DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES MÉTHODOLOGIES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE A TRÈS HAUTE RÉSOLUTION POUR L'ANALYSE STRUCTURALE DE COMPLEXES PROTÉIQUES

Ophélie Robine

▶ **To cite this version:**

Ophélie Robine. DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES MÉTHODOLOGIES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE A TRÈS HAUTE RÉSOLUTION POUR L'ANALYSE STRUCTURALE DE COMPLEXES PROTÉIQUES. Chimie analytique. Ecole Polytechnique X, 2012. Français. NNT : . pastel-00750754

HAL Id: pastel-00750754

https://pastel.hal.science/pastel-00750754

Submitted on 12 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE

Spécialité : Chimie

Par

Ophélie ROBINE

Développement de nouvelles méthodologies par spectrométrie de masse à très haute résolution pour l'analyse structurale de complexes protéiques

Directrice de thèse : Julia Chamot-Rooke

Soutenue le 28 septembre 2012 devant la commission d'Examen composée de :

M. Jean-Michel Camadro	Président
Mme Julia Chamot-Rooke	Directrice de thèse
Mme Emmanuelle Leize	Rapporteur
M. Christian Rolando	Rapporteur
M. Guillaume van der Rest	Co-directeur de thèse

Le génie, c'est 1% d'inspiration

et 99% de transpiration.

Thomas Edison

So mushkil vakt comando sakth.

A close friend

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ***Gilles Ohanessian***, Directeur du laboratoire des Mécanismes Réactionnels de l'École Polytechnique, de m'avoir accueillie au sein de son Unité de Recherche et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction de ***Julia Chamot-Rooke*** et la co-direction de ***Guillaume van der Rest***. Je vous remercie de votre aide, de votre soutien et de vos encouragements dans les moments plus difficiles qui surviennent au cours d'une thèse. Un grand merci à tous les deux de m'avoir accompagnée jusqu'au bout de cette belle aventure.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame ***Emmanuelle Leize*** et Monsieur ***Christian Rolando*** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également à Monsieur ***Jean-Michel Camadro*** d'avoir participé à l'évaluation de ma Thèse de Doctorat.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à ***Édith*** et ***Christian*** de m'avoir épaulée quand j'en avais besoin dans mes expériences et de m'avoir enseigné les rouages des spectromètres de masse du laboratoire plus ou moins capricieux ! Je suis d'accord avec Édith, bien que Christian ait "toujours" raison : le FT-ICR (sous toutes ses versions) est le meilleur instrument du monde entier ! J'exprime également ma gratitude à ***Vincent*** d'Orsay et à ***Thibaut*** et ***Manuel*** de Paris 7 de m'avoir aidée à dompter leur machine.

Un grand merci à ***Yves Méchulam***, Directeur du laboratoire de Biochimie de l'École Polytechnique, de m'avoir offert l'opportunité d'enseigner au sein de son département et de travailler en collaboration avec son laboratoire. Merci aussi à ***Emmanuelle*** pour ses conseils.

Un très grand merci à toutes celles et ceux qui ont partagés mon bureau et mon amitié pendant ces trois années de dur labeur. Notamment merci à : ***Yasmine***, ***Jianqing,*** ***Jana*** et ***Jan***. J'adresse également mes sincères remerciements à ***Édith*** et ***Julien*** pour vos pauses café (ou plutôt thé !) que j'ai beaucoup appréciées en cette fin de thèse et à ***Joe*** pour tes discussions à n'en plus finir et ton humour anglais. *Best of Luck !* Merci aux "anciens" : ***Mag***, ***Renjie***…

Merci enfin à ***toutes les personnes que j'ai côtoyées ou croisées au DCMR*** pendant ces trois années mémorables. Merci à ***Thérèse***, ***Carine***, ***Sophie***, ***Steph***, ***Michel***, ***Chris***, ***Gilles***, ***Ash***, ***P.-H.***, ***Vanessa***, ***Tatiana***… Et pour finir, je tiens également à remercier chaleureusement mes entraineurs de boxe à l'X. Merci à ***Rémy***, ***Fred*** et ***Gilou*** pour votre *coaching* décoiffant ! Un exemple de prochain *challenge* : les J.O. de Rio de Janeiro en 2016…

Je n'oublierai pas de remercier également,

Jean-Baptiste,

Je ne te remercierai jamais assez de ta présence à mes côtés depuis maintenant quelques années déjà et de tout ce que tu fais pour moi. Notre rencontre remonte au début de notre vie étudiante et voici que nous la finissons ensemble. J'espère te retrouver très prochainement pour le commencement d'une "nouvelle" vie à deux. Merci pour ton soutien et ta complicité. Merci de partager mon quotidien et de me remonter le moral quand il est *dans les chaussettes*. Merci de partager mes joies, mes peines. Merci de t'être intéressé à mon travail et d'avoir cherché avec moi des solutions. Merci pour tes petits plats mijotés avec amour… Un grand merci pour TOUT ton amour avec un grand "A".

Mes parents et mes sœurs,

Merci de m'avoir insufflé la soif d'apprendre et la curiosité intellectuelle, de m'avoir donné l'envie et les moyens de faire des études. Merci de m'avoir soutenue et encouragée jusqu'au bout de ma longue formation. Merci de vous être tenus au courant de l'avancée de mon travail de recherche. Merci pour votre amour, votre tendresse et votre réconfort de tous les jours. Merci pour tout. Ma réussite est également la vôtre.

Ma famille et belle-famille,

Merci à vous tous pour votre affection et votre bienveillance mais je tiens à remercier plus particulièrement ma Mamie d'être encore près de moi aujourd'hui. Merci du fond du cœur de m'avoir toujours beaucoup aidée, soutenue, encouragée, réconfortée, entourée… durant toutes ces années et encore plus ces trois dernières. Merci pour notre cohabitation, nos fous rires, nos discussions… merci pour tous ces très bons moments que nous avons partagés ensemble.

Mes amis,

Laurence, ma "sœur siamoise du hand" avec laquelle j'ai lié une sincère amitié il y a six ans déjà. Merci d'avoir gardé le contact et de m'avoir soutenue durant ces trois dernières années malgré les contraintes d'espace et de temps imposées par la thèse et la vie active. J'espère que maintenant nous allons nous revoir plus souvent autour d'une triple Carmélite !

Ash, my best male friend. I met you in DCMR lab two years ago where you were pursuing a post doctoral research work. Thanks a lot for ALL your happiness, your support, your help… You taught me how to be self-confident. I found in you a confidant and a collaborator.

Un grand merci à vous tous.

Liste des abréviations

AA : acide formique

ACN : acétonitrile

AF : acide formique

aIF2 : facteur d'initiation 2 chez les archées

ATD : distribution des temps d'arrivée

ATP : adénosine triphosphate

ARN(m/t) : acide ribonucléique (messager/transfert)

BN-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition bleue native

CI : ionisation chimique

CID : dissociation induite par collision

DNA : acide désoxyribonucléique

DSG : DiSuccinimidyl Glutarate

ECD : dissociation par capture d'électron

EGTA : acide éthylène glycol tétraacétique

ESI : ionisation par électronébulisation

ESSI : ElectroSonic Spray Ionisation

ETD : dissociation par transfert d'électron

FID : Free Induction Decay

FT-ICR : résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

FT-MS : spectrométrie de masse à transformée de Fourier

GTP : guanosine triphosphate

HDX : échange hydrogène/deutérium

HDX/MS : échange hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse

HIV : virus de l'immunodéficience humaine

HMQC : corrélation quantique multiple hétéronucléaire

HPLC: chromatographie en phase liquide à haute performance

HSQC : corrélation quantique unique hétéronucléaire

IgG : immunoglobulines G
IRMPD : dissociation multiphotonique infrarouge
ISD : In-Source Decay

LC : chromatographie en phase liquide
LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LILBID : Laser-Induced Liquid Beam Ionization/Desorption

m-NBA : alcool m-nitrobenzylique
MALDI : désorption/ionisation au laser assistée par matrice
MPT : modification post-traductionnelle
MS : spectrométrie de masse
MS/MS: spectrométrie de masse en tandem

NHS : N-HydroxySuccinimide
nOe : effet Overhauser nucléaire

Q-ToF : quadripôle-temps de vol

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles
SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes contenant du dodécyl sulfate de sodium
SMI : spectrométrie de mobilité ionique
SORI : Sustained Off-Resonance Irradiation
SPR : résonance plasmonique de surface

TAP-Tag : purification par affinité en tandem
TEV : virus de la gravure du tabac
TROSY : spectroscopie de relaxation transversale optimisée

UPLC : chromatographie en phase liquide ultra haute performance

UV : ultraviolet

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I : Introduction 7

I.1. Analyse de complexes protéiques 9

I.1.1. Structure des protéines 9

I.1.1.1. Structure primaire 10

I.1.1.2. Structure secondaire 12

I.1.1.3. Structure tertiaire 15

I.1.1.4. Structure quaternaire 17

I.1.2. Méthodes d'analyse physico-chimique 19

I.1.2.1. Méthodes classiques pour l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines 19

I.1.2.1.1. Cristallographie des protéines 19

I.1.2.1.2. Spectroscopie RMN 21

I.1.2.2. Méthodes pour l'étude de la structure quaternaire des protéines et des assemblages macromoléculaires 24

I.1.2.2.1. Diffusion aux petits angles 24

I.1.2.2.2. Cryomicroscopie électronique 24

I.1.2.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique 26

I.1.2.2.4. Résonance plasmonique de surface 27

I.1.2.2.5. Spectrométrie de masse 28

I.1.3. Méthodes d'analyse biochimique 37

I.2. Méthode associant les échanges hydrogène/deutérium à la spectrométrie de masse pour l'étude de la dynamique structurelle des protéines en solution 40

I.2.1. Principe des échanges isotopiques hydrogène/deutérium appliqués aux protéines en solution 40

I.2.1.1. Quel type d'hydrogène va-t-on sonder dans nos expériences HDX ? 40

I.2.1.2. Des échanges isotopiques dépendant de la structure et de l'accessibilité des protéines 42

I.2.1.3. Mécanismes de la réaction d'échange hydrogène/deutérium dans les protéines et peptides 43

I.2.1.3.1. Définition du facteur chimique 43

I.2.1.3.2. Facteurs influençant le facteur chimique 43

I.2.1.3.3. Catalyse de la réaction 46

I.2.1.3.4. Cinétique d'échange au niveau de la protéine et définition du facteur de protection 46

I.2.1.3.5. Deux modèles de cinétique d'échange en fonction de la vitesse de dépliement et repliement des protéines 47

I.2.2. Techniques d'incorporation des deutériums dans les protéines 49

I.2.2.1. Marquage continu 50

I.2.2.2. Marquage pulsé 50

I.2.3. Analyse de l'incorporation des deutériums dans les protéines par spectrométrie de masse 51

I.2.3.1. Analyse des échanges : avantages de la MS vs. RMN 51

I.2.3.2. Approche classique « bottom-up » 52

I.2.3.2.1. Digestion protéolytique et analyse par LC-MS 53

I.2.3.2.2. Fragmentation en phase gazeuse des peptides protéolytiques 56

I.2.3.3. Approche moderne « top-down » ECD ou ETD 60

I.2.3.3.1. Méthodes de fragmentation de protéines intactes par ECD ou ETD 60

I.2.3.3.2. Approches top-down et HDX 62

I.2.3.3.3. Limitations des approches top-down HDX 64

I.3. Bibliographie 65

Chapitre II : Analyse de peptides modèles : validation de l'approche combinant échanges H/D et fragmentation ECD 79

II.1. Introduction 81

II.1.1. Spectrométrie de masse en tandem et HDX 81
II.1.2. Principe des peptides modèles développés par T. Jørgensen 82

II.2. Résultats 84

II.2.1. Système d'introduction des échantillons 84
II.2.2. Marquage des peptides de référence 84
II.2.3. Influence des paramètres de source sur le « scrambling » 85

II.3. Conclusions 92

II.3.1. Conclusion sur l'APEX III 92
II.3.2. Autres instruments FT-ICR 93

II.4. Bibliographie 96

Chapitre III : Développement de l'approche "HDX top-down ECD" 99

III.1. Pourquoi faire une analyse « top-down » des échanges H/D ? 101

III.1.1. Problèmes et limitations de l'approche « bottom-up » 101
III.1.2. Etat de l'art de la stratégie « top-down » 102

III.2. Comparaison des différentes techniques de fragmentation lors d'études HDX/MS par approche « top-down » 106

III.2.1. Développement de l'approche « top-down » HDX 106
III.2.1.1. Protéines d'étude 106
III.2.1.2. Protocole d'analyse HDX/MS 107
III.2.1.3. Instruments utilisés 108
III.2.2. Fragmentation par ECD 109
III.2.2.1. Analyse de la sous-unité aIF2α3 109
III.2.2.1.1. Spectre de masse 109
III.2.2.1.2. Résultats obtenus en ECD 109
III.2.2.1.3. Résultats en HDX/ECD 113
III.2.2.1.4. Analyse des données 115
III.2.2.2. Analyse du sous-complexe aIF2α3/γ 121
III.2.2.2.1. Optimisation du protocole d'analyse 121
III.2.2.2.2. Résultats obtenus en HDX/ECD 123
III.2.3. Fragmentation par ETD 127
III.2.3.1. Spectre de masse 127
III.2.3.2. Résultats obtenus en ETD 128
III.2.3.3. Résultats en HDX/ETD 129
III.2.3.4. Analyse de données et comparaison avec les résultats d'ECD 131
III.2.3.5. Conclusion 134
III.2.4. Fragmentation par CID 135
III.2.4.1. Analyse de la protéine aIF2α3 135
III.2.4.1.1. Spectres de masse 135
III.2.4.1.2. Résultats obtenus en HDX/CID 136
III.2.4.2. Analyse de la protéine aIF2α3 avec une étiquette poly-histidines 139

III.3. Détermination du taux maximal de deutération : mise en évidence du phénomène d'échange inverse 142

III.4. Conclusion 147

III.5. Bibliographie 149

Chapitre IV : Développement d'une source refroidie 151
IV.1. Echange inverse 153
IV.2. Différents systèmes d'introduction 155
IV.2.1. Avec une approche « bottom-up » 156
IV.2.2. Avec une approche « top-down » 158
IV.3. Développement d'un nouveau dispositif d'injection 165
IV.3.1. Qu'est-ce que la « cryosource » ? 166
IV.3.2. Matériel et méthodes 166
IV.3.2.1. Instrumentation 166
IV.3.2.2. Préparation et analyse des échantillons marqués 168
IV.3.3. Résultats 169
IV.3.3.1. Conception du produit et optimisation sur une petite protéine 169
IV.3.3.1.1. Réalisation de la maquette 169
IV.3.3.1.2. Réalisation des prototypes 169
IV.3.3.2. Validation de la « cryosource » et optimisation sur des peptides 174
IV.3.3.2.1. Validation de la « cryosource » pour HHHHHHIIKIIK 175
IV.3.3.2.2. Cas du peptide KKDDDDDDIIKIIK 175
IV.3.3.2.2.1. Détermination du temps d'incubation pour le démarquage sélectif 176
IV.3.3.2.2.2. Vérification de la stabilité de la deutération dans la « cryosource » 179
IV.3.3.2.3. Cas du peptide GluF 186
IV.3.4. Conclusion 187
IV.4. Bibliographie 189

Conclusion générale 191

Annexe : Matériels et méthodes 197
A.1. Instrumentation 199
A.1.1. Ionisation par électrospray 199
A.1.1.1. Formation des gouttelettes chargées 200
A.1.1.2. Evaporation du solvant et explosions coulombiennes 201
A.1.1.3. Formation d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir de petites gouttelettes fortement chargées 201
A.1.2. Spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT-MS) 203
A.1.2.1. Principe de la spectrométrie de masse FT-ICR 203
A.1.2.1.1. Principe physique 206
A.1.2.1.2. Piégeage des ions 206
A.1.2.1.3. Obtention des spectres de masse 208
A.1.2.2. Performances de la spectrométrie de masse FT-ICR 212
A.1.2.2.1. Résolution et précision en masse 212
A.1.2.2.2. Sensibilité 212
A.1.2.2.3. Gamme dynamique 213
A.1.2.2.4. Gamme de masse 213
A.1.2.3. Technologie Orbitrap 214
A.1.3. Fragmentation en phase gazeuse 216
A.1.3.1. Fragmentation par ECD sur le FT-ICR 216
A.1.3.2. Fragmentation par ETD sur l'Orbitrap 218
A.1.3.3. Fragmentation par CID sur le Q-ToF 220
A.2. Expériences d'échange hydrogène/deutérium 220
A.2.1. Marquage 220
A.2.1.1. Peptides modèles sélectivement deutérés 220
A.2.1.2. Protéine modèle ubiquitine 221
A.2.1.3. Protéine aIF2α3 et complexe protéique aIF2α3/γ 221

A.2.2. Dessalage....222
A.2.3. Analyse par spectrométrie de masse....222
A.3. Bibliographie.... 224

Introduction générale

Acteurs essentiels de l'organisation cellulaire et de la régulation du métabolisme, les protéines sont à la fois des cibles thérapeutiques et des médicaments potentiels. L'étude de ces protéines à grande échelle, appelée *analyse protéomique,* a été rendue possible ces dernières années par la mise au point d'approches robustes basées sur des développements importants en spectrométrie de masse. Cependant, un simple inventaire de ces protéines ne suffit pas à comprendre les phénomènes biologiques complexes qui régissent l'activité cellulaire. Ainsi, appréhender la manière dont sont organisées ces protéines en complexes multiprotéiques est un des défis actuels de la protéomique. Le nombre d'interactions entre protéines au sein d'une cellule étant très important, l'investigation de ces multiples réseaux protéiques nécessite de nouveaux développements à la fois en spectrométrie de masse mais aussi en bioinformatique pour fournir des méthodologies adaptées ainsi que des outils puissants pour les analyser.

Les interactions entre protéines sont gouvernées par leur agencement et repliement dans l'espace faisant de la structure tridimensionnelle de ces complexes un élément-clé dans l'étude et la compréhension de la vie de la cellule. Les méthodes physico-chimiques les plus couramment utilisées pour ces études structurales sont la cristallographie et la spectroscopie RMN. Bien que ces méthodes d'analyse soient les piliers de la biologie structurale actuelle, elles présentent toutefois des limitations majeures : la cristallographie des protéines, également appelée diffraction des rayons X, nécessite de pouvoir cristalliser les protéines et la spectroscopie RMN est limitée à des systèmes de taille modeste. Par ailleurs, les deux techniques requièrent des quantités relativement importantes d'échantillon et ne donnent qu'une image statique, qui est loin de la réalité, de la structure des protéines. Il est donc devenu indispensable de développer des méthodes alternatives permettant de s'intéresser à la dynamique de ces systèmes biologiques, tout en travaillant avec des quantités les plus faibles possibles d'échantillon.

Dans ce contexte, la spectrométrie de masse est devenue, ces dernières années, un outil intéressant pour la biologie structurale. La spectrométrie de masse présente l'avantage de permettre des études sur des protéines non cristallisables, d'être peu consommatrice en matériel et de permettre des analyses rapides sur des systèmes complexes tant par la diversité que par la taille. Il existe aujourd'hui trois grandes approches basées sur la spectrométrie de masse pour étudier l'organisation structurale d'un complexe protéique. La première consiste à utiliser des conditions d'ionisation adaptées permettant de maintenir en phase gazeuse des interactions non covalentes au sein de complexes protéiques. La deuxième approche repose sur le pontage covalent des protéines en association, suivi d'une digestion enzymatique et

analyse par spectrométrie de masse. Les agents pontants permettent d'obtenir des informations de topologie du complexe initial en créant des liaisons covalentes entre des acides aminés proches dans la structure tertiaire. Une dernière technique consiste à effectuer un marquage de la surface accessible du complexe qui peut être soit permanent, par l'utilisation de réactifs chimiques particuliers ou par l'exposition aux radicaux hydroxyles, soit labile. Dans ce dernier cas, les échanges isotopiques hydrogène/deutérium sont généralement utilisés. La vitesse d'échange des hydrogènes d'amide d'un squelette polypeptidique dépend de l'accessibilité au solvant mais également de la stabilité de la structure locale. Ainsi, les hydrogènes d'amide situés dans les régions flexibles ou non structurées de la protéine telles que les boucles et les coudes ou dans les régions accessibles au solvant ont des vitesses d'échange rapides, identiques à celles observées dans le cas d'un peptide non structuré. Au contraire, ceux qui sont impliqués dans des structures secondaires stables comme les hélices α et les feuillets β ainsi que ceux enfouis dans le cœur hydrophobe des protéines s'échangent plus lentement car ils sont protégés. La mesure des vitesses d'échange permet donc de sonder localement la structure d'une protéine ou d'un complexe. L'avantage majeur de cette approche est qu'elle ne modifie pas la structure tridimensionnelle du complexe, ce qui n'est pas toujours le cas avec des marquages covalents. De plus, elle permet de s'intéresser à des complexes de très haut poids moléculaire. En revanche, le fait que le marquage soit labile impose des conditions expérimentales strictes à respecter pour éviter le démarquage et davantage de contraintes au niveau de la rapidité de l'analyse. Malgré ces limitations, l'association des échanges isotopiques hydrogène/deutérium et de la spectrométrie de masse (HDX/MS) est devenue une méthode largement employée pour l'étude structurale et dynamique des protéines et complexes protéiques.

L'analyse par spectrométrie de masse des protéines marquées au deutérium est classiquement réalisée par une approche « bottom-up ». Cette dernière consiste à analyser des peptides obtenus par digestion enzymatique de la protéine d'intérêt. Chaque hydrogène remplacé par un deutérium conduit à un incrément en masse de 1 Da facilement détectable par spectrométrie de masse. Pour chaque peptide, une cinétique d'échange hydrogène/deutérium peut donc être obtenue. Si cette approche a montré tout son intérêt, même pour des systèmes très grands, l'inconvénient majeur en est la résolution qui est limitée par la taille des peptides générés (en moyenne 5-10 acides aminés). Une alternative, qui s'est développée ces dernières années, est celle qui consiste à introduire la protéine intacte en phase gazeuse (approche « top-down ») et à la fragmenter par capture ou transfert d'un électron. En effet, contrairement aux approches de fragmentation classiques par CID (« Collision Induced Dissociation ») qui conduisent à une redistribution aléatoire des deutériums dans la séquence, ces approches ECD

ou ETD permettent de localiser les deutériums dans la séquence avec une résolution qui peut être à l'acide aminé.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette thématique de développement d'approches top-down après échanges H/D pour l'analyse de complexes protéiques. Les systèmes biologiques sur lesquels nous avons choisi de travailler sont les complexes d'initiation de la traduction, et ce travail est mené en collaboration avec le laboratoire de Biochimie de l'École Polytechnique (E. Schmitt et Y. Méchulam). Il a été initié lors de la thèse de M. Duchateau (soutenue en février 2010).

Cette thèse comporte quatre grands chapitres.

Le premier est un chapitre bibliographique. Il comprend des généralités sur la structure des protéines, les méthodes physico-chimiques classiquement utilisées en biologie structurale et fait également le point sur les différentes approches basées sur la spectrométrie de masse permettant d'obtenir des informations structurales sur des protéines ou des complexes protéiques. Le principe des échanges H/D et leur analyse par spectrométrie de masse, incluant les derniers développements dans le domaine fait l'objet de la fin de ce chapitre.

Le chapitre II est consacré à l'étude de peptides modèles qui peuvent être sélectivement marqués au deutérium. Ces peptides ont été utilisés comme sonde (i) du démarquage (D → H) qui peut avoir lieu à différents endroits du spectromètre de masse et (ii) du réarrangement aléatoire des deutériums et des hydrogènes dans la séquence polypeptidique lors d'expériences de spectrométrie de masse en tandem. L'objectif de ces études était de mettre au point une approche robuste par ECD ou ETD pour l'analyse de peptides deutérés en vue de l'appliquer à des protéines.

Dans le chapitre III sont regroupés les résultats obtenus pour l'analyse du complexe aIF2 et notamment toute la mise au point de l'approche top-down HDX sur une des sous-unités de ce complexe. Des essais ont été réalisés à la fois en ECD sur différents spectromètres de masse FT-ICR et en ETD sur un instrument de type Orbitrap installé sur la plateforme protéomique de Paris Diderot, dirigée par J-M. Camadro. Ce chapitre montre toute la difficulté qu'il peut y avoir pour rendre l'approche robuste et reproductible, notamment pour des échantillons réels, pour lesquels de nouvelles contraintes apparaissent (quantité disponible, dessalage, stabilité...).

Sur la base des résultats obtenus dans le chapitre III, il nous est apparu évident qu'un problème majeur de reproductibilité était lié à l'étape d'introduction des échantillons deutérés dans le spectromètre de masse. Nous avons donc décidé de mettre au point un système complètement différent de tout ce qui avait été développé jusqu'à présent, basé sur l'utilisation

d'une enceinte isolée qui peut être maintenue à -30°C. La mise au point de ce montage expérimental, que nous avons appelé "cryosource" fait l'objet du quatrième chapitre de ce manuscrit. Les différentes modifications ayant conduit à la version finale de cette cryosource, les difficultés rencontrées et la manière donc nous les avons résolues, et les performances que l'on peut atteindre sur des peptides ou des protéines sont décrites dans ce chapitre.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et les perspectives liées à ce travail et une annexe décrivant les matériels et méthodes.

Chapitre I : Introduction

Chapitre I : Introduction 7

I.1. Analyse de complexes protéiques 9

I.1.1. Structure des protéines 9
I.1.1.1. Structure primaire 10
I.1.1.2. Structure secondaire 12
I.1.1.3. Structure tertiaire 15
I.1.1.4. Structure quaternaire 17
I.1.2. Méthodes d'analyse physico-chimique 19
I.1.2.1. Méthodes classiques pour l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines 19
I.1.2.1.1. Cristallographie des protéines 19
I.1.2.1.2. Spectroscopie RMN 21
I.1.2.2. Méthodes pour l'étude de la structure quaternaire des protéines et des assemblages macromoléculaires 24
I.1.2.2.1. Diffusion aux petits angles 24
I.1.2.2.2. Cryomicroscopie électronique 24
I.1.2.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique 26
I.1.2.2.4. Résonance plasmonique de surface 27
I.1.2.2.5. Spectrométrie de masse 28
I.1.3. Méthodes d'analyse biochimique 37

I.2. Méthode associant les échanges hydrogène/deutérium à la spectrométrie de masse pour l'étude de la dynamique structurelle des protéines en solution 40

I.2.1. Principe des échanges isotopiques hydrogène/deutérium appliqués aux protéines en solution 40
I.2.1.1. Quel type d'hydrogène va-t-on sonder dans nos expériences HDX ? 40
I.2.1.2. Des échanges isotopiques dépendant de la structure et de l'accessibilité des protéines 42
I.2.1.3. Mécanismes de la réaction d'échange hydrogène/deutérium dans les protéines et peptides 43
I.2.1.3.1. Définition du facteur chimique 43
I.2.1.3.2. Facteurs influençant le facteur chimique 43
I.2.1.3.3. Catalyse de la réaction 46
I.2.1.3.4. Cinétique d'échange au niveau de la protéine et définition du facteur de protection 46
I.2.1.3.5. Deux modèles de cinétique d'échange en fonction de la vitesse de dépliement et repliement des protéines 47
I.2.2. Techniques d'incorporation des deutériums dans les protéines 49
I.2.2.1. Marquage continu 50
I.2.2.2. Marquage pulsé 50
I.2.3. Analyse de l'incorporation des deutériums dans les protéines par spectrométrie de masse 51
I.2.3.1. Analyse des échanges : avantages de la MS vs. RMN 51
I.2.3.2. Approche classique « bottom-up » 52
I.2.3.2.1. Digestion protéolytique et analyse par LC-MS 53
I.2.3.2.2. Fragmentation en phase gazeuse des peptides protéolytiques 56
I.2.3.3. Approche moderne « top-down » ECD ou ETD 60
I.2.3.3.1. Méthodes de fragmentation de protéines intactes par ECD ou ETD 60
I.2.3.3.2. Approches top-down et HDX 62
I.2.3.3.3. Limitations des approches top-down HDX 64

I.3. Bibliographie 65

I.1. Analyse de complexes protéiques

Les protéines sont des composants essentiels de la cellule. En effet, elles assurent l'immense majorité des fonctions cellulaires responsables de la vie. Les protéines sont responsables de la catalyse enzymatique, du transport des molécules, de la défense de l'hôte, de la conversion énergétique ainsi que de beaucoup d'autres processus cellulaires essentiels.

