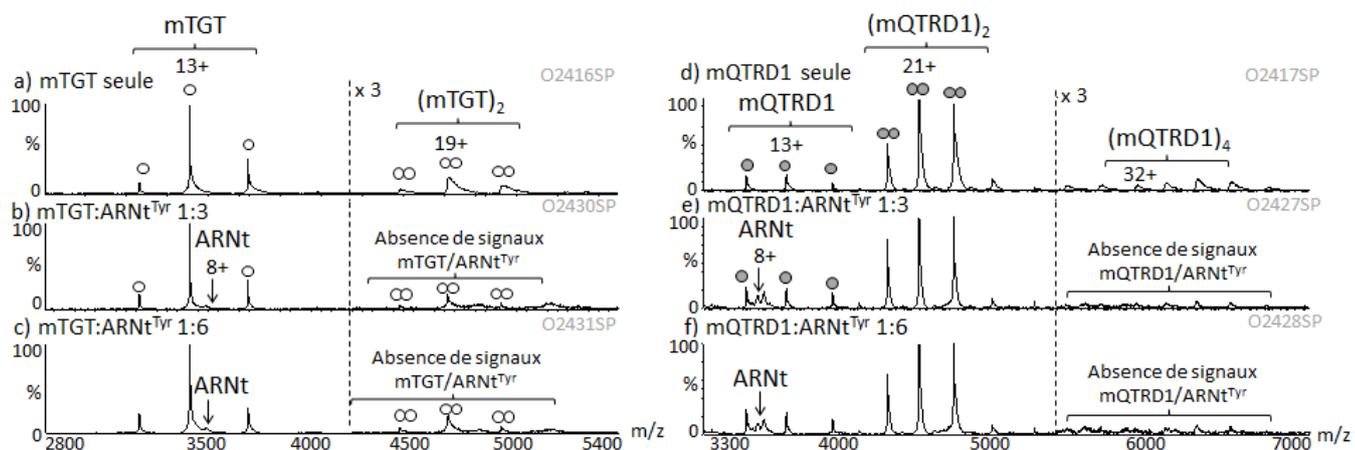
### b. Stœchiométries d'interaction des complexes mTGT/ARNt<sup>Tyr</sup> et mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> et mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>

Des expériences de titrage de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1 par l'ARNt<sup>Tyr</sup> ont été menées par MS supramoléculaire.

#### - Étude des interactions mTGT : ARNt<sup>Tyr</sup> et mQTRD1 : ARNt<sup>Tyr</sup>

Les stœchiométries d'interaction entre chacune des sous-unités de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1 et l'ARNt<sup>Tyr</sup> ont tout d'abord été déterminées. L'ARNt<sup>Tyr</sup> a été incubé soit avec la

protéine mTGT, soit avec l'homodimère mQTRD1 selon des ratios mTGT : ARNt<sup>Tyr</sup> et mQTRD1 : ARNt<sup>Tyr</sup> de 1 : 3 ou 1 : 6 (5  $\mu$ M en monomère) (Figure 23).

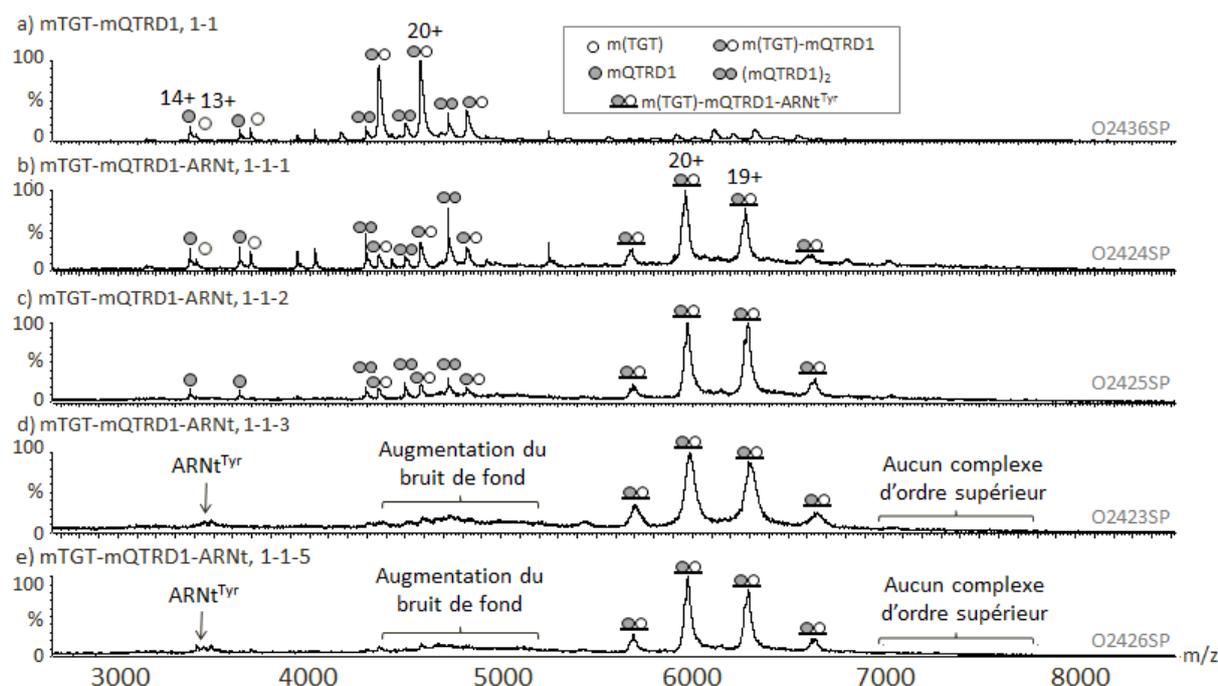


**Figure 23: Étude des stoechiométries d'interaction mTGT :ARNt<sup>Tyr</sup> et mQTRD1 :ARNt<sup>Tyr</sup>.** Chacune des protéines dessalées a été incubées avec l'ARNt<sup>Tyr</sup> en conditions natives dans un tampon AcNH<sub>4</sub> 100 mM pH 7.5 (Vc=150V, Pi = 5.5 mbar). a) et d), b) et e), c) et f) correspondent respectivement aux protéines seules, au ratio protéine/ARNt 1 : 3 et 1 : 6. (○, ● et ⊙, correspondent respectivement aux monomères de mTGT et de mQTRD1 et au dimère de mQTRD1.

Quels que soient la protéine et le ratio étudié, nous n'avons pas pu mettre en évidence de signaux correspondant à une interaction entre l'ARNt et les protéines seules suggérant que chacune des sous-unités ne semble pas interagir avec l'ARNt individuellement. Ces résultats sont en accord avec des données d'activité enzymatique obtenues par nos collaborateurs.

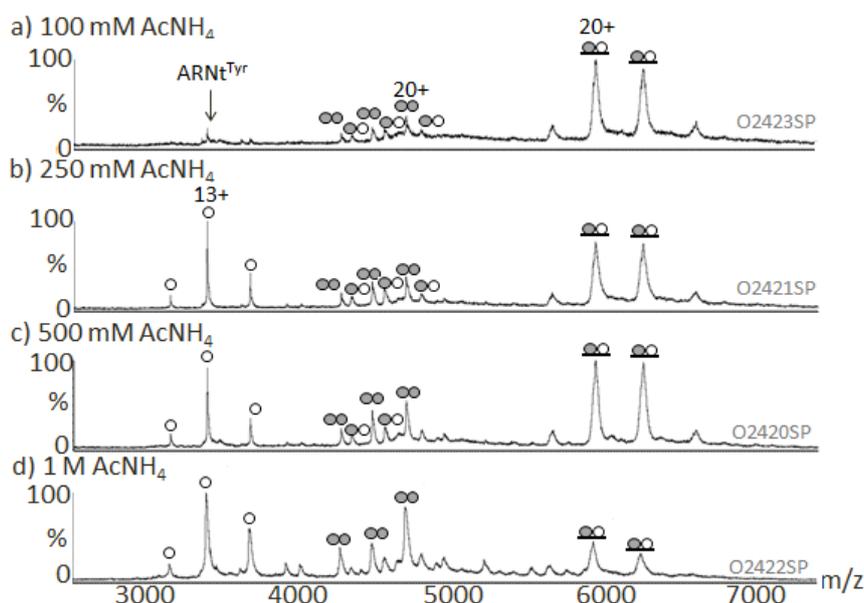
#### - Stoechiométries d'interaction entre l'ARNt<sup>Tyr</sup> et l'hétérodimère mTGT/mQTRD1

Les protéines mTGT et mQTRD1 ont été incubées ensemble selon un ratio 1 : 1 (5  $\mu$ M en monomère) pendant 5 minutes de manière à former l'hétérodimère mTGT et mQTRD1 (Figure 24, a) puis différentes concentrations d'ARNt<sup>Tyr</sup> (de 5 à 25  $\mu$ M) ont été ajoutées à l'hétérodimère précédemment formé. Un complexe mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> 1/1/1 a été mis en évidence lorsque chacun des partenaires sont incubés dans des proportions stoechiométriques ( $M_{\text{mesurée}} = 11\,9178 \pm 9$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 11\,9038$  Da) (Figure 24, b). La différence observée entre la masse théorique et la masse mesurée est due à l'hétérogénéité de l'ARNt qui se traduit sur les spectres de masse par des pics larges perturbant les mesures de masses exactes. De plus, nous pouvons observer que l'augmentation de la concentration en ARNt se traduit sur les spectres par une suppression du signal dans la zone comprise entre 4 000 et 5 000 m/z. À partir du ratio 1/1/3 mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> (Figure 24, d-e), nous avons pu mettre en évidence la formation quantitative (> 90%) du complexe mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>. Par conséquent, cette condition expérimentale sera utilisée pour les expériences suivantes. Aucun complexe d'ordre supérieur n'a pu être en évidence pour des concentrations en ARNt<sup>Tyr</sup> plus élevées. Ces expériences de titrage nous ont donc permis de démontrer la fixation d'une unique molécule d'ARNt<sup>Tyr</sup> par hétérodimère mTGT/mQTRD1.



**Figure 24: Stœchiométrie d'interaction entre l'hétérodimère mTGT:mQTRD1 et l'ARNt<sup>Tyr</sup>.** Les protéines dessalées ont été incubées à 5  $\mu$ M en monomère pendant 5 minutes (a), puis ont été incubées avec différentes concentrations d'ARNt<sup>Tyr</sup> (b) 5  $\mu$ M, c) 10  $\mu$ M, d) 15  $\mu$ M et e) 20  $\mu$ M) ( $V_c = 150$  V,  $P_i = 5.5$  mbar, Tampon AcNH<sub>4</sub> 100 mM pH 7.5).

Pour confirmer que ce complexe ternaire résulte bien d'une association spécifique en solution, nous avons étudié l'effet d'une augmentation de la force ionique du tampon sur le complexe. Le complexe ternaire a donc été incubé dans des tampons acétate d'ammonium dont les concentrations sont comprises entre 100 mM et 1 M (Figure 25).



**Figure 25: Déstabilisation du complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> par augmentation de la force ionique du tampon.** Le complexe ternaire a été incubé selon un ratio mTGT/mQTRD1/ARNt, 1/1/3 avec a) 100 mM AcNH<sub>4</sub>, b) 250 mM AcNH<sub>4</sub>, c) 500 mM AcNH<sub>4</sub> ou d) 1 M AcNH<sub>4</sub> ( $V_c = 150$  V,  $P_i = 5.5$  mbar ;  $\circ$ ,  $\bullet$ ,  $\bullet\bullet$  et  $\square$  correspondent respectivement à mTGT, (mQTRD1)<sub>2</sub>, mTGT/mQTRD1 et mTGT/mQTRD1/ARNt).

Cette expérience, nous a permis de montrer qu'une augmentation de la force ionique du tampon entraîne une dissociation progressive du complexe mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>. Le complexe détecté

en phase gazeuse résulte donc d'une association spécifique en solution<sup>258, 319</sup>. En conclusion, nous avons pu démontrer qu'une seule molécule d'ARNt<sup>Tyr</sup> se fixe par hétérodimère même en présence d'un excès d'ARNt<sup>Tyr</sup> comme cela avait été observé pour la protéine TGT Procaryote.

#### - Cinétique de formation du complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>

La formation de l'hétérodimère est dépendante du temps d'incubation des deux partenaires protéiques. Nous avons donc souhaité étudier la cinétique de formation du complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>. Pour cela, deux expériences ont été réalisées : soit les trois partenaires ont été incubés ensemble et la cinétique de formation du complexe a été suivie par MS supramoléculaire, soit l'hétérodimère mTGT/mQTRD1 préformé a été incubé avec l'ARNt<sup>Tyr</sup> (Figure 26).

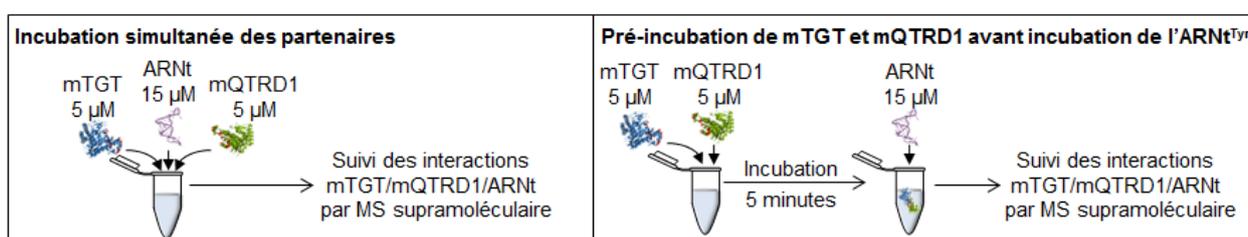


Figure 26: Modèles expérimentaux mis en place pour mettre en évidence l'étape limitante de la réaction de formation du complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>.

Dans un premier temps, les 3 partenaires ont été incubés ensemble et la cinétique de formation du complexe mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> a été suivie par MS supramoléculaire (Figure 27, a-d et Figure 28)

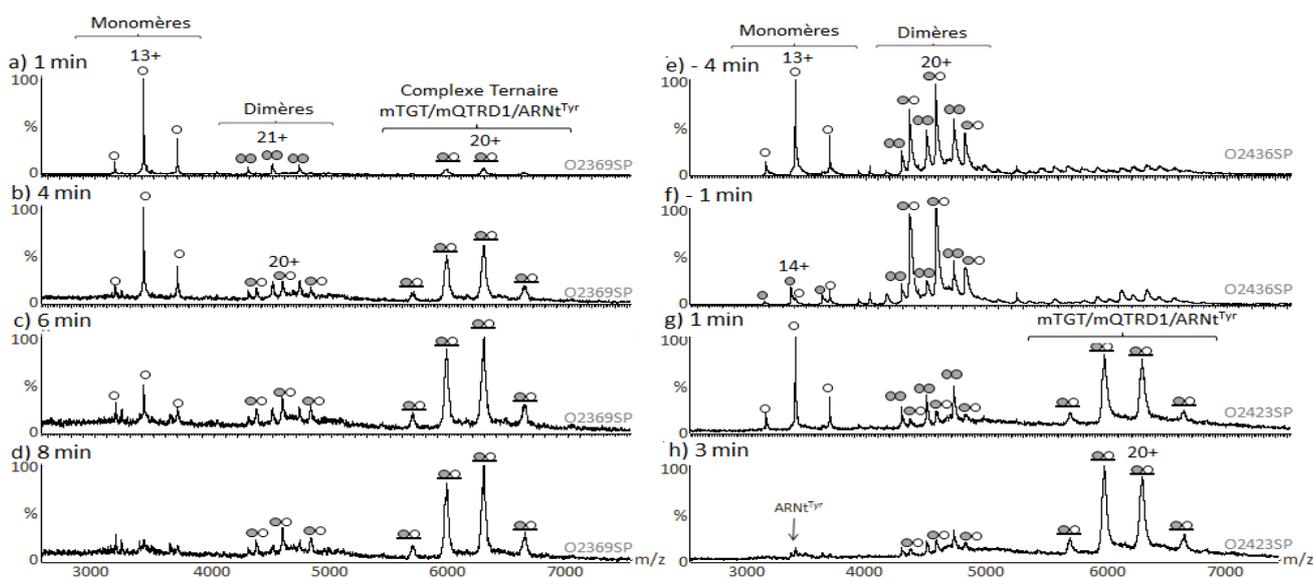
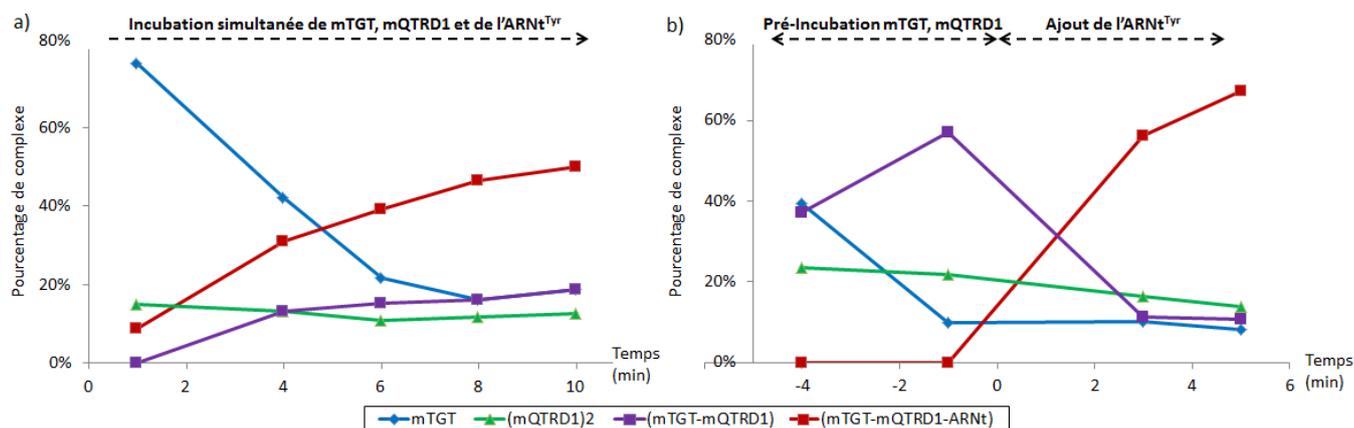


Figure 27: Cinétique d'interaction entre l'ARNt<sup>Tyr</sup> et l'hétérodimère mTGT/mQTRD1. a), b), c) et d) correspondent aux spectres de masse obtenus après 1, 4, 6 ou 8 minutes d'incubation de mTGT, mQTRD1 et l'ARNt<sup>Tyr</sup> dans un tampon AcNH<sub>4</sub> 250 mM Ph 7.5 (Vc=150V, Pi = 5.5 mbar). Les protéines mTGT et mQTRD1 ont été incubées pendant 5 minutes (e et f) dans un tampon AcNH<sub>4</sub> 100 mM pH 7.5 puis l'ARNt<sup>Tyr</sup> a été ajouté au mélange mTGT et mQTRD1. g) et h) correspondent aux spectres de masse obtenus 1 et 3 minutes après l'ajout de l'ARNt<sup>Tyr</sup> (Vc = 150V, Pi = 5.5 mbar). Les différents partenaires ont été incubés avec un ratio mTGT : mQTRD1 : ARNt<sup>Tyr</sup> 1 : 1 : 3 (5µM), (15 scans de 4 secondes ont été cumulés pour chaque analyse).

Après 1 minute d'incubation, des signaux correspondant au complexe ternaire apparaissent, mais des signaux correspondant aux protéines mTGT et mQTRD1 seules sont toujours visibles dans la zone 3000-5000 m/z. À partir de 4 minutes, les signaux correspondant au complexe ternaire augmentent encore. Toutefois, on voit apparaître le complexe mTGT/mQTRD1 sous forme libre. À 8 minutes, un équilibre est atteint où l'espèce majoritaire est le complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> 1/1/1.



**Figure 28:** Mise en évidence de l'étape limitante de la formation du complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup>. Suivi de la formation des complexes mTGT/mQTRD1 et mTGT/mQTRD1/ARNt<sup>Tyr</sup> lors d'une compétition directe entre les 3 partenaires (a) et lorsque les protéines mTGT et mQTRD1 sont incubées pendant 5 minutes avant ajout de l'ARNt<sup>Tyr</sup> (b).

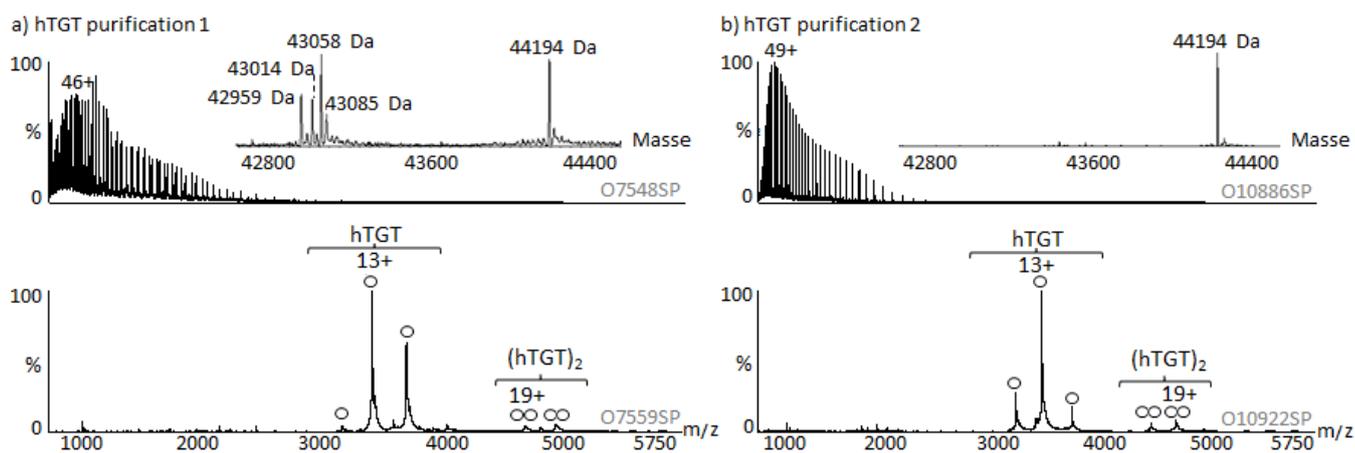
Dans le but de pouvoir déterminer l'étape limitante de la formation du complexe ternaire, nous avons incubé les protéines mTGT et mQTRD1 pendant 5 minutes puis nous avons ajouté l'ARNt<sup>Tyr</sup> et suivi la formation du complexe ternaire au cours du temps (Figure 27, e-h). Dans ces conditions, l'ARNt<sup>Tyr</sup> se fixe rapidement à l'hétérodimère seul ayant pour conséquence, l'apparition de signaux correspondants au complexe ternaire et la disparition de ceux correspondants à l'hétérodimère (Figure 28, b). La présence des protéines mTGT et mQTRD1 seules suggèrent que la formation de l'hétérodimère n'est pas quantitative. Après 3 minutes d'incubation, l'ARNt<sup>Tyr</sup> est fixé totalement à l'hétérodimère mTGT/mQTRD1. Ces deux expériences suggèrent que l'étape limitante à la formation du complexe ternaire est la formation de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1.

Cette série d'analyse a permis de déterminer que la fixation d'une molécule d'ARNt<sup>Tyr</sup> a lieu uniquement lorsque l'hétérodimère est formé ce qui confirme l'importance des 2 sous-unités mTGT et mQTRD1. Des études par microcalorimétrie, enzymologie et cristallographie sont actuellement en cours afin de pouvoir caractériser le fonctionnement de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1.

### 3.4 Caractérisation de la protéine TGT Humaine (hTGT)

Après avoir étudié l'hétérodimère mTGT/mQTRD1, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'hétérodimère hTGT/hQTRD1. Contrairement à la protéine TGT *Mus musculus*, nos collaborateurs ont eu de nombreux problèmes lors de la production des protéines humaines.

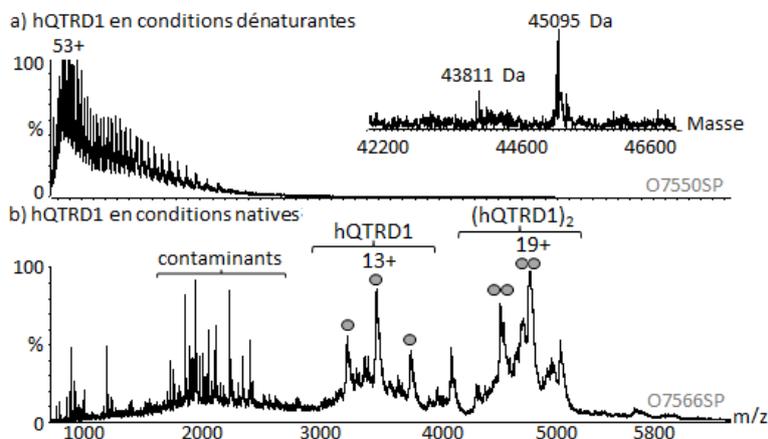
Une première analyse de la protéine hTGT a été réalisée par MS supramoléculaire (Figure 29, a), révélant la présence de cette protéine ( $M_{\text{mesurée}} = 44\,193.18 \pm 0.92$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 44\,191.8$  Da), mais aussi de nombreux contaminants dans l'échantillon. De plus, le dessalage réalisé n'a pas permis d'obtenir un spectre de bonne qualité comme le montre le bruit de fond présent dans la région des bas  $m/z$  (500-2 000) du spectre de masse obtenus en conditions dénaturantes. L'analyse de cet échantillon en conditions natives a permis de mettre en évidence la protéine hTGT majoritairement sous forme monomérique avec un ion  $\text{Zn}^{2+}$  ( $M_{\text{mesurée}} = 44\,258 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 44\,257$  Da).



**Figure 29: Caractérisation de la protéine hTGT issue de deux purifications différentes.** La protéine hTGT a été dessalée deux fois par filtration sur gel (Zeba) contre un tampon  $\text{AcNH}_4$  150 mM pH 7.5, a) et b) panels hauts : les protéines ont été diluées à  $2 \mu\text{M}$  dans une solution eau/acétonitrile/acide 50/50/1 ( $V_c = 40\text{V}$ ,  $P_i = 2\text{mbar}$ ). a) et b) panels bas : les protéines ont été diluées à  $5 \mu\text{M}$  dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  150 mM pH 7.5 ( $P_i = 6\text{mbar}$ , a)  $V_c = 150\text{V}$  ou b)  $120\text{V}$ ).

Une deuxième purification de cette protéine a donc été réalisée permettant d'obtenir un échantillon de meilleure qualité comme le montre le spectre obtenu en conditions dénaturantes (Figure 29, b). Nous observons aussi que les états de charge de cet échantillon sont différents de ceux obtenus lors de la première purification. D'autre part, comme nous avons pu l'observer avec la forme *Mus musculus*, la protéine hTGT est majoritairement sous forme monomérique.

Dans un second temps, la protéine hQTRD1 a été analysée par MS supramoléculaire (Figure 30).



**Figure 30: Caractérisation de la protéine hQTRD1.** La protéine hQTRD1 a été dessalée deux fois par filtration sur gel (Zeba) contre un tampon  $\text{AcNH}_4$  300 mM pH 7.9 puis reconcentrée par ultrafiltration (Vivaspin). a) analyses en conditions dénaturantes à  $2 \mu\text{M}$  dans une solution eau/acétonitrile/acide 50/50/1 ( $V_c = 40\text{V}$ ,  $P_i = 2$  mbar). b) la protéine a été analysée à  $2 \mu\text{M}$  ( $V_c = 180\text{V}$ ,  $P_i = 6$  mbar).

L'analyse de cet échantillon en conditions dénaturantes nous a permis de mettre en évidence un dessalage de mauvaise qualité ne permettant pas des analyses par MS supramoléculaire comme le montre l'analyse de cet échantillon en conditions natives (Figure 30, b). Malgré le manque de précision liée aux pics larges, les analyses en conditions natives nous ont permis de montrer la présence de la protéine hQTRD1 sous une forme monomérique fixant un ion  $Zn^{2+}$  ( $M_{\text{mesurée}} = 45\ 151 \pm 10$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 45\ 159$  Da) est sous forme de dimère fixant deux atomes de  $Zn^{2+}$  ( $M_{\text{mesurée}} = 90\ 330 \pm 13$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 90\ 317$  Da). Dans ces conditions, nous ne pouvons cependant pas déterminer l'état d'oligomérisation de cette protéine. Nos collaborateurs essayent actuellement d'améliorer la préparation de cette protéine difficile à produire.

Lorsque les protéines hTGT et hQTRD1 seront analysables par MS supramoléculaire, nous étudierons la formation d'un hétérodimère hTGT/hQTRD1 ainsi que les stœchiométries d'interaction entre cet hétérodimère et l'ARNt<sup>Tyr</sup>.

## 4 Conclusion

---

Les expériences de MS supramoléculaire réalisées au cours de ce projet ont été menées à la fois sur la protéine TGT Procaryote de *Zymomonas mobilis*, sur deux protéines TGT Eucaryote (*Mus musculus* et humaine).

De précédentes études portant sur la protéine TGT *Zymomonas mobilis* avaient permis de montrer que la déstabilisation de l'interface de dimérisation de la protéine TGT constituait une stratégie prometteuse pour l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme. L'étude par MS supramoléculaire de nouveaux mutants de la protéine TGT Procaryote nous a permis d'identifier des acides aminés essentiels à la dimérisation de la protéine. En effet, une simple mutation de certains acides aminés a conduit à la déstabilisation de l'homodimère de TGT. La recherche de nouveaux inhibiteurs a aussi été poursuivie, mais aucun inhibiteur testé n'a permis de déstabiliser le dimère de TGT. La recherche de nouveaux inhibiteurs va donc être poursuivie en croisant les informations obtenues par cristallographie et par MS supramoléculaire. L'innocuité de ces inhibiteurs vis-à-vis des protéines Eucaryote devra ensuite être réalisée.

L'étude de la protéine TGT Eucaryote nous a permis de montrer que la protéine mTGT forme un hétérodimère de stœchiométrie 1 : 1 avec la protéine mQTRD1. De plus, nous avons pu montrer que les états d'oligomérisation de ces 2 protéines sont différents, l'une forme un monomère (mTGT), l'autre, un dimère (mQTRD1). Nous avons pu montrer que la forme Eucaryote de cette protéine forme un complexe ternaire mTGT/mQTRD1/ARNt de stœchiométrie 1/1/1. De plus, un suivi cinétique de la réaction par MS supramoléculaire nous a permis de montrer que l'étape limitante était la formation de l'hétérodimère mTGT/mQTRD1. Les informations obtenues par MS

supramoléculaire seront corrélées à des analyses par microcalorimétrie ainsi que des déterminations d'activité enzymatique par nos collaborateurs.

Dans le but de poursuivre la caractérisation de la protéine TGT Eucaryote, nos collaborateurs ont essayé de produire la protéine TGT humaine. Cependant pour le moment, seule la protéine hTGT a pu être produite avec une pureté suffisante pour réaliser une étude par MS supramoléculaire. Parallèlement, une étude cristallographique a été initiée. Toutefois, aucun cristal utilisable n'a pu être observé pour le moment. Une fois le mécanisme d'action de cette forme Eucaryote connue, des études d'interaction avec des inhibiteurs de la protéine TGT Procaryote seront réalisées. L'ensemble de ces études a pour objectif ultime le développement de nouveaux médicaments contre la dysenterie bacillaire.

Les informations obtenues par MS supramoléculaire, par cristallographie et par enzymologie ont permis d'obtenir des informations précieuses concernant les protéines TGT Procaryote et de *Mus musculus*. Toutefois, dans le cas de la protéine TGT humaine de nombreux problèmes de cristallisation ont été observés. De plus, afin d'obtenir rapidement des informations concernant les changements conformationnels induits par des mutations ou par la fixation de ligands sur les protéines TGT Procaryote et Eucaryote, une étude par IM-MS sera réalisée.

## 5 Valorisation

---

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont fait l'objet de la publication suivante :

Florian Immekus, Luzi Jakob Barandun, Michael Betz, Francois Debaene, **Stephanie Petiot-Bécard**, Sarah Sanglier-Cianferani, Klaus Reuter, François Diederich and Gerhard Klebe. **Launching spiking ligands into a protein-protein interface: A promising strategy to destabilize and break interface formation in a tRNA modifying enzyme.** Rédaction en cours.



## Chapitre 3 : Optimisation des paramètres instrumentaux du couplage IM-MS pour la détection de faibles changements conformationnels : Étude du système Bcl-xL/ABT-737

---

Le criblage de chimiothèques est l'une des premières étapes des études de *drug discovery*. L'objectif de cette étape est de déterminer rapidement quelles molécules sont les meilleurs candidats pour moduler l'activité d'une cible thérapeutique. Parmi les techniques utilisées dans le cas du criblage protéine/ligand, la MS supramoléculaire a montré depuis plusieurs années, sa capacité à répondre aux exigences de l'industrie pharmaceutique. Elle est maintenant reconnue comme une technique permettant de déterminer des stœchiométries d'interaction, des affinités et des spécificités de fixation de systèmes protéine/ligand<sup>5, 143, 251</sup>. De la même manière, une technique émergente : le couplage IM-MS pourrait devenir une technique indispensable dans le criblage de chimiothèques. Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont permis de suivre des changements conformationnels induits par la fixation de petites molécules sur des complexes multiprotéiques de hauts poids moléculaires (100-300 kDa). Toutefois, seules des différences de CCS de l'ordre de 5% ont pu être mises en évidence<sup>9</sup>. Cependant, dans les systèmes biologiques, des changements structuraux fins peuvent rendre compte d'une activité physiologique importante<sup>320</sup>. Ainsi, jusqu'à présent peu ou pas de données sont disponibles sur l'utilisation du couplage IM-MS pour l'étude de changements conformationnels subtils induits par la fixation de petites molécules chimiques sur des protéines. Nous avons donc souhaité étudier le potentiel du couplage IM-MS pour l'étude de changements conformationnels fins. Afin de développer notre méthode analytique, nous nous sommes intéressés à un système bien caractérisé : le système Bcl-xL/ABT-737.

### 1 Contexte biologique de l'étude des interactions Bcl-xL/ABT-737

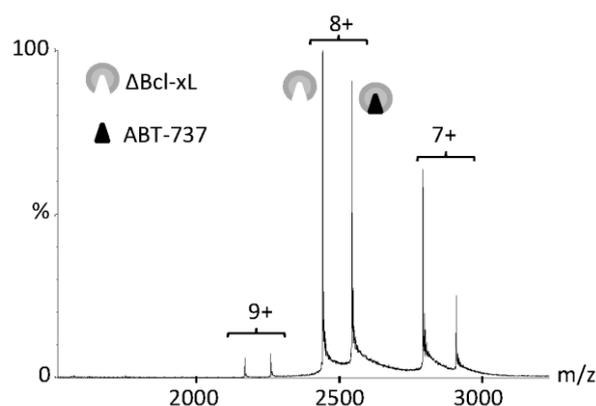
---

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus cellulaire fondamental permettant l'élimination de cellules endommagées ou potentiellement dangereuses. Une dérégulation de ce processus conduit à une prolifération anormale des cellules et donc à la formation de tumeurs<sup>321</sup>. L'une des stratégies thérapeutiques anticancéreuses consiste à activer ce processus. Plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier des molécules capables d'activer l'apoptose. L'une d'entre elles a permis d'identifier une classe de molécules dont fait partie la molécule ABT-737, capable d'activer l'apoptose en se liant à des facteurs de survie tels que Bcl-xL<sup>322</sup>. Cette classe de composés est

actuellement utilisée dans plusieurs programmes de recherche clinique de phase I/II. Lors de l'étude de ce système par cristallographie, il a été mis en évidence que la fixation du ligand ABT-737 (MW= 813.43 Da) sur la protéine  $\Delta$ Bcl-xL (MW= 19 576.5 Da) induisait un repositionnement majeur des hélices H3 et H4 de la protéine  $\Delta$ Bcl-xL et que le changement conformationnel global était de  $0,9 \text{ \AA}^{323}$ . Pour nous assurer que notre modèle peut être étudié par couplage IM-MS, nous avons déterminé les sections efficaces théoriques des structures apo (structure non publiée) et holo  $\Delta$ Bcl-xL (PDB 2XYJ). La forme apo de la protéine présente une CCS de  $15,4 \pm 0,8 \text{ nm}^2$  alors que la CCS de la structure holo est de  $16,3 \pm 0,8 \text{ nm}^2$ . Par conséquent, la différence de CCS théorique de  $0,9 \text{ nm}^2$  est significative ( $p < 0,001$ ), en accord avec le changement conformationnel global observé, et représente 6% de variation de CCS.

La mobilité ionique permet une séparation des ions en fonction de leur forme, mais aussi en fonction de leur taille et de leur charge. Pour que des changements conformationnels subtils puissent être mis en évidence, il est important que le ligand n'induisse pas une augmentation significative de la taille et ni de la charge de la protéine cible.

La protéine  $\Delta$ Bcl-xL est monomérique ( $M_{\text{mesurée}} = 19\,578 \pm 1 \text{ Da}$  ;  $M_{\text{théorique}} = 19\,577 \text{ Da}$ ) et présente deux états de charges majoritaires : 7 et 8+. L'étude des interactions entre la protéine  $\Delta$ Bcl-xL et le ligand ABT-737 nous a permis de mettre en évidence la fixation d'un ligand par protéine ( $M_{\text{mesurée}} = 20\,392 \pm 1 \text{ Da}$  ;  $M_{\text{théorique}} = 20\,391 \text{ Da}$ ) et la conservation des états de charge majoritaire de la protéine  $\Delta$ Bcl-xL. La fixation du ligand (ABT-737) sur la protéine  $\Delta$ Bcl-xL n'a donc pas eu d'effet sur la charge de la protéine et n'a pas entraîné d'augmentation significative de la masse de la protéine ( $< 5\%$ ) (Figure 31). Par conséquent, si une différence de mobilité est observée, celle-ci ne pourra être attribuée qu'à un changement de la forme de la protéine.



**Figure 31:** Spectre de masse obtenu en conditions non dénaturantes d'un mélange  $\Delta$ Bcl-xL/ABT-737 en proportion stœchiométriques (1/0,5). La protéine a été infusée à  $5 \mu\text{M}$  dans un tampon acétate d'ammonium  $50 \text{ mM}$  (pH 7.5).

Nous avons donc utilisé ce système pour déterminer si les instruments dont nous disposons au laboratoire nous permettaient de visualiser des changements conformationnels très subtils sur des systèmes protéiques de faibles poids moléculaires.

## 2 Objectifs de l'étude

- L'optimisation des paramètres de mobilité ionique pour la détection de changements conformationnels très faibles.
- La mise au point d'une méthode permettant un calcul de CCS la plus juste possible.

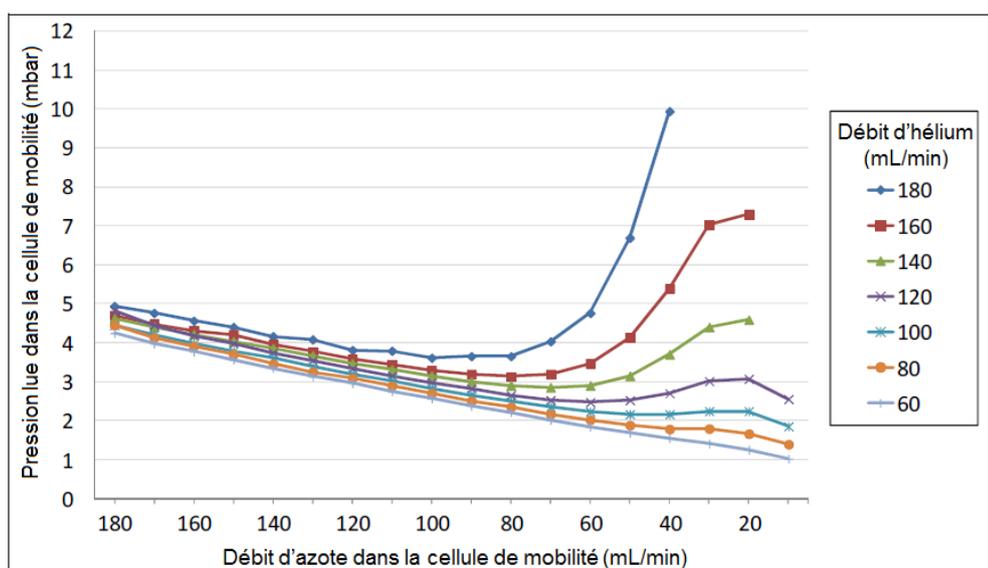
Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Analytical Chemistry*. Un résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous.

## 3 Résumé de la stratégie mise en œuvre et des résultats obtenus

### 3.1 Optimisation fine des paramètres instrumentaux

L'optimisation des paramètres IMS est une étape *sine qua non* dans toute étude de changement conformationnel par IM-MS. Ceci est d'autant plus important lorsque l'on étudie des changements conformationnels très faibles. Notre étude a donc porté sur l'optimisation des paramètres de séparation en IMS ( $W_H$ ,  $W_V$ ,  $Q_{He}$  et  $Q_{N_2}$ ) pour détecter de faibles changements de conformation.

Il est important de rappeler que contrairement aux études réalisées sur des instruments Synapt G1, sur un Synapt G2, la lecture de la pression dans la cellule IMS n'est pas un paramètre fiable. En effet, la présence d'une cellule d'hélium entraîne une diffusion de l'hélium dans la cellule IMS. Par conséquent, la lecture de la pression  $P_i$  dans la cellule IMS est fautive, car les jauges sont étalonnées uniquement pour des gaz purs. La pression  $P_i$  mesurée dans la cellule IMS dépend donc des débits d'hélium et d'azote. Du fait de cette diffusion d'hélium, l'évolution de la pression mesurée au sein de la cellule IMS n'est pas monotone (Figure 32).



**Figure 32:** Évolution de la pression lue dans la cellule de mobilité ( $P_{IMS}$ ) en fonction des débits de gaz d'hélium et d'azote ( $Q_{He}$  et  $Q_{N_2}$ ). Différents couples ( $Q_{He}$ ,  $Q_{N_2}$ ) peuvent conduire à des pressions similaires montrant l'importance de fournir des informations concernant les débits de gaz en plus de la pression lue dans la cellule lors d'étude de mobilité ionique sur le Synapt G2 HDMS (Waters).

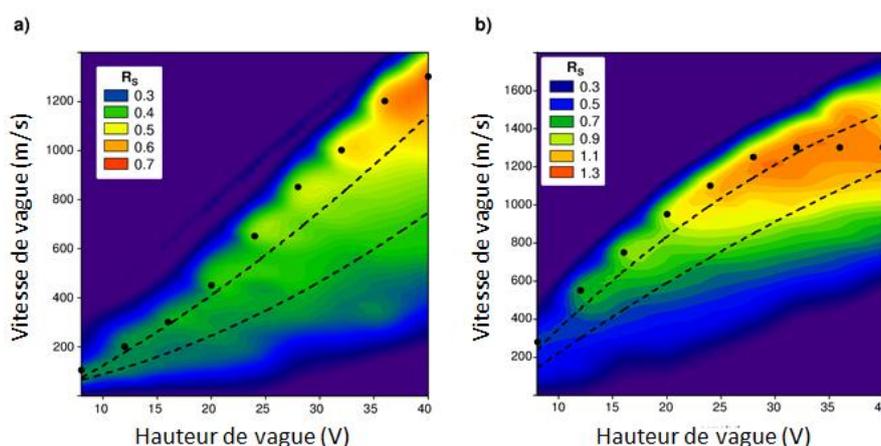
Par conséquent, plusieurs combinaisons de débits de gaz d'hélium et d'azote peuvent donner la même lecture de pression. C'est pourquoi il est important de préciser les débits de gaz utilisés lors d'études IM-MS réalisées sur un Synapt G2.

Afin d'optimiser les paramètres de mobilité ionique, plusieurs étapes ont été nécessaires.

#### - Optimisation des vitesses (WV) et des hauteurs (WH) de vagues

Pour étudier l'effet des vitesses de vagues, nous avons fixé la hauteur de vagues puis nous avons fait varier la vitesse des vagues de manière à obtenir des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité recouvrant l'ensemble du mobilogramme. Cette étude a été faite pour 3 hauteurs de vagues (20, 30 et 40V) et pour 2 rapports de débits d'hélium/azote ( $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 2$  et  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 4$ ).

Afin d'évaluer la qualité de la séparation en IMS, nous avons calculé les facteurs de résolution  $R_s$  (voir Partie 2, Chapitre 3, Paragraphe 1.1) entre l'état de charge 7+ des formes apo et holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  pour chaque condition expérimentale (Figure 33).



**Figure 33: Optimisation des hauteurs et vitesses de vagues.** La protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) a été infusée en présence d'une concentration sous-stœchiométrique de ligand ABT-737. a)  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 150/75$  ( $P_{\text{IMS}} = 3$  mbar) et b)  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 150/35$  ( $P_{\text{IMS}} = 5$  mbar). Les facteurs de résolutions  $R_s$  ont été calculés entre les formes apo et holo de la protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$ . La zone située entre les pointillés correspond aux couples (WH, WV) permettant d'obtenir un temps de passage des ions dans la cellule de mobilité se trouvant dans le second tiers du mobilogramme. Les cercles noirs représentent les valeurs de WV permettant d'obtenir le meilleur  $R_s$  pour chaque hauteur de vague testée.

Ces optimisations nous ont permis de montrer que de meilleures séparations des formes apo et holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  étaient obtenues pour des hauteurs de vagues comprises entre 30 et 40 V et pour des rapports de débits de gaz  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  plus élevés (Figure 33, b).

#### - Optimisation des rapports de débits de gaz d'hélium et d'azote ( $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$ )

Pour mieux comprendre l'effet des débits de gaz sur le facteur de résolution, nous avons fait varier les débits d'hélium pour 3 rapports  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  (2, 3 et 4). Pour chacune des conditions de débits de gaz, 3 hauteurs de vagues ont été testées (20, 30 et 40 V). Les vitesses de vagues ont été

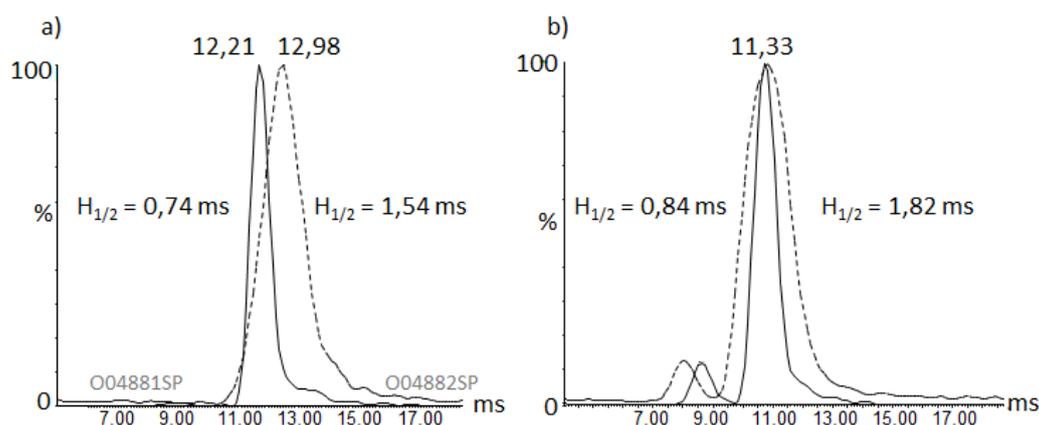
optimisées pour que les temps de passage des ions dans la cellule de mobilité soient compris entre 7 et 14 ms (Figure 34).

		Facteur de résolution												WV (m/s)												P <sub>IMS</sub> (mbar)		
		2				3				4				2				3				4				2	3	4
Q <sub>He</sub> /Q <sub>N2</sub>	Q <sub>He</sub> (mL/min)	Q <sub>He</sub> /Q <sub>N2</sub>												Q <sub>He</sub> /Q <sub>N2</sub>												Q <sub>He</sub> /Q <sub>N2</sub>		
		60	0.9	0.9	1.1	1.1	1.2	1.1*	1.3	1.0*	n.d.	850	950	950	1200	1230	1220*	1450	1435*	1335*	1.4	1.3	1.2					
100	0.6	0.9	1.1	0.8	1.2	1.4	1.0	1.3	1.3	610	825	875	1000	1200	1200	1300	1435	1450	2.2	2.2	2.3							
140	0.4	0.7	0.9	0.5	0.9	1.2	0.7	1.1	1.4	390	630	775	750	1020	1150	1100	1340	1400	2.8	3.3	4.1							
180	0.4	0.5	0.7	0.4	0.7	1.0	0.5	0.8	1.2	260	450	625	550	825	1050	850	1150	1350	3.5	4.7	7.9							
WH (V)		20				30				40				20				30				40						

**Figure 34: Amélioration de la séparation par IM-MS des formes  $\Delta$ Bcl-xL apo et holo (état de charge 7+) grâce à l'optimisation des débits de gaz d'hélium et d'azote.** L'astérisque (\*) correspond aux conditions expérimentales induisant l'activation des ions. n.d : le facteur de résolution n'a pas pu être calculé à cause de l'activation des ions. Les couleurs utilisées vont du vert pour les valeurs les plus faibles aux valeurs les plus élevées en rouge.

De meilleures séparations des formes apo et holo  $\Delta$ Bcl-xL ( $R_s > 1$ ) ont été obtenues pour des hauteurs de vagues et des rapports de débits de gaz plus élevés (Figure 34, a). De plus, nous avons pu montrer qu'une diminution des débits de gaz d'hélium et d'azote permet une meilleure séparation des formes apo et holo  $\Delta$ Bcl-xL par mobilité ionique. Par exemple, pour un rapport  $Q_{He}/Q_{N_2}$  de 4 et une hauteur de vague de 30 V, une augmentation du facteur de résolution  $R_s$  de 1 à 1.4 est observée lorsque le débit d'hélium diminue de 180 mL.min<sup>-1</sup> à 100 mL.min<sup>-1</sup>.

Toutefois, il existe une limite. En effet, une diminution trop importante des débits de gaz peut conduire à une activation des ions en phase gazeuse, caractérisée sur les mobilogrammes par une augmentation de la largeur des pics de mobilité (Figure 35). Ainsi pour un même rapport de débit de gaz ( $Q_{He}/Q_{N_2} = 3$ ), une augmentation de la largeur des pics de mobilité est observée lorsque le débit d'hélium diminue de 100 à 60 mL.min<sup>-1</sup>.



**Figure 35: Effet de la diminution des débits de gaz d'hélium et d'azote sur la largeur des pics de mobilité ionique.** Temps de passage de l'ion de m/z 2798 (a) (état de charge 7+ de la forme apo  $\Delta$ Bcl-xL) et de l'ion de m/z 2915 (b) (état de charge 7+ de la forme holo  $\Delta$ Bcl-xL) dans la cellule IMS enregistrés en absence d'activation (ligne continue - WH = 40 V, WV = 1435 m.s<sup>-1</sup>, Q<sub>He</sub> = 100 mL/min; Q<sub>He</sub>/Q<sub>N<sub>2</sub></sub> = 3) et en présence d'activation (ligne pointillée - WH = 40 V, WV = 1435 m.s<sup>-1</sup>, Q<sub>He</sub> = 60 mL/min; Q<sub>He</sub>/Q<sub>N<sub>2</sub></sub> = 3).

### - Conclusion

L'ensemble de ces optimisations nous a donc permis de déterminer l'importance des différents paramètres sur la séparation par mobilité ionique.

Pour obtenir la meilleure séparation possible : le rapport  $Q_{He}/Q_{N_2}$  doit être supérieur ou égal à 3 avec un débit d'azote le plus faible possible, la hauteur de vague doit être la plus haute possible (30-40 V) et la vitesse des vagues est ajustée de manière à ce que le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité se trouve dans le deuxième tiers du mobilogramme.

De plus, il est indispensable de s'assurer que les paramètres instrumentaux choisis n'induisent pas l'activation des ions en phase gazeuse.

### 3.2 Une nouvelle méthode d'étalonnage pour un calcul plus précis des CCS

La comparaison des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité permet d'obtenir une information précise concernant la séparation des différents conformères en phase gazeuse.

Cependant, cette information ne peut être comparée à d'autres méthodes biophysiques contrairement à la section efficace rotationnelle (CCS). Cette valeur est obtenue grâce à un étalonnage de la mobilité ionique avec des étalons dont la CCS théorique a été déterminée dans des tubes de mobilité classiques. Le choix des étalons est une étape cruciale permettant d'obtenir des CCS fiables et donc de conserver l'information d'un changement conformationnel. Récemment, Ruotolo *et al.*, ont montré que pour déterminer avec précision des CCS de molécules en conditions natives, un ensemble d'étalons, utilisés en conditions natives, avec des masses et des mobilités encadrant l'analyte doit être choisi<sup>177</sup>. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de la courbe d'étalonnage permet de vérifier la qualité de l'étalonnage. Toutefois, comme ce paramètre varie en fonction de la vitesse de vague et de la pression dans la cellule de mobilité<sup>185</sup>, nous avons souhaité évaluer l'effet de ces paramètres de mobilité sur l'étalonnage en mobilité ionique (Figure 36).

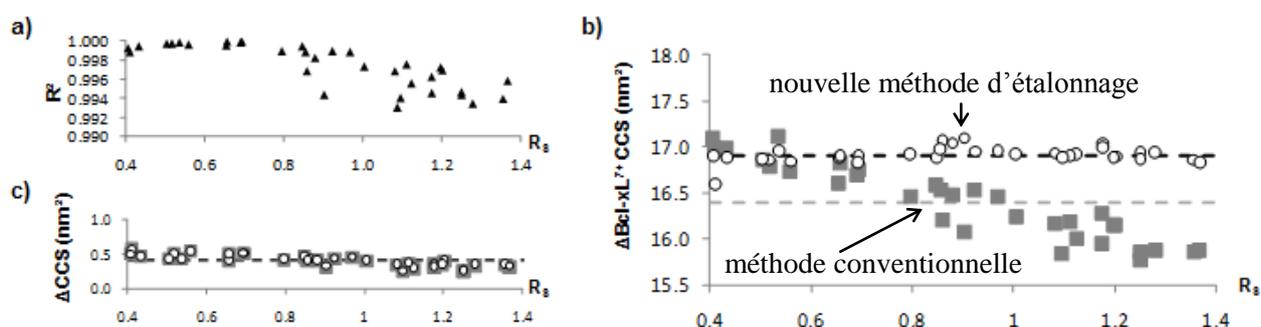
a) Facteur de résolution $R_s$										b) Facteur X										$P_{MS}$ (mbar)		
		$Q_{He}/Q_{N_2}$			$Q_{He}/Q_{N_2}$			$Q_{He}/Q_{N_2}$			$Q_{He}/Q_{N_2}$			$Q_{He}/Q_{N_2}$			2	3	4			
$Q_{He}$ (mL/min)	WH (V)	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4			
		60	20	0.9	0.9	1.1	1.1	1.2	1.1*	1.3	1.0*	n.d.	0.35	0.27	0.20	0.25	0.20	0.28*	0.19	0.19*	n.d.	1.4
100	20	0.6	0.9	1.1	0.8	1.2	1.4	1.0	1.3	1.3	0.51	0.37	0.28	0.39	0.29	0.25	0.32	0.25	0.16	2.2	2.2	2.3
140	20	0.4	0.7	0.9	0.5	0.9	1.2	0.7	1.1	1.4	0.64	0.48	0.38	0.55	0.37	0.30	0.45	0.32	0.23	2.8	3.3	4.1
180	20	0.4	0.5	0.7	0.4	0.7	1.0	0.5	0.8	1.2	0.62	0.56	0.45	0.62	0.48	0.37	0.58	0.42	0.29	3.5	4.7	7.9
	30																					
	40																					

**Figure 36: Corrélation entre la séparation par IM-MS des formes  $\Delta Bcl-xL$  apo et holo (état de charge 7+) et le facteur d'étalonnage X déterminé lors du calcul de CCS expérimentales.** L'astérisque (\*) correspond aux conditions expérimentales induisant l'activation des ions. n.d. : le facteur de résolution n'a pas pu être calculé à cause de l'activation des ions. Les couleurs utilisées vont du vert pour les valeurs les plus faibles aux valeurs les plus élevées en rouge.

Nous avons ainsi pu montrer que le coefficient de corrélation diminuait progressivement lorsque les conditions de mobilité favorisaient une augmentation de la séparation ce qui est en accord avec de précédentes études sur le sujet<sup>185</sup> (Figure 36 et Figure 37, a).