Les protéines sont des macromolécules biologiques de haut poids moléculaire qui comportent différents niveaux de structuration, allant de leur séquence en acides aminés à leur structure tridimensionnelle au sein de complexes protéiques. La structure tridimensionnelle d'une protéine est intimement liée à sa fonction. Toute l'information requise pour qu'une protéine adopte une conformation native particulière est contenue dans sa séquence en acides aminés (*1*). Les multiples conformations que sont capables d'adopter les protéines, leur permettent de remplir la variété de tâches qui leur incombent mais en font des systèmes complexes à analyser.

Cependant, aussi puissantes que les protéines puissent être individuellement, leur véritable pouvoir et leur complexité découlent des interactions qu'elles entretiennent avec d'autres molécules. Beaucoup d'entre elles ne remplissent leur fonction que si elles sont liées à des ligands tels que des ions métalliques, des groupes prosthétiques ou à d'autres protéines (*2*). En effet, un grand nombre de phénomènes biologiques implique l'activité de plusieurs protéines à travers la formation de complexes multi-protéiques. Ainsi, la compréhension des processus cellulaires au niveau atomique passe par la détermination de la structure tridimensionnelle de ces complexes.

I.1.1. Structure des protéines

L'analyse de la structure tridimensionnelle revient à décrire la position relative des différents atomes constituant une protéine donnée. De la séquence de la protéine à la formation de complexes oligomériques, il existe quatre niveaux de structuration de la protéine.

I.1.1.1. **Structure primaire**

Les protéines sont des assemblages d'acides aminés (nombre supérieur à 50) liés entre eux par des liaisons peptidiques. Il existe vingt acides aminés naturels répondant tous à la même structure générale (Fig. I. 1). Ce sont des molécules organiques formées d'un atome de carbone central (alpha) auquel sont liés : un atome d'hydrogène, un radical R appelé aussi chaîne latérale (R représente un groupement fonctionnel et correspond à la portion variable d'un acide aminé à l'autre) ainsi que deux groupements terminaux conservés, une amine et un acide carboxylique.

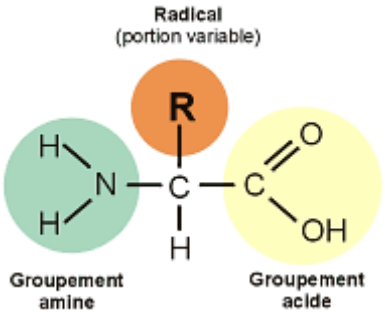


Fig. I. 1 Structure générale des acides aminés. À pH physiologique, les groupements terminaux -NH_2 et -COOH sont retrouvés respectivement sous la forme -NH_3^+ et -COO^-.

Les acides aminés peuvent être distingués suivant les propriétés physico-chimiques de leur chaîne latérale (Fig. I. 2). Un premier groupe est formé par les acides aminés présentant des chaînes latérales aliphatiques tels que la glycine (Gly, G)[1], l'alanine (Ala, A), la valine (Val, V), la leucine (Leu, L), l'isoleucine (Ile, I) et la proline (Pro, P). Ces acides aminés sont apolaires. On peut classer dans une seconde catégorie ceux qui sont aromatiques : phénylalanine (Phe, F), tyrosine (Tyr, Y) et tryptophane (Trp, W). On distingue également les acides aminés basiques (lysine [Lys, K], arginine [Arg, R], histidine [His, H]) et acides (acide aspartique [Asp, D], acide glutamique [Glu, E]). L'asparagine (Asn, N) et la glutamine [Gln, Q] sont deux acides aminés polaires non ionisables. Les deux derniers groupes sont constitués des acides aminés hydroxylés (sérine [Ser, S], thréonine [Thr, R]) et ceux qui contiennent du soufre (cystéine [Cys, C], méthionine [Met, M]). Chacun des vingt acides aminés possède donc une chaîne latérale avec une fonction chimique qui lui est propre. L'existence simultanée d'une grande diversité de fonctions chimiques est en partie à l'origine de la

[1] Les abréviations entre parenthèses correspondent à la nomenclature en trois lettres et en une lettre des acides aminés. Elles seront utilisées dans la suite de ce manuscrit.

multitude de fonctions biochimiques que peuvent remplir les protéines dans le monde du vivant.

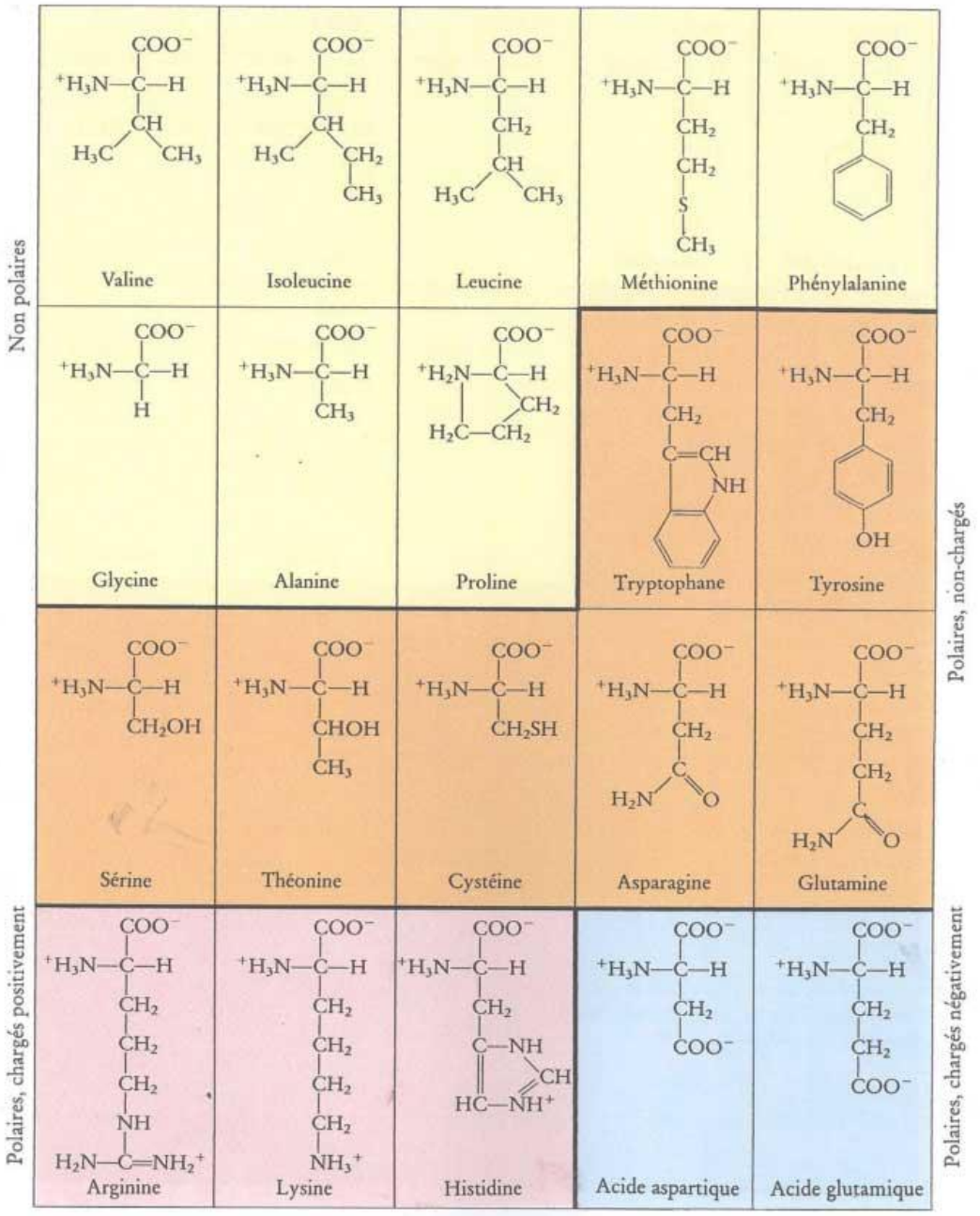


Fig. I. 2 Tableau des vingt acides aminés naturels. Ils peuvent être apolaires (hydrophobes) et dans ce cas ils sont retrouvés le plus souvent au cœur des protéines ou au contraire polaires (hydrophiles) et localisés généralement à leur surface. Parmi ces derniers, certains sont acides, d'autre basiques, d'autres encore sont neutres.

Les acides aminés peuvent se lier entre eux de manière covalente par la formation d'une liaison amide, appelée aussi liaison peptidique. Elle s'établit entre le groupement acide (-COOH) d'un acide aminé et le groupement amine ($-NH_2$) d'un autre et permet la formation

d’un dipeptide. Au cours de la réaction de condensation, une molécule d'eau est éliminée. Les polymères comprenant un plus grand nombre d’acides aminés (de 10 à 100) sont nommés polypeptides. Ces derniers servent dans la synthèse des protéines qui sont de longues chaînes polypeptidiques.

La structure primaire d’une protéine est donnée par la séquence linéaire des acides aminés la constituant. Elle est orientée. Le premier acide aminé de la séquence est, par convention, celui qui possède une extrémité amine libre, on parle d'extrémité N-terminale. De manière symétrique, le dernier acide aminé est celui qui possède une extrémité carboxyle libre, on parle d’extrémité C-terminale. Cette convention correspond également à l’ordre de la synthèse de la protéine par les ribosomes. Par exemple, la description AGSLK correspond à l’enchaînement des acides aminés alanine-glycine-sérine-leucine-lysine.

Cependant, une protéine ne peut être simplement décrite par une structure primaire linéaire. En effet, ses propriétés découlent également de sa capacité à former des structures plus élaborées.

I.1.1.2. **Structure secondaire**

La structure secondaire d’une protéine correspond au repliement local de sa chaîne principale[2]. Il s’établit alors des liaisons hydrogènes entre des acides aminés qui sont relativement proches dans sa séquence primaire donnant naissance à des motifs structuraux particuliers. L'existence de structures secondaires est due au fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont en nombres limités et que seules certaines conformations sont possibles. Ainsi, une protéine se décrit par sa séquence d'acides aminés mais aussi par l’enchaînement de ses éléments de structure secondaire.

En d’autres termes, certaines conformations se trouvent nettement favorisées car particulièrement stabilisées par des liaisons hydrogène entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (CO) du squelette peptidique. Il existe trois principaux types de structures secondaires selon le repliement des liaisons peptidiques et l’établissement de ponts hydrogène entre les acides aminés : les hélices, les feuillets et les coudes.

[2] La chaîne principale d'une protéine correspond aux atomes impliqués dans la structure de base du polypeptide (-NH-CαH-CO-). Les chaînes latérales des acides aminés (souvent notées -R) n'appartiennent donc pas au squelette carboné.

L’hélice est une structure régulière dans laquelle la chaîne principale de la protéine adopte un repliement hélicoïdal périodique. L’hélice est dite « droite » quand elle tourne dans le sens horaire. Il s’agit du cas rencontré le plus fréquent. A l'inverse, lorsqu'une hélice tourne dans le sens anti-horaire, elle est dite « gauche ». L'hélice droite de type alpha est un motif structural très retrouvé au sein des protéines (Fig. I. 3). L’hélice α est une structure très stable, caractérisée par la formation de liaisons hydrogène entre le groupement carbonyle d'un résidu *n* et le groupement amide d'un résidu *n+4*. Un tour d'hélice α moyen est constitué de 3,6 acides aminés. Dans une hélice α, les chaînes latérales des acides aminés sont localisées en périphérie de l'hélice et pointent vers l'extérieur, perpendiculairement à l’axe de la spirale. La structure compacte, énergétiquement favorable de l'hélice α a été prédite par Linus Pauling et Robert Corey en 1951 (*3*) à partir de calculs théoriques. Elle a ensuite été observée pour la première fois en 1958 dans la myoglobine, en huit exemplaires impliquant environ 75% des acides aminés de la protéine. La structure tridimensionnelle de cette dernière fut la première élucidée par cristallographie des protéines (*4*).

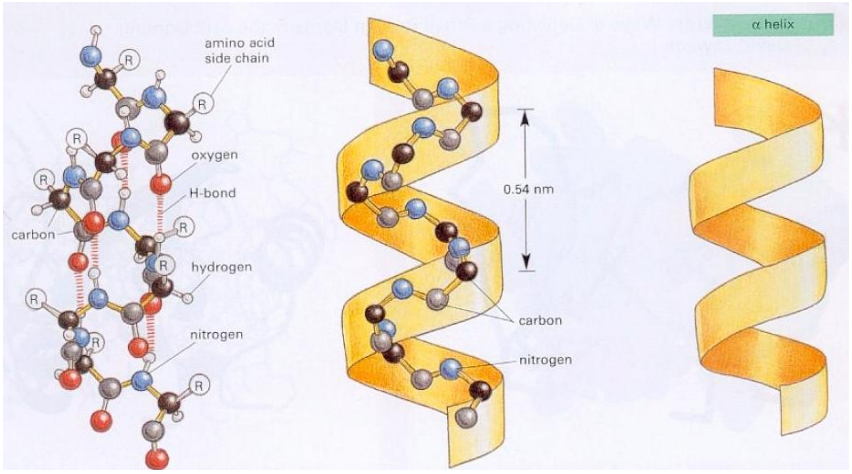


Fig. I. 3 Schéma de l’hélice droite de type α très répandue dans le repliement des protéines. Le pas de l’hélice est de 5,4 Å (*5*).

Le feuillet bêta est une structure régulière dans laquelle la chaîne principale de la protéine adopte un repliement étendu périodique. Le feuillet β est composé de plusieurs brins β qui établissent des liaisons hydrogène entre eux afin de stabiliser la structure. De ce fait, les ponts hydrogènes qui le stabilisent se font entre résidus distants plutôt qu'entre résidus consécutifs comme c’est le cas dans une hélice α. Dans un feuillet β, les chaînes latérales des acides aminés sont situées alternativement en dessus et en dessous du plan du feuillet. Le repliement β est favorisé par des acides aminés portant des petits groupements latéraux «R» non chargés. De la même manière que pour la structure de l'hélice α, la structure du feuillet β a été prédite

par Pauling et Corey en 1951 (*6*). Les feuillets β sont représentés par des flèches (Fig. I. 4) correspondant aux chaînes polypeptidiques qui les constituent. Ces dernières sont plissées et peuvent être alignées de manière parallèle et dans ce cas elles ont la même orientation, ou de manière antiparallèle avec des orientations opposées. Le sens est déterminé par la polarité des chaînes latérales des acides aminés. Lorsque deux brins β s'organisent de manière antiparallèle, les groupements -NH et -CO d'un résidu *i* du premier brin forment des liaisons hydrogène avec les groupements -CO et -NH d'un résidu *j* appartenant au second. Typiquement, deux brins β consécutifs reliés par un coude forment un feuillet β antiparallèle. Lorsque deux brins β sont orientés dans le même sens, ils s'organisent en un feuillet parallèle. Les groupements -NH et -CO d'un résidu d'un brin *A* forment alors des liaisons hydrogène avec les groupements -CO d'un premier résidu et -NH d'un second résidu appartenant tous les deux à un brin *B*. Le feuillet β antiparallèle est plus stable que le feuillet parallèle car les ponts hydrogène sont dans un alignement parfait.

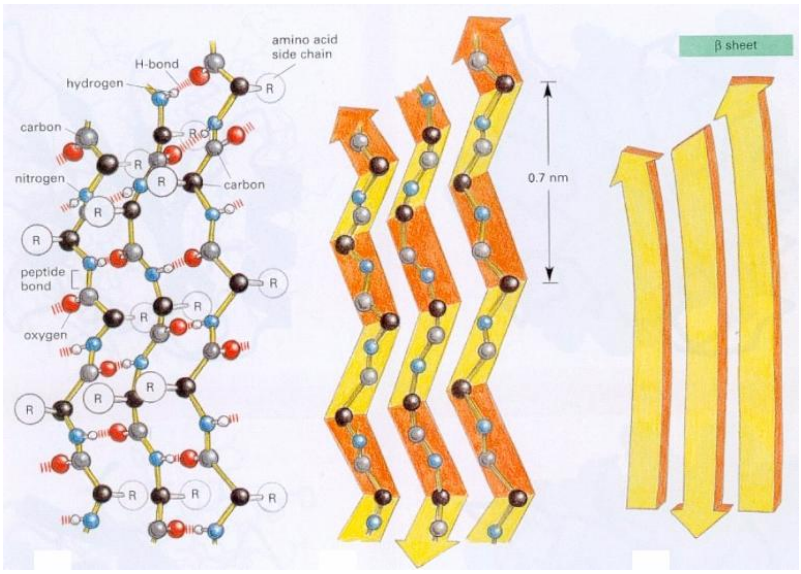


Fig. I. 4 Schéma du feuillet β anti-parallèle qui est la juxtaposition de brins β ayant des orientations opposées (*5*).

Les coudes ne sont pas des structures régulières et périodiques. Il s'agit plutôt d'un repliement particulier de la chaîne principale localisé sur trois ou quatre résidus consécutifs. Les coudes permettent bien souvent de relier deux structures secondaires périodiques telles que les hélices et/ou les brins.

Les hélices α, les feuillets β et les coudes ne sont pas les seuls motifs structuraux secondaires, mais sont ceux qui sont le plus fréquemment rencontrés. Il existe une grande variété de motifs moins courants qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

I.1.1.3. **Structure tertiaire**

La structure tertiaire d'une protéine correspond à sa structure tridimensionnelle d'ensemble. Il s'agit de la structure finale adoptée par une protéine après le repliement dans l'espace des hélices α, feuillets β et autres éléments de la structure secondaire.

Bien que la plupart des protéines néosynthétisées aient la capacité de se replier correctement, certaines en sont incapables sans l'intervention de protéines dîtes chaperonnes. Une protéine chaperonne est donc une protéine particulière dont une des fonctions est d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat. Le repliement dans l'espace des chaînes polypeptidiques est un processus co-traductionnel (*7*). Les protéines chaperonnes ont été co-découvertes en 1989 par Arthur L. Horwich et Franz-Ulrich Hartl (*8-9*).

La structure tertiaire donne une forme particulière à la protéine la rendant ainsi fonctionnelle. Pour cela, elle façonne la surface des protéines de manière complexe leur permettant d'interagir spécifiquement avec des ligands ou d'autres macromolécules comme des protéines partenaires (*10*). La structure tridimensionnelle est thermodynamiquement stable dans un domaine restreint de température, pH et force ionique. Au-delà de ce domaine, une protéine peut se déplier et perdre son activité biologique, on dit alors qu'elle est dénaturée. A l'intérieur des cellules, ce sont les protéines chaperonnes qui interviennent. Elles préviennent les dommages potentiels causés par de telles variations des conditions physico-chimiques et règlent la perte de fonction due au mauvais repliement tridimensionnel pouvant conduire à une variété de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou les maladies à prion (*11*). L'étude de la structure tridimensionnelle des protéines est donc un élément clé dans la compréhension de leurs fonctions biochimiques. Son importance est aussi retrouvée dans l'industrie biopharmaceutique, notamment dans le contrôle de la conception de protéines pharmaceutiques. Il faut noter par ailleurs, que la structure tridimensionnelle d'une protéine en solution n'est pas totalement rigide mais dynamique (*12-13*). En effet, la chaîne polypeptidique subit des mouvements thermiques et est susceptible de se déformer lors

d’interactions avec d’autres molécules. Ces fluctuations de conformations sont souvent considérées comme une condition préalable à la fonction biologique (*14-15*).

Cette organisation structurale dans l’espace est obtenue et rendue possible grâce à différents types d'interactions qui la stabilisent. Ces interactions plus ou moins fortes sont établies entre les radicaux de différents acides aminés généralement éloignés dans la structure primaire. La chaîne principale de la protéine aura donc tendance à se replier sur elle-même pour adopter une structure tridimensionnelle précise. Parmi les interactions les plus notables, sont retrouvées : les interactions covalentes, non covalentes ainsi que les interactions hydrophobes.

Les interactions covalentes établissent des liaisons fortes entre deux acides aminés qui peuvent être très proches dans la structure tertiaire, mais très éloignés dans la structure primaire de la protéine. De ce fait, la formation de cette liaison conduit à une stabilisation accrue de la structure tertiaire. Dans le cas des protéines, il s’agit principalement de la création d’un pont disulfure par une réaction d’oxydation se déroulant entre les fonctions thiols de deux cystéines. Les interactions non covalentes regroupent, quant à elles, les liaisons électrostatiques, les liaisons hydrogène et les liaisons de van der Waals. Elles se distinguent par leur géométrie, leur longueur et leur spécificité. Elles sont affectées de différentes façons par la présence d’eau.

Les liaisons électrostatiques peuvent s’établir entre deux groupements portant une charge nette positive ou négative. Cette interaction peut conduire à un effet répulsif (charges de signe identique) ou attractif (charges opposées). Une interaction entre deux groupes de charge opposée est également appelée liaison ionique, liaison saline, pont salin ou paire d’ions. Il s’agit de l’interaction la plus forte parmi les interactions non covalentes. Elle est plus forte dans le vide et plus faible dans un milieu tel que l’eau.

Les liaisons hydrogène peuvent être formées aussi bien entre des molécules non chargées que des molécules chargées. Elle correspond à une liaison entre deux atomes électronégatifs, assurée par un atome d’hydrogène partagé entre les deux. L’atome auquel l’hydrogène est le plus fermement lié est le donneur d’hydrogène tandis que l’autre est l’accepteur d’hydrogène. Avec des énergies de liaison de l’ordre de 3 à 7 kcal/mol, les liaisons hydrogène sont plus fortes que celles de van der Waals. Les liaisons hydrogène sont directionnelles. Les plus fortes sont celles dans lesquelles le donneur, l’hydrogène et l’accepteur sont colinéaires.

Les liaisons de van der Waals, force attractive non spécifique, entrent en jeu lorsque deux atomes sont distants de 3 à 4 Å. Elle est due au fait que la distribution de la charge électronique autour d'un atome varie dans le temps. A un instant donné la distribution de la charge n'est pas parfaitement symétrique. Cette asymétrie transitoire de la charge électronique autour d'un atome induit une asymétrie semblable dans la distribution électronique des atomes voisins non liés. Ceci conduit donc à des interactions de type dipôle-dipôle induit. L'énergie des interactions de van der Waals est faible avec une énergie de stabilisation de l'ordre de 0,6 kcal/mol. Comme pour les liaisons hydrogène, le nombre de ces interactions au sein d'une protéine peut être très élevé. La somme de l'énergie mise en jeu est alors substantielle. A titre d'exemple, dans le cytochrome C de cheval et dans la myoglobine de cachalot, les interactions de van der Waals à l'intérieur de la protéine contribuent pour l'essentiel à la stabilité de la structure.

Dans une solution aqueuse, une molécule apolaire tend à interagir avec d'autres molécules apolaires plutôt que de s'entourer de molécules d'eau. On nomme cette propriété hydrophobicité et cela conduit à des interactions entre molécules qu'on appelle des interactions hydrophobes. Ces dernières engendrent, dans le cas des protéines, un regroupement des résidus apolaires généralement vers le centre formant un cœur hydrophobe, ou encore au niveau d'autres régions hydrophobes de la cellule comme dans les membranes lipidiques. Les interactions hydrophobes constituent une force essentielle dans le repliement des protéines.

I.1.1.4. **Structure quaternaire**

La structure quaternaire d'une protéine est donnée par l'association des différentes chaînes polypeptidiques la constituant. Elles peuvent être identiques ou différentes et sont reliées par des liaisons non covalentes (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions hydrophobes) et plus rarement par des ponts disulfures. L'effet hydrophobe est un facteur prépondérant dans l'assemblage des éléments structuraux, y compris dans l'association des chaînes. Chacune de ces chaînes est appelée monomère (ou sous unité) et l'ensemble oligomère ou protéine multimérique.

Seulement certaines protéines présentent une telle organisation. L'hémoglobine est un exemple de protéine possédant une structure quaternaire. Elle est constituée de quatre sous-unités, deux sous-unités α (de 141 acides aminés) et deux sous-unités β (de 146 acides aminés).

Ces assemblages polypeptidiques peuvent être parfaitement bien définis, mais certains peuvent former des complexes multiprotéiques uniquement transitoires tout en étant fonctionnellement importants. En effet, dans l'environnement cellulaire, les protéines sont rarement isolées, et les interactions qu'elles peuvent créer avec d'autres partenaires sont essentielles à leur fonction. Dans d'autres cas, comme dans les macroassemblages amyloïdes, la formation d'un complexe entre des protéines peut conduire à la formation d'assemblages potentiellement pathogènes (*16*). L'étude de la structure quaternaire des protéines et des macroassemblages est donc primordiale à la compréhension de leur fonctionnement et dysfonctionnement.

~

Nous venons de mettre en évidence l'importance de l'étude structurale des protéines ainsi que sa complexité qui en font un véritable défi analytique. La structure tridimensionnelle d'une protéine donnée n'est pas nécessairement unique, elle peut fluctuer temporellement ou dépendre des autres molécules (protéines ou ligands) avec lesquelles la protéine interagit dans l'environnement cellulaire. Il existe un grand nombre de techniques physico-chimiques, biophysiques ou biochimiques permettant d'obtenir des informations structurales sur des protéines et des complexes protéiques. Les approches les plus couramment employées pour identifier et caractériser des interactions protéine-protéine combinent des méthodes biochimiques et biophysiques.

Parmi ces techniques, deux méthodes physico-chimiques sont couramment utilisées pour l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines. Il s'agit de la cristallographie et de la résonance magnétique nucléaire (RMN). En ce qui concerne l'analyse des complexes protéiques qui sont généralement des édifices macromoléculaires bien plus importants, ces dernières années ont vu le développement de méthodes alternatives telles que la cryo-microscopie électronique, la diffraction de rayons X ou de neutrons aux petits angles, ou encore différentes techniques basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse. Il est aussi possible d'aborder la composition des complexes protéiques par des méthodes biochimiques parmi lesquelles le TAP-Tag et le double hybride occupent une place de choix.

Les paragraphes suivants seront consacrés à une description des grandes méthodes d'analyse physico-chimique et biochimique utilisables pour appréhender la structure des protéines mais surtout celle des complexes protéiques.

I.1.2. Méthodes d'analyse physico-chimique

I.1.2.1. **Méthodes classiques pour l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines**

I.1.2.1.1. ***Cristallographie des protéines***

La cristallographie est la science qui étudie les systèmes cristallins à l'échelle atomique. Les macromolécules dont font partie les protéines sont généralement trop petites pour être observées directement par microscopie optique. En effet, leur taille n'est pas suffisante pour diffracter la lumière dans les longueurs d'onde du domaine visible du spectre électromagnétique. En revanche, les distances interatomiques au sein des protéines (environ 1,5 Å) sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde des rayons X. Par conséquent, la diffraction des rayons X par les atomes d'une protéine peut, quant à elle, être envisagée. Dans un cristal régulier, les protéines forment un arrangement périodique, suivant des axes de l'espace tridimensionnel, de mailles élémentaires définies comme étant le plus petit élément représentant le cristal entier. Des translations suivant les axes d'une maille élémentaire permettent de reconstituer l'ensemble du cristal.