De même, nous avons pu montrer qu'en utilisant l'étalonnage proposé par Ruotolo *et al.*, les CCS mesurées à partir de l'état de charge 7+ de la protéine  $\Delta Bcl-xL$  diminuent lorsque le pouvoir résolutif augmente (Figure 37, b). Or, des différences de sections efficaces entre les états de charge 7+ des

formes apo et holo de la protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$  ( $\Delta\text{CCS}$ ) sont identiques quel que soit le pouvoir de résolution ( $R_s$ ) (Figure 37, c). Les incohérences observées entre le calcul de CCS et les différences de CCS, nous ont conduits à développer une nouvelle méthode d'étalonnage prenant comme ion étalon, un ion de même charge et de même masse que l'ion dont on détermine la CCS. Les CCS calculées avec cette nouvelle méthode d'étalonnage ne varient plus en fonction du pouvoir de résolution (Figure 37, b), ce qui est en accord avec l'absence d'effet du facteur  $R_s$  sur les différences de CCS (Figure 37, c).



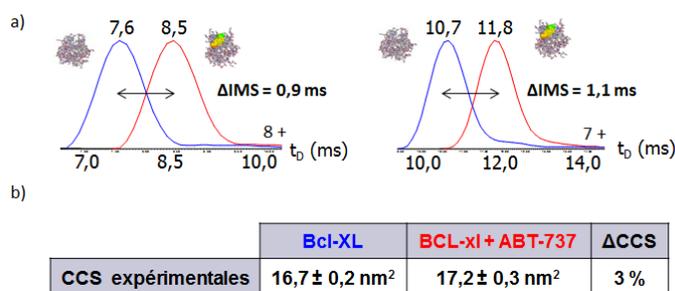
**Figure 37: Influence des paramètres instrumentaux permettant une augmentation de la résolution en mobilité ionique sur la détermination de la CCS de la protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$**  a) Évolution du coefficient de corrélation ( $R^2$ ) en fonction du pouvoir de résolution ( $R_s$ ). b) CCS de l'état de charge  $7+$  de la protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$  et c) différence de CCS entre les états de charge  $7+$  des formes apo et holo de la protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$ , en fonction du pouvoir de résolution ( $R_s$ ), en utilisant la procédure de étalonnage conventionnelle de Ruotolo *et al* (carrés et pointillés gris) ou la procédure modifiée utilisant un standard externe (cercles blancs et pointillés noirs). Les lignes pointillées correspondent aux CCS moyennes sur l'ensemble de la gamme de  $R_s$ .

Ainsi, nous avons pu montrer avec notre nouvelle méthode d'étalonnage que pour des meilleures séparations en mobilité ionique, nous conservions une différence de CCS moyenne constante entre la protéine apo et la protéine holo ( $0.41 \pm 0.08 \text{ nm}^2$ ).

De plus, cette différence est du même ordre de grandeur que la différence calculée à partir des CCS théoriques ( $0,9 \text{ nm}^2$ ).

### 3.3 Mise en évidence de changements conformationnels fins par IM-MS

L'ensemble des optimisations réalisées au cours de cette étude, nous a permis de mettre en évidence une séparation de la protéine  $\Delta\text{Bcl-xL}$  sous forme apo et sous forme holo par IM-MS. En effet, une différence de temps de passage des ions dans la cellule IMS de l'ordre de la milliseconde a pu être mise en évidence (Figure 38, a).



**Figure 38: Mise en évidence de changements conformationnels fins par IM-MS lors d'étude protéine/ligand.** a) Mobilogrammes des états de charge  $7+$  et  $8+$ , b) Calcul des CCS expérimentales mettant en évidence un changement conformationnel fin (3%).

Grâce aux calculs des CCS expérimentales, nous avons pu montrer que cette séparation correspondait à une différence de CCS de 3% (Figure 38, b).

Par conséquent, après avoir optimisé finement les paramètres IM-MS, il est possible d'étudier des changements conformationnels de l'ordre de 3% sur un système protéine/ligand du type  $\Delta$ Bcl-xL/ABT-737.

## 4 Conclusion

---

L'étude du système  $\Delta$ Bcl-xL/ABT-737 par IM-MS nous a permis de montrer pour la première fois que l'étude de changements conformationnels subtils est possible grâce au Synapt HDMS G2. L'étude des différents paramètres IM-MS nous a permis de mettre au point une stratégie d'optimisation pour l'étude de changements conformationnels très faibles.

Bien que le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité soit le paramètre le plus représentatif de la qualité de la séparation dans la cellule de mobilité, nous avons aussi proposé une nouvelle méthode d'étalonnage en IMS permettant de diminuer la perte d'information structurale lors du calcul des CCS (paramètre permettant la comparaison entre les différentes méthodes biophysiques).

## 5 Valorisation

---

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

### Publication :

Cédric Atmanene\*, **Stéphanie Petiot-Bécard\***, Denis Zeyer, Alain Van Dorsselaer, Valérie Vivat Hannah, Sarah Sanglier-Cianférani. **Exploring Key Parameters to detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry.** *Journal of Analytical chemistry*, 2012, 84 (11) : 4703-4710 (\* co-auteurs)

### Communication orale :

**Stéphanie Bécard**, Jean-Paul Renaud, Denis Zeyer, Valérie Vivat Hannah, Alain Van Dorsselaer, Cédric Atmanene, Sarah Sanglier-Cianférani. **Exploring Key Parameters to detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry.** *Journée des doctorants de l'IPHC, 12 avril 2012, Strasbourg.*

### Communication par affiche :

**Stéphanie Petiot-Bécard**, Jean-Paul Renaud, Denis Zeyer, Valérie Vivat-Hannah, Alain Van Dorsselaer, Cédric Atmanene et Sarah Sanglier-Cianférani. **Le couplage Mobilité Ionique - Spectrométrie de Masse (IM-MS) pour le suivi de changements conformationnels induits par la fixation d'un ligand sur une cible protéique.** *Congrès français de spectrométrie de masse et d'analyses protéomiques (SMAP), 19-22 septembre 2011, Avignon.* Prix poster SMAP 2011.

## Publication

### **Exploring Key Parameters to detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry**

Cédric Atmanene\*, Stéphanie Petiot-Bécard\*, Denis Zeyer, Alain Van Dorsselaer, Valérie Vivat  
Hannah, Sarah Sanglier-Cianférani

*Analytical Chemistry*, 2012,

\* contribution équivalente des deux auteurs



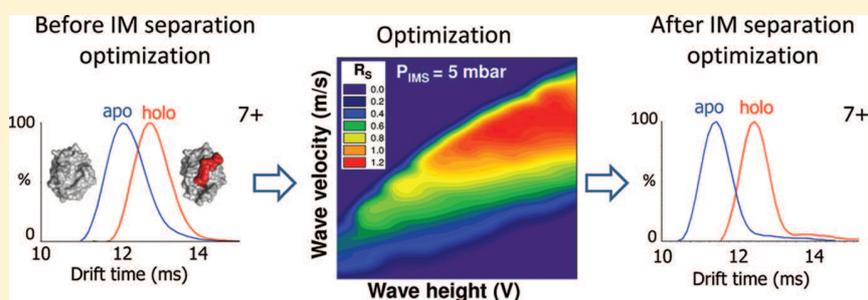
# Exploring Key Parameters to Detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes Using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry

Cédric Atmanene,<sup>†</sup> Stéphanie Petiot-Bécard,<sup>‡</sup> Denis Zeyer,<sup>†</sup> Alain Van Dorsseleer,<sup>‡</sup> Valérie Vivat Hannah,<sup>†</sup> and Sarah Sanglier-Cianfèrani<sup>\*‡</sup>

<sup>†</sup>NovAliX, Structural Biology, Parc d'Innovation Bioparc, Boulevard Sébastien Brant, 67400 Illkirch, France

<sup>‡</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), Université de Strasbourg, IPHC, 25 Rue Becquerel 67087 Strasbourg, France, CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France

## Supporting Information



**ABSTRACT:** Evidencing subtle conformational transitions in proteins occurring upon small modulator binding usually requires atomic resolution techniques (X-ray crystallography or NMR). Recently, hyphenation of ion mobility and mass spectrometry (IM-MS) has greatly enlarged the potentials for biomolecular assembly structural characterization. Using the well 3D-characterized Bcl-xL/ABT-737 protein model, we explored in the present report whether IM-MS can be used to differentiate close conformers and monitor collision cross section (CCS) differences correlating with ligand-induced conformational changes. Because comparing CCS derived from IM-MS data with 3D-computed CCS is critical for thorough data interpretation, discussing pitfalls related to protein construct similarity and missing sequence sections in PDB files was of primary importance to avoid misinterpretation. The methodic exploration of instrument parameters showed enhanced IM separation of Bcl-xL conformers by combining high wave heights and velocities with low helium and nitrogen flow rates while keeping a high He/N<sub>2</sub> flow rate ratio (>3). The robustness of CCS measurements was eventually improved with a modified IM calibration method providing constant CCS values regardless of instrument settings. Altogether, optimized IM-MS settings allowed a 0.4 nm<sup>2</sup> increase (i.e., 2%) of Bcl-xL CCS to be evidenced upon ABT-737 binding.

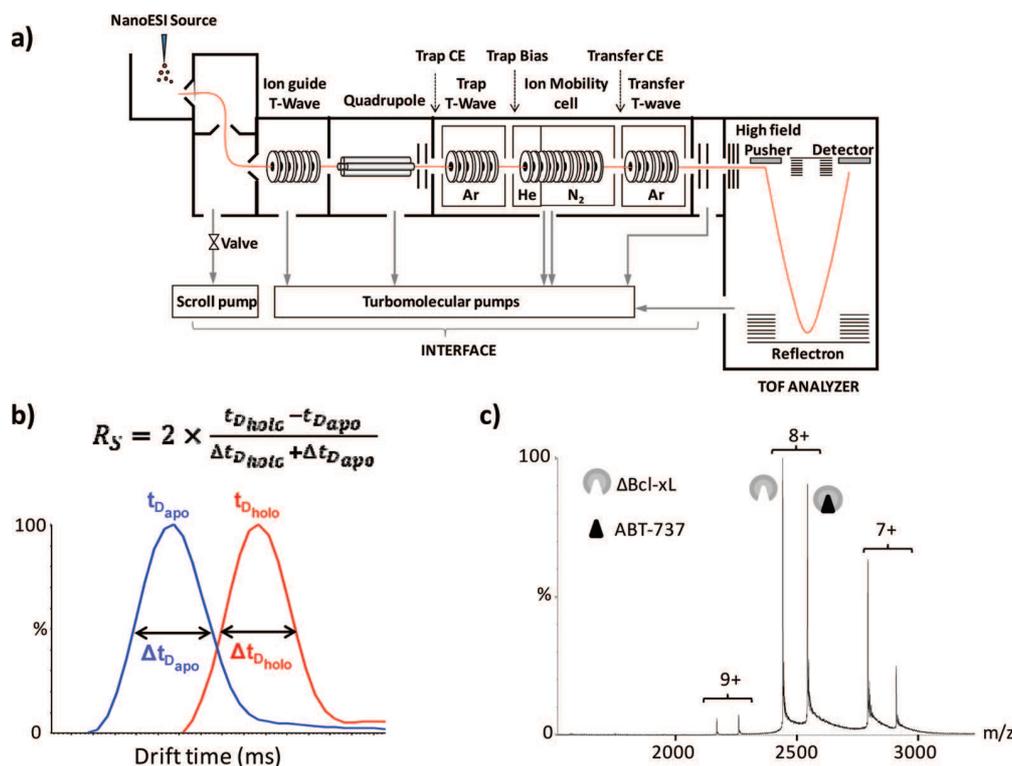
In 1991, pioneering reports from two American groups evidenced for the first time that intact noncovalent complexes can be analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).<sup>1,2</sup> The following 2 decades were dedicated to methodological studies providing strategies for rational optimization of experimental conditions and instrument settings,<sup>3–5</sup> allowing native MS to become a robust and versatile technique to characterize intermolecular interactions involving proteins, peptides, oligonucleotides, metals, and small molecules. Concomitant publication of numerous case studies has contributed not only to define the possibilities afforded by native MS but also to explore the limitations of the method in order to probe to which extent gas-phase measurements can be correlated with solution-phase properties. Thanks to this groundwork, native MS is now broadly approved to address key questions like protein oligomerization states,<sup>6,7</sup> complex binding stoichiometries and affinities,<sup>8,9</sup> ligand site-specificities,<sup>8</sup> or interaction networks within multimeric complexes.<sup>10</sup>

Ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) is likely to follow similar developments. Ion mobility is an analytical technique allowing ions to be separated by a weak electric field in a defined gas environment according to their mobility, which depends on ion charge and collision cross section (CCS,  $\Omega$ ). Accumulation of methodological and practical studies focusing on native biomolecules has been accelerated by the recent advent of traveling-wave IM-MS. Practically, traveling-wave (T-wave) IM separation is achieved by submitting ions to waves of potential that move along a radiofrequency-confining cell filled with a carrier buffer gas. For a given charge state, the ion-neutral collision frequency increases with extended ion conformation resulting in a higher propensity to roll back

Received: December 5, 2011

Accepted: April 25, 2012





**Figure 1.** (a) General scheme of the Synapt G2 HDMS. (b) Resolution factor ( $R_s$ ) calculation based on apo and holo Bcl-xL arrival time distributions (ATD).  $t_D$  and  $\Delta t_D$  represent, respectively, the maximum and the width-at-half-maximum of the corresponding ATD. (c) Nondenaturing nanoESI mass spectra of substoichiometric 1/0.5 Bcl-xL/ABT-737 mixture: protein was infused at 5  $\mu$ M in a 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  solution (pH 7.5).

over the waves. Consequently, compact ions display shorter drift times ( $t_D$ ) than ions with expanded structures. The possibility of compiling data of ion  $t_D$  together with mass and charge expands one notch further the range of information that can be gathered on native biological assemblies, including conformational polydispersity, ligand-induced conformational transitions, or multimeric complex topology.<sup>10–22</sup>

One key issue in such IM-MS experiments is to improve IM resolution. The major modifications implemented into the second-generation of traveling-wave IM-MS instruments were intended to address this point. While technical enhancements of the Synapt G2 HDMS have been detailed elsewhere,<sup>23,24</sup> it is important emphasizing the addition of a helium gate in front of the T-Wave IM separator (Figure 1). Operating the He gate at high pressure (i) provides efficient ion collisional cooling, (ii) allows higher  $\text{N}_2$  pressure to be used in the IM cell, and (iii) favors ion transfer against the pressure gradient existing between the trap T-wave (filled with Ar) and the IM cell (filled with  $\text{N}_2$ ).<sup>23</sup>

The effect of IM wave height (WH) and velocity (WV) on IM resolution has been approached both theoretically and experimentally.<sup>24,25</sup> Conversely, the influence of helium and nitrogen flow rates ( $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$ ) entering, respectively, the helium and IM cell has not been thoroughly examined yet. The main focus of the present study was to investigate the effect of  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$  on IM separation of closely related protein conformers. To this end, we used the Bcl-xL protein model: Bcl-xL is a Bcl-2 related survival factor that undergoes conformational changes upon small-molecule inhibitor ABT-737 binding as previously evidenced by X-ray crystallography.<sup>26</sup> Using this model system, we addressed a number of critical

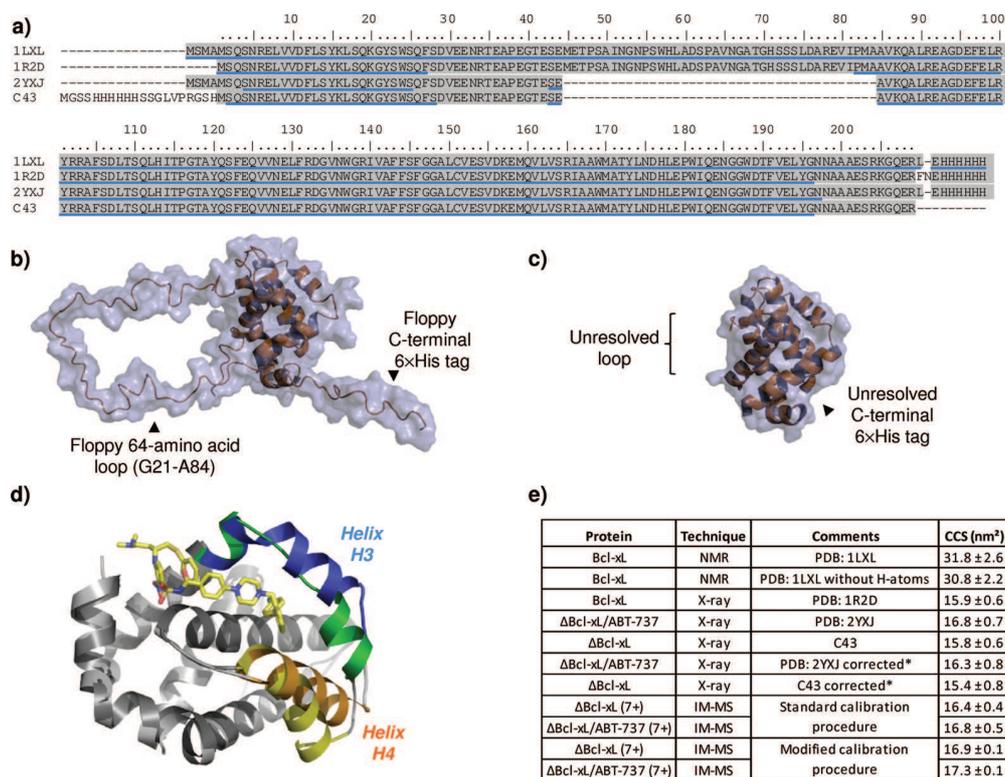
points including (i) difficulties related to theoretical CCS computation from coordinate files, (ii) effects of WH, WV, as well as  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$  on IM separation of apo versus holo Bcl-xL, and (iii) robustness of CCS measurements on a traveling-wave IM-MS instrument.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Sample Preparation.** Recombinant Bcl-xL was produced in *E. coli* and purified by affinity chromatography as described by Muchmore et al.<sup>27</sup> The peptidic sequence of the construct included N-terminal (His)<sub>6</sub>-tagged deletion mutant ( $\Delta$ M45-A84) of Bcl-xL (M1-R209), hereafter called  $\Delta$ Bcl-xL. Thrombin cleavage site (LVPRG) located downstream of the His-tag sequence was used to remove the tag before IM-MS experiments. Protein storage buffer was exchanged against 50 mM ammonium acetate buffered at pH 7.5 using a microcentrifuge gel-filtration column (Zeba 0.5 mL, ThermoScientific, Rockford, IL). The protein concentration was determined using the Bradford assay. ABT-737 (Selleck Chemicals, Houston, TX) was incubated substoichiometrically with  $\Delta$ Bcl-xL to avoid saturation and allow apo and holo protein to be concomitantly monitored during the same analysis.

**Computation of Rotationally Averaged Theoretical Collision Cross Sections.** Theoretical CCS values reported in the present paper were obtained using the Mobcal trajectory method with a number of complete cycles of average mobility calculation set to 30.<sup>28,29</sup> Computed CCS error values correspond to standard deviations reported in Mobcal output files.

**Ion Mobility Mass Spectrometry.** IM-MS experiments were performed on the Synapt G2 HDMS (Waters, Man-



**Figure 2.** Comparison of Bcl-xL structures. (a) Sequence alignment of Bcl-xL constructs used in different structural studies. 1LXL: NMR structure of Bcl-xL. 1R2D: X-ray structure of Bcl-xL. 2YXJ: X-ray structure of ΔBcl-xL/ABT-737 complex. C43: X-ray structure of apo ΔBcl-xL. Visible residues are underlined in sequences. (b, c) Three-dimensional structures of Bcl-xL from (b) NMR (PDB 1LXL) and (c) X-ray crystallography (PDB 1R2D). (d) Superimposed structures of apo ΔBcl-xL (C43) and ΔBcl-xL/ABT-737 complex (2YXJ). Overlapping regions are gray-colored; helices H3 and H4 are colored in green/yellow in apo ΔBcl-xL and blue/orange in ΔBcl-xL/ABT-737. (e) CCS summary. \* Coordinate files corresponding to ΔBcl-xL/ABT-737 (PDB 2YXJ) and ΔBcl-xL (C43) were corrected for missing coordinates in either file.

chester, U.K.). This electrospray hybrid quadrupole/ion mobility/time-of-flight mass spectrometer was coupled to an automated chip-based nanoelectrospray device (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, U.S.) operating in the positive ion mode. IM-MS data analysis was performed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, U.K.). Instrument parameters were adjusted to transfer intact noncovalent complexes without extensive ion activation before IM separation while keeping satisfactory ion desolvation.<sup>30</sup> Particularly, the sample cone voltage, the trap collision energy, and the trap bias voltage were set to 30 V, 5 V, and 40 V, respectively; the backing pressure was increased to 6 mbar to improve ion collisional cooling. Wave parameters (WV, WH) and gas flow rates ( $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$ ) were systematically varied to investigate their influence on IM separation. Unless mentioned otherwise, instrument parameters were set to keep  $t_D$  of apo and holo ΔBcl-xL 7+ charge state in the second third (7–14 ms) of the accessible  $t_D$  range (0–21 ms corresponding to 500–5000  $m/z$  range). Working in this  $t_D$  window (i) affords recording simultaneously calibrants and analyte ions with identical instrument parameters, (ii) avoids poor IM separation to occur in the first third of the  $t_D$  range, and (iii) prevents arrival time distribution (ATD) broadening to appear in the last third of the  $t_D$  range.<sup>31</sup>

IM-MS calibration was performed as previously described using native equine cytochrome C (1766 and 2061  $m/z$ ) and bovine β-lactoglobulin (2041, 2296, 2624, 2825, 3060, 3336  $m/z$ ) (Sigma Aldrich St. Louis, MO).<sup>32</sup> Details of the modified

calibration procedure are given in the last part of the Results and Discussion.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Computation of Theoretical CCS: Difference between Bcl-xL and Bcl-xL/ABT-737 Complex.** Whether differences in Bcl-xL CCS should be expected upon binding of ABT-737 was first investigated by computing the theoretical CCS from published three-dimensional structures. The Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>) includes several structures for the wild type (wt) apo Bcl-xL determined by X-ray crystallography (PDB 1R2D, 1MAZ) or NMR (PDB 1LXL) and a single structure for the Bcl-xL/ABT-737 complex obtained by X-ray crystallography using the deletion mutant (ΔBcl-xL, PDB 2YXJ). This variety of three-dimensional data obtained with different techniques and different protein constructs incited us to address in deeper detail a point rarely commented in the literature, which is the choice of the coordinate sets used to compute theoretical CCS.

**NMR versus X-ray Bcl-xL Structures: Differences That Influence Computed CCS.** The 3D structure of the wt apo Bcl-xL elucidated by NMR and X-ray crystallography used similar constructs that contain C-terminal (His)<sub>6</sub>-tag and the large 64-amino acid loop connecting helices H1 and H2 (Figure 2). Computed CCS values from NMR (PDB 1LXL) and X-ray (PDB 1R2D) data sets were  $31.8 \pm 2.6 \text{ nm}^2$  and  $15.9 \pm 0.6 \text{ nm}^2$ , respectively. The substantial difference between both CCS values arises from different information content in X-ray versus NMR coordinate files. Indeed, while the structured core of the

protein was similarly resolved by both techniques (compare parts b and c of Figure 2), only NMR could resolve the floppy parts of the biomolecule, i.e., the large loop between H1 and H2 and the C-terminal His-tag. It is worthy to note that when the completeness of the NMR and X-ray crystallography structures is similar, both structures provide comparable CCS values.<sup>33</sup> Another interesting difference is the presence of H-atom coordinates in NMR data only. In the case of the Bcl-xL NMR structure, the CCS decreases from  $31.8 \pm 2.6 \text{ nm}^2$  to  $30.8 \pm 2.2 \text{ nm}^2$  (3% decrease) when H atoms are removed from the coordinate file. Although the contribution of H-atom may sound marginal, it may become significant when studying subtle CCS differences.

Altogether, these observations suggest that comparing CCS computed from 3D-structures obtained with the same biophysical technique provides better reliability especially when intrinsic unstructured motifs are present.

**Examination of Coordinate Files: Spotting Missing Atoms to Avoid Misinterpretations.** To estimate the CCS shift resulting from ligand-induced conformational changes, coordinate files to be compared (e.g., apo vs holo protein) must ideally report the position of the same atoms to ensure that computed CCS difference can be linked directly to the conformational transition. This is however not always the case because (i) slightly different constructs may be used for free and liganded proteins (Figure 2a shows the example of Bcl-xL), and (ii) ligand binding may induce initially floppy regions of the protein to become structured and visible in X-ray structures. Careful examination of both amino acid sequences and 3D structures prior to CCS computation is therefore of primary importance to point out missing atoms. To deal with incomplete structures, Politis et al. have recently proposed to reconstruct missing sections of sequence using homology or coarse-grained modeling.<sup>19</sup> While this approach was successfully used to decipher the architecture of multiprotein complexes, it may be difficult to apply such strategy in the case of subtle conformation differences, where the accuracy of protein structure models may not be sufficient to draw clear conclusions. Alternatively, for minor differences existing in protein regions that are not involved in compound binding or conformational transition, coordinate files may be corrected by removing atom coordinates that are not simultaneously defined in both structures. Although this approach is likely to alter the outcome of CCS computation, higher interest is given to the shift in CCS ( $\Delta\text{CCS}$ ) occurring upon conformational changes rather than to absolute CCS values.

**Application to the Case of Bcl-xL: apo versus ABT-737-Bound.** The structure of Bcl-xL in complex with ABT-737 (PDB 2YXJ) was obtained by X-ray crystallography at 2.2 Å resolution using a C-terminal His-tagged deletion mutant ( $\Delta\text{Bcl-xL}$ ) lacking part of the disordered amino acid loop connecting helices H1 to H2 (M45-A84, Figure 2a). Of the 181 amino acids (1467 non-hydrogen atoms) present in this construct, 137 residues (1119 non-hydrogen atoms, i.e., 76% coverage) are defined in the structure leading to the computed CCS value of  $16.8 \pm 0.7 \text{ nm}^2$  (Figure 2e).

No equivalent X-ray structure of unbound  $\Delta\text{Bcl-xL}$  was deposited in the PDB. We have therefore produced, crystallized, and resolved the structure of the free protein (so-called C43, Figure 2a) at 2.3 Å resolution using nearly identical  $\Delta\text{Bcl-xL}$  construct. In the resulting structure, 141 amino acids (1147 non-hydrogen atoms) of the protein 189 residues (1516 non-hydrogen atoms, i.e., 76% coverage) were resolved. CCS

computation from this data set provided a value of  $15.8 \pm 0.6 \text{ nm}^2$ .

To ascertain that the  $\Delta\text{CCS}$  computed from the whole crystallographic data sets of  $\Delta\text{Bcl-xL}$  and  $\Delta\text{Bcl-xL}/\text{ABT-737}$  was not over- or underestimated, coordinate files were corrected for protein atoms that are missing in either structure (Figure 2a). Subsequent CCS computation provided values of  $15.4 \pm 0.8 \text{ nm}^2$  and  $16.3 \pm 0.8 \text{ nm}^2$  for free and ABT-737-bound  $\Delta\text{Bcl-xL}$ , respectively, i.e., a  $\Delta\text{CCS}$  of  $0.9 \text{ nm}^2$  (Figure 2e). Although very close, these CCS values are significantly different ( $p < 0.001$ ). Interestingly, computed CCS of bound  $\Delta\text{Bcl-xL}$  did not change significantly when ABT-737 atomic coordinates were removed from the Mobcal input file ensuring that the  $0.9 \text{ nm}^2$  difference in computed CCS arises from conformational changes.

An apparent increase in the computed CCS of bound  $\Delta\text{Bcl-xL}$  (namely, 6% difference with free  $\Delta\text{Bcl-xL}$  computed CCS) was correlated with the conformational changes occurring upon inhibitor binding (0.9 Å global rmsd). Superimposition of the crystallographic structures of apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  (Figure 2d) showed a major shift of  $\Delta\text{Bcl-xL}$  helices H3 and H4 induced by ABT-737 binding: in H3, amino acids S106 to Q111 moved outward by 4.36 Å up to 5.95 Å; in H4, amino acids Q121 to F123 shifted outward from 5.00 Å down to 2.00 Å.

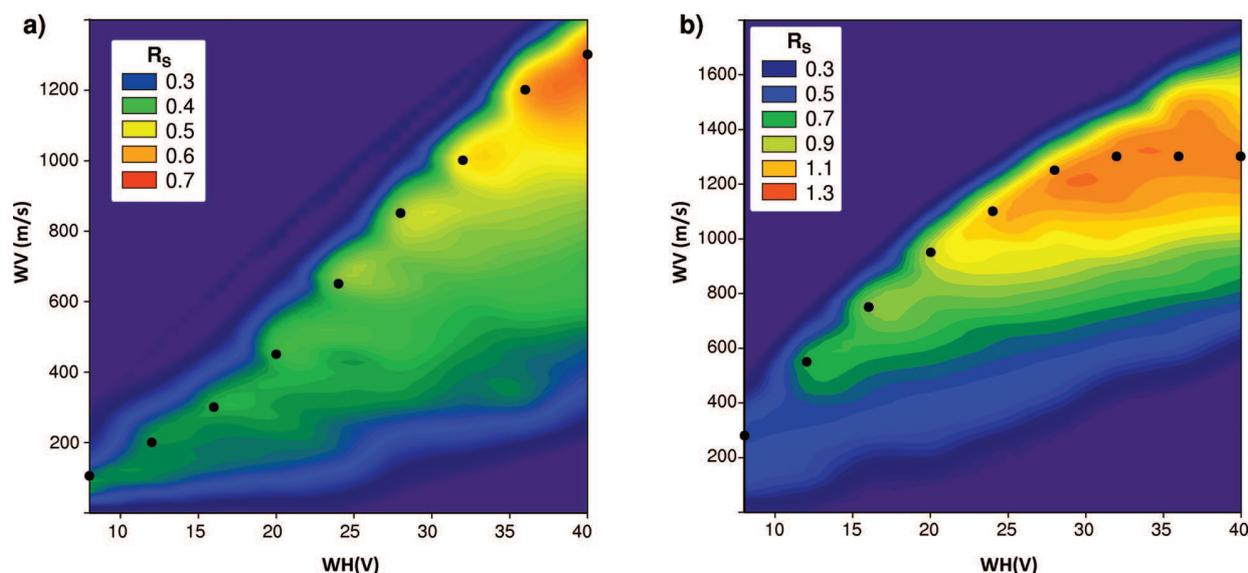
**Optimizing Ion Mobility Separation of Conformers with Subtle CCS Differences.** IM separation of conformers displaying only a subtle CCS difference requires fine-tuned instrument settings to achieve maximal IM resolution. We investigated the effect of gas flow rates and wave parameters applied to the IM region of the Synapt G2 HDMS on IM separation of apo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  and the  $\Delta\text{Bcl-xL}/\text{ABT-737}$  complex.

**Experimental Design.** Because IM separation of native biomolecular ions must be optimized without altering the ion gas phase structure, interface parameters were first adjusted to avoid ion activation (see the Experimental Section).<sup>31</sup> We next focused on parameters that primarily control ion  $t_D$  in the IM cell of the Synapt G2 HDMS: IM wave parameters (WH and WV) as well as helium and nitrogen flow rates ( $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$ ).

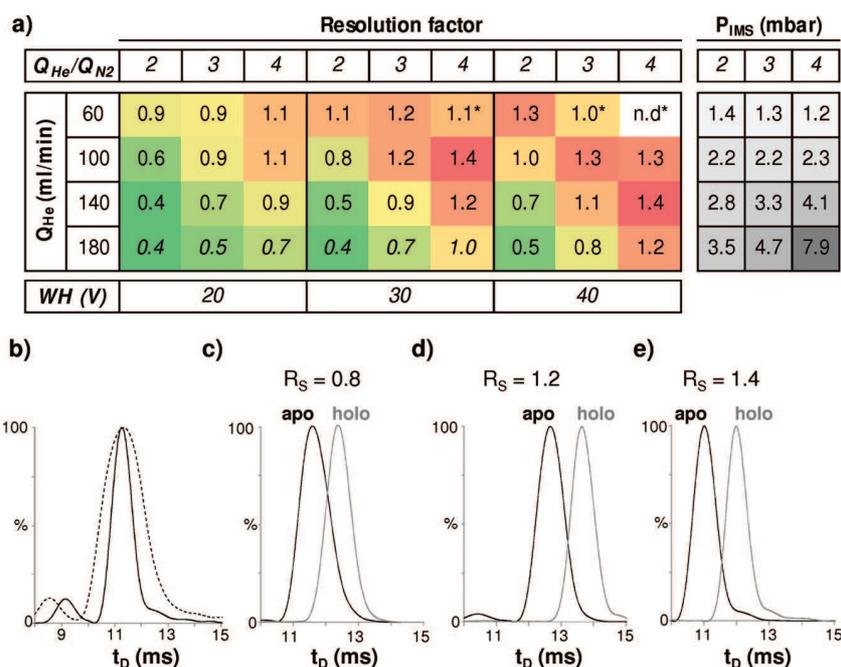
Analysis of  $\Delta\text{Bcl-xL}$  under non-denaturing conditions showed a narrow charge state distribution dominated by 8+ and 7+ ions (Figure 1c). As the lowest charge state is expected to better represent protein native conformation,<sup>12,21,33,34</sup> the 7+ charge state of apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  was selected to monitor the effects of the different parameters tested. Optimization was performed with  $\Delta\text{Bcl-xL}$  incubated with subsaturating concentration of ABT-737 in order to have both conformers simultaneously present in solution (i.e., free and bound  $\Delta\text{Bcl-xL}$ ). By analogy to chromatography, the resolution factor  $R_S$  was calculated for each set of parameters to quantify IM separation of free and bound  $\Delta\text{Bcl-xL}$ :

$$R_S = 2 \frac{t_{D_{\text{holo}}} - t_{D_{\text{apo}}}}{\Delta t_{D_{\text{holo}}} + \Delta t_{D_{\text{apo}}}} \quad (1)$$

In eq 1,  $t_D$  and  $\Delta t_D$  represent the maximum and the width-at-half-maximum, respectively, of apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  ATD assuming Gaussian distribution. Using the  $R_S$  factor (rather than the  $t_D/\Delta t_D$  ratio) allows values of 0.5, 1, and 2 to be directly correlated with 25%, 50%, and 100% valley, respectively, between apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  ATDs. Importantly,  $R_S$  follows the same qualitative trend as the  $t_D/\Delta t_D$  ratio used previously to quantify IM resolution.<sup>24,25</sup>



**Figure 3.** Optimization of WH and WV.  $\Delta$ Bcl-xL ( $5 \mu\text{M}$ ) was infused in the presence of a subsaturating concentration of ABT-737. The resolution factor ( $R_S$ ) calculated between apo and holo charge state is plotted against WH and WV.  $R_S$  is color-coded from the lowest (blue) to the highest (orange) values. Black dots represent WV values leading to maximal  $R_S$  for each WH tested.  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$  were, respectively, fixed at (a) 150 mL/min and 75 mL/min ( $P_{\text{IMS}} = 3$  mbar) and (b) 150 mL/min and 35 mL/min ( $P_{\text{IMS}} = 5$  mbar).  $R_S$  was arbitrarily set to 0 in dark blue areas, which correspond to (WH, WV) pairs preventing ions to roll over the waves (high WH and low WV) or lead to ions ATD exceeding the  $t_D$  accessible range (low WH and high WV).



**Figure 4.** Influence of helium and nitrogen flow rates on IM separation of apo and holo  $\Delta$ Bcl-xL 7+ charge state. (a) Resolution factors calculated for different ( $Q_{\text{He}}, Q_{\text{N}_2}$ ) pairs (left-hand panel) as well as resulting IM pressure readouts ( $P_{\text{IMS}}$ , right-hand panel). The table content is color-coded from the lowest (green) to the highest (red) values. Asterisk: instrument settings leading to ion activation. n.d.: not determined due to ion activation. (b) ATDs of apo  $\Delta$ Bcl-xL (7+) in the absence of ion activation (solid line, WH = 40 V; WV = 1435 V;  $Q_{\text{He}} = 100$  mL/min;  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 3$ ) and in the presence of ion activation (dashed line, WH = 40 V; WV = 1435 V;  $Q_{\text{He}} = 60$  mL/min;  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 3$ ). (c–e) IM separation for different ( $Q_{\text{He}}, Q_{\text{N}_2}$ ) pairs giving similar  $P_{\text{IMS}}$ .  $Q_{\text{He}}$  was kept at 100 mL/min; WH was set to 30 V. (c)  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 2$ ;  $P_{\text{IMS}} = 2.2$  mbar, WV = 1000 V;  $R_S = 0.8$ . (d)  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 3$ ;  $P_{\text{IMS}} = 2.2$  mbar; WV = 1200 V,  $R_S = 1.2$ . (e)  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2} = 4$ ;  $P_{\text{IMS}} = 2.3$  mbar; WV = 1200 V,  $R_S = 1.4$ .

**Tuning Wave Height and Wave Velocity to Enhance IM Separation.** To probe the effect of IM wave parameters,  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$  were kept constant while WH was ramped stepwise from 8 to 40 V. For each WH value, data were recorded using 9–11 different WV, providing  $t_D$  values of apo and holo  $\Delta$ Bcl-

xL 7+ charge state that span over the whole  $t_D$  accessible range (0–21 ms).  $R_S$  was calculated for each (WH, WV) pair, and results were graphically represented by contour plots depicted in Figure 3.

In the first series of experiments,  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$  were, respectively, set to 150 and 75 mL/min resulting in 3 mbar pressure readout in the IM cell ( $P_{\text{IMS}}$ ). Under these conditions, IM separation continually improved with increasing WH and WV, starting from  $R_S = 0.3$  (i.e., 15% valley) and reaching up to  $R_S = 0.7$  (i.e., 35% valley). For each WH tested, a maximum  $R_S$  was obtained using the highest WV value accessible as illustrated in Figure 3a (black dots). A qualitatively similar trend was observed when experiments were carried out with a different set of gas flow rates ( $Q_{\text{He}} = 150$  mL/min,  $Q_{\text{N}_2} = 35$  mL/min,  $P_{\text{IMS}} = 5$  mbar, Figure 3b). Interestingly, however, for WH higher than 30 V,  $R_S$  does no longer increase monotonically with the WV but reaches a maximum around 1300 m/s before slightly diminishing at higher WV values (Figure 3b, black dots). Comparable observations were reported in a previous publication showing that IM resolution ( $t_D/\Delta t_D$ ) increases consistently with WH whereas a maximum was attained at intermediate WV values.<sup>23,24</sup> The existence of the WV optimum and its position in the WV accessible range is likely related to intrinsic properties of analyte ions (mass, charge, mobility) as well as to instrument parameters that directly act on ions  $t_D$  ( $Q_{\text{He}}$ ,  $Q_{\text{N}_2}$ , and WH) as illustrated in Figure 3.

In terms of a general trend, these results indicate that, at least in the case of native proteins with mass and mobility properties close to  $\Delta\text{Bcl-xL}$ , enhanced IM separation may be achieved using the highest WH values and careful optimization of the WV.

**Effect of Helium and Nitrogen Flow Rates on IM Separation.** Beyond WV and WH optimization, former reports described the central effect of IM cell gas pressure on IM separation.<sup>24,35</sup> Importantly, because of gas diffusion between the helium gate and the IM cell, IM separation takes place in the He/N<sub>2</sub> mixture which exact composition depends on  $Q_{\text{He}}$ ,  $Q_{\text{N}_2}$ , and the  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  ratio. Gas diffusion has two direct consequences: (i) the IM Pirani gauge, which is calibrated for pure nitrogen only, provides distorted  $P_{\text{IMS}}$  values and (ii)  $P_{\text{IMS}}$  does not display expected monotonic evolution as a function of  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$ , enabling similar  $P_{\text{IMS}}$  readouts to be obtained for different ( $Q_{\text{He}}$ ,  $Q_{\text{N}_2}$ ) pairs (Figure S-1 in the Supporting Information). Therefore, the effect of gas on IM separation was assessed as a function of helium and nitrogen flow rates rather than IM pressure readout.

To cover a wide range of instrument settings, experiments were carried out at three different WH (20, 30, and 40 V) while WV was adjusted for each ( $Q_{\text{He}}$ ,  $Q_{\text{N}_2}$ ) pair to keep the apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state  $t_D$  between 7 and 14 ms (see the Experimental Section).  $Q_{\text{He}}$  was ramped stepwise from 60 mL/min to 180 mL/min, and  $Q_{\text{N}_2}$  was set for each  $Q_{\text{He}}$  to keep a constant  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  ratio. Three different  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  ratios (2, 3, 4) were tested and  $R_S$  was calculated from the apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state ATDs for each set of parameters. Results summarized in Figure 4 show better IM separation at higher  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  ratios independently of the WH. Moreover, for a fixed WH and a given  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  ratio, we observed greater  $R_S$  at lower gas flow rates ( $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$ ) coupled to higher WV (see also Figure S-2 in the Supporting Information). Regarding the effect of WH, higher  $R_S$  were reached at high WH as previously illustrated in Figure 3 contour plots. However, combining simultaneously low  $Q_{\text{He}}$  and  $Q_{\text{N}_2}$  with high WH led to a slight decrease in  $R_S$  which was likely due to ion activation as indicated by peak broadening observed on ion ATD (Figure 4b). Interestingly, substantially different  $R_S$  can be reached

using different ( $Q_{\text{He}}$ ,  $Q_{\text{N}_2}$ ) pairs that yield similar  $P_{\text{IMS}}$  readouts (Figure 4c–e). This later observation supports that gas flow rates rather than pressure readouts must be considered when optimizing IM separation of the Synapt G2 HDMS.

Taken altogether, optimization of T-wave IM separation implies considering all parameters (WH, WV,  $Q_{\text{He}}$ ,  $Q_{\text{N}_2}$ ) that contribute to increasing the resolution of close conformers and suggests that these parameters must be optimized together rather than individually. Enhancing T-wave IM separation consists indeed in increasing the difference in the number of roll-overs experienced by each ion conformer while keeping narrow ion bunches to avoid ATD peak broadening. The number of ion roll-overs depends on (i) the WH (the higher the WH, the less roll-overs), (ii) the WV controlling the number of waves per IM cycle (the higher the WV, the more waves per IM cycle and hence the more roll-overs), and (iii) the gas flow rates affecting ion-neutral collision frequency, especially  $Q_{\text{N}_2}$  (the higher  $Q_{\text{N}_2}$ , the higher the collision frequency and hence the more roll-overs). Consequently, for a given WH value, increasing gas flow rates gives rise to longer  $t_D$ , which in turn requires the WV to be decreased to remain in the optimal second third of the accessible  $t_D$  range (compare, for example, part e to part c of Figure 4). While similar  $t_D$  was also obtained using lower gas flow rates and higher WV, the present data interestingly show that both options are not equivalent in regards of IM separation of apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  (compare, for example, part c to part e of Figure 4): much better  $R_S$  were obtained using high WV/low gas flow rates rather than low WV/high gas flow rates (see also Figure S-2 in the Supporting Information). Knowing about these trends may help prioritizing between apparently equivalent instrument settings and guide/simplify the process of instrument tuning.

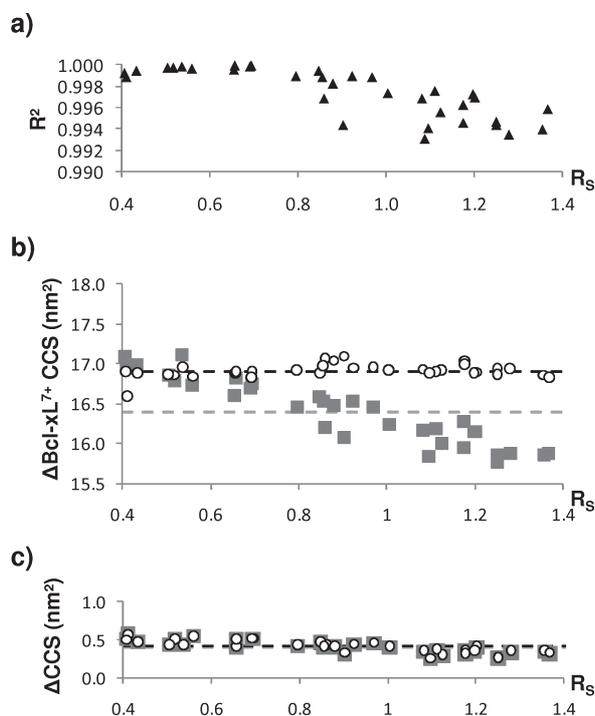
**CCS Determination Using IM-MS: a Modified Calibration Procedure for Robust CCS Estimation.** Because traveling-wave IM-MS uses a sequence of DC pulses to separate ions according to their mobility in the gas-phase,  $t_D$  cannot be directly converted into CCS in contrast to standard drift tubes. Analyte ion CCS may however be assessed using ions of known CCS to determine the calibration factors based on eq 2:

$$\Omega = \frac{Az(t_D')^X}{\sqrt{\mu}} \quad (2)$$

where  $\Omega$  is the CCS,  $A$  and  $X$  are calibration factors determined from calibrant ion  $t_D$  and CCS,  $z$  is the ion charge,  $t_D'$  is the corrected ion drift time, and  $\mu$  is the reduced mass of the ion-gas system.<sup>30,32</sup>

**Effect of Enhanced IM Separation on CCS Calculation.** Recently, Ruotolo et al. showed that accuracy and robustness of CCS determination for native biomolecules can be improved using a small set of native calibrant proteins which closely brackets analyte ions in terms of mass and mobility.<sup>32</sup> Further investigations however revealed that calibration accuracy quantified by the correlation factor of the calibration curve ( $R^2$ ) decreases at high WV and low  $P_{\text{IMS}}$  values.<sup>24</sup> To which extent  $\Delta\text{Bcl-xL}$  CCS measurement was impacted by instrument settings enhancing IM separation of apo and holo forms was therefore investigated. CCS of  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state was monitored throughout the whole optimization process summarized in Figure 4a (except for conditions leading to ion activation). Among the available list of calibrant ions, native cytochrome C and monomeric and dimeric  $\beta$ -lactoglobulin

which encompass  $\Delta\text{Bcl-xL}$  mass and mobility properties at best were used.<sup>32</sup> Following this calibration procedure, we observed steady decrease of the  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state CCS as  $R_S$  increases (Figure 5b). We suspected biased calibrations to be



**Figure 5.** Influence of instrument parameters enhancing IM resolution on the determination of  $\Delta\text{Bcl-xL}$  CCS. (a) Correlation coefficients ( $R^2$ ) of calibration curves plotted as a function of  $R_S$ . (b) CCS of apo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state and (c) CCS difference ( $\Delta\text{CCS}$ ) between apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state determined using either the conventional calibration procedure (gray squares, gray dashed line) or the modified procedure involving an external standard (white circles, black dashed line). Dashed lines correspond to mean CCS averaged over the entire range of  $R_S$ .

responsible for this trend in absolute CCS values rather than protein gas-phase rearrangement. Calibration curve correlation factors indeed progressively decreased when moving to conditions that promote IM separation (Figure 5a), which is in agreement with a previous report.<sup>24</sup> Moreover, if structure collapsing would occur in the gas phase, convergence of apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  CCS would be expected (i.e.,  $\Delta\text{CCS}$  approaching 0 at high  $R_S$ ). In contrast, Figure 5c clearly shows mostly a constant CCS difference between apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  over the whole range of  $R_S$  (average  $\Delta\text{CCS}$   $0.40 \pm 0.09 \text{ nm}^2$ ).

**Modified Calibration Procedure for Robust CCS Estimation.** Using calibrant ions of mobility properties closer from the analyte ions may improve the robustness of the standard calibration procedure. However, because of the limited list of published calibrants, a modified calibration procedure was experimented to circumvent possible biases introduced by calibrant ions that cover a broad range of mass, charge, and mobility properties. Basically, analyte CCS was determined relatively to a calibrant protein ion, used as an external standard, with the same charge and similar mass. According to this system, eq 3 can be derived from eq 2:

$$\frac{\Omega_i}{\Omega_{\text{std}}} = \frac{Az_i(t_{D_i}')^X}{\sqrt{\mu_i}} \frac{\sqrt{\mu_{\text{std}}}}{Az_{\text{std}}(t_{D_{\text{std}}}')^X} \quad (3)$$

where std and  $i$  subscripts refer to the standard and analyte ions, respectively. In the case of high mass species like proteins, the value of reduced mass is mainly dictated by the mass of the gas, thus  $\mu_i \approx \mu_{\text{std}}$ . Moreover, keeping in mind that  $z_i = z_{\text{std}}$ , analyte CCS can be approximated by eq 4:

$$\Omega_i = \Omega_{\text{std}} \left( \frac{t_{D_i}'}{t_{D_{\text{std}}}' } \right)^X \quad (4)$$

To note, calibration factor  $A$  is no longer taken into account using eq 4. In addition, judicious selection of the external standard so that  $t_{D_i}'/t_{D_{\text{std}}}'$  ratio is close to 1 makes  $\Omega_i$  less sensitive to possible errors in calibration factor  $X$ . In the present study, calibration factor  $X$  was determined using the list of calibrant proteins mentioned above (cytochrome C,  $\beta$ -lactoglobulin) and the 7+ charge state of monomeric  $\beta$ -lactoglobulin was selected as the external standard. Interestingly, instrument parameters providing better  $R_S$  values gave rise to lower calibration factor  $X$  and hence better CCS resolution as reported by Zhong et al. (Figure S-2 in the Supporting Information).<sup>24</sup> Using the modified calibration procedure, CCS values of  $\Delta\text{Bcl-xL}$  7+ charge state remained constant regardless of  $R_S$  (Figure 5b) resulting in an average CCS value of  $16.9 \pm 0.1 \text{ nm}^2$  for  $\Delta\text{Bcl-xL}$  and  $17.3 \pm 0.1 \text{ nm}^2$  for  $\Delta\text{Bcl-xL}/\text{ABT-737}$  complex. These results are in agreement with the corresponding computed CCS ( $15.4 \pm 0.8 \text{ nm}^2$  and  $16.3 \pm 0.8 \text{ nm}^2$ , respectively), although incomplete structure resolution in the X-ray coordinate file inevitably leads to underestimation of the latter CCS values. The CCS shift measured between apo and holo  $\Delta\text{Bcl-xL}$  remained almost constant throughout the accessible  $R_S$  range (Figure 5c), providing an average  $\Delta\text{CCS}$  of  $0.41 \pm 0.08 \text{ nm}^2$  (2% difference between apo and holo measured CCS), which is of the same order of magnitude as the  $0.9 \text{ nm}^2$  difference in computed CCS.

While the use of well-defined calibrant for each analyte ion of interest may appear restrictive at first sight, the present method represents an interesting extension of the standard procedure, avoiding compromising between optimal IM separation and robust CCS determination. Both methods would benefit from expanded calibrant lists, improving the robustness of the standard method and extending the applicability of the present procedure to larger data sets of protein–ligand systems.

## CONCLUSIONS

Studying fine structural changes in native proteins using traveling-wave IM-MS requires methodical instrument optimization and accurate data analysis. Computing theoretical CCS from 3D structures to interpret or anticipate IM results has become common practice. However, the choice of coordinate files and the potential pitfalls are points only seldom detailed in publications. We used the Bcl-xL model to illustrate the importance of (i) comparing coordinate files obtained with the same technique, (ii) comparing files obtained with very similar, if not identical, protein constructs, and (iii) taking a close look at the extent of missing atoms through careful examination of coordinate files, to reliably conclude at CCS differences between two conformational states of a protein.

The second part of this study was dedicated to the tuning of the Synapt G2 HDMS for optimal IM separation of apo versus holo  $\Delta$ Bcl-xL conformers. We explored the effect of wave parameters together with gas flow rates in the IM cell. Our results showed better IM separation using high WH, low He and N<sub>2</sub> flow rates while keeping  $Q_{\text{He}}/Q_{\text{N}_2}$  ratio higher than 3, and WV adjusted to keep ion  $t_D$  in the middle of the accessible range. Of note, while tuning these instrument parameters, careful attention must be paid to potential ion activation, as evidenced by ion ATD broadening. Ion activation typically occurred with increasing WH and WV as well as with decreasing helium and nitrogen flow rates. Applying this optimization workflow to  $\Delta$ Bcl-xL provided up to a 70% valley between ATDs of apo and ABT-737-bound  $\Delta$ Bcl-xL in which CCS differed by only 0.4 nm<sup>2</sup> (i.e., 2%). Although present optimized settings are quantitatively applicable for biomolecules with mass and mobility properties close to  $\Delta$ Bcl-xL only, this work provides qualitative trends useful to streamline the process of instrument optimization for other IM-MS studies involving biological systems.

Observing  $t_D$  differences when studying protein conformational heterogeneity is certainly the primary information which will determine whether further characterization of analyte ion CCS is truly relevant. To complete this study, we thus evaluated a modified calibration procedure involving calibrant ion with mass, charge, and mobility properties similar to analyte ions. The use of such external standard turned out to be more robust than the classical calibration method, eliminating systematic bias observed in absolute CCS values depending on instrument settings.

Altogether, this methodological groundwork which allowed improving close conformer IM separation to detect subtle conformation differences is of utmost interest in structural biology to track batch-to-batch variations of therapeutic proteins,<sup>15,20</sup> or to monitor stimulus-induced conformation changes occurring for instance in prion-like proteins.<sup>16,22</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +33 (0)3 68 85 26 79. Fax: +33 (0)3 68 85 27 81. E-mail: [sarah.cianferani@unistra.fr](mailto:sarah.cianferani@unistra.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

C.A. and S.P.-B. contributed equally to this work. This work was funded by the CNRS, the University of Strasbourg Uds, and the GIS IBIISA. S.P.-B. was supported by a studentship from the CNRS and NovAliX. We thank Valéry Laurent for  $\Delta$ Bcl-xL production and purification.

## ■ REFERENCES

- (1) Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6294–6296.
- (2) Katta, V.; Chait, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8534–8535.
- (3) Tahallah, N.; Pinkse, M.; Maier, C. S.; Heck, A. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 596–601.
- (4) Smith, R. D.; Light-Wahl, K. J. *Biological Mass Spectrometry* **1993**, *22*, 493–501.
- (5) Schmidt, A.; Bahr, U.; Karas, M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6040–6046.
- (6) Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 419–429.
- (7) Sanglier, S.; Ramstrom, H.; Haiech, J.; Leize, E.; Dorsselaer, A. V. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *219*, 681–696.
- (8) Vivat Hannah, V.; Atmanene, C.; Zeyer, D.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianferani, S. *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 35–50.
- (9) Daniel, J. M.; Friess, S. D.; Rajagopalan, S.; Wendt, S.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *216*, 1–27.
- (10) Taverner, T.; Hernandez, H.; Sharon, M.; Ruotolo, B. T.; Matak-Vinkovic, D.; Devos, D.; Russell, R. B.; Robinson, C. V. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 617–627.
- (11) Atmanene, C.; Chaix, D.; Bessin, Y.; Declerck, N.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianferani, S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3597–3605.
- (12) Ruotolo, B. T.; Giles, K.; Campuzano, I.; Sandercock, A. M.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Science* **2005**, *310*, 1658–1661.
- (13) Ruotolo, B. T.; Hyung, S. J.; Robinson, P. M.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8001–8004.
- (14) Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 402–408.
- (15) Atmanene, C.; Wagner-Rousset, E.; Malissard, M.; Chol, B.; Robert, A.; Corvaia, N.; Dorsselaer, A. V.; Beck, A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6364–6373.
- (16) Hilton, G. R.; Thalassinou, K.; Grabenauer, M.; Sanghera, N.; Slade, S. E.; Wyttenbach, T.; Robinson, P. J.; Pinheiro, T. J.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 845–854.
- (17) Pukala, T. L.; Ruotolo, B. T.; Zhou, M.; Politis, A.; Stefanescu, R.; Leary, J. A.; Robinson, C. V. *Structure* **2009**, *17*, 1235–1243.
- (18) Williams, J. P.; Phillips, H. I.; Campuzano, I.; Sadler, P. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1097–1106.
- (19) Politis, A.; Park, A. Y.; Hyung, S. J.; Barsky, D.; Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V. *PLoS One* **2010**, *5*, e12080.
- (20) Bagal, D.; Valliere-Douglass, J. F.; Bolland, A.; Schnier, P. D. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6751–6755.
- (21) Scarff, C. A.; Patel, V. J.; Thalassinou, K.; Scrivens, J. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 625–631.
- (22) Smith, D. P.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 2180–2190.
- (23) Giles, K.; Williams, J. P.; Campuzano, I. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1559–1566.
- (24) Zhong, Y.; Hyung, S. J.; Ruotolo, B. T. *Analyst* **2011**, *136*, 3534–3541.
- (25) Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9689–9699.
- (26) Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Zobel, K.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1711–1713.
- (27) Muchmore, S. W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Yoon, H. S.; Nettesheim, D.; Chang, B. S.; Thompson, C. B.; Wong, S. L.; Ng, S. L.; Fesik, S. W. *Nature* **1996**, *381*, 335–341.
- (28) Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16082–16086.
- (29) Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261*, 86–91.
- (30) Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L. P.; Sandercock, A. M.; Hyung, S.; Robinson, C. V. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1139–1152.
- (31) Smith, D. P.; Knapman, T. W.; Campuzano, I.; Malham, R. W.; Berryman, J. T.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, *15*, 113–130.
- (32) Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9557–9565.
- (33) Scarff, C. A.; Thalassinou, K.; Hilton, G. R.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 3297–3304.
- (34) Jarrold, M. F. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 360–367.
- (35) Wallace, A. *Am. Lab.* **2010**, *42*, 13–17.

## Chapitre 4 : Caractérisation fine par MS et IM-MS supramoléculaires d'un système protéine/ligands : exemple du système PDF1B/Ligands

---

Après avoir mis en évidence les capacités du couplage IM-MS pour l'étude de changements conformationnels fins sur un système bien caractérisé, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un système peu caractérisé : le système PDF1B/ligands.

### 1 Présentation du système PDF1B/ligands

---

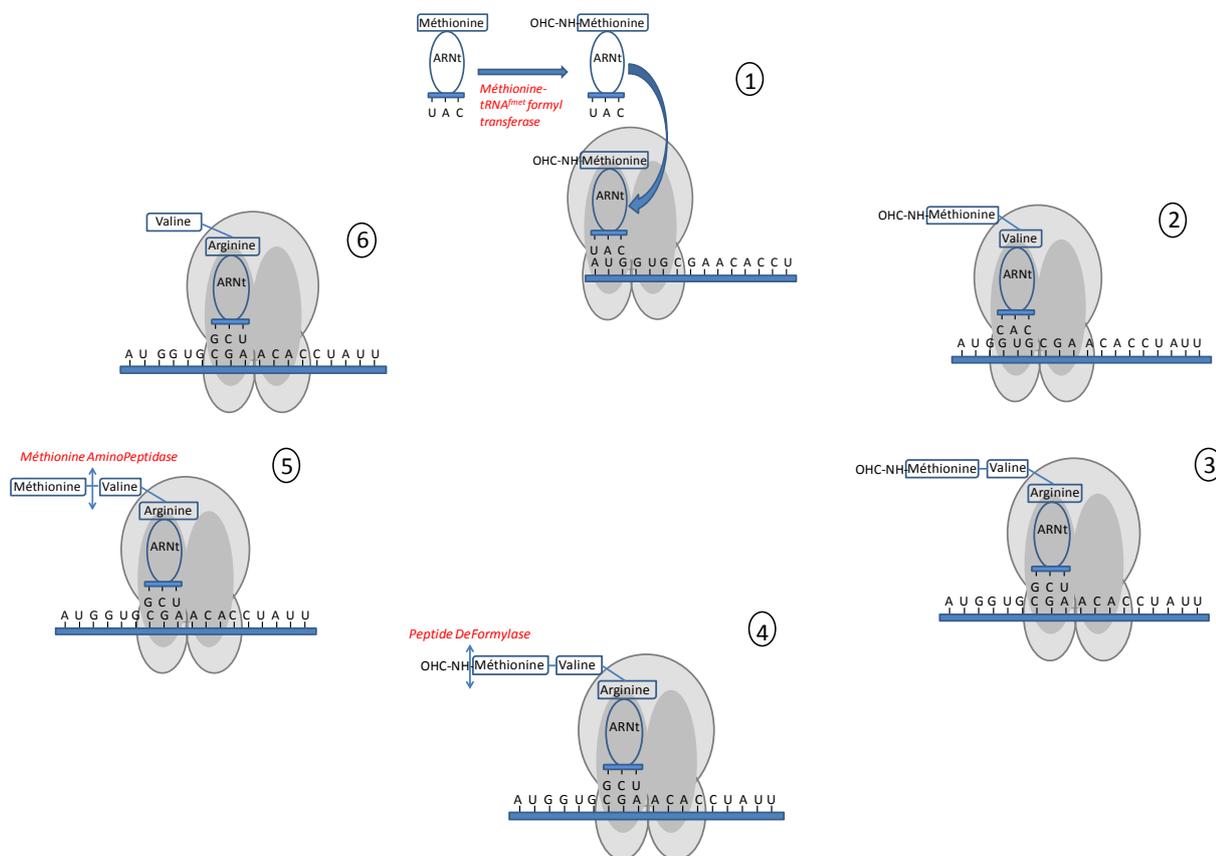
Au cours de cette dernière décennie, l'augmentation de la multirésistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques actuels est particulièrement préoccupante. Traditionnellement, la recherche d'antibiotiques consiste à créer des chimiothèques ou à modifier des antibiotiques existants. Toutefois, cette méthode ne permet plus de répondre efficacement au développement de résistances bactériennes<sup>324</sup>. C'est pourquoi, depuis quelques années, de nouvelles méthodes mettant à profit les apports de la génomique ont été développées. Ces méthodes consistent à rechercher des inhibiteurs d'une cible protéique spécifique en combinant la génomique et les techniques de conception de médicaments telles que la biologie structurale ou la chimie. C'est dans ce contexte que le système PDF1B/ligands a été étudié<sup>325</sup>.

#### 1.1 Intérêt de la recherche de ligands pour la protéine PDF1B

---

L'un des mécanismes protéolytiques majeurs responsables de la diversité des extrémités N-terminale des protéines est l'excision de la méthionine N-terminale, acide aminé indispensable à l'initiation de la synthèse de toutes nouvelles chaînes polypeptidiques. Ce processus appelé NME (*N-terminale Methionine Excision*) est observé chez 50 à 70% des protéines, et est commun aux Procaryotes comme aux Eucaryotes. Le processus NME est composé de deux étapes : d'une part la déformylation de la méthionine N-terminale par la protéine PDF (*Peptide DeFormylase*) ; d'autre part, l'excision de la méthionine N-terminale par la protéine MAP (*Methionine AminoPeptidase*) (Figure 39). L'étape limitante dans ce processus étant l'action de la protéine PDF puisque son action est indispensable pour que la protéine MAP puisse réaliser l'excision de la méthionine N-terminale<sup>326</sup>. Lors de l'apparition de multi-résistances bactériennes, le mécanisme NME est apparu comme une nouvelle cible thérapeutique, car il présente un rôle vital dans la survie de certains micro-organismes<sup>327</sup>. La protéine PDF est présente chez tous les organismes vivants, unicellulaires comme pluricellulaires. Deux formes<sup>328</sup> de PDF ont pu être identifiées grâce à des différences de séquences et

de structures : la forme PDF1 comprenant deux classes (PDF1A et PDF1B) et la forme PDF2. Les PDF1B et PDF2 sont spécifiques des bactéries alors que la forme PDF1A est spécifique des Eucaryotes<sup>328</sup>.



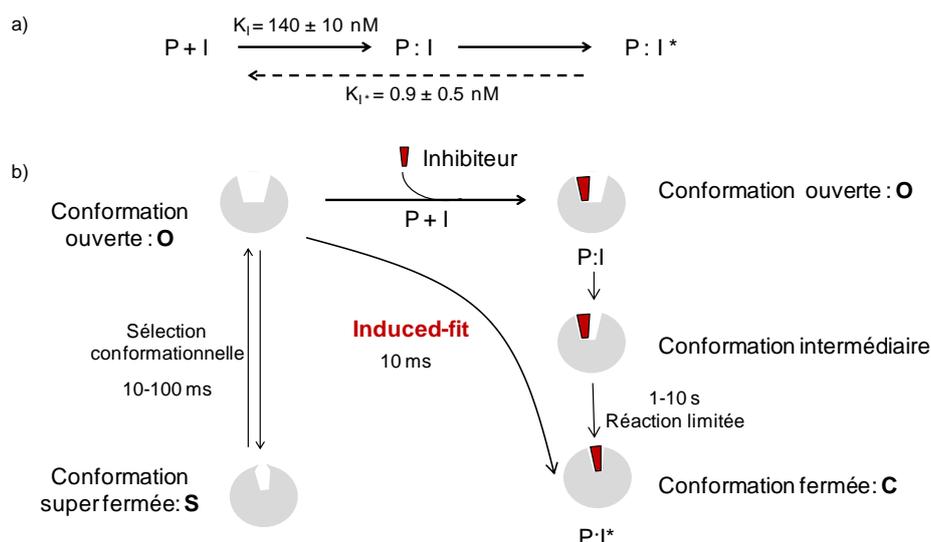
**Figure 39: Représentation schématique des réactions impliquant la protéine PDF1B lors du processus de traduction protéique.** 1) initiation de la traduction par fixation d'un ARNt méthionine au niveau de la sous-unité P du ribosome, 2 et 3) Élongation de la chaîne protéique naissante, 4) Déformylation de la méthionine initiatrice par le peptide déformylase (PDF), 5) Clivage de la méthionine initiatrice déformylée par la méthionine aminopeptidase (MAP), 6) poursuite de la synthèse protéique après clivage de la méthionine initiatrice.

La protéine PDF n'ayant jamais été utilisée comme cible métabolique dans les thérapies humaines, elle ne présente aucune pression de sélection, ni aucune forme de résistance. Elle a donc été proposée comme une nouvelle cible pour le développement d'antibiotiques. Cette protéine étant présente chez tous les organismes vivants, il est important de bloquer spécifiquement et efficacement les formes bactériennes de PDF (PDF1B et PDF2) sans pour autant altérer le fonctionnement des PDF Eucaryotes (PDF1A). Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement au criblage de ligands spécifiques de la protéine PDF1B retrouvée chez les bactéries.

## 1.2 Les ligands et leurs caractéristiques

Les premières études de recherche d'inhibiteurs de PDF (PDFI) ont permis d'établir que la structure idéale d'un PDFI serait un di- ou un tripeptide dont le groupement formyl de la méthionine N-terminale serait remplacé par un groupement chélatant les métaux, tels qu'un hydroxamate<sup>329</sup>. Un inhibiteur naturel de PDF qui correspond à ces critères est l'Actinonine. Elle fonctionne selon un

mode d'inhibition appelé « *Slow Tight Binding* » qui présente un mécanisme multi-étapes. Dans un premier temps, le ligand inhibiteur (I) se fixe sur la protéine (P) pour conduire à la formation rapide d'un complexe (P : I) non-covalent. Dans un second temps, un changement conformationnel conduit à la formation d'un complexe (P : I\*) plus stable dont la dissociation est extrêmement lente (Figure 40). Ce type d'inhibiteur permet donc une inhibition spécifique de PDF1B avec un effet à long terme. Le passage de la forme ouverte de la protéine à la forme fermée s'effectuerait en plusieurs étapes selon un mécanisme appelé « *Induced Fit* »<sup>330</sup>.

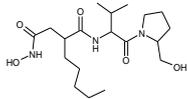
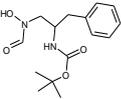
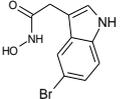
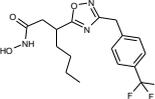
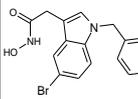
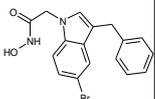


**Figure 40: a) Inhibition en deux étapes de la protéine (P) par l'inhibiteur (I). b) Représentation schématique du *slow tight binding*.** La protéine PDF (P) dans une conformation ouverte (O) se lie à l'inhibiteur (I). Cette fixation (P : I) induit un changement conformationnel aboutissant à une forme intermédiaire de la protéine. Après un certain temps, la protéine adopte une conformation fermée (C) correspondant à un complexe très stable (P : I\*). Le passage de la forme ouverte à la forme fermée est caractéristique du mécanisme d'*induced-fit*. Une forme super fermée (S) existe et est en équilibre avec la forme ouverte.

Toutefois, l'Actinonine, qui aurait été un nouvel antibiotique efficace contre les pathogènes bactériens, a récemment montré des effets néfastes sur la survie des cellules humaines<sup>331</sup>. De nouveaux inhibiteurs spécifiques des PDF bactériennes ont donc dû être développés. Plusieurs critères majeurs ont été pris en compte lors du développement de ces nouveaux inhibiteurs tels que la présence d'un groupement liant un métal et d'autre part un groupe ayant une forte affinité pour la poche hydrophobe de la protéine PDF<sup>329, 332</sup>.

Comme les poches hydrophobes des protéines PDF bactériennes et humaines sont différentes, plusieurs classes d'inhibiteurs ont été développées par l'équipe de Thierry Meinel tels que des inhibiteurs non peptidiques avec un groupement 5-bromoindole ou un groupement indole inversé pouvant contenir ou non un groupement oxadiazole. Afin de trouver l'inhibiteur présentant les meilleures propriétés thérapeutiques, plusieurs ligands de leur chimiothèque (Tableau 7) seront étudiés par des techniques biochimiques telles que l'enzymologie, mais aussi par spectrométrie de masse supramoléculaire.

Tableau 7: Présentation des différents ligands de la protéine PDF1B

Ligands	Actinonine	RAS358	AB47	AT008	SM195	SM289
Noms	N4-hydroxy-n1-{1-[2-(hydroxyméthyl)pyrrolidin-1-yl]-3-méthyl-1-oxobutan-2-yl}-2-pentylsuccinamide	(1-hydroxy carbamoylméthyl-2-phenylethyl) carbamic acid tert-Butyl Ester	2-(5-Bromo-1H-indol-3-yl)-N-hydroxy acetamide	N-hydroxy-3-{3-[4-(trifluorométhyl) benzyl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl}heptanamide	2-(1-benzyl-5-bromoindol-3-yl)-N-hydroxyacetamide	2-(3-benzyl-5-bromoindol-1-yl)-N-hydroxyacetamide
MW (Da)	385	293	268	371	358	358
Structures						

### 1.3 Objectifs de cette étude

Dans ce contexte, nous avons entrepris une collaboration avec l'équipe des Dr. Thierry Meinel et Carmela Giglione (CNRS, ISV, Gif-sur-Yvette France) dans le but de caractériser finement les différentes interactions PDF1B/ligands par MS et IM-MS supramoléculaires.

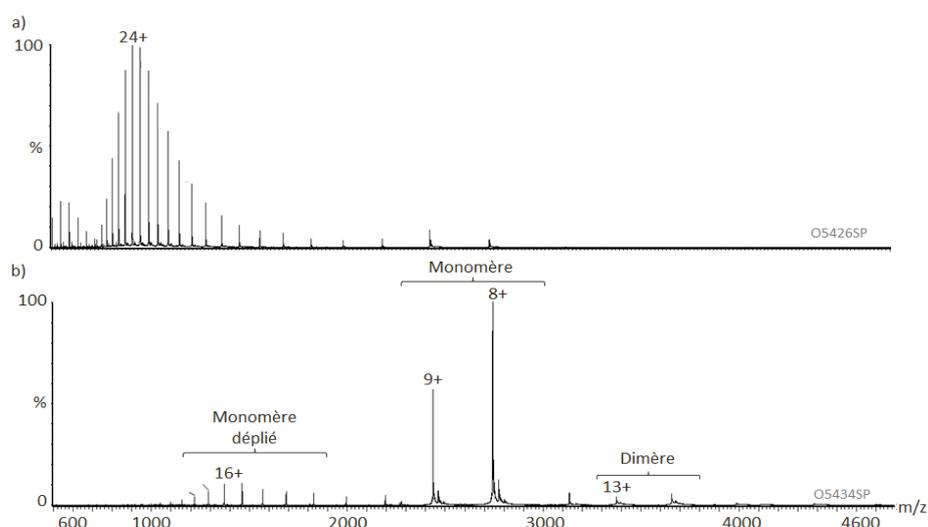
Les objectifs de notre étude sont les suivants :

- Caractériser les interactions PDF1B/ligands par MS supramoléculaire
- Déterminer s'il existe plusieurs sites de fixation du ligand Ras358 sur la protéine PDF1B
- Rechercher des preuves de l'existence du mécanisme de *Slow Tight Binding* par MS et IM-MS supramoléculaires

## 2 Caractérisation des interactions PDF1B/Ligands par MS supramoléculaire

### 2.1 Caractérisation de la protéine PDF1B par MS supramoléculaire

La protéine PDF1B d'*Arabidopsis thaliana*, modèle de notre étude, est une métalloprotéase appartenant à la famille des Thermolysines-Metzincine. L'analyse de cette protéine en conditions dénaturantes nous a permis de vérifier la masse de la protéine PDF1B ( $M_{\text{mesurée}} = 21\ 877.1 \pm 0.1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 21\ 876.1$  Da) (Figure 41, a).



**Figure 41 : État d'oligomérisation de la protéine PDF1B.** a) analyse en conditions dénaturantes de la protéine PDF1B diluée à 2 µM dans une solution eau/acétonitrile/acide formique 50/50/1 (Vc = 40V, Pi = 2 mbar). b) analyse en conditions natives de la protéine PDF1B diluée à 5 µM dans un tampon AcNH<sub>4</sub> 100 mM pH 7.5 (Vc = 40V, Pi = 6 mbar).

Cette protéine contient de façon constitutive un atome de Fer ferreux :  $\text{Fe}^{2+}$  nécessaire à son activité. Étant donné que l'oxydation de cet atome de Fer rend la protéine inactive, celui-ci a été remplacé par un atome de nickel qui permet de préserver l'activité de la protéine tout en diminuant les risques d'inactivation liés au phénomène d'oxydation<sup>333,334</sup>. De plus, cette protéine est peu stable dans le temps. Par conséquent, nous avons travaillé sur des lots de protéines conservés au maximum 48 heures à 4°C après dessalage.

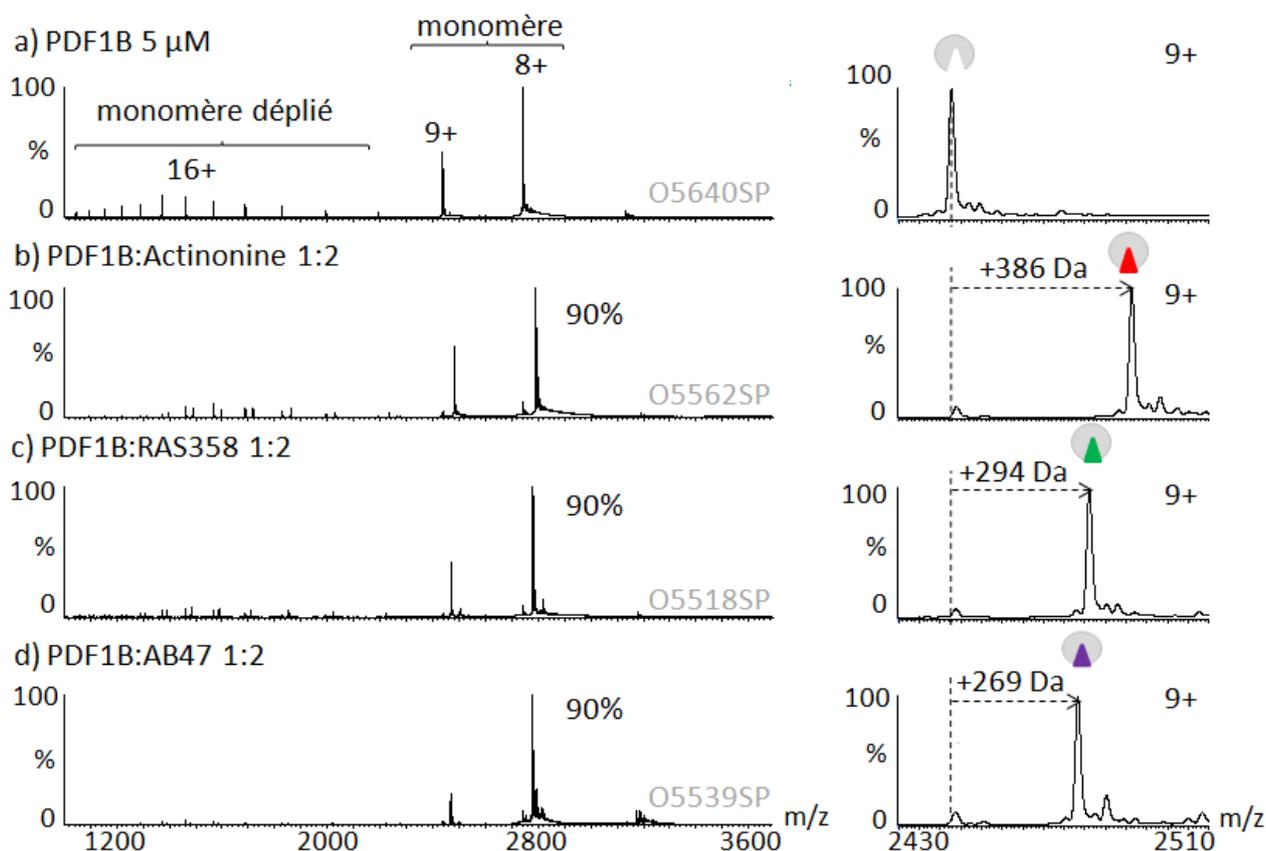
Une analyse de la protéine PDF1B en conditions natives, nous a permis de mettre en évidence que la protéine PDF1B est majoritairement sous forme monomérique et qu'elle fixe un atome de nickel (MW= 58.6 Da) par monomère de protéine ( $M_{\text{mesurée}} = 21\,933 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 21\,932.7$  Da) (Figure 41, b). La protéine PDF1B est aussi présente sous forme partiellement dénaturée dans la gamme de m/z (500-2 000) et sous forme dimérique ( $M_{\text{mesurée}} = 43\,864 \pm 2$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 43\,865$  Da). La fixation d'une molécule de nickel (58.6 Da) a eu pour conséquence la perte de 2 atomes d'hydrogène (2 Da) conduisant à une différence de masse entre la forme dénaturée et la forme native de la protéine monomérique de 56.6 Da.

## 2.2 Détermination des stœchiométries d'interaction

---

Afin de déterminer les affinités des ligands pour la protéine PDF1B, les stœchiométries d'interaction entre les 6 ligands à tester et la protéine PDF1B ont été déterminées. Pour cela, la protéine PDF1B dessalée a été incubée à 5  $\mu\text{M}$ , pendant 10 minutes à température ambiante en présence d'un excès de ligand (10  $\mu\text{M}$ ) afin de favoriser la formation d'éventuels complexes. Les paramètres instrumentaux du Synapt HDMS G2 (Vc, Pi, Bias, Trap et Transfer CE) ont été optimisés afin de permettre une bonne désolvatation et transmission des complexes en phase gazeuse, tout en préservant les interactions non-covalentes existantes. Au cours de cette étude, l'Actinonine qui présente actuellement des propriétés antibactériennes avérées a été considérée comme ligand de référence.

Les différents ligands interagissent avec la protéine PDF1B selon une stœchiométrie 1 : 1 comme le montre les spectres MS (Figure 42) et les mesures de masses présentées dans le Tableau 8.



**Figure 42: Stœchiométrie d'interaction entre la protéine PDF1B (a) et les ligands Actinonine (b), RAS358 (c) et AB47 (d).** La protéine PDF1B dessalée a été incubée à 5 µM avec les différents ligands selon un ratio 1 : 2 dans un tampon AcNH<sub>4</sub> 100 mM pH7.5 V<sub>c</sub> = 40V, P<sub>i</sub> = 6 mbar.

Afin d'obtenir des informations fiables concernant les pourcentages d'affinités des différents ligands pour la protéine PDF1B, les expériences d'interaction ont été réalisées au moins trois fois sur des échantillons préparés de manière indépendante.

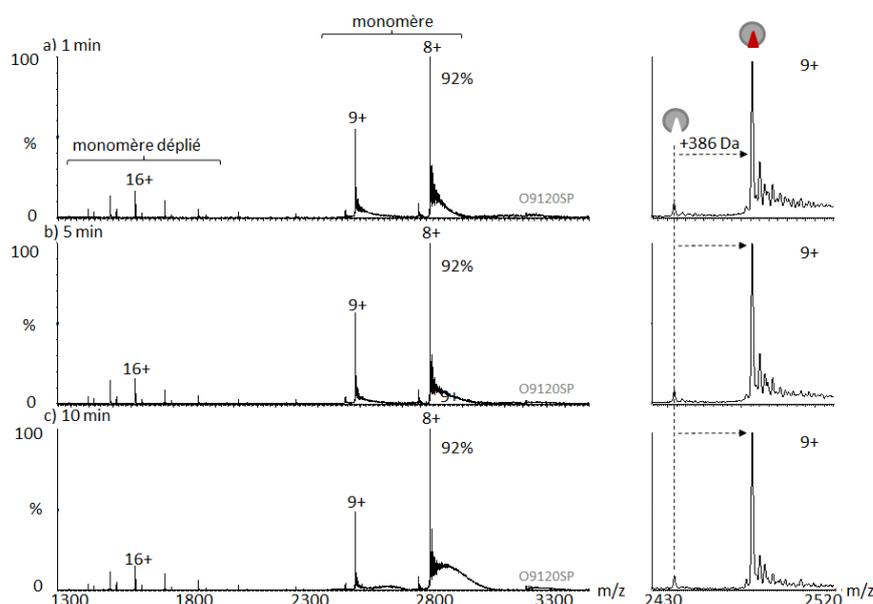
**Tableau 8 : Stœchiométries d'interaction entre la protéine PDF1B et les 6 ligands.** La protéine PDF1B dessalée (5 µM) est incubée avec 10 µM d'un excès de ligand pendant 10 minutes puis analysée par MS supramoléculaire (V<sub>c</sub>=20V, P<sub>i</sub> = 6 mbar). L'intensité des pics de complexes protéine/ligand est ensuite rapportée à l'intensité des pics de protéines seules de manière à déterminer les pourcentages de complexes formés.

	Actinonine	RAS358	AB47	SM195	AT008	SM289
M <sub>mesurée</sub> (Da)	22320 ± 1	22228 ± 1	22202 ± 1	22293 ± 1	22305 ± 1	22293 ± 1
% complexe	91 ± 1	89 ± 2	89 ± 1	86 ± 1	48 ± 6	52 ± 4

Cette première série d'analyses nous permet de conclure que les différentes classes de ligand interagissent avec la protéine PDF1B dans des proportions différentes, ce qui suggère des affinités différentes en fonction des ligands. Deux classes de ligands se distinguent grâce à ces expériences : les ligands à forte interaction pour lesquels le taux de fixation est supérieur à 85% (Actinonine, RAS358, AB47 et SM195) et ceux à plus faible interaction avec des taux de fixation compris entre 45 et 55 % (AT008 et SM289).

Afin d'étudier la cinétique de fixation des ligands sur la protéine PDF1B, nous avons incubé la protéine avec chaque ligand au moment de l'injection dans le spectromètre de masse. Ainsi, nous

avons pu montrer que le temps de fixation de chacun des ligands sur la protéine PDF1B était d'une minute, ce qui est en accord avec la première étape du mécanisme de *Slow Thight Binding* précédemment décrit (Figure 43).



**Figure 43: Effet du temps d'incubation de la protéine PDF1B avec l'Actinonine sur le pourcentage de complexe PDF1B : Actinonine.** La protéine PDF1B dessalée a été incubée à 5  $\mu\text{M}$  avec l'Actinonine selon un ratio 1 : 2. Le pourcentage de complexe formé est suivi au cours du temps.

### 2.3 Stabilité des interactions protéine/ligands en phase gazeuse (Vc50)

Dans le cas de caractérisation de complexes protéine/ligands, l'étude de la dissociation progressive des complexes en fonction de la tension d'accélération ( $V_c$ ) permet d'évaluer la contribution des interactions polaires au sein du complexe puisque ces dernières sont renforcées en phase gazeuse<sup>231</sup>. Plus un complexe sera stable plus la tension nécessaire à la dissociation de 50% du complexe initialement formé sera grande. Ainsi, la stabilité des complexes en phase gazeuse peut être déterminée par la mesure de la tension d'accélération conduisant à la dissociation de 50% des complexes ( $V_{c50}$ )<sup>228</sup>.

Au cours de notre étude, nous avons donc déterminé puis comparé les  $V_{c50}$  obtenus pour chaque ligand. La protéine PDF1B (5  $\mu\text{M}$ ) a été incubée à température ambiante pendant 10 minutes avec chacun des ligands (10  $\mu\text{M}$ ) puis une rampe de tension d'accélération a été réalisée induisant la dissociation en source de chaque complexe. La quantification des différentes espèces sur les spectres de masse a été réalisée, pour chaque tension d'accélération, en considérant les intensités relatives des pics correspondant aux états de charge 8 et 9 + de la protéine seule ou complexée à un ligand. La Figure 44 met en évidence les courbes de dissociation obtenues pour chacun des ligands à tester.

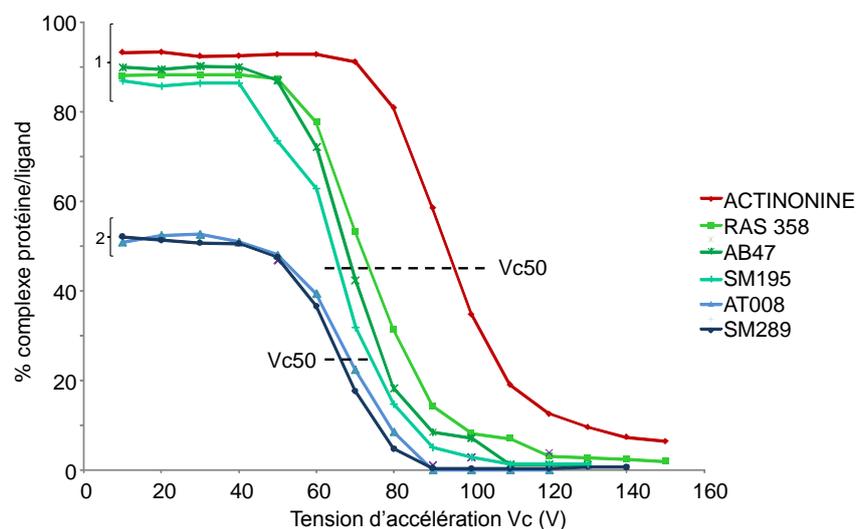


Figure 44: Détermination des Vc50 des 6 ligands interagissant avec la protéine PDF1B. 1 : ligands ayant un pourcentage de complexation élevé. 2 : ligands ayant des pourcentages de complexation plus faibles.

Ces résultats permettent de mettre en évidence la présence de deux classes de ligands : ceux très stables en phase gazeuse (en rouge) et ceux moins stables (en vert) (Tableau 9). En effet, le complexe Actinonine/PDF1B est plus stable ( $Vc50 > 85$  V) que les autres complexes protéine/ligand étudiés dont les  $Vc50$  sont compris entre 65 et 80 V. Afin d'évaluer la stabilité des complexes en minimisant l'effet des variations expérimentales, au moins 3 déterminations de  $Vc50$  ont été réalisées pour chaque ligand. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Détermination de la stabilité des complexes protéines/ligands en phase gazeuse ( $Vc50$ ) ( $P_i = 6$  mbar)

	Actinonine	RAS358	AB47	SM195	AT008	SM289
$Vc50$ (V)	$90 \pm 4$ (5)	$75 \pm 1$ (4)	$71 \pm 3$ (4)	$69 \pm 4$ (3)	$71 \pm 4$ (4)	$67 \pm 2$ (3)

Contrairement à l'analyse des pourcentages de complexes en phase gazeuse, l'étude des  $Vc50$  nous permet de caractériser plus finement les différents complexes protéine/ligands. En combinant les pourcentages de complexation obtenus précédemment et les résultats de  $Vc50$ , trois classes de ligands se distinguent :

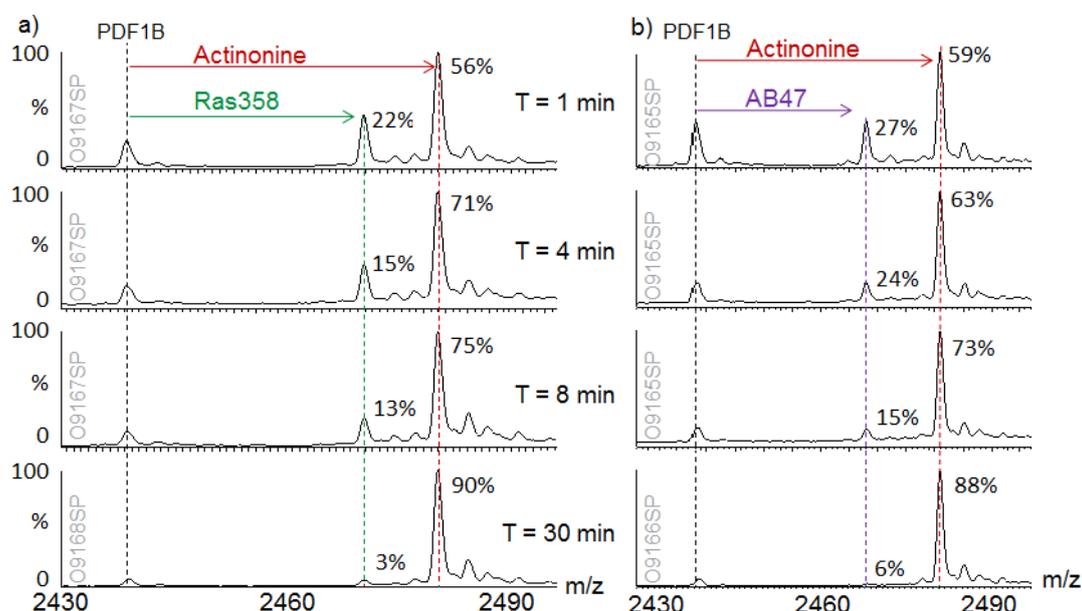
- 1 : Complexation importante et bonne stabilité du complexe en phase gazeuse (Actinonine)
- 2 : Complexation importante et stabilité moyenne en phase gazeuse (RAS358, AB47 et SM195)
- 3 : Complexation et stabilité moyenne en phase gazeuse (AT008 et SM289).

Les différents complexes entre PDF1B et des dérivés indoles ou indoles inversés (AB47, SM195 et SM289) ont des stabilités en phase gazeuse inférieures à celles observées pour le ligand de référence, reflétant une diminution des interactions électrostatiques entre la protéine et les nouveaux ligands.

## 2.4 Détermination des affinités protéine/ligands en solution

### a. Compétition directe entre deux ligands pour le site de fixation de la protéine PDF1B

Afin de déterminer les affinités relatives des différents ligands pour le site de fixation de la protéine PDF1B, nous avons réalisé des expériences de compétitions directes entre les ligands RAS358/Actinonine et AB47/Actinonine (Figure 45).



**Figure 45: Compétition directe entre l'Actinonine et les ligands RAS358 ou AB47.** La protéine PDF1B (5  $\mu$ M) a été incubée avec les mélanges Actinonine/RAS35 (a) ou Actinonine/AB47 (b) selon un ratio PDF1B/ligand 1/ligand 2, 1 :2 :2. Les pourcentages de complexes formés ont été suivis pendant 30 minutes. Les spectres de masse correspondent à l'état de charge 9+.

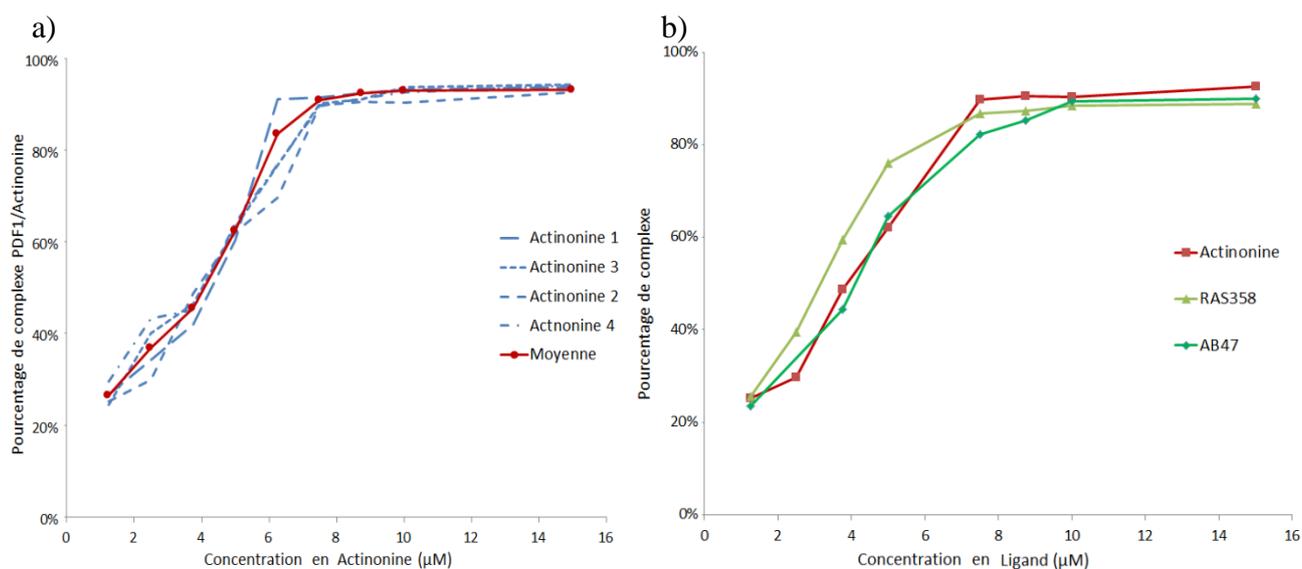
Dans les deux cas, après une minute d'incubation, l'Actinonine est majoritairement fixée sur la protéine PDF1B et les autres ligands en compétition sont minoritairement fixés, ce qui est en accord avec les données d'affinité obtenues pour ces ligands. Le pourcentage de complexes protéine/RAS358 ou protéine/AB47 diminue ensuite au cours du temps au profit du complexe protéine/Actinonine. Après 30 minutes, un état stationnaire est observé où l'Actinonine a complètement remplacé les ligands en compétition (RAS358 et AB47).

Ces observations montrent que l'affinité des ligands RAS358 et AB47 pour la protéine PDF1B est suffisante pour permettre la fixation de ces deux ligands en début d'analyse. Le temps mis par l'Actinonine pour remplacer le ligand présent dans le site actif de l'enzyme est toujours du même ordre de grandeur (environ 30 min) et est relativement important par rapport au temps mis en absence de second ligand (1 min). Cette observation pourrait s'expliquer par un changement conformationnel induit par la fixation des ligands RAS358 et AB47, rendant la fixation de l'Actinonine plus complexe.

## b. Détermination des constantes d'affinités par MS supramoléculaire

Afin de pouvoir caractériser plus finement certaines interactions protéine/ligand, les constantes de dissociation ( $K_d$ ) de différents complexes ont été déterminées par spectrométrie de masse. Pour cela la protéine PDF1B dont la concentration a été fixée à  $5 \mu\text{M}$  a été incubée pendant 10 minutes à température ambiante avec des concentrations croissantes de ligands allant de  $1,25 \mu\text{M}$  à  $15 \mu\text{M}$ . Pour obtenir des courbes d'association les plus précises possible, 9 points de titration ont été réalisés. Lors de cette étude, les paramètres instrumentaux ont été optimisés pour préserver les interactions non-covalentes en phase gazeuse. Les intensités des pics observées sur les spectres ont été utilisées pour déterminer les pourcentages de complexes formés.

Dans un premier temps, afin d'évaluer la reproductibilité de nos analyses, nous avons effectué 4 déterminations de  $K_d$  pour notre ligand de référence, l'Actinonine, sur des échantillons indépendants. Afin d'évaluer les constantes  $K_d$ , nous avons utilisé un modèle prenant en compte les différences de facteurs réponses entre la protéine seule et la protéine liée au ligand<sup>214</sup>. Les courbes de titrages réalisées à l'aide du logiciel SigmaPlot nous ont permis de déterminer les constantes de dissociation des complexes PDF1B/Actinonine ainsi que les facteurs de réponses (Figure 46, a). Les valeurs obtenues pour le  $K_d$  et le facteur réponse  $t$  présentent des valeurs similaires lors des 4 expériences permettant de confirmer la reproductibilité de la détermination du  $K_d$  pour l'évaluation de l'affinité des complexes protéine/ligands. Les courbes de titrage obtenues lors des 4 expériences, représentées sur la Figure 46, montrent aussi une reproductibilité de nos résultats. Le complexe PDF1B/Actinonine présente un  $K_d$  moyen de  $0,34 \pm 0,07 \mu\text{M}$  et un facteur réponse moyen de  $1,53 \pm 0,18$ . (Figure 46, a). Nous avons ensuite réalisé notre étude sur les ligands RAS358 et AB47.



**Figure 46: Titration de la protéine PDF1B par les ligands: Actinonine, RAS358 et AB47.** a) Évaluation de la reproductibilité de la détermination de constantes d'affinités par MS (courbes bleues : représentation des 4 réplicats indépendants, courbe rouge : courbe moyenne des 4 réplicats) ; b) Courbe de titrage de PDF1B par l'Actinonine (rouge), RAS358 (vert clair) et AB47 (vert foncé).

Nous avons pu ainsi mettre en évidence que les facteurs réponses sont différents en fonction des ligands (Actinonine : 1,62, RAS358 : 0,9 et AB47 :1,38). En prenant en compte ces facteurs réponses, les valeurs de  $K_d$  mesurées permettent de classer les ligands testés en deux familles : d'une part l'Actinonine avec un  $K_d$  de 0,33  $\mu\text{M}$ , d'autre part : les ligands RAS358 et AB47 dont les  $K_d$  sont respectivement de 0,66  $\mu\text{M}$  et 0,59  $\mu\text{M}$ . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par des techniques enzymologiques montrant que le ligand de référence possède la meilleure constante d'affinité pour la protéine PDF1B.

Afin de compléter cette étude, les  $K_d$  des autres ligands devront être déterminés par MS supramoléculaire.

## 2.5 Conclusion

En conclusion, cette première série d'analyse de la stabilité des complexes en phase gazeuse et en solution nous a permis d'affiner la caractérisation des inhibiteurs de la protéine PDF1B en les classant en trois familles distinctes:

- les ligands à fortes interactions avec des affinités fortes (Actinonine)
- les ligands à fortes interactions avec des affinités fortes faibles (RAS358, AB47 et SM195)
- les ligands à interactions faibles avec des affinités faibles (AT008 et SM289).

Tableau 10: Caractérisation des différents ligands de la protéine PDF1B par MS supramoléculaire

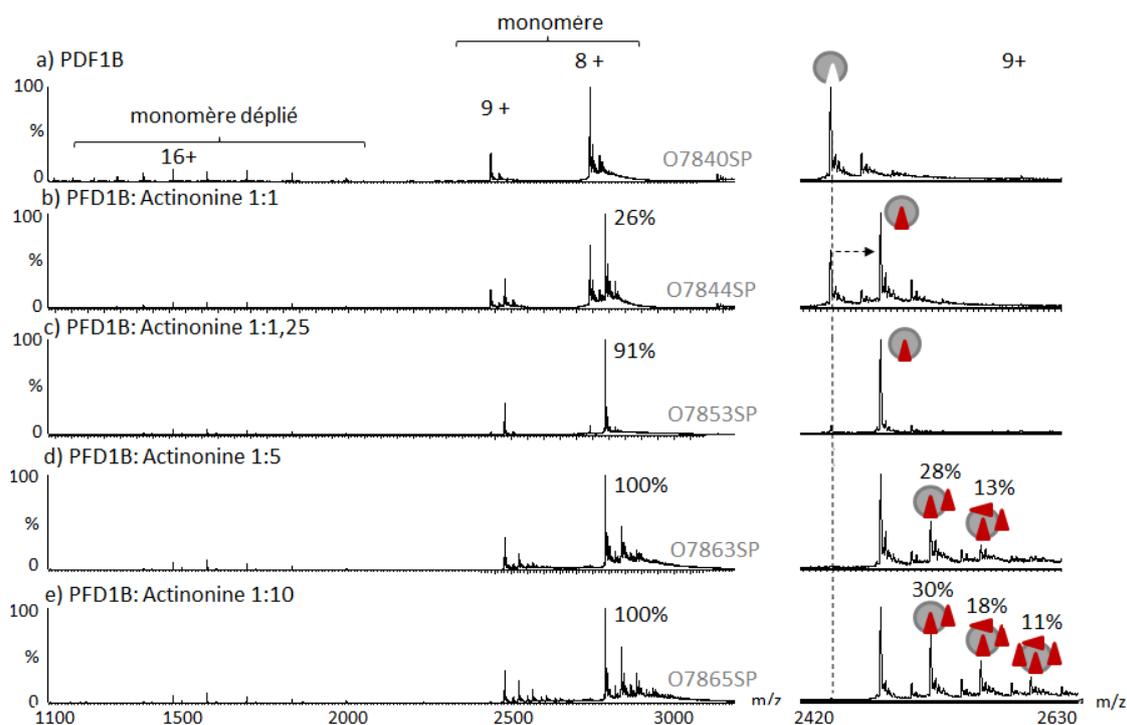
	Actinonine	RAS358	AB47	SM195	AT008	SM289
$M_{\text{mesurée}}$ (Da)	22320 $\pm$ 1	22228 $\pm$ 1	22202 $\pm$ 1	22293 $\pm$ 1	22305 $\pm$ 1	22293 $\pm$ 1
% complexe	91 $\pm$ 1	89 $\pm$ 2	89 $\pm$ 1	86 $\pm$ 1	48 $\pm$ 6	52 $\pm$ 4
Vc50 (V)	90 $\pm$ 4	75 $\pm$ 1	71 $\pm$ 3	69 $\pm$ 4	71 $\pm$ 4	67 $\pm$ 2

## 3 Existe-t-il un second site de fixation du ligand RAS358 sur la protéine PDF1B ?

Des études cristallographiques réalisées par nos collaborateurs ont mis en évidence la fixation du ligand RAS358 sur un site de fixation non attendu. Par conséquent, des études par MS supramoléculaire ont été réalisées afin de déterminer s'il existait un second site de fixation du ligand RAS358 sur la protéine PDF1B.

### 3.1 Spécificité des interactions entre PDF1B et les ligands Actinonine, RAS358 ou AB47

Pour évaluer les spécificités des interactions protéine/ligand, nous avons incubé la protéine PDF1B (5  $\mu\text{M}$ ) avec des concentrations croissantes de ligands (de 2,5 à 50  $\mu\text{M}$ ) (Figure 47).



**Figure 47: Mise en évidence de fixation non spécifique de l'Actinonine sur la protéine PDF1B.** La protéine PDF1B a été dessalée puis incubée avec différentes concentrations d'Actinonine selon différents ratios (de 1 : 1 à 1 : 10).  $\circ$  et  $\blacktriangle$  correspondent respectivement à la protéine PDF1B et au ligand Actinonine.

Parmi l'ensemble des ligands étudiés, seule l'Actinonine présente une fixation non spécifique à partir de 5 équivalents de ligands, avec l'apparition de complexes de stœchiométrie 1 : 2 ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,705 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,705$  Da), 1 : 3 ( $M_{\text{mesurée}} = 23\,090 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 23\,090$  Da) et 1 : 4 ( $M_{\text{mesurée}} = 23\,746 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 23\,745$  Da) (Figure 47).

Cette fixation non spécifique de l'Actinonine à forte concentration devra être prise en compte lors des études de compétition entre les différents ligands. En effet, il est important lors d'études d'interactions protéine/ligands de faire la différence entre une fixation non spécifique et l'identification de plusieurs sites spécifiques de fixation.

### 3.2 Compétition indirecte de deux ligands pour le site de fixation de la protéine PDF1B

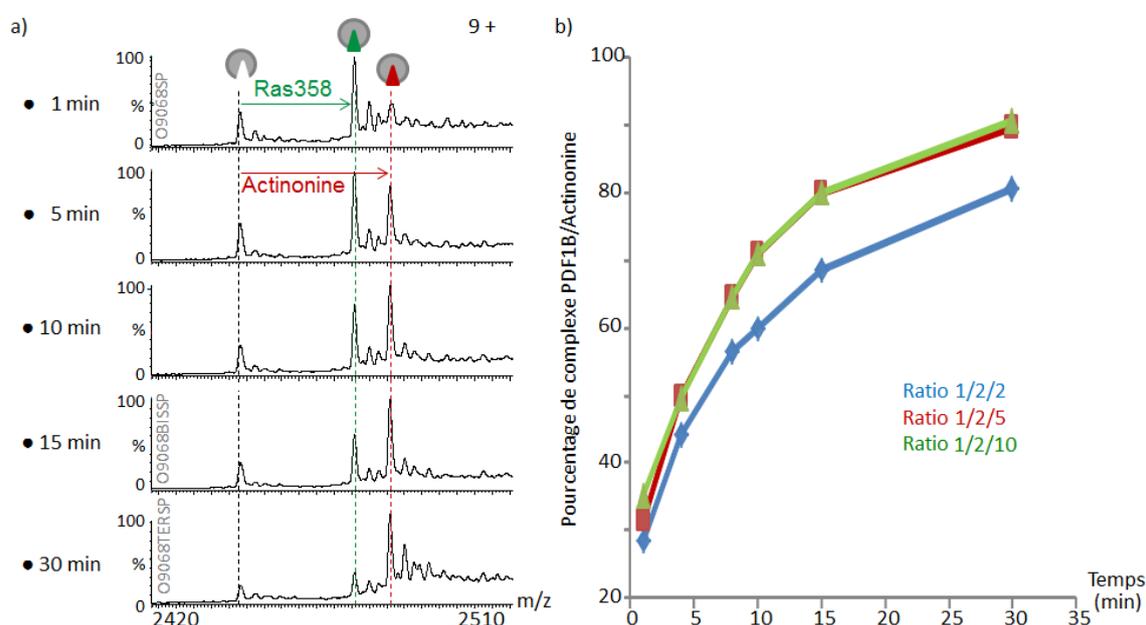
L'objectif de cette série d'analyses est de déterminer si un ligand 2 est capable de déplacer un ligand 1 précédemment lié à l'enzyme et/ou s'il se fixe sur un second site de fixation indépendant.

Pour toutes ces expériences de compétitions, le ligand 1 (10  $\mu\text{M}$ ) est incubé avec la protéine PDF1B (5  $\mu\text{M}$ ) pendant 10 minutes à température ambiante et la formation du complexe est vérifiée par MS. Le ligand 2 (10  $\mu\text{M}$ ) est ensuite ajouté au complexe précédemment formé. Le suivi de la réaction est réalisé immédiatement et jusqu'à atteindre un état stationnaire.

Il est important de rappeler ici que chaque ligand est capable de former un complexe de stœchiométrie 1 : 1 avec la protéine PDF1B en 1 minute. Chaque analyse de compétition a été réalisée à deux reprises sur des échantillons indépendants afin de s'assurer de la reproductibilité de nos résultats.

- **Compétition RAS358 (Ligand 1 : L1)/Actinonine (Ligand 2 : L2)**

Dans un premier temps, le complexe PDF1B/RAS358 a été formé avant ajout de l'Actinonine (Ligand 2). Nous avons pu observer que l'Actinonine était capable de former un complexe avec la protéine PDF1B au détriment du complexe RAS358/PDF1B comme le montre la Figure 48. Ce phénomène de remplacement du ligand RAS358 par l'Actinonine n'est pas instantané puisque 30 minutes sont nécessaires pour atteindre un état stationnaire. Le fait que l'Actinonine soit capable de se fixer à la place du ligand RAS358 est en accord avec les données d'affinités en solution précédemment obtenues. La comparaison du temps mis par l'Actinonine pour remplacer le ligand 1 nous apportera une nouvelle information concernant la stabilité des complexes ligands 1/PDF1B formés.



**Figure 48: Compétition indirecte entre le ligand RAS358 et l'Actinonine pour la protéine PDF1B.** Suivi de la cinétique de formation du complexe PDF1B/Actinonine au cours du temps pour les ratios PDF1B/RAS358/Actinonine 1/2/2, 1/2/5 et 1/2/10 ( $V_c = 20V$ ,  $P_i = 6mbar$ ). a) Spectres de masse correspondants au ratio 1/2/2, b) Pourcentage de complexes PDF1B/Actinonine formés en fonction du temps.

Afin de mettre en évidence la possible existence d'un second site de fixation, nous avons réalisé cette même expérience, mais en ajoutant des concentrations croissantes d'Actinonine. Afin de déterminer si la concentration d'Actinonine avait un effet sur la cinétique de remplacement du ligand RAS358, nous avons suivi ce phénomène sur 30 minutes pour 3 concentrations d'Actinonine différentes (10, 25 et 50  $\mu M$ ) (Figure 48, b). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la cinétique de remplacement du ligand RAS358 par l'Actinonine est plus rapide lorsque le ratio RAS358/Actinonine est d'au moins 2/5. Après ce ratio, augmenter la concentration en Actinonine ne permet pas d'accélérer la vitesse d'échange du ligand RAS358.

Après 30 minutes, l'Actinonine a donc remplacé le ligand RAS358 précédemment fixé à la protéine PDF1B. Aucune fixation du ligand RAS358 sur la protéine PDF1B n'est observée, suggérant l'absence d'un second site de fixation.

Une fixation non spécifique de l'Actinonine est cependant observée à partir d'un ratio PDF1B : Actinonine de 1 : 5 comme lors de nos études de stœchiométries d'interaction PDF1B/Actinonine. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des complexes PDF1B/Actinonine 1/2 ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,706 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,705$  Da) et 1/3 ( $M_{\text{mesurée}} = 23\,092 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 23\,090$  Da).

- **Compétitions AB47 (L1)/Actinonine (L2) et AT008 (L1)/Actinonine (L2)**

De même qu'avec le ligand RAS358, l'Actinonine est capable de remplacer les ligands AB47 et AT008 fixés à la protéine PDF1B. Toutefois, le temps d'échange des ligands L1 par l'Actinonine diffère en fonction du ligand étudié. Nous pouvons ainsi classer ces différents ligands en fonction de leur cinétique de remplacement par l'Actinonine : RAS358 (30 min) > AB47 (15 min) > AT008 (1 min) (Figure 49).

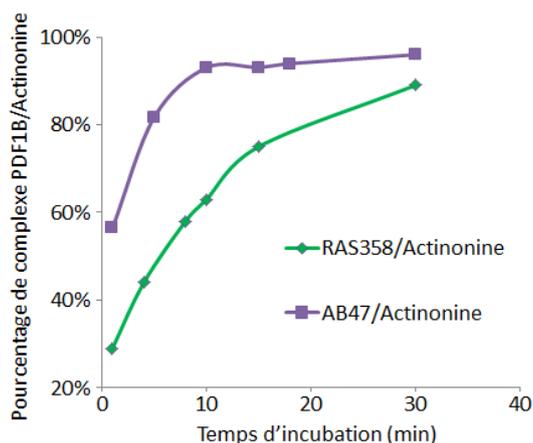


Figure 49: Compétition indirecte entre les complexes PDF1B/RAS358 ou PDF1B/AB47 et l'Actinonine. (Ratio PDF1B :ligands 1 :2, 5  $\mu$ M,  $V_c = 20$ V,  $P_1 = 6$  mbar).

- **Compétition Actinonine (L1)/RAS358 ou AB47 (L2)**

Lorsque les ligands RAS358 ou AB47 sont incubés avec le complexe PDF1B/Actinonine, aucun déplacement de l'Actinonine par les ligands n'est observé au cours du temps.

Lorsque le complexe PDF1B/Actinonine est incubé avec un excès de ligand RAS358 (ratio 2/5), la fixation minoritaire d'un ligand ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,612 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,613$  Da) ou de 2 ligands RAS358 ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,907 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,906$  Da) a été observée sur le complexe PDF1B/Actinonine (Figure 50, panel de gauche). De même pour le ligand AB47, la fixation minoritaire d'un ligand ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,589 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,588$  Da) ou de 2 ligands AB47 ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,857 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,856$  Da) a été observée sur le complexe PDF1B/Actinonine (Figure 50, panel de droite).