Chaque atome d'une protéine a donc exactement la même position dans toutes les mailles. Le cristal est ainsi composé de plans d'atomes. Ces plans d'atomes, ou plutôt les nuages d'électrons correspondants, produisent un motif de diffraction lors de l'irradiation du cristal aux rayons X (*17*). Le motif de diffraction contient les informations sur la position de tous les atomes de la maille. Par conséquent, il est possible, par l'analyse de ce motif, de calculer les angles de diffraction ainsi que les distances interatomiques pour reconstituer la structure moléculaire.

La haute résolution reste le principal avantage de cette technique. Malgré des données relativement complexes à analyser, la diffraction des rayons X donne des informations très précises sur la structure moléculaire des protéines, souvent à une résolution atomique

inférieure ou égale à 1,2 Å (*18*). A des résolutions encore plus élevées, *i.e*. inférieures ou égales à 0,8 Å, les atomes d'hydrogène deviennent visibles et les atomes ne peuvent plus être considérés comme des sphères en raison de la déformation des nuages électroniques. Une telle visualisation des électrons permet de déterminer la distribution des charges et la polarisation des liaisons (*19*). Une image très détaillée de la structure de la protéine est alors obtenue.

Toutefois, la technique présente des limites. La principale difficulté liée à la méthode reste l'obtention de cristaux avec des tailles suffisantes. Il est indispensable de disposer de plusieurs cristaux identiques car ils sont souvent dégradés en présence des rayons X (par chauffage ou par des radicaux libres). Pour faire pousser des cristaux, il est nécessaire de produire une protéine extrêmement pure. Il est également indispensable d'exprimer des quantités importantes de protéine afin de trouver les conditions optimales de cristallisation. Ces dernières étant protéines dépendantes, il est impératif d'en tester un grand nombre. Les cristaux peuvent se former rapidement ou au contraire apparaître après un temps considérablement long. Parfois même, il est malheureusement impossible d'en obtenir. Les chaînes polypeptidiques partiellement repliées telles que le prion, sont un exemple probant de protéines difficilement cristallisables (*20*). De plus, si des cristaux sont finalement obtenus alors les segments peptidiques qui sont non structurés en solution apparaîtront soit ordonnés par des liaisons intermoléculaires au sein du système cristallin ou n'apparaîtront pas. Par conséquent, il est important de développer une méthode alternative permettant d'étudier la structure de protéines partiellement repliées ou même désordonnées.

Par définition, l'étude cristallographique est basée sur des structures statiques (les cristaux) de l'état le plus stable. Il est donc peu probable que cette technique renseigne sur la dynamique des molécules. Si la protéine cristallisée présente une dynamique sans mouvement à grande échelle, alors des événements dynamiques peuvent être caractérisés. En revanche, les mouvements à grande échelle sont quasiment toujours bloqués dans le cristal. D'importants développements technologiques ont été apportés à la technique pour améliorer l'observation de la dynamique à courte échelle. Il s'agit de la cryo-cristallographie (*21-23*) ou des méthodes de cristallographie en temps résolu (*24-26*).

L'avènement du synchrotron a considérablement accéléré la vitesse d'acquisition des données. En effet, celle-ci a été réduite de quelques semaines à quelques heures grâce à la production d'un rayonnement X intense, stable, de longueur d'onde variable et de grande

qualité optique. Actuellement, la plupart des données de cristallographie sont collectées à partir d'un synchrotron.

La diffraction des rayons X est également un outil de choix pour l'étude de complexes protéiques permettant d'obtenir des informations structurales de très grande qualité, même pour des systèmes très complexes (*27*) ou membranaires (*28-29*).

I.1.2.1.2. ***Spectroscopie RMN***

La spectroscopie RMN est également devenue une méthode performante pour l'étude de la conformation des protéines. Développée en 1945, elle n'a cessé d'être améliorée depuis sa mise au point. En raison de l'impact scientifique exceptionnel qu'elle a eu au fil des années, elle a été récompensée par quatre prix Nobel. Le dernier en date (2002) a été décerné au Professeur Kurt Wüthrich pour ses développements portés à la RMN qui ont permis l'élucidation de la structure tridimensionnelle des macromolécules biologiques en solution. Plus particulièrement, il a été primé pour son étude structurale de la protéine prion partiellement repliée (*30*).

Technique d'analyse chimique et structurale non destructive, elle est basée sur l'absorption de la radiation à une radio fréquence par des noyaux atomiques. Les niveaux d'énergie de spin des noyaux sont séparés dans un champ magnétique (effet Zeeman). Sous l'effet d'une radio fréquence, chaque noyau de la molécule va résonner à sa fréquence spécifique (fréquence de Larmor). Chaque noyau de la protéine a donc sa propre fréquence de Larmor, qui dépend de l'environnement local du noyau (par exemple protection par des champs magnétiques locaux). Un spectre RMN contient ainsi des pics correspondants aux résonances de tous les noyaux de l'échantillon, chacun avec une fréquence (caractérisée par le déplacement chimique δ) caractéristique de son environnement chimique. De plus, la surface sous un pic est proportionnelle au nombre des noyaux résonnant à cette fréquence, ce qui permet de quantifier les résidus identifiés et caractérisés.

Un facteur très important permettant la détermination de la structure des protéines est la corrélation entre des noyaux d'une molécule. La perturbation locale des nuages d'électrons par le spin des noyaux conduit à un couplage scalaire entre des noyaux qui sont liés de façon covalente avec un maximum de quatre liaisons entre eux. L'origine de ce couplage est le

changement des niveaux d'énergie des états de spin des noyaux en question pour conduire à des nouveaux niveaux d'énergie, en fonction de l'alignement des spins des noyaux (parallèle ou anti-parallèle). Le nombre et la nature des noyaux voisins produit des motifs et des constantes de couplage spécifiques qui permettent d'attribuer une structure covalente. Dans les protéines, chaque chaîne latérale d'un acide aminé présente un motif de couplage scalaire caractéristique. Il est alors aisé d'attribuer les signaux RMN à la structure d'une protéine.

L'étude d'une protéine peut être réalisée par RMN homonucléaire ou hétéronucléaire. Les noyaux protons sont alors observés respectivement seuls ou avec les noyaux carbones et/ou azotes. Les expériences RMN permettent l'observation des couplages scalaires et dipolaires entre spins. Le transfert d'aimantation par couplage dipolaire produit des effets Overhauser nucléaires (nOe) entre noyaux situés à moins de 5 Å l'un de l'autre. La mise en évidence de ces phénomènes permet l'estimation des distances entre les noyaux considérés. Cependant, la RMN homonucléaire présente certaines limites pour l'étude des protéines en solution, en raison du taux de superposition des pics sur les spectres et du mauvais transfert d'aimantation entre protons par couplage scalaire. Ces inconvénients, qui rendaient problématique l'emploi de la RMN pour l'étude de protéines de taille supérieure à cent acides aminés, ont été surmontés par l'utilisation des propriétés RMN de noyaux autres que le proton. En effet, des noyaux différents résonnent dans des gammes de fréquences différentes, ce qui permet de résoudre les superpositions de déplacements chimiques. De plus, les constantes de couplage hétéronucléaires améliorent la sensibilité du couplage scalaire.

Les trois isotopes de spin 1/2 naturellement présents dans les protéines sont ^{1}H, ^{15}N et ^{13}C. Cependant, les faibles abondances naturelles des isotopes ^{13}C du carbone (1,1 %) et ^{15}N de l'azote (0,37 %) ne permettent pas de réaliser des expériences de corrélation hétéronucléaire les impliquant. Par conséquent, un enrichissement des échantillons protéiques en isotopes ^{13}C et ^{15}N, préalable à l'analyse en RMN, doit être envisagé.

La préparation d'échantillons marqués est réalisée, le plus souvent, par clonage moléculaire et par techniques de surexpression et de purification de protéines. La surexpression des protéines isotopiquement enrichies peut se faire à partir d'une culture en milieu minimum ou en milieu riche. Le milieu minimum est préparé de façon à ne renfermer qu'une seule source du noyau dont on veut enrichir la protéine (*e.g.* glucose avec ^{13}C, chlorure d'ammonium avec ^{15}N). Les cultures en milieu riche se font en utilisant un milieu standard enrichi en isotopes. Si l'on souhaite simplement procéder à un marquage partiel de la

protéine sur certains types de résidus, alors on peut utiliser un organisme hétérotrophe. Ce dernier, incapable de synthétiser certains acides aminés, devra donc les puiser dans son milieu de culture. Ces organismes sont cultivés dans un milieu contenant les acides aminés marqués que l'on veut incorporer dans la protéine.

Les expériences de RMN hétéronucléaire peuvent être réalisées sur des échantillons simplement marqués au ^{15}N ou doublement marqués (^{15}N, ^{13}C). Dans le cas de protéines marquées à l'isotope lourd de l'azote (^{15}N), des expériences 2D HSQC ou HMQC (« Heteronuclear Single /Multiple Quantum Correlation ») peuvent être menées. Elles permettent d'observer les pics de corrélation dus au couplage scalaire entre l'hydrogène amide et l'azote de chaque résidu. La stratégie d'attribution basée sur le double marquage utilise, quant à elle, exclusivement les couplages scalaires homo- et hétéronucléaires. Si l'on souhaite augmenter la limite de taille des systèmes étudiés, alors en sus du marquage ^{15}N et ^{13}C on peut remplacer 70 à 100 % des protons par des deutériums. En effet, cela permet de diminuer la fuite de l'aimantation due aux interactions dipolaires entre protons. La diminution de la relaxation transverse à l'aide de l'expérience TROSY (« Transverse Relaxation-Optimized SpectroscopY ») permet également de repousser cette limite (*31*). Des expériences combinant les deux approches ont également été développées pour l'analyse de complexes protéiques de haut poids moléculaire (> 50 kDa) (*32*).

Les intermédiaires du repliement d'une protéine peuvent aussi être caractérisés par l'échange des hydrogènes d'amide avec le deutérium de l'eau lourde. Enfin, une interprétation qualitative des déplacements chimiques en fonction de la structure primaire de la molécule permet la détection des structures secondaires telles que l'hélice α ou le feuillet β.

Si l'avantage majeur de la RMN, par rapport à la diffraction des rayons X, est de permettre l'étude de protéines en solution, elle présente des limites importantes qui sont : d'une part, la quantité de matériel nécessaire pour réaliser les expériences (des concentrations de l'ordre du millimolaire de protéine sont généralement utilisées et d'une centaine de micromoles avec l'utilisation d'une cryosonde), mais surtout, la taille des systèmes qui peuvent être étudiés (< 50 kDa). Il faut par ailleurs noter que dans certains cas, des concentrations d'échantillon très élevées peuvent induire des perturbations de la structure quaternaire des protéines (agrégation ou précipitation de certaines protéines).

I.1.2.2. **Méthodes pour l'étude de la structure quaternaire des protéines et des assemblages macromoléculaires**

I.1.2.2.1. ***Diffusion aux petits angles***

La diffusion aux petits angles des rayons X en solution (« Small Angle X-ray Scattering », SAXS) est une technique qui repose sur la diffusion élastique des rayons X par des protéines et des macro-assemblages dans la gamme 10-1000 Å (*33*). Bien qu'il ne soit pas possible d'obtenir une résolution atomique par cette méthode, elle fournit des informations structurales précieuses à basse résolution (forme globale de la protéine, structures tertiaire et quaternaire). Elle permet donc d'étudier les changements conformationnels de macromolécules ainsi que la formation d'assemblages supramoléculaires dans des conditions quasi-physiologiques. La diffusion en solution, qui n'est pas soumise aux principales limitations de la cristallographie et de la RMN, apparaît comme une technique complémentaire pour l'étude structurale des macromolécules.

Les échantillons réels sont le plus souvent complexes (co-existence de plusieurs espèces de protéines) et hétérogènes (manque d'homogénéité au niveau de la conformation des molécules). Leur étude représente un défi majeur pour cette technique. En effet, dans un tel cas, le profil de diffusion contiendra des contributions de tous les composants rendant l'analyse complexe. Cette difficulté peut être surmontée par des méthodes de traitement des données afin de caractériser des conformères individuels de protéines (*34*) ou bien des agrégats de protéines (*35*).

I.1.2.2.2. ***Cryomicroscopie électronique***

La cryomicroscopie électronique se base sur les principes généraux de la microscopie électronique à transmission tout en évitant les étapes de préparation endommageant les échantillons. Elle repose sur l'observation de molécules ayant été fixées de manière brutale par congélation à très basse température (processus de quelques millisecondes à environ -170°C) afin d'éviter la formation de cristaux de glace. Les molécules totalement englobées dans un fin film d'eau vitrifiée, sont ainsi préservées dans leur environnement et leur état natifs. Complémentaire à la cristallographie des protéines et à la spectroscopie RMN, cette méthode permet d'obtenir la structure de larges assemblages macromoléculaires en solution.

La microscopie électronique permet d'obtenir des images bidimensionnelles correspondant à des projections de toute l'épaisseur de l'échantillon. Cependant, elles ne possèdent qu'un contraste très faible et l'analyse d'images est alors indispensable. Celle-ci consiste, dans un premier temps, à additionner des images de faible contraste afin de moyenner le bruit présent et d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit. Dans un deuxième temps, ces moyennes qui représentent des vues de l'échantillon sous différents angles, peuvent être combinées de manière mathématique pour calculer la structure tridimensionnelle de l'objet de départ (*36*). Cette technique de reconstruction en 3D utilisant des images obtenues sous différents angles, est appelée tomographie.

La cryomicroscopie électronique est particulièrement bien adaptée à l'observation de molécules de masse moléculaire supérieure à 200 ou 300 kDa (*37*). En effet, seuls des édifices macromoléculaires de grande taille remplissent les critères nécessaires pour être visualisés au dessus du bruit de fond. Il est possible d'obtenir une résolution de l'ordre de 10 à 30 Å (*38*). Pour des macro-assemblages, on peut envisager de compléter une structure à basse résolution avec des structures à haute résolution des protéines individuelles. Ces dernières peuvent être obtenues, par exemple, par cristallographie. Il est ainsi possible d'obtenir des informations structurales à une résolution presque atomique de structures subcellulaires (*39*).

Cette technique permet l'étude du changement conformationnel d'assemblages macromoléculaires par imagerie de complexes fixés par vitrification dans différents états conformationnels (*37*, *40*). La microscopie électronique permet également aujourd'hui d'obtenir des informations sur des macromolécules et leurs assemblages dans le contexte cellulaire par imagerie de la structure biologique entière (*41-43*). Ceci a été rendu possible par les progrès effectués dans le développement de la tomographie électronique et l'élaboration de la cryomicroscopie de sections vitreuses.

Il existe de nombreuses études de complexes macromoléculaires par cryomicroscopie électronique parmi lesquelles la structure du ribosome à une résolution de 11,5 Å (*44*) et celle de virus (*45*), l'environnement cytosolique total de cellules eucaryotes (*46*) ainsi que l'étude d'une interaction protéine chaperone-substrat (*47*).

La cryomicroscopie électronique possède plusieurs avantages par rapport à la cristallographie et à la RMN. En effet, elle requiert de plus faibles quantités de matériel (environ 2 mL à une concentration de 0,1-1,0 mg/mL^{-1} par grille), elle ne nécessite pas

l’obtention de cristaux et elle permet l’observation d’objets de l'ordre de grandeur de 300 kDa à 1000 MDa. Mais cette méthode présente aussi des limites. Les échantillons doivent être purs, uniformes et sans agrégats, et contenir seulement une faible concentration de sel et de solvants afin de maximiser le contraste entre la protéine et le tampon.

I.1.2.2.3. *Chromatographie d’exclusion stérique*

La chromatographie est une technique de chimie analytique quantitative et qualitative. Il s’agit d’une méthode physique de séparation d’espèces chimiques. Le principe est le suivant : l'échantillon renfermant une ou plusieurs espèces est entraîné par une phase mobile le long d'une phase stationnaire. Chaque espèce a une vitesse de migration propre qui dépend de ses caractéristiques et de celles des deux phases.

La chromatographie d’exclusion stérique, appelée aussi filtration sur gel, permet de séparer des protéines ou autres molécules biologiques suivant leur taille (*48*), tandis que la plupart des méthodes chromatographiques utilisent l’affinité chimique avec un support. La phase stationnaire est un gel hydraté constitué de pores de tailles différentes. Les macromolécules de l’échantillon entrent et sortent de ces pores selon leur taille. Les molécules les plus petites peuvent entrer dans un plus grand nombre de pores ce qui allonge la durée de leur migration, alors que les plus grosses molécules sont éluées plus rapidement. En conséquence, les macromolécules sont séparées selon leurs dimensions.

Plus rigoureusement, cette méthode permet de séparer des macromolécules en fonction de leur taille mais aussi de leur forme, *i.e.* suivant leur volume hydrodynamique. Ainsi, deux macromolécules de même masse moléculaire mais d’architecture différente pourront être distinguées. En effet, une macromolécule peu structurée aura un plus grand volume hydrodynamique qu’une macromolécule de même masse moléculaire mais de structure très globulaire. Par conséquent, la première sera plus rapidement éluée que la seconde, bien que les deux masses soient identiques.

Une étude récente a montré qu’il était possible de caractériser des macroassemblages de très grande taille, jusqu’à plusieurs millions de daltons, par chromatographie d’exclusion stérique (*49*).

I.1.2.2.4. ***Résonance plasmonique de surface***

La résonance plasmonique de surface (« Surface Plasmon Resonance », SPR) est un phénomène physique basé sur les propriétés de la lumière. Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une surface placée entre deux milieux d'indice de réfraction différent, une partie du rayon incident est réfléchie tandis que l'autre partie est réfractée à travers la surface. Selon l'angle d'incidence du rayon toute la lumière peut être réfléchie. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, *i.e.* sous les conditions de réflexion interne totale, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à la surface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Si une couche fine de métal, riche en électrons libres, est déposée sur cette surface, alors ceux-ci entrent en résonance avec les photons du faisceau incident et créent la résonance plasmonique de surface. Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle pour lequel on observe une intensité minimale est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu dans lequel l'onde évanescente se propage.

Depuis sa découverte par Wood en 1902 (*50-51*), la résonance plasmonique de surface est principalement utilisée comme senseur, *i.e.* comme détecteur placé à la source même du phénomène étudié capable de déceler des modifications au niveau moléculaire. L'application de cette technique pour le contrôle des interactions biomoléculaires a été démontrée pour la première fois en 1983 (*52*). La résonance plasmonique de surface permet de mettre en évidence la formation d'une liaison entre un ligand et un récepteur adsorbé à la surface métallique par mesure de la variation de l'indice de réfraction (Fig. I. 5). L'analyte est mis au contact de la surface métallique greffée. Les changements induits par l'association ou la dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées. Cette technique permet donc d'obtenir des données cinétiques sur des interactions mettant en jeu deux ou plusieurs partenaires (*53*).

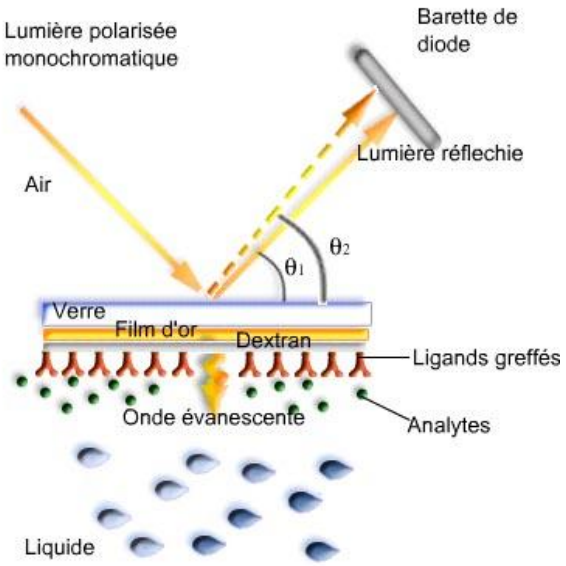


Fig. I. 5 Schéma du principe de la résonance plasmonique de surface utilisé par la technologie Biacore TM pour l'analyse des interactions entre molécules en temps réel et sans marquage. Dans un tel système, les deux milieux d'indices de réfraction différents sont la solution dans laquelle se trouvent les molécules à analyser et le verre d'une lame qui sert de senseur. Le film conducteur à l'interface des deux est un très fin film d'or à la surface de la lame de verre.

La résonance plasmonique de surface permet donc de détecter et de quantifier des interactions entre molécules en temps réel et sans avoir recours au marquage de ces dernières. Par le suivi en temps réel de la formation et de la dissociation des complexes, il est possible de caractériser minutieusement la force des associations et d'obtenir les cinétiques des interactions moléculaires. La technique ne nécessitant pas l'utilisation de marquage pour la détection et étant non destructrice, les biomolécules qui sont sélectivement retenues sur la surface du capteur peuvent être par la suite récupérées et analysées par spectrométrie de masse. Cette combinaison de technologies offre donc une toute nouvelle gamme d'applications telle que l'identification et la rapide caractérisation de nouvelles interactions protéine/protéine entre une protéine d'intérêt et un mélange complexe de protéines (*54-55*).

I.1.2.2.5. ***Spectrométrie de masse***

Bien que les techniques de diffraction des rayons X et de spectroscopie RMN soient les deux méthodes phares pour l'élucidation structurale des protéines, nous avons vu précédemment qu'elles présentaient des limites. En effet, elles sont toutes les deux peu sensibles et la cristallographie des protéines nécessite l'obtention de cristaux tandis que la spectroscopie RMN est limitée en gamme de masse. Ainsi le choix de ces méthodes

classiques pour l'étude des complexes protéiques n'est pas toujours possible. En revanche, l'apport de la spectrométrie de masse dans ce domaine est en constante progression. La spectrométrie de masse ne permet pas d'obtenir des informations structurales avec la même résolution spatiale que les rayons X ou la RMN, mais apporte un gain important en termes de sensibilité et rapidité par rapport aux deux méthodes précédentes. Il existe plusieurs approches par spectrométrie de masse permettant d'obtenir des informations de structure. L'une d'entre elles repose sur le pontage covalent de protéines en association, suivi d'une digestion enzymatique et analyse par spectrométrie de masse. Une deuxième implique des échanges isotopiques (ou un marquage covalent) permettant soit de déterminer des zones de flexibilité induites par la liaison d'un ligand à une protéine, soit des zones d'interaction entre macromolécules au sein d'un complexe. La spectrométrie de masse offre également l'opportunité de caractériser des complexes non covalents (protéine-protéine, protéine-ligand) grâce à l'utilisation de modes d'ionisation adaptés. On peut noter, pour l'analyse de complexes protéiques intacts, l'émergence de spectromètres de masse équipés d'une cellule de mobilité ionique.

Approche par pontage covalent

Les interactions protéine-protéine peuvent donc être analysées par pontage covalent (« crosslinking ») et spectrométrie de masse. L'avantage majeur de cette approche est qu'elle permet d'obtenir à la fois des informations sur la composition et sur la structure des complexes grâce à la grande sensibilité de la spectrométrie de masse. Le « crosslinking » est une technique qui permet de relier chimiquement les sous-unités d'un complexe non covalent, ce qui permet de stabiliser les interactions au sein de l'édifice macromoléculaire et d'en faciliter l'étude. Ceci est réalisé par des agents pontants, ou « crosslinkers », qui sont des composés chimiques possédant un groupe réactif à leur extrémité capable de réagir avec des fonctions spécifiques des protéines ou d'autres molécules (*e.g.* amines primaires, sulfhydryles, …). Les agents pontants établissent des liaisons covalentes entre des acides aminés proches dans la structure tertiaire. L'utilisation de « crosslinkers » de taille différente permet d'obtenir des contraintes de distance entre les peptides des partenaires protéiques du complexe. L'analyse des peptides pontés par spectrométrie de masse permet d'obtenir des informations sur la topologie initiale du complexe. Il existe maintenant une grande variété d'agents pontants multifonctionnels (homo- ou hétérofonctionnels) disponibles dans le commerce (www.piercenet.com).

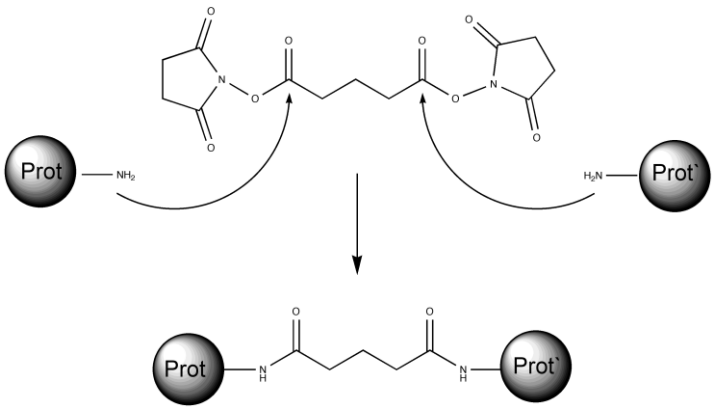


Fig. I. 6 Schéma de la réaction de pontage covalent entre deux protéines utilisant le DSG (DiSuccinimidyl Glutarate), réactif homobifonctionnel. Il a deux groupes identiques, des esters de NHS, à chacune de ses extrémités, qui réagissent avec les amines primaires des protéines (extrémité N-terminale et chaîne latérale des lysines). Son bras espaceur, long de 7,7 Å, est constitué de cinq atomes.

Les groupes réactifs peuvent être des esters de NHS (N-HydroxySuccinimide) (Fig. I. 6) ou des maléimides qui ciblent les thiols des cystéines ou encore des aryl azides qui s'insèrent dans des liaisons C-H ou N-H sous activation UV. Les esters de NHS et leurs dérivés solubles sulfonylés sont les plus couramment utilisés malgré les réactions secondaires qu'ils entraînent, compliquant l'analyse des spectres obtenus après digestion enzymatique du complexe protéique. En effet, si les amines primaires des lysines (ou des extrémités N-terminales) sont les cibles majeures des groupements NHS, il n'est pas rare d'observer des réactions de pontage impliquant les groupements hydroxyles des tyrosines, des sérines ou encore des thréonines (*56*). De plus, les esters de NHS conventionnels ont une forte tendance à s'hydrolyser pendant l'étape de pontage, conduisant à des produits de type « dead-end » qu'il est difficile de séparer des autres (*57*). Par conséquence, avec la connaissance de toutes les cibles possibles des « crosslinkers », l'élucidation de la structure des complexes protéiques pourrait être significativement améliorée due à la plus grande fraction d'espèces pontées identifiées.

Bien que l'association pontage covalent et spectrométrie de masse soit devenue un outil analytique performant pour l'étude des complexes protéiques, elle présente des limites qui sont : (i) la faible intensité, dans les spectres de masse, des pics correspondant aux peptides pontés et (ii) la difficulté à les identifier parmi les autres, due au fait qu'ils sont très minoritaires dans les mélanges obtenus. Dans ce contexte, le choix d'un spectromètre de masse alliant excellente résolution et très bonne précision sur la mesure de masse (FT-ICR, orbitrap) est judicieux. Il permet d'une part de bien séparer les différents constituants obtenus

après la digestion des complexes et d'autre part d'utiliser la masse exacte comme critère de sélection. Des stratégies permettant d'identifier plus facilement les peptides pontés dans le mélange très complexe obtenu après digestion enzymatique ont également été développées ces dernières années. Elles sont basées sur l'utilisation d'agents pontants possédant des isotopes stables (*58*), ou intégrant une fonction biotine permettant un enrichissement sélectif des peptides pontés (*59*). Des agents pontants permettant une identification plus aisée des peptides pontés en MS/MS ont également été mis au point ces dernières années (*60-62*). Récemment, l'utilisation de « crosslinkers » photoactivables a permis de mettre en évidence des sites d'interaction différents entre trois activateurs de la transcription (Gal4, Gcn4 et VP16) et le cofacteur MD15 (*63*). Cette étude montre par ailleurs la complémentarité des modes d'ionisation MALDI et ESI pour retrouver un grand nombre de peptides pontés. Dans un exemple un peu moins récent, Rappsilber *et al.* ont proposé un modèle tridimensionnel pour un complexe du pore nucléaire chez la levure (*64*).