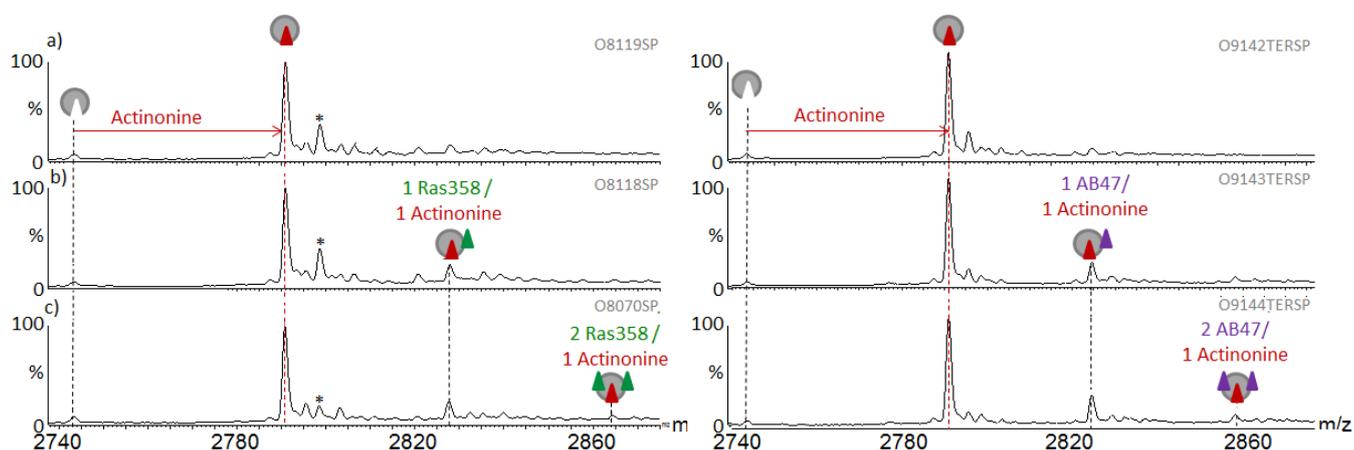


Figure 50: Fixation non spécifique des ligands RAS358 (panel de gauche) et AB47 (panel de droite) sur le complexe PDF1B/Actinonine en présence d'un excès de ligands. Ratios PDF1B/Actinonine/ligand 2 : 1/2/2 (a), 1/2/5 (b), 1/2/10 (c). \* correspond à un adduit non covalent de 62 Da

Cette observation suggérerait la présence d'une fixation non spécifique des ligands RAS358 et AB47, présents en excès, sur le complexe PDF1B/Actinonine.

### 3.3 Conclusion

Ces études ont permis de montrer que les différents ligands et l'Actinonine étaient en compétition pour le site de fixation de la protéine PDF1B. L'Actinonine, qui est le ligand ayant la meilleure affinité pour ce site est capable de déplacer chaque ligand fixé à PDF1B. Pour la première fois en MS, nous avons pu montrer que ce phénomène de déplacement de l'équilibre est fonction du temps. De plus, nous avons pu montrer que ce remplacement est d'autant plus rapide que le ratio Actinonine/ligand est important, jusqu'à atteindre une cinétique maximale de remplacement qui n'évolue plus à partir d'un certain ratio Actinonine/Ligand. Ainsi, nous avons pu différencier les ligands étudiés, en fonction de leur cinétique de remplacement par l'Actinonine. Les différences mises en évidence au cours de cette étude pourraient être liées à des changements conformationnels induits au niveau de la protéine PDF1B. Les expériences réalisées lors de cette étude par MS supramoléculaire devront donc être réalisées en utilisant le couplage IM-MS. Pour cela, il faudra que notre système d'étude soit compatible avec la résolution actuelle de cette technique.

Dans un premier temps, notre étude a porté sur la comparaison de notre ligand de référence à des ligands candidats. Toutefois, il serait intéressant de réaliser des études de compétitions indirectes entre ligands candidats, mais aussi des compétitions directes faisant intervenir plus de 2 ligands candidats. Ces études pourraient notamment nous permettre d'identifier des ligands ayant des sites de fixation différents sur la protéine et étant capables d'agir en synergie. L'action synergique de 2 ligands différents permettrait en effet, de renforcer la lutte contre la multirésistance bactérienne.

Ce criblage de ligands a été réalisé sur la protéine cible PDF1B, toutefois, afin de déterminer le meilleur candidat parmi ces ligands, des études sur d'autres PDF (bactériennes et humaines) devront être réalisées.

## 4 À la recherche de preuves de l'existence du mécanisme de *Slow Tight Binding*

---

Le mécanisme de *Slow Tight Binding* est un mécanisme multi-étapes (Paragraphe 1.2 et Figure 40). En effet, la fixation du ligand sur la protéine en conformation ouverte (Étape 1) induirait progressivement un changement conformationnel au niveau de la protéine cible (Étape 2) jusqu'à atteindre un état conformationnel fermé ne permettant plus la sortie du ligand (Étape 3). Des études cinétiques et structurales réalisées par nos collaborateurs ont apporté des preuves indirectes de l'existence de ce mécanisme toutefois, l'appartenance de protéines au mécanisme de *Slow Tight Binding* est encore très discutée.

Notre étude a donc pour but de mettre à profit les possibilités offertes par la MS et l'IM-MS supramoléculaires pour prouver l'existence de ce mécanisme de *Slow Tight Binding*.

### 4.1 Expériences de compétitions indirectes en MS supramoléculaire

---

Les expériences de compétitions indirectes réalisées par MS supramoléculaire (paragraphe 3.2) ont mis en évidence que l'Actinonine ne pouvait être remplacée par aucun ligand ayant une force de complexation et une stabilité en phase gazeuse similaire à celles de l'Actinonine (RAS358 et AB47). Par conséquent, les interactions entre l'Actinonine et la protéine PDF1B sont très fortes et ne peuvent être déstabilisées. Ces observations permettent de confirmer que l'Actinonine est un *Slow Tight Binder* puisqu'une fois fixé, le ligand est emprisonné dans le site actif de la protéine. Au contraire, les autres ligands ne sont pas des *Slow Tight Binder*.

### 4.2 Utilisation du couplage IM-MS pour la caractérisation de changements conformationnels fins

---

#### 4.2.1 Moyens mis en œuvre pour étudier le mécanisme de *Slow Tight Binding* par IM-MS

---

##### a. Ligands Actinonine, RAS358 et AB47

Afin de pouvoir mettre en évidence ce mécanisme, les changements conformationnels induits par la fixation du ligand *Slow Tight Binder* (Actinonine) sur la protéine PDF1B seront comparés à ceux induits par la fixation des autres ligands non *Slow Tight Binder* (RAS358 et AB47).

##### b. Mutants PDF1B G41Q et G41M

De précédentes études ont pu montrer que la protéine PDF1B possède une région riche en glycine (G<sub>41</sub>IGLAAXQ) impliquée dans les interactions protéine/ligand. Cette région pourrait avoir un rôle dans le passage de la forme ouverte à la forme fermée<sup>330</sup>. Afin de mettre en évidence la présence d'états conformationnels intermédiaires entre la forme ouverte et la forme fermée de la protéine PDF1B, des mutants de la Glycine 41 ont été réalisés (G41Q et G41M).

Les mutants PDF1B G41Q ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,004 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,005$  Da) et G41M ( $M_{\text{mesurée}} = 22\,008 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 22\,008$  Da) sont majoritairement monomérique et présentent chacun un atome de nickel. Par conséquent, les mutations étudiées n'ont pas eu d'effet sur la fixation de l'atome de nickel, ni sur l'état d'oligomérisation de la protéine PDF1B.

L'étude des stœchiométries d'interaction entre l'Actinonine et les mutants G41Q et G41M a permis de montrer que les mutations n'ont pas d'effet sur les interactions protéine/Actinonine en phase gazeuse (Tableau 11).

**Tableau 11: Effet de la mutation de la Glycine 41 sur les interactions PDF1B/Actinonine et PDF1B/RAS358.**

Actinonine	PDF1B	G41Q	G41M	RAS358	PDF1B	G41Q	G41M
$M_{\text{mesurée}}$ (Da)	22320 ± 1	22004 ± 1	22008 ± 1	$M_{\text{mesurée}}$ (Da)	22228 ± 1	22391 ± 1	22392 ± 1
% complexe	91 ± 1	88 ± 1	96 ± 1	% complexe	91 ± 1	78	89
Vc50 (V)	88V	87V	86V	Vc50 (V)	74V	73V	72V

Toutefois, les interactions protéine/RAS358 et protéine/AB47 semblent perturbées par la mutation de la Glycine 41. En effet, les interactions entre la protéine G41Q et le ligand RAS358 (78%) sont moins importantes qu'en absence de mutation (91%). De même, les mutants G41Q et G41M présentent des interactions plus faibles avec le ligand AB47 (60 et 76% respectivement) par rapport à la protéine PDF1B sauvage (89%).

D'autre part, les stabilités des complexes protéine/Actinonine et protéine/RAS358 en phase gazeuse ne sont pas altérées par la présence d'une mutation au niveau de la Glycine 41 puisque les valeurs de Vc50 sont similaires à celles obtenues en absence de mutations (Tableau 11).

#### 4.2.2 Changements conformationnels attendus : calcul de CCS théoriques

Les sections efficaces théoriques ont été déterminées grâce au programme Mobcal mis en ligne par l'équipe de Jarrold selon les trois méthodes de projections : PA, EHSS et TM (Tableau 12). Les CCS déterminées par la méthode PA, ne prenant pas en compte les interactions entre les molécules de gaz et les ions en phase gazeuse, sont sous-estimées par rapport aux CCS effectives. Les CCS déterminées par les EHSS et TM sont similaires. Toutefois, la méthode de prédiction TM qui prend en compte l'ensemble des interactions ayant lieu entre les ions et les molécules de gaz permet d'obtenir une meilleure estimation des CCS théoriques.

Dans le but de calculer des CCS les plus justes possible, les différents fichiers PDB (*Protein Data Bank*) ont été homogénéisés de manière à ce qu'ils contiennent le même nombre d'acides aminés à savoir 180 dans notre cas.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 12.

**Tableau 12: CCS théoriques calculées à l'aide du logiciel Mobcal développé par l'équipe de Jarrold MF.**

Echantillons	Fichiers PDB	CCS (nm <sup>2</sup> )		
		PA	EHSS	TM
PDF1B	3M60	15,57	19,74	19,53
PDF1B + Actinonine	3M6P	15,64	19,93	19,66
PDF1B + RAS358	3PN3 -(ARG)	15,73	19,98	19,99
PDF1B + AB47	3O3J	15,38	19,63	19,51
G41Q	3PN5 -(ARG)	15,86	20,1	20,54
G41Q + Actinonine	3M6Q-(ARG)	15,59	19,86	19,71
G41M	3PN6 -(ARG)	15,86	20,14	20,24
G41M + Actinonine	3M6R	15,83	20,14	20,03

D'après les CCS théoriques, la fixation de l'Actinonine et de RAS358 sur la protéine PDF1B entraînent respectivement une augmentation de 0,7 et de 1% de la CCS contrairement à la fixation du ligand AB47 qui n'induit pas de changement conformationnel détectable par IM-MS. La fixation de l'Actinonine sur les mutants G41Q et G41M entraîne une diminution de la CCS de 4 et 1 % respectivement.

D'après les études cristallographiques réalisées par nos collaborateurs, la fixation de l'Actinonine ou du ligand AB47 sur la protéine PDF1B devrait entraîner un changement conformationnel, contrairement à la fixation du ligand RAS38. La fixation de l'Actinonine sur les protéines G41Q et G41M devrait entraîner un changement conformationnel moins important que celui observé lors de la fixation de l'Actinonine sur la protéine PDF1B.

Toutefois, les prédictions réalisées à l'aide du logiciel Mobcal ne sont pas en accord avec les résultats attendus d'après les études RX réalisées. Étant donné que les structures cristallographiques disponibles dans la PDB ne correspondent pas à la même orientation de la protéine PDF1B dans l'espace, nos collaborateurs nous ont fourni de nouveaux fichiers PDB où les protéines ont la même orientation. Les CCS théoriques calculées à partir de ces nouveaux fichiers sont présentées dans le Tableau 13.

**Tableau 13: Calcul de CCS sur les nouveaux fichiers PDB dont l'orientation des molécules est identique à l'aide du logiciel Mobcal développé par MF Jarrold.**

Echantillons	CCS (nm <sup>2</sup> )		
	PA	EHSS	TM
PDF1B	15,63	19,9	19,69
PDF1B + Actinonine	15,7	19,99	19,59
PDF1B + RAS358	15,7	19,96	19,6
PDF1B + AB47	15,38	19,54	19,33
G41Q	15,84	20,07	19,76
G41Q + Actinonine	15,59	19,87	19,37
G41M	15,88	20,18	20,44
G41M + Actinonine	15,81	20,12	20,2

Cette nouvelle détermination des CCS théoriques nous a permis de mettre en évidence que la fixation de l'Actinonine sur les protéines PDF1B et G41M entraîne une diminution de la CCS de 1% alors que la fixation du ligand AB47 sur la protéine PDF1B et du ligand Actinonine sur la protéine G41Q entraîne une diminution de 2% de la CCS. La fixation du ligand RAS358 sur la protéine PDF1B n'entraînera pas de changement conformationnel visible par IM-MS.

Bien que le logiciel Mobcal soit couramment utilisé pour déterminer des CCS théoriques de protéines, il n'a pas encore été utilisé pour prédire des changements conformationnels fins. L'ensemble des calculs que nous avons réalisé au cours de cette étude suggère que ce logiciel n'est pas adapté pour la détermination de CCS dont la mesure doit être fiable au centième de nanomètre carré près.

### 4.3 Étude par IM-MS du système PDF1B/Ligands

#### 4.3.1 Optimisation du couplage IM-MS sur le complexe PDF1B/Actinonine

L'optimisation de nos paramètres de mobilité ionique a été effectuée sur le complexe de référence PDF1B/Actinonine. Pour cela, la protéine PDF1B a été incubée avec l'Actinonine (ratio 1 : 1, 5  $\mu$ M). Dans un premier temps, l'ensemble des paramètres instrumentaux a été optimisé pour diminuer l'énergie transmise aux ions tout en conservant une bonne désolvatation et une bonne transmission des ions. Par la suite, nous avons défini plusieurs paramétrages permettant de déterminer le meilleur rapport débit d'hélium/débit d'azote ( $Q_{He}/Q_{N_2}$ ), les meilleures hauteurs (WH) et vitesses de vagues (WV) (Tableau 14).

Tableau 14: Optimisation des paramètres IM-MS pour la détection de changements conformationnels fins

Paramètres de pression												
$Q_{He}/Q_{N_2}$	$Q_{He}$	$Q_{N_2}$	$P_{IMS}$	Conditions	WH	WV	Conditions	WH	WV	Conditions	WH	WV
2	180	90	3,52	R2_A1	20	260	R2_B1	30	550	R2_C1	40	900
	140	70	2,83	R2_A3		400	R2_B3		800	R2_C3		1100
	120	60	2,5	R2_A4		500	R2_B4		900	R2_C4		1200
	100	50	2,17	R2_A5		600	R2_B5		1000	R2_C5		1300
	60	30	1,43	R2_A7		850	R2_B7		1200	R2_C7		1400
3	180	60	4,68	R3_A1	20	450	R3_B1	30	850	R3_C1	40	1200
	140	46,67	3,29	R3_A3		600	R3_B3		1000	R3_C3		1300
	120	40	2,75	R3_A4		700	R3_B4		1100	R3_C4		1350
	100	33,33	2,23	R3_A5		800	R3_B5		1150	R3_C5		1400
	60	20	1,31	R3_A7		850	R3_B7		1200	R3_C7		1350
4	180	45	7,96	R4_A1	20	650	R4_B1	30	1050	R4_C1	40	1350
	140	35	4,11	R4_A3		800	R4_B3		1150	R4_C3		1400
	120	30	3,09	R4_A4		850	R4_B4		1200	R4_C4		1450
	100	25	2,31	R4_A5		895	R4_B5		1200	R4_C5		1430
	60	15	1,22	R4_A7		850	R4_B7		1200	R4_C7		1300

Lors de notre étude sur la protéine Bcl-xL, nous avons montré que les temps de passage des ions dans la cellule de mobilité doivent être compris dans le deuxième tiers du mobilogramme pour être

exploitables soit entre 7 et 14 ms dans le cas de cette étude. À l'issue d'une analyse, les temps de passage des ions dans la cellule de mobilité sont relevés ainsi que la largeur à mi-hauteur des pics de mobilité. Lors de l'étude d'un changement conformationnel fin, le temps de passage des ions n'est pas assez informatif. En effet, deux ions peuvent avoir des temps de passage différents, mais ne pas être bien séparés si les pics de mobilité sont larges. C'est pourquoi, le facteur de résolution  $R_s$  est le plus approprié pour décrire la séparation des ions par IM-MS. Afin d'évaluer les meilleurs paramètres expérimentaux, nous avons comparé les facteurs de résolution obtenus pour les états de charge 9 et 8 + de la protéine PDF1B (Tableau 15).

**Tableau 15: Évolution des facteurs de résolution en fonction des paramètres IM-MS pour les états de charge 8 et 9 + de la protéine PDF1B seule ou en interaction avec l'Actinonine.** Plus les facteurs de résolution sont élevés, plus la couleur des cellules devient rouge.

		Facteur de résolution									$P_{IMS}$ (mbar)		
8+		2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
$Q_{He}/Q_{N2}$													
$Q_{He}$ (mL/min)	180	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,4	0,3	0,4	0,5	3,52	4,68	7,96
	140	0,2	0,1	0,3	0,3	0,4	0,5	0,2	0,4	0,6	2,83	3,29	4,11
	120	0,3	0,2	0,4	0,2	0,5	0,7	0,4	0,6	0,6	2,5	2,75	3,09
	100	0,3	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,4	0,6	0,5	2,17	2,23	2,31
	60	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	0,5	0,5	0,3	1,43	1,31	1,22
WH (V)		20			30			40					
9+		Facteur de résolution									$P_{IMS}$ (mbar)		
$Q_{He}/Q_{N2}$		2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
$Q_{He}$ (mL/min)	180	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	3,52	4,68	7,96
	140	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3	0,5	2,83	3,29	4,11
	120	0,0	0,1	0,4	0,1	0,2	0,5	0,2	0,3	0,7	2,5	2,75	3,09
	100	0,1	0,2	0,4	0,2	0,4	0,6	0,4	0,5	0,6	2,17	2,23	2,31
	60	0,4	0,6	0,6	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	1,43	1,31	1,22
WH (V)		20			30			40					

Les meilleures séparations sont obtenues pour des rapports de débits de gaz de 4 avec des débits d'azote les plus bas possible ainsi que pour des hauteurs de vagues élevées.

Les facteurs de résolution obtenus pour l'état de charge 8 + sont généralement plus élevés que ceux obtenus pour l'état de charge 9+. Ceci est dû au fait que le temps de passage des ions dans la cellule de mobilité des ions 8+ est plus long que celui des ions 9+, et que ces derniers sont aux limites de notre zone d'analyse. Par conséquent, les pics de mobilité des ions 8+ sont plus larges que ceux des ions 9+. Par exemple, pour un ratio  $Q_{He}/Q_{N2}$  de 4, avec un débit d'azote de 100 et une hauteur de vague de 40, la largeur à mi-hauteur du pic de protéine/ligand de l'état de charge 9+ est de 0,7 ms alors que celle de l'état de charge 8+ est de 1,25 ms. Par conséquent, il est important de choisir les meilleurs paramètres pour les deux états de charges.

Une fois l'étape d'optimisation réalisée, il est important de choisir plusieurs jeux de paramètres à étudier, pour permettre une bonne compréhension du système protéine/ligand. Dans notre cas, les conditions suivantes ont été sélectionnées : ratio  $Q_{He}/Q_{N_2}$  de 4, avec un débit d'azote de 120 ou de 100 et une hauteur de vague de 40.

#### 4.3.2 Mise en évidence de changements conformationnels faibles par IM-MS

Au cours de notre optimisation, plusieurs jeux de paramètres ont permis d'obtenir des séparations par IM-MS, de la protéine seule et liée à l'Actinonine à plus de 30% de vallée. Étant donné que la fixation du ligand sur la protéine n'induit pas un changement significatif de la masse de la protéine, ni un changement d'état de charge, la différence de mobilité observée est bien due à un changement conformationnel très fin.

Notre interprétation des données est basée sur l'analyse des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité. Or, même si nous utilisons toujours les mêmes paramètres instrumentaux, de légères variations de ces temps de passage apparaissent entre les répliquats. Comme nous ne disposons pas de moyen pour étalonner les temps de passage des ions dans notre instrument, nous avons choisi de valider nos résultats en effectuant chaque détermination au moins 9 fois, à des moments différents, sur des échantillons indépendants.

Nous avons donc réalisé pour les ligands Actinonine, RAS35, AB47 et AT008 une analyse complète par MS en utilisant les jeux de paramètres instrumentaux précédemment définis. Ainsi, nous avons pu montrer que les variations de temps de passage des ions dans la cellule de mobilité au cours du temps n'ont pas d'effets significatifs sur notre étude après 9 reliquats.

Les résultats obtenus pour l'état de charge 9+ de la condition R4\_C5 (définis dans le Tableau 14) sont présentés dans le Tableau 16.

**Tableau 16: Détermination des facteurs de résolution obtenus pour les ligands Actinonine, RAS358, Actinonine et AT008 dans la condition instrumentale R4\_C5.**

Etat de charge 9+	Ligands			
	ACTINONINE	RAS358	AB47	AT008
Facteur de résolution: Rs	0,63 ± 0,07	0,26 ± 0,10	0,27 ± 0,11	0,57 ± 0,08
Nombre de répliquats	14	19	12	11

Ces données nous permettent de conclure que la fixation du ligand Actinonine entraîne un changement conformationnel au niveau de la protéine PDF1B (à 30% de vallée). Parmi l'ensemble des ligands étudiés, seul le ligand AT008 est capable d'entraîner un changement conformationnel similaire à celui de l'Actinonine. Deux classes de ligands peuvent ainsi être définies, ceux induisant un changement conformationnel « *Actinonine like* » (Actinonine, AT008) et ceux entraînant un changement conformationnel différent de celui de l'Actinonine (RAS358 et AB47).

L'analyse par IM-MS apporte donc une information essentielle sur l'effet des ligands sur la protéine PDF1B en phase gazeuse.

De plus, certaines hypothèses émises lors des études par compétition peuvent être validées grâce à ces nouvelles données. En effet, la cinétique de remplacement du ligand AT008 était relativement courte comparée à celle des autres ligands, suggérant que le changement conformationnel induit par ce ligand est proche de celui induit par l'Actinonine, ce qui est confirmé par IM-MS. Ainsi, nous pouvons en déduire que les différences de cinétiques d'échanges pourraient être dues à des différences de changements conformationnels.

Pour le moment seuls certains ligands ont été testés de manière approfondie par IM-MS afin de valider l'utilisation de cette technique lors de l'étude de changements conformationnels très fins. Parmi les autres ligands, une étude préliminaire nous a permis de montrer que les ligands SM195 et SM289 ne font pas partie de la classe « *Actinonine like* », avec des facteurs de résolution respectifs de 0,37 et 0,43.

#### 4.3.3 Déterminations de CCS expérimentales

Afin de pouvoir comparer nos données à celles obtenues par des méthodes biophysiques plus résolutive, nous avons déterminé les CCS expérimentales de la protéine PDF1B en interaction avec les ligands Actinonine, RAS358 et AB47. Pour cela, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage, dont le coefficient de corrélation  $R^2$  supérieur à 0,98, à partir de deux étalons natifs : le Cytochrome C et la  $\beta$ -lactoglobuline. Plusieurs déterminations de CCS ont été réalisées afin de garantir la reproductibilité de nos résultats. Les CCS moyennes des états de charge 8 et 9+ ont ensuite été calculées (Tableau 17).

**Tableau 17: Détermination des CCS expérimentales obtenues à partir des données IM-MS pour les ligands Actinonine, RAS358 et AB47 en interaction avec la protéine PDF1B.** Les CCS ont été déterminées grâce à une courbe d'étalonnage utilisant les étalons natifs : Cytochrome C et  $\beta$ -lactoglobuline. (-L) correspond à la CCS de la protéine apo, (+L) correspond à la CCS de la protéine holo.

	ACTINONINE	RAS358	AB47
PDF1B	(- L) $18,68 \pm 0,03 \text{ nm}^2$	(- L) $18,61 \pm 0,01 \text{ nm}^2$	(- L) $18,58 \pm 0,02 \text{ nm}^2$
	(+ L) $18,87 \pm 0,05 \text{ nm}^2$	(+ L) $18,70 \pm 0,02 \text{ nm}^2$	(+ L) $18,68 \pm 0,02 \text{ nm}^2$

La comparaison des sections efficaces calculées nous a permis d'identifier 2 classes de ligands : ceux induisant un changement conformationnel « *Actinonine like* » (Actinonine : 1% de CCS) deux fois plus important que celui observé pour les ligands RAS358 et AB47 (0,5% de CCS). Cette étude nous a permis pour la première fois de mettre en évidence un changement conformationnel extrêmement fin de l'ordre de 1% en section efficace. Lors de ce type d'étude, il est impératif de répéter plusieurs fois ces analyses pour s'affranchir des variations biologiques et expérimentales. Il est intéressant de remarquer que la conversion des temps de passage des ions dans la cellule de

mobilité en sections efficaces conduit à une perte d'information due à l'étalonnage (diminution des pourcentages de séparation observée). C'est pour cela que dans des études de criblages de ligands, nous proposons de comparer uniquement les temps de passage et les facteurs de résolutions et non les CCS calculées.

Les résultats obtenus au cours de cette partie de l'étude nous permettent de conclure que l'Actinonine qui est un *Slow Tight Binder* induit un changement conformationnel significatif au niveau de la protéine PDF1B. Au contraire, les ligands RAS358 et AB47, qui ne sont pas des *Slow Tight Binder*, ne sont pas capables d'induire le même changement conformationnel. Ces premiers résultats sont une preuve de l'existence du mécanisme de *Slow Tight Binding* de la protéine PDF1B.

#### 4.4 Étude par IM-MS de l'effet de la mutation de la Glycine 41

Afin de poursuivre la recherche de preuves concernant le mécanisme de *Slow Tight Binding*, nous avons étudié par IM-MS, les changements conformationnels induits par la fixation du ligand Actinonine sur les mutants G41Q et G41M, mais aussi par la fixation des ligands RAS358, AB47 et AT008.

Les mutants G41Q et G41M en interaction avec les différents ligands ont été analysés par IM-MS dans la condition R4\_C5 précédemment optimisée (Tableau 18).

**Tableau 18: Effet de la mutation de la Glycine 41 lors de l'interaction protéine/ligands.** Les différents échantillons ont été analysés dans la condition R4\_C5 selon un ratio stœchiométrique protéine-ligand (1 :1, 5µM). Rs = facteur de résolution, N = nombre de reliquats. La couleur rouge correspond aux changements conformationnels « *Actinonine-like* ». La couleur verte correspond aux ligands non « *Actinonine-like* ».

Etat de charge 9+		ACTINONINE	RAS358	AB47	AT008
PDF	Rs	0,63 ± 0,07	0,26 ± 0,10	0,27 ± 0,11	0,57 ± 0,08
	N	14	19	12	11
G41Q	Rs	0,55 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,42 ± 0,07	0,53 ± 0,01
	N	11	7	5	3
G41M	Rs	0,56 ± 0,05	0,37 ± 0,09	0,33 ± 0,01	0,39 ± 0,16
	N	6	6	3	3

Aucun effet significatif de la mutation de la glycine 41 a pu être mis en évidence sur la conformation des différents mutants en présence d'Actinonine.

D'autre part, l'effet des ligands RAS358 et AB47 sur le mutant G41M est le même que celui observé sur la protéine PDF1B. Par contre, nous avons pu mettre en évidence que les séparations par IM-MS pour le mutant G41Q sont les mêmes avec tous les ligands. Cette observation nous permet de conclure qu'il y a donc un effet de la mutation sur la conformation du ligand G41Q en présence de ligand.

Compte tenu de cette observation concernant le ligand G41Q, nous avons cherché à affiner notre caractérisation en calculant les CCS des 3 protéines en interaction ou non avec les ligands

Actinonine, RAS358 et AB47 (Tableau 19). En effet, les CCS nous permettent de comparer, de manière objective, chaque protéine entre elles.

**Tableau 19: Détermination des CCS expérimentales obtenues à partir des données IM-MS pour les ligands Actinonine, RAS358 et AB47 en interaction avec les protéines PDF1B, G41Q et G41M.** Les CCS ont été déterminées grâce à une courbe d'étalonnage utilisant les étalons natifs : Cytochrome C et  $\beta$ -lactoglobuline. (-L) correspond à la CCS de la protéine apo, (+L) correspond à la CCS de la protéine holo. En rouge ( $\Delta\text{CCS} \geq 1\%$ ), vert ( $1\% > \Delta\text{CCS} \geq 0,8\%$ ), bleu ( $0,8\% > \Delta\text{CCS} \geq 0,6\%$ ) et gris ( $0,6\% > \Delta\text{CCS}$ ).

	ACTINONINE	RAS358	AB47
PDF1B	(- L) 18,68 $\pm$ 0,03 nm <sup>2</sup>	(- L) 18,61 $\pm$ 0,01 nm <sup>2</sup>	(- L) 18,58 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>
	(+ L) 18,87 $\pm$ 0,05 nm <sup>2</sup>	(+ L) 18,70 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(+ L) 18,68 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>
G41Q	(- L) 18,59 $\pm$ 0,01 nm <sup>2</sup>	(- L) 18,64 $\pm$ 0,01 nm <sup>2</sup>	(- L) 18,57 $\pm$ 0,01 nm <sup>2</sup>
	(+ L) 18,74 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(+ L) 18,78 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(+ L) 18,67 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>
G41M	(- L) 18,62 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(- L) 18,63 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(- L) 18,62 $\pm$ 0,03 nm <sup>2</sup>
	(+ L) 18,76 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(+ L) 18,73 $\pm$ 0,02 nm <sup>2</sup>	(+ L) 18,73 $\pm$ 0,04 nm <sup>2</sup>

Le calcul des CCS nous a permis de mettre en évidence une différence de changements conformationnels entre les différents mutants étudiés en présence d'Actinonine. En effet, les mutants G41Q ( $\Delta\text{CCS} = 0,8\%$ ) et G41M ( $\Delta\text{CCS} = 0,7\%$ ) présentent des changements conformationnels moins importants que ceux observés pour la protéine PDF1B sauvage ( $\Delta\text{CCS} = 1\%$ ).

D'autre part, nous avons pu confirmer que la fixation du ligand RAS358 induisait un changement conformationnel du mutant G41Q ( $\Delta\text{CCS} = 0,7\%$ ) contrairement à la protéine PDF1B ( $\Delta\text{CCS} = 0,5\%$ ).

L'analyse par mobilité ionique des différents mutants de la protéine PDF1B, nous a permis de montrer que la mutation de la glycine 41 induisait la perte du *Slow Tight Binding* de la protéine PDF1B en présence de l'Actinonine (Tableau 19). De plus, l'existence de plusieurs états conformationnels intermédiaires de la protéine PDF1B en présence d'Actinonine est une preuve indirecte que cette protéine change de conformation via un mécanisme de *Slow Tight Binding*.

Afin de pouvoir mettre en évidence ce mécanisme par IM-MS, il sera nécessaire de réaliser une étude cinétique de la fixation du ligand Actinonine sur la protéine PDF1B. De plus, nous pourrions suivre les expériences de compétitions indirectes par IM-MS, de manière à établir une relation directe entre le temps d'échange des ligands et la conformation de la protéine PDF1B. Ces dernières expériences nous permettront d'évaluer le potentiel de l'IM-MS pour l'étude cinétique de changements conformationnels, faisant de l'IM-MS une technique indispensable aux études de biologie structurale.

#### 4.5 Conclusion

Cette étude nous a permis de caractériser très finement les différentes interactions PDF1B/ligands en alliant des approches MS et IM-MS supramoléculaires. Les ligands ont ainsi pu être classés en

fonction de leur interaction avec la protéine PDF1B, de la stabilité des complexes en phase gazeuse et des changements conformationnels induits par la fixation du ligand (Tableau 20).

**Tableau 20: Comparaison des interactions PDF1B/ligands par MS et IM-MS supramoléculaire.**

	Actinonine	RAS358	AB47
M <sub>mesurée</sub> (Da)	22320 ± 1	22228 ± 1	22202 ± 1
% complexe	91 ± 1	89 ± 2	89 ± 1
Vc50 (V)	90 ± 4	75 ± 1	71 ± 3
Rs	0,63 ± 0,07	0,26 ± 0,1	0,27 ± 0,11
Temps d'échange avec l'Actinonine		30 min	15 min

L'Actinonine présente une forte interaction avec la protéine PDF1B et forme un complexe stable en phase gazeuse. La fixation de ce ligand sur la protéine induit un changement conformationnel dit de *Slow Tight Binding* ou « *Actinonine like* ».

Les ligands RAS358, AB47 et SM195 appartiennent à la classe des ligands à forte interaction, mais ont des stabilités dites intermédiaires en phase gazeuse et n'induisent pas de changement conformationnel « *Actinonine like* ».

L'étude du système PDF1B/ligands nous a permis de caractériser finement les interactions protéine/ligands et d'évaluer le potentiel de nouveaux candidats médicaments. Pour la première fois, une étude des cinétiques d'échange entre ligands par MS a pu être réalisée, apportant des informations nouvelles dans les études de criblage de ligands. Les optimisations instrumentales réalisées en IM-MS au sein de notre laboratoire ont été mises à profit au cours de cette étude et nous ont permis d'étudier des changements conformationnels extrêmement fins (1% de CCS).

La MS supramoléculaire apporte donc des informations essentielles à la compréhension de systèmes enzymatiques complexes tels que le mécanisme de *Slow Tight Binding*.

Afin de montrer le caractère indispensable de la mobilité ionique au cours des études de biologies structurales, mais aussi au cours des criblages protéine/ligands, nous envisageons de suivre la cinétique de changements conformationnels de la protéine PDF1B en présence d'Actinonine.

#### 4.6 Valorisation

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'une communication par affiche :

**Stéphanie Petiot-Bécard**, Sonia Fieulaine, Carmela Giglione, Thierry Meinel, Alain Van Dorsselaer et Sarah Sanglier-Cianférani. **Caractérisation de complexes PDF1B/inhibiteurs par MS supramoléculaire et couplage mobilité ionique-MS : stœchiométries d'interactions, affinités et changements conformationnels** ; *Congrès de la Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM), 17-20 septembre 2012, Orléans.*

#### 4.7 Outils d'aide à la caractérisation des complexes protéine/ligands par MS : PLS

L'automatisation du criblage de ligands à l'aide de l'injecteur automatique d'échantillons Triversa Nanomate a permis un gain de temps considérable lors des analyses par MS

supramoléculaire. Cependant, le temps d'interprétation des données reste long et est actuellement un frein au développement haut débit du criblage de ligands par MS. Au cours de ma thèse, un logiciel appelé *Protein Ligand Screening* a été développé par l'équipe de bio-informatique (Figure 51) de notre laboratoire. Désormais, les données de stœchiométries d'interaction et de spécificité de fixation peuvent être rapidement obtenues. Il en est de même lors de l'étude de la stabilité des complexes en phase gazeuse (détermination de Vc50).

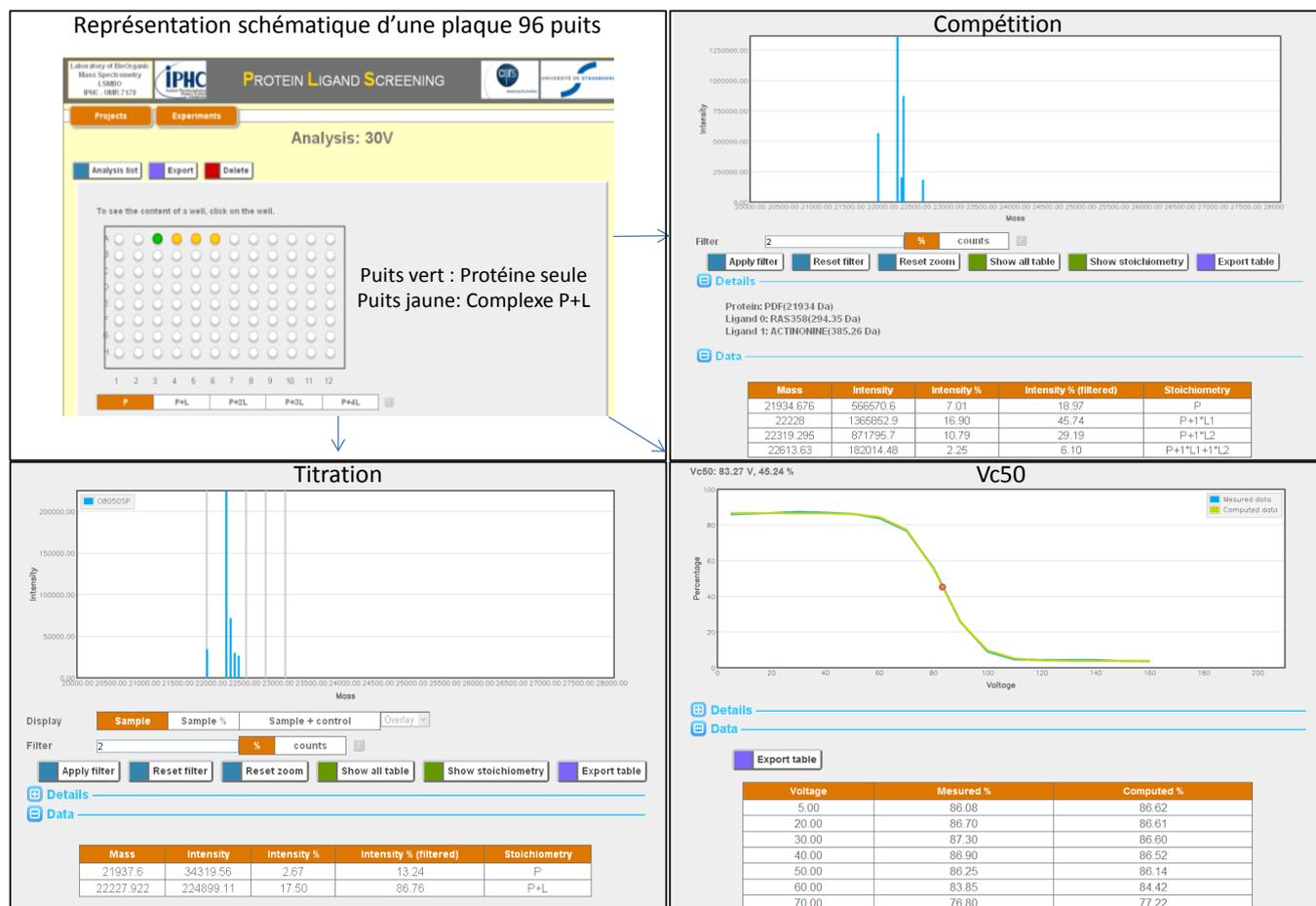


Figure 51: Présentation des fonctionnalités offertes par le logiciel *Protein ligand Screening* (équipe bio-informatique du LSMBO).

Toutefois, pour permettre une interprétation haut débit des données de criblage protéine/ligand, il est important de simplifier la génération des fichiers d'entrée de notre logiciel. Actuellement, cette étape limitante est réalisée par un logiciel commercial (Biopharmalynx, Waters). Le développement d'un outil plus adapté à la génération de spectre déconvolué devra être réalisé par notre équipe pour pouvoir offrir une suite logicielle complète pour le criblage de ligands à haut débit. Toutefois, il est important de rappeler que l'utilisation d'un logiciel d'aide à l'interprétation des données ne dispense pas d'un regard expert sur les données brutes acquises.

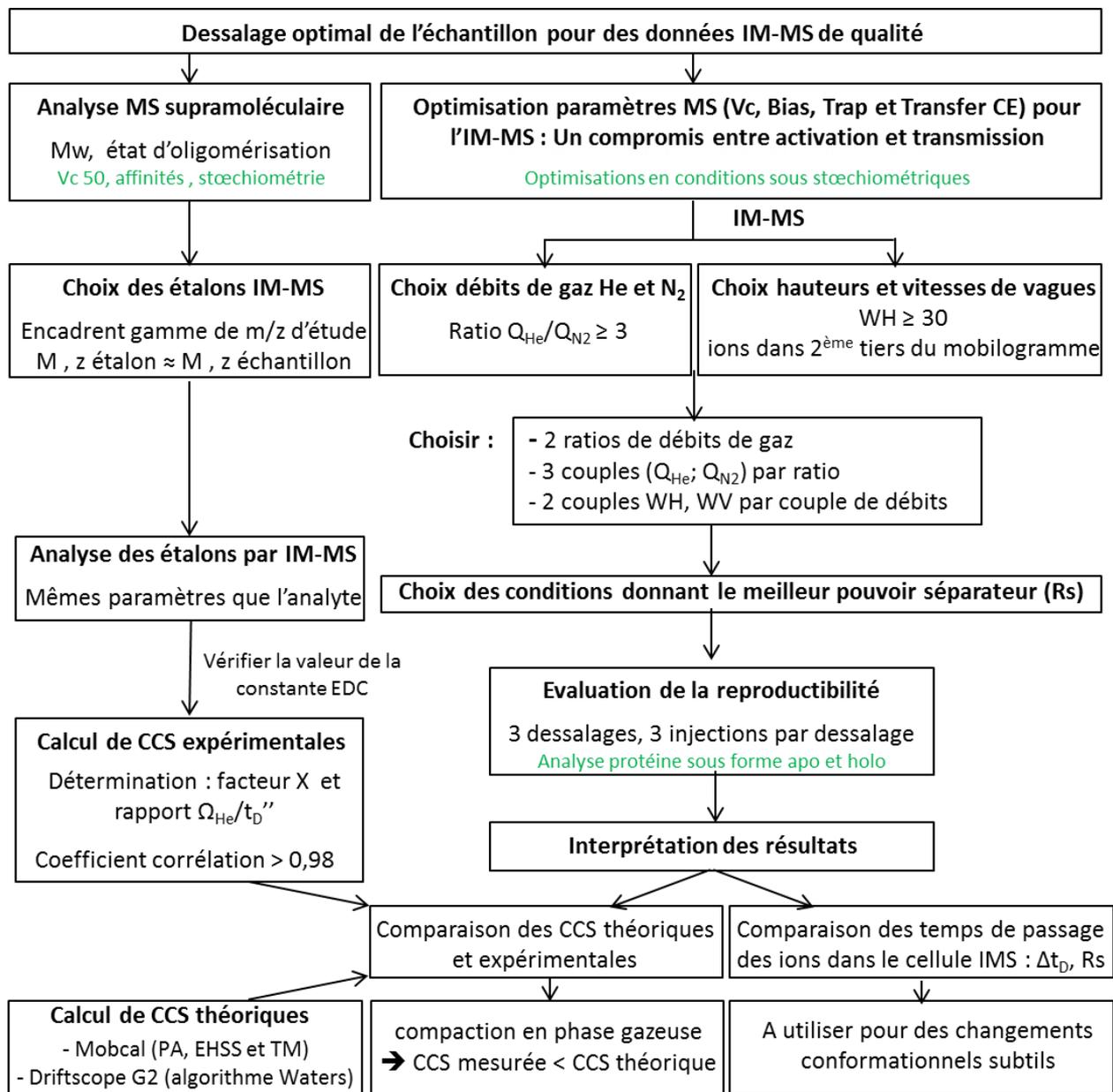
Afin de compléter les études de criblages de ligands par MS, une analyse systématique des changements conformationnels induits par la fixation des ligands pourrait être réalisée. Dans ce but,

nous nous sommes intéressés à l'étude de systèmes protéine/ligand par IM-MS. Nous avons ainsi pu montrer que ce type d'étude est possible et apporte une information cruciale lors du criblage de ligands. Toutefois, les temps d'optimisation et d'interprétation des données IM-MS rendent ce travail long et fastidieux. Ce travail de thèse a permis de simplifier l'étape d'optimisation qui est essentielle pour des études de qualité. Cependant pour que cette technique puisse être utilisée à haut débit, il faudra aussi réduire le temps d'interprétation. Le développement d'un nouvel outil bio-informatique sera donc nécessaire pour l'aide à l'interprétation des données de mobilité ionique.

## Conclusion de cette partie

Les développements méthodologiques réalisés lors de l'étude d'interactions protéine/ligands ont permis d'étendre le potentiel de la MS pour l'étude de complexes multiprotéiques impliquant des partenaires de natures différentes, mais aussi de montrer le rôle primordial du couplage IM-MS lors du criblage de ligands. L'étude des interactions existant au sein d'une protéine à doigt de zinc nous a permis de montrer l'importance de coupler des approches supramoléculaires à des approches protéomiques pour caractériser les sites d'interaction entre les atomes de zinc et les cystéines d'une protéine. D'autre part, ce travail de thèse a permis de montrer l'importance de suivre les cinétiques de formation de complexes protéine/ligands. En effet, il est ainsi possible de valider des modèles réactionnels grâce à la MS supramoléculaire. L'un des grands développements réalisés au cours de ce travail de thèse est l'introduction de l'IM-MS dans des études de criblages de ligands. En effet, une étude méthodique des différents paramètres IM-MS a permis de mettre en évidence des changements conformationnels subtils lors d'interactions protéine/ligands. L'étude du système PDF1B/ligands par IM-MS nous a permis de classer les 6 ligands à tester en fonction de leurs affinités pour la protéine PDF1B, mais aussi en fonction des changements conformationnels induits en présence de ligands. Le potentiel de l'IM-MS, mis en évidence lors de cette étude, fait de cette technique rapide et nécessitant de faibles quantités d'échantillons, un outil complémentaire des techniques biophysiques actuelles (cristallographie, RMN,..). L'IM-MS pourrait devenir une technique indispensable en amont des études structurales, s'affranchissant des problèmes de cristallisation et permettant de suivre la formation de complexe en temps réel. L'automatisation de l'interprétation des données IM-MS permettrait de développer cette technique à haut débit, offrant aux industriels pharmaceutiques un outil rapide et complet lors du criblage de ligands.

L'ensemble des optimisations en mobilité ionique réalisées au cours de ce travail de thèse nous a permis de déterminer un schéma d'optimisation à suivre lors du démarrage d'une étude IM-MS.





## *Partie 4 : Vers une information conformationnelle pour l'étude de complexes de très hauts poids moléculaires*

---

Cette partie a pour but de présenter des travaux préliminaires concernant l'étude de complexes de très hauts poids moléculaires (de plusieurs centaines à plusieurs millions de Da) par MS et IM-MS. L'objectif de cette étude est d'une part, d'optimiser la transmission d'édifices de très hauts poids moléculaires sur les instruments de dernière génération disponibles au laboratoire (Synapt G1 et G2 HDMS, Waters), mais aussi, d'évaluer le potentiel offert par le couplage IM-MS pour la caractérisation de tels complexes.

### **Chapitre 1 : Difficultés liées à l'analyse de complexes de hauts poids moléculaires**

### **Chapitre 2 : La mobilité ionique et l'analyse de complexes de très hauts poids moléculaires**

### **Chapitre 3 : Données préliminaires issues de l'analyse de Ribosomes par MS supramoléculaire**



## Chapitre 1 : Difficultés liées à l'analyse de complexes de hauts poids moléculaires

---

Les complexes de hauts poids moléculaires sont difficiles à caractériser du fait de leur hétérogénéité et de leur fonctionnement dynamique. Par conséquent, l'étude de ces complexes par des techniques biophysiques classiques reste encore un défi pour la biologie structurale. C'est dans ce contexte que la MS supramoléculaire a pu être utilisée pour la caractérisation de complexes de hauts poids moléculaires<sup>335</sup>. En effet, cette technique sensible (1 pmol/ $\mu$ L) et rapide permet d'analyser des complexes à leur niveau d'expression endogène<sup>336</sup>. Toutefois de nombreux problèmes restent liés à l'analyse de complexes de hauts (100-500 kDa) et de très hauts poids moléculaires (supérieurs à 500 kDa) par MS supramoléculaire<sup>102, 138, 142, 143, 237, 337</sup>.

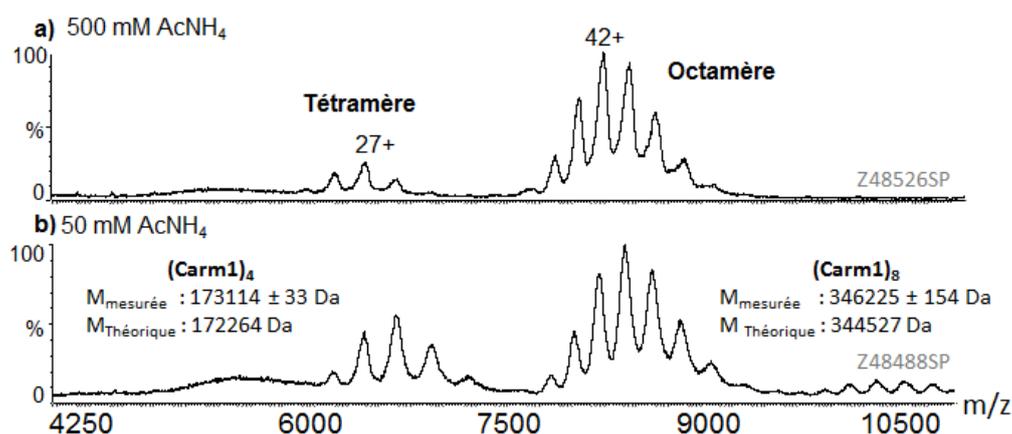
### 1 Les difficultés liées à l'analyse de protéines de hauts et très hauts poids moléculaires par MS ou IM-MS.

---

#### 1.1 Préparation de l'échantillon

---

L'une des premières étapes indispensables à l'analyse des protéines de hauts poids moléculaires est le dessalage des échantillons. En effet, la plupart de ces protéines sont produites dans des tampons à fortes forces ioniques et contenant des agents stabilisateurs (DTT, TCEP,  $\beta$ -mercaptoéthanol, EDTA, etc...) nécessaires à la stabilité des protéines en solution et au maintien de leur intégrité conformationnelle. Par exemple, la protéine chaperone GroEL nécessite la présence de chlorure de potassium, d'EDTA et d'ATP pour conserver son état d'oligomérisation tétradécamérique<sup>338</sup>. Ces agents non volatiles doivent être remplacés par des tampons compatibles avec les analyses ESI<sup>339, 340</sup> et dont la force ionique doit être choisie avec attention. En effet, lors de l'étude d'une protéine oligomérique, nous avons pu mettre en évidence que l'augmentation de la force ionique permettait de stabiliser la forme octamérique de la protéine (Figure 1). La force ionique doit donc être adaptée à chaque échantillon de manière à maintenir les interactions non-covalentes entre les protéines.

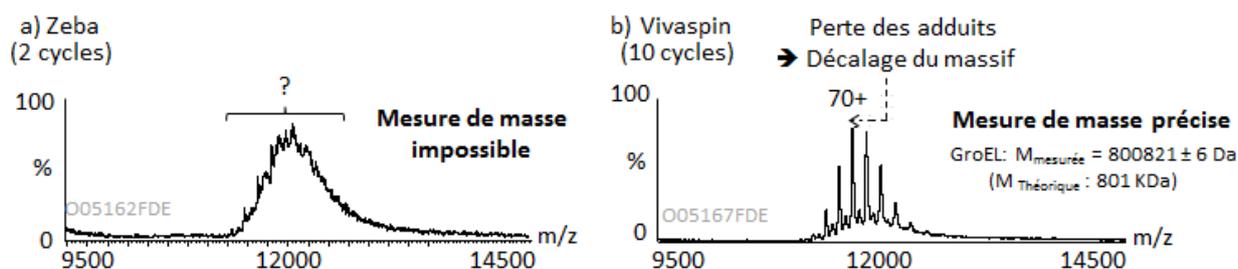


**Figure 1 : Effet de la force ionique du tampon d'échange sur la stabilité des complexes non-covalents en phase gazeuse.** Analyse d'une protéine multimérique à 50 ou 500 mM en acétate d'ammonium ( $V_c = 200V$ ,  $P_i = 6$  mbar).

Parmi les méthodes d'échange de tampon utilisées en MS, certaines semblent plus adaptées au dessalage de protéines de hauts et très hauts poids moléculaires.

En effet, nous avons pu montrer que le dessalage des anticorps (150 kDa) par filtration sur gel, sur des colonnes NAP-5 permettait d'obtenir des largeurs de pics à mi-hauteur plus faibles qu'avec un dessalage par filtration sur gel sur colonnes Zeba (Partie 2, Paragraphe 1.2).

De même, nous avons pu mettre en évidence lors du dessalage de la protéine chaperone GroEL (800 kDa) que 10 cycles de dessalage par ultrafiltration sur Vivaspin 2 mL permettaient d'éliminer les adduits présents sur cette protéine contrairement à un dessalage sur colonne Zeba (Figure 2). L'amélioration de la qualité du dessalage s'accompagne d'un décalage du massif vers les plus bas m/z ce qui correspond à la perte des adduits agrégés à la protéine. Ainsi, la masse exacte de cette protéine de 800 kDa a pu être déterminée après dessalage par ultrafiltration.

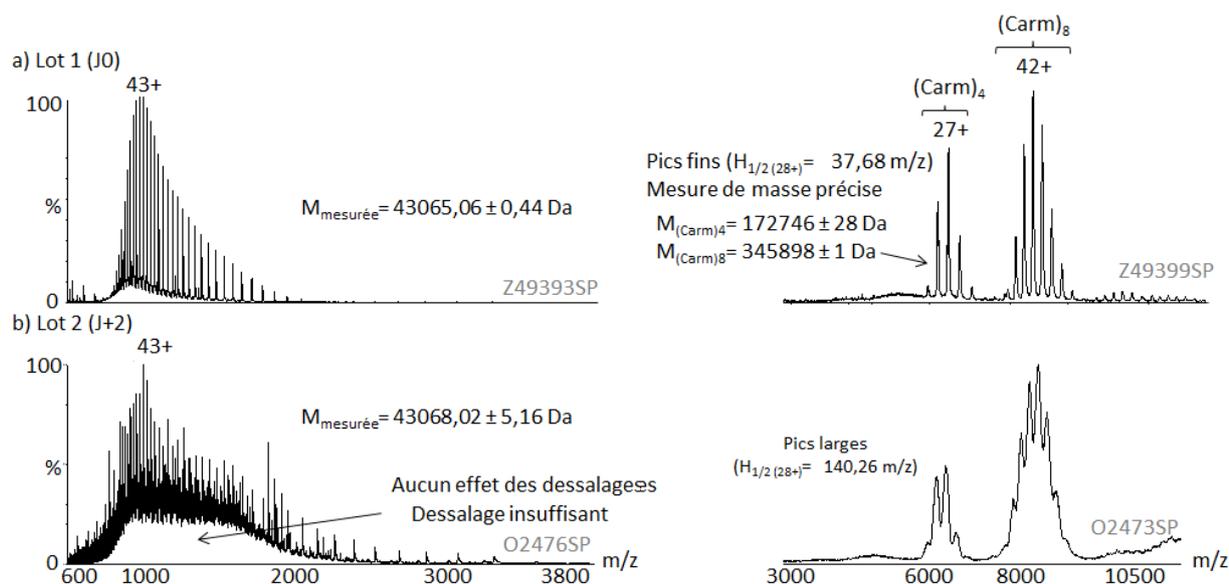


**Figure 2 : Effet de la méthode de dessalage sur la qualité des spectres de masse.** Analyse de la protéine GroEL en conditions natives (2  $\mu$ M) ( $V_{ESI} = 1.8$  kV,  $P_{ESI} = 0.8$  kV,  $V_c = 120V$ ,  $P_i = 7$  mbar). a) après 2 cycles de dessalage sur colonne Zeba, b) après 10 cycles de dessalage sur Vivaspin 2 mL.

Les échantillons traités au cours de ce travail de thèse nous ont ainsi permis d'établir qu'un dessalage par filtration sur gel sur colonne NAP est recommandé pour des protéines de hauts poids moléculaires (100-500 kDa), telles que les anticorps alors que pour des protéines de très hauts poids moléculaires (supérieures à 500 kDa), un dessalage par ultrafiltration est préconisé. Cette tendance a

notamment été retrouvée dans la littérature lors de l'étude de la protéine multimérique GroEL<sup>338</sup>, de l'étude d'Hémocyanine (2,2 M Da)<sup>337</sup> ou lors de l'étude de ribosomes (2,3 M Da)<sup>341</sup>.