Approche par marquage

Une deuxième approche consiste à modifier chimiquement la surface du complexe protéique accessible en solution et à identifier les sites de modifications par spectrométrie de masse. Les segments peptidiques impliqués dans des interactions protéine-protéine ne sont pas accessibles en solution et *a priori* ne seront pas modifiés. La comparaison des cartes d'accessibilité pour des protéines seules et associées permet de remonter à la topologie initiale du complexe. La modification chimique peut être réversible ou irréversible. Les échanges hydrogène/deutérium (HDX) des amides de la liaison peptidique sont un exemple de modifications labiles (*65-67*). La modification chimique des chaînes latérales par des réactifs spécifiques tels que l'acétanhydride, le diéthylpyrocarbonate ou le phenylglyoxal est, quant à elle, permanente (*67-68*), ce qui impose moins de contraintes au niveau de la rapidité de l'analyse après modifications. La première stratégie, qui fait l'objet de cette thèse, sera décrite en détails dans la seconde partie de cette introduction.

Les radicaux hydroxyles peuvent également être utilisés dans une approche par marquage covalent. Leur formation peut avoir lieu de différentes façons, *i.e.* par : chimie Fenton, radiolyse de l'eau, électrochimie ou photolyse UV du peroxyde d'hydrogène. Ces techniques aboutissent à des concentrations en radicaux différentes, avec des échelles de temps variées mais en principe les réactions avec les protéines conduisent aux mêmes produits. Les produits d'oxydation sont nombreux puisque quatorze acides aminés sur vingt peuvent être modifiés (Cys, Met, Trp, Tyr, Phe, His, Leu, Ile, Arg, Lys, Val, Ser, Gln et Glu). L'analyse des

produits de la réaction et des sites de modification est généralement réalisée par couplage LC-MS/MS après digestion enzymatique. La cinétique d'oxydation des différents peptides permet d'obtenir des informations de structure. Elle est établie à partir de la disparition des peptides non modifiés mais également à partir de l'apparition des peptides oxydés. Si le temps d'exposition aux radicaux est court (inférieur à quelques centaines de ms), alors la vitesse d'oxydation enregistrée pour un peptide donné dépendra principalement (i) de la réactivité intrinsèque des chaînes latérales des acides aminés et (ii) de leur accessibilité au solvant dans la structure tridimensionnelle de la protéine (ou du complexe). Ainsi, la comparaison des vitesses d'oxydation mesurées pour deux peptides dont les acides aminés modifiés sont identiques permettra d'obtenir des informations en termes d'accessibilité relative à la surface de deux régions différentes d'une protéine.

L'avantage majeur des approches par marquage covalent réside dans le fait de pouvoir analyser les peptides modifiés sans prendre de précautions particulières puisque la modification n'est pas labile. En revanche, la technique des échanges hydrogène/deutérium impose de travailler dans des conditions expérimentales strictes permettant de conserver le marquage jusqu'à l'analyse finale en spectrométrie de masse. Cependant, cette dernière approche ne modifie pas la structure tridimensionnelle du complexe, ce qui n'est pas toujours le cas avec des approches par marquage covalent. En effet, une altération de la structure des macroassemblages peut être observée sous l'effet de l'oxydation par l'utilisation de radicaux hydroxyles (*69*).

L'approche par marquage peut également être utilisée pour obtenir des informations sur la dynamique structurelle des protéines et complexes protéiques. La caractérisation des modifications dans des conditions expérimentales différentes permet de remonter aux changements structuraux. Ainsi, Dumoulin *et al.* ont étudié le changement conformationnel du lysozyme induisant la formation d'agrégats multimériques (*70*). Un autre exemple est l'étude des changements d'interaction protéine-protéine lors de la maturation des capsides du virus HIV-1 (*71*). Des informations sur les changements conformationnels d'une protéine lors de la fixation d'un ligand ont pu également être obtenues (*72-74*). Par ailleurs, une étude récente du complexe Arp2/3 formé de sept sous-unités protéiques, a permis de mettre en évidence finement des modifications de structure tridimensionnelle induites par la liaison à l'ATP en utilisant les radicaux hydroxyles (*75*).

Approche par protéolyse ménagée

Une autre approche consiste à réaliser une protéolyse ménagée. Les premiers travaux rapportant l'étude d'une empreinte protéique par protéolyse ménagée datent de 1987 et sont directement inspirés des travaux de « DNA footprint » (*76*). Le principe ici consiste à tester l'accessibilité à différentes protéases des protéines étudiées. Un profil protéolytique différent peut traduire des surfaces accessibles qui ne sont pas identiques ou un masquage par une molécule de ligand. Associée à la spectrométrie de masse, la protéolyse ménagée est ainsi devenue un outil puissant dont l'une des applications premières a été l'identification précise d'épitopes à partir de complexes antigène-anticorps immobilisés (*77*). Depuis, cette technique est largement utilisée pour des études de dynamique structurelle (*78*), d'interaction protéine-ligand (*79-82*), de différences conformationnelles liées à des mutations (*83-84*) ou pour l'élucidation de domaines structuraux (*85-87*).

Les enzymes classiquement utilisées sont la trypsine qui clive après les acides aminés basiques, tels que les résidus lysine et arginine, et la protéase V8 qui coupe spécifiquement après les résidus acide aspartique et acide glutamique. Elles ont été choisies préférentiellement en raison de la haute fréquence de ces résidus dans les protéines et de la complémentarité des profils protéolytiques obtenus. Par ailleurs, la protéolyse doit être la plus limitée possible afin de ne pas déstructurer la protéine conduisant à d'autres sites de coupure non représentatifs de la structure tertiaire. La résolution de cette méthode est cependant modeste. C'est la raison pour laquelle la protéolyse ménagée est très souvent couplée avec des approches par échanges hydrogène/deutérium afin d'obtenir des résultats complémentaires (*88-89*).

Analyse de complexes non covalents

L'avènement des techniques d'ionisation douces telles que l'ESI (« ElectroSpray Ionisation ») (*90*) et le MALDI (« Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation ») (*91*), a ouvert à la spectrométrie de masse un nouveau champ d'application, celui de l'analyse de macromolécules biologiques intactes (*92*). Pour le développement de ces méthodes qui ont, ces dernières années, largement participé à l'essor de la spectrométrie de masse dans le cadre des analyses protéomiques, J. Fenn et K. Tanaka ont été récompensés en 2002 par l'attribution du prix Nobel de chimie.

Par comparaison aux différentes techniques utilisées pour la caractérisation des protéines, la spectrométrie de masse apporte plusieurs avantages. Tout d'abord, elle est très sensible. En effet, quelques picomoles, voire même attomoles de peptides suffisent à obtenir un signal. Par ailleurs, la spectrométrie de masse est caractérisée par sa grande précision en masse. Elle est ainsi capable de déterminer des masses moléculaires à moins d'une partie par million (ppm) pour les instruments les plus précis, alors que la technique de SDS-PAGE (« Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis ») donne des erreurs de l'ordre de 20%. Enfin, la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse rapide. A titre de comparaison, un spectre de masse est enregistré en quelques secondes à minutes, tandis qu'une expérience de SDS-PAGE dure plusieurs heures.

Dans le cadre de l'étude des complexes protéiques, la spectrométrie de masse est susceptible de fournir d'une part des informations précises sur la stœchiométrie des macroassemblages et d'autre part des données structurales, en combinaison avec du marquage.

Une des questions souvent posées aux spectrométristes de masse concerne la possibilité de réaliser une mesure de masse directe d'un complexe protéique intact, dans le but d'obtenir des informations sur la stœchiométrie de l'interaction. Il convient de noter que la mesure de masse est alors effectuée sur le complexe en phase gazeuse alors que pour le biologiste, l'interaction d'intérêt est celle qui a lieu en solution. Dans ces conditions, une interaction non covalente présente en solution peut ne pas être détectée en phase gazeuse. C'est le cas, par exemple, des interactions hydrophobes. Des études ont ainsi montré l'impossibilité de corroborer les résultats obtenus en phase gazeuse et en solution pour ce type d'interaction (*93-94*). A l'inverse, des interactions principalement électrostatiques seront renforcées en phase gazeuse, et un complexe, même peu stable en solution, peut être détecté facilement par spectrométrie de masse. Compte tenu de ces éléments, il n'est pas toujours facile de relier des stabilités en phase gazeuse, étudiées par exemple en modifiant la tension à l'interface, aux stabilités en solution. Dans certains cas, le problème est encore plus complexe, puisque le type d'interaction en phase gazeuse peut être différent de celui en solution. L'exemple retenu est celui des complexes entre des cyclodextrines et des acides aminés aromatiques (*95*) : en solution, l'interaction est principalement de type hydrophobe entre le groupe aromatique et la cavité de la cyclodextrine, alors qu'en phase gazeuse, il s'agit d'une interaction ion-dipôle à l'extérieur de la cavité. Ceci implique la formation, en phase gazeuse, de complexes inexistants en solution donnant ainsi naissance à des faux positifs.

Malgré ces contraintes, quelques revues récentes de la littérature montrent l'intérêt de la spectrométrie de masse pour la détermination des masses moléculaires de complexes protéiques entiers (*96-99*). Actuellement, il est même possible de mesurer des masses moléculaires de l'ordre de plusieurs millions de daltons. Parmi les plus importantes jamais atteintes, il a celles des hémocyanines de 2,2 MDa de crabes abyssaux (*100*), du ribosome de *Thermus thermophilus* de 2,33 MDa (*98*), des assemblages viraux des capsides du virus de l'hépatite B de 3 et 4 MDa (*101*) et du complexe multiprotéique de l'uréase de *Helicobacter pylori* à 4,26 MDa (*98*).

La technique d'ionisation de référence pour analyser les complexes protéiques est l'électrospray (ou sa variante, le nano électrospray). Dans des cas particuliers, il est même possible de les étudier par MALDI (*102*), bien que cette méthode ne soit probablement pas généralisable à tous les systèmes. Quelques techniques émergentes pour l'analyse d'assemblages macromoléculaires ont été développées récemment ou sont en cours de développement comme la mobilité ionique (SMI) (*103*), l'« ElectroSonic Spray Ionization » (ESSI) (*104*) ou le « Laser-Induced Liquid Beam Ionization/Desorption » (LILBID) (*105*). Le processus d'ionisation doit être réalisé en conditions non dénaturantes (pH contrôlé) pour conserver les complexes protéiques dans leur conformation active. Il faut donc choisir un tampon (nature des sels) qui soit compatible à la fois avec la méthode d'ionisation employée et le maintien de l'intégrité des complexes biologiques. Dans le cas de l'électrospray, des sels volatils comme l'acétate d'ammonium ($AcNH_4$) sont préférentiellement utilisés. Néanmoins, lors de la préparation des échantillons, une étape de dessalage (par centrifugation, gel filtration, …) est indispensable. En ce qui concerne l'analyseur du spectromètre de masse, le choix est porté sur les temps de vol (« Time of Flight », ToF et « Quadrupole Time of Flight », Q-ToF) qui permettent d'analyser des ions avec des rapports masse sur charge élevés, propriété intéressante pour la détermination des masses moléculaires de complexes protéiques entiers. Une optimisation des paramètres instrumentaux est préalablement requise pour contrôler l'énergie communiquée aux ions dans l'interface du spectromètre de masse.

Pour les complexes protéiques qui restent intacts après leur ionisation en phase gazeuse, la spectrométrie de masse est ainsi devenue un outil très puissant pour obtenir des informations sur leur masse moléculaire et donc pour déterminer leur stœchiométrie.

Comme indiqué précédemment, la spectrométrie de masse est souvent combinée à une autre technique pour obtenir des informations de structure. On peut dans ce contexte citer les derniers développements dans le domaine de la mobilité ionique, qui permet de séparer différents complexes protéiques en fonction de leur structure en phase gazeuse. Le principe de la Spectrométrie de Mobilité Ionique (SMI) est illustré dans la Fig. I. 7. L'utilisation en routine de la SMI a été rendue possible par la commercialisation par Waters de spectromètres de masse équipés d'une cellule de mobilité ionique.

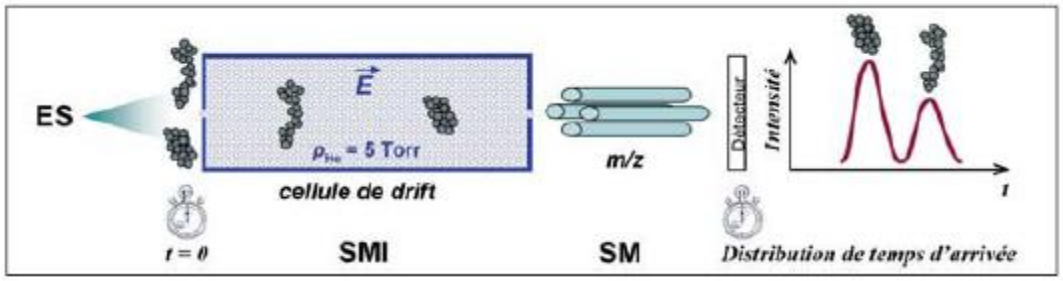


Fig. I. 7 Schéma du principe de la méthode de spectrométrie de mobilité ionique (SMI) couplée à la spectrométrie de masse (SM). Les ions produits par la source électrospray (ES) sont introduits dans la cellule de « drift » dans laquelle règne un champ électrique E. Le frottement avec les molécules d'hélium contenues dans la cellule étant plus important avec des ions de conformation dépliée, ceux-ci arriveront plus tard au détecteur. Ici les ions sont sélectionnés en masse par un quadripôle après la cellule de drift.

La mobilité ionique est l'équivalent en phase gazeuse de la mobilité électrophorétique : les ions sont à la fois accélérés dans le champ électrique et freinés par les nombreuses collisions avec le gaz-tampon (hélium). Il s'établit donc un régime stationnaire : les ions atteignent une vitesse de translation constante. La mobilité ionique correspond au rapport entre la vitesse de « drift » et le champ électrique appliqué. Plus l'ion a une conformation compacte, moins sa section efficace est grande et moins il est freiné par des collisions, donc plus sa vitesse est élevée. Il arrivera plus rapidement au détecteur par rapport à un ion de conformation plus déployée. Un ion « funnel » ou un piège à ions quadripolaire est placé en amont de la cellule de « drift » afin de focaliser les ions en "paquets" à envoyer à un temps zéro et ainsi pour pouvoir mesurer la distribution des temps d'arrivée (« Arrival Time Distribution », ou ATD).

Les premiers instruments de SMI ont été conçus par quelques groupes pionniers en la matière (Bowers (*106-107*), Jarrold (*108*) et Clemmerb (*109*) pour les biomolécules). La société Waters (Milford, Etats-Unis, www.waters.com) a récemment commercialisé le système Synapt™ High Definition MS, qui inclut une cellule de mobilité de type « travelling

wave » (champ électrique oscillant entre les anneaux successifs d'un tunnel à ions) entre un filtre quadripolaire et un analyseur à temps de vol.

L'analyse des complexes protéiques par SMI/MS permet non seulement d'obtenir des informations sur leur taille mais également des données de topologie (*110*). L'agencement des protéines au sein des complexes peut être sondé suivant deux approches différentes. La première consiste à dissocier le complexe en phase gazeuse, les protéines se trouvant à la périphérie se détachent théoriquement en premier. Néanmoins, il est difficile de fragmenter en phase gazeuse des complexes de très haut poids moléculaire. Par ailleurs, l'activation nécessaire à la dissociation conduit à une augmentation des sections efficaces de collision et donc à une perturbation partielle de la conformation native des protéines du complexe. Il est alors possible que les protéines qui se séparent du complexe en premier ne soient pas celles qui ont initialement les surfaces d'interaction les plus petites avec les autres partenaires protéiques (*111*). Néanmoins l'utilisation récente de la dissociation sur surface par le groupe de V. Wysocki pour dissocier ces complexes en maintenant les structures des sous-unités, semble ouvrir des perspectives nouvelles et prometteuses dans le domaine (*112*). L'autre approche consiste à dénaturer progressivement le complexe en solution et à analyser les différents sous-complexes par SMI pour reconstruire la topologie initiale. L'avantage majeur de cette approche est que les sous-complexes sont formés en solution et reflètent donc de manière plus fidèle la composition du complexe dans son état natif. Le laboratoire de Carol Robinson, en Angleterre, est devenu ces dernières années leader pour l'analyse structurale par SMI de ces complexes protéiques de très grande taille (*113*).

I.1.3. Méthodes d'analyse biochimique

Ces méthodes permettent de travailler sur l'objet biologique lui-même. Parmi elles, le TAP-Tag (« Tandem Affinity Purification-Tag ») et le double hybride occupent une place de choix pour l'étude des interactions protéine-protéine. Il s'agit de deux techniques *in-situ*.

La méthode du TAP-Tag permet d'isoler le complexe protéique étudié qui est dans sa conformation native, par deux étapes de purification successives (Fig. I. 8). La première utilise une colonne constituée de billes greffées avec des immunoglobulines G (IgG) qui ont une forte affinité pour la protéine A, protéine recombinante dite "appât" à laquelle est fixé le complexe protéique. Le complexe retenu sur cette colonne est ensuite élué spécifiquement par

coupure avec la protéase TEV. Puis, il est appliqué sur la seconde colonne constituée de billes de calmoduline. En présence d'ions calcium, la calmoduline est sous sa forme active favorisant l'attachement du complexe. L'élution est réalisée par l'ajout d'un chélateur de calcium (EGTA) qui rend la calmoduline inactive et donc libère le complexe. Finalement, ce dernier pourra être analysé par spectrométrie de masse afin de déterminer ses différents constituants ou bien être utilisé pour des études fonctionnelles.

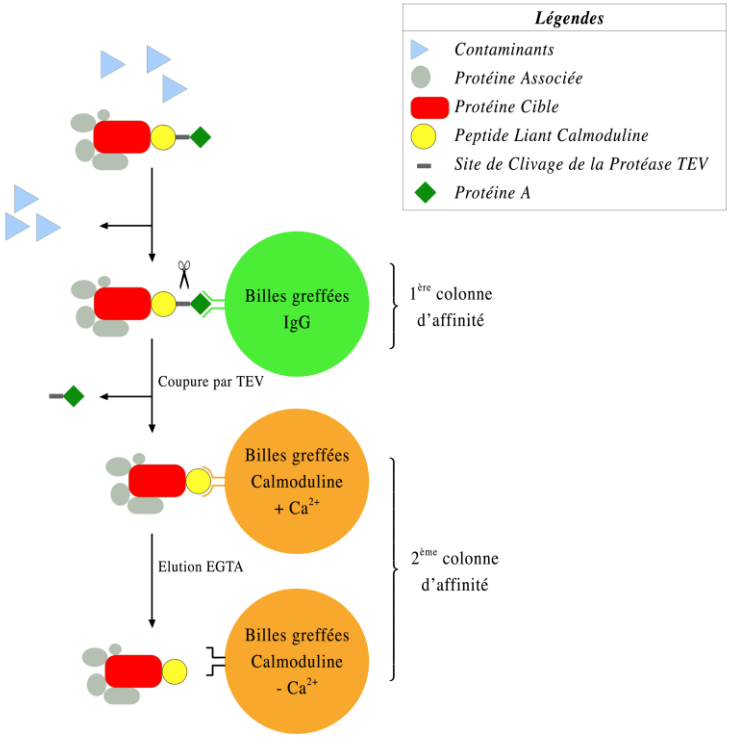


Fig. I. 8 Schéma du principe de la technique du TAP-Tag.

Cette méthode a été appliquée à l'analyse à haut débit du protéome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*114-116*). Son utilisation chez les eucaryotes supérieurs reste plus complexe mais tout de même envisageable (*117*). Des améliorations de l'approche TAP-Tag/MS ont été apportées pour la possibilité d'utiliser cette méthode à haut débit chez les eucaryotes supérieurs (*118*).

La technique du double hybride permet, quant à elle, de mettre en évidence une interaction physique entre deux protéines X et Y. Le principe est le suivant : par génie génétique, deux protéines de fusion sont synthétisées puis exprimées dans la levure. La première est constituée de la protéine X à laquelle est fusionné le domaine de liaison à l'ADN (DL) d'un facteur de transcription, tandis que la seconde est formée de la protéine Y et du domaine d'activation de

la transcription (DA) de ce même facteur. Les deux domaines ont été dissociés et le gène rapporteur de la β-galactosidase est sous le contrôle de la séquence où vient se fixer spécifiquement le DL. La β-galactosidase est une enzyme qui transforme un substrat soluble et incolore en un composé bleu insoluble. Lorsque la protéine Y interagit avec la protéine X, le DA est de nouveau associé au DL permettant alors la transcription du gène rapporteur. Les clones capables d'utiliser le galactose présent dans le milieu peuvent donc être sélectionnés (colonies bleues). En effet, le changement de couleur témoigne de l'interaction entre les deux protéines.

Ce système a été, à l'origine, mis au point pour tester l'interaction pouvant exister entre deux protéines connues (*119*). De nouvelles variantes de la méthode double hybride ont fait leur apparition récemment, permettant la détection des protéines impliquées dans des interactions avec l'ADN (« one-hybrid system »), l'ARN (« RNA-based three-hybrid system »), de petits ligands (« small molecule-based threehybrid system ») et des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles (« tribrid system ») (*120*).

Il existe également des techniques de séparation des complexes protéiques en conditions non dénaturantes pour conserver intactes les interactions. Ainsi, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition bleue native ou BN-PAGE (« Blue Native-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis ») permet d'isoler les macro-assemblages dans leur conformation native en fonction de leur taille et de leur forme. En combinaison avec une seconde dimension de séparation sur gel, cette fois-ci en conditions dénaturantes, les protéines d'un même complexe peuvent à leur tour être isolées puis identifiées par spectrométrie de masse. Il est donc possible, par cette technique, de mettre en évidence le nombre et la masse moléculaire des protéines impliquées dans le complexe.

Cette technique peut être utilisée pour l'isolation de complexes protéiques membranaires ou pour les complexes protéiques extraits de cellules entières. Un grand nombre d'applications pour cette technique concerne l'analyse de complexes protéiques issus de plantes (*121*).

I.2. Méthode associant les échanges hydrogène/deutérium à la spectrométrie de masse pour l'étude de la dynamique structurelle des protéines en solution

La technique des échanges hydrogène/deutérium (HDX) en solution s'est révélée très performante pour l'étude de la conformation et de la dynamique structurelle des protéines. La spectroscopie RMN à deux dimensions a longtemps été choisie comme méthode d'analyse de ces échanges isotopiques (*32, 122-123*). L'utilisation de la spectrométrie de masse, comme méthode alternative d'analyse après échanges H/D s'est développée ces dernières années. La spectrométrie de masse, qui permet de s'intéresser à des complexes protéiques de très haut poids moléculaire, ouvre ainsi de nouvelles opportunités pour l'étude de systèmes protéiques plus importants (>> 50 kDa). Par ailleurs, en raison de sa meilleure sensibilité, cette technique requiert une quantité initiale de matériel beaucoup moins importante (de l'ordre de quelques dizaines de ng/analyse). Elle permet également de détecter la coexistence de différents conformères protéiques en solution (*124*).

Les premiers travaux combinant les échanges H/D et la spectrométrie de masse datent de 1991. Ils portent alors sur l'analyse de protéines entières (*125*). Depuis les avantages de la spectrométrie de masse ont permis aux échanges isotopiques H/D d'étudier des protéines individuelles de poids moléculaires plus importants (*126*), des protéines s'associant pour former des polymères de haut poids moléculaire (*127*), des particules virales (*71, 128*) ainsi que des complexes protéine-ligand (*129*) ou protéine-protéine (*130*). De plus, l'association HDX/MS semble prometteuse pour l'analyse structurale de protéines membranaires, connues pour être difficilement étudiables par beaucoup d'autres techniques (*131-133*).

I.2.1. Principe des échanges isotopiques hydrogène/deutérium appliqués aux protéines en solution

I.2.1.1. **Quel type d'hydrogène va-t-on sonder dans nos expériences HDX ?**

Les hydrogènes liés à des hétéroatomes dans les molécules biologiques telles que les protéines sont labiles. Autrement dit, les atomes d'hydrogène appartenant aux groupements O-H, N-H et S-H peuvent s'échanger avec ceux des molécules d'eau environnantes. Il s'agit des hydrogènes des protéines qui sont représentés en bleu et en rouge sur la Fig. I. 9.

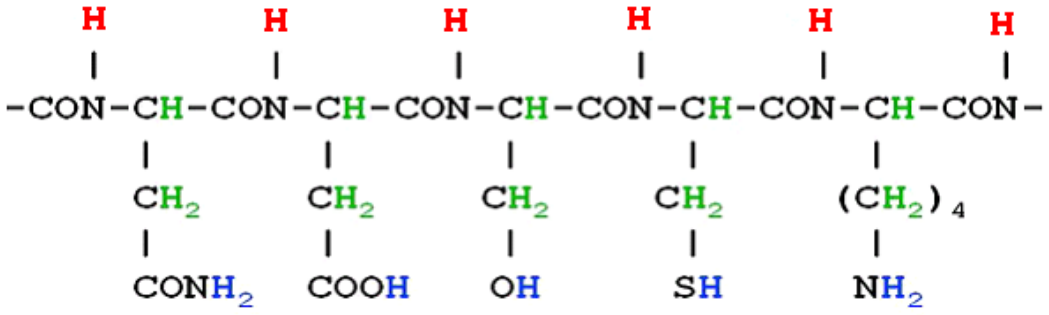
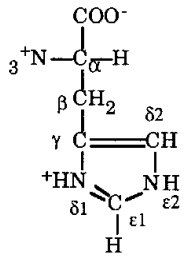


Fig. I. 9 Schéma des différents types d'hydrogène dans une protéine.

Si un atome d'hydrogène est échangé avec un autre atome d'hydrogène alors il est évident que ce remplacement ne sera pas détecté par spectrométrie de masse. En revanche, l'exposition d'une protéine à de l'eau lourde (D_2O ou ^2H_2O) conduit à des remplacements d'hydrogènes (^1H) par des deutériums (^2H) qui accroissent la masse totale de la protéine de 1 Da par hydrogène échangé. Lorsque les échanges isotopiques se réalisent dans le sens décrit précédemment, *i.e.* $^1H \rightarrow {}^2H$, alors on utilise l'expression « exchange-in ». Mais les échanges isotopiques peuvent être réalisés dans les deux directions. On emploie alors le terme de « exchange-out » pour évoquer les échanges qui s'opèrent dans le sens $^2H \rightarrow {}^1H$ quand une protéine complètement deutérée est incubée dans de l'eau légère et que des deutériums sont alors remplacés par des hydrogènes (*134*). Les études d'échange H/D sont principalement réalisées suivant le principe « exchange-in ». En effet, ce dernier ne nécessite pas d'étape supplémentaire qui consisterait à deutérer complètement les protéines avant le début des expériences HDX/MS. C'est la stratégie que nous avons adoptée pour notre étude structurale de complexes protéiques.

Si on considère maintenant les hydrogènes qui sont liés de manière covalente à un atome de carbone dans les protéines, dessinés en vert sur la Fig. I. 9, ces derniers ne subiront pas d'échange isotopique dans nos conditions expérimentales. Seule une catalyse chimique importante serait à envisager pour procéder à l'échange isotopique de ces hydrogènes. Mais il semblerait qu'il soit possible d'échanger l'hydrogène de la liaison C(ε_1)-H du groupement imidazole de la chaîne latérale de l'histidine (Fig. I. 10) (*135*).



Histidine
His (H)

Fig. I. 10 Schéma de l'acide aminé histidine.

Parmi les hydrogènes échangeables des protéines, il y a :

- ceux des chaînes latérales des acides aminés (en bleu sur la Fig. I. 9) et des extrémités N- et C-terminales (groupements amino et carboxy) qui ont des vitesses d'échange isotopique très rapides de l'ordre de la milliseconde à la seconde. Dans l'échelle de temps de nos expérimentations, ces vitesses d'échange sont trop rapides pour que nous puissions les observer.

- les hydrogènes d'amide des liaisons peptidiques (en rouge sur la Fig. I. 9) qui ont des vitesses d'échange isotopique plus lentes de l'ordre de la minute à l'heure et donc qui sont compatibles avec une détection par spectrométrie de masse. Au cours de nos expériences HDX/MS, nous allons par conséquent nous intéresser aux échanges isotopiques de ces hydrogènes.

Dans une protéine tous les acides aminés, à l'exception de la proline et du premier résidu de la chaîne polypeptidique, possèdent un groupement amide N-H de liaison. Il est par conséquent possible d'obtenir des informations structurales tout le long de la chaîne polypeptidique.

I.2.1.2. **Des échanges isotopiques dépendant de la structure et de l'accessibilité des protéines**

La vitesse des échanges isotopiques H/D dépend de l'accessibilité au solvant mais également de la stabilité de la structure locale des protéines. Autrement dit, les hydrogènes d'amide situés dans les régions flexibles ou non structurées de la protéine tels que les boucles et les coudes ou dans les régions accessibles au solvant ont des vitesses d'échange plus rapides, identiques à celles observées dans le cas d'un peptide non structuré. Au contraire,

ceux qui sont impliqués dans des structures secondaires stables comme les hélices α et les feuillets β ainsi que ceux enfouis dans le cœur hydrophobe des protéines s'échangent plus lentement car ils sont protégés (*136*).

I.2.1.3. **Mécanismes de la réaction d'échange hydrogène/deutérium dans les protéines et peptides**

I.2.1.3.1. ***Définition du facteur chimique***

Il vient d'être dit que l'échange isotopique est plus rapide quand l'hydrogène d'amide de la liaison peptidique est complètement exposé au solvant et non impliqué dans des liaisons hydrogène intramoléculaires stables. Dans ces conditions, la constante de vitesse du remplacement de N-H par N-D (« exchange-in ») est notée k_{ch}. Il s'agit du facteur chimique.

I.2.1.3.2. ***Facteurs influençant le facteur chimique***

Pour chaque hydrogène d'amide du squelette polypeptidique considéré individuellement, la valeur de k_{ch} est déterminée selon une série de facteurs : le pH, la température et la composition du solvant, la pression, la force ionique du milieu et la séquence locale en acides aminés. Nous détaillerons uniquement l'influence des trois facteurs les plus représentatifs, soit le pH (ou pD en solution deutérée), la température et la séquence locale.

Les échanges isotopiques H/D sont fortement dépendants du pH, ce qui est un point extrêmement important qui est utilisé pour leur analyse par spectrométrie de masse. La réaction peut s'effectuer par des mécanismes de catalyse acide ou basique (II.1.3.3.). Le facteur chimique k_{ch} s'exprime comme suit :

$$k_{ch} = k_{D_3O^+} [D_3O^+] + k_{OD^-} [OD^-] + k_{D_2O}$$

où $k_{D_3O^+}$ et k_{OD^-} sont les constantes d'échange en catalyse acide et en catalyse basique respectivement.

Des études sur des peptides modèles, des polyalanines, ont montré que k_{OH^-} est supérieure d'un facteur 10^8 à $k_{H_3O^+}$ (137). Le pH influence donc les vitesses d'échange qui sont

principalement conditionnées par les ions OH^- pour des pH supérieurs à 3 et par les ions H_3O^+ pour des pH inférieurs à 3.

Ainsi, la constante de vitesse d'échange k_{ch} peut être reliée au pD (Fig. I. 11). Le minimum d'échange se produit pour un pD voisin de 2-3, pour lequel les échanges dus à la catalyse acide sont équivalents à ceux dus à la catalyse basique (pD_{min}).

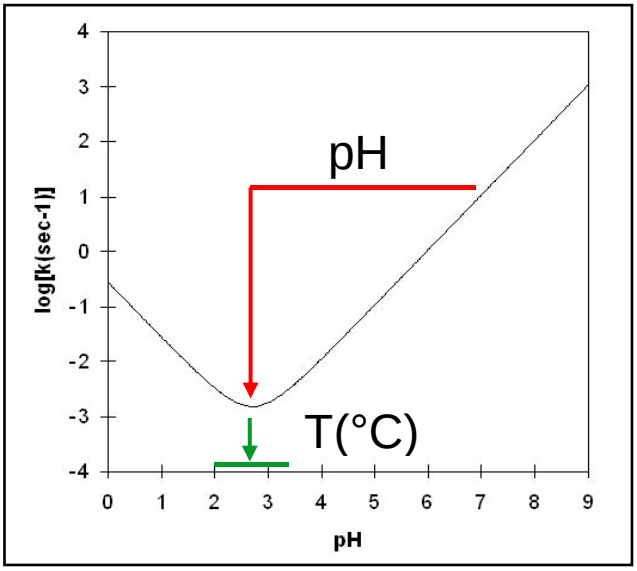


Fig. I. 11 Schéma représentant le taux d'échange hydrogène/deutérium en fonction du pH.

La plupart des hydrogènes échangeables des chaînes latérales ont des pH_{min} plus grands que ceux des hydrogènes d'amide. Ainsi, lorsque le pH est ajusté à 2,5 pour minimiser l'échange des hydrogènes d'amide avant l'analyse par spectrométrie de masse, les hydrogènes des chaînes latérales continuent de s'échanger par catalyse acide, à l'exception des H_ε et H_η de l'arginine.

Les vitesses d'échange H/D sont également dépendantes de la température. Elles sont multipliées par trois pour chaque incrément de 10°C (*138*). Ainsi, lorsque l'on veut minimiser les échanges, une diminution de la température de 20°C à 0°C conduit à une diminution de la vitesse d'échange d'un facteur 10, ce qui n'est pas négligeable.

Le facteur chimique k_{ch} est principalement affecté par des changements de température. En effet, la constante d'ionisation de l'eau varie avec la température, altérant les concentrations de catalyseurs disponibles pour l'échange. Par ailleurs, à basse température, les coefficients de diffusion sont également modifiés et la probabilité de collision entre le donneur de proton et

le receveur diminue, conduisant à un nombre de transfert (et donc un taux d'échange) moins grand. Le facteur chimique k_{ch} s'exprime donc plutôt comme suit :

$$k_{ch}(t) = k_{D_3O^+}(t)\,[D_3O^+] + k_{OD^-}(t)\,[OD^-] + k_{D_2O}(t)$$

Les expériences d'échange H/D s'effectuent à pD physiologique pendant des temps d'incubation dans D_2O variables et à une température adaptée à la protéine d'intérêt. Pour ne garder que les deutériums échangés avec les hydrogènes d'amide des liaisons peptidiques, et donc pour s'affranchir de ceux des chaînes latérales des acides aminés, la protéine est remise dans de l'eau légère (H_2O) avant analyse. Les deutériums des chaînes latérales sont alors rapidement ré-échangés en hydrogènes. Mais cette étape doit être contrôlée afin de ne pas ré-échanger également les deutériums d'amide en hydrogènes. Ainsi, pour diminuer au maximum les vitesses d'échange, la réaction d'échange est arrêtée en ajoutant de l'eau (H_2O) à pH acide (2,5) et en diminuant brusquement la température de l'échantillon (0°C). C'est cette approche de démarquage dans H_2O des chaînes latérales avant analyse, que nous avons choisie pour ma thèse. D'autres approches peuvent néanmoins être envisagées comme le marquage de la protéine suivie de l'analyse de tous les deutériums (*139*). Dans ce dernier cas, il n'y a pas d'étape de démarquage.

Enfin, les vitesses d'échanges des hydrogènes d'amide dans une protéine ou dans un peptide sont sensibles aux effets de blocage stérique ou inductif liés à la présence proche de certaines chaînes latérales (*138, 140*). Les effets inductifs sont dus principalement à la présence de groupements voisins attracteurs d'électrons (chaînes latérales polaires) qui vont augmenter l'acidité des protons d'amide en diminuant le pK, favorisant la déprotonation. Dans le cas d'une catalyse basique, la vitesse d'échange est donc augmentée. Les effets d'encombrement stérique, sont quant à eux, liés à la présence de résidus aliphatiques (isoleucine par exemple) ou aromatiques. Les chaînes latérales de ces amides aminés bloquent stériquement l'interaction entre le catalyseur et le squelette polypeptidique, ralentissant l'échange.

L'additivité de ces deux phénomènes a été étudiée en détails et a permis d'établir une équation pour k_{ch} tenant compte de facteurs correctifs associés à la nature des chaînes latérales des acides aminés voisins (à droite et à gauche du résidu d'intérêt), pour une catalyse acide A ou basique B :

$$k_{ch}(t) = k_{D_3O^+}(t)\,(A_{gauche} \times A_{droite})\,[D_3O^+] + k_{OD^-}(t)\,(B_{gauche} \times B_{droite})\,[OD^-] + k_{D_2O}(t)\,(B_{gauche} \times B_{droite})$$

I.2.1.3.3. ***Catalyse de la réaction***

Les échanges peuvent se produire soit par catalyse basique soit par catalyse acide (Fig. I. 12). Dans les conditions physiologiques dans lesquelles les protéines et les peptides se trouvent généralement, la catalyse basique est la plus fréquente.

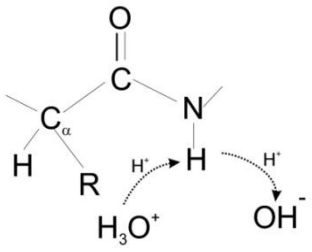


Fig. I. 12 Catalyse basique ou acide permettant l'échange isotopique d'un hydrogène d'amide sur le squelette polypeptidique.

La première étape, en catalyse basique, est l'abstraction d'un proton amidique par un ion hydroxyde (OD^-) et formation d'un anion imidate. Cet imidate est ensuite reprotoné par D_2O pour procéder à l'échange. Nous venons de voir précédemment que le facteur chimique k_{ch} est minimal pour un pD≈2,5. Au-delà d'un pD égal à 4, il augmente d'un ordre de grandeur (facteur 10) avec chaque unité de pD atteignant des valeurs de l'ordre de 10^3 s^{-1} pour un pD de 9 (*141*) (Fig. I. 11). La possibilité de régler k_{ch} en contrôlant la basicité du solvant est cruciale dans beaucoup de stratégies HDX/MS.

I.2.1.3.4. ***Cinétique d'échange au niveau de la protéine et définition du facteur de protection***

Comme la vitesse d'échange N-H → N-D est modulée par les propriétés conformationnelles des protéines, il devient alors possible d'utiliser la technique des échanges isotopiques H/D pour les études structurales. Les régions structurées possèdent une multitude de liaisons hydrogènes intramoléculaires N-H···O=C qui sont autant de sites protégés difficilement accessibles par les molécules de solvant. Les vitesses d'échange isotopique vont

donc varier considérablement selon l'implication de l'hydrogène concerné dans des structures secondaires stables (*142*) ou la flexibilité de la région peptidique à laquelle il appartient (*141*) ou encore suivant sa distance par rapport à la surface de la protéine (*143*). Ces différents facteurs contribuent à la protection des hydrogènes d'amide telle que la constante de vitesse globale d'échange k_{HDX} soit bien inférieure à k_{ch}. Le facteur de protection P correspondant est donné par la formule qui suit :

$$P = k_{ch}/k_{HDX}$$

où k_{HDX} est la constante de vitesse globale d'échange d'un hydrogène d'amide donné dans la conformation native d'une protéine et k_{ch} la constante de vitesse d'échange de l'hydrogène concerné si celui-ci se trouvait dans un peptide non structuré. P est la probabilité que l'hydrogène en question soit protégé à l'accès du solvant (et aux catalyseurs). P est alors dépendant de l'accessibilité au solvant et de la participation de l'hydrogène concerné à des liaisons hydrogène. Le facteur de protection peut excéder parfois la valeur de 10^6 pour une protéine dans sa conformation native repliée.

I.2.1.3.5. *Deux modèles de cinétique d'échange en fonction de la vitesse de dépliement et repliement des protéines*

Néanmoins, même un hydrogène d'amide protégé peut être échangé. En effet, une protéine en solution est une molécule dynamique. Autrement dit, même dans son état natif replié, elle peut subir des fluctuations conformationnelles résultant de son dépliement pendant un temps très court. L'échange isotopique d'un hydrogène d'amide protégé ne peut donc avoir lieu que lorsque la protéine adopte des d'états intermédiaires transitoires dépliés. Ce dépliement peut être localisé ou impliquer la protéine dans sa globalité. Les constantes de vitesse du dépliement et du repliement sont désignées par k_1 et k_{-1} respectivement et le mécanisme général de l'échange peut être décrit comme suit :

$$N-H_{replié} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} N-H_{déplié} \xrightarrow[D_2O]{k_{ch}} N-D_{déplié} \underset{k_1}{\overset{k_{-1}}{\rightleftarrows}} N-D_{replié}$$

avec l'existence d'une combinaison unique de valeurs de k_1, k_{-1} et pour chaque hydrogène d'amide. En accord avec ce modèle, l'échange isotopique ne peut avoir lieu qu'après une rupture transitoire des liaisons intramoléculaires de la protéine repliée rendant les hydrogènes

d'amide échangeables. Puis la protéine se replie pour revenir à un état natif. La constante de vitesse globale d'échange k_{HDX} est donnée par la formule suivante :

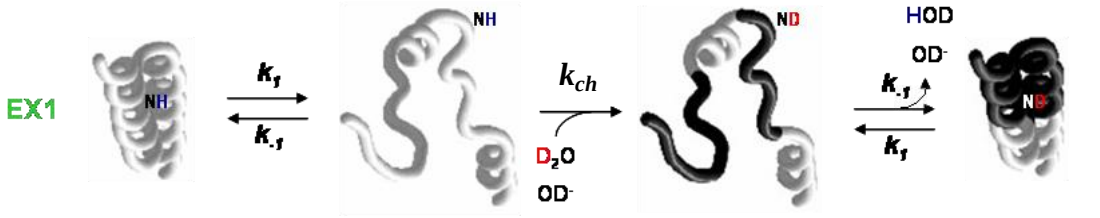
$$k_{HDX} = \frac{k_1 \times k_{ch}}{k_1 + k_{-1} + k_{ch}}$$

Deux modèles de cinétique, EX1 et EX2 (*123, 144*), sont discutés à partir de ce mécanisme d'échange. Le premier modèle (EX1) (Fig. I. 13) est caractérisé par :

$$k_{ch} >> k_{-1} > k_1$$

impliquant que tous les hydrogènes d'amide sont échangés avant le repliement de la protéine au cours du tout premier événement de dépliement. L'étape cinétiquement limitante est donc le dépliement de la protéine ce qui se traduit par :

$$k_{HDX} = k_1$$



N - $H_{replié}$ **N - $H_{déplié}$** **N - $D_{déplié}$** **N - $D_{replié}$**

Fig. I. 13 Principe de l'échange H/D dans le cas d'une cinétique EX1.

Inversement, le second modèle (EX2) (Fig. I. 14) est caractérisé par :

$$k_{-1} >> k_{ch} >> k_1$$

menant à l'expression :

$$k_{HDX} = K_1.k_{ch}$$

où $K_1=k_1/k_{-1}$ est le constante d'équilibre de dépliement de la protéine native. Comme la protéine se replie plus vite qu'elle n'échange, la probabilité d'échange pendant un seul

événement dépliement/repliement est faible. L'étape cinétiquement limitante est donc la vitesse d'échange k_{ch} et l'échange d'un hydrogène a généralement lieu après un grand nombre d'étapes de dépliement/repliement. Dans ce modèle, le facteur de protection est donné par :

$$P = K_1^{-1}$$

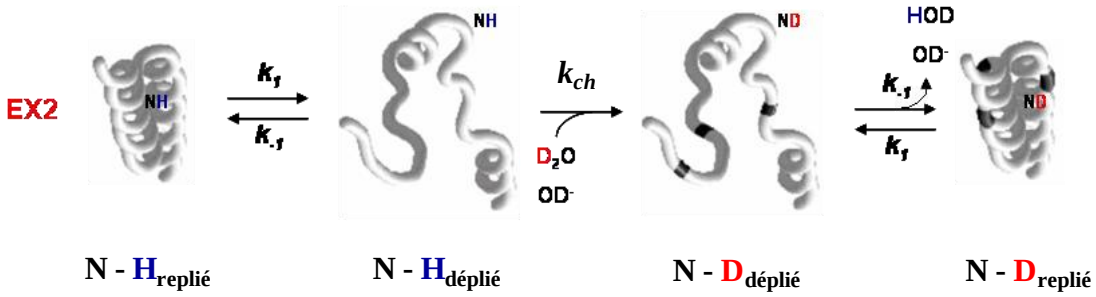


Fig. I. 14 Principe de l'échange H/D dans le cas d'une cinétique EX2.

Dans des conditions physiologiques, le premier modèle (EX1) est moins fréquent que le second (EX2). Les vitesses d'échange par le mécanisme EX2 dépendent de manière linéaire de la concentration en catalyseurs alors que dans le mécanisme EX1, la vitesse ne varie pas avec la quantité de catalyseurs. Ce dernier est généralement forcé par l'utilisation de conditions dénaturantes telles que des températures ou un pH élevés ou encore par l'utilisation de chaotropes. On peut néanmoins rencontrer le cas de protéines pour lesquelles différentes régions s'échangent simultanément avec des cinétiques d'ordre 1 (modèle EX1) et 2 (modèle EX2). Par ailleurs, il ne faut pas perdre de vue que même une protéine native peut présenter des hydrogènes d'amide non protégés de façon permanente, *i.e.* exposés au solvant et non impliqués dans des liaisons hydrogène. L'échange à ces sites est réalisé sans dépliement de la protéine, la vitesse y est alors plus rapide ($k_{HDX} \approx k_{ch}$).

I.2.2. Techniques d'incorporation des deutériums dans les protéines

Pour mesurer un taux d'échange hydrogène/deutérium dans une protéine, en condition « exchange-in », la première étape consiste à l'exposer à du deutérium. Il existe deux grandes stratégies d'incorporation des deutériums dans les protéines. L'exposition aux deutériums peut être réalisée de manière continue (marquage continu) ou pulsée (marquage pulsé). La méthode sera choisie en fonction du type d'information que l'on souhaite obtenir (*145*).

I.2.2.1. **Marquage continu**

Il s'agit de la méthode la plus simple utilisée dans la plupart des études HDX/MS. Elle consiste à diluer d'un facteur quinze à vingt une protéine qui se trouve initialement dans son tampon hydrogéné, dans un tampon identique mais contenant 100% de D_2O (*146*). L'incorporation des deutériums est alors suivie en fonction du temps d'exposition de la protéine en condition native dans le D_2O. Une dilution d'au moins un facteur quinze permet de s'assurer qu'une fois qu'un hydrogène est remplacé par un deutérium, la réaction ne revient pas en arrière.

Le marquage continu est alors poursuivi jusqu'à ce que le temps maximum d'exposition aux deutériums choisi initialement soit atteint. Typiquement, il varie des minutes aux heures (parfois même aux jours). En pratique, des aliquotes de la solution sont prélevés régulièrement, leur réaction est brusquement arrêtée et l'analyse se fait par spectrométrie de masse.

Au cours de l'échange, la masse de la protéine augmente progressivement avec l'incorporation en deutériums selon les paramètres de cinétique décrits précédemment. Les régions présentant une conformation dépliée pendant un temps très long subiront des échanges plus rapides que d'autres régions ayant une conformation plus compacte. D'après le mécanisme général de l'échange, le marquage continu permet d'obtenir essentiellement des informations sur la dynamique conformationnelle des protéines dans des conditions d'équilibre plutôt que sur leur structure à proprement parler. Cependant, il existe un lien évident entre ces deux aspects. En effet, des régions hautement structurées sont généralement moins dynamiques que des régions désordonnées.

I.2.2.2. **Marquage pulsé**

Le marquage pulsé est, quant à lui, essentiellement utilisé pour étudier les mécanismes de repliement des protéines ainsi que pour détecter et caractériser des états intermédiaires transitoires (*147*).

Dans les expériences de marquage pulsé, une protéine initialement dénaturée est rapidement transférée dans un solvant approprié permettant le déclenchement du processus de

repliement. A des temps bien définis au cours de la réaction, la protéine est ensuite exposée à du deutérium pendant un temps très court (typiquement 10 s ou moins). Comme le temps de marquage est très court, seuls les hydrogènes d'amide accessibles et échangeables facilement (ceux qui sont dans les parties non structurées de la protéine ou dans les parties les plus accessibles au solvant) sont deutérés. Des séries de mesures sont effectuées en faisant varier l'intervalle de temps entre l'initiation du repliement et le pulse de deutérium. De cette façon, il est possible d'obtenir des aperçus détaillés de la séquence temporelle des événements qui conduisent la protéine d'un état déplié à sa conformation native. Les pulses de deutérium requièrent des conditions basiques (pD 8-10) pour s'assurer qu'un grand nombre d'échanges isotopiques se produisent pendant l'étape courte de marquage. La réaction de marquage est arrêtée par une rapide baisse du pH et de la température (à pH 2,5 et à 0°C) de la solution ou par l'évaporation du solvant pendant le processus d'ionisation par électrospray lors d'expériences « on-line » HDX/MS. L'usage d'un système automatisé est nécessaire pour réaliser des pulses sur des temps très courts (< 10 ms) et accéder ainsi à des dynamiques très rapides.

La dénaturation préalable de la protéine est effectuée par l'addition d'un agent qui va perturber sa structure (*148*). Ces agents sont généralement des chaotropes, mais peuvent également être des ligands qui vont venir se fixer sur la protéine, ou un simple changement de température ou de pH.

I.2.3. Analyse de l'incorporation des deutériums dans les protéines par spectrométrie de masse

Les échanges H/D en solution sont donc devenus, ces dernières décennies, un outil technique puissant pour l'analyse structurale et dynamique des protéines (*149*). Alors que la plupart des études HDX initiales utilisaient la RMN à haute résolution (*32*) comme méthode pour le suivi des cinétiques d'échange H/D, la spectrométrie de masse occupe désormais une place de choix (*150-153*).

I.2.3.1. **Analyse des échanges : avantages de la MS vs. RMN**

C'est le développement de méthodes de spectroscopie RMN multidimensionnelle de haute résolution (*154-155*) qui a permis d'exploiter toute la puissance de la technique HDX (*156*).

La RMN est restée pendant longtemps l'outil de choix pour suivre les échanges H/D car de ces deux isotopes, seul l'hydrogène conduit à un signal détectable. Ainsi, remplacer des hydrogènes d'amide par des deutériums peut être facilement suivi en observant la disparition des signaux correspondant dans les spectres RMN. L'analyse des échanges H/D par RMN devient alors facile une fois que tous les signaux ont été attribués. Par ailleurs, elle est réalisée en solution dans la continuité du marquage rendant son interprétation aisée. Un profil de deutération en solution est observé en solution n'engendrant pas de problèmes quelconques.

L'échange d'un hydrogène par un deutérium conduisant à un incrément de masse de 1 Da, peut également être suivi de manière très simple par spectrométrie de masse. Cette technique, plus récente, offre par ailleurs plusieurs avantages importants par rapport à la RMN. Elle permet des analyses plus rapides sur des systèmes plus complexes tant par la diversité que par la taille avec moins de matériel initialement. Néanmoins, l'association HDX/MS n'atteint que rarement la haute résolution spatiale facilement accessible par la technique HDX/RMN. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est récemment apparue comme une solution à ce problème faisant de la technique HDX-MS/MS un candidat potentiel pour devenir une méthode de choix pour l'analyse structurale et dynamique des protéines.

I.2.3.2. **Approche classique « bottom-up »**

Comme il a été dit précédemment, la stratégie du marquage continu est choisie pour la plupart des études en HDX/MS. Elle consiste à suivre le taux de deutération des protéines en fonction de leur temps d'exposition *t* à D_2O pour détecter, le plus souvent, des différences en réponse à des modifications chimiques ou expérimentales (*157-158*), à la liaison de ligands (*159-160*) ou encore à la formation de complexes (*161*). L'incorporation des deutériums peut être mesurée au niveau de la protéine entière (échange global) et/ou pour des courts segments protéiques (échange local). Seulement, la mesure de l'échange global ne présente aucune résolution spatiale puisque elle est réalisée pour l'ensemble des hydrogènes d'amide de la protéine. Les expériences spatialement résolues apportent, quant à elles, des informations sur le comportement vis-à-vis de la deutération de régions spécifiques de la protéine.

I.2.3.2.1. ***Digestion protéolytique et analyse par LC-MS***

Les expériences spatialement résolues dérivent pour la plupart de l'approche classique de fragmentation enzymatique en solution (*146, 162-163*), appelée approche « bottom-up ». La digestion des protéines par des protéases, conduisant à des fragments peptidiques pour lesquels le taux d'échange peut être calculé, a permis une première amélioration de la résolution de l'approche (*164-166*). La digestion protéolytique a ensuite été associée à une séparation chromatographique en phase liquide couplée en ligne à la spectrométrie de masse (LC-MS) (*141, 167*). Dans le cadre de l'analyse des échanges H/D par LC-MS, des méthodes chromatographiques de courte durée et à basse température doivent être impérativement mises au point afin de minimiser le « back-exchange » (*168-169*). Pour réaliser une analyse rapide, des colonnes courtes sont utilisées. Bien qu'elles ne permettent qu'une séparation grossière des peptides, elles limitent néanmoins le démarquage. L'utilisation de la spectrométrie de masse à très haute résolution est importante car elle peut permettre une identification plus fiable des peptides, sur la base de leur masse précise. L'approche classique est d'utiliser une séparation par HPLC (« High-Performance Liquid Chromatography »), et de placer toute la chaîne chromatographique dans une armoire réfrigérée. Notons qu'un système commercial, optimisé pour limiter l'échange inverse, a été développé récemment par la société Waters. Le choix d'une méthode HPLC et non d'une chaîne de nano-chromatographie liquide, conduit à utiliser une quantité importante d'échantillon. C'est la raison pour laquelle, notre équipe a mis au point une approche par nano-LC pour l'étude des échanges H/D en solution. Ce travail a fait l'objet d'une partie de la thèse de Magalie Duchateau au laboratoire. Les différents systèmes d'introduction des échantillons marqués dans le spectromètre de masse seront plus détaillés dans le Chap. IV. Le plus souvent, les peptides sont analysés en utilisant l'électrospray comme mode d'ionisation (LC/ESI-MS). La technique MALDI-MS est moins communément utilisée (*170-172*).

Choix des enzymes

Bien évidemment, la protéolyse doit être réalisée dans les conditions expérimentales de l'arrêt de la réaction (à pH final 2,5 et à 0°C) afin d'empêcher l'échange inverse (D → H) avant l'analyse finale en spectrométrie de masse. Il est par conséquent nécessaire d'utiliser des protéases acides. L'enzyme la plus couramment utilisée pour ce type d'expériences est la pepsine (*173*). Cette enzyme est non spécifique contrairement à la trypsine ou la chymotrypsine mais elle est active dans les conditions expérimentales requises et peut générer de nombreux peptides chevauchants permettant de localiser des zones d'intérêt avec une

meilleure résolution. Cependant cette faible spécificité (*174*) rend nécessaire une étape préalable aux échanges H/D d'identification des peptides obtenus par spectrométrie de masse en tandem.

La résolution spatiale attendue avec l'approche de digestion enzymatique à la pepsine est de l'ordre de 5 à 10 acides aminés. Elle est limitée par la taille des fragments générés par l'étape de digestion et le nombre de peptides chevauchants. En revanche, l'utilisation de protéases immobilisées sur des colonnes semble permettre, d'une part, de standardiser le protocole HDX/MS et d'autre part dans certains cas, d'atteindre une résolution spatiale proche de l'acide aminé près (*175-176*). Notons le développement récent d'une nouvelle approche basée sur une digestion à la pepsine mais utilisant des conditions de haute pression (*177*), semblant encore améliorer les résultats.