L'un des autres paramètres à prendre en compte est la purification de l'échantillon. L'importance de ce paramètre a pu être mise en évidence lors de l'étude de 2 lots de protéine, purifiés dans un tampon contenant du chlorure de sodium (250 mM) et du  $\beta$ -mercaptoéthanol (2 mM), puis analysés par MS à J0 et à J+2 après dessalage (Figure 3).



**Figure 3 : Analyse de différents lots de la protéine mCarm1<sub>(130-507)</sub>.** Panel de gauche : analyse en conditions dénaturantes de la protéine mCARM1 ( $V_c=40\text{V}$ ,  $P_i=2\text{mbar}$ ), Panel de droite : analyse en conditions natives de la protéine mCARM1 ( $V_c=200\text{V}$ ,  $P_i=7\text{mbar}$ ).

L'analyse par MS en conditions dénaturantes des différents lots a permis de mettre en évidence la présence de contaminants dans le lot 2 contrairement au lot 1. De plus, le lot 2 présente un important bruit de fond caractéristique d'un mauvais dessalage. Toutefois, aucune des méthodes de dessalage couramment utilisées (filtration sur gel sur colonne Zeba et NAP ou ultrafiltration) n'a permis d'améliorer la qualité du spectre obtenu (Figure 3, panel de gauche, b). L'analyse de ces échantillons en conditions natives nous a permis de confirmer les résultats obtenus en conditions dénaturantes. En effet, contrairement au spectre obtenu pour le lot 2, celui obtenu pour le lot 1 permet de déterminer la masse du tétramère ( $M_{\text{mesurée}} = 172\,746 \pm 28 \text{ Da}$ ,  $M_{\text{théorique}} = 172\,264 \text{ Da}$ ) et de l'octamère ( $M_{\text{mesurée}} = 345\,898 \pm 1 \text{ Da}$ ,  $M_{\text{théorique}} = 344\,527 \text{ Da}$ ) de cette protéine. Les différences de masses observées entre la masse mesurée et la masse théorique proviennent au moins en partie d'une mauvaise désolvation des pics. Il est intéressant de noter que lorsque l'intervalle de temps entre la production de la protéine et l'analyse par MS est long, la qualité de l'échantillon est altérée. L'analyse de cette protéine multimérique nous a permis de montrer que la qualité des spectres de masse obtenus est dépendante de la qualité de la préparation de l'échantillon, mais aussi de l'intervalle de temps existant entre la purification et l'analyse par MS.

Nous avons ainsi pu constater que toutes ces notions de « préparation d'échantillons » (type de purification, stockage, type de dessalage, etc.) sont encore plus cruciales et déterminantes dans le cas de complexes de très hauts poids moléculaires.

## 1.2 Choix du mode d'ionisation

Les études réalisées sur les protéines de hauts poids moléculaires sont généralement effectuées grâce à des sources d'ionisation nanoESI. En effet, ce type d'ionisation permet d'utiliser de faibles quantités d'échantillons (1  $\mu\text{M}$ , 5-10  $\mu\text{L}$ ) et forme des petites gouttes permettant une meilleure efficacité d'ionisation contrairement aux sources d'ionisation ESI.

### a. Ionisation et désolvatation à l'aide d'aiguilles nanoESI

Lors de l'analyse de la protéine GroEL à l'aide d'aiguilles nanoESI, l'optimisation de la tension appliquée au niveau du capillaire a été particulièrement importante pour obtenir une bonne ionisation et désolvatation des protéines de très hauts poids moléculaires (Figure 4).

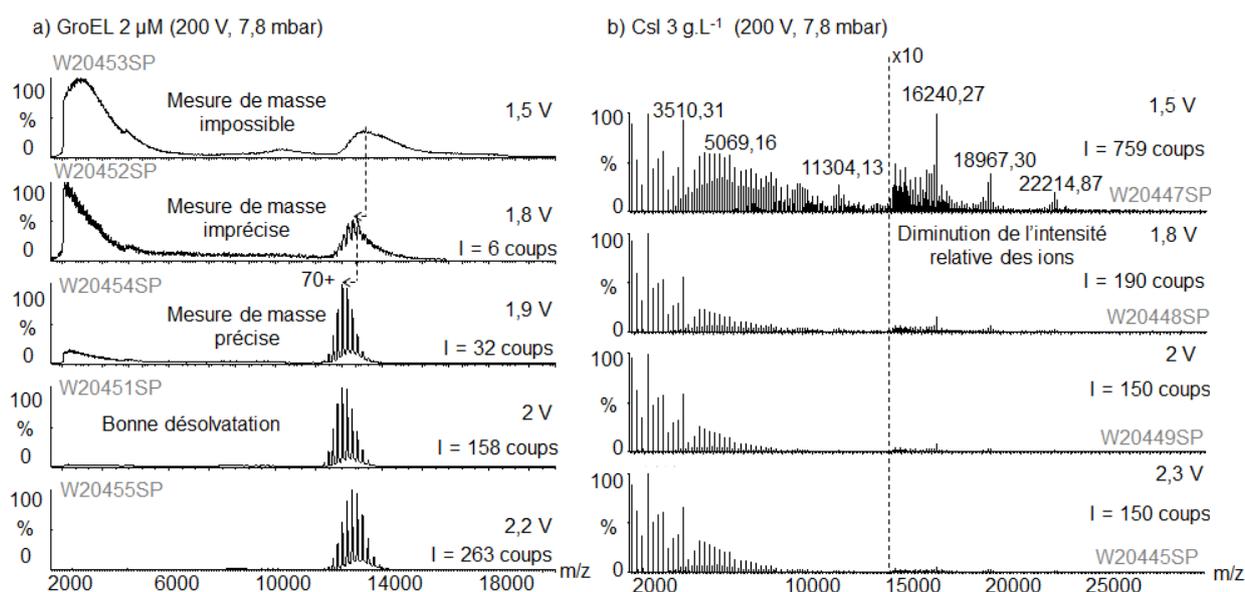


Figure 4 : Effet de la tension capillaire sur la désolvatation de la protéine GroEL et sur la transmission du CsI.

En effet, pour des tensions capillaires trop faibles (Figure 4, a), l'énergie fournie aux ions n'est pas suffisante pour permettre une désolvatation correcte de la protéine GroEL. Dans ces conditions, il n'est pas possible de distinguer les différents états de charge de la protéine étudiée. Lorsque la tension capillaire augmente, l'énergie transmise aux ions permet de rompre les interactions non-covalentes entre la protéine et les adduits présents sur la protéine. Ce qui se caractérise sur les spectres de masse par un décalage du massif observé dans la gamme des  $m/z$  (12 000-15 000) vers les plus bas  $m/z$  (11 000-13 000) et une diminution de la largeur des pics de masse à mi-hauteur (Figure 4). À partir de la tension capillaire 1,9 V, il est possible de distinguer les états de charge de la

protéine GroEL. Cependant nous observons encore des contaminants dans la gamme des  $m/z$  (500-4 000) ainsi que du bruit de fond au niveau de la protéine GroEL contrairement à une tension capillaire de 2 V.

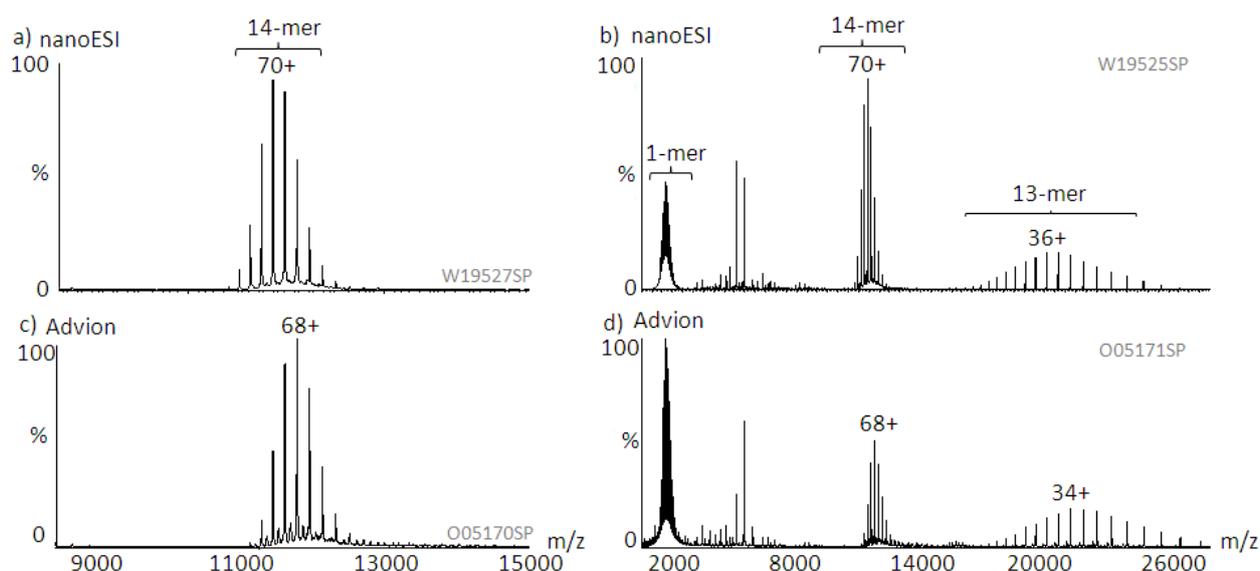
Dans un second temps, nous avons étudié l'effet de la tension capillaire sur la transmission des ions lourds du CsI ( $> 15\ 000\ m/z$ ). Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une augmentation de la tension d'accélération conduit à une diminution de la transmission des ions lourds comme le montrent les intensités relatives des ions dans la gamme des  $m/z$  (15 000-30 000) (Figure 4, b).

Par conséquent, en mode d'ionisation nanoESI avec des aiguilles nanospray, il est important d'optimiser correctement la tension capillaire pour permettre une bonne désolvatation des protéines étudiées sans pour autant entraîner une diminution de la transmission des ions.

### b. Comparaison des sources nanoESI en aiguilles ou sur puces microfluidiques

Bien que les aiguilles nanoESI permettent d'obtenir des spectres de masse lors de l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires, des différences d'efficacité d'ionisation peuvent être observées entre ces dernières dont la géométrie et la taille sont variables<sup>342</sup>. Par conséquent, des systèmes d'injection automatisés tels que le Triversa Nanomate (Advion Biosciences) ont été commercialisés assurant la reproductibilité de l'obtention d'un spray ainsi que sa stabilité<sup>343</sup>.

Afin de pouvoir comparer ces deux systèmes d'ionisation, nous avons réalisé l'étude de la protéine GroEL, sur une source nanoESI classique couplée au Synapt HDMS G1 et une source Triversa Nanomate (Advion Biosciences) couplée au Synapt HDMS G2 (Figure 5).



**Figure 5: Comparaison des sources d'ionisation nanoESI en aiguilles (a, b) ou sur puce microfluidique (c, d).** Analyse de la protéine GroEL dessalée par 10 cycles d'ultrafiltration (Vivaspin 2 mL) dans un tampon acétate d'ammonium 200 mM pH 6,8 en conditions natives ( $P_i = 7\ mbar$ , (a, c)  $V_c = 80V$ , (b, d)  $V_c = 200V$ ).

Cette protéine sous forme trétradécamérique en conditions natives ( $800\,893 \pm 11$  Da), se caractérise sur les spectres de masse par des états de charge compris dans la zone des  $m/z$  (11 000-12 600). La présence d'une protéine contaminante de  $76\,447 \pm 4$  Da a aussi été mise en évidence dans la zone des bas  $m/z$  (4 000-6 000). La comparaison des analyses de la protéine GroEL en conditions natives avec des aiguilles nanoESI ou sur puce nanoESI nous a permis de remarquer une différence de distribution des états de charge en fonction de la source d'ionisation. En effet, une diminution des états de charge majoritaires est observée lorsque l'on passe de la source nanoESI (70+) (Figure 5, a) à la puce nanoESI (68+) (Figure 5, c). Ce décalage des états de charge aurait pour origine les différences de débits et de tailles de gouttelettes chargées produites par les différentes sources<sup>135</sup>.

L'analyse de cette protéine dans des conditions plus énergétiques nous a permis de mettre en évidence une dissociation asymétrique du 14-mer avec l'éjection d'un monomère (Figure 5, c et d). Cette dissociation nous a permis de montrer que quelle que soit la source d'ionisation utilisée, les différents états de charge du 13-mer compris dans la zone des  $m/z$  (18 000-28 000) sont observables.

L'analyse de cette protéine modèle ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence entre les sources d'ionisation testées. Toutefois, il est important de noter que l'analyse sur puce microfluidique permet d'obtenir rapidement un spray stable contrairement à l'analyse en aiguilles nanoESI.

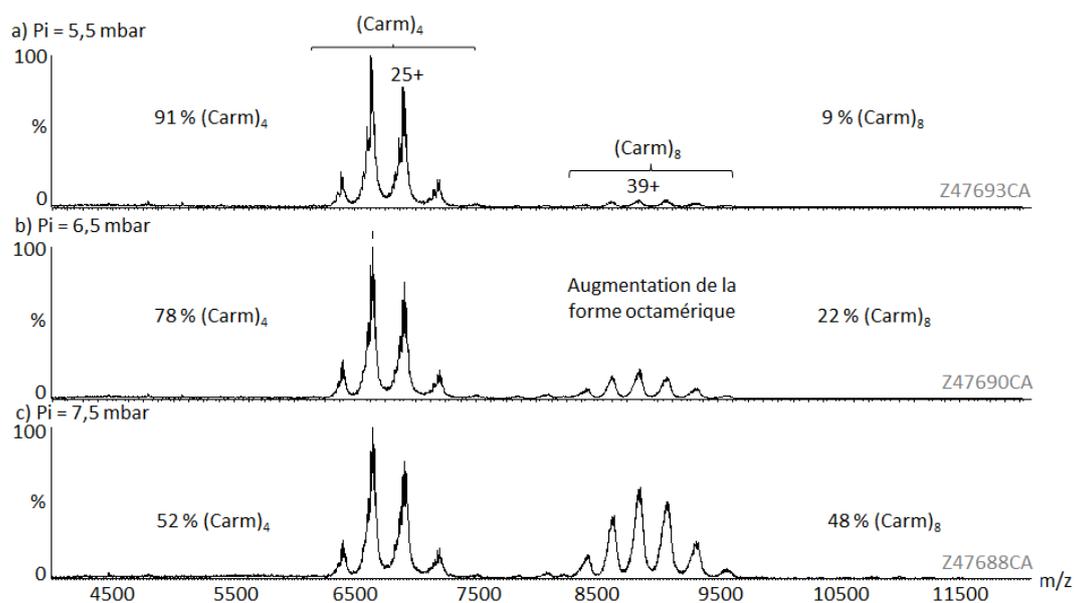
### 1.3 Transmission des ions de $m/z$ élevés sur les Synapt G1 et G2

---

#### a. Effet de la pression dans l'interface

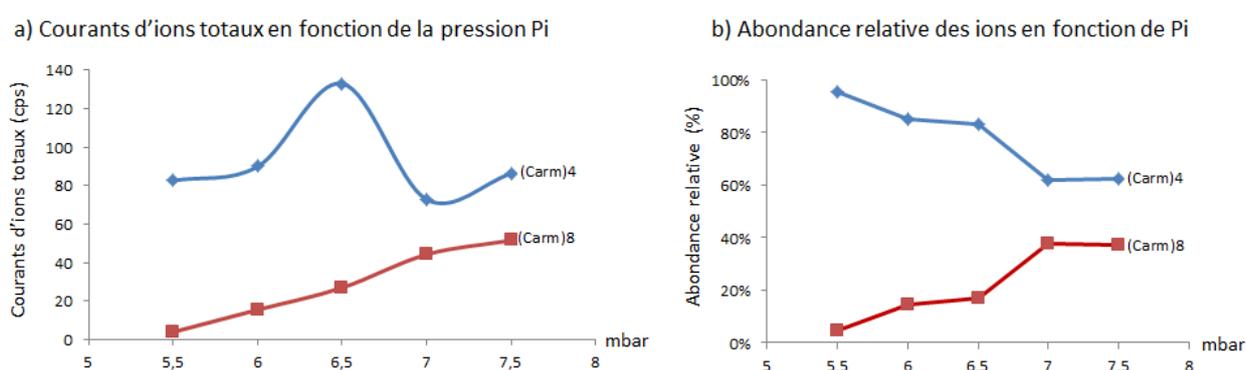
Comme cela a précédemment été décrit dans la deuxième partie de ce travail, l'optimisation de la pression dans l'interface est indispensable lors de l'analyse de protéines en conditions natives<sup>138, 142, 143, 344</sup> et plus particulièrement, dans le cas des protéines de hauts poids moléculaires. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la pression permet une meilleure thermalisation des ions<sup>138</sup> et a un effet sur la détection des ions suivant leurs rapports  $m/z$ <sup>142</sup>.

Afin de mettre en évidence l'effet de la pression sur des protéines de hauts poids moléculaires, nous avons observé l'effet de ce paramètre sur la transmission d'une protéine sous forme de tétramère (172 kDa) ou d'octamère (345 kDa) (Figure 6). Cet exemple nous a permis de montrer qu'une augmentation de la pression se caractérise sur les spectres de masse par une augmentation de la forme octamérique de cette protéine (Figure 6, c).



**Figure 6 : Effet de la pression dans l'interface sur la transmission des ions de hauts rapports m/z.** Analyse de la protéine Carm dessalée 2 fois par filtration sur gel et diluée à 60  $\mu$ M. ( $V_c = 200V$ ).

La forme tétramérique de la protéine est toujours présente quelque soit la pression utilisée cependant, l'intensité du signal varie en fonction de la pression dans l'interface. L'intensité optimale des signaux du tétramère est observée pour une pression de 6,5 mbar contrairement à l'octamère où l'intensité des signaux est maximale à 7,5 mbar (Figure 7, a). Les abondances relatives du tétramère et de l'octamère varient aussi en fonction de la pression dans l'interface (Figure 7, b). En effet, l'abondance relative du tétramère diminue lorsque la pression augmente au profit de l'abondance relative de la forme octamérique. Cette observation montre qu'il faut être conscient de l'effet de la pression sur l'abondance relative des différentes espèces en phase gazeuse lors de l'interprétation de spectres de masse.



**Figure 7 : Effet de la pression sur les abondances relatives de deux états d'oligomérisation détectés par ESI-MS.** a) Représentation des courants d'ions totaux correspondants au tétramère (Carm)<sub>4</sub> ou à l'octamère (Carm)<sub>8</sub> de la protéine Carm en fonction de la pression dans l'interface. b) Abondances relatives des ions correspondants au tétramère ou à l'octamère en fonction de la pression dans l'interface. ( $V_c = 200V$ ).

Étant donné que l'augmentation de la pression dans l'interface permet de réduire la dissociation des espèces en phase gazeuse et qu'elle permet d'augmenter la transmission des ions de rapports m/z

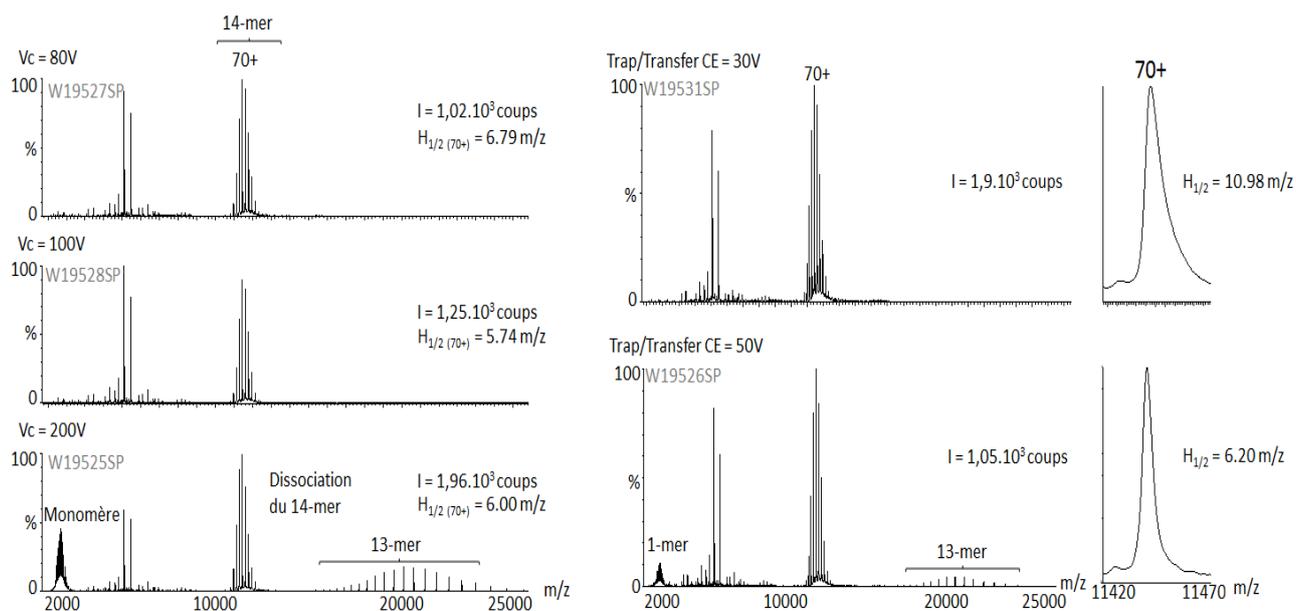
élevés, il est difficile de relier les abondances relatives des différentes espèces présentes sur les spectres de masse aux abondances de ces dernières en solution.

La pression joue aussi un rôle sur la désolvatation des ions. En effet, comme cela a été présenté précédemment, l'augmentation de la pression peut s'accompagner d'une augmentation de la largeur des pics de masse à mi-hauteur. Il est donc important d'en tenir compte lors de l'optimisation des paramètres instrumentaux, car une bonne désolvatation des ions est nécessaire pour déterminer des masses précises.

Sur les instruments de type Synapt, il est possible de faire varier la pression dans d'autres parties de l'instrument et notamment dans la cellule *Triwave*. Au cours de notre étude sur les protéines de hauts poids moléculaires, nous avons mis en évidence le rôle particulier du gaz présent dans la cellule *Trap*. Sur le Synapt HDMS G2, le débit de gaz dans la partie *Trap* est de 2 mL.min<sup>-1</sup> en utilisation classique. Toutefois, ce débit doit être compris entre 5 et 7 mL.min<sup>-1</sup> pour augmenter la transmission des ions de hauts rapports m/z. De même que pour la pression dans l'interface, il existe un optimum de transmission des ions pour une pression donnée.

### b. Effet des potentiels d'accélération $V_c$ , Trap CE et Transfer CE.

Les différentes tensions d'accélération existantes au sein des spectromètres de masse ont pour rôle de fournir l'énergie nécessaire à la transmission des ions au sein de l'instrument. Toutefois, ces énergies doivent être maîtrisées pour éviter la dissociation des complexes non-covalents en phase gazeuse. La Figure 8 présente l'effet des tensions d'accélération  $V_c$  et Trap/Transfer CE sur la détection de la protéine GroEL.



**Figure 8 : Effet des tensions d'accélération  $V_c$  et Trap/Transfer CE sur la protéine GroEL en conditions natives.** Panel de gauche : Effet de la tension d'accélération  $V_c$ , Panel de droite : effet des paramètres Trap/Transfer CE (agrandissement de l'ion 70+).

Lorsque la tension d'accélération  $V_c$  augmente de 80 à 100 V, une diminution de la largeur du pic à mi-hauteur de l'ion 70+ est observée ( $H_{1/2\ 80V} = 6.79$  m/z,  $H_{1/2\ 100V} = 5.74$  m/z). Toutefois, pour des valeurs de  $V_c$  plus élevées, une dissociation du complexe est observée. De même, l'augmentation des paramètres Trap/Transfer CE de 30 à 50 V a permis de diminuer la largeur du pic à mi-hauteur de l'ion 70+ ( $H_{1/2\ 30V} = 10.98$  m/z,  $H_{1/2\ 50V} = 6.20$  m/z). Cependant à 50 V, la dissociation du 14-mer de la protéine GroEL est observée.

Les tensions d'accélération appliquées au sein du spectromètre de masse permettent d'améliorer la désolvatation des ions en phase gazeuse, mais aussi la transmission des ions. En effet, une augmentation de l'intensité du signal est observée pour des valeurs de tensions plus élevées (Figure 8, Panel de gauche). Toutefois, des valeurs trop élevées peuvent entraîner la dissociation des complexes non-covalents en phase gazeuse.

### c. Rôle du Quadripôle dans la transmission des ions (*Quad Profile*)

Les guides d'ions présents au sein des spectromètres de masse ont pour but de confiner les ions, de manière à les transmettre efficacement jusqu'au détecteur. Le quadripôle est un guide d'ions qui ne permet pas de transmettre les ions avec la même efficacité sur une large gamme de rapports m/z. Par conséquent, nous avons étudié l'effet de ce paramètre sur la transmission des hauts rapports m/z du CsI (Figure 9). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence qu'en mode d'ionisation « *AutoProfile* », la transmission des ions est maximale dans les bas m/z et diminue progressivement (Figure 9, a). Au contraire, une optimisation du *Quad Profile*, permet de déplacer la fenêtre de transmission des ions vers les hauts rapports m/z. Cependant, une diminution de la transmission des faibles rapports m/z est observée dans la gamme de m/z (500-3000) <sup>102, 345, 346</sup>.

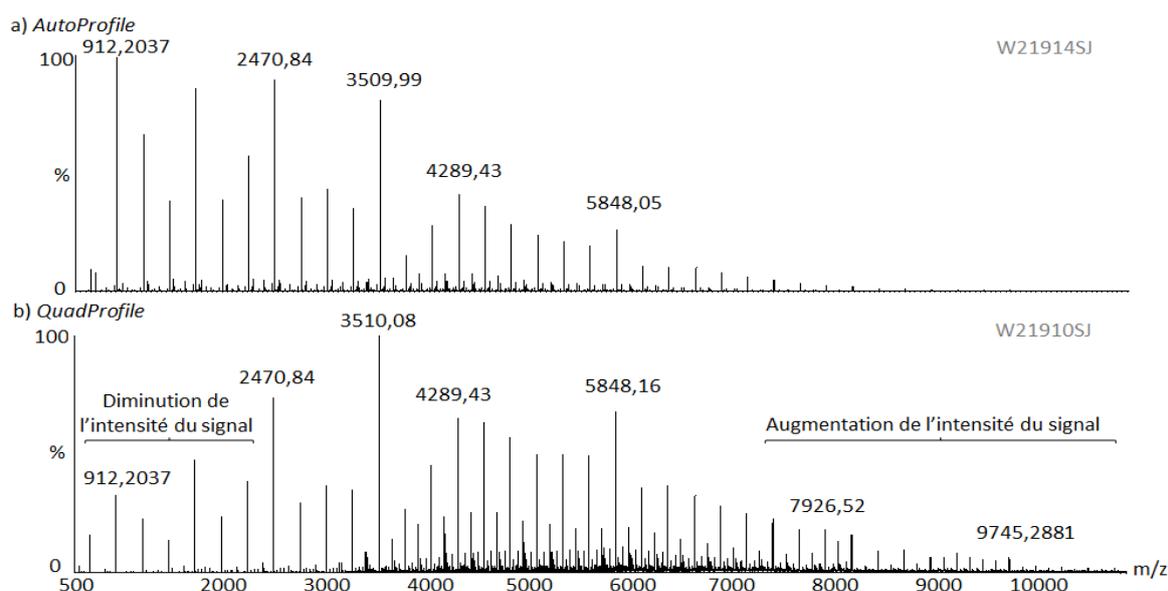


Figure 9: Mise en évidence de l'effet du *Quad Profile* sur la transmission des ions. Analyse du CsI 3 g.L<sup>-1</sup> dans un mélange eau/isopropanol 50/50 sur le Synapt HDMS G1 ( $V_c = 200V$ ,  $P_i = 7mbar$ ). a) AutoProfile b) QuadProfile (2000/4000/8000 : 5/5/20).

Par conséquent, l'effet du *Quad Profile* doit être pris en compte lors de la détermination des abondances relatives des différentes espèces présentes sur les spectres de masse.

Pour permettre de transmettre les ions sur une large gamme de rapports  $m/z$ , il convient donc d'utiliser le mode *Quad Profile* du quadripôle permettant de balayer plusieurs valeurs de tensions  $V$ . Ce mode de transmission sera utilisé dans la suite de ce chapitre pour permettre l'étude de complexes de hauts poids moléculaires.

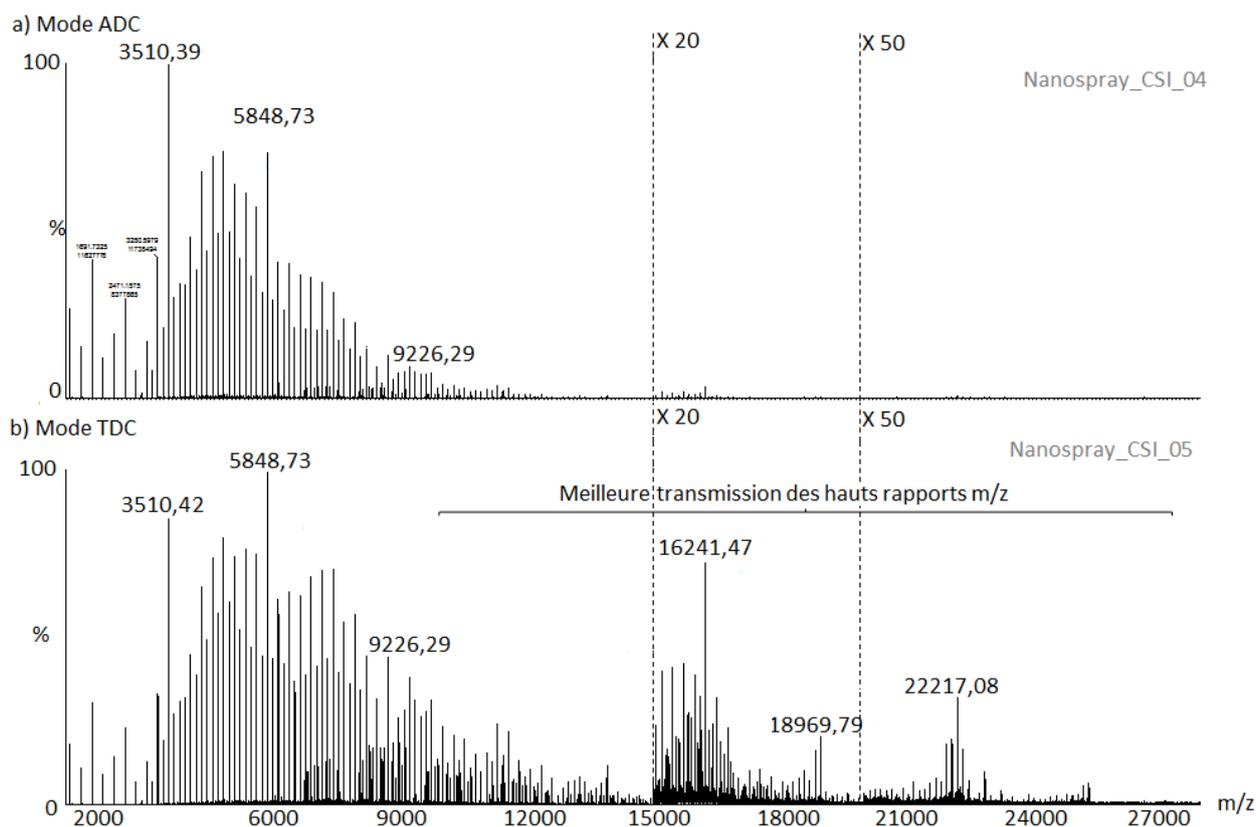
#### d. Rôle du *Pusher Cycle Time* dans la transmission des ions

Lors de l'étude de protéines de hauts poids moléculaires, l'intervalle de temps entre chaque envoi des ions dans le tube de vol est augmenté. En effet, cet intervalle appelé aussi « *Pusher Cycle Time* » est fonction de la gamme de  $m/z$  observée. Plus un rapport  $m/z$  est élevé, plus le temps mis par les ions pour atteindre le détecteur est long. Par conséquent, pour permettre aux ions de rapports  $m/z$  élevés d'atteindre le détecteur avant l'envoi d'un nouveau paquet d'ions, la fréquence de pulsation du *pusher* doit être diminuée.

### **1.4 Importance des modes de détection et de digitalisation pour l'étude des protéines de hauts poids moléculaires**

Les instruments de type Q-TOF (Waters) utilisés traditionnellement pour l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires (QTOFII et Synapt G1) disposent d'un détecteur de type MCP couplé à un digitaliseur de type TDC. Toutefois, l'utilisation des instruments de type Q-TOF pour l'analyse protéomique a conduit les constructeurs à équiper les instruments de nouvelle génération (Synapt G2) de détecteurs de type MagnéTof couplés à des digitaliseurs de type ADC ou TDC.

L'analyse de différents échantillons biologiques en conditions natives sur le Synpat G2, nous a permis de mettre en évidence que le mode de digitalisation doit être adapté à la gamme de masse étudiée. En effet, pour des protéines de bas poids moléculaires (8-40 kDa), l'utilisation du mode ADC permet d'obtenir de meilleurs rapports signaux/bruits dans la gamme des  $m/z$  (500-6000). Par contre, lorsque l'étude porte sur des protéines de plus hauts poids moléculaires (100 kDa et plus), il est préférable d'utiliser le mode de digitalisation TDC qui permet d'obtenir des meilleurs rapports signaux/bruits dans la gamme des  $m/z$  (6 000-30 000). Ainsi, lors de l'étude de la transmission du CsI sur le Synapt HDMS G2, nous avons pu mettre en évidence une meilleure observation des ions dans la gamme des  $m/z$  (15 000-30 000) avec le mode TDC par rapport au mode ADC (Figure 10).



**Figure 10: Effet du mode de digitalisation sur la transmission des ions.** Analyse du CsI 3 g.L<sup>-1</sup> dans un mélange eau/isopropanol 50/50 sur le Synapt HDMS G2 (V<sub>c</sub>=200V, P<sub>i</sub> =7mbar). a) Analyse en mode de digitalisation ADC b) Analyse en mode de digitalisation TDC.

Ces observations s'expliquent notamment par le fait que les signaux correspondants aux protéines de hauts poids moléculaires sont souvent peu intenses. En mode ADC, les ions détectés étant tous intégrés pour fournir un spectre de masse, les ions de hauts rapports m/z peu intenses peuvent être confondus avec ceux du bruit de fond. Au contraire, en mode de digitalisation TDC, seuls les ions dont l'intensité du signal est supérieure à un certain seuil seront intégrés. Par conséquent, de meilleurs rapports signaux/bruits seront obtenus pour des protéines de hauts poids moléculaires.

## 1.5 Problématique liée à l'interprétation des spectres MS de ces protéines

### 1.5.1 Étalonnage pour les protéines de hauts et très hauts poids moléculaires

Lors de l'analyse de protéines de bas poids moléculaires (< 40 kDa), l'étalonnage du spectromètre de masse dans la gamme des m/z (500-3 000) s'effectue à l'aide des ions multichargés de la myoglobine de cœur de cheval en conditions dénaturantes (2 pmol/μL, V<sub>c</sub> = 40 V, P<sub>i</sub> = 2 mbar). L'utilisation de cet étalon pour des ions de m/z plus élevés conduit à des erreurs de masses importantes. Il est donc nécessaire d'utiliser un étalon produisant des ions dans la gamme des m/z (3 000-22 000). Le CsI répond à ce critère en formant en solution des ions monochargés de type

$Cs_{(N+1)}I_N$ . Contrairement à la myoglobine, l'analyse du CsI s'effectue à une pression de 7 mbar et une tension d'accélération de 200 V. De plus, pour obtenir une mesure de masse précise pour de hauts rapports m/z, il est nécessaire de réaliser un lissage du spectre de masse du CsI sur une fenêtre de m/z élevés (entre 30 et 50 m/z) avant de procéder à l'étalonnage.

### 1.5.2 Calculs de masse pour des protéines de hauts poids moléculaires

#### a. Problème lié à la largeur des pics des complexes de hauts poids moléculaires

Lors de l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires par MS supramoléculaire, les pics de masse détectés présentent des largeurs à mi-hauteur importantes. Cet élargissement est différent en fonction de la complexité de l'échantillon biologique et peut être dû à un manque de désolvation des ions et/ou à un dessalage insuffisant de l'échantillon biologique. Une des conséquences de l'élargissement des pics de masses est la difficulté à déterminer une masse précise voire même à identifier les états de charge observés.

#### b. Stratégie utilisée pour le calcul de la masse des protéines de hauts poids moléculaires

Le calcul de la masse des protéines de hauts poids moléculaires reste complexe notamment à cause de la détermination des états de charge correspondants à chacun des pics observés sur le spectre de masse ESI. Par conséquent, il est important de respecter certaines règles lors de la détermination de masses de très hauts poids moléculaires :

- Additionner assez de spectres de masse pour augmenter le rapport signal/bruit.
- Soustraire le bruit de fond des spectres
- Lisser les spectres de masse en fonction de la largeur des pics de masse à mi-hauteur
- Déterminer les états de charge des pics de masse observés sur le spectre ESI-MS.
- Mesure des masses à partir des rapports m/z observés et des états de charge choisis.

#### c. Détermination des états de charge sur un spectre de masse ESI-MS

La détermination des états de charge est une étape importante qui nécessite une attention particulière. En effet, pour une détermination manuelle des états de charge, il faut :

- Lister les rapports m/z observés sur le spectre ESI-MS
- Attribuer un état de charge pour un rapport m/z donné
- Déterminer la masse et la déviation standard associée à chaque rapport m/z
- Renouveler la dernière étape en attribuant un nouvel état de charge pour le rapport m/z initialement choisi.

L'attribution des états de charge est validée lorsque la plus faible déviation standard est observée. Dans certains cas, la déviation standard minimale est difficile à déterminer. Par conséquent, il est possible d'utiliser un programme de déconvolution tel que *Maxent* (Waters) pour faciliter l'interprétation des spectres. La comparaison des masses obtenues avec le programme *Maxent* à celles obtenues manuellement permet d'aider à la détermination des états de charge les plus probables pour une série d'ions.

Les difficultés liées à la détermination des états de charge a conduit plusieurs équipes de recherche à proposer des outils d'aide à l'identification des états de charge<sup>339, 347-349</sup>. Il a ainsi pu être montré qu'il existait une relation entre la masse d'une protéine et la largeur des pics à mi-hauteur observée sur les spectres ESI-MS, indépendante de l'instrument utilisé<sup>339</sup>. De plus, il a été mis en évidence que la masse calculée à partir d'un rapport m/z diminue lorsque la charge de l'ion augmente. Par conséquent, Tseng *et al.*, ont proposé un outil d'attribution automatique des états de charge pour des protéines de hauts poids moléculaires mêmes avec des résolutions spectrales de l'ordre de 1 000<sup>349</sup>.

#### d. Validation du calcul de masses de très hauts poids moléculaires

Bien qu'il soit difficile de déterminer la masse précise de protéines de très hauts poids moléculaires, il est possible de déterminer l'état d'oligomérisation de la protéine ou la stœchiométrie d'interaction entre la protéine et son partenaire si la déviation standard observée est inférieure à la masse des différents partenaires du complexe.

Toutefois, dans le cas de complexes impliquant différents partenaires de natures différentes, il est difficile de mettre en évidence la perte d'un partenaire lorsque la largeur des pics et la déviation standard sont trop importantes.

#### e. Logiciels d'aide à l'interprétation des spectres de protéines de très hauts poids moléculaires

Il existe de nombreux logiciels commerciaux permettant de déterminer la masse de petites protéines, mais ces derniers ne sont pas adaptés pour l'analyse de protéines de très hauts poids moléculaires. C'est pourquoi, depuis quelques années, des logiciels facilitant l'interprétation des spectres lors de l'analyse de protéines de très hauts poids moléculaires ou de mélanges très complexes ont été développés.

Pour l'analyse de mélanges protéiques, il est possible d'utiliser le logiciel de déconvolution *Maxent*<sup>350, 351</sup>. Cette approche utilise un algorithme d'entropie maximum pour déterminer la masse d'un composé sur un spectre. De bons résultats peuvent être obtenus pour des petites molécules et des protéines individuelles. Cependant, cette approche devient problématique pour des spectres plus

complexes, avec des pics plus larges ou lorsque les états de charge des différentes espèces se recouvrent.

Le logiciel *Summit* développé par Taverner *et al.*<sup>233</sup> permet, à partir des masses des partenaires d'un complexe, d'identifier les différents partenaires présents sur un spectre de masse et de déterminer les partenaires en interaction. Toutefois, ce logiciel ne peut être utilisé que si les différents partenaires du complexe sont connus.

Afin de pouvoir interpréter des spectres plus complexes avec des pics larges, l'équipe de Robinson *et al.*<sup>352</sup> a développé le logiciel *Massign*. Ce logiciel permet d'interpréter de manière automatique ou semi-automatique des spectres de masse complexes avec des pics larges et des états de charge qui se recouvrent. Pour cela, il réalise une recherche itérative des états de charge permettant d'obtenir une déviation standard minimale, puis compare des spectres simulés à des spectres expérimentaux. Afin d'affiner la mesure de masse, le logiciel prend en compte les différents problèmes liés à l'analyse de mélanges complexes et de protéines de hauts poids moléculaires : simulation des adduits fixés de manière non-covalente, prise en compte de la largeur des pics et du chevauchement des états de charges.

Ces logiciels récemment mis à la disposition de la communauté scientifique devront être évalués lors du calcul de masses de complexes de très hauts poids moléculaires.

## 1.6 Conclusion

---

Lors de l'analyse de complexes de très hauts poids moléculaires par ESI-MS, la préparation des échantillons ainsi que les paramètres d'interface du spectromètre de masse sont très importants. En effet, les tensions d'accélération entre la source et l'analyseur ainsi que la pression dans l'interface sont des paramètres cruciaux pour l'ionisation et la transmission des ions à hauts rapports  $m/z$ . Ils doivent donc être correctement ajustés, en fonction de l'échantillon biologique analysé, pour permettre une bonne désolvatation et une bonne transmission des ions sans pour autant rompre les interactions non-covalentes au sein des complexes.

Cette première partie de notre étude ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence entre l'ionisation nanoESI en aiguilles nanospray ou sur puces microfluidiques lors de l'étude d'une protéine modèle. Cette étude nous a aussi permis de montrer les rôles du *Quad Profile* et du système de digitalisation de type TDC sur la transmission et la détection des ions de hauts rapports  $m/z$ .

Cette partie a aussi été l'occasion de mettre en avant les problèmes liés à la mesure de masse de protéines de hauts poids moléculaires tels que la largeur des pics de masse, la difficulté d'attribuer un état de charge à un rapport  $m/z$  élevé ainsi que le recouvrement des états de charge.

## 2 Comparaison des Synapt G1 et G2 pour l'analyse de complexes de très hauts poids moléculaires

Avant de débiter l'étude de protéines de très hauts poids moléculaires au sein du laboratoire, nous avons souhaité évaluer la transmission des ions de hauts rapports  $m/z$  sur les instruments de dernières générations : les Synapt HDMS G1 et G2.

Afin de pouvoir analyser correctement ce type de protéines, il est indispensable de déterminer si l'instrument utilisé est capable de transmettre et de détecter correctement les protéines de hauts poids moléculaires. Pour cela, seuls deux échantillons, disponibles commercialement en grande quantité, peuvent servir de référence et sont systématiquement analysés par MS supramoléculaire : le CsI et la protéine GroEL. En effet, le CsI va nous permettre de vérifier la capacité de notre instrument à transmettre des ions lourds, mais aussi d'étalonner notre instrument pour la mesure de protéines de hauts et très hauts poids moléculaires. La protéine GroEL va nous permettre d'optimiser les conditions de désolvatation et de transmission pour des complexes biologiques macromoléculaires.

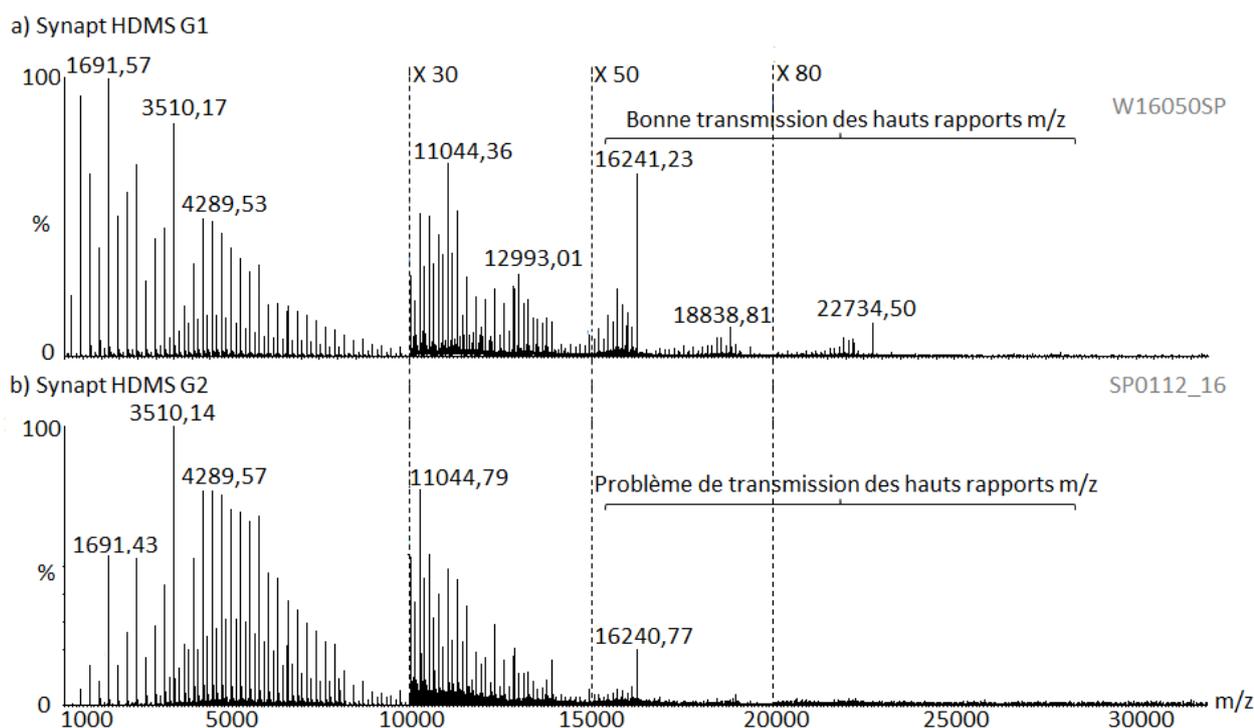
### 2.1 Étude du CsI par MS supramoléculaire

Afin de pouvoir comparer la transmission des ions sur ces deux instruments, nous les avons couplés à une source d'ionisation nanoESI. L'évaluation de la transmission des ions de hauts poids moléculaires a ensuite été réalisée à l'aide du CsI. Les paramètres de transmission ( $V_c$ ,  $P_i$ , Bias, Trap et Transfer CE, *Quad Profile*) des ions de hauts rapports  $m/z$  ont été optimisés sur ces deux instruments avant de comparer les spectres de masse obtenus.

L'analyse du CsI nous a permis d'observer sur le Synapt G1 des ions dans la zone des  $m/z$  (500-10 000) alors que sur le Synapt G2, la gamme de transmission est optimale dans la zone des  $m/z$  (3 000-8 000). Les abondances relatives des ions dans la gamme de  $m/z$  (15 000-30 000) sont plus élevées sur le Synapt G1 que sur le Synapt G2 suggérant une meilleure transmission des ions sur l'instrument d'ancienne génération. De plus, l'observation des spectres dans la zone des  $m/z$  (15 000-30 000) nous a permis de mettre en évidence, sur le Synapt HDMS G1, la présence de l'ion  $m/z$  22 734 (Figure 11, a) correspondant à la forme  $C_{88}I_{87}$ . Au contraire, cet ion n'a pas pu être mis en évidence sur le Synapt HDMS G2 (Figure 11, b).

L'ensemble de ces observations suggère donc que le Synapt HDMS G2 permet une moins bonne transmission et/ou détection des ions de hauts rapports  $m/z$  que le Synapt HDMS G1.

Ces expériences ont conduit à de nombreuses discussions avec le constructeur afin de pouvoir le convaincre des problèmes de transmission observés sur le Synapt HDMS G2.

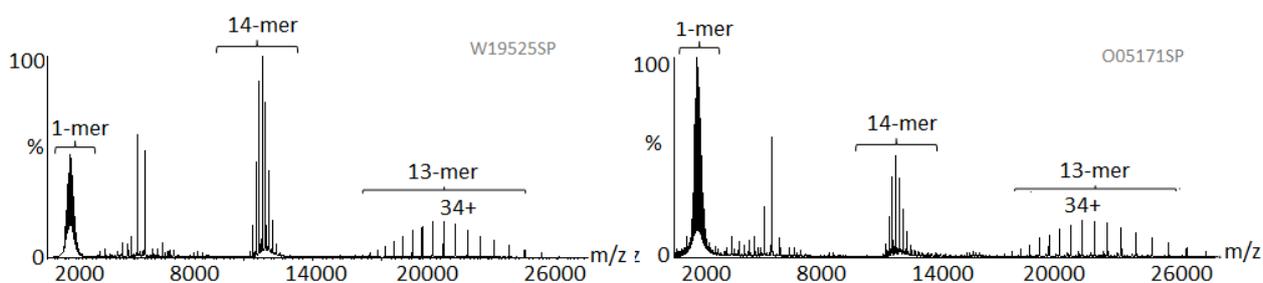


**Figure 11 :** Comparaison de la transmission des ions du CsI sur les Synapt G1 et G2 avec des sources d'ionisation nanoESI. Pour plus de visibilité, plusieurs zones du spectre de masse ont été agrandies selon les facteurs multiplicatifs indiqués. Analyse du CsI  $3 \text{ g.L}^{-1}$  dans un mélange eau/isopropanol 50/50 ( $V_c=200\text{V}$ ,  $P_i=7\text{mbar}$ ).

## 2.2 Étude de la protéine GroEL par MS supramoléculaire

L'analyse du CsI nous a permis de déterminer l'instrument le plus adapté pour la transmission des ions de très hauts rapports m/z. Toutefois, l'étude de cette molécule chimique ne permet pas de rendre compte exactement de la transmission des protéines. C'est pourquoi il est nécessaire d'analyser la protéine GroEL, qui est la seule disponible commercialement.

L'analyse de cette protéine sur les Synapt HDMS G1 et G2 nous a permis de mettre en évidence une bonne désolvatation et une bonne transmission de la protéine sur la gamme des m/z (500-30 000). Toutefois, nous avons pu mettre en évidence des largeurs de pics à mi-hauteur plus faibles pour l'ion 70+ sur le Synapt G1 (5.47 m/z) par rapport au Synapt G2 (6.64 m/z), suggérant une meilleure désolvatation de cette protéine sur le Synapt G1 (Figure 12).



**Figure 12 :** Comparaison de la transmission des ions de la protéine GroEL sur les Synapt G1 (panel de gauche) et G2 (panel de droite). Analyse de la protéine GroEL à  $2 \mu\text{M}$  en 14-mer dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  200 mM pH 6.8 ( $V_c=200 \text{ V}$ ,  $P_i=7 \text{ mbar}$ ).

De plus, nous pouvons observer que l'abondance relative du 14-mer est plus importante sur le Synapt G1 par rapport au Synapt G2 (Figure 12). L'analyse de la protéine GroEL, nous permet à nouveau de mettre en évidence une moins bonne transmission des ions de hauts rapports  $m/z$  sur le Synapt HDMS G2 par rapport au Synapt HDMS G1.

Par conséquent, le Synapt HDMS G1 semble être le plus adapté pour la transmission des ions de très hauts poids moléculaires du CsI ainsi que pour l'analyse des protéines de très hauts poids moléculaires.



## Chapitre 2 : La mobilité ionique et l'analyse de complexes de très hauts poids moléculaires

### 1 Les difficultés liées à l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires par IMS

#### 1.1 Perte de sensibilité lors du passage du mode MS au mode IMS

L'un des premiers problèmes posés par l'analyse de protéines de très hauts poids moléculaires par IM-MS est la perte de sensibilité observée lors du passage du mode MS au mode IMS. En effet, il a pu être mis en évidence lors d'analyses de protéines de très hauts poids moléculaires telles que la protéine GroEL que l'intensité des signaux observés en IMS (Figure 13, b) est 10 fois moins importante que celle observée en MS (Figure 13, a).

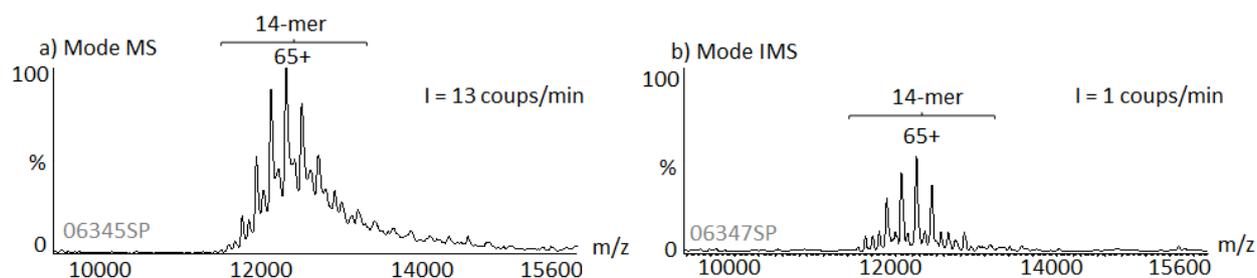


Figure 13: Perte de sensibilité liée au passage du mode MS au mode IMS lors de l'étude de la protéine GroEL (Synapt HDMS G2).

Ce problème de perte de sensibilité lors du passage du mode MS au mode IMS a un impact limité lorsque l'intensité des signaux observée est importante. Cependant, dans le cas des protéines de très hauts poids moléculaires, cette perte de sensibilité rend difficile l'analyse de ces protéines par IM-MS.

#### 1.2 Optimisation de la transmission des ions en IMS

Lors d'analyse de protéines de très hauts poids moléculaires par IM-MS, les paramètres de transmission habituellement utilisés ne permettent pas d'observer les protéines de très hauts poids moléculaires. Par conséquent, ces paramètres ont dû être optimisés pour éviter la perte d'ions lors du passage dans la cellule de mobilité tels que l'augmentation des valeurs de Trap Bias (15 V au lieu de 5 V sur le Synapt G1 et 60 V au lieu de 40 V sur le Synapt G2). Les paramètres de mobilité ont aussi dû être adaptés par rapport aux conditions habituelles. En effet, lors de l'analyse de protéines de très hauts poids moléculaires par IM-MS, il est important de laisser le temps aux ions de hauts rapports m/z de progresser au sein de la cellule de mobilité. Pour cela, la vitesse des vagues doit être

diminuée. Ainsi, sur le Synapt G1, la vitesse des vagues habituellement comprise entre 350 et 450  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  a donc été ramenée à 225  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . De même, sur le Synapt G2, la vitesse des vagues habituellement comprise entre 800 et 1 200  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  a été ramenée à 600  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

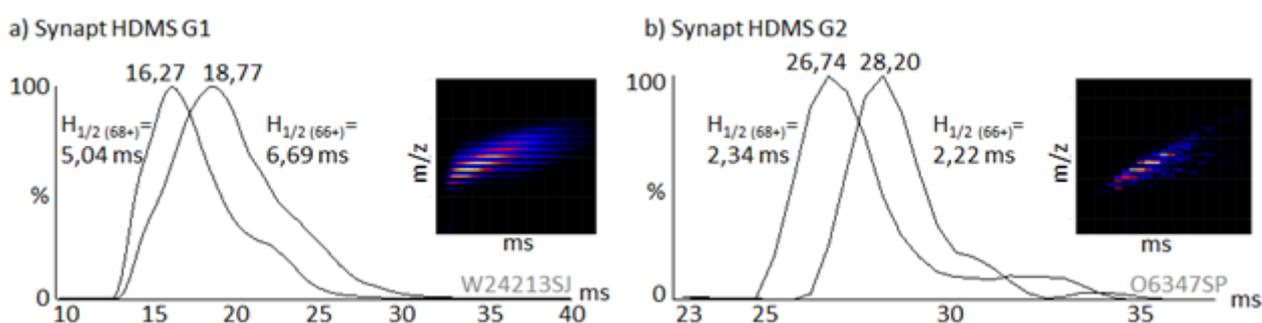
### 1.3 Diffusion dans la cellule de mobilité

Comme nous l'avons précisé précédemment, lors de l'analyse de protéines de très hauts poids moléculaires, les vitesses de vagues doivent être réduites pour permettre aux ions d'être entraînés par les vagues de potentiels régnant au sein de la cellule IMS. Toutefois, il ne faut pas trop réduire la vitesse des vagues de manière à éviter la diffusion des ions dans la cellule de mobilité. Il est donc nécessaire de trouver le bon compromis entre transmission des ions de rapports  $m/z$  élevés et limitation de la diffusion de ces ions dans la cellule de mobilité.