D'autres protéases acides peuvent également être utilisées, mais les conditions expérimentales imposent qu'elles soient capables de digérer leur substrat en moins de cinq minutes afin de minimiser l'échange inverse. L'utilisation combinée de différentes protéases permet de générer un grand nombre de peptides chevauchants et ainsi d'augmenter considérablement la résolution spatiale (*178*). La protéase de type XIII d'*Aspergillus saitoi* (*179*), ainsi que celle de type XVIII extraite des différentes espèces de *Rhizopus* (*178*) ou encore plus récemment la plasmepsine II de *Plasmodium falciparum* (*180*) peuvent être utilisées dans les études HDX/MS (*172, 179, 181-182*). Par ailleurs, une version recombinante de la protéase de type XVIII vient d'être mise au point. Elle permettrait l'utilisation d'un rapport enzyme/protéine beaucoup plus faible qu'avec la version sauvage (*183*).

Une méthode permettant de générer un très grand nombre de peptides chevauchants basée sur l'utilisation de deux protéases acides, et de les identifier efficacement et précisément a récemment été développée pour les analyses HDX/MS (*184-185*). La difficulté de l'analyse, du fait de la grande quantité de données générées par la protéolyse (nombreux peptides chevauchants) combinée à la complexité des informations obtenues par HDX (incorporation des deutériums, perte du marquage), a encouragé le développement d'une plateforme où les expériences et le traitement de données sont totalement automatisés (*186*).

Problème de l'échange inverse

Malgré une optimisation des conditions expérimentales (diminution du pH et de la température de l'échantillon ainsi que du temps d'analyse), le phénomène d'échange inverse

reste un problème crucial lors des étapes de digestion protéolytique et d'analyse des fragments peptidiques. En effet, chaque clivage enzymatique conduit à une perte d'information au niveau de deux sites échangeables. Les sites concernés sont l'hydrogène d'amide du squelette peptidique qui a été clivé et converti en amine libre et celui adjacent à l'extrémité N-terminale (*168*). Par ailleurs, le démarquage peut également avoir lieu au cours de l'étape de digestion. Or, la perte totale de la deutération au niveau de sites particuliers tels que ceux protégés par une interaction protéine-partenaire, signifierait que les surfaces d'interaction de macroassemblages ne pourraient pas être déterminées par cette approche. C'est la raison pour laquelle, plusieurs tentatives de correction systématique du « back-exchange » ont été développées (*187*). Une méthode de réajustement a ainsi été décrite par Zhang *et al.* (*141*). Brièvement, elle consiste à mesurer le taux d'échange de peptides complètement deutérés et à le comparer à la référence sans échange. Les analyses sont réalisées dans les mêmes conditions de digestion et de séparation par HPLC. Le facteur de correction du « back-exchange » relative à l'expérience est alors déterminé. Mais cela implique que le démarquage soit identique pour tous les sites échangeables, ce qui n'est pas le cas (I.2.1.3.2). Le taux d'échange inverse est considérablement différent d'un site à un autre site et donc d'un peptide à un autre peptide. Il peut néanmoins être prédit pour des peptides non structurés en utilisant les paramètres de calcul de k_{ch} suivant la formule donnée au I.2.1.3.2 (*188*).

Exemples de complexes protéiques analysés

Malgré les problèmes posés par l'échange inverse et la résolution relativement faible de l'approche, un des avantages majeurs des approches « bottom-up » est leur utilisation pour l'étude de complexes de très haut poids moléculaire, puisque ce sont des peptides issus d'une digestion enzymatique qui sont analysés. Ainsi, cette approche a été utilisée par l'équipe de V. Wysocki afin d'étudier des complexes protéiques, protéine chaperonne-substrat, et ainsi de mieux comprendre leur mécanisme d'action (I.1.1.3) (*189*). Il s'agit de protéines s'associant pour former des oligomères de très haut poids moléculaire. Les complexes qui ont été analysés par la technique HDX/MS couplée à une approche « bottom-up » sont les suivants : TaHsp16.9-MDH (> 1000 kDa) et PsHsp18.1-MDH (~600-700 kDa). Un pourcentage de couverture peptidique de 100% a été obtenu pour les deux protéines. Par ailleurs, une étude du complexe Arp2/3 avait permis de mettre en évidence finement des modifications de structure tridimensionnelle induites par la liaison à l'ATP ou à des protéines activatrices telles que les protéines WASp en utilisant l'approche par marquage avec les radicaux hydroxyles (*75*) (I.1.2.2.5). Plus récemment, le complexe Arp2/3 a été analysé par une approche

complémentaire HDX/MS afin de mettre en évidence des modifications de structure et de dynamique résultant de l'activation par les protéines WASp et de comparer les résultats avec les modèles du mécanisme préexistants. Pour autant que nous sachions, le complexe Arp2/3 de sept sous-unités protéiques avec un poids moléculaire de 220 kDa est le plus important macroassemblage jamais étudié par HDX/MS. Ceci a été possible grâce à une analyse par « bottom-up » (*190*).

Comment améliorer la résolution?

Une façon d'augmenter la résolution des approches bottom-up serait de recourir à la fragmentation en phase gazeuse des peptides protéolytiques afin de localiser plus précisément les deutériums dans la séquence. D'une manière générale, la fragmentation peut être réalisée de différentes manières dans un spectromètre de masse. Tout d'abord, il est possible de fragmenter les ions dans la source (« In-Source Decay » ou ISD) en les accélérant dans une région de haute pression mais ce processus ne conduit à aucune sélectivité et pose donc des problèmes quant à l'analyse des mélanges. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) peut également être utilisée pour la dissociation des peptides. Elle est adaptée à l'étude des mélanges, apporte des informations structurales de qualité et est dotée d'une grande sensibilité. Elle consiste à sélectionner un ion précurseur par un premier analyseur, à le fragmenter (par différentes techniques d'activation) et à analyser les fragments obtenus à l'aide d'un autre analyseur (le même pour les instruments de type trappe ionique). Néanmoins, comme cela sera détaillé dans le paragraphe suivant, le choix de la technique d'activation, pour des peptides deutérés, est très important pour obtenir des informations valables.

I.2.3.2.2. ***Fragmentation en phase gazeuse des peptides protéolytiques***

L'objectif des expériences de MS/MS sur les peptides deutérés est de pouvoir précisément localiser les deutériums incorporés dans la séquence au niveau des différents hydrogènes d'amide, afin d'obtenir une résolution à l'acide aminé près. En théorie, la spectrométrie de masse en tandem constitue donc un moyen intéressant et simple pour améliorer la résolution des approches HDX/MS.

Il existe différents modes d'activation susceptibles d'être utilisés pour fragmenter les peptides. Dans une approche protéomique classique, la méthode de dissociation induite par

collision (CID) est largement préférée. Le principe consiste à fragmenter la molécule par collision avec un gaz inerte (hélium, diazote, argon ou xénon). Malheureusement, dans le cadre d'études HDX/MS, ces méthodes conventionnelles de fragmentation par activation collisionnelle de protéines et peptides protonés ont rapidement été écartées. En effet, bien que la littérature soit contradictoire, il a été montré qu'elles conduisent très souvent à une redistribution aléatoire des deutériums, partielle ou totale, le long de la chaîne polypeptidique (y compris au niveau des chaînes latérales) (*191-194*) pendant l'étape de fragmentation. Le processus de migration intramoléculaire des hydrogènes en phase gazeuse est appelé « scrambling » en anglais.

En fait, ce phénomène de « scrambling » peut se produire à différents endroits du spectromètre de masse. Le premier est lors de la désolvatation des ions encore solvatés dans la source, dans les toutes premières étapes précédant leur transmission vers l'analyseur (*195-196*). Une autre possibilité est donc dans la cellule de collision au moment de la fragmentation. Le « scrambling » est induit par un apport d'énergie vibrationnelle conduisant à un échange des hydrogènes et des deutériums avant la dissociation. Il est clair que le mécanisme de fragmentation des peptides protonés, dit "mécanisme du proton mobile", proposé par Simon Gaskell (*197*) et Vicky Wysocki (*198-200*) n'est pas en faveur d'une conservation de la position des deutériums d'amide avant la fragmentation. En effet, ce mécanisme (Fig. I. 15) fait l'hypothèse que, préalablement à la fragmentation, un proton migre des sites les plus basiques de la molécule vers un azote d'amide, évènement préalable à une cyclisation pour former des ions *b* et *y*. Cette étape étant *a priori* réversible, les deutériums peuvent être mélangés avec des hydrogènes à ce moment là.

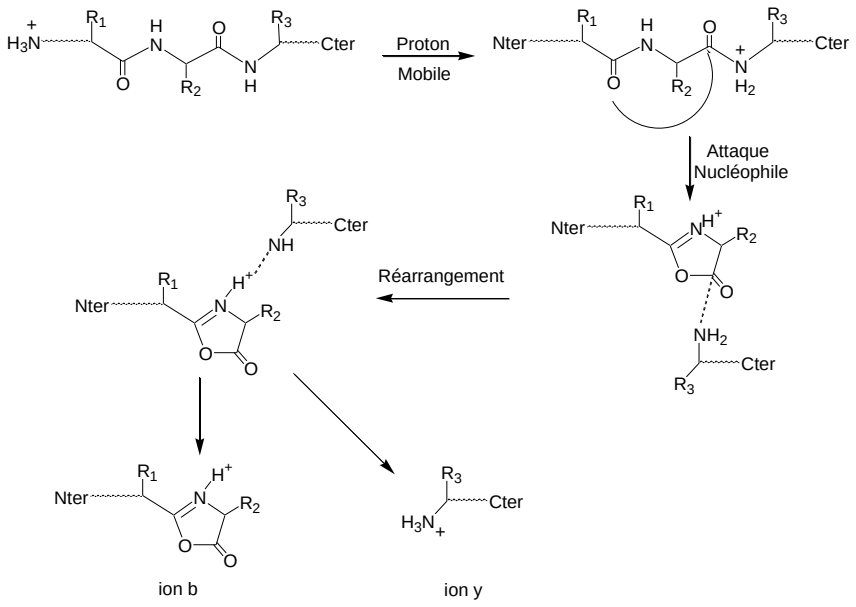


Fig. I. 15 Formation des ions b et y (201).

Le « scrambling » conduit donc à une perte d'information au niveau du profil de deutération rendant l'analyse difficilement interprétable. La littérature indique que ce phénomène semble dépendre de la séquence du peptide fragmenté (*202*) mais également de l'énergie de collision apportée et de la flexibilité de la chaîne polypeptidique en phase gazeuse (*195, 203*). Ces deux derniers facteurs joueraient un rôle déterminant dans le réarrangement aléatoire des deutériums et des hydrogènes le long du squelette peptidique avant la dissociation. Une faible énergie de collision et donc une lente activation des ions en phase gazeuse seraient favorables à une migration intramoléculaire des hydrogènes. En revanche, la réduction de la flexibilité des ions protéiques pourrait diminuer la mobilité du proton dans des conditions d'activation collisionnelle de basse énergie. Le phénomène du « scrambling » a pu être mis en évidence par l'utilisation de peptides modèles (*204-206*). Le principe des peptides sélectivement deutérés, développés par T. Jorgensen, sera détaillé dans le Chap. II.

La conclusion des études de fragmentation par CID de peptides deutérés est que les méthodes d'activation conduisant à une augmentation progressive de l'énergie vibrationnelle (CID, IRMPD, SORI-CID) (*195*) ne peuvent pas être utilisées pour localiser les deutériums dans la séquence peptidique. De ce fait, d'autres méthodes de fragmentation en phase gazeuse ont été investiguées. Parmi elles, les méthodes d'activation par les électrons telles que l'ECD et l'ETD se sont révélées très prometteuses (*207-209*).

L'ECD est une technique de dissociation spécifique des spectromètres de masse FT-ICR. Son principe repose sur la capture exothermique (~4-5 eV) d'un électron par une espèce multichargée (*210*). L'ion protéique multichargé est irradié par un faisceau d'électrons de faible énergie (< 1 eV). Après capture d'un électron, l'ion radicalaire se fragmente. La réactivité est différente par rapport aux méthodes par activation collisionnelle en raison de la présence d'un électron dans le système et notamment le mécanisme du proton mobile n'est pas celui qui explique la fragmentation, rendant son utilisation possible pour analyser des peptides ou des protéines deutérés (*139, 207, 211-212*). En ECD, on n'observe pas la rupture des liaisons peptidiques (pour conduire à des ions *b* et *y*) ni, généralement, la perte de modifications post-traductionnelles labiles comme ce qui est observé pour l'activation par CID. Le site de clivage quasi-spécifique en ECD est la liaison N-Cα entraînant la formation d'ions fragments de type *c* et $z^{\cdot}$ le plus souvent mais aussi parfois *a*, $b^{\cdot}$ et *y* (Fig. I. 16). Une charge positive étant neutralisée par un électron, la technique d'ECD ne peut être utilisée que sur des ions précurseurs qui sont au minimum deux fois chargés (doublement protonés).

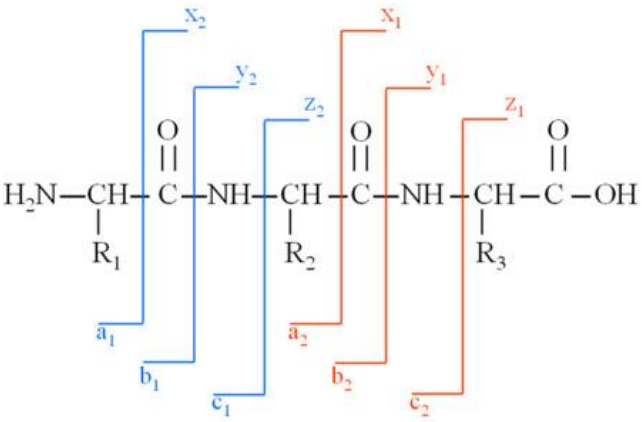


Fig. I. 16 Nomenclature des fragments peptidiques issus de la spectrométrie de masse en tandem.

L'ETD qui a récemment été développée est une technique similaire à l'ECD conduisant également à la formation d'ions fragments de type *c* et $z^{\cdot}$ (*213*). La fragmentation repose sur la réaction ion/ion qui se produit entre le peptide multiprotoné et un anion radicalaire. Cet anion se trouve séquestré dans un piège à ions. Quand les deux ions se trouvent à une distance suffisante, il se produit le transfert d'un électron de l'anion vers le peptide chargé positivement, ce qui induit sa fragmentation. L'avantage majeur de l'ETD est qu'il peut être réalisé sur une variété de types d'instruments standards utilisant la radiofréquence d'un champ électrique oscillant pour piéger les ions (*213-215*). L'ECD, quant à lui, nécessite des champs électrique et magnétique stables disponibles exclusivement sur des spectromètres de masse FT-ICR (*207, 216*).

Bien que le mécanisme des techniques ECD et ETD ne soit pas encore complètement élucidé, il passe par une voie alternative de fragmentation de type radicalaire, dont on a pu discuter du caractère ergodique ou non (*217*), n'induisant pas de « scrambling » pourvu que les paramètres instrumentaux soient contrôlés et optimisés pour la minimisation du phénomène. Il s'agit d'une part de minimiser les paramètres des optiques de transfert ionique tels que le potentiel de désolvatation des ions et la tension des lentilles du tube de transfert et d'autre part de minimiser l'excitation vibrationnelle des ions pendant leur filtration et avant leur fragmentation en augmentant le paramètre fenêtre d'isolation (*207*). Il a été montré que la fragmentation des ions par ECD se produisait avant que l'énergie puisse être redistribuée au niveau du site de clivage de la liaison, le plus favorable (*210, 218-219*). Cette rapide et efficace méthode d'activation conduit donc à une limitation du « scrambling » et permet donc de localiser précisément les deutériums dans la séquence peptidique (*207*). Une résolution à l'acide aminé près de l'incorporation des deutériums a également pu être obtenue par

fragmentation ETD au niveau de peptides sélectivement marqués (*208*) ainsi que de peptides protéolytiques issus de la digestion enzymatique de la β_2-microglobuline deutérée (*209*). L'incorporation des deutériums par résidu est calculée en faisant la différence des contenus en deutériums de fragments consécutifs pour les séries d'ions *c* (c_2-c_1, c_3-c_2, …) et *z* (z_2-z_1, z_3-z_2, …). Une cinétique d'échange H/D par acide aminé peut également être obtenue en suivant l'incorporation des deutériums des ions *c* ou *z* au cours du temps.

Cette approche combinant la digestion enzymatique en solution et la fragmentation ETD en phase gazeuse est devenue très récemment assez robuste pour être utilisée sur de vrais systèmes biologiques. Elle a été complètement automatisée en plateforme HDX (*220*).

La spectrométrie de masse en tandem, peut donc être utilisée pour améliorer la résolution des expériences utilisant les échanges H/D. La fragmentation en phase gazeuse des ions peptidiques obtenus après digestion enzymatique du système biologique d'intérêt permet donc d'obtenir la localisation précise des deutériums dans la séquence. Pour cela, elle doit être réalisée en utilisant des méthodes alternatives d'activation par les électrons (ECD, ETD) tout en contrôlant les processus de désolvatation, transfert et sélection des ions, préalables à la fragmentation (*207-208*). Ces méthodes ayant également fait leur preuve pour la fragmentation de protéines entières (*221-222*), il est rapidement apparu qu'il serait possible de les utiliser dans des approches dites « top-down » pour des études HDX/MS. Dans cette dernière approche, l'étape de digestion enzymatique n'est plus requise.

I.2.3.3. **Approche moderne « top-down » ECD ou ETD**

L'approche « top-down » s'affranchit donc de l'étape de protéolyse et de séparation des peptides en chromatographie liquide. Au lieu de cela, la protéine est introduite entière dans le spectromètre de masse et fragmentée directement en phase gazeuse (*223*).

I.2.3.3.1. ***Méthodes de fragmentation de protéines intactes par ECD ou ETD***

Il existe plusieurs modes d'activation pour la fragmentation en phase gazeuse de protéines entières. Les méthodes dissociatives par capture ou transfert d'électron (ECD ou ETD) sont particulièrement utilisées dans ce type d'approche.

Des couvertures de séquence importantes peuvent être obtenues par ces approches sur protéines entières, conduisant également à la localisation de modifications post-traductionnelles (MPT) (*223-225*). Le laboratoire pionnier dans le domaine est celui de Neil Kelleher aux USA qui a développé une véritable approche intégrée pour l'analyse protéomique « top-down », allant de la séparation des protéines entières à l'analyse automatisée des spectres MS/MS complexes obtenus lorsque l'on fragmente une protéine entière. Ses protéines de prédilection sont les histones, petites protéines de 13 kDa que l'on peut retrouver sous un grand nombre d'isoformes différentes (même stucture primaire mais modifications post-traductionnelles différentes et dynamiques), liées au code des histones.

L'avantage majeur des approches « top-down » en protéomique est de permettre non seulement l'identification des isoformes de protéines par simple mesure de masse, mais aussi d'obtenir des informations structurales (présence de MPT notamment) sur l'ensemble de la séquence. Cela n'est pas possible par des approches classiques par « bottom-up », car tous les peptides issus de la digestion ne sont pas retrouvés lors de l'analyse.

Néanmoins, elles présentent encore certaines limitations comme l'étape cruciale de séparation des protéines entières, le poids moléculaire des protéines qui peuvent être fragmentées et la sensibilité. Le problème majeur rencontré avec les protéines de haut poids moléculaire est leur propension à se replier en phase gazeuse, formant un réseau de liaisons hydrogène qui conduit à une perte d'efficacité au niveau de la fragmentation par ECD ou ETD. En effet, bien que l'électron soit capturé par un site peptidique et la liaison N-Cα rompue, les deux "morceaux" de la protéine (parties N-terminales et C-terminales) restent liées entre elles et les fragments ne peuvent être détectés. Une solution consiste à introduire une étape de chauffage lent des ions (photons infrarouge par exemple) pour rompre ce réseau de liaisons hydrogène, avant ou après la capture de l'électron. Néanmoins, si l'approche fonctionne souvent bien dans le cas de protéines non deutérées, elle ne peut être envisagée dans le cadre des études HDX car le chauffage lent conduira à un échange des hydrogènes et des deutériums avant la fragmentation.

I.2.3.3.2. *Approches top-down et HDX*

Dans les études HDX, le développement de l'approche « top-down » ECD ou ETD comme méthodologie alternative à l'approche classique de « bottom-up » semble très prometteur. En effet, l'approche « top-down » permet, d'une part, d'éliminer le « back-exchange » relatif aux étapes de digestion enzymatique en solution et de séparation en chromatographie liquide, et d'autre part, d'obtenir une meilleure résolution spatiale tout au moins pour des protéines de petite à moyenne taille (*211*).

La faisabilité d'expériences HDX par « top-down » ECD spatialement résolues a été récemment démontrée par Pan *et al.* pour l'étude d'une protéine de 17 kDa (*211*). Il est également possible, grâce à cette approche, d'obtenir des informations structurales au niveau d'espèces spécifiques en mélange hétérogène, en isolant au préalable un ion précurseur (*212*).

De plus, en raison de son association avec des méthodes d'activation par les électrons qui limitent le phénomène de « scrambling » dans des conditions expérimentales bien contrôlées, et conduisent à de bonnes couvertures de séquence, elles permettent de localiser précisément la position des deutériums dans la séquence (Fig. I. 17).

La meilleure résolution spatiale obtenue par l'approche « top-down » s'explique de la manière suivante : tandis que l'expérience « bottom-up » consiste à cliver la protéine au niveau de plusieurs sites générant des peptides de taille relativement petite, l'étude « top-down », quant à elle, conduit à un seul événement de fragmentation au niveau de chaque chaîne polypeptidique. Il en résulte la formation d'une paire d'ions complémentaires, $c/z^{\cdot}$ dans le cas de la fragmentation ECD ou ETD, issus de l'extrémité N- et C-terminale. Une résolution spatiale à l'acide aminé près peut donc être obtenue avec l'approche « top-down » car les protéines en phase gazeuse sont clivées une seule fois à différents sites (Fig. I. 17).

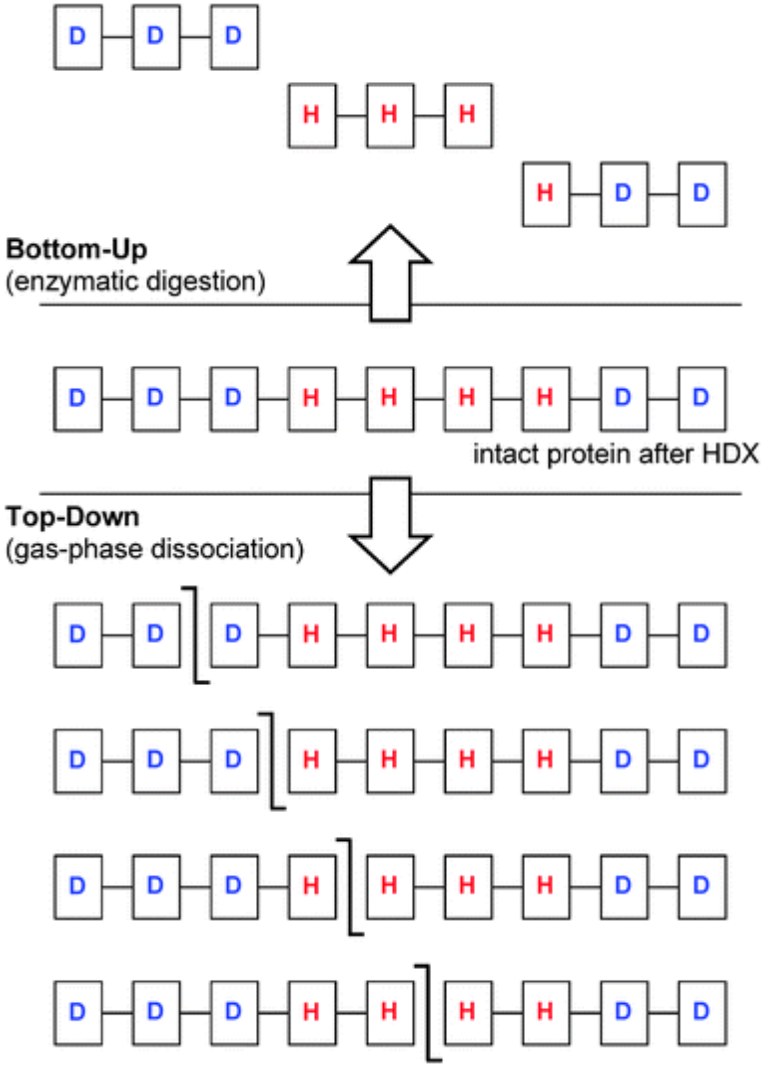


Fig. I. 17 Schéma illustrant la différence conceptuelle entre les approches MS de « bottom-up » et « top-down » appliquées aux études HDX (226). L'approche par fragmentation en phase gazeuse de la protéine entière, dite « top-down », permet de localiser précisément les deutériums dans la séquence protéique.

Dans le cadre des études HDX/MS, un autre avantage des approches « top-down », par rapport à celles dites de « bottom-up », est le fait qu'il est possible, en théorie, de reconstruire une cinétique d'échange par acide aminé. Cela sera détaillé dans le Chap. III de ce manuscrit. Il est également avantageux de pouvoir s'affranchir des étapes de digestion enzymatique et de séparation en chromatographie liquide. En effet, un gain de temps et une possible réduction du « back-exchange » sont des éléments cruciaux pour ces études.

I.2.3.3.3. *Limitations des approches top-down HDX*

La limitation majeure de la fragmentation des protéines deutérées par ECD reste la taille des systèmes, comme en analyse « top-down » classique. De très bonnes couvertures de séquence peuvent être obtenues pour des protéines de faible masse moléculaire (< 20 kDa). Au-delà de cette valeur, l'efficacité de fragmentation diminue avec le plus souvent une région centrale de la protéine peu fragmentée au contraire des extrémités N- et C-terminales, en raison de la structuration des protéines en phase gazeuse décrite précédemment.

Un autre problème est d'arriver à maintenir la protéine entière avec ses deutériums sans qu'elle se démarque pendant le temps de l'analyse. En effet, pour obtenir des couvertures de séquence importantes, un grand nombre de spectres doivent être accumulés (idéalement pendant trente minutes à une heure) et le maintien de l'intégrité de la protéine en termes de position des deutériums dans la séquence est primordial.

Enfin, le dernier inconvénient de ces approches est l'analyse de protéines réelles qui demeure compliquée. En effet, sans séparation par chromatographie liquide, un dessalage des échantillons biologiques réels doit se faire indépendamment et préalablement à l'analyse par spectrométrie de masse. Il est donc effectué de manière « off-line » et conduit malheureusement à un certain démarquage. Par ailleurs, il doit obligatoirement être réalisé à froid ce qui complique le déroulement des expériences.

I.3. Bibliographie

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science 181*, 223-230.
2. Robinson, C. V., Sali, A., and Baumeister, W. (2007) The molecular sociology of the cell, *Nature 450*, 973-982.
3. Pauling, L., Corey, R. B., and Branson, H. R. (1951) The Structure of Proteins - 2 Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 37*, 205-211.
4. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., and Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis, *Nature 181*, 662-666.
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robertsn, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.
6. Pauling, L., and Corey, R. B. (1951) The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains, *Proc Natl Acad Sci U S A 37*, 251-256.
7. Eichmann, C., Preissler, S., Riek, R., and Deuerling, E. (2010) Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A 107*, 9111-9116.
8. Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L., and Horwich, A. L. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria, *Nature 337*, 620-625.
9. Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., and Hartl, F. U. (1989) Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis, *Nature 341*, 125-130.
10. Petsko, G. A., Ringe, D., Sanlaville, C., and Charmot-Bensimon, D. (2008) *Structure et fonction des protéines*, De Boeck Supérieur ed.
11. Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature 426*, 884-890.
12. Frauenfelder, H., Sligar, S. G., and Wolynes, P. G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins, *Science 254*, 1598-1603.
13. Frauenfelder, H., Chen, G., Berendzen, J., Fenimore, P. W., Jansson, H., McMahon, B. H., Stroe, I. R., Swenson, J., and Young, R. D. (2009) A unified model of protein dynamics, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*, 5129-5134.
14. Huang, Y. J., and Montelione, G. T. (2005) Structural biology: proteins flex to function, *Nature 438*, 36-37.
15. Falke, J. J. (2002) Enzymology. A moving story, *Science 295*, 1480-1481.
16. Thompson, A. J., and Barrow, C. J. (2002) Protein conformational misfolding and amyloid formation: Characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and prion diseases, *Current Medicinal Chemistry 9*, 1751-1762.
17. Rhodes, G. (2000) *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models*, 2nd ed.
18. Schmidt, A., and Lamzin, V. S. (2002) Veni, vidi, vici - atomic resolution unravelling the mysteries of protein function, *Current Opinion in Structural Biology 12*, 698-703.
19. Lario, P. I., and Vrielink, A. (2003) Atomic resolution density maps reveal secondary structure dependent differences in electronic distribution, *J Am Chem Soc 125*, 12787-12794.
20. Wille, H., and Prusiner, S. B. (1999) Ultrastructural studies on scrapie prion protein crystals obtained from reverse micellar solutions, *Biophys J 76*, 1048-1062.

21. Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Sligar, S. G. (2000) The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution, *Science 287*, 1615-1622.
22. Petsko, G. A., and Ringe, D. (2000) Observation of unstable species in enzyme-catalyzed transformations using protein crystallography, *Curr Opin Chem Biol 4*, 89-94.
23. Yang, X., Ren, Z., Kuk, J., and Moffat, K. (2011) Temperature-scan cryocrystallography reveals reaction intermediates in bacteriophytochrome, *Nature 479*, 428-432.
24. Perman, B., Anderson, S., Schmidt, M., and Moffat, K. (2000) New techniques in fast time-resolved structure determination, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 46*, 895-913.
25. Schmidt, M., Pahl, R., Srajer, V., Anderson, S., Ren, Z., Ihee, H., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2004) Protein kinetics: structures of intermediates and reaction mechanism from time-resolved x-ray data, *Proc Natl Acad Sci U S A 101*, 4799-4804.
26. Schotte, F., Lim, M. H., Jackson, T. A., Smirnov, A. V., Soman, J., Olson, J. S., Phillips, G. N., Wulff, M., and Anfinrud, P. A. (2003) Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved X-ray crystallography, *Science 300*, 1944-1947.
27. Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes, *Science 285*, 2095-2104.
28. Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export, *Nature 405*, 914-919.
29. Bill, R. M., Henderson, P. J., Iwata, S., Kunji, E. R., Michel, H., Neutze, R., Newstead, S., Poolman, B., Tate, C. G., and Vogel, H. (2011) Overcoming barriers to membrane protein structure determination, *Nat Biotechnol 29*, 335-340.
30. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., and Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein, *Proc Natl Acad Sci U S A 97*, 145-150.
31. Riek, R., Pervushin, K., and Wuthrich, K. (2000) TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution, *Trends Biochem Sci 25*, 462-468.
32. Takahashi, H., Nakanishi, T., Kami, K., Arata, Y., and Shimada, I. (2000) A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes, *Nat Struct Biol 7*, 220-223.
33. Wall, M. E., Gallagher, S. C., and Trewhella, J. (2000) Large-scale shape changes in proteins and macromolecular complexes, *Annu Rev Phys Chem 51*, 355-380.
34. Chen, L., Hodgson, K. O., and Doniach, S. (1996) A lysozyme folding intermediate revealed by solution X-ray scattering, *J Mol Biol 261*, 658-671.
35. Segel, D. J., Eliezer, D., Uversky, V., Fink, A. L., Hodgson, K. O., and Doniach, S. (1999) Transient dimer in the refolding kinetics of cytochrome c characterized by small-angle X-ray scattering, *Biochemistry 38*, 15352-15359.
36. Unger, V. M. (2001) Electron cryomicroscopy methods, *Current Opinion in Structural Biology 11*, 548-554.
37. Frank, J. (2002) Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy, *Annu Rev Biophys Biomol Struct 31*, 303-319.
38. Chiu, W., McGough, A., Sherman, M. B., and Schmid, M. F. (1999) High-resolution electron cryomicroscopy of macromolecular assemblies, *Trends Cell Biol 9*, 154-159.
39. Amos, L. A. (2000) Focusing-in on microtubules, *Curr Opin Struct Biol 10*, 236-241.
40. Saibil, H. R. (2000) Conformational changes studied by cryo-electron microscopy, *Nat Struct Biol 7*, 711-714.

41. Steven, A. C., and Aebi, U. (2003) The next ice age: cryo-electron tomography of intact cells, *Trends Cell Biol 13*, 107-110.
42. Bouchet-Marquis, C., Zuber, B., Glynn, A. M., Eltsov, M., Grabenbauer, M., Goldie, K. N., Thomas, D., Frangakis, A. S., Dubochet, J., and Chretien, D. (2007) Visualization of cell microtubules in their native state, *Biology of the Cell 99*, 45-53.
43. Zuber, B., Nikonenko, I., Klauser, P., Muller, D., and Dubochet, J. (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes, *Proc Natl Acad Sci U S A 102*, 19192-19197.
44. Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Svergun, D. I., Frank, J., and Penczek, P. (2000) Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 A resolution, *Cell 100*, 537-549.
45. Tang, L., and Johnson, J. E. (2002) Structural biology of viruses by the combination of electron cryomicroscopy and X-ray crystallography, *Biochemistry 41*, 11517-11524.
46. Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G., and Baumeister, W. (2002) Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography, *Science 298*, 1209-1213.
47. Ranson, N. A., Farr, G. W., Roseman, A. M., Gowen, B., Fenton, W. A., Horwich, A. L., and Saibil, H. R. (2001) ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy, *Cell 107*, 869-879.
48. Irvine, G. B. (2003) High-performance size-exclusion chromatography of peptides, *J Biochem Biophys Methods 56*, 233-242.
49. Olinares, P. D., Ponnala, L., and van Wijk, K. J. (2010) Megadalton complexes in the chloroplast stroma of Arabidopsis thaliana characterized by size exclusion chromatography, mass spectrometry, and hierarchical clustering, *Mol Cell Proteomics 9*, 1594-1615.
50. Wood, R. W. (1902) XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical Magazine Series 6 4*, 396-402.
51. Wood, R. (1912) Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity, *Philosophical Magazine 23*, 310-137.
52. Liedberg, B., Nylander, C., and Lundstrom, I. (1983) Surface-Plasmon Resonance for Gas-Detection and Biosensing, *Sensors and Actuators 4*, 299-304.
53. Markgren, P. O., Hamalainen, M., and Danielson, U. H. (2000) Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology, *Analytical Biochemistry 279*, 71-78.
54. Madeira, A., Ohman, E., Nilsson, A., Sjogren, B., Andren, P. E., and Svenningsson, P. (2009) Coupling surface plasmon resonance to mass spectrometry to discover novel protein-protein interactions, *Nat Protoc 4*, 1023-1037.
55. Madeira, A., Vikeved, E., Nilsson, A., Sjogren, B., Andren, P. E., and Svenningsson, P. (2011) Identification of protein-protein interactions by surface plasmon resonance followed by mass spectrometry, *Curr Protoc Protein Sci Chapter 19*, Unit19 21.
56. Kalkhof, S., and Sinz, A. (2008) Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters, *Anal Bioanal Chem 392*, 305-312.
57. Schilling, B., Row, R. H., Gibson, B. W., Guo, X., and Young, M. M. (2003) MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides, *J Am Soc Mass Spectrom 14*, 834-850.
58. Collins, C. J., Schilling, B., Young, M., Dollinger, G., and Guy, R. K. (2003) Isotopically labeled crosslinking reagents: resolution of mass degeneracy in the identification of crosslinked peptides, *Bioorg Med Chem Lett 13*, 4023-4026.
59. Sinz, A., Kalkhof, S., and Ihling, C. (2005) Mapping protein interfaces by a trifunctional cross-linker combined with MALDI-TOF and ESI-FTICR mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom 16*, 1921-1931.

60. Lu, Y. L., Tanasova, M., Borhan, B., and Reid, G. E. (2008) Ionic Reagent for Controlling the Gas-Phase Fragmentation Reactions of Cross-Linked Peptides, *Analytical Chemistry 80*, 9279-9287.
61. Du, X., Rorie, J., Chowdhury, S., Adkins, J., Anderson, G., and Smith, R. (2009) Identification of Protein-Protein Interactions Using Chemical Cross-linking and CID and ETD Tandem Mass Spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, S33-S33.
62. Chowdhury, S. M., Du, X. X., Tolic, N., Wu, S., Moore, R. J., Mayer, M. U., Smith, R. D., and Adkins, J. N. (2009) Identification of Cross-Linked Peptides after Click-Based Enrichment Using Sequential Collision-Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry 81*, 5524-5532.
63. Majmudar, C. Y., Wang, B., Lum, J. K., Hakansson, K., and Mapp, A. K. (2009) A high-resolution interaction map of three transcriptional activation domains with a key coactivator from photo-cross-linking and multiplexed mass spectrometry, *Angew Chem Int Ed Engl 48*, 7021-7024.
64. Rappsilber, J., Siniossoglou, S., Hurt, E. C., and Mann, M. (2000) A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry, *Analytical Chemistry 72*, 267-275.
65. Engen, J. R., and Smith, D. L. (2000) Investigating the higher order structure of proteins. Hydrogen exchange, proteolytic fragmentation, and mass spectrometry, *Methods Mol Biol 146*, 95-112.
66. Maier, C. S., and Deinzer, M. L. (2005) Protein conformations, interactions, and H/D exchange, *Methods Enzymol 402*, 312-360.
67. Borch, J., Jorgensen, T. J., and Roepstorff, P. (2005) Mass spectrometric analysis of protein interactions, *Curr Opin Chem Biol 9*, 509-516.
68. Bennett, K. L., Matthiesen, T., and Roepstorff, P. (2000) Probing protein surface topology by chemical surface labeling, crosslinking, and mass spectrometry, *Methods Mol Biol 146*, 113-131.
69. Fitzgerald, M. C., and West, G. M. (2009) Painting proteins with covalent labels: what's in the picture?, *J Am Soc Mass Spectrom 20*, 1193-1206.
70. Dumoulin, M., Canet, D., Last, A. M., Pardon, E., Archer, D. B., Muyldermans, S., Wyns, L., Matagne, A., Robinson, C. V., Redfield, C., and Dobson, C. M. (2005) Reduced global cooperativity is a common feature underlying the amyloidogenicity of pathogenic lysozyme mutations, *J Mol Biol 346*, 773-788.
71. Lanman, J., Lam, T. T., Emmett, M. R., Marshall, A. G., Sakalian, M., and Prevelige, P. E., Jr. (2004) Key interactions in HIV-1 maturation identified by hydrogen-deuterium exchange, *Nat Struct Mol Biol 11*, 676-677.
72. Chalmers, M. J., Busby, S. A., Pascal, B. D., He, Y., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G., and Griffin, P. R. (2006) Probing protein ligand interactions by automated hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Analytical Chemistry 78*, 1005-1014.
73. Akashi, S., and Takio, K. (2000) Characterization of the interface structure of enzyme-inhibitor complex by using hydrogen-deuterium exchange and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Protein Science 9*, 2497-2505.
74. King, D., Lumpkin, M., Bergmann, C., and Orlando, R. (2002) Studying protein-carbohydrate interactions by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry 16*, 1569-1574.
75. Kiselar, J. G., Mahaffy, R., Pollard, T. D., Almo, S. C., and Chance, M. R. (2007) Visualizing Arp2/3 complex activation mediated by binding of ATP and WASp using structural mass spectrometry, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 1552-1557.

76. Sheshberadaran, H., and Payne, L. G. (1988) Protein antigen-monoclonal antibody contact sites investigated by limited proteolysis of monoclonal antibody-bound antigen: protein "footprinting", *Proc Natl Acad Sci U S A 85*, 1-5.
77. Suckau, D., Kohl, J., Karwath, G., Schneider, K., Casaretto, M., Bitter-Suermann, D., and Przybylski, M. (1990) Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping, *Proc Natl Acad Sci U S A 87*, 9848-9852.
78. Bothner, B., Dong, X. F., Bibbs, L., Johnson, J. E., and Siuzdak, G. (1998) Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry, *J Biol Chem 273*, 673-676.
79. Gervasoni, P., Staudenmann, W., James, P., and Pluckthun, A. (1998) Identification of the binding surface on beta-lactamase for GroEL by limited proteolysis and MALDI-mass spectrometry, *Biochemistry 37*, 11660-11669.
80. Yi, J. Z., and Skalka, A. M. (2000) Mapping epitopes of monoclonal antibodies against HIV-1 integrase with limited proteolysis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Biopolymers 55*, 308-318.
81. Bogan, M. J., Agnes, G. R., Pio, F., and Cornell, R. B. (2005) Interdomain and membrane interactions of CTP : phosphocholine cytidylyltransferase revealed via limited proteolysis and mass spectrometry, *Journal of Biological Chemistry 280*, 19613-19624.
82. Williams, J. G., Tomer, K. B., Hioe, C. E., Zolla-Pazner, S., and Norris, P. J. (2006) The antigenic determinants on HIV p24 for CD4(+) T cell inhibiting antibodies as determined by limited proteolysis, chemical modification, and mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 17*, 1560-1569.
83. Brockerhoff, S. E., Edmonds, C. G., and Davis, T. N. (1992) Structural-Analysis of Wild-Type and Mutant Yeast Calmodulins by Limited Proteolysis and Electrospray Ionization Mass-Spectrometry, *Protein Science 1*, 504-516.
84. Huang, S., Zou, X. J., Guo, P., Zhong, L. J., Peng, J. R., and Jing, G. Z. (2005) Probing the subtle conformational state of N138ND(2)-Q1060 hydrogen bonding deletion mutant (Asn138Asp) of staphylococcal nuclease using time of flight mass spectrometry with limited proteolysis, *Archives of Biochemistry and Biophysics 434*, 86-92.
85. Bantscheff, M., Weiss, V., and Glocker, M. O. (1999) Identification of linker regions and domain borders of the transcription activator protein NtrC from Escherichia coli by limited proteolysis, in-gel digestion, and mass spectrometry, *Biochemistry 38*, 11012-11020.
86. Jawhari, A., Boussert, S., Lamour, V., Atkinson, R. A., Kieffer, B., Poch, O., Potier, N., van Dorsselaer, A., Moras, D., and Poterszman, A. (2004) Domain architecture of the p62 subunit from the human transcription/repair factor TFIIH deduced by limited proteolysis and mass spectrometry analysis, *Biochemistry 43*, 14420-14430.
87. Gao, X., Bain, K., Bonanno, J. B., Buchanan, M., Henderson, D., Lorimer, D., Marsh, C., Reynes, J. A., Sauder, J. M., Schwinn, K., Thai, C., and Burley, S. K. (2005) High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation, *J Struct Funct Genomics 6*, 129-134.
88. Hager-Braun, C., and Tomer, K. B. (2005) Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry, *Expert Rev Proteomics 2*, 745-756.
89. Cheng, K. W., Wong, C. C., Wang, M. F., He, Q. Y., and Chen, F. (2010) Identification and Characterization of Molecular Targets of Natural Products by Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews 29*, 126-155.
90. Wong, S. F., Meng, C. K., and Fenn, J. B. (1988) Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(Ethylene Glycols), *Journal of Physical Chemistry 92*, 546-550.

91. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987) Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 78*, 53-68.
92. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science 246*, 64-71.
93. Robinson, C. V., Chung, E. W., Kragelund, B. B., Knudsen, J., Aplin, R. T., Poulsen, F. M., and Dobson, C. M. (1996) Probing the nature of noncovalent interactions by mass spectrometry. A study of protein-CoA ligand binding and assembly, *J Am Chem Soc 118*, 8646-8653.
94. Wu, Q. Y., Gao, J. M., JosephMcCarthy, D., Sigal, G. B., Bruce, J. E., Whitesides, G. M., and Smith, R. D. (1997) Carbonic anhydrase-inhibitor binding: From solution to the gas phase, *J Am Chem Soc 119*, 1157-1158.
95. Cunniff, J. B., and Vouros, P. (1995) False Positives and the Detection of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Electrospray Mass-Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 6*, 437-447.
96. van den Heuvel, R. H., and Heck, A. J. (2004) Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries, *Curr Opin Chem Biol 8*, 519-526.
97. Heck, A. J., and Van Den Heuvel, R. H. (2004) Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews 23*, 368-389.
98. Benesch, J. L., and Robinson, C. V. (2006) Mass spectrometry of macromolecular assemblies: preservation and dissociation, *Current Opinion in Structural Biology 16*, 245-251.
99. Sobott, F., and Robinson, C. V. (2002) Protein complexes gain momentum, *Current Opinion in Structural Biology 12*, 729-734.
100. Sanglier, S., Leize, E., Van Dorsselaer, A., and Zal, F. (2003) Comparative ESI-MS study of approximately 2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: from protein oligomeric state to biotope, *J Am Soc Mass Spectrom 14*, 419-429.
101. Uetrecht, C., Versluis, C., Watts, N. R., Roos, W. H., Wuite, G. J. L., Wingfield, P. T., Steven, A. C., and Heck, A. J. R. (2008) High-resolution mass spectrometry of viral assemblies: Molecular composition and stability of dimorphic hepatitis B virus capsids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 9216-9220.
102. Distler, A. M., Allison, J., Hiser, C., Qin, L., Hilmi, Y., and Ferguson-Miller, S. (2004) Mass spectrometric detection of protein, lipid and heme components of cytochrome c oxidase from R-sphaeroides and the stabilization of non-covalent complexes from the enzyme, *European Journal of Mass Spectrometry 10*, 295-308.
103. Loo, J. A., Berhane, B., Kaddis, C. S., Wooding, K. M., Xie, Y. M., Kaufman, S. L., and Chernushevich, I. V. (2005) Electrospray ionization mass spectrometry and ion mobility analysis of the 20S proteasome complex, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 16*, 998-1008.
104. Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., and Cooks, R. G. (2004) Electrosonic spray ionization. A gentle technique for generating folded proteins and protein complexes in the gas phase and for studying ion - Molecule reactions at atmospheric pressure, *Analytical Chemistry 76*, 4050-4058.
105. Wattenberg, A., Sobott, F., and Brutschy, B. (2000) Detection of intact hemoglobin from aqueous solution with laser desorption mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry 14*, 859-861.
106. Gidden, J., Bowers, M. T., Jackson, A. T., and Scrivens, J. H. (2002) Gas-phase conformations of cationized poly(styrene) oligomers, *J Am Soc Mass Spectrom 13*, 499-505.

107. Gidden, J., and Bowers, M. T. (2003) Gas-phase conformations of deprotonated trinucleotides (dGTT-, dTGT-, and dTTG-): the question of zwitterion formation, *J Am Soc Mass Spectrom 14*, 161-170.
108. Hudgins, R. R., Mao, Y., Ratner, M. A., and Jarrold, M. F. (1999) Conformations of Gly(n)H+ and Ala(n)H+ peptides in the gas phase, *Biophys J 76*, 1591-1597.
109. Hoaglund, C. S., Valentine, S. J., Sporleder, C. R., Reilly, J. P., and Clemmer, D. E. (1998) Three-dimensional ion mobility/TOFMS analysis of electrosprayed biomolecules, *Analytical Chemistry 70*, 2236-2242.
110. Ruotolo, B. T., Giles, K., Campuzano, I., Sandercock, A. M., Bateman, R. H., and Robinson, C. V. (2005) Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water, *Science 310*, 1658-1661.
111. Benesch, J. L. P., Aquilina, J. A., Ruotolo, B. T., Sobott, F., and Robinson, C. V. (2006) Tandem mass spectrometry reveals the quaternary organization of macromolecular assemblies, *Chemistry & Biology 13*, 597-605.
112. Zhou, M. W., Dagan, S., and Wysocki, V. H. (2012) Protein Subunits Released by Surface Collisions of Noncovalent Complexes: Nativelike Compact Structures Revealed by Ion Mobility Mass Spectrometry, *Angewandte Chemie-International Edition 51*, 4336-4339.
113. Politis, A., Park, A. Y., Hyung, S. J., Barsky, D., Ruotolo, B. T., and Robinson, C. V. (2010) Integrating Ion Mobility Mass Spectrometry with Molecular Modelling to Determine the Architecture of Multiprotein Complexes, *Plos One 5*.
114. Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, *Nature 415*, 141-147.
115. Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H. Y., Zhong, G. Q., Guo, X. H., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S. Y., Datta, N., Tikuisis, A. P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J. M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M. D., Paccanaro, A., Bray, J. E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D. P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M. M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S. R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J. J., Gandi, K., Thompson, N. J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M. H. Y., Butland, G., Altaf-Ui, A. M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J. S., Ingles, C. J., Hughes, T. R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S. J., Emili, A., and Greenblatt, J. F. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae, *Nature 440*, 637-643.
116. Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M. A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A. M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J. M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R. B., and Superti-Furga, G. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery, *Nature 440*, 631-636.
117. Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A. M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M. A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A. C., Jackson, D. B., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B., and Superti-Furga, G. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway, *Nat Cell Biol 6*, 97-105.

118. Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E., and Wilm, M. (2003) An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes, *Nat Biotechnol 21*, 89-92.
119. Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature 340*, 245-246.
120. Fields, S. (2005) High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril, *FEBS J 272*, 5391-5399.
121. D'Amici, G. M., Timperio, A. M., and Zolla, L. (2008) Coupling of native liquid phase isoelectrofocusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation, *J Proteome Res 7*, 1326-1340.
122. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2004) Unfolded proteins and protein folding studied by NMR, *Chem Rev 104*, 3607-3622.
123. Krishna, M. M., Hoang, L., Lin, Y., and Englander, S. W. (2004) Hydrogen exchange methods to study protein folding, *Methods 34*, 51-64.
124. Kaltashov, I. A., and Eyles, S. J. (2005) *Mass Spectrometry in Biophysics : Conformation and Dynamics of Biomolecules*, John Wiley & Sons ed.
125. Katta, V., and Chait, B. T. (1991) Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom 5*, 214-217.
126. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2011) Conformer-specific hydrogen exchange analysis of Abeta(1-42) oligomers by top-down electron capture dissociation mass spectrometry, *Analytical Chemistry 83*, 5386-5393.
127. Chik, J. K., and Schriemer, D. C. (2003) Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry of actin in various biochemical contexts, *Journal of Molecular Biology 334*, 373-385.
128. Lanman, J., Lam, T. T., Barnes, S., Sakalian, M., Emmett, M. R., Marshall, A. G., and Prevelige, P. E., Jr. (2003) Identification of novel interactions in HIV-1 capsid protein assembly by high-resolution mass spectrometry, *J Mol Biol 325*, 759-772.
129. Lee, T., Hoofnagle, A. N., Kabuyama, Y., Stroud, J., Min, X. S., Goldsmith, E. J., Chen, L., Resing, K. A., and Ahn, N. G. (2004) Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry, *Molecular Cell 14*, 43-55.
130. Engen, J. R. (2003) Analysis of protein complexes with hydrogen exchange and mass spectrometry, *Analyst 128*, 623-628.
131. Rey, M., Mrazek, H., Pompach, P., Novak, P., Pelosi, L., Brandolin, G., Forest, E., Havlicek, V., and Man, P. (2010) Effective removal of nonionic detergents in protein mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange, and proteomics, *Analytical Chemistry 82*, 5107-5116.
132. Hebling, C. M., Morgan, C. R., Stafford, D. W., Jorgenson, J. W., Rand, K. D., and Engen, J. R. (2010) Conformational analysis of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs by hydrogen exchange mass spectrometry, *Analytical Chemistry 82*, 5415-5419.
133. Zhang, X., Chien, E. Y., Chalmers, M. J., Pascal, B. D., Gatchalian, J., Stevens, R. C., and Griffin, P. R. (2010) Dynamics of the beta2-adrenergic G-protein coupled receptor revealed by hydrogen-deuterium exchange, *Analytical Chemistry 82*, 1100-1108.
134. Xiao, H., Hoerner, J. K., Eyles, S. J., Dobo, A., Voigtman, E., Mel'cuk, A. I., and Kaltashov, I. A. (2005) Mapping protein energy landscapes with amide hydrogen exchange and mass spectrometry: I. A generalized model for a two-state protein and comparison with experiment, *Protein Science 14*, 543-557.
135. Niimura, N., Chatake, T., Kurihara, K., and Maeda, M. (2004) Hydrogen and hydration in proteins, *Cell Biochem Biophys 40*, 351-369.

136. Anderegg, R. J., Wagner, D. S., Stevenson, C. L., and Borchardt, R. T. (1994) The Mass-Spectrometry of Helical Unfolding in Peptides, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 5*, 425-433.
137. Englander, S. W., and Kallenbach, N. R. (1983) Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids, *Q Rev Biophys 16*, 521-655.
138. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, *Proteins 17*, 75-86.
139. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2008) Electron capture dissociation of electrosprayed protein ions for spatially resolved hydrogen exchange measurements, *J Am Chem Soc 130*, 11574-11575.
140. Connelly, G. P., Bai, Y., Jeng, M. F., and Englander, S. W. (1993) Isotope effects in peptide group hydrogen exchange, *Proteins 17*, 87-92.
141. Smith, D. L., Deng, Y., and Zhang, Z. (1997) Probing the non-covalent structure of proteins by amide hydrogen exchange and mass spectrometry, *J Mass Spectrom 32*, 135-146.
142. Hilser, V. J., and Freire, E. (1996) Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. Correlation with hydrogen exchange protection factors, *J Mol Biol 262*, 756-772.
143. Resing, K. A., Hoofnagle, A. N., and Ahn, N. G. (1999) Modeling deuterium exchange behavior of ERK2 using pepsin mapping to probe secondary structure, *J Am Soc Mass Spectrom 10*, 685-702.
144. Konermann, L., Tong, X., and Pan, Y. (2008) Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches, *Journal of Mass Spectrometry 43*, 1021-1036.
145. Chance, M. (2008) *Mass spectrometry analysis for protein-protein interactions and dynamics*, Wiley & Sons ed.
146. Konermann, L., Tong, X., and Pan, Y. (2008) Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches, *J Mass Spectrom 43*, 1021-1036.
147. Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., Smith, D. L., and Vial, C. (2004) Conformational dynamics of the GdmHCl-induced molten globule state of creatine kinase monitored by hydrogen exchange and mass spectrometry, *Biochemistry 43*, 5045-5054.
148. Konermann, L., and Simmons, D. A. (2003) Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev 22*, 1-26.
149. Englander, S. W., Mayne, L., Bai, Y., and Sosnick, T. R. (1997) Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrom-Lang, *Protein Science 6*, 1101-1109.
150. Engen, J. R., and Smith, D. L. (2001) Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS, *Analytical Chemistry 73*, 256A-265A.
151. Kaltashov, I. A., and Eyles, S. J. (2002) Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews 21*, 37-71.
152. Konermann, L., and Simmons, D. A. (2003) Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev 22*, 1-26.
153. Hoofnagle, A. N., Resing, K. A., and Ahn, N. G. (2003) Protein analysis by hydrogen exchange mass spectrometry, *Annu Rev Biophys Biomol Struct 32*, 1-25.
154. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley ed.
155. Bax, A. (1994) Multidimensional Nuclear-Magnetic-Resonance Methods for Protein Studies, *Current Opinion in Structural Biology 4*, 738-744.
156. Wagner, G., and Wuthrich, K. (1982) Amide Proton-Exchange and Surface Conformation of the Basic Pancreatic Trypsin-Inhibitor in Solution - Studies with Two-Dimensional Nuclear Magnetic-Resonance, *Journal of Molecular Biology 160*, 343-361.