## 2 Étude de la protéine GroEL par IM-MS

### 2.1 Comparaison des Synapt G1 et G2

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude de la protéine GroEL par IM-MS<sup>353, 354</sup>. L'étude de cette protéine a donc été réalisée sur les Synapt HDMS G1 et G2 de manière à déterminer l'instrument le plus adapté pour l'étude de protéines de très hauts poids moléculaires par IM-MS (Figure 14).



**Figure 14 :** Comparaison des analyses IM-MS de la protéine GroEL réalisées sur les Synapt HDMS G1 (a) et G2 (b). Mobilogrammes extraits des états de charge 66 et 68 + du tétradécamère de GroEL. (a)  $V_c = 200$  V,  $P_i = 7,5$  mbar, Bias = 15 V, WH = 8 V, WV = 225  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $P_{IMS} = 0,5$  mbar, Trap CE = 10 V, Transfer CE = 10 V. (b)  $V_c = 150$  V,  $P_i = 7,5$  mbar, Bias = 60 V, WH = 35 V, WV = 600  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $P_{IMS} = 3,6$  mbar, Trap CE = 10 V, Transfer CE = 4 V.

Dans un premier temps, nous avons pu remarquer que l'intensité du signal obtenue sur le Synapt HDMS G1 était plus intense que celle obtenue sur le Synapt HDMS G2 comme le montre les driftscopes obtenus Figure 14. Toutefois, la comparaison des mobilogrammes extraits des états de charge 66 et 68+ sur les Synapt HDMS G1 et G2, nous a permis de mettre en évidence l'amélioration de la résolution en IM-MS sur le Synapt G2. En effet, pour l'état de charge 66+, la largeur des pics de mobilité à mi-hauteur est de 6,69 ms sur le Synapt G1 contre 2,22 ms sur le Synapt G2 (Figure 14).

Toutefois, il est important de noter que sur les édifices de très hauts poids moléculaires, la mise en évidence de différence de mobilité ionique entre deux espèces est plus difficile que sur des édifices de bas poids moléculaires compte tenu de l'hétérogénéité des échantillons de très hauts poids moléculaires.

## 2.2 Comparaison de nos résultats à ceux de la littérature

Les résultats obtenus en IM-MS sur la protéine GroEL au cours de ce travail de thèse sont en accord avec les données publiées dans la littérature<sup>185, 355</sup>. En effet, lors de ces deux études, des largeurs à mi-hauteur comprises entre 2.6 et 2.9 ms ont été obtenues sur le Synapt HDMS G2 et une largeur à mi-hauteur de 5.5 ms a été obtenue sur le Synapt HDMS G1 pour l'ion 66+ (Figure 15).

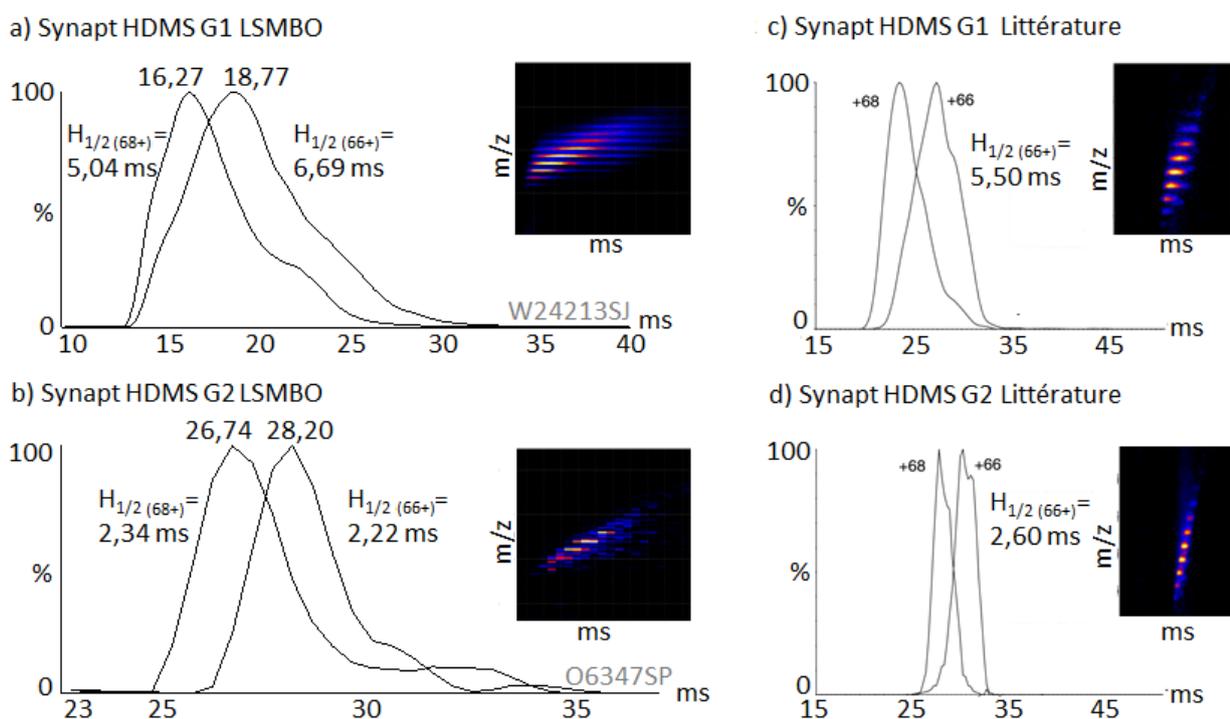


Figure 15 : Comparaison des mobilogrammes obtenus sur les Synapt HDMS G1 et G2 au LSMBO (a et b), dans la littérature<sup>185</sup> (c et d).

De plus, les paramètres de mobilité rapportés dans la littérature pour observer la protéine GroEL sur les Synapt HDMS G1 et G2 correspondent à ceux utilisés au cours de notre étude (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison des paramètres IMS utilisés lors de l'analyse de la protéine GroEL sur les Synapt G1 et G2 avec ceux utilisés dans la littérature<sup>185</sup>.

		Synapt G1		Synapt G2	
		Littérature	LSMBO	Littérature	LSMBO
Paramètres iMS	Pression (mbar)	0,5	0,5	3	3,6
	WV (m.s-1)	250	225	650	600
	WH (V)	9	8	40	35

Les optimisations réalisées en IM-MS sur les Synapt HDMS G1 et G2 permettront d'initier l'étude de protéines de très hauts poids moléculaires par IM-MS.

### 3 Application à un système inconnu : exemple de Tsa-Srx

---

#### 3.1 Contexte biologique de l'étude

---

Après avoir étudié une protéine modèle, nous nous sommes intéressés à l'analyse d'un système inconnu : le complexe Tsa-Srx. La protéine Tsa appartient à la famille des peroxydases, impliquées dans l'élimination d'un agent cellulaire toxique : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )<sup>356, 357</sup>. La protéine Srx est une sulfirédoxine<sup>358</sup>, aussi impliquée dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène, car son expression est fortement induite en présence d' $H_2O_2$ . Afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, la protéine Tsa va réagir avec ce dernier conduisant à une forme Tsa suroxydée. La réduction de la protéine Tsa peut ensuite être assurée grâce à l'action des protéines sulfirédoxines Srx. Les interactions existantes entre ces deux protéines Tsa et Srx sont de nature non-covalente et peuvent être étudiées par MS. Des travaux réalisés précédemment par le Dr. Hortense Mazon (Laboratoire de Guy Branlant, Université de Lorraine) ont permis de mettre en évidence que la protéine Srx est monomérique avec une masse de  $13\,723 \pm 1$  Da ( $M_{théorique} = 13\,723$  Da) en condition native et que la protéine Tsa sous forme sulfinique est décamerique avec une masse de  $215\,022 \pm 26$  Da ( $M_{théorique} = 214\,900$  Da). Des interactions non-covalentes entre ces deux protéines ont aussi pu être mises en évidence par MS supramoléculaire, dans la gamme de  $m/z$  (5 000-10 000), pour des ratios Tsa-Srx compris entre 1 : 1 et 1 : 10.

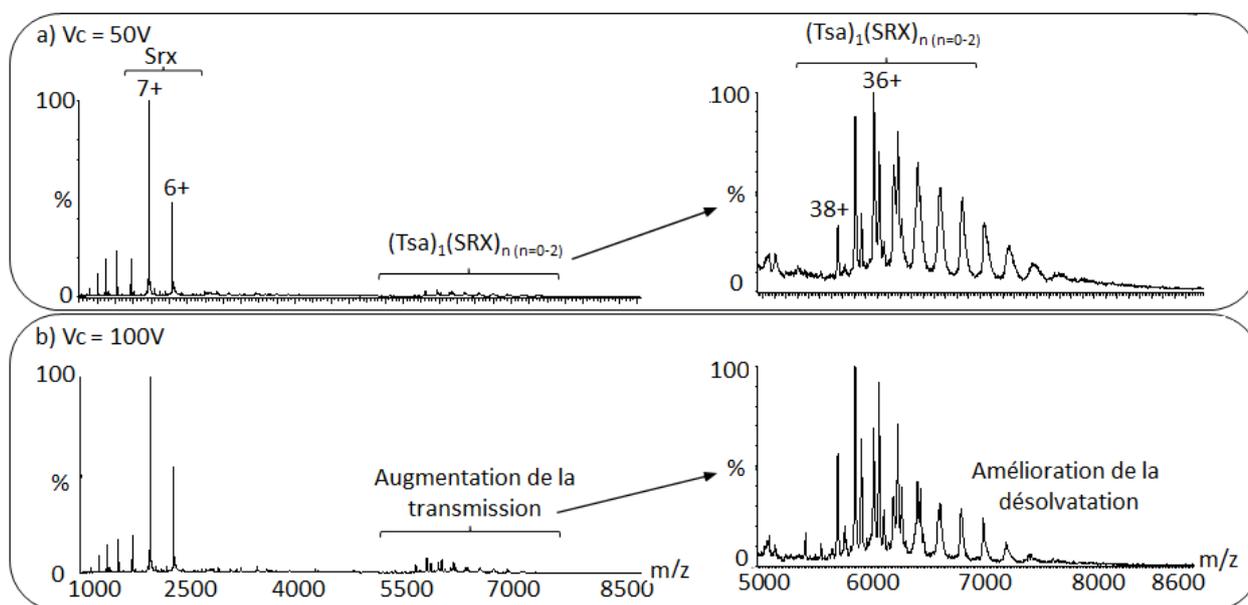
Nous avons donc souhaité évaluer le potentiel de la mobilité ionique pour mettre en évidence les différents complexes formés entre ces deux protéines.

#### 3.2 Analyse par MS supramoléculaire des complexes TsaSO<sub>2</sub>-Srx

---

La protéine Srx a été incubée avec la protéine Tsa sous forme sulfinique pendant 10 minutes à 30°C selon un ratio Tsa : Srx 1 : 2,5 (Figure 16). L'analyse de ce mélange par MS supramoléculaire en conditions natives, nous a permis de mettre en évidence la protéine Srx seule ( $13\,722 \pm 1$  Da) dans la gamme des  $m/z$  (500-3 000) et la protéine Tsa seule ( $214\,878 \pm 11$  Da) ou complexée à la protéine Srx (Tsa<sub>1</sub>Srx<sub>1</sub> :  $228\,620 \pm 22$  Da ( $M_{théorique} : 228\,622$  Da) et Tsa<sub>1</sub>Srx<sub>2</sub> :  $242\,376 \pm 20$  Da ( $M_{théorique} : 242\,344$  Da)) dans la gamme des  $m/z$  (5 000-10 000). La comparaison des données obtenues avec des potentiels d'accélération en source de 50 ou 100 V, nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la transmission des hauts rapports  $m/z$  ainsi qu'une meilleure désolvatation pour un Vc de 100 V. De plus, plus la masse du complexe Tsa<sub>1</sub>Srx<sub>N</sub> augmente, plus les pics de masse s'élargissent conduisant à des mesures de masses de moins en moins précises.

L'interprétation des spectres dans la gamme de  $m/z$  (5 000-10 000) est par conséquent difficile, du fait de la largeur des pics de masse et du recouvrement des états de charge des différentes espèces observées (Figure 16, Panel de droite).



**Figure 16 : Formation de complexes non-covalents entre les protéines SrX et Tsa après 10 minutes d'incubation à 30°C (ratio 1 :2,5).** Panel de gauche : Comparaison des spectres de masse obtenus à des tensions d'accélération de 50 V (a) et 100 V (b). Panel de droite : agrandissement de la gamme de  $m/z$  (5 000-9 000).

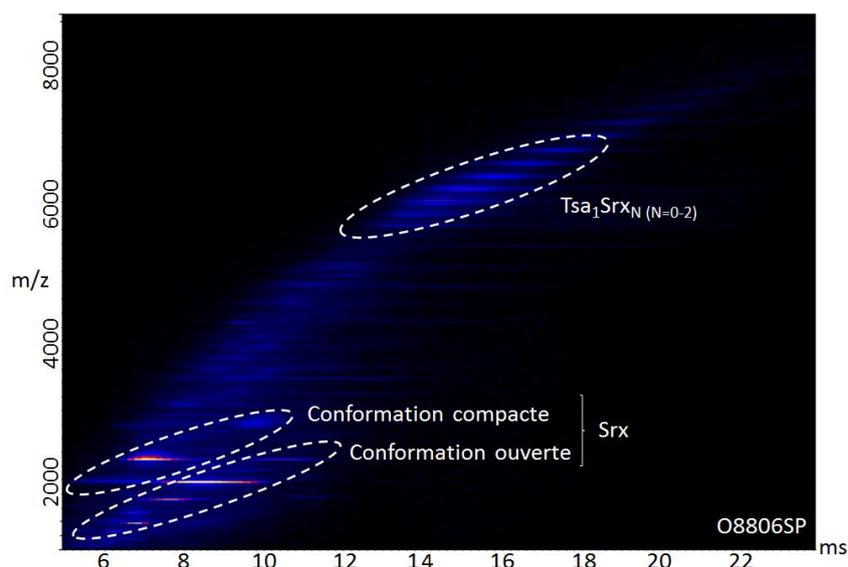
De plus, nous avons observé sur le spectre ESI-MS une augmentation des états de charge des complexes Tsa-SrX en fonction du nombre de SrX fixée. Cette observation suggère l'apparition d'un changement conformationnel du décimère de Tsa en fonction du nombre de protéines SrX fixées.

### 3.3 Analyse par IM-MS supramoléculaire des complexes TsaSO<sub>2</sub>-SrX

Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer l'apport du couplage IM-MS pour l'étude d'échantillons de hauts poids moléculaires complexes et hétérogènes. L'échantillon Tsa : SrX (1 : 2,5) a donc été analysé par IM-MS sur le Synapt HDMS G2.

#### a. Données issues de la représentation Driftscope

Comme pour l'analyse de la protéine GroEL, les paramètres de mobilité utilisés ont dû être adaptés à l'analyse de cette protéine de hauts poids moléculaires. Ainsi, le débit de gaz dans la partie Trap a été ajusté à 7 mL.min<sup>-1</sup> au lieu de 2 mL.min<sup>-1</sup>, la vitesse dans la cellule de mobilité a été réduite à 750 m.s<sup>-1</sup> pour une hauteur de vague de 40 V. De plus, afin d'assurer une désolvatation optimale des ions, les paramètres Trap et Transfer CE ont été ajustés à 10 et 30 V respectivement. Contrairement à l'analyse de la protéine GroEL, des conditions douces ont pu être maintenues pour le paramètre Trap Bias (40 V).



**Figure 17:** Driftscope obtenu lors de l'analyse par IM-MS de la protéine Tsa incubée pendant 10 minutes à 30°C selon un ratio 1 :2 ,5.  $V_c = 100V$ ,  $P_i = 7,5$  mbar, Trap CE = 10V, Transfer CE = 30V,  $P_{IMS} = 3$  mbar, Trap gaz = 7 mL.min<sup>-1</sup>, Bias = 40V, WH = 40 V, WV = 750 m.s<sup>-1</sup>.

Le driftscope obtenu dans ces conditions (Figure 17), permet de mettre en évidence dans la gamme de m/z (500-3 000) que la protéine Srx est présente sous deux conformations plus ou moins ouvertes. Cette hétérogénéité conformationnelle de la protéine Srx pourrait s'expliquer par des hétérogénéités de pontage au niveau des cystéines libres de la protéine Srx.

Dans la gamme des m/z (5 000-10 000), nous avons pu mettre en évidence des mobilités comprises entre 12 et 20 ms correspondant aux différentes formes de complexes Tsa<sub>1</sub>SrX<sub>N</sub> (N= 0-2). Toutefois, la représentation sous forme de driftscope ne nous permet pas de mettre en évidence des différences de mobilité entre les différents complexes formés.

#### b. Études des mobilogrammes extraits et effet du potentiel d'accélération $V_c$

Les mobilogrammes des ions 37 et 38 + des différentes formes de complexes Tsa-Srx ont donc été extraits à partir des spectres de masse obtenus pour des potentiels d'accélération de 50 et 100 V (Figure 18). En effet, nous avons montré dans le paragraphe 3.2, que la désolvatation et la transmission des ions de hauts rapports m/z étaient meilleures pour un potentiel d'accélération de 100 V cependant lors d'études par IM-MS, il est essentiel de réduire ce potentiel d'accélération pour éviter l'activation des ions en phase gazeuse. Nous avons donc souhaité étudier l'effet de ce potentiel sur l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires.

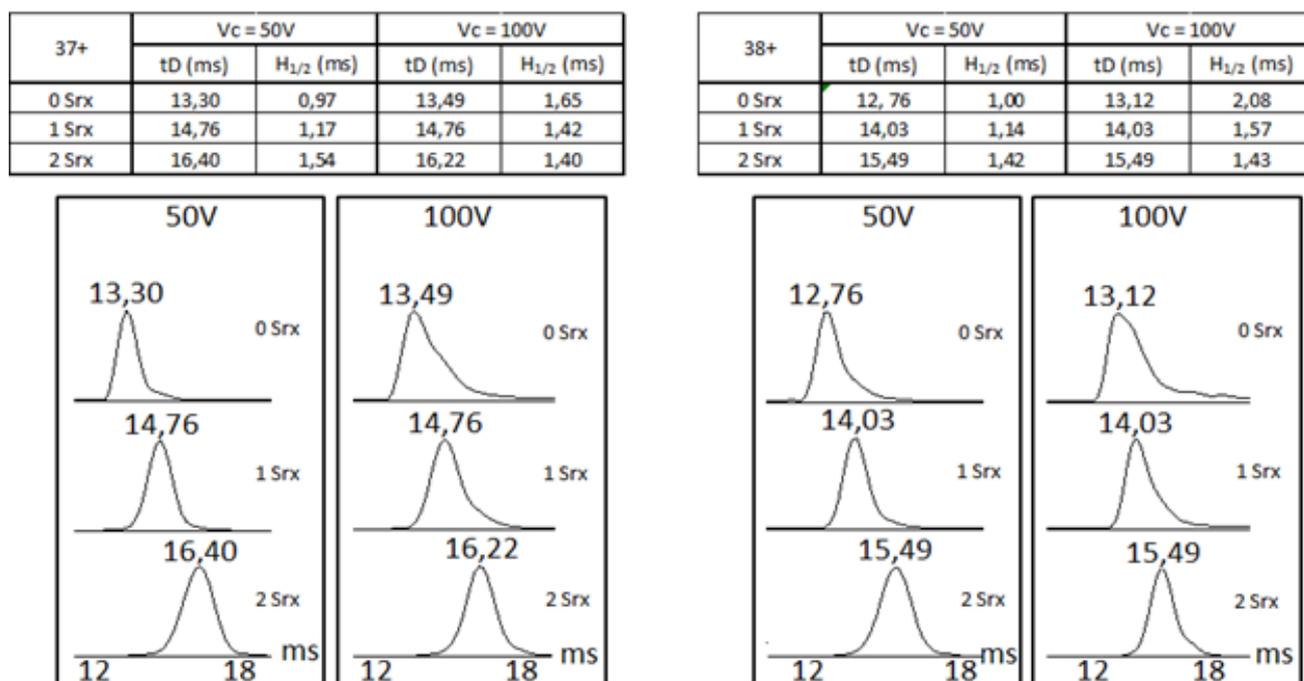


Figure 18: Comparaison des mobilogrammes extraits des états de charge 37 et 38 + lors de l'analyse de la protéine Tsa incubée avec la protéine Srx selon un ratio 1 : 2,5 pendant 10 minutes à 30°C. L'effet de la tension d'accélération Vc a été évalué grâce aux temps de passage des ions dans la cellule IMS et à la largeur des pics de mobilité à mi-hauteur. O8805SP et O8807SP

Un potentiel d'accélération de 100 V permet d'obtenir des spectres de masse bien désolvatés et de transmettre correctement les ions de hauts rapports m/z. Cependant, comme le montre l'analyse du mélange Tsa-Srx (1 : 2,5) par IM-MS, ce potentiel d'accélération induit un élargissement des pics de mobilité par rapport à une tension de 50 V. Cet élargissement s'accompagne dans certains cas d'un décalage du temps de passage des ions dans la cellule de mobilité. Par conséquent, il est préférable d'utiliser des tensions d'accélération plus faibles (50 V) pour étudier des protéines de hauts poids moléculaires par IM-MS au détriment de la désolvatation des spectres de masse.

Pour un potentiel d'accélération de 50 V, une augmentation des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité ainsi qu'une augmentation de la largeur à mi-hauteur des pics de mobilité sont observées lorsque le nombre de protéines Srx fixées à la protéine Tsa augmente (Figure 18). Cette observation suggère que la fixation de la protéine Srx sur le décimère de Tsa entraîne une augmentation de la section efficace du complexe Tsa-Srx en phase gazeuse. Cette augmentation est donc corrélée à l'augmentation du nombre d'états de charge observée lors d'analyses par MS supramoléculaire en conditions natives. L'augmentation de la largeur des pics de mobilité à mi-hauteur pourrait dans ce cas rendre compte d'une hétérogénéité conformationnelle due à la taille des édifices supramoléculaires analysés.

Pour un potentiel d'accélération de 100 V, une augmentation des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité est observée lorsque le nombre de protéines Srx fixées à la protéine Tsa augmente (Figure 18). Cette observation pourrait s'expliquer par une activation des ions

correspondants aux complexes  $Tsa_1Srx_{(0-2)}$  à 100 V. Cependant, les largeurs à mi-hauteur des pics de mobilité diminuent lorsque le nombre de protéines Srx fixées augmente. Par conséquent, nous pouvons conclure de ces résultats que la fixation des protéines Srx semble induire un changement conformationnel stabilisant le complexe Tsa-Srx.

### c. Conclusion

L'optimisation des paramètres de mobilité ionique nous a permis d'observer différentes formes de complexes Tsa-Srx. De plus, cette étude nous a permis de montrer l'importance de diminuer l'énergie transmise aux ions en phase gazeuse pour éviter l'activation des ions. Notre étude des temps de passage des ions dans la cellule de mobilité ainsi que des largeurs de pics à mi-hauteur suggère que la fixation de protéines Srx sur le décimère de Tsa induit un changement conformationnel rendant plus stable le complexe Tsa-Srx. Afin de pouvoir confirmer cette hypothèse, plusieurs répliquats devront être réalisés et cette étude devra être effectuée pour des ratios Tsa-Srx supérieurs.

## Chapitre 3 : Données préliminaires issues de l'analyse de Ribosomes par MS supramoléculaire

Les développements réalisés pour l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires seront illustrés au travers de l'étude du ribosome de *Thermus thermophilus* et d'*Escherichia coli*. L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence les difficultés liées à l'analyse de ribosomes par MS supramoléculaire.

### 1 Contexte biologique de l'étude des ribosomes

Les ribosomes, structures complexes, formés d'ARN et de protéines, assurent le fonctionnement et le renouvellement cellulaire grâce à leur fonction de traducteurs universels. Les ribosomes, présents à la fois chez les Procaryotes et les Eucaryotes, diffèrent par leur taille, leur structure et leur séquence. En effet, le ribosome Procaryote (70S) est composé des sous-unités 30S et 50S (Figure 19, panel de gauche)<sup>359</sup>, alors que le ribosome Eucaryote (80S) est formé des sous-unités 40S et 60S<sup>359-361</sup>.

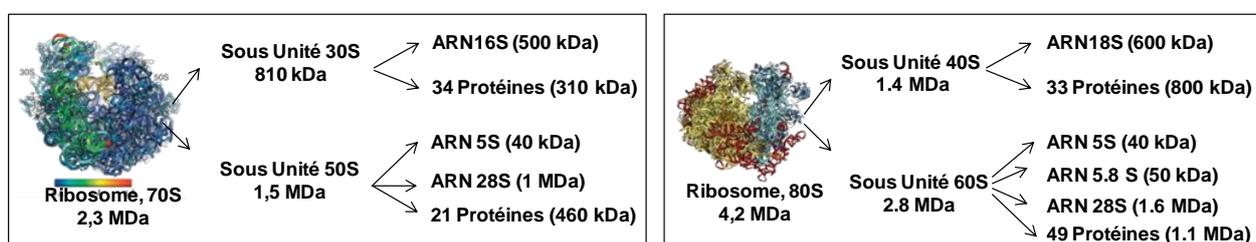


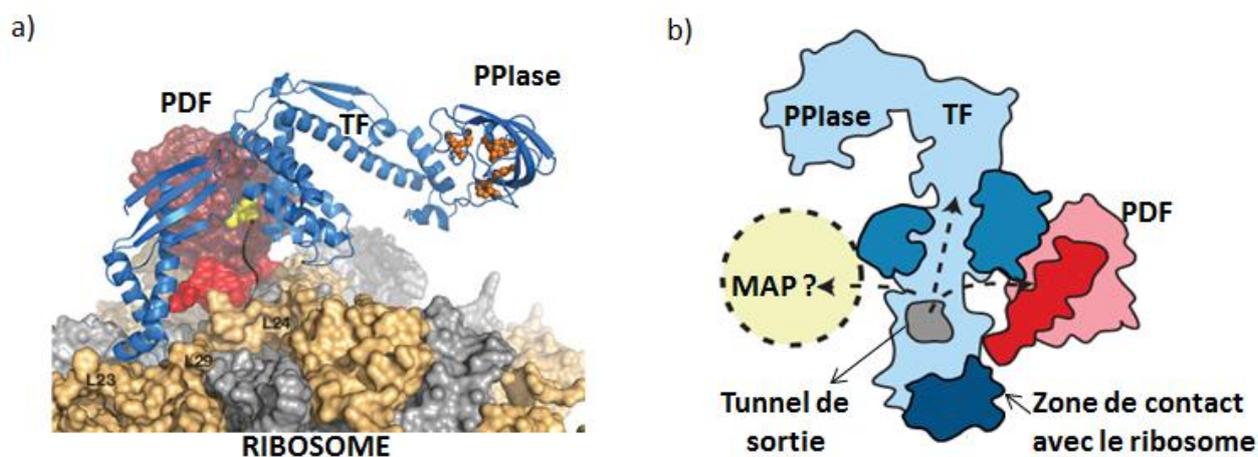
Figure 19 : Présentation schématique des Ribosomes 70 S et 80 S présents respectivement chez les organismes Procaryotes ou Eucaryotes. Ribosome 70S<sup>362, 363</sup>, Ribosome 80S<sup>364</sup>. Les masses des différents constituants du ribosome sont des estimations.

En 2009, V. Ramakrishnan, TA. Steitz et AE. Yanath ont reçu le prix Nobel de chimie pour la réalisation de la carte structurale détaillée du ribosome Procaryote. Grâce à ces nouvelles données, différentes études ont été initiées afin de développer de nouveaux antibiotiques se liant aux ribosomes. En effet, les différences qui existent entre les ribosomes permettent notamment d'envisager le développement de traitements antibiotiques dirigés spécifiquement contre les ribosomes des organismes Procaryotes. Pour cela, il est important de comprendre le fonctionnement du ribosome et de comprendre les nouvelles pathologies liées au dysfonctionnement des protéines associées stablement ou transitoirement avec les ribosomes.

Les difficultés liées à l'étude cristallographique des ribosomes ont conduit plusieurs équipes à développer des méthodes d'analyses alternatives telles que la microscopie électronique ou la MS supramoléculaire. En effet, la combinaison de ces deux techniques permet d'obtenir des informations

concernant l'enveloppe de densité électronique d'un complexe protéique, mais aussi concernant les sous-unités composant un complexe protéique. L'utilisation de la modélisation moléculaire en complément de ces deux techniques permet alors de définir des modèles structuraux sans cristaux<sup>8</sup>. Toutefois, l'étude de ribosomes par MS supramoléculaire n'est pas triviale et nécessite de nombreuses optimisations. En effet, le ribosome est une structure complexe, très hétérogène, posant de nombreux problèmes de dessalage<sup>339</sup>. D'autant plus que l'analyse du ribosome nécessite l'utilisation d'ions non volatils tels que le magnésium, qui altèrent la qualité des spectres de masse<sup>365</sup>. Ainsi, l'analyse du ribosome ainsi que l'étude d'interactions entre le ribosome et des protéines associées aux ribosomes restent toujours un défi pour la MS supramoléculaire.

L'étude du fonctionnement du ribosome est un sujet difficile qui nécessite souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques pour étudier le ribosome intact ou en interaction protéines/ribosomes. Plusieurs études ont récemment été réalisées et ont permis de mettre en évidence un certain nombre de protéines associées aux ribosomes<sup>366</sup> (Figure 20). Parmi elles, nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines associées à la genèse des polypeptides qui s'organisent pour former le tunnel de sortie du ribosome : les protéines MAP (*Méthionine AminoPeptidase*), TF (*Trigger Factor*) et PDF (*Peptide DeFormylase*)<sup>326, 367, 368</sup>.



**Figure 20 :** a) vu à travers le centre du ribosome : TF (en bleu), les résidus actifs de la peptidyl-prolyl-cis/trans-isomérase (PPIase) (en orange) à travers le tunnel de sortie vers le site actif de PDF (en rouge). Les flèches indiquent la voie du tunnel de sortie vers le site actif de la protéine PDF b) Schéma de la protéine TF (en bleue) avec ces deux bras et le domaine de fixation au ribosome permettant la sortie de la chaîne polypeptidique naissante, vu de la sortie du tunnel. MAP et PDF sont proches de l'ouverture latérale de TF. D'après<sup>367</sup>.

## 2 Objectifs de l'étude

Dans ce contexte, nous avons initié une collaboration avec le Dr. Carmela Giglione (ISV, Gif sur Yvette) dans le but d'analyser par MS supramoléculaire plusieurs ribosomes Procaryotes (*Thermus thermophilus* et *Escherichia coli*) puis d'étudier les interactions avec différentes protéines du tunnel de sortie du ribosome telles que les protéines MAP, PDF et TF.

Dans un premier temps, nous avons optimisé l'analyse du ribosome de *Thermus thermophilus* par MS supramoléculaire. Les difficultés abordées dans le chapitre précédent seront donc illustrées au travers de l'étude du ribosome : choix du tampon, méthode de dessalage, source d'ionisation, paramètres de transmission. La méthode d'analyse développée pour le ribosome *Thermus thermophilus* sera ensuite utilisée pour l'étude du ribosome *Escherichia coli*.

Dans un second temps, nous avons souhaité étudier les interactions entre le ribosome 70S et la protéine TF du tunnel de sortie du ribosome. Les difficultés liées à l'analyse des interactions entre des protéines et un complexe de très hauts poids moléculaires seront notamment abordées.

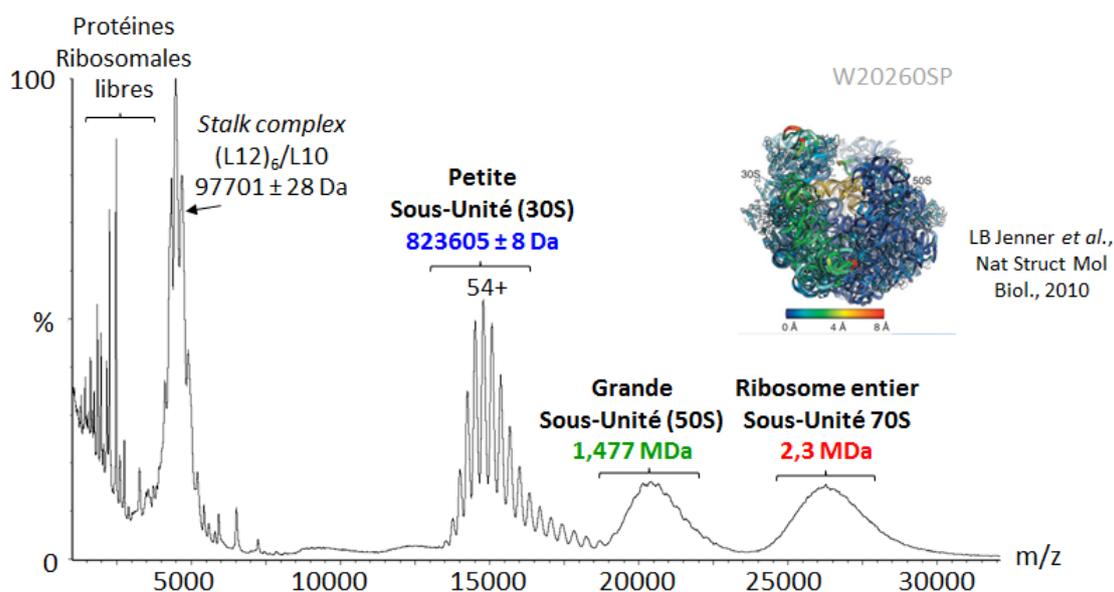
### 3 Résultats

#### 3.1 Analyse du ribosome par MS supramoléculaire

Avant chaque analyse ESI-MS sur des protéines de hauts poids moléculaires, la transmission des ions de hauts rapports  $m/z$  est vérifiée à l'aide du CsI et de la protéine GroEL. De plus, lors de ces études, le cône d'échantillonnage des spectromètres de masse est nettoyé chaque jour afin d'éliminer les sels non volatils qui se sont déposés et qui entraînent une perte de signal.

Lors de cette étude, nous avons analysé des échantillons ribosomaux fraîchement purifiés ou après avoir été congelés sous azote puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Une première analyse du ribosome de *Thermus thermophilus* sur le Synapt HDMS G1 nous a permis de détecter le ribosome 70S dans la gamme des  $m/z$  (25 000-35 000), mais aussi les différentes sous-unités du ribosome (30S et 50S) ainsi que des protéines associées aux ribosomes appelées protéines du *Stalk complex* (Figure 21).



**Figure 21** : Analyse du ribosome de *Thermus thermophilus* dessalé par 5 cycles d'ultrafiltration sur Amicon 50 kDa. ( $V_c = 120$  V,  $P_i = 6.5$  mM,  $\text{AcNH}_4$  1 M pH6.8,  $\text{AcMg}$  10mM)

Il a été montré par Videler *et al.*<sup>361</sup> que les protéines du *Stalk complex*, qui interagissent moins avec les ARN ribosomiaux, sont plus labiles, ce qui explique leur présence dans la gamme des bas  $m/z$  (2 000-5 000).

Les résolutions obtenues sur les sous-unités 50S et 70S rendent difficile une mesure de masse précise. Au contraire, nous avons pu déterminer la masse de la sous-unité 30S du ribosome ( $M_{\text{mesurée}} = 823\,605 \pm 8$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 818\,786$  Da). De plus, nous avons pu mettre en évidence dans la gamme de  $m/z$  (2 500-7 000), un complexe protéique de  $97\,701 \pm 28$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 95\,826$  Da) qui correspond à un complexe comprenant 6 protéines L12 et une protéine L10<sup>104</sup>. Il est important de remarquer que l'absence d'une désolvatation optimale de l'échantillon en phase gazeuse conduit à une surestimation de la masse des complexes détectés sur le spectre de masse.

La présence des sous-unités 30S et 50S sur le spectre de masse ainsi que du complexe (L12)<sub>6</sub>/L10 indique une dissociation du ribosome au cours de l'analyse par MS supramoléculaire. Cependant, il est intéressant de noter que le spectre de masse obtenu est similaire aux spectres de masse de *Thermus thermophilus* présents dans la littérature<sup>341</sup>.

### 3.1.1 Effet du tampon sur le ribosome

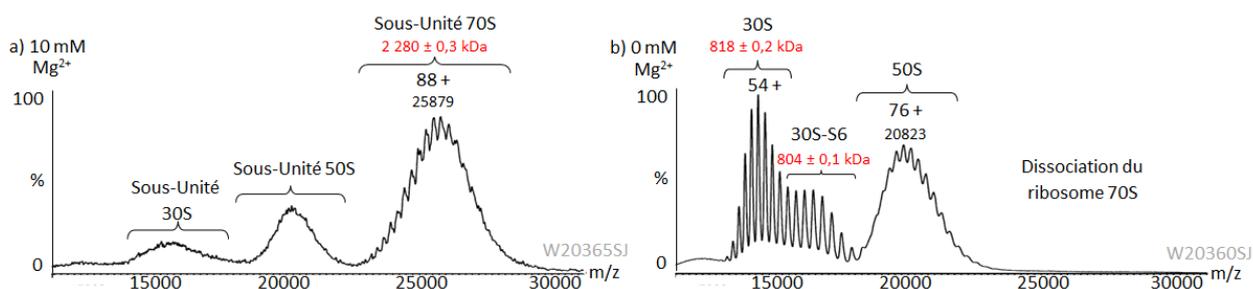
---

Afin d'améliorer la qualité des spectres de masse obtenus, nous avons étudié l'effet des forces ioniques en acétate de magnésium et en acétate d'ammonium.

#### a. Effet de la force ionique en acétate de magnésium

De précédentes études réalisées sur les ribosomes ont permis de mettre en évidence que le magnésium était indispensable pour maintenir les interactions non-covalentes entre les différentes sous-unités du ribosome<sup>369, 370</sup>.

L'analyse d'un échantillon de ribosome, stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ , en présence de 10 mM de magnésium nous a permis d'observer majoritairement sur les spectres de masse, la sous-unité 70S avec une bonne résolution (Figure 22, a). La masse de la sous-unité 70S est de  $2\,279\,822 \pm 260$  Da ce qui est en accord avec la masse théorique attendue à 2.3 millions de daltons. Toutefois, dans ces conditions, la désolvatation des sous-unités 30S et 50S est insuffisante et ne permet pas de mesurer des masses précises. De plus, l'ionisation d'un échantillon contenant de l'acétate de magnésium est plus complexe et les sprays obtenus sont très instables.



**Figure 22 : Effet de la force ionique en acétate de magnésium sur la stabilité du ribosome de *Thermus thermophilus*.** Analyse du ribosome de *Thermus thermophilus* dessalé par 10 cycles d'ultrafiltration sur Amicon 50kDa (5 fois) et sur Vivaspin 50 kDa (5 fois). (Vc= 160 V, Pi = 7.5 mM, AcNH<sub>4</sub> 65 mM pH6.8) a) 10 mM AcMg, et b) 0 mM AcMg.

Par conséquent, nous avons réalisé l'analyse de cet échantillon en absence de magnésium (Figure 22, b). Dans ces conditions, l'obtention d'un spray stable est facilitée permettant de réaliser des analyses sur plusieurs minutes et par conséquent d'obtenir des spectres de meilleure qualité. Cependant, l'absence de magnésium induit la dissociation du ribosome 70S mais permet d'obtenir une désolvatation des sous-unités 30 et 50S suffisante pour mesurer des masses précises. La sous-unité 50 S présente une masse de  $1\,586\,748 \pm 18$  Da ce qui est en accord avec la masse théorique (environ 1.5 million de daltons). Dans la gamme de m/z correspondant à la sous-unité 30S (12 500-17 500), le spectre présente une représentation bimodale correspondant à deux formes de la sous-unité 30S. D'une part, la sous-unité 30S a été mesurée à  $818\,069 \pm 193$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 818\,786$  Da), d'autre part, une masse de  $804\,242 \pm 113$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 806\,945$  Da) correspondant à la sous-unité 30S, privée de la protéine S6 a été mise en évidence. L'existence de ces différentes formes de la sous-unité 30S a été abordée dans l'étude de Ilag LL *et al.*<sup>104</sup>. En effet, lors de leur étude, la masse apparente de la sous-unité 30S semblait correspondre à un mélange de sous-unités 30S entières et dépourvues de la protéine S6.

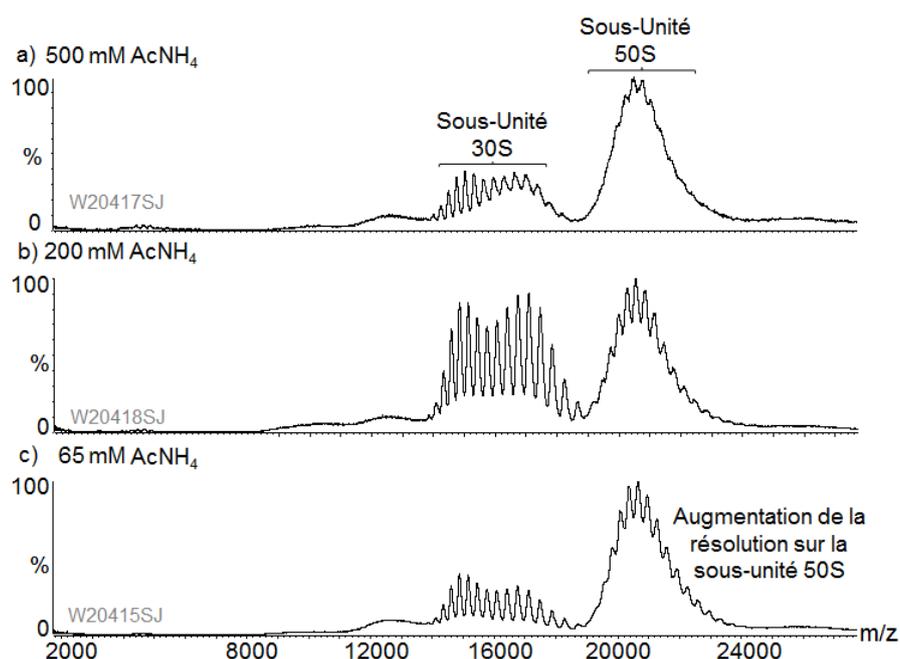
En conclusion, l'acétate de magnésium permet de maintenir les interactions entre les sous-unités du ribosome 70S. Toutefois, la présence de magnésium conduit à l'obtention de spray peu stable et mal désolvaté. Au contraire, l'absence de magnésium permet d'obtenir des sprays plus stables et induit la dissociation du ribosome 70S. Ainsi, des spectres bien résolus sont obtenus pour les sous-unités 30S et 50S permettant des mesures de masses précises.

Le temps nécessaire pour réaliser une analyse en présence de magnésium étant très long, nous avons donc choisi de travailler en présence ou en absence de magnésium en fonction de nos applications.

#### b. Effet de la force ionique en acétate d'ammonium

Dans les études réalisées sur le ribosome par MS supramoléculaire, le magnésium est souvent éliminé pour permettre de simplifier l'étude du ribosome. En contrepartie, la force ionique du tampon acétate d'ammonium peut-être augmentée jusqu'à  $1\text{ M}$ <sup>339, 371</sup>. Nous avons donc étudié l'effet

de la force ionique du tampon acétate d'ammonium sur le ribosome de *Thermus thermophilus* (Figure 23).

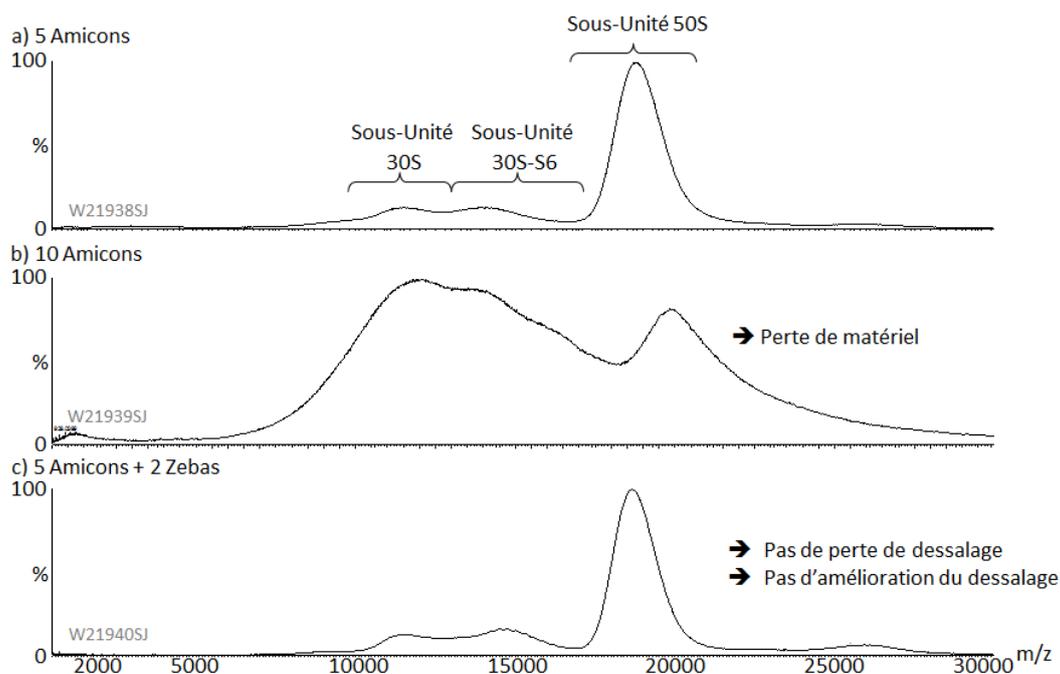


**Figure 23 : Effet de la force ionique en acétate d'ammonium sur la désolvatation des spectres de masse.** Analyse du ribosome dessalé par ultrafiltration et dilué à 1  $\mu$ M dans des tampons AcNH<sub>4</sub> de différentes forces ioniques : a) 500 mM, b) 200 mM et c) 65 mM). ( $V_{ESI} = 2$  kV,  $V_c = 200$  V,  $P_i = 7.8$  mbar).

Lors de l'analyse du ribosome dans un tampon acétate d'ammonium à forte force ionique, nous avons mis en évidence un manque de résolution au niveau des sous-unités 30S et 50S. Au contraire, lorsque la force ionique du tampon diminue, une amélioration de la résolution est observée notamment pour la sous-unité 50S. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser un tampon acétate d'ammonium à 65 mM pour l'ensemble de notre étude.

### 3.1.2 Effet de la méthode de dessalage

Comme nous avons pu le voir sur les spectres obtenus à partir du ribosome de *Thermus thermophilus*, 5 cycles de dessalage par ultrafiltration (Amicon 50 kDa) permettent d'obtenir des spectres de bonne qualité. Cependant, lors de l'étude du ribosome d'*Escherichia coli*, cette technique de dessalage ne nous a pas permis d'obtenir un spectre bien résolu pour la sous-unité 50S (Figure 24, a). Afin d'améliorer le dessalage de cet échantillon, nous avons donc augmenté le nombre de cycles de dessalage par ultrafiltration (Figure 24, b). Mais ceci nous a conduits à une perte importante de matériel. Dans un second temps, nous avons donc essayé de procéder à deux cycles de dessalage par filtration sur gel (colonne Zeba) (Figure 24, c). Toutefois, nous n'avons pas pu améliorer la qualité du spectre de masse initialement obtenu. De même, nous n'avons pas pu améliorer la qualité du spectre obtenu en réalisant une dialyse ou en diluant l'échantillon.

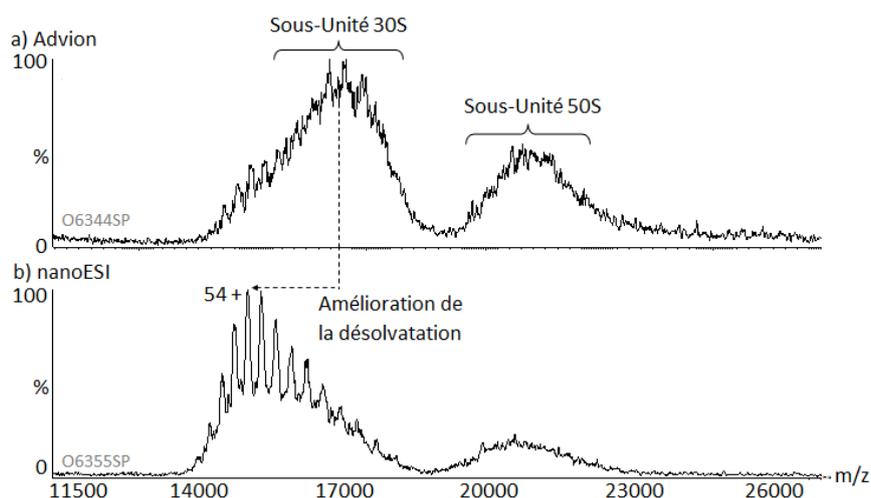


**Figure 24: Difficultés liées au dessalage du ribosome *E. coli*.** a) dessalage par 5 cycles d'ultrafiltration sur Amicon. b) dessalage par 10 cycles d'ultrafiltration sur Amicon c) dessalage par 5 cycles d'ultrafiltration sur Amicon puis 2 cycles de dessalage par filtration sur gel sur colonne Zeba. (Vc = 200V, Pi = 7.5 mbar, AcNH<sub>4</sub> 65 mM pH 6.5).

La résolution obtenue pour la sous-unité 50S du ribosome d'*E. coli* est cependant en accord avec ce qui est présenté actuellement dans la littérature<sup>371</sup>. En effet, contrairement au ribosome de *Thermus thermophilus*, le ribosome d'*E. coli* est plus complexe et donc plus difficile à analyser par MS. En conclusion, la méthode de dessalage privilégiée pour l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires est l'ultrafiltration. Les autres méthodes de dessalage n'ont pas permis d'améliorer la qualité des spectres MS des ribosomes.

### 3.1.3 Effet de la source d'ionisation

Lors de l'étude de la protéine GroEL par MS supramoléculaire sur le Synapt HDMS G2, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la source d'ionisation sur la désolvatation de cette protéine. Par conséquent, lors de l'étude du ribosome de *Thermus thermophilus*, nous avons utilisé, dans un premier temps, la source d'ionisation Triversa Nanomate (Figure 25, a). Le spectre de masse obtenu ne nous a pas permis de mesurer avec précision la masse des sous-unités 30S et 50S. Par conséquent, nous avons souhaité étudier l'effet de la source d'ionisation sur la qualité du spectre obtenu. Ainsi, nous avons analysé le même échantillon que précédemment, mais en utilisant comme source d'ionisation des aiguilles nanospray (Figure 25, b). Dans ces conditions, un décalage du massif correspondant à la sous-unité 30S est observé, suggérant une meilleure désolvatation de la sous-unité 30S. La résolution obtenue nous permet alors de mesurer une masse de  $810\,117 \pm 38$  Da ( $M_{\text{théorique}} = 818\,786$  Da) correspondant à un mélange de sous-unité 30S avec et sans protéines S6. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'amélioration de la désolvatation de la sous-unité 50S.



**Figure 25 :** Effet de la source d'ionisation sur la désolvatation du ribosome de *Thermus thermophilus*. ( $V_c=200V$ ,  $P_i = 7.5$  mbar,  $AcNH_4$  65 mM pH 6.8).

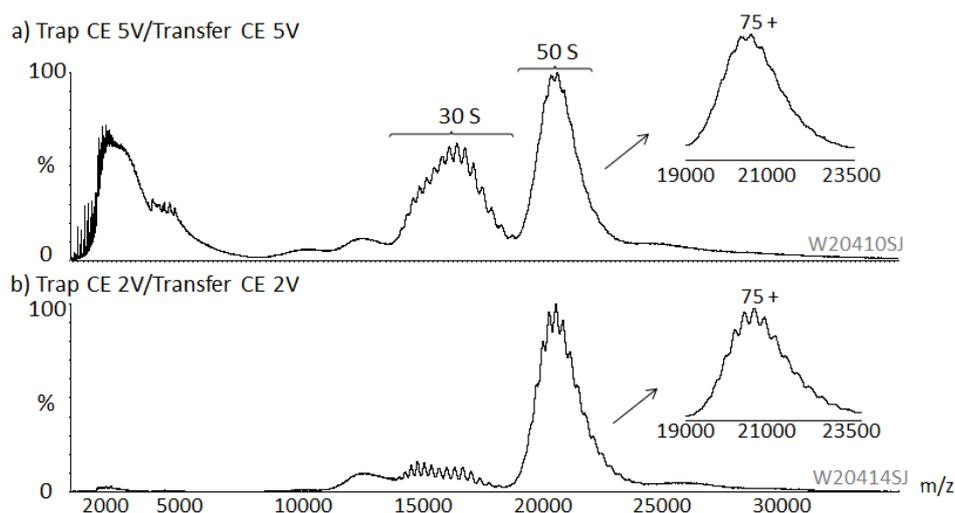
En conclusion, bien que nous n'ayons pas mis en évidence l'effet de la source d'ionisation sur la désolvatation des ions lors de l'étude de la protéine de référence GroEL. L'étude d'un système plus complexe tel que le ribosome nous a permis de montrer que la désolvatation des ions était meilleure lors d'ionisation en aiguilles nanospray par comparaison avec la source Triversa Nanomate. Ceci pourrait notamment s'expliquer par une obturation partielle des émetteurs de la puce nanospray en présence de quantité de sels importants.

Par conséquent, lors de l'étude de protéines de hauts poids moléculaires, l'utilisation d'aiguilles nanospray est nécessaire pour assurer une désolvatation optimale des ions.

### 3.1.4 Effet de paramètres instrumentaux sur la transmission des ions de hauts rapports $m/z$

Afin d'améliorer la transmission des complexes de hauts poids moléculaires, il est recommandé d'augmenter les tensions d'accélération au sein du spectromètre de masse. Toutefois, il est important de ne pas entraîner la dissociation des interactions non-covalentes en phase gazeuse.

Ainsi, lors de l'étude du ribosome de *Thermus thermophilus*, nous avons pu mettre en évidence que des paramètres Trap/Transfer CE de 5 V conduisaient sur les spectres de masse à l'observation des sous-unités 30S et 50S (Figure 26, a). Dans ces conditions, seule la masse de la sous-unité 30S peut être déterminée avec précision. Au contraire, une diminution des paramètres Trap et Transfer CE (2V) nous a permis d'observer majoritairement la sous-unité 50S (Figure 26, b), avec une résolution spectrale permettant de déterminer sa masse avec précision ( $M_{mesurée} = 1\ 552\ 982 \pm 56$  Da).



**Figure 26 : Effet des paramètres Trap et Transfer CE sur la transmission du ribosome de *Thermus thermophilus*.** Analyse du ribosome de *Thermus thermophilus* à 1  $\mu$ M dessalé par 10 cycles d'ultrafiltration (5 Amicon 50kDa et 5 Vivaspin 50 kDa) Tension capillaire =2V, Vc= 120V, Pi = 7.8 mbar, AcNH<sub>4</sub> 65 mM, AcMg 1.6 mM a) Trap/Transfer CE 5/5V, b) Trap/Transfer CE 2/2V.

Par conséquent, la diminution des paramètres Trap et Transfer CE a permis de favoriser la transmission des ions dans la gamme des m/z (19 000-24 000).

### 3.1.5 Conclusion

Les différentes optimisations réalisées au cours de ce travail sur les protéines de hauts poids moléculaires nous ont permis de détecter le ribosome de *Thermus thermophilus* mais aussi d'*Escherichia coli* par MS supramoléculaire.

Les conditions de préparation d'échantillon doivent être bien maîtrisées pour obtenir des spectres avec une résolution permettant de déterminer des masses précises.

Contrairement à l'étude de protéines commerciales de hauts poids moléculaires, l'analyse du ribosome est plus complexe puisqu'il s'agit d'un ensemble de protéines et d'ARN dont le dessalage et l'ionisation sont plus difficiles à maîtriser.

## 3.2 Essais préliminaires d'interaction entre le ribosome et la protéine TF

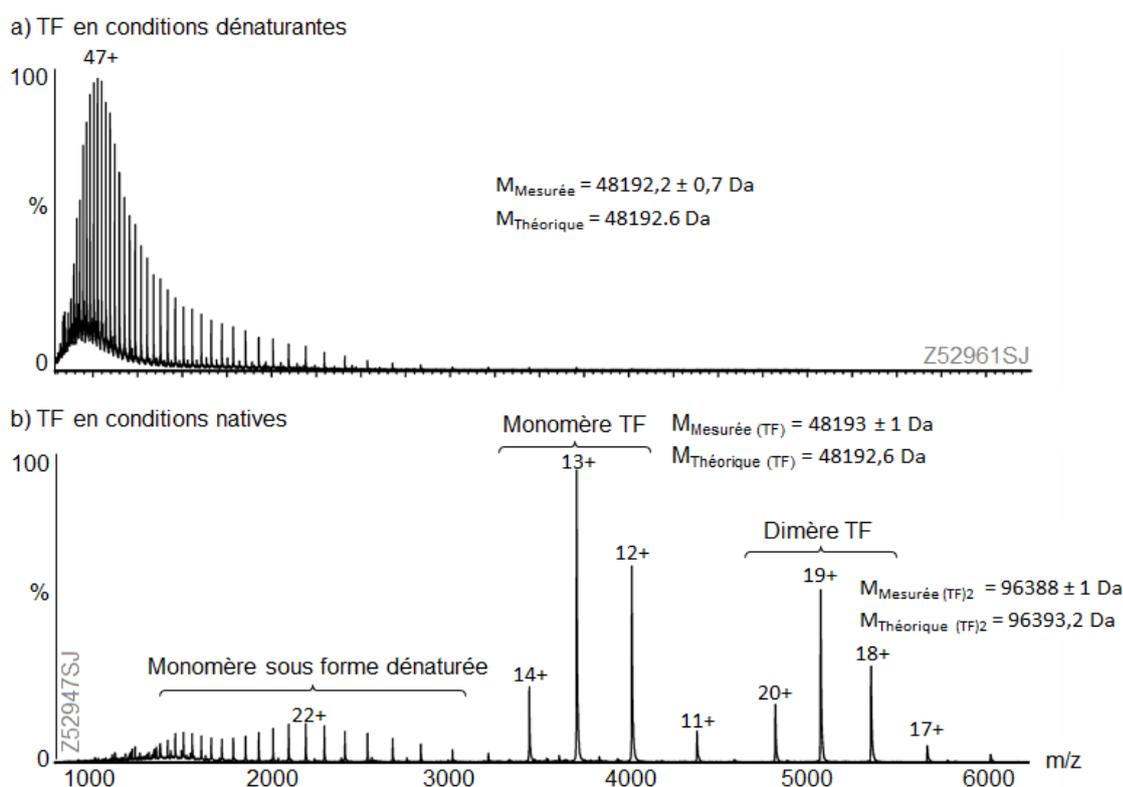
Les spectres de masse obtenus par MS supramoléculaire permettent de déterminer la masse précise des différentes sous-unités du ribosome de *Thermus thermophilus*. Par conséquent, nous avons souhaité étudier les interactions entre le ribosome et une protéine du tunnel de sortie du ribosome : la protéine TF.

Avant d'initier l'étude des interactions protéines/ribosome, il est important de s'assurer que la fixation des protéines peut être mise en évidence sur les spectres de masse compte tenu de la résolution spectrale obtenue sur le ribosome. Dans le cadre de notre étude, la résolution spectrale obtenue nous permet de mettre en évidence la fixation d'une protéine TF sur les sous-unités 30 et

50S par contre, il sera difficile de mettre en évidence la fixation d'une protéine TF sur le ribosome 70S.

### 3.2.1 Étude de la protéine TF participant au tunnel de sortie du ribosome

L'analyse de la protéine TF par MS supramoléculaire en conditions dénaturantes nous a permis de vérifier la masse de la protéine TF ( $M_{\text{mesurée}} = 48\,192.2 \pm 0.7$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 48\,192.6$  Da). En conditions natives, cette protéine est présente à la fois sous forme monomérique ( $M_{\text{mesurée}} = 48\,193 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 48\,193$  Da) et sous forme dimérique ( $M_{\text{mesurée}} = 96\,388 \pm 1$  Da,  $M_{\text{théorique}} = 96\,393$  Da) (Figure 27).



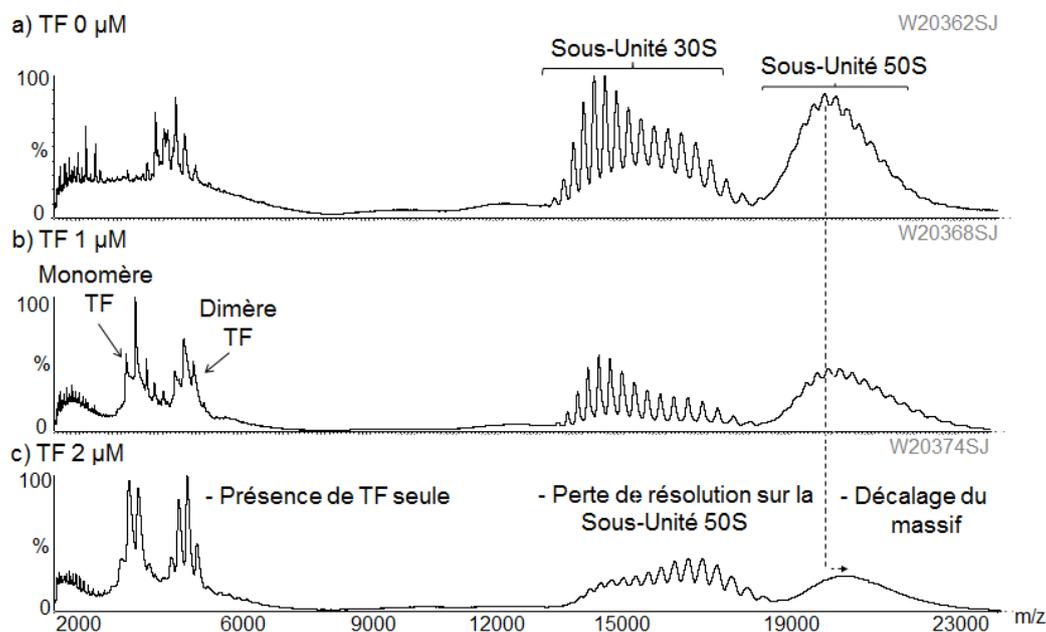
**Figure 27 : Analyse de la protéine TF en conditions dénaturantes et natives.** La protéine TF a été dessalée 2 fois sur colonne Zeba puis diluée à  $2\mu\text{M}$  dans une solution eau/Acétonitrile/acide formique 50/50/1 (a,  $V_c = 40\text{V}$ ,  $P_i = 2$  mbar) ou diluée à  $10\mu\text{M}$  dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  150 mM pH 6.8 (b,  $V_c=140\text{V}$ ,  $P_i = 6$  mbar).

Les spectres de masse de la protéine TF montrent un dessalage correct de l'échantillon ce qui nous permet d'envisager l'étude des interactions entre le ribosome et cette protéine.

### 3.2.2 Interaction entre le ribosome et les protéines du tunnel de sortie du ribosome

L'analyse des interactions entre la protéine TF et les ribosomes de *Thermus thermophilus* et d'*Escherichi coli* a donc été réalisée par MS supramoléculaire dans des conditions permettant d'observer les différents partenaires sur les spectres de masse (Figure 28). En effet, la protéine TF est détectée sous forme de monomère et de dimère dans la gamme des bas  $m/z$  (2 000-6 000) (Figure 28, b et c). Sachant que nous sommes capables de détecter la protéine seule, il est plus facile d'optimiser

notre instrument pour transmettre les ions de hauts rapports  $m/z$  sans pour autant induire la dissociation des interactions non-covalentes en phase gazeuse.



**Figure 28: Étude des interactions entre les ribosomes et la protéine TF du tunnel de sortie du ribosome.** Ribosomes de *Thermus thermophilus* dessalés par 5 cycles d'ultrafiltration sur Amicon 50 kDa, à l'aide d'un tampon  $\text{AcNH}_4$  65 mM contenant 10 mM d' $\text{AcMg}$  puis dilués à 1  $\mu\text{M}$  dans un tampon sans magnésium. Les ribosomes ont été analysés seuls (a) ou en présence de 1  $\mu\text{M}$  (b) ou de 2  $\mu\text{M}$  (c) de protéine TF.  $P_i = 7,5$  bar and  $V_c = 120\text{V}$ .

Lorsque la protéine TF est incubée avec le ribosome de *Thermus thermophilus* (Figure 28, a), une diminution de la résolution spectrale est observée sur les sous-unités 30 et 50S. Bien que la protéine TF soit correctement dessalée, la présence de sels dans l'échantillon conduit à un décalage du massif correspondant à la sous-unité 50S vers les hauts rapports  $m/z$ . La perte de résolution spectrale ne permet plus de déterminer la masse des sous-unités avec précision (Figure 28, c).

Afin de pouvoir étudier des interactions entre un ribosome et des protéines, il est donc essentiel d'obtenir le meilleur dessalage possible des différents partenaires.

Toutefois, il ne semble pas y avoir d'interactions entre la protéine TF et la sous-unité 50S du ribosome. En effet, dans ce cas, le massif correspondant à la sous-unité 50S devrait se situer dans la gamme de  $m/z$  (20 000-23 000).

## 4 Conclusion

Les différentes optimisations réalisées au cours de ce travail de thèse ont permis la détection des ribosomes de *Thermus thermophilus* et d'*Escherichia coli* par MS supramoléculaire. L'analyse de ribosomes est plus complexe que celle de protéines de référence correctement dessalées. En effet, l'ionisation du ribosome nécessite l'utilisation d'aiguilles nanospray au lieu du système d'injection

automatisé. De plus, afin d'assurer une transmission correcte des ions, les paramètres instrumentaux doivent être finement optimisés.

Actuellement, malgré les développements expérimentaux réalisés, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction protéines/ribosome notamment à cause d'un manque de dessalage du ribosome et des protéines testées. Des améliorations devront donc être apportées pour permettre de réaliser l'étude de ces interactions.

Afin de pallier au manque de résolution spectrale, des méthodes d'analyse des ribosomes par IM-MS pourraient être envisagées. Actuellement, la mise en évidence d'un décalage de masse ne peut pas être attribuée avec certitude à la fixation d'une protéine d'intérêt. Par conséquent, l'utilisation du couplage IM-MS permettrait de mettre en évidence un éventuel changement conformationnel lié à la fixation d'une protéine sur le ribosome.

## 5 Valorisation

---

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'une communication par affiche :

Saliou JM, **Petiot-Bécard S**, Fleulaine S, Meinnel T, Van Dorsselaer A, Giglione C et Cianférani S. **Native Mass Spectrometry Approaches for the Analysis of intact Ribosomes and related Protein/Ribosome interactions : interaction between RBPs in absence of ribosomes.** - *Conférences Jacques Monod 2012: The translating ribosome: towards mature proteins. 2-6 Juin 2012, Roscoff.*

## Conclusion de cette partie

L'analyse de protéines de hauts et très hauts poids moléculaires nécessite une optimisation fine de la préparation des échantillons à analyser, mais aussi des paramètres instrumentaux. Lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que l'ultrafiltration permet d'obtenir des meilleurs dessalages pour les protéines de hauts poids moléculaires contrairement à l'analyse de protéines dont la masse est inférieure à 150 kDa. À chaque échantillon correspond une méthode de dessalage et une méthode d'analyse optimale.

Les différentes optimisations réalisées au cours de ce travail nous ont permis d'observer par MS supramoléculaire les différentes sous-unités du ribosome de *Thermus thermophilus* avec une résolution suffisante pour déterminer leurs masses. Toutefois, malgré des échantillons de bonne qualité, nous n'avons pas été capables de mettre en évidence des interactions protéines/ribosome à cause d'une résolution insuffisante lors des expériences d'interaction. Par conséquent, il est important d'améliorer encore la qualité des dessalages pour pouvoir étudier ces interactions par MS supramoléculaire.

Malgré une optimisation fine des paramètres, des pics larges peuvent être obtenus rendant difficile l'interprétation des spectres de masse. Différentes méthodes permettant de faciliter le calcul de masses manuellement ou de façon semi-automatisée ont donc été présentées au cours de cette partie.

Afin de pouvoir approfondir l'étude des complexes de très hauts poids moléculaires, les différents partenaires des complexes devraient pouvoir être identifiés par MS supramoléculaire. Pour cela, des méthodes visant à dissocier, en phase gazeuse, les complexes puis à identifier les différents partenaires obtenus devront être mises en place. Toutefois, ce type d'analyse conduit à des spectres MS complexes et difficiles à interpréter<sup>372</sup>.

Lors de cette étude, nous avons développé des méthodes d'analyses IM-MS pour l'étude de protéines de hauts poids moléculaires. Ces développements méthodologiques ont pour but de simplifier l'interprétation des spectres de masse en présence de mélanges complexes. En effet, le couplage IM-MS pourrait mettre en évidence des changements conformationnels du ribosome en présence d'interactions avec des protéines associées au ribosome.

Les différents développements réalisés en MS supramoléculaire pour l'étude de complexes de très hauts poids moléculaires permettront dans les années à venir de placer cette technique au centre des études de biologie structurale.



## Conclusion générale

---

**Dans la première partie** de ce manuscrit, nous avons réalisé une étude bibliographique qui fait le point sur l'état d'avancement de la MS et de l'IM-MS supramoléculaires pour l'étude des complexes en biologie. Les principaux développements instrumentaux réalisés ces dernières années ont permis d'étendre les possibilités offertes par la MS pour l'étude de complexes intacts en phase gazeuse, mais aussi d'apporter des informations structurales notamment grâce au développement de l'IM-MS.

**Dans une seconde partie**, nous nous sommes intéressés aux optimisations instrumentales et expérimentales nécessaires pour obtenir des informations fiables en MS et en IM-MS. Les différentes étapes qui conditionnent la qualité des analyses réalisées ont été illustrées au travers de différents exemples d'applications.

- La préparation des échantillons en MS supramoléculaire est une étape cruciale pour obtenir des données de bonne qualité. Elle doit être optimisée pour chaque échantillon de manière à préserver l'intégrité des complexes en solution.

- L'optimisation des paramètres instrumentaux est également primordiale. En effet, l'énergie transmise aux ions lors d'analyses MS et IM-MS doit être finement contrôlée pour éviter toute activation des ions en phase gazeuse, tout en conservant une transmission correcte de ces derniers. L'un des objectifs de ce travail de thèse a été de proposer un nouveau schéma d'optimisation adapté à l'instrument de nouvelle génération Synapt HDMS G2

- L'interprétation des données de MS et IM-MS supramoléculaires, qui permet d'accéder à des informations concernant les stœchiométries d'interaction des complexes non-covalents, leurs affinités, leurs spécificités, leurs dynamiques d'assemblage ou encore leurs conformations, reste également délicate.

- Enfin, les potentialités offertes par les deux instruments IM-MS disponibles au laboratoire (Synapt HDMS G1 et G2) ont été comparées au travers de différents exemples d'application, dont l'étude de peptides isobares par IM-MS.

**La troisième partie** de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude des interactions protéine/ligands par MS et IM-MS supramoléculaires. Les différents exemples développés au cours de cette

partie ont permis de mettre en évidence l'apport du couplage IM-MS pour l'étude des interactions protéine/petites molécules.

- La première étude, axée sur la caractérisation des interactions protéine/métal au sein d'une protéine à doigts de zinc, a permis de déterminer la stœchiométrie d'interaction entre cette protéine et un atome de zinc ainsi que la réversibilité de cette fixation. De plus, la combinaison d'approches supramoléculaires à des outils protéomiques nous a permis de déterminer les cystéines impliquées dans la fixation des atomes de zinc.

- Une deuxième étude a été consacrée à l'analyse d'un complexe faisant intervenir des partenaires de natures différentes (protéine, ARN et petite molécule). Cette étude a permis de montrer que la protéine TGT de Mammifères est formée d'un hétérodimère mTGT-mQTRD1 capable d'interagir avec une molécule d'ARNt. De plus, ce modèle nous a permis d'étudier pour la première fois la cinétique de formation d'un complexe protéine/ARNt par MS.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux interactions protéine/petites molécules et plus particulièrement au rôle de l'IM-MS pour la mise en évidence de changements conformationnels fins au travers de deux exemples :

- Dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel du couplage IM-MS sur un système protéine/ligand connu : le système Bcl-xL/ABT-737. Cette étude nous a permis d'étudier de manière exhaustive l'effet des différents paramètres instrumentaux du couplage IM-MS sur la séparation de différentes conformations en phase gazeuse et d'établir un schéma d'optimisation de ces paramètres. De plus, afin de pouvoir comparer nos résultats à d'autres études biophysiques, une nouvelle méthode d'étalonnage en IM-MS a été proposée permettant un calcul plus précis des sections efficaces. Nous avons ainsi réalisé pour la première fois l'étude de changements conformationnels subtils (< 2% en CCS) par IM-MS dans le cas d'interaction protéine/ligands.

- Les différents développements instrumentaux réalisés ont ensuite été appliqués à la caractérisation fine d'un système protéine/ligands inconnus : le système PDF1B/ligands. Cette étude a eu pour but de rechercher de nouveaux inhibiteurs d'une protéine essentielle à la survie des bactéries : la protéine PDF1B. L'analyse détaillée des interactions PDF1B/ligands, par MS supramoléculaire, a permis de classer les ligands en fonction de leur stœchiométrie d'interaction et de leur affinité pour la protéine. Nous avons aussi effectué pour la première fois le suivi de la cinétique de remplacement d'un ligand et ainsi pu valider le modèle de *Slow Tight Binding* proposé par nos collaborateurs. Le couplage IM-MS a ensuite permis de mettre en évidence des changements conformationnels extrêmement fins (environ 1%) en présence de certains ligands. Cette étude nous a permis de montrer l'importance de combiner des analyses IM-MS à des analyses MS pour la

caractérisation fine d'interactions protéine/petites molécules notamment dans le cadre du criblage de ligands.

Le travail décrit dans cette troisième partie a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le contexte du développement de molécules à visée thérapeutique notamment grâce aux développements de méthodes analytiques IM-MS pour l'étude de changements conformationnels fins. Ces différents travaux ont permis de montrer que l'association d'approches de MS supramoléculaire à des approches d'IM-MS permettait une caractérisation fine des systèmes protéine/ligands. La combinaison de ces techniques présente donc un fort potentiel pour le criblage conformationnel rapide de ligands notamment dans l'industrie pharmaceutique.

**La dernière partie** de ce travail de thèse a eu pour objectif de repousser les limites de l'analyse par MS et IM-MS supramoléculaires, en étudiant des complexes de très hauts poids moléculaires (plusieurs millions de daltons). Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'optimisation de la préparation des échantillons de hauts poids moléculaires ainsi qu'à l'optimisation des paramètres instrumentaux (ionisation, transmission et détection) en MS et IM-MS pour l'étude de protéines de très hauts poids moléculaires. Ces optimisations nous ont permis de montrer que le Synapt HDMS G1 était plus adapté que le Synapt HDMS G2 pour l'analyse des complexes de très hauts poids moléculaires.

- L'étude du système Tsa/Srx a permis de montrer que l'utilisation du couplage IM-MS permettait de dé-complexifier l'interprétation de mélanges complexes de hauts poids moléculaires dans des cas où la résolution en MS est insuffisante.

- Une étude préliminaire du ribosome de *Thermus thermophilus* (un complexe de plus de 2 millions de Daltons) a ensuite été engagée. Les différentes optimisations réalisées nous ont permis de mettre en évidence la sous-unité 70S du ribosome de *Thermus thermophilus*. Toutefois, pour le moment nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction protéines/ribosome notamment à cause de la complexité du ribosome et des protéines qui interagissent avec ce dernier. Afin de pallier au manque de résolution spectrale, des méthodes d'analyse des ribosomes par IM-MS pourront être envisagées. Les développements réalisés au cours de ce travail de thèse ont cependant permis d'obtenir des informations essentielles pour l'étude de macro- ou de méga-complexes sur des instruments de nouvelle génération.

L'étude des interactions existant au sein des complexes de très hauts poids moléculaires représente un défi de la biologie structurale. Dans ce contexte, la MS et l'IM-MS supramoléculaires offrent un potentiel intéressant pour la caractérisation structurale de complexes dynamiques, de très hauts poids moléculaires, parfois difficilement analysables par cristallographie. Le travail décrit dans

cette partie a donc permis de développer des stratégies analytiques pour la caractérisation de protéines de très hauts poids moléculaires permettant de répondre aux attentes croissantes des biologistes.

**En conclusion,** ce travail de thèse a été focalisé sur le développement d'approches MS et IM-MS supramoléculaires pour la caractérisation fine des interactions protéine/ligands et pour l'analyse de mélanges protéiques de plus en plus complexes en terme de taille et de composition. Une part importante de ce travail a été consacrée à la maîtrise des instruments de MS supramoléculaire ainsi qu'aux optimisations instrumentales et méthodologiques. Il a ainsi pu être mis en évidence que les développements technologiques récents ont permis d'étendre le potentiel de l'approche MS supramoléculaire pour la caractérisation d'assemblages moléculaires particulièrement complexes. En effet, ce travail a permis de suivre la cinétique de formation de complexes protéine/ligands ainsi que les changements conformationnels qui y sont associés. Ainsi, l'utilisation du couplage IM-MS en recherche pharmaceutique ou dans les processus de « *drug discovery* » permettrait de discriminer rapidement de nouveaux candidats médicaments. Par ailleurs, ce travail a eu pour objectif de s'intéresser à l'étude de protéines de très hauts poids moléculaires et d'évaluer le potentiel de l'IM-MS pour obtenir des informations structurales sur ces complexes. Les différentes collaborations réalisées au cours de ce travail ont permis de repousser certaines limites de la MS et de placer cette technique au cœur des études de biologie structurale. L'amélioration constante des instruments et des méthodes en MS devrait offrir de nouvelles perspectives à cette technique analytique, qui deviendra incontournable pour la caractérisation d'édifices supramoléculaires en biologie.

## Références Bibliographiques

1. Robinson, C.V., Sali, A. and Baumeister, W., *The molecular sociology of the cell*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 973-82.
2. Yamashita, M. and Fenn, J.B., *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. The Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
3. Ganem, B., Li, Y.T. and Henion, J.D., *Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry*. J Am Chem Soc, 1991. **113**(16): p. 6294-6296.
4. Katta, V. and Chait, B.T., *Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1991. **5**(4): p. 214-7.
5. Vivat Hannah, V., Atmanene, C., Zeyer, D., Van Dorsselaer, A. and Sanglier-Cianferani, S., *Native MS: an 'ESI' way to support structure- and fragment-based drug discovery*. Future Med Chem, 2010. **2**(1): p. 35-50.
6. Heck, A.J. and Van Den Heuvel, R.H., *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2004. **23**(5): p. 368-89.
7. Heck, A.J., *Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology*. Nat Methods, 2008. **5**(11): p. 927-33.
8. Sharon, M. and Robinson, C.V., *The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 167-93.
9. Atmanene, C., Chaix, D., Bessin, Y., Declerck, N., Van Dorsselaer, A. and Sanglier-Cianferani, S., *Combination of noncovalent mass spectrometry and traveling wave ion mobility spectrometry reveals sugar-induced conformational changes of central glycolytic genes repressor/DNA complex*. Anal Chem, 2010. **82**(9): p. 3597-605.
10. Jordan, J.D., Landau, E.M. and Iyengar, R., *Signaling Networks: The Origins of Cellular Multitasking*. Cell, 2000. **103**(2): p. 193-200.
11. Landreh, M., Astorga-Wells, J., Johansson, J., Bergman, T. and Jornvall, H., *New developments in protein structure-function analysis by MS and use of hydrogen-deuterium exchange microfluidics*. FEBS J, 2011. **278**(20): p. 3815-21.
12. Zav'yalov, V.P., et al., *Influence of the conserved disulphide bond, exposed to the putative binding pocket, on the structure and function of the immunoglobulin-like molecular chaperone Caf1M of Yersinia pestis*. Biochem J, 1997. **324** ( Pt 2): p. 571-8.
13. Jones, D.P., *Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling*. J Intern Med, 2010. **268**(5): p. 432-448.
14. Ryu, S.E., *Structural mechanism of disulphide bond-mediated redox switches*. J Biochem, 2012. **151**(6): p. 579-588.
15. Israelachvili, J., *Intermolecular and surface forces*. Second Edition ed1992, London.
16. Kuhner, S., et al., *Proteome organization in a genome-reduced bacterium*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1235-40.
17. Rix, U. and Superti-Furga, G., *Target profiling of small molecules by chemical proteomics*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(9): p. 616-24.
18. Shi, W. and Chance, M.R., *Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(1): p. 144-8.
19. Young, N.L., Plazas-Mayorca, M.D. and Garcia, B.A., *Systems-wide proteomic characterization of combinatorial post-translational modification patterns*. Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(1): p. 79-92.
20. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 528-39.
21. Torrerri, P., Ceccarini, M., Macioce, P. and Petrucci, T.C., *Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology*. Ann Ist Super Sanita, 2005. **41**(4): p. 437-41.
22. Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., Manghani, C. and Rani, V., *DNA-protein interactions: methods for detection and analysis*. Mol Cell Biochem, 2012. **365**(1-2): p. 279-99.

23. Yan, Y. and Marriott, G., *Analysis of protein interactions using fluorescence technologies*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. **7**(5): p. 635-640.
24. Sun, Y., Day, R.N. and Periasamy, A., *Investigating protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy*. *Nat. Protocols*, 2011. **6**(9): p. 1324-1340.
25. Duff, J.M.R., Grubbs, J. and Howell, E.E., *Isothermal Titration Calorimetry for Measuring Macromolecule-Ligand Affinity*. *J Vis Exp*, 2011(55): p. e2796.
26. Ghai, R., Falconer, R.J. and Collins, B.M., *Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research—survey of the literature from 2010*. *Journal of Molecular Recognition*, 2012. **25**(1): p. 32-52.
27. Guilbaud, J.-B. and Saiani, A., *Using small angle scattering (SAS) to structurally characterise peptide and protein self-assembled materials*. *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(3): p. 1200-1210.
28. Lipfert, J. and Doniach, S., *Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007. **36**: p. 307-27.
29. Svergun, D.I. and Koch, M.H., *Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution*. *Curr Opin Struct Biol*, 2002. **12**(5): p. 654-60.
30. Taylor, K.A. and Glaeser, R.M., *Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on opportunities for the future*. *J Struct Biol*, 2008. **163**(3): p. 214-223.
31. Wilson, D.N. and Doudna Cate, J.H., *The structure and function of the eukaryotic ribosome*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(5).
32. Orlova, E.V. and Saibil, H.R., *Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy*. *Chemical Reviews*, 2011. **111**(12): p. 7710-7748.
33. Meyer, B. and Peters, T., *NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. **42**(8): p. 864-90.
34. Foster, M.P., McElroy, C.A. and Amero, C.D., *Solution NMR of large molecules and assemblies*. *Biochemistry*, 2007. **46**(2): p. 331-40.
35. Kleckner, I.R. and Foster, M.P., *An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2011. **1814**(8): p. 942-968.
36. Renaud, J.P. and Delsuc, M.A., *Biophysical techniques for ligand screening and drug design*. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. **9**(5): p. 622-8.
37. Alber, F., Kim, M.F. and Sali, A., *Structural Characterization of Assemblies from Overall Shape and Subcomplex Compositions*. *Structure (London, England : 1993)*, 2005. **13**(3): p. 435-445.
38. Russel, D., Lasker, K., Phillips, J., Schneidman-Duhovny, D., Velazquez-Muriel, J.A. and Sali, A., *The structural dynamics of macromolecular processes*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(1): p. 97-108.
39. Chalmers, M.J., Busby, S.A., Pascal, B.D., West, G.M. and Griffin, P.R., *Differential hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry analysis of protein-ligand interactions*. *Expert Rev Proteomics*, 2011. **8**(1): p. 43-59.
40. Engen, J.R., *Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS*. *Anal Chem*, 2009. **81**(19): p. 7870-5.
41. Englander, S.W., *Hydrogen exchange and mass spectrometry: A historical perspective*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006. **17**(11): p. 1481-9.
42. Kaltashov, I.A., Bobst, C.E. and Abzalimov, R.R., *H/D exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamics: is there a need for a top-down approach?* *Anal Chem*, 2009. **81**(19): p. 7892-9.
43. Konermann, L., Pan, J. and Liu, Y.H., *Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics*. *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(3): p. 1224-34.
44. Jin Lee, Y., *Mass spectrometric analysis of cross-linking sites for the structure of proteins and protein complexes*. *Mol Biosyst*, 2008. **4**(8): p. 816-23.
45. Leitner, A., Walzthoeni, T., Kahraman, A., Herzog, F., Rinner, O., Beck, M. and Aebersold, R., *Probing Native Protein Structures by Chemical Cross-linking, Mass Spectrometry, and Bioinformatics*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2010. **9**(8): p. 1634-1649.
46. Petrotchenko, E.V. and Borchers, C.H., *Crosslinking combined with mass spectrometry for structural proteomics*. *Mass Spectrom Rev*, 2010. **29**(6): p. 862-76.
47. Konermann, L., Stocks, B.B., Pan, Y. and Tong, X., *Mass spectrometry combined with oxidative labeling for exploring protein structure and folding*. *Mass Spectrom Rev*, 2010. **29**(4): p. 651-67.

48. Kiselar, J.G. and Chance, M.R., *Future directions of structural mass spectrometry using hydroxyl radical footprinting*. J Mass Spectrom, 2010. **45**(12): p. 1373-82.
49. Hubbard, S.J., *The structural aspects of limited proteolysis of native proteins*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1382**(2): p. 191-206.
50. Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P. and Zamboni, M., *Probing protein structure by limited proteolysis*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(2): p. 299-321.
51. Yates, J.R., Ruse, C.I. and Nakorchevsky, A., *Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications*. Annu Rev Biomed Eng, 2009. **11**: p. 49-79.
52. Gingras, A.C., Gstaiger, M., Raught, B. and Aebersold, R., *Analysis of protein complexes using mass spectrometry*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 645-54.
53. Uetrecht, C., Rose, R.J., van Duijn, E., Lorenzen, K. and Heck, A.J., *Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies*. Chem Soc Rev, 2010. **39**(5): p. 1633-55.
54. Gundry, R.L., White, M.Y., Murray, C.I., Kane, L.A., Fu, Q., Stanley, B.A. and Van Eyk, J.E., *Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow*. Curr Protoc Mol Biol, 2009. **Chapter 10**: p. Unit10 25.
55. Kelleher, N.L., *Top-down proteomics*. Anal Chem, 2004. **76**(11): p. 197A-203A.
56. Sowell, R.A., Koeniger, S.L., Valentine, S.J., Moon, M.H. and Clemmer, D.E., *Nanoflow LC/IMS-MS and LC/IMS-CID/MS of protein mixtures*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(9): p. 1341-53.
57. Baker, E.S., et al., *An LC-IMS-MS platform providing increased dynamic range for high-throughput proteomic studies*. J Proteome Res, 2010. **9**(2): p. 997-1006.
58. Taraszka, J.A., Kurulugama, R., Sowell, R.A., Valentine, S.J., Koeniger, S.L., Arnold, R.J., Miller, D.F., Kaufman, T.C. and Clemmer, D.E., *Mapping the Proteome of Drosophila melanogaster: Analysis of Embryos and Adult Heads by LC-IMS-MS Methods*. J Proteome Res, 2005. **4**(4): p. 1223-1237.
59. Jurneczko, E. and Barran, P.E., *How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? The relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase*. Analyst, 2011. **136**(1): p. 20-8.
60. Rizzo, T.R., Stearns, J.A. and Boyarkin, O.V., *Spectroscopic studies of cold, gas-phase biomolecular ions*. International Reviews in Physical Chemistry, 2009. **28**(3): p. 481-515.
61. Rand, K.D., Adams, C.M., Zubarev, R.A. and Jorgensen, T.J., *Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(4): p. 1341-9.
62. Pan, J., Han, J., Borchers, C.H. and Konermann, L., *Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(35): p. 12801-8.
63. Zhang, J., Chalmers, M.J., Stayrook, K.R., Burris, L.L., Garcia-Ordonez, R.D., Pascal, B.D., Burris, T.P., Dodge, J.A. and Griffin, P.R., *Hydrogen/Deuterium Exchange Reveals Distinct Agonist/Partial Agonist Receptor Dynamics within Vitamin D Receptor/Retinoid X Receptor Heterodimer*. Structure (London, England : 1993), 2010. **18**(10): p. 1332-1341.
64. West, Graham M., Chien, Ellen Y.T., Katritch, V., Gatchalian, J., Chalmers, Michael J., Stevens, Raymond C. and Griffin, Patrick R., *Ligand-Dependent Perturbation of the Conformational Ensemble for the GPCR <sup>22</sup> Adrenergic Receptor Revealed by HDX*. Structure (London, England : 1993), 2011. **19**(10): p. 1424-1432.
65. Morgan, C.R., Hebling, C.M., Rand, K.D., Stafford, D.W., Jorgenson, J.W. and Engen, J.R., *Conformational Transitions in the Membrane Scaffold Protein of Phospholipid Bilayer Nanodiscs*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(9).
66. Pan, J., Han, J., Borchers, C.H. and Konermann, L., *Characterizing short-lived protein folding intermediates by top-down hydrogen exchange mass spectrometry*. Anal Chem, 2010. **82**(20): p. 8591-7.
67. Zhang, X., Chien, E.Y., Chalmers, M.J., Pascal, B.D., Gatchalian, J., Stevens, R.C. and Griffin, P.R., *Dynamics of the beta2-adrenergic G-protein coupled receptor revealed by hydrogen-deuterium exchange*. Anal Chem, 2010. **82**(3): p. 1100-8.
68. Mendoza, V.L. and Vachet, R.W., *Probing protein structure by amino acid-specific covalent labeling and mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2009. **28**(5): p. 785-815.
69. Rappsilber, J., *The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes*. J Struct Biol, 2011. **173**(3): p. 530-40.

70. Vasilescu, J., Guo, X. and Kast, J., *Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3845-3854.
71. Petrotchenko, E.V., Xiao, K., Cable, J., Chen, Y., Dokholyan, N.V. and Borchers, C.H., *BiPS, a photocleavable, isotopically coded, fluorescent cross-linker for structural proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(2): p. 273-86.
72. Griffiths, J., *A brief history of mass spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(15): p. 5678-83.
73. Hilton, G.R. and Benesch, J.L., *Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry*. J R Soc Interface, 2012. **9**(70): p. 801-16.
74. Yamashita, M. and Fenn, J., *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. Journal of Physical Chemistry, 1984. **80**: p. 4451.
75. Dole, M., Mack, L., Hines, R., Mobley, R., Ferguson, L. and Alice, M., *Molecular Beams of Macroions*. The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**: p. 2240-2249.
76. Dodonov, A., Chernushevich, I., Dodonova, T., Raznikov, V. and Talrose, V., 1987, February 25.
77. Wilm, M. and Mann, M., *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source*. Anal Chem, 1996. **68**(1): p. 1-8.
78. Xue, Q., Foret, F., Dunayevskiy, Y.M., Zavracky, P.M., McGruer, N.E. and Karger, B.L., *Multichannel microchip electrospray mass spectrometry*. Anal Chem, 1997. **69**(3): p. 426-30.
79. Ramsey, R.S. and Ramsey, J.M., *Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(13): p. 2617-2617.
80. Schultz, G.A., Corso, T.N., Prosser, S.J. and Zhang, S., *A Fully Integrated Monolithic Microchip Electrospray Device for Mass Spectrometry*. Anal Chem., 2000. **72**(17): p. 4058-4063.
81. Van Pelt, C.K., Zhang, S. and Henion, J.D., *Characterization of a fully automated nanoelectrospray system with mass spectrometric detection for proteomic analyses*. J Biomol Tech, 2002. **13**(2): p. 72-84.
82. McDaniel, E.W., Martin, D.W. and Barnes, W.S., *Drift Tube Mass Spectrometer for Studies of Low Energy Ion Molecule Reactions*. Rev. Sci.Instrum., 1962. **33**: p. 2-7.
83. Kebarle, P. and Hogg, A.M., *Mass Spectrometric Study of Ions at Near Atmospheric Pressures. I. The Ionic Polymerization of Ethylene*. J. Chem. Phys., 1965. **42**: p. 668-674.
84. Cohen, M.J. and Karasek, F.W., *Plasma Chromatography™—A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. Journal of Chromatographic Science, 1970. **8**(6): p. 330-337.
85. Karasek, F.W. and Fong, I., *Analysis of Chlorinated Benzene Compounds by Gas Chromatography*. Journal of Chromatographic Science, 1971. **9**(8): p. 497-499.
86. Mason, E.A. and McDaniel, E.W., *Transport Properties of Ions in Gases* 1988, New-York.
87. McDaniel, E.W., *Collision Phenomena in Ionized Gases* 1964, New-York.
88. Kemper, P.R. and Bowers, M.T., *A hybrid double-focusing mass spectrometer—high-pressure drift reaction cell to study thermal energy reactions of mass-selected ions*. J Am Soc Mass Spectrom, 1990. **1**(3): p. 197-207.
89. Dugourd, P., Hudgins, R.R., Clemmer, D.E. and Jarrold, M.F., *High-resolution ion mobility measurements*. Rev. Sci. Instrum., 1997. **68**: p. 1122-1129.
90. Bohringer, H. and Arnold, F., *Temperature dependence of three-body association reactions from 45 to 400 K. The reactions  $N_2 + N_2 \rightarrow N_4$  and  $O_2 + O_2 \rightarrow O_4$* . J. Chem. Phys. , 1982. **77**: p. 5534-5541.
91. Clemmer, D.E. and Jarrold, M.F., *Ion Mobility Measurements and their Applications to Clusters and Biomolecules*. J. Mass Spectrom., 1997. **32**: p. 577-592.
92. Hudgins, R.R., Ratner, M.A. and Jarrold, M.F., *Design of Helices That Are Stable in Vacuo*. J. Am. Chem.Soc., 1998. **120**: p. 12974-12975.
93. Johnsen, R., Brown, H.L. and Manfred, A.B., *Ion-Molecule Reactions Involving  $N_2^+$ ,  $N^+$ ,  $O_2^+$  and  $O^+$  Ions from 300°K to ~ 1 eV*. J. Chem. Phys., 1970. **52**: p. 5080-5084.
94. Thomson, G.M., Schummers, J.H., James, D.R., Graham, E., Gatland, I.R., Flannery, M.R. and McDaniel, E.W., *Mobility, Diffusion and Clustering of  $K^+$  ions in gases*. J. Chem.Phys., 1973. **58**: p. 2402-2411.
95. McAfee, K.B., Sipler, D. and Edelson, D., *Mobilities and. Reactions of Ions in Argon*. Phys. Rev., 1967. **160**: p. 130-135.
96. McKnight, L.G., McAfee, K.B. and Sipler, D.P., *Low- Field Drift Velocities and Reactions of Nitrogen Ions in Nitrogen*. Phys. Rev., 1967. **164**: p. 62-70

97. Kanu, A.B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L. and Hill, H.H., Jr., *Ion mobility-mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2008. **43**(1): p. 1-22.
98. Pringle, S.D., Giles, K., Wildgoose, J.L., Williams, J.P., Slade, S.E., Thalassinou, K., Bateman, R.H., Bowers, M.T. and Scrivens, J.H., *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.
99. Ruotolo, B.T., Giles, K., Campuzano, I., Sandercock, A.M., Bateman, R.H. and Robinson, C.V., *Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1658-61.
100. Baca, M. and Kent, S.B.H., *Direct observation of a ternary complex between the dimeric enzyme HIV-1 protease and a substrate-based inhibitor*. J. Am. Chem. Soc., 1992. **114** p. 3992-3993.
101. Benesch, J.L., Ruotolo, B.T., Simmons, D.A. and Robinson, C.V., *Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics*. Chem Rev, 2007. **107**(8): p. 3544-67.
102. Sobott, F., Hernandez, H., McCammon, M.G., Tito, M.A. and Robinson, C.V., *A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies*. Anal Chem, 2002. **74**(6): p. 1402-7.
103. Benesch, J.L., *Collisional activation of protein complexes: picking up the pieces*. J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(3): p. 341-8.
104. Ilag, L.L., Videler, H., McKay, A.R., Sobott, F., Fucini, P., Nierhaus, K.H. and Robinson, C.V., *Heptameric (L12)6/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8192-7.
105. Lorenzen, K., Olia, A.S., Uetrecht, C., Cingolani, G. and Heck, A.J., *Determination of stoichiometry and conformational changes in the first step of the P22 tail assembly*. J Mol Biol, 2008. **379**(2): p. 385-96.
106. Uetrecht, C., Barbu, I.M., Shoemaker, G.K., van Duijn, E. and Heck, A.J., *Interrogating viral capsid assembly with ion mobility-mass spectrometry*. Nat Chem, 2011. **3**(2): p. 126-32.
107. Ilag, L.L., Ubarretxena-Belandia, I., Tate, C.G. and Robinson, C.V., *Drug binding revealed by tandem mass spectrometry of a protein-micelle complex*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(44): p. 14362-3.
108. Barrera, N.P., Di Bartolo, N., Booth, P.J. and Robinson, C.V., *Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum*. Science, 2008. **321**(5886): p. 243-6.
109. Bernstein, S.L., et al., *Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease*. Nat Chem, 2009. **1**(4): p. 326-31.
110. Fandrich, M., Tito, M.A., Leroux, M.R., Rostom, A.A., Hartl, F.U., Dobson, C.M. and Robinson, C.V., *Observation of the noncovalent assembly and disassembly pathways of the chaperone complex MtGimC by mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14151-5.
111. Kloniecki, M., Jablonowska, A., Poznanski, J., Langridge, J., Hughes, C., Campuzano, I., Giles, K. and Dadlez, M., *Ion mobility separation coupled with MS detects two structural states of Alzheimer's disease Abeta1-40 peptide oligomers*. J Mol Biol, 2011. **407**(1): p. 110-24.
112. Vis, H., Dobson, C.M. and Robinson, C.V., *Selective association of protein molecules followed by mass spectrometry*. Protein Sci, 1999. **8**(6): p. 1368-70.
113. Hyung, S.J. and Ruotolo, B.T., *Integrating mass spectrometry of intact protein complexes into structural proteomics*. Proteomics, 2012. **12**(10): p. 1547-64.
114. Benesch, J.L. and Ruotolo, B.T., *Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(5): p. 641-9.
115. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804-817.
116. Kebarle, P. and Peschke, M., *On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions*. Anal Chim Acta, 2000. **406**(1): p. 11-35.
117. Kebarle, P. and Tang, L., *From ions in solution to ions in the gas phase*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(22): p. 972A-986A.
118. Kebarle, P. and Verkerk, U.H., *Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass Spectrom Rev, 2009. **28**(6): p. 898-917.
119. Fernández de la Mora, J., *The Fluid Dynamics of Taylor Cones*. Annual Review of Fluid Mechanics, 2007. **39**(1): p. 217-243.
120. Rayleigh, L., XX. *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Philosophical Magazine Series 5, 1882. **14**(87): p. 184-186.

121. Gomez, A. and Tang, K., *Charge and fission of droplets in electrostatic sprays*. Physics of Fluids, 1994. **6**(1): p. 404-414.
122. Iribarne, J.V. and Thomson, B.A., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J Chem Phys, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
123. Thomson, B.A. and Iribarne, J.V., *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure*. J Chem Phys, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
124. Ikonomou, M.G., Blades, A.T. and Kebarle, P., *Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(18): p. 1989-1998.
125. Wilm, M. and Mann, M., *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1994. **136**: p. 167-180.
126. De la Mora, J.F. and Loscertales, I.G., *The current emitted by highly conducting Taylor cones*. Journal of Fluid Mechanics, 1994. **260**: p. 155-184.
127. Pfeifer, R.J. and Hendricks, C.D., *Parametric studies of electrohydrodynamic spraying*. AIAA Journal, 1968. **6**: p. 496-502.
128. Bahr, U., Pfenninger, A., Karas, M. and Stahl, B., *High-Sensitivity Analysis of Neutral Underivatized Oligosaccharides by Nano-electrospray Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): p. 4530-4535.
129. Juraschek, R., Dulcks, T. and Karas, M., *Nano-electrospray--more than just a minimized-flow electrospray ionization source*. J Am Soc Mass Spectrom, 1999. **10**(4): p. 300-8.
130. Karas, M., Bahr, U. and Dulcks, T., *Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine*. Fresenius J Anal Chem, 2000. **366**(6-7): p. 669-76.
131. Sung, W.C., Makamba, H. and Chen, S.H., *Chip-based microfluidic devices coupled with electrospray ionization-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2005. **26**(9): p. 1783-91.
132. Koster, S. and Verpoorte, E., *A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: an overview*. Lab Chip, 2007. **7**(11): p. 1394-412.
133. Lazar, I.M., Grym, J. and Foret, F., *Microfabricated devices: A new sample introduction approach to mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2006. **25**(4): p. 573-94.
134. Benkestock, K., Van Pelt, C.K., Akerud, T., Sterling, A., Edlund, P.O. and Roeraade, J., *Automated nano-electrospray mass spectrometry for protein-ligand screening by noncovalent interaction applied to human H-FABP and A-FABP*. J Biomol Screen, 2003. **8**(3): p. 247-56.
135. Jecklin, M.C., Touboul, D., Bovet, C., Wortmann, A. and Zenobi, R., *Which electrospray-based ionization method best reflects protein-ligand interactions found in solution? a comparison of ESI, nanoESI, and ESSI for the determination of dissociation constants with mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2008. **19**(3): p. 332-43.
136. Zhang, S. and Van Pelt, C.K., *Chip-based nano-electrospray mass spectrometry for protein characterization*. Expert Rev Proteomics, 2004. **1**(4): p. 449-68.
137. Douglas, D.J., *Applications of Collision Dynamics in Quadrupole Mass Spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 1998. **9**(2): p. 101-113.
138. Krutchinsky, A.N., Chernushevich, I.V., Spicer, V.L., Ens, W. and Standing, K.G., *Collisional Damping Interface for an Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom, 1998. **9**(6): p. 569-579.
139. Douglas, D.J. and French, J.B., *Collisional focusing effects in radio frequency quadrupoles*. . Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1992. **3**: p. 398-408.
140. Chernushevich, I.V. and Thomson, B.A., *Collisional cooling of large ions in electrospray mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(6): p. 1754-60.
141. Standing, K.G., *Timing the flight of biomolecules: a personal perspective*. International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **200**(1): p. 597-610.
142. Tahallah, N., Pinkse, M., Maier, C.S. and Heck, A.J., *The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001. **15**(8): p. 596-601.
143. Sanglier, S., Ramström, H., Haiech, J., Leize, E. and Dorselaer, A.V., *Electrospray ionization mass spectrometry analysis revealed a ~310 kDa noncovalent hexamer of HPr kinase/phosphatase from Bacillus subtilis*. International Journal of Mass Spectrometry, 2002. **219**(3): p. 681-696.
144. Schmidt, A., Bahr, U. and Karas, M., *Influence of pressure in the first pumping stage on analyte desolvation and fragmentation in nano-ESI MS*. Anal Chem, 2001. **73**(24): p. 6040-6.

145. Gerlich, D., *Inhomogeneous RF Fields: A Versatile Tool for the Study of Processes with Slow Ions*, in *Advances in Chemical Physics* 2007, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-176.
146. Campana, J.E., *Elementary theory of the quadrupole mass filter*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, 1980. **33**(2): p. 101-117.
147. He, J., Yu, Q., Li, L., Hang, W. and Huang, B., *Characteristics and comparison of different radiofrequency-only multipole cooling cells*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(20): p. 3327-33.
148. Lorenzen, K., Versluis, C., van Duijn, E., van den Heuvel, R.H.H. and Heck, A.J.R., *Optimizing macromolecular tandem mass spectrometry of large non-covalent complexes using heavy collision gases*. International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **268**(2-3): p. 198-206.
149. Luca, A., Schlemmer, S., Čermák, I. and Gerlich, D., *On the combination of a linear field free trap with a time-of-flight mass spectrometer*. Review of Scientific Instruments, 2001. **72**(7): p. 2900.
150. Landau, L.D. and Lifshitz, E.M., *Mechanics*. Vol. Third Edition. 1976, New York.
151. Guan, S. and Marshall, A., *Stacked-ring electrostatic ion guide*. J Am Soc Mass Spectrom, 1996. **7**(1): p. 101-106.
152. Tolmachev, A.V., Kim, T., Udseth, H.R., Smith, R.D., Bailey, T.H. and Futrell, J.H., *Simulation-based optimization of the electrodynamic ion funnel for high sensitivity electrospray ionization mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **203**(1): p. 31-47.
153. Giles, K., Pringle, S.D., Worthington, K.R., Little, D., Wildgoose, J.L. and Bateman, R.H., *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(20): p. 2401-14.
154. Kirchner, N., *Ion processing: control and analysis*, 1993.
155. Koppelaar, D.W., Eiden, G.C. and Barinaga, C.J., *Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004. **19**(5): p. 561.
156. Gerlich, D., *Applications of rf fields and collision dynamics in atomic mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004. **19**(5): p. 581.
157. Wiley, W.C. and McLaren, J.B., *Time of flight mass spectrometer with improved resolution* Rev. Sci. Instrum., 1955. **26**: p. 1150-1157.
158. Dawson, J.H.J. and Guilhaus, M., *Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1989. **3**(5): p. 155-159.
159. Mamyurin, B., Karataev, V., Shmikk, D. and Zagulin, V., *The mass reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution*. . Soviet Physics - Journal of Experimental and Theoretical Physics, 1973. **37**: p. 45.
160. Wiza, J.L., *Microchannel plate detectors*. . Nuclear Instruments and Methods., 1979. **162**: p. 587-601.
161. Kume, H., Nakatsugawa, K., Suzuki, S. and Fatlowitz, D., *Ultrafast microchannel plate photomultipliers*. . Applied Optics, 1988. **27**(6): p. 1170.
162. Guilhaus, M., Selby, D. and Mlynski, V., *Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2000. **19**(2): p. 65-107.
163. Benari, Y., Hunter, K., Raffin, P., Sheils, W. and Stresau, R., *Particle detection by electron multiplication*, 2006.
164. De Hoffmann, E. and Stroobant, V., *Spectrométrie de masse* 3ème ed 2005, PARIS: DUNOD. 425.
165. Eiceman, G.A. and Karpas, Z., *Ion Mobility Spectrometry*. Second Edition ed 2005, FL: CRC Press, Boca Raton.
166. Guevremont, R., *High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry: a new tool for mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2004. **1058**(1-2): p. 3-19.
167. Kolakowski, B.M. and Mester, Z., *Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS)*. Analyst, 2007. **132**(9): p. 842-64.
168. Zimmermann, S., Abel, N., Baether, W. and Barth, S., *An ion-focusing aspiration condenser as an ion mobility spectrometer*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007. **125**(2): p. 428-434.
169. Michaelevski, I., Kirshenbaum, N. and Sharon, M., *T-wave ion mobility-mass spectrometry: basic experimental procedures for protein complex analysis*. J Vis Exp, 2010(41).
170. Shvartsburg, A.A. and Smith, R.D., *Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(24): p. 9689-99.

171. Smith, D.P., Knapman, T.W., Campuzano, I., Malham, R.W., Berryman, J.T., Radford, S.E. and Ashcroft, A.E., *Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies*. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng), 2009. **15**(2): p. 113-30.
172. Guo, Y., Wang, J., Javahery, G., Thomson, B.A. and Siu, K.W., *Ion mobility spectrometer with radial collisional focusing*. Anal Chem, 2005. **77**(1): p. 266-75.
173. Javahery, G. and Thomson, B., *A segmented radiofrequency-only quadrupole collision cell for measurements of ion collision cross section on a triple quadrupole mass spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom, 1997. **8**(7): p. 697-702.
174. Lee, Y.J., Hoaglund-Hyzer, C.S., Taraszka, J.A., Zientara, G.A., Counterman, A.E. and Clemmer, D.E., *Collision-induced dissociation of mobility-separated ions using an orifice-skimmer cone at the back of a drift tube*. Anal Chem, 2001. **73**(15): p. 3549-55.
175. Merenbloom, S.I., Koeniger, S.L., Valentine, S.J., Plasencia, M.D. and Clemmer, D.E., *IMS-IMS and IMS-IMS-IMS/MS for separating peptide and protein fragment ions*. Anal Chem, 2006. **78**(8): p. 2802-9.
176. Tang, K., Shvartsburg, A.A., Lee, H.N., Prior, D.C., Buschbach, M.A., Li, F., Tolmachev, A.V., Anderson, G.A. and Smith, R.D., *High-sensitivity ion mobility spectrometry/mass spectrometry using electrodynamic ion funnel interfaces*. Anal Chem, 2005. **77**(10): p. 3330-9.
177. Bush, M.F., Hall, Z., Giles, K., Hoyes, J., Robinson, C.V. and Ruotolo, B.T., *Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology*. Anal Chem, 2010. **82**(22): p. 9557-65.
178. Zhou, M., et al., *Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18139-44.
179. Politis, A., Park, A.Y., Hyung, S.J., Barsky, D., Ruotolo, B.T. and Robinson, C.V., *Integrating ion mobility mass spectrometry with molecular modelling to determine the architecture of multiprotein complexes*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12080.
180. Tao, L., Dahl, D.B., Perez, L.M. and Russell, D.H., *The contributions of molecular framework to IMS collision cross-sections of gas-phase peptide ions*. J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(9): p. 1593-602.
181. Dupuis, N.F., Wu, C., Shea, J.-E. and Bowers, M.T., *The Amyloid Formation Mechanism in Human IAPP: Dimers Have  $\beta$ -Strand Monomer-Monomer Interfaces*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(19): p. 7240-7243.
182. Gangqiang, L., *Ion mobility spectrometer with high ion transmission efficiency*, 2002.
183. Atmanene, C., *Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire*, 2009, Université de Strasbourg: Strasbourg.
184. Thalassinos, K., Slade, S.E., Jennings, K.R., Scrivens, J.H., Giles, K., Wildgoose, J., Hoyes, J., Bateman, R.H. and Bowers, M.T., *Ion mobility mass spectrometry of proteins in a modified commercial mass spectrometer*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004. **236**(1-3): p. 55-63.
185. Giles, K., Williams, J.P. and Campuzano, I., *Enhancements in travelling wave ion mobility resolution*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011. **25**(11): p. 1559-66.
186. Giles, K., Wildgoose, J.L., Langridge, D.J. and Campuzano, I., *A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide*. International Journal of Mass Spectrometry, 2010. **298**(1-3): p. 10-16.
187. Beck, J.L., Colgrave, M.L., Ralph, S.F. and Sheil, M.M., *Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins*. Mass Spectrom Rev, 2001. **20**(2): p. 61-87.
188. Lemaire, D., Marie, G., Serani, L. and Laprevote, O., *Stabilization of gas-phase noncovalent macromolecular complexes in electrospray mass spectrometry using aqueous triethylammonium bicarbonate buffer*. Anal Chem, 2001. **73**(8): p. 1699-706.
189. Jaquinod, M., Leize, E., Potier, N., Albrecht, A.-M., Shanzer, A. and Van Dorsselaer, A., *Characterisation of non-covalent complexes by electrospray mass spectrometry*. Tetrahedron Letters, 1993. **34**(17): p. 2771-2774.
190. Sanglier, S., Atmanene, C., Chevreux, G. and Dorsselaer, A.V., *Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries*. Methods Mol Biol, 2008. **484**: p. 217-43.

191. Bernstein, S.L., Liu, D., Wytttenbach, T., Bowers, M.T., Lee, J.C., Gray, H.B. and Winkler, J.R., *Alpha-synuclein: stable compact and extended monomeric structures and pH dependence of dimer formation*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(10): p. 1435-43.
192. Mendes, M.A., Chies, J.M., Dias, A.C.d.O., Filho, S.A. and Palma, M.S., *The shielding effect of glycerol against protein ionization in electrospray mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(7): p. 672-677.
193. Sterling, H.J., Prell, J.S., Cassou, C.A. and Williams, E.R., *Protein conformation and supercharging with DMSO from aqueous solution*. J Am Soc Mass Spectrom, 2011. **22**(7): p. 1178-86.
194. Kapur, A., Beck, J.L., Brown, S.E., Dixon, N.E. and Sheil, M.M., *Use of electrospray ionization mass spectrometry to study binding interactions between a replication terminator protein and DNA*. Protein Sci, 2002. **11**(1): p. 147-57.
195. Waters, *Q-ToF Premier Operator's Guide*. 2005.
196. Bagal, D., Valliere-Douglass, J.F., Balland, A. and Schnier, P.D., *Resolving disulfide structural isoforms of IgG2 monoclonal antibodies by ion mobility mass spectrometry*. Anal Chem, 2010. **82**(16): p. 6751-5.
197. Pukala, T.L., Ruotolo, B.T., Zhou, M., Politis, A., Stefanescu, R., Leary, J.A. and Robinson, C.V., *Subunit architecture of multiprotein assemblies determined using restraints from gas-phase measurements*. Structure, 2009. **17**(9): p. 1235-43.
198. Ruotolo, B.T., Benesch, J.L., Sandercock, A.M., Hyung, S.J. and Robinson, C.V., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1139-52.
199. Wytttenbach, T., Paizs, B., Barran, P., Brechi, L., Liu, D., Suhai, S., Wysocki, V.H. and Bowers, M.T., *The Effect of the Initial Water of Hydration on the Energetics, Structures, and H/D Exchange Mechanism of a Family of Pentapeptides: An Experimental and Theoretical Study*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(45): p. 13768-13775.
200. Bohrer, B.C., Merenbloom, S.I., Koeniger, S.L., Hilderbrand, A.E. and Clemmer, D.E., *Biomolecule analysis by ion mobility spectrometry*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2008. **1**: p. 293-327.
201. Morsa, D., Gabelica, V. and De Pauw, E., *Effective temperature of ions in traveling wave ion mobility spectrometry*. Anal Chem, 2011. **83**(14): p. 5775-82.
202. Shvartsburg, A.A. and Jarrold, M.F., *An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions*. Chemical Physics Letters, 1996. **261**: p. 86-91.
203. Mesleh, M.F., Hunter, J.M., Shvartsburg, A.A., Schatz, G.C. and Jarrold, M.F., *Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential*. Journal of Physical Chemistry 1996. **100**: p. 16082-16086.
204. Bleiholder, C., Wytttenbach, T. and Bowers, M.T., *A novel projection approximation algorithm for the fast and accurate computation of molecular collision cross sections (I). Method*. International Journal of Mass Spectrometry, 2011. **308**(1): p. 1-10.
205. Wytttenbach, T., von Helden, G., Batka, J., Carlat, D. and Bowers, M., *Effect of the long-range potential on ion mobility measurements*. J Am Soc Mass Spectrom, 1997. **8**(3): p. 275-282.
206. Wytttenbach, T., Witt, M. and Bowers, M.T., *On the Stability of Amino Acid Zwitterions in the Gas Phase: The Influence of Derivatization, Proton Affinity, and Alkali Ion Addition*. J Am Chem Soc, 2000. **122**(14): p. 3458-3464.
207. Ruotolo, B.T., Hyung, S.J., Robinson, P.M., Giles, K., Bateman, R.H. and Robinson, C.V., *Ion mobility-mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(42): p. 8001-4.
208. Jarrold, M.F., *Unfolding, refolding, and hydration of protein in the gas phase*. Acc. Chem. Res., 1999. **32**: p. 360-367.
209. Scarff, C.A., Patel, V.J., Thalassinos, K. and Scrivens, J.H., *Probing hemoglobin structure by means of traveling-wave ion mobility mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(4): p. 625-31.
210. Hoaglund-Hyzer, C.S., Counterman, A.E. and Clemmer, D.E., *Anhydrous Protein Ions*. Chemical Reviews, 1999. **99**(10): p. 3037-3080.
211. Breuker, K. and McLafferty, F.W., *Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase, 10(-12) to 10(2) s*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18145-52.
212. Merenbloom, S.I., Flick, T.G. and Williams, E.R., *How hot are your ions in TWAVE ion mobility spectrometry?* J Am Soc Mass Spectrom, 2012. **23**(3): p. 553-62.

213. Wortmann, A., Jecklin, M.C., Touboul, D., Badertscher, M. and Zenobi, R., *Binding constant determination of high-affinity protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry and ligand competition*. J Mass Spectrom, 2008. **43**(5): p. 600-8.
214. Gabelica, V., Galic, N., Rosu, F., Houssier, C. and De Pauw, E., *Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(5): p. 491-501.
215. Peschke, M., Verkerk, U.H. and Kebarle, P., *Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(10): p. 1424-34.
216. Ayed, A., Krutchinsky, A., Ens, W., Standing, K. and Duckworth, H., *Quantitative evaluation of protein-protein and ligand-protein equilibria of a large allosteric enzyme by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry*. . Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998. **12**: p. 339-344.
217. Gabelica, V., Rosu, F. and De Pauw, E., *A simple method to determine electrospray response factors of noncovalent complexes*. Anal Chem, 2009. **81**(16): p. 6708-15.
218. Griffey, R., Sannes-Lowery, K., Drader, J., Mohan, V., Swayze, E. and Hofstadler, S., *Characterization of Low-Affinity Complexes between RNA and Small Molecules Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**: p. 9933-9938.
219. Sannes-Lowery, K.A., Griffey, R.H. and Hofstadler, S.A., *Measuring dissociation constants of RNA and aminoglycoside antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Biochem, 2000. **280**(2): p. 264-71.
220. Jørgensen, T.J.D., Roepstorff, P. and Heck, A.J.R., *Direct Determination of Solution Binding Constants for Noncovalent Complexes between Bacterial Cell Wall Peptide Analogues and Vancomycin Group Antibiotics by Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(20): p. 4427-4432.
221. Kempen, E.C. and Brodbelt, J.S., *A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 2000. **72**(21): p. 5411-6.
222. Pan, J., Rintala-Dempsey, A.C., Li, Y., Shaw, G.S. and Konermann, L., *Folding kinetics of the S100A11 protein dimer studied by time-resolved electrospray mass spectrometry and pulsed hydrogen-deuterium exchange*. Biochemistry, 2006. **45**(9): p. 3005-13.
223. Chevreux, G., Atmanene, C., Lopez, P., Ouazzani, J., Van Dorsselaer, A., Badet, B., Badet-Denisot, M.A. and Sanglier-Cianferani, S., *Monitoring the dynamics of monomer exchange using electrospray mass spectrometry: the case of the dimeric glucosamine-6-phosphate synthase*. J Am Soc Mass Spectrom, 2011. **22**(3): p. 431-9.
224. Sobott, F., Benesch, J.L., Vierling, E. and Robinson, C.V., *Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38921-9.
225. Simmons, D.A., Wilson, D.J., Lajoie, G.A., Doherty-Kirby, A. and Konermann, L., *Subunit disassembly and unfolding kinetics of hemoglobin studied by time-resolved electrospray mass spectrometry*. Biochemistry, 2004. **43**(46): p. 14792-801.
226. Keetch, C.A., Bromley, E.H., McCammon, M.G., Wang, N., Christodoulou, J. and Robinson, C.V., *L55P transthyretin accelerates subunit exchange and leads to rapid formation of hybrid tetramers*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41667-74.
227. Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Ding, L.L., Yaron, O., Horwitz, J. and Robinson, C.V., *Subunit exchange of polydisperse proteins: mass spectrometry reveals consequences of alphaA-crystallin truncation*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 14485-91.
228. Rogniaux, H., et al., *Binding of aldose reductase inhibitors: correlation of crystallographic and mass spectrometric studies*. J Am Soc Mass Spectrom, 1999. **10**(7): p. 635-47.
229. El-Kabbani, O., Rogniaux, H., Barth, P., Chung, R.P.T., Fletcher, E.V., Van Dorsselaer, A. and Podjarny, A., *Aldose and aldehyde reductases: Correlation of molecular modeling and mass spectrometric studies on the binding of inhibitors to the active site*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2000. **41**(3): p. 407-414.
230. Gao, J., Wu, Q., Carbeck, J., Lei, Q.P., Smith, R.D. and Whitesides, G.M., *Probing the Energetics of Dissociation of Carbonic Anhydrase-Ligand Complexes in the Gas Phase*. Biophys J., 1999. **76**: p. 3253-3260.

231. Robinson, C.V., Chung, E.W., Kragelund, B.B., Knudsen, J., Aplin, R.T., Poulsen, F.M. and Dobson, C.M., *Probing the Nature of Noncovalent Interactions by Mass Spectrometry. A Study of Protein-CoA Ligand Binding and Assembly*. J Am Chem Soc, 1996. **118**(36): p. 8646-8653.
232. Wu, Q., Gao, J., McCarthy, D.J., Sigal, G.B., Bruce, J.E., Whitesides, G.M. and Smith, R.D., *Carbonic Anhydrase-Inhibitor Binding: From Solution to the Gas Phase*. J. Am. Chem. Soc. , 1997. **119**: p. 1157-1158.
233. Taverner, T., Hernandez, H., Sharon, M., Ruotolo, B.T., Matak-Vinkovic, D., Devos, D., Russell, R.B. and Robinson, C.V., *Subunit architecture of intact protein complexes from mass spectrometry and homology modeling*. Acc Chem Res, 2008. **41**(5): p. 617-27.
234. Felitsyn, N., Kitova, E.N. and Klassen, J.S., *Thermal Decomposition of a Gaseous Multiprotein Complex Studied by Blackbody Infrared Radiative Dissociation. Investigating the Origin of the Asymmetric Dissociation Behavior*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(19): p. 4647-4661.
235. Jurchen, J.C., Garcia, D.E. and Williams, E.R., *Further studies on the origins of asymmetric charge partitioning in protein homodimers*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(10): p. 1408-15.
236. Jurchen, J.C. and Williams, E.R., *Origin of asymmetric charge partitioning in the dissociation of gas-phase protein homodimers*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(9): p. 2817-26.
237. Rostom, A.A. and Robinson, C.V., *Disassembly of intact multiprotein complexes in the gas phase*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(1): p. 135-41.
238. Loo, J.A., Berhane, B., Kaddis, C.S., Wooding, K.M., Xie, Y., Kaufman, S.L. and Chernushevich, I.V., *Electrospray ionization mass spectrometry and ion mobility analysis of the 20S proteasome complex*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(7): p. 998-1008.
239. Lorenzen, K., Vannini, A., Cramer, P. and Heck, A.J., *Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture*. Structure, 2007. **15**(10): p. 1237-45.
240. Hyung, S.J., Robinson, C.V. and Ruotolo, B.T., *Gas-phase unfolding and disassembly reveals stability differences in ligand-bound multiprotein complexes*. Chem Biol, 2009. **16**(4): p. 382-90.
241. Muto, Y., Krummel, D.A., Kambach, C., Hernandez, H., Robinson, C.V. and Nagai, K., *Reconstitution of the spliceosomal U1 snRNP from all recombinant subunits and its characterisation by ionspray Q-tof mass-spectrometry*. Nucleic Acids Res Suppl, 2001(1): p. 275-6.
242. Hernandez, H. and Robinson, C.V., *Dynamic protein complexes: insights from mass spectrometry*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46685-8.
243. Eyles, S.J. and Kaltashov, I.A., *Methods to study protein dynamics and folding by mass spectrometry*. Methods, 2004. **34**(1): p. 88-99.
244. Kaltashov, I.A. and Abzalimov, R.R., *Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure?* J Am Soc Mass Spectrom, 2008. **19**(9): p. 1239-46.
245. Bovet, C., Wortmann, A., Eiler, S., Granger, F., Ruff, M., Gerrits, B., Moras, D. and Zenobi, R., *Estrogen receptor-ligand complexes measured by chip-based nanoelectrospray mass spectrometry: an approach for the screening of endocrine disruptors*. Protein Sci, 2007. **16**(5): p. 938-46.
246. Chowdhury, S.K., Katta, V. and Chait, B.T., *Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry*. J Am Chem Soc, 1990. **112**(24): p. 9012-9013.
247. Grandori, R., *Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(1): p. 11-5.
248. Hall, Z., Politis, A., Bush, M.F., Smith, L.J. and Robinson, C.V., *Charge-state dependent compaction and dissociation of protein complexes: insights from ion mobility and molecular dynamics*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(7): p. 3429-38.
249. Hall, Z. and Robinson, C.V., *Do charge state signatures guarantee protein conformations?* J Am Soc Mass Spectrom, 2012. **23**(7): p. 1161-8.
250. Konermann, L., *A minimalist model for exploring conformational effects on the electrospray charge state distribution of proteins*. J Phys Chem B, 2007. **111**(23): p. 6534-43.
251. Daniel, J.M., Friess, S.D., Rajagopalan, S., Wendt, S. and Zenobi, R., *Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2002. **216**(1): p. 1-27.
252. Chung, E.W., Henriques, D.A., Renzoni, D., Morton, C.J., Mulhern, T.D., Pitkeathly, M.C., Ladbury, J.E. and Robinson, C.V., *Probing the nature of interactions in SH2 binding interfaces—evidence from electrospray ionization mass spectrometry*. Protein Science, 1999. **8**(10): p. 1962-1970.
253. Myers, D., *Surfaces, Interfaces, and Colloids*, Wiley-VCH, Editor 2002, John Wiley & Sons, Inc.: New York.

254. Sanglier, S., *La spectrométrie de masse : Un nouvel outil pour l'étude des interactions faibles en biologie.*, 2002, Thèse de l'Université Louis Pasteur: Strasbourg.
255. Siuzdak, G., Bothner, B., Yeager, M., Brugidou, C., Fauquet, C.M., Hoey, K. and Change, C.-M., *Mass spectrometry and viral analysis.* Chemistry & Biology, 1996. **3**(1): p. 45-48.
256. Wytttenbach, T. and Bowers, M.T., *Structural stability from solution to the gas phase: native solution structure of ubiquitin survives analysis in a solvent-free ion mobility-mass spectrometry environment.* J Phys Chem B, 2011. **115**(42): p. 12266-75.
257. Mirza, U.A. and Chait, B.T., *Do proteins denature during droplet evolution in electrospray ionization?* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1997. **162**(1-3): p. 173-181.
258. Smith, R.D. and Light-Wahl, K.J., *The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis.* Biol Mass Spectrom, 1993. **22**(9): p. 493-501.
259. Cunniff, J.B. and Vouros, P., *False positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes by electrospray mass spectrometry.* J Am Soc Mass Spectrom, 1995. **6**(5): p. 437-447.
260. Smith, R.D., Bruce, J.E., Wu, Q. and Lei, Q.P., *New mass spectrometric methods for the study of noncovalent associations of biopolymers.* Chem Soc Rev, 1997. **26**(3): p. 191-202.
261. Sun, N., Sun, J., Kitova, E.N. and Klassen, J.S., *Identifying Nonspecific Ligand Binding in Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using the Reporter Molecule Method.* J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(7): p. 1242-1250.
262. Harvey, D.J., et al., *Ion mobility mass spectrometry for extracting spectra of N-glycans directly from incubation mixtures following glycan release: application to glycans from engineered glycoforms of intact, folded HIV gp120.* J Am Soc Mass Spectrom, 2011. **22**(3): p. 568-81.
263. Atmanene, C., et al., *Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry.* Med Sci Monit, 2009. **15**(7): p. BR178-87.
264. Benesch, J.L.P., Ruotolo, B.T., Sobott, F., Wildgoose, J., Gilbert, A., Bateman, R. and Robinson, C.V., *Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometer Modified for Higher-Energy Dissociation Reduces Protein Assemblies to Peptide Fragments.* Analytical Chemistry, 2008. **81**(3): p. 1270-1274.
265. Utrecht, C., Versluis, C., Watts, N.R., Wingfield, P.T., Steven, A.C. and Heck, A.J., *Stability and shape of hepatitis B virus capsids in vacuo.* Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(33): p. 6247-51.
266. Wang, S.C., Politis, A., Di Bartolo, N., Bavro, V.N., Tucker, S.J., Booth, P.J., Barrera, N.P. and Robinson, C.V., *Ion mobility mass spectrometry of two tetrameric membrane protein complexes reveals compact structures and differences in stability and packing.* J Am Chem Soc, 2010. **132**(44): p. 15468-70.
267. Schenauer, M.R. and Leary, J.A., *An Ion Mobility-Mass Spectrometry Investigation of Monocyte Chemoattractant Protein-1.* Int J Mass Spectrom, 2009. **287**(1-3): p. 70-76.
268. Hopper, J.T. and Oldham, N.J., *Collision induced unfolding of protein ions in the gas phase studied by ion mobility-mass spectrometry: the effect of ligand binding on conformational stability.* J Am Soc Mass Spectrom, 2009. **20**(10): p. 1851-8.
269. Gupta, N., et al., *Whole proteome analysis of post-translational modifications: applications of mass-spectrometry for proteogenomic annotation.* Genome Res, 2007. **17**(9): p. 1362-77.
270. Mann, M. and Jensen, O.N., *Proteomic analysis of post-translational modifications.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 255-61.
271. Molina, H., Matthiesen, R., Kandasamy, K. and Pandey, A., *Comprehensive Comparison of Collision Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation.* Analytical Chemistry, 2008. **80**(13): p. 4825-4835.
272. Savitski, M.M., Nielsen, M.L. and Zubarev, R.A., *ModifiComb, a New Proteomic Tool for Mapping Substoichiometric Post-translational Modifications, Finding Novel Types of Modifications, and Fingerprinting Complex Protein Mixtures.* Molecular & Cellular Proteomics, 2006. **5**(5): p. 935-948.
273. Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. and Brunak, S., *Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence.* Proteomics, 2004. **4**(6): p. 1633-1649.
274. Kim, S., Choi, H. and Park, Z.Y., *Improved detection of multi-phosphorylated peptides by LC-MS/MS without phosphopeptide enrichment.* Mol Cells, 2007. **23**(3): p. 340-8.

275. Kyono, Y., Sugiyama, N., Tomita, M. and Ishihama, Y., *Chemical dephosphorylation for identification of multiply phosphorylated peptides and phosphorylation site determination*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(15): p. 2277-2282.
276. Sweet, S.M.M., Bailey, C.M., Cunningham, D.L., Heath, J.K. and Cooper, H.J., *Large Scale Localization of Protein Phosphorylation by Use of Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics, 2009. **8**(5): p. 904-912.
277. Sweet, S.M.M., Mardakheh, F.K., Ryan, K.J.P., Langton, A.J., Heath, J.K. and Cooper, H.J., *Targeted Online Liquid Chromatography Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry for the Localization of Sites of in Vivo Phosphorylation in Human Sprouty2*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(17): p. 6650-6657.
278. Cunningham, D.L., Sweet, S.M., Cooper, H.J. and Heath, J.K., *Differential phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling: identification of Src family kinase-mediated phosphorylation events*. J Proteome Res, 2010. **9**(5): p. 2317-28.
279. Shvartsburg, A.A., Creese, A.J., Smith, R.D. and Cooper, H.J., *Separation of a set of peptide sequence isomers using differential ion mobility spectrometry*. Anal Chem, 2011. **83**(18): p. 6918-23.
280. Woodling, K., Eyler, J., Tsybin, Y., Nilsson, C., Marshall, A., Edison, A., Al-Naggar, I. and Bubb, M., *Identification of single and double sites of phosphorylation by ECD FT-ICR/MS in peptides related to the phosphorylation site domain of the myristoylated alanine-rich c kinase protein*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(12): p. 2137-2145.
281. Zhang, K., Yau, P.M., Chandrasekhar, B., New, R., Kondrat, R., Imai, B.S. and Bradbury, M.E., *Differentiation between peptides containing acetylated or tri-methylated lysines by mass spectrometry: an application for determining lysine 9 acetylation and methylation of histone H3*. Proteomics, 2004. **4**(1): p. 1-10.
282. Rosenzweig, A.C., *Metallochaperones: Bind and Deliver*. Chemistry & Biology, 2002. **9**(6): p. 673-677.
283. Carlton, D.D., Jr. and Schug, K.A., *A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2011. **686**(1-2): p. 19-39.
284. Shvachak, V., Sanglier, S., Rocle, S., Villa, P., Haiech, J., Hibert, M., Van Dorsselaer, A., Mély, Y. and de Rocquigny, H., *Identification by high throughput screening of small compounds inhibiting the nucleic acid destabilization activity of the HIV-1 nucleocapsid protein*. Biochimie, 2009. **91**(7): p. 916-923.
285. Potier, N., Rogniaux, H., Chevreux, G. and Van Dorsselaer, A., *Ligand-metal ion binding to proteins: investigation by ESI mass spectrometry*. Methods Enzymol, 2005. **402**: p. 361-89.
286. Traoré, O., et al., *A reassessment of the epidemiology of Rice yellow mottle virus following recent advances in field and molecular studies*. Virus Res, 2009. **141**(2): p. 258-267.
287. Lacombe, S., Bangratz, M., Vignols, F. and Brugidou, C., *The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing*. The Plant Journal, 2010. **61**(3): p. 371-382.
288. Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R.N. and Fauquet, C., *Expression of the Rice Yellow Mottle Virus P1 Protein in Vitro and in Vivo and Its Involvement in Virus Spread*. Virology, 1998. **244**(1): p. 79-86.
289. Sire, C., Bangratz-Reyser, M., Fargette, D. and Brugidou, C., *Genetic diversity and silencing suppression effects of Rice yellow mottle virus and the P1 protein*. Virol J, 2008. **5**: p. 55.
290. Craik, D.J., *The folding of disulfide-rich proteins*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(1): p. 61-4.
291. Krishna, S.S., Majumdar, I. and Grishin, N.V., *Structural classification of zinc fingers: survey and summary*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 532-50.
292. Maret, W. and Li, Y., *Coordination dynamics of zinc in proteins*. Chem Rev, 2009. **109**(10): p. 4682-707.
293. Holm, R.H., Kennepohl, P. and Solomon, E.I., *Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology*. Chem Rev, 1996. **96**(7): p. 2239-2314.
294. Larabee, J.L., Hocker, J.R. and Hanas, J.S., *Cys redox reactions and metal binding of a Cys2His2 zinc finger*. Arch Biochem Biophys, 2005. **434**(1): p. 139-149.
295. Beyersmann, D. and Haase, H., *Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells*. BioMetals, 2001. **14**(3): p. 331-341.
296. Frederickson, C.J., Koh, J.-Y. and Bush, A.I., *The neurobiology of zinc in health and disease*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(6): p. 449-462.

297. Piątek, K., Hartwig, A. and Bal, W., *Physiological levels of glutathione enhance Zn(II) binding by a Cys4 zinc finger*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **389**(2): p. 265-268.
298. Shin, D.H., Lou, Y., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R. and Kim, S.-H., *Crystal structure of YjeQ from Thermotoga maritima contains a circularly permuted GTPase domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(36): p. 13198-13203.
299. Janda, I., et al., *The Crystal Structure of the Reduced, Zn<sup>2+</sup>-Bound Form of the B. subtilis Hsp33 Chaperone and Its Implications for the Activation Mechanism*. *Structure*, 2004. **12**(10): p. 1901-1907.
300. Kumsta, C. and Jakob, U., *Redox-Regulated Chaperones*. *Biochemistry*, 2009. **48**(22): p. 4666-4676.
301. Penner-Hahn, J., *Zinc-promoted alkyl transfer: a new role for zinc*. *Curr Opin Chem Biol*, 2007. **11**(2): p. 166-171.
302. Bourlès, E., Isaac, M., Lebrun, C., Latour, J.-M. and Sénèque, O., *Oxidation of Zn(Cys)<sub>4</sub> Zinc Finger Peptides by O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Products, Mechanism and Kinetics*. *Chemistry – A European Journal*, 2011. **17**(49): p. 13762-13772.
303. Fribourg, S., Kellenberger, E., Rogniaux, H., Poterszman, A., Van Dorsselaer, A., Thierry, J.-C., Egly, J.-M., Moras, D. and Kieffer, B., *Structural Characterization of the Cysteine-rich Domain of TFIIH p44 Subunit*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(41): p. 31963-31971.
304. Shindo, M., Irie, K., Fukuda, H. and Ohigashi, H., *Analysis of the non-covalent interaction between metal ions and the cysteine-rich domain of protein kinase C eta by electrospray ionization mass spectrometry*. *Bioorg Med Chem*, 2003. **11**(23): p. 5075-5082.
305. Mounicou, S., Szpunar, J. and Lobinski, R., *Metallomics: the concept and methodology*. *Chem Soc Rev*, 2009. **38**(4): p. 1119-38.
306. Liu, X., Clements, A., Zhao, K. and Marmorstein, R., *Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(1): p. 578-586.
307. Sénèque, O. and Latour, J.-M., *Coordination Properties of Zinc Finger Peptides Revisited: Ligand Competition Studies Reveal Higher Affinities for Zinc and Cobalt*. *J Am Chem Soc*, 2010. **132**(50): p. 17760-17774.
308. Hellman, L.M. and Fried, M.G., *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(8): p. 1849-61.
309. Kool, J., Jonker, N., Irth, H. and Niessen, W.M., *Studying protein-protein affinity and immobilized ligand-protein affinity interactions using MS-based methods*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **401**(4): p. 1109-25.
310. Rusconi, F., Guillonneau, F. and Praseuth, D., *Contributions of mass spectrometry in the study of nucleic acid-binding proteins and of nucleic acid-protein interactions*. *Mass Spectrom Rev*, 2002. **21**(5): p. 305-48.
311. Hegarat, N., Francois, J.C. and Praseuth, D., *Modern tools for identification of nucleic acid-binding proteins*. *Biochimie*, 2008. **90**(9): p. 1265-72.
312. Sansonetti, P.J., *III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis*. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001. **280**(3): p. G319-G323.
313. Sansonetti, P.J., *Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks*. *FEMS Microbiol Rev*, 2001. **25**(1): p. 3-14.
314. Sansonetti, P.J., *Bases moléculaires et cellulaires de l'invasion des cellules épithéliales intestinales par Shigella flexneri*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 1997. **320**(9): p. 729-734.
315. Hurt, J.K., Olgen, S. and Garcia, G.A., *Site-specific modification of Shigella flexneri virF mRNA by tRNA-guanine transglycosylase in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(14): p. 4905-13.
316. Gradler, U., Gerber, H.D., Goodenough-Lashua, D.M., Garcia, G.A., Ficner, R., Reuter, K., Stubbs, M.T. and Klebe, G., *A new target for shigellosis: rational design and crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase*. *J Mol Biol*, 2001. **306**(3): p. 455-67.
317. Ritschel, T., Atmanene, C., Reuter, K., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S. and Klebe, G., *An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction*. *J Mol Biol*, 2009. **393**(4): p. 833-47.
318. Boland, C., Hayes, P., Santa-Maria, I., Nishimura, S. and Kelly, V.P., *Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(27): p. 18218-27.

319. Barraud, P., Golinelli-Pimpaneau, B., Atmanene, C., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Droogmans, L., Dardel, F. and Tisne, C., *Crystal structure of Thermus thermophilus tRNA m1A58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA*. J Mol Biol, 2008. **377**(2): p. 535-50.
320. Lee, E.F., Czabotar, P.E., Yang, H., Sleebs, B.E., Lessene, G., Colman, P.M., Smith, B.J. and Fairlie, W.D., *Conformational changes in Bcl-2 pro-survival proteins determine their capacity to bind ligands*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30508-17.
321. Vo, D.D., Gautier, F., Juin, P. and Grée, R., *Structure–activity relationship of selected polyphenol derivatives as inhibitors of Bax/Bcl-xL interaction*. Eur J Med Chem, 2012. **51**(0): p. 286-293.
322. Oltersdorf, T., et al., *An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 677-681.
323. Lee, E.F., Czabotar, P.E., Smith, B.J., Deshayes, K., Zobel, K., Colman, P.M. and Fairlie, W.D., *Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1711-3.
324. Miesel, L., Greene, J. and Black, T.A., *Genetic strategies for antibacterial drug discovery*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(6): p. 442-56.
325. Hughes, D., *Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(6): p. 432-41.
326. Giglione, C., Boularot, A. and Meinnel, T., *Protein N-terminal methionine excision*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(12): p. 1455-74.
327. Mamelli, L., Petit, S., Chevalier, J., Giglione, C., Lieutaud, A., Meinnel, T., Artaud, I. and Pages, J.M., *New antibiotic molecules: bypassing the membrane barrier of gram negative bacteria increases the activity of peptide deformylase inhibitors*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6443.
328. Fioulaine, S., Juillan-Binard, C., Serero, A., Dardel, F., Giglione, C., Meinnel, T. and Ferrer, J.L., *The crystal structure of mitochondrial (Type 1A) peptide deformylase provides clear guidelines for the design of inhibitors specific for the bacterial forms*. J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 42315-24.
329. Ragusa, S., Mouchet, P., Lazennec, C., Dive, V. and Meinnel, T., *Substrate recognition and selectivity of peptide deformylase. Similarities and differences with metzincins and thermolysin*. J Mol Biol, 1999. **289**(5): p. 1445-57.
330. Fioulaine, S., Boularot, A., Artaud, I., Desmadril, M., Dardel, F., Meinnel, T. and Giglione, C., *Trapping conformational states along ligand-binding dynamics of peptide deformylase: the impact of induced fit on enzyme catalysis*. PLoS Biol, 2011. **9**(5): p. e1001066.
331. Grujić, M. and Renko, M., *Aminopeptidase inhibitors bestatin and actinonin inhibit cell proliferation of myeloma cells predominantly by intracellular interactions*. Cancer Lett, 2002. **182**(2): p. 113-119.
332. Boularot, A., et al., *Discovery and refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors*. J Med Chem, 2007. **50**(1): p. 10-20.
333. Dardel, F., Ragusa, S., Lazennec, C., Blanquet, S. and Meinnel, T., *Solution structure of nickel-peptide deformylase*. J Mol Biol, 1998. **280**(3): p. 501-13.
334. Ragusa, S., Blanquet, S. and Meinnel, T., *Control of peptide deformylase activity by metal cations*. J Mol Biol, 1998. **280**(3): p. 515-23.
335. Kirshenbaum, N., Michaelevski, I. and Sharon, M., *Analyzing large protein complexes by structural mass spectrometry*. J Vis Exp, 2010(40).
336. Potier, N., Billas, I.M., Steinmetz, A., Schaeffer, C., van Dorsselaer, A., Moras, D. and Renaud, J.P., *Using nondenaturing mass spectrometry to detect fortuitous ligands in orphan nuclear receptors*. Protein Sci, 2003. **12**(4): p. 725-33.
337. Sanglier, S., Leize, E., Dorsselaer, A. and Zal, F., *Comparative ESI-MS study of ~2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: from protein oligomeric state to biotope*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(5): p. 419-429.
338. Freeke, J., Robinson, C.V. and Ruotolo, B.T., *Residual counter ions can stabilise a large protein complex in the gas phase*. International Journal of Mass Spectrometry, 2010. **298**(1-3): p. 91-98.
339. McKay, A.R., Ruotolo, B.T., Ilag, L.L. and Robinson, C.V., *Mass Measurements of Increased Accuracy Resolve Heterogeneous Populations of Intact Ribosomes*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(35): p. 11433-11442.
340. Benjamin, D.R., Robinson, C.V., Hendrick, J.P., Hartl, F.U. and Dobson, C.M., *Mass spectrometry of ribosomes and ribosomal subunits*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(13): p. 7391-7395.

341. Gordiyenko, Y., Videler, H., Zhou, M., McKay, A.R., Fucini, P., Biegel, E., Muller, V. and Robinson, C.V., *Mass spectrometry defines the stoichiometry of ribosomal stalk complexes across the phylogenetic tree*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(8): p. 1774-83.
342. El-Faramawy, A., Siu, K.W. and Thomson, B.A., *Efficiency of nano-electrospray ionization*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(10): p. 1702-7.
343. Keetch, C.A., Hernandez, H., Sterling, A., Baumert, M., Allen, M.H. and Robinson, C.V., *Use of a microchip device coupled with mass spectrometry for ligand screening of a multi-protein target*. *Anal Chem*, 2003. **75**(18): p. 4937-41.
344. Zal, F., Chausson, F., Leize, E., Van Dorselaer, A., Lallier, F.H. and Green, B.N., *Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Native Hemocyanin of the Deep-Sea Crab *Bythograea thermydron**. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(2): p. 229-231.
345. Van den Heuvel, R.H., et al., *Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2006. **78**(21): p. 7473-83.
346. Hernandez, H. and Robinson, C.V., *Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(3): p. 715-26.
347. Abzalimov, R.R. and Kaltashov, I.A., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Highly Heterogeneous Protein Systems: Protein Ion Charge State Assignment via Incomplete Charge Reduction*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(18): p. 7523-7526.
348. Liepold, L., Oltrogge, L.M., Suci, P.A., Young, M.J. and Douglas, T., *Correct Charge State Assignment of Native Electrospray Spectra of Protein Complexes*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009. **20**(3): p. 435-442.
349. Tseng, Y.-H., Uetrecht, C., Heck, A.J.R. and Peng, W.-P., *Interpreting the Charge State Assignment in Electrospray Mass Spectra of Bioparticles*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(6): p. 1960-1968.
350. Ferrige, A.G., Seddon, M.J., Jarvis, S., Skilling, J. and Aplin, R., *Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1991. **5**(8): p. 374-377.
351. Ferroge, A.G., Seddon, M.J., Skilling, J. and Ordsmith, N., *The application of 'MaxEnt' to high resolution mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1992. **6**(12): p. 765-770.
352. Morgner, N. and Robinson, C.V., *Massign: an assignment strategy for maximizing information from the mass spectra of heterogeneous protein assemblies*. *Anal Chem*, 2012. **84**(6): p. 2939-48.
353. Van Duijn, E., Barendregt, A., Synowsky, S., Versluis, C. and Heck, A.J., *Chaperonin complexes monitored by ion mobility mass spectrometry*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(4): p. 1452-9.
354. Knapman, T.W., Berryman, J.T., Campuzano, I., Harris, S.A. and Ashcroft, A.E., *Considerations in experimental and theoretical collision cross-section measurements of small molecules using travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2010. **298**(1-3): p. 17-23.
355. Hogan, C.J., Jr., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V. and Fernandez de la Mora, J., *Tandem differential mobility analysis-mass spectrometry reveals partial gas-phase collapse of the GroEL complex*. *J Phys Chem B*, 2011. **115**(13): p. 3614-21.
356. Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J. and Poole, L.B., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(1): p. 32-40.
357. Wood, Z.A., Poole, L.B. and Karplus, P.A., *Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling*. *Science*, 2003. **300**(5619): p. 650-653.
358. Biteau, B., Labarre, J. and Toledano, M.B., *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 980-984.
359. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M. and Ban, N., *Atomic structures of the eukaryotic ribosome*. *Trends Biochem Sci*, 2012. **37**(5): p. 189-198.
360. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S. and Ban, N., *Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6*. *Science*, 2011. **334**(6058): p. 941-948.
361. Videler, H., Ilag, L.L., McKay, A.R.C., Hanson, C.L. and Robinson, C.V., *Mass spectrometry of intact ribosomes*. *FEBS Letters*, 2005. **579**(4): p. 943-947.
362. Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G. and Yusupov, M., *Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(99): p. 1072-1078.
363. Jenner, L.B., Demeshkina, N., Yusupova, G. and Yusupov, M., *Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(5): p. 555-560.

364. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M., *Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome*. Science, 2010. **330**(6008): p. 1203-1209.
365. Rostom, A.A., Fucini, P., Benjamin, D.R., Juenemann, R., Nierhaus, K.H., Hartl, F.U., Dobson, C.M. and Robinson, C.V., *Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5185-90.
366. Giglione, C., Fieulaine, S. and Meinnel, T., *Cotranslational processing mechanisms: towards a dynamic 3D model*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(8): p. 417-426.
367. Bingel-Erlenmeyer, R., et al., *A peptide deformylase-ribosome complex reveals mechanism of nascent chain processing*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 108-11.
368. Merz, F., et al., *Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome*. EMBO J, 2008. **27**(11): p. 1622-32.
369. Weller, D.L., Shechter, Y., Musgrave, D., Rougvie, M. and Horowitz, J., *Conformational changes in Escherichia coli ribosomes at low magnesium ion concentrations*. Biochemistry, 1968. **7**(10): p. 3668-3675.
370. Gesteland, R.F., *Unfolding of Escherichia coli ribosomes by removal of magnesium*. J Mol Biol, 1966. **18**(2): p. 356-371.
371. Gordiyenko, Y. and Robinson, C.V., *The emerging role of MS in structure elucidation of protein-nucleic acid complexes*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**: p. 723-31.
372. Morgner, N. and Robinson, C.V., *Linking structural change with functional regulation-insights from mass spectrometry*. Curr Opin Struct Biol, 2012. **22**(1): p. 44-51.
373. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.



## Partie Expérimentale

### Préparation des échantillons protéiques de masses inférieures à 500 kDa

Les différentes techniques d'échange de tampon utilisées au cours de ce travail de thèse ont été décrites dans la première partie de ce manuscrit. La mise en œuvre de ces techniques a été réalisée conformément aux recommandations des fournisseurs.

La concentration des protéines a ensuite été mesurée par la méthode de Bradford <sup>373</sup> en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'albumine de sérum bovin à 2 g.L<sup>-1</sup>.

Le tableau ci-dessous récapitule les conditions d'échanges de tampon des protéines étudiées ainsi que les masses molaires, leur point isoélectrique et leur séquence en acides aminés.

Protéines	Masses moléculaires (Da)	Pi	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
Bcl-XL	19576,5	4,72	AcNH4 50 mM pH7,5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	GSHMSQSNRELVDFLSYKLSQKGYWSQFSDVEENRTEAPEGTESEAVKQALRE AGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFQVWVNFVGRDGNVWGRIVAFFSFGG ALCVESVDKEMQVLSRIAAMWATYLNHLEPWIQENGGWDTFVELYGNNAEA ESRKGQER
P1	17929	5,46	AcNH4 50 mM pH8	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	MTRLEVLIRPTEQTAAKANAVGYTHALTWVWHSQTWDVDSVRDPSLRADFNPE KVGWVSVSFACTQCTAHYYTSEQVKYFTNIPPVHFDVVCADCERSVQLDDEIDRE HQERNAEISACNARALSEGRPASLVYLSRDACDIPEHSGRCRFVKYLNLF
Frmsr	17874,1	4,63	AcNH4 50 mM pH6,8	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	GSLHFSASDKAALYREVLPQIESVVADETDWVANLANTAALVKEAFGWFWVGFYL VDTRSDELVLAPFQGPLAATRIPFGRGVAGQAWAKGGTVVVDVDAHPDHIACS SLSRSEIVVPLFSDGRAIGVLDADSEHLAQFDETDALYLGELAKILEKRFEASRQAV
mCARM	43065,9	6,01	AcNH4 500 mM pH6,8	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (NAP-5)	GHMGHTLERSVFSERTEESSAVQYFQFYGYLSQQQNMMDYVRTGTYQRAILQ NHTDFKDKIVLDVCGSGILSFFAAQAGARKIYAVEASTMAQHAELVKSNNLTDNR IVVIPGKVEEVSLEQVDIIISEPMGYMLFNERMLESYLHAKKYLKPSGNMFPPTIGD VHLAPFTDEQLYMEQFTKANFWYQPSFHGVVLSALRGAADVDFRQPVVDTFDI RILMAKSVKYTVNFLEAKEGDLHRIEIPFKFHLHSGLVHGLAFWFDVAFIGSIMT VWLSTAPTEPLTHWYQVRCFLFQSPFLFAKAGDTLSGTCLLIANKRQSYDISIVAQVD QTGSKSSNLLDLKNPFRYTGTTSPPPGSHYTSPEENMWNTGTYNLS

Protéines	Masses moléculaires (Da)	Pi	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence en acides aminés
TGT	42738,5	6,6	AcNH4 1M pH8	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	VEATAQETDRPRFSFSAAREGKARTGTIEMKRGVIRTPAFMPVGTAAATVKALKPE TVRATGADII LGNTYHMLRPGAERIAKLGGLHSFMGWDRPILTDSSGGYQVMSLS SLTKQSEEGVTFKSHLDGSRHMLSPERSIEIQHLLGSDIVMAFDECTPPYPATPSRAA SSMERSMRWAKRSRDAFDSRKEQAENAALFGIQQGSVFENLRQQSADALAEIGF DGYAVGGLAVGEGQDEMFRVLDVDFVMPMLPDDKP
mTGT	44237	7,71	AcNH4 500 mM pH7,5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	GSM AAVGSPGLESAPRIMRLVAECSRSGARAGELRPHGTVPVFMVPGTQAT MKGITTEQLDSLGCRI CLGNTYHLGLRPGPELIRKAQGLHGF MNWPHNLLTDSGG FQMVSLFSLSEVTEEGVHFRSPYDGEETLSPERSVEIQNALGSDIIMQLDHVVSST VTGLPVEEAMHRSVRWLDRCIAAHKHDPDKQNLFAIIQGGLNADLRRTTCKEMTKR DVPGFAGGLSGGESKAQFWK MVALSTSM LPKDKPRYLMGVGYATDLVVCVALG CDMFDCVYPTRTARFGSALVPTGNLQ LKKQYAKDFSPINPECPCTCQTHSRAF LHALLHSDNTTALHHLTVHNIAYQLQLLSAVRSSI LEQRFDFVRNFMRTMYGDHS LCPAWAVEALASVGI MLT
mQTRD1	47161,2	5,9	AcNH4 500 mM pH7,5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (NAP-5)	GSRDRMMKLSLIKVVNGCRLGKIQLNGKAGDCTVDIPGCLLYTRTGSAPHLTHQT LRNIHGVP GIALQLTSSLAEHHEVLAEYKKGVGSGFIMPELSFYCSLHDPVTPGPAG YVTSKSVSWVFGGRRVEMTVSKFMAIQEALQPDWFQCLSDGEASCAETTSIKRA RKSVDRLSLFLDSCRLRQESEVLQKSVIIGVIEGGDVMEERLRSARETAKRPVGGFL LDGFQGDPAVTETRLHLLSVTAELPEDKPRLICGVSRRPDEVLECIERGVDLFESEFF YQVTERGCALTFTFDCLNPEETLLQQNGIQEKIKGLDQAKKIEATGCNQEMTSFE INLKEKQYEDFDPLVRGCSYCCCKNHTRAYIHLLMTNELLAGVLLMMHNFHYF GFFCSIREALNNDTLAQLKELICRQMFGFL
hTGT	44191,8	6,89	AcNH4 150 mM pH7,5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	GSMAGAATQASLESAPRIMRLVAECSRSGARAGELWLP HGTVPVFMVPGTQA TMKGITTEQLDALGCRI CLGNTYHLGLRPGPELIQKANGHLHGF MNWPHNLLTDSG GFMVSLVSLSEVTEEGVFRSPYDGNETLSPKESVQIQNALGSDIIMQLDDVVS STVTGPRVEEAMYSIRWLDRCIAAHQRDPDKQNLFAIIQGGLDADLRATCLEEMT KRDVPGFAIGGLSGGESKQFWRMVALSTSRPKDPRYLMGVGYATDLVVCVALG GCDMFDCVFPTRTARFGSALVPTGNLQ LRRKKVFEKDFGPI DPECTCPTCKHSRA FLHALLHSDNTAALHHLTVHNIAYQLQLMSAVRTSIVEKRFDFVRDFMGMAMYGD PTLCP TWATDALASVGI TLG
hQTRD1	48893	6,52	AcNH4 150 mM pH7,5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	ASWSHPQFEKSGGGGLVPRGSMKLSLTKVVNGCRLGKIQLNGKTDGHTMDIP GCLLYTKGSAPHLTHHTLHNIHGVPAMAQLTSSLAEHHEVLTVEYKGVGKFGIM PESLLYCSLHDPVSPCPAGYVTVNKSVMVSVAGRVEMTVSKFMAIQKALQPDWF QCCLSDGEVSCKEATSIRVRKSVDRSLFLDNCLRQESEVLQKSVIIGVIEGGDV MEERLRSARETAKRPVGGFLDGFQGNPTTLEARLRLSSVTAELPEDKPRLISGVSR PDEVLECIERGVDLFESEFFPYQVTERGCALTFSFDYQNPPEETLLQNGTQEEIKCM DQIKKIETTGCNQEITSFEINLKEKQYEDFNPLVRGCSYCCCKNHTRAYIHLLVT NELLAGVLLMMHNFHYGFFHYIREALKSDKLAQLKELIHRQAS
PDF1B	21876,1	5,27	AcNH4 100 mM pH7,5	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	MEIVEYDPDILRAKNKRIDIFDENLKNLVDAMFDVMYKTDGIGLSAPQVGLNVQL MVFNPAPEGEGEKELVLPNKIKKYSKLVFPFDEGCLSPGIYAEVVRPQSVKIDA RDITGERFSISLSPARIFQHEYDHLEGLVFFDRMTDQVLDISIRELEALEKKEYEKT GLPSPERVEARQKRKAGVGFGR
TF	48192,6	4,83	AcNH4 150 mM pH6,8	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	MQVSVETTQGLGRRVTITIAADSIETAVKSELVNVAKVRI DGFRRKGVPMNIVAQ RYGASVRQDVLGDLMRNFI DAIKEKINPAGAPTYVPGEYKLGEDFTYSVEFEVYP EVELQGLEAIEVEKPIVEVTDADVDGMLDTRKQQTATWKEKDGAVEADRVTIDF TGSVDGEEFEKASDFVLAMGQGRMIPGFEDGKIGHKAGEFTIDVTFPEEYHA ENLKGKAAKFAINLKKVEERELPETAEFIKRFGVEDGSGVEGLRAEVRKNMERELKSA IRNRVKSQAEGLVKANDIDVPAALIDSEIDVLRQAQRFGGNEKQALELPRELFE EQAKRRVVVGLLGEVIRTNELKADEERVKGLIEEMASAYEDPKEVIEFYSKNKELM DNMRNVALEEQAWEAVLAKAVTEKETTFNLMNQQA

## Préparation des échantillons protéiques de masses supérieures à 500 kDa

**-Préparation de la protéine GroEL** (SIGMA C7688), 1 mg selon le protocole de Freeke *et al.*,<sup>338</sup>

- Dissoudre 1 mg de protéine avec 80  $\mu$ L de tampon de renaturation et 20  $\mu$ L de méthanol (20 mM Tris Acetate, 50 mM EDTA, 1mM ATP, 5mM MgCL, pH 6,8) et incubé pendant 2 heures à température ambiante. La solution transparente est prélevée et transférée dans un tube de 1.5 mL.
- Ajouter à la solution, 100  $\mu$ L d'acétone, mélanger et attendre 2 minutes puis centrifuger 1 minute à 11 000 g.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le précipité dans 200  $\mu$ L de tampon de renaturation par pipettage puis incubé sous agitation 1 heure à température ambiante.
- Centrifuger rapidement 1 minute à 1500 g et vérifier la concentration en protéine dans le surnageant.
- Dessaler ensuite les 200  $\mu$ L de surnageant par 2 cycles de dessalage sur colonnes de filtration sur gel (Zeba 0.5 mL) à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium 200 mM pH 6.8.
- Regrouper les deux fractions puis réaliser 10 cycles de dessalage successifs par ultrafiltration sur Centricon 10 kDa, 2 mL.
- Déterminer la concentration de la protéine GroEL par la technique de Bradford (au final 50  $\mu$ L d'une solution à environ 6  $\mu$ M sont obtenus).

### **-Préparation du ribosome**

Dessalage du ribosome à l'aide de 5 cycles de dessalage sur Centricon 50 kDa à l'aide d'un tampon AcNH<sub>4</sub> 60 mM pH6.8, 10 mM AcMg

### Préparation des acides nucléiques

La concentration des acides nucléiques est déterminée par mesure directe de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm dans l'eau, en utilisant comme les relations suivantes 1 DO<sub>260nm</sub> correspond à 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> d'ADN double brin ou à 40  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> d'ARN.

Protéines	Masses moléculaires (Da)	Tampon d'échange	Technique d'échange	Séquence nucléotidique
ARNt <sup>Tyr</sup>	27511.5	AcNH <sub>4</sub> 200 mM pH 8.0	2 cycles de dessalage sur colonne de filtration sur gel (Zeba 0,5 mL)	5' ppp-GGUGGGGUUCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCA GACUGUAAAUCUGCCGUCAUCGACUUCGAAGGUUC GAAUCCUCCCCACCACCA-3' OH

### **Préparation des ligands dans le cadre du projet TGT**

Afin d'éliminer le DMSO présent dans les ligands, les étapes suivantes ont été réalisées :

- Dilution des ligands dans de l'éthanol de manière à obtenir une concentration final en ligand de 100  $\mu\text{M}$
- 5  $\mu\text{M}$  de cette solution ont ensuite été évaporés sous vide
- 10  $\mu\text{L}$  d'éthanol ont ensuite été ajoutés permettant de solubiliser le ligand
- Evaporation sous vide de l'éthanol (2 ou 3 cycles de re-solubilisation/évaporation sont nécessaires pour permettre d'éliminer le DMSO)
- La solution protéique est ensuite ajoutée au ligand séché.
- Le mélange est ensuite incubé pendant au moins 30 minutes sous agitation à température ambiante avant analyse.

# Production scientifique

## Publications:

- 1- Atmanene C\*, **Petiot-Bécard S\***, Zeyer D, Van Dorsselaer A, Vivat Hannah V, Sanglier-Cianféran S - **Exploring Key Parameters to detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry**. *Anal. Chem*, 2012 ; 84 (11) : 4703-4710  
\* ces auteurs ont contribué de façon équivalente au travail
- 2- François-Xavier Gillet, Diego Ignacio Cattoni, **Stéphanie Petiot-Bécard**, François Delalande, Vianney Poignavent, Jean-Paul Brizard, Sarah Sanglier-Cianferani, Yannick Bessin, Nathalie Declerck, Alain Van Dorsselaer, Christophe Brugidou, Florence Vignols. - **The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a Zinc-binding protein with redox-dependent flexibility** - *Biochemistry*. 2012. Soumis
- 3 Florian Immekus, Luzi Jakob Barandun, Michael Betz, Francois Debaene, **Stephanie Petiot-Bécard**, Sarah Sanglier-Cianferani, Klaus Reuter, François Diederich and Gerhard Klebe. **Launching spiking ligands into a protein-protein interface: A promising strategy to destabilize and break interface formation in a tRNA modifying enzyme**. Rédaction en cours.

## Communications orales:

1. **Stéphanie Petiot**, Hélène Diemer, Alain Van Dorsselaer et Sarah Sanglier-Cianféran. **Characterization of isobaric peptides using ion mobility mass spectrometry (IM-MS)**. *Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyses Protéomiques (SFEAP), Marseille, 6-8 Septembre 2010*.
2. **Stéphanie Petiot** et Daniel Ayoub. **Apports de la Spectrométrie de Masse pour la Caractérisation de Complexes Supramoléculaire**. *Journées des doctorants de l'IPHC, Strasbourg, 2010*.
3. **Stéphanie Petiot**, François Delalande, François-Xavier Gillet, Jean-Paul Brizard, Florence Vignols, Christophe Brugidou, Alain Van Dorsselaer, Sarah Sanglier-Cianferani. **Can we combine ion mobility with supramolecular mass spectrometry to characterize protein/metal complexes?** *Club Jeunes de la Société Française Spectrométrie de Masse (SFSM), Saint-Jean-Saint-Nicolas, 2010*.
4. **Stéphanie Petiot**, Hélène Diemer, Alain Van Dorsselaer, Sarah Sanglier-Cianferani. **Application of ion mobility-MS: from peptide to large protein analysis**. *Réunion des utilisateurs Waters, Paris, 7 décembre 2010*.
5. **Stéphanie Petiot**, Hélène Diemer, Alain Van Dorsselaer, Sarah Sanglier-Cianferani. **Characterization of isobaric/close MWs peptides with different post-translational modifications using ion mobility-mass spectrometry (IM-MS)**. *Journées MassProt'INRA, Montpellier, 9 Février 2011*.
- 6- **Stéphanie Bécard**, Jean-Paul Renaud, Denis Zeyer, Valérie Vivat Hannah, Alain Van Dorsselaer, Cédric Atmanene, Sarah Sanglier-Cianféran. **Exploring Key Parameters to detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry**. *Journées des doctorants de l'IPHC, Strasbourg, 2012*.

## Communications par affiches:

1. Sarah Cianféran, **Stéphanie Petiot**, Jean-Michel Saliou, Daniel Ayoub et Alain Van Dorsselaer. **La spectrométrie de masse supramoléculaire pour la caractérisation de complexes non-covalents multi-protéiques**. *Journée de l'ECPM, Strasbourg, 2010*.
2. **Stéphanie Petiot**, Hélène Diemer, Alain Van Dorsselaer et Sarah Sanglier-Cianféran. **Apport du couplage IM-MS pour la caractérisation de peptides isobares**. *Congrès SFEAP, Marseille, 2010*.
3. **Stéphanie Petiot**, Hélène Diemer, Alain Van Dorsselaer et Sarah Sanglier-Cianféran. **Apport du couplage IM-MS pour la caractérisation de peptides isobares**. *Congrès SFSM, Clermont-Ferrand, Septembre 2010*.
4. **Stéphanie Petiot-Bécard**, Jean-Paul Renaud, Denis Zeyer, Valérie Vivat-Hannah, Alain Van Dorsselaer, Cédric Atmanene et Sarah Sanglier-Cianféran. **Le couplage mobilité ionique – spectrométrie de masse (IM-MS) pour le suivi de changements conformationnels induits par la fixation d'un ligand sur une cible protéique**. *Congrès SFEAP, Avignon, Septembre 2011*.
5. Jean-Michel Saliou, **Stéphanie Petiot-Bécard**, Sonia Fieulaine, Thierry Meinel, Alain Van Dorsselaer, Carmela Giglione et Sarah Cianféran. **Native Mass Spectrometry Approaches for the Analysis of intact Ribosomes and related Protein/Ribosome interactions : interaction between RBPs in absence of ribosomes**. *Conférences Jacques Monod 2012: The translating ribosome: towards mature proteins. 2-6 Juin 2012, Roscoff*
6. **Stéphanie Petiot-Bécard**, Sonia Fieulaine, Carmela Giglione, Thierry Meinel, Alain Van Dorsselaer et Sarah Sanglier-Cianféran. **Caractérisation de complexes PDF1B/inhibiteurs par MS supramoléculaire et couplage mobilité ionique-MS : stœchiométries d'interactions, affinités et changements conformationnels**. *Congrès SFSM, 17-20 septembre 2012, Orléans*.









## Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et en mobilité ionique pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie

### Résumé

Ce travail de thèse a été focalisé sur le développement d'approches MS et IM-MS supramoléculaires pour la caractérisation fine des interactions protéine/ligand et pour l'analyse de mélanges protéiques complexes. La maîtrise des instruments de MS supramoléculaire ainsi que les optimisations instrumentales et méthodologiques réalisées ont permis d'étendre le potentiel des approches MS et IM-MS pour la caractérisation d'assemblages moléculaires particulièrement complexes. Nous avons ainsi pu suivre la cinétique de formation de complexes protéine/ligand ainsi que les changements conformationnels qui y sont associés, montrant l'intérêt du couplage IM-MS en recherche pharmaceutique. De plus, ce travail a porté sur l'étude de complexes de très hauts poids moléculaires et l'évaluation de l'IM-MS pour obtenir des informations structurales sur ces complexes. Nous avons ainsi permis de repousser certaines limites de la MS et de placer cette technique au cœur des études de biologie structurale.

Mots-Clés : Spectrométrie de Masse Supramoléculaire (MS), Mobilité ionique (IM-MS), Protéine/ligand, Ribosomes, Biologie structurale.

### Résumé en anglais

The aim of this thesis was the development of different supramolecular approaches, like MS and IM-MS, to characterize precisely protein/ligand interaction and to analyze complex mixtures of proteins. Understanding of supramolecular MS instruments and instrumental and methodological optimizations were allowed the development of MS and IM-MS to characterize very high mass supramolecular assembly. Thus, we were able to follow by kinetic the formation of protein/ligand interaction as well as associated conformational modifications, showing the interest of IM-MS coupling in pharmaceutical research. Furthermore, this work deals with the study of high mass complexes and assessment of IM-MS to obtain structural information on these complexes. As a consequence, we have pushed away some limits of MS allowing the use of this technique in structural biology.

Key Words : Supramolecular Mass Spectrometry (MS), Ion Mobility (IM-MS), Protein/ligand, Ribosome, Structural Biology