157. Liu, Y. H., Belcheva, A., Konermann, L., and Golemi-Kotra, D. (2009) Phosphorylation-induced activation of the response regulator VraR from Staphylococcus aureus: insights from hydrogen exchange mass spectrometry, *J Mol Biol 391*, 149-163.
158. Pan, Y., Brown, L., and Konermann, L. (2011) Hydrogen Exchange Mass Spectrometry of Bacteriorhodopsin Reveals Light-Induced Changes in the Structural Dynamics of a Biomolecular Machine, *J Am Chem Soc 133*, 20237-20244.
159. Choi, J. H., Banks, A. S., Estall, J. L., Kajimura, S., Bostrom, P., Laznik, D., Ruas, J. L., Chalmers, M. J., Kamenecka, T. M., Bluher, M., Griffin, P. R., and Spiegelman, B. M. (2010) Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5, *Nature 466*, 451-456.
160. Bennett, M. J., Barakat, K., Huzil, J. T., Tuszynski, J., and Schriemer, D. C. (2010) Discovery and characterization of the laulimalide-microtubule binding mode by mass shift perturbation mapping, *Chemistry & Biology 17*, 725-734.
161. Chung, K. Y., Rasmussen, S. G., Liu, T., Li, S., DeVree, B. T., Chae, P. S., Calinski, D., Kobilka, B. K., Woods, V. L., Jr., and Sunahara, R. K. (2011) Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor, *Nature 477*, 611-615.
162. Englander, S. W. (2006) Hydrogen exchange and mass spectrometry: A historical perspective, *J Am Soc Mass Spectrom 17*, 1481-1489.
163. Engen, J. R. (2009) Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS, *Anal Chem 81*, 7870-7875.
164. Rosa, J. J., and Richards, F. M. (1979) An experimental procedure for increasing the structural resolution of chemical hydrogen-exchange measurements on proteins: application to ribonuclease S peptide, *J Mol Biol 133*, 399-416.
165. Englander, J. J., Rogero, J. R., and Englander, S. W. (1985) Protein hydrogen exchange studied by the fragment separation method, *Anal Biochem 147*, 234-244.
166. Mallikarachchi, D., Burz, D. S., and Allewell, N. M. (1989) Effects of ATP and CTP on the conformation of the regulatory subunit of Escherichia coli aspartate transcarbamylase in solution: a medium-resolution hydrogen exchange study, *Biochemistry 28*, 5386-5391.
167. Zhang, Z., and Smith, D. L. (1993) Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci 2*, 522-531.
168. Wang, L., and Smith, D. L. (2003) Downsizing improves sensitivity 100-fold for hydrogen exchange-mass spectrometry, *Anal Biochem 314*, 46-53.
169. Zhang, H. M., Bou-Assaf, G. M., Emmett, M. R., and Marshall, A. G. (2009) Fast reversed-phase liquid chromatography to reduce back exchange and increase throughput in H/D exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom 20*, 520-524.
170. Wales, T. E., and Engen, J. R. (2006) Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics, *Mass Spectrom Rev 25*, 158-170.
171. Anand, G. S., Law, D., Mandell, J. G., Snead, A. N., Tsigelny, I., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F., and Komives, E. A. (2003) Identification of the protein kinase A regulatory RIalpha-catalytic subunit interface by amide H/2H exchange and protein docking, *Proc Natl Acad Sci U S A 100*, 13264-13269.
172. Alverdi, V., Mazon, H., Versluis, C., Hemrika, W., Esposito, G., van den Heuvel, R., Scholten, A., and Heck, A. J. R. (2008) cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain, *J Mol Biol 375*, 1380-1393.
173. Wang, F., Scapin, G., Blanchard, J. S., and Angeletti, R. H. (1998) Substrate binding and conformational changes of Clostridium glutamicum diaminopimelate

dehydrogenase revealed by hydrogen/deuterium exchange and electrospray mass spectrometry, *Protein Science 7*, 293-299.
174. Hamuro, Y., Coales, S. J., Molnar, K. S., Tuske, S. J., and Morrow, J. A. (2008) Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions, *Rapid Commun Mass Spectrom 22*, 1041-1046.
175. Chetty, P. S., Mayne, L., Lund-Katz, S., Stranz, D., Englander, S. W., and Phillips, M. C. (2009) Helical structure and stability in human apolipoprotein A-I by hydrogen exchange and mass spectrometry, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*, 19005-19010.
176. Del Mar, C., Greenbaum, E. A., Mayne, L., Englander, S. W., and Woods, V. L. (2005) Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level, *P Natl Acad Sci USA 102*, 15477-15482.
177. Jones, L. M., Zhang, H., Vidavsky, I., and Gross, M. L. (2010) Online, high-pressure digestion system for protein characterization by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry, *Anal Chem 82*, 1171-1174.
178. Cravello, L., Lascoux, D., and Forest, E. (2003) Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins, *Rapid Commun Mass Sp 17*, 2387-2393.
179. Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., and Vial, C. (2005) Local dynamics measured by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry of creatine kinase digested by two proteases, *Biochimie 87*, 1101-1110.
180. Marcoux, J., Thierry, E., Vives, C., Signor, L., Fieschi, F., and Forest, E. (2010) Investigating alternative acidic proteases for H/D exchange coupled to mass spectrometry: plasmepsin 2 but not plasmepsin 4 is active under quenching conditions, *J Am Soc Mass Spectrom 21*, 76-79.
181. Man, P., Montagner, C., Vernier, G., Dublet, B., Chenal, A., Forest, E., and Forge, V. (2007) Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry, *J Mol Biol 368*, 464-472.
182. Zhang, H. M., Kazazic, S., Schaub, T. M., Tipton, J. D., Emmett, M. R., and Marshall, A. G. (2008) Enhanced Digestion Efficiency, Peptide Ionization Efficiency, and Sequence Resolution for Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry 80*, 9034-9041.
183. Rey, M., Man, P., Brandolin, G., Forest, E., and Pelosi, L. (2009) Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Sp 23*, 3431-3438.
184. Kan, Z. Y., Mayne, L., Chetty, P. S., and Englander, S. W. (2011) ExMS: data analysis for HX-MS experiments, *J Am Soc Mass Spectrom 22*, 1906-1915.
185. Mayne, L., Kan, Z. Y., Chetty, P. S., Ricciuti, A., Walters, B. T., and Englander, S. W. (2011) Many overlapping peptides for protein hydrogen exchange experiments by the fragment separation-mass spectrometry method, *J Am Soc Mass Spectrom 22*, 1898-1905.
186. Zhang, Z., Zhang, A., and Xiao, G. (2012) Improved protein hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry platform with fully automated data processing, *Anal Chem 84*, 4942-4949.
187. Kheterpal, I., Wetzel, R., and Cook, K. D. (2003) Enhanced correction methods for hydrogen exchange-mass spectrometric studies of amyloid fibrils, *Protein Sci 12*, 635-643.
188. Feng, L., Orlando, R., and Prestegard, J. H. (2006) Amide proton back-exchange in deuterated peptides: applications to MS and NMR analyses, *Anal Chem 78*, 6885-6892.

189. Cheng, G. L., Basha, E., Wysocki, V. H., and Vierling, E. (2008) Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry, *Journal of Biological Chemistry 283*, 26634-26642.
190. Zencheck, W. D., Xiao, H., Nolen, B. J., Angeletti, R. H., Pollard, T. D., and Almo, S. C. (2009) Nucleotide- and Activator-Dependent Structural and Dynamic Changes of Arp2/3 Complex Monitored by Hydrogen/Deuterium Exchange and Mass Spectrometry, *Journal of Molecular Biology 390*, 414-427.
191. Jorgensen, T. J., Gardsvoll, H., Ploug, M., and Roepstorff, P. (2005) Intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides upon collisional activation, *J Am Chem Soc 127*, 2785-2793.
192. Jorgensen, T. J., Bache, N., Roepstorff, P., Gardsvoll, H., and Ploug, M. (2005) Collisional activation by MALDI tandem time-of-flight mass spectrometry induces intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides, *Mol Cell Proteomics 4*, 1910-1919.
193. Ferguson, P. L., Pan, J., Wilson, D. J., Dempsey, B., Lajoie, G., Shilton, B., and Konermann, L. (2007) Hydrogen/deuterium scrambling during quadrupole time-of-flight MS/MS analysis of a zinc-binding protein domain, *Anal Chem 79*, 153-160.
194. McLafferty, F. W., Guan, Z., Haupts, U., Wood, T. D., and Kelleher, N. L. (1998) Gaseous Conformational Structures of Cytochrome c, *Journal of the American Chemical Society 120*, 4732-4740.
195. Hoerner, J. K., Xiao, H., Dobo, A., and Kaltashov, I. A. (2004) Is there hydrogen scrambling in the gas phase? Energetic and structural determinants of proton mobility within protein ions, *J Am Chem Soc 126*, 7709-7717.
196. Eyles, S. J., Speir, J. P., Kruppa, G. H., Gierasch, L. M., and Kaltashov, I. A. (2000) Protein Conformational Stability Probed by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Journal of the American Chemical Society 122*, 495-500.
197. Burlet, O., Yang, C.-Y., and Gaskell, S. J. (1992) Influence of cysteine to cysteic acid oxidation on the collision-activated decomposition of protonated peptides: evidence for intraionic interactions, *J Am Soc Mass Spectr 3*, 337-344.
198. Dongré, A. R., Jones, J. L., Somogyi, Á., and Wysocki, V. H. (1996) Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model, *Journal of the American Chemical Society 118*, 8365-8374.
199. Jones, J. L., Dongre, A. R., Somogyi, A., and Wysocki, V. H. (1994) Sequence Dependence of Peptide Fragmentation Efficiency Curves Determined by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation Mass Spectrometry, *Journal of the American Chemical Society 116*, 8368-8369.
200. Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L., and Breci, L. A. (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation, *J Mass Spectrom 35*, 1399-1406.
201. Paizs, B., and Suhai, S. (2005) Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrom Rev 24*, 508-548.
202. Demmers, J. A., Rijkers, D. T., Haverkamp, J., Killian, J. A., and Heck, A. J. (2002) Factors affecting gas-phase deuterium scrambling in peptide ions and their implications for protein structure determination, *J Am Chem Soc 124*, 11191-11198.
203. Kaltashov, I. A., and Eyles, S. J. (2002) Crossing the phase boundary to study protein dynamics and function: combination of amide hydrogen exchange in solution and ion fragmentation in the gas phase, *J Mass Spectrom 37*, 557-565.

204. Rand, K. D., and Jorgensen, T. J. (2007) Development of a peptide probe for the occurrence of hydrogen (1H/2H) scrambling upon gas-phase fragmentation, *Anal Chem 79*, 8686-8693.
205. Hamuro, Y., Tomasso, J. C., and Coales, S. J. (2008) A simple test to detect hydrogen/deuterium scrambling during gas-phase peptide fragmentation, *Anal Chem 80*, 6785-6790.
206. Rand, K. D., Zehl, M., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2010) Loss of ammonia during electron-transfer dissociation of deuterated peptides as an inherent gauge of gas-phase hydrogen scrambling, *Anal Chem 82*, 9755-9762.
207. Rand, K. D., Adams, C. M., Zubarev, R. A., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens, *J Am Chem Soc 130*, 1341-1349.
208. Zehl, M., Rand, K. D., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron transfer dissociation facilitates the measurement of deuterium incorporation into selectively labeled peptides with single residue resolution, *J Am Chem Soc 130*, 17453-17459.
209. Rand, K. D., Zehl, M., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2009) Protein hydrogen exchange measured at single-residue resolution by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Anal Chem 81*, 5577-5584.
210. Zubarev, R. A., Kelleher, N. L., and McLafferty, F. W. (1998) Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process, *J Am Chem Soc 120*, 3265-3266.
211. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2009) Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein, *J Am Chem Soc 131*, 12801-12808.
212. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2010) Characterizing short-lived protein folding intermediates by top-down hydrogen exchange mass spectrometry, *Anal Chem 82*, 8591-8597.
213. Syka, J. E., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Proc Natl Acad Sci U S A 101*, 9528-9533.
214. McAlister, G. C., Phanstiel, D., Good, D. M., Berggren, W. T., and Coon, J. J. (2007) Implementation of electron-transfer dissociation on a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer, *Analytical Chemistry 79*, 3525-3534.
215. Xia, Y., Thomson, B. A., and McLuckey, S. A. (2007) Bidirectional ion transfer between quadrupole arrays: MSn ion/ion reaction experiments on a quadrupole/time-of-flight tandem mass spectrometer, *Analytical Chemistry 79*, 8199-8206.
216. Zubarev, R. A. (2003) Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase, *Mass Spectrometry Reviews 22*, 57-77.
217. Turecek, F. (2003) N-C-alpha bond dissociation energies and kinetics in amide and peptide radicals. Is the dissociation a non-ergodic process?, *J Am Chem Soc 125*, 5954-5963.
218. Turecek, F., and McLafferty, F. W. (1984) Non-ergodic behavior in acetone-enol ion dissociations, *Journal of the American Chemical Society 106*, 2525-2528.
219. Horn, D. M., Ge, Y., and McLafferty, F. W. (2000) Activated Ion Electron Capture Dissociation for Mass Spectral Sequencing of Larger (42 kDa) Proteins, *Anal Chem 72*, 4778-4784.
220. Landgraf, R. R., Chalmers, M. J., and Griffin, P. R. (2012) Automated hydrogen/deuterium exchange electron transfer dissociation high resolution mass spectrometry measured at single-amide resolution, *J Am Soc Mass Spectrom 23*, 301-309.

221. Zubarev, R. A., Horn, D. M., Fridriksson, E. K., Kelleher, N. L., Kruger, N. A., Lewis, M. A., Carpenter, B. K., and McLafferty, F. W. (2000) Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations, *Anal Chem 72*, 563-573.
222. Horn, D. M., Ge, Y., and McLafferty, F. W. (2000) Activated ion electron capture dissociation for mass spectral sequencing of larger (42 kDa) proteins, *Anal Chem 72*, 4778-4784.
223. Siuti, N., and Kelleher, N. L. (2007) Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry, *Nature Methods 4*, 817-821.
224. Kelleher, N. L., Lin, H. Y., Valaskovic, G. A., Aaserud, D. J., Fridriksson, E. K., and McLafferty, F. W. (1999) Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society 121*, 806-812.
225. McLafferty, F. W. (2001) Tandem mass spectrometric analysis of complex biological mixtures, *Int J Mass Spectrom 212*, 81-87.
226. Konermann, L., Pan, J., and Liu, Y. H. (2011) Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics, *Chem Soc Rev 40*, 1224-1234.

Chapitre II : Analyse de peptides modèles : validation de l'approche combinant échanges H/D et fragmentation ECD

Chapitre II : Analyse de peptides modèles : validation de l'approche combinant échanges H/D et fragmentation ECD 79

II.1. Introduction 81

II.1.1. Spectrométrie de masse en tandem et HDX 81
II.1.2. Principe des peptides modèles développés par T. Jørgensen 82

II.2. Résultats 84

II.2.1. Système d'introduction des échantillons 84
II.2.2. Marquage des peptides de référence 84
II.2.3. Influence des paramètres de source sur le « scrambling » 85

II.3. Conclusions 92

II.3.1. Conclusion sur l'APEX III 92
II.3.2. Autres instruments FT-ICR 93

II.4. Bibliographie 96

II.1.Introduction

II.1.1.Spectrométrie de masse en tandem et HDX

Comme indiqué dans le chapitre précédent, un des problèmes expérimentaux majeurs lié aux études par HDX-MS/MS est le « scrambling », qui correspond à une redistribution aléatoire des hydrogènes et des deutériums présents dans la séquence peptidique par des processus qui ont lieu en phase gazeuse.

Le plus connu est celui qui intervient au moment de la fragmentation par CID, et qui s'explique par le modèle du proton mobile (*1-4*). Dans ce modèle, l'énergie apportée par la collision conduit à une mobilité du proton qui se trouve initialement sur le site le plus basique du peptide (Lysine, Arginine ou amine N-terminale). Ce proton se met donc à se déplacer dans le peptide pour aller vers des sites de protonation moins basiques tels que l'oxygène ou l'azote de la liaison peptidique. Bien que la protonation sur l'azote de l'amide soit thermodynamiquement moins favorable que la protonation sur l'oxygène des carbonyles, c'est ce site protoné qui conduit à la rupture de la liaison amide et à la formation des ions *b* et *y*. La protonation réversible des atomes d'azote des différentes fonctions amides du squelette, dans le contexte d'une étude HDX, conduit donc, si l'intermédiaire réactionnel a un temps de vie suffisamment long et si la cinétique de la voie retour est comparable à la cinétique de fragmentation, à un échantillonnage du proton sur tous les amides et donc un mélange complet des hydrogènes et des deutériums. Pour éviter ce phénomène, il faut (i) soit que la protonation sur l'amide ne soit pas réversible, (ii) soit que la dissociation de la liaison peptidique soit plus rapide que la déprotonation de l'azote d'amide. Paizs et Suhai (*5*) ont évalué la constante de vitesse de dissociation de la liaison amide par des calculs RRKM et ont obtenu une valeur de l'ordre de la microseconde pour des énergies internes d'environ 45 kJ/mol, soit une vitesse relativement lente due entre autre à la nécessaire cyclisation de la partie *b*, et donc probablement compétitive avec de simples transferts de protons. Ainsi de nombreux exemples de la littérature montrent qu'il n'est pas possible d'utiliser des approches par CID pour localiser précisément les deutériums dans des peptides marqués car le « scrambling » qui a lieu avant la fragmentation est total (*6-11*).

Néanmoins, il est curieux de constater que certaines études arrivent à des conclusions opposées. A titre d'exemple, il a été montré par Deng et *al.* pour une série de peptides issus de

la digestion du cytochrome C de cheval (*12*) ou par Kim et *al.* sur des fragments peptidiques de thiorédoxine oxydée et réduite d'*E. coli* (*13-14*), que les ions *b* présentaient un « scrambling » modéré alors que les ions *y* correspondants, présentaient au contraire un « scrambling » total. Des résultats similaires décrivant un phénomène de « scrambling » partiel ont également été obtenus sur des protéines entières (*15-17*).

Ce qui semble ressortir de ces articles est que les conditions expérimentales utilisées, et la séquence des peptides jouent un rôle très important sur le type de résultat qui est obtenu. Dans ce contexte, mieux comprendre les différents facteurs affectant le réarrangement aléatoire des hydrogènes et des deutériums dans la séquence avant la fragmentation semble un point crucial pour pouvoir développer des approches de spectrométrie de masse tandem robustes en HDX.

Néanmoins, le problème majeur pour réaliser de telles études est de disposer d'un système modèle permettant de caractériser la présence du mélange entre les hydrogènes et les deutériums, qu'il soit partiel ou total.

C'est le groupe de T. Jørgensen, au Danemark, qui a résolu ce problème en mettant au point des peptides modèles, qui peuvent être deutérés sélectivement sur leur extrémité N-terminale ou C-terminale. L'utilisation de ces peptides lui a ainsi permis de montrer (i) qu'en contrôlant finement un certain nombre de paramètres expérimentaux et (ii) en utilisant des méthodes d'activation basées sur le transfert ou la capture d'un électron (ECD/ETD), il était possible de limiter considérablement le « scrambling » et localiser précisément les deutériums dans la séquence (*18-19*).

II.1.2.Principe des peptides modèles développés par T. Jørgensen

Les premiers travaux publiés par T. Jørgensen sont basés sur l'utilisation d'un peptide qui peut être marqué au deutérium de manière sélective grâce à l'interaction d'une partie de sa séquence avec un récepteur. La partie en interaction avec la protéine étant masquée, ne conduit à aucun échange H/D, alors que la partie libre échange facilement ses hydrogènes d'amide pour des deutériums (*20*). Néanmoins, il est vite apparu que le modèle était trop compliqué à manipuler et nécessitait d'être simplifié.

Pour ce faire, T. Jørgensen a décidé, de manière tout à fait astucieuse, de mettre à profit le fait qu'en solution les hydrogènes d'amide du squelette peptidique ont des vitesses d'échange avec le solvant qui varient fortement en fonction des acides aminés voisins pour construire des peptides qui peuvent être sélectivement deutérés. L'influence des résidus voisins peut être soit d'ordre stérique soit d'ordre inductif (*21*). A titre d'exemple, l'hydrogène d'un amide se trouvant entre deux isoleucines échange dix fois moins vite qu'un hydrogène d'amide situé entre deux alanines. Ces vitesses d'échange ont été mesurées par des expériences de spectroscopie RMN (*22*). Thomas Jørgensen a donc utilisé, pour établir la séquence de ses peptides modèles : des acides aminés qui échangent très rapidement (histidine ou acide aspartique) qu'il a placés en N-terminal et des acides aminés qui échangent beaucoup plus lentement (isoleucine), en C-terminal. Il a également introduit des acides aminés basiques (lysine) pour s'assurer de la solubilité de ses peptides. La séquence générale de ses peptides est donc : $(His)_n(Ile\text{-}Ile\text{-}Lys)_m$ ou $(Lys)_2(Asp)_n(Ile\text{-}Ile\text{-}Lys)_m$. Ainsi, après un échange complet dans D_2O et dilution dans H_2O (acide et glacée), les amides de la partie N-terminale des peptides $(His)_n$ ou $(Lys)_2(Asp)_n$ se retrouvent complètement hydrogénés alors que ceux de la partie C-terminale $(Ile\text{-}Ile\text{-}Lys)_m$ portent encore des deutériums.

L'utilisation de ces peptides a permis à T. Jørgensen de montrer qu'il était possible de trouver des conditions, en ECD (*18*) mais aussi en ETD (*19*, *23-24*) qui permettent de minimiser le phénomène de « scrambling ». Différents instruments ont été utilisés pour ses expériences : un spectromètre de masse FT-ICR (LTQ-FT) de la société Thermo pour les expériences en ECD (*18*), et une trappe ionique Agilent (*19*) ainsi qu'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL (Thermo) (*23*, *25*) pour les expériences ETD. Une des conclusions de ces études est que, quel que soit le spectromètre de masse utilisé, l'optimisation des conditions expérimentales de la source électrospray, et notamment tous les paramètres liés à la désolvatation, est un paramètre crucial pour éviter le « scrambling ». Ce résultat n'est pas étonnant dans la mesure où avant leur arrivée dans une région de très basse pression, les ions subissent un certain nombre de collisions qui peuvent augmenter leur énergie interne (*26*) et favoriser ce phénomène de « scrambling ». Pour les expériences ECD, T. Jørgensen a également montré que la fenêtre de sélection choisie dans le piège linéaire pour isoler l'ion à fragmenter est également un paramètre à contrôler finement. Une fenêtre trop étroite conduit en effet à une excitation de l'ion précurseur et au phénomène de « scrambling ».

Dans ce contexte, nous avons souhaité utiliser les peptides développés par T. Jørgensen comme sondes du « scrambling » sur le spectromètre de masse FT-ICR APEX III du

laboratoire afin de pouvoir déterminer les conditions expérimentales propres à réaliser de l'ECD sur des peptides puis des protéines deutérés. Ce travail a été initié lors de la thèse de Magalie Duchateau (*27*) mais n'avait pas pu être terminé pour des problèmes instrumentaux. Afin d'assurer la cohérence des résultats, toutes expériences réalisées précédemment ont été dupliquées et complétées au début de ma thèse. Une mise à jour de l'instrument en APEX-Q, puis en SolariX nous a ensuite conduits à devoir ré-optimiser certains paramètres. Les résultats obtenus lors de ce travail font l'objet du deuxième chapitre de cette thèse. Les peptides choisis sont les suivants :

P1: HHHHHHIIKIIK
P2: KKDDDDDDIIKIIK
P3: KKDDDIIKIIK
P4: KKDDIIK

II.2.Résultats

II.2.1.Système d'introduction des échantillons

Le système développé par T. Jørgensen est celui que nous avons utilisé. Il est constitué d'une seringue préalablement placée entre deux sacs de glace puis refroidie pendant la durée de l'analyse par un sachet de carboglace. La longueur du capillaire en PEEK (125 µm de diamètre interne) entre la sortie de la seringue et l'entrée dans la source d'ionisation a été minimisée à environ 30 cm et le débit utilisé est de 600 µL/min afin de minimiser l'échange inverse pendant le transfert de l'échantillon entre la seringue refroidie et la source d'ionisation (voir Chap. IV). Les expériences sont réalisées pendant 10 minutes avec le même échantillon et la stabilité du marquage (qui doit restée dans les 10% du marquage initial qui sert de référence) est suivie par l'acquisition régulière de spectres MS.

II.2.2.Marquage des peptides de référence

Parmi les quatre peptides que nous avons choisis, deux ont déjà été étudiés précédemment par T. Jørgensen (*18-19, 21*). Notre premier objectif était donc de retrouver le même nombre de deutériums initial que ce qu'il avait trouvé. Les peptides ont été conçus de telle sorte que

seule l'extrémité C-terminale doit porter des deutériums, au niveau du motif IIKIIK pour les peptides P1, P2 et P3. En théorie, on s'attend donc à cinq échanges H → D pour ces peptides. Les résultats expérimentaux montrent que l'on n'atteint pas tout à fait cette valeur, mais qu'une moyenne de 4,2 D est obtenue, comme l'indique le Tab. II. 1. Cette "perte" de 0,8 D s'explique par le fait que le marquage au niveau de l'amide situé entre la dernière histidine et la première isoleucine n'est pas parfait et qu'il existe un mélange de populations de peptides pour lesquels c'est bien un D qui est à cette place et des peptides pour lesquels le D a été remplacé par un H. De la même façon, on n'obtient pas exactement 2 D pour le peptide P4 mais seulement 1,6. Les résultats regroupés dans le Tab. II. 1 montrent également que la taille et la nature de la partie du peptide qui échange vite (série d'histidines, ou enchainement lysine-acide aspartique) n'ont pas d'influence sur le marquage global du peptide.

Tab. II. 1 Séquence des quatre peptides utilisés dans cette étude. Nombre de deutériums retenus au niveau des acides aminés de l'extrémité C-terminale dans les différents états de charge, après ré-échange de certains deutériums avec les hydrogènes du solvant protié dans des conditions contrôlées (Chap. V).

Peptide	Séquence	Masse monoisotopique	MH^{1+}	MH_2^{2+}	MH_3^{3+}	Référence
P1	HHHHHHIIKIIK	1549,8975	-	4,3	3,9	(*18, 21*)
P2	KKDDDDDDIIKIIK	1673,8956	4,4[a]	4,3	4,3	(*19*)
P3	KKDDDIIKIIK	1328,8148	4,0[b]	4,2	4,2	
P4	KKDDDIIK	974,5517	2,0	1,6	-	

Potentiel de désolvatation [a] entre 200 et 250 V et [b] entre 150 et 250 V.

II.2.3.Influence des paramètres de source sur le « scrambling »

Afin d'évaluer le taux de « scrambling » dû à la source électrospray, les spectres ECD des peptides ont été enregistrés en faisant varier les conditions expérimentales dans la source. Comme les peptides sont construits pour ne porter des deutériums qu'à leur extrémité C-terminale, les ions de type *c* (N-terminaux) fournissent des massifs isotopiques diagnostics simples. En l'absence de « scrambling », les ions *c* de petite taille (comme l'ion c_4 par exemple) doivent conserver un massif isotopique identique à celui obtenu pour le peptide non deutéré. En revanche, s'il y a eu « scrambling », les enveloppes isotopiques seront déplacées vers des rapports m/z plus élevés.

A titre d'exemple, la Fig. II. 1 montre le déplacement du massif isotopique obtenu pour l'ion c_4 du peptide P2 lorsque l'on augmente l'énergie de désolvatation.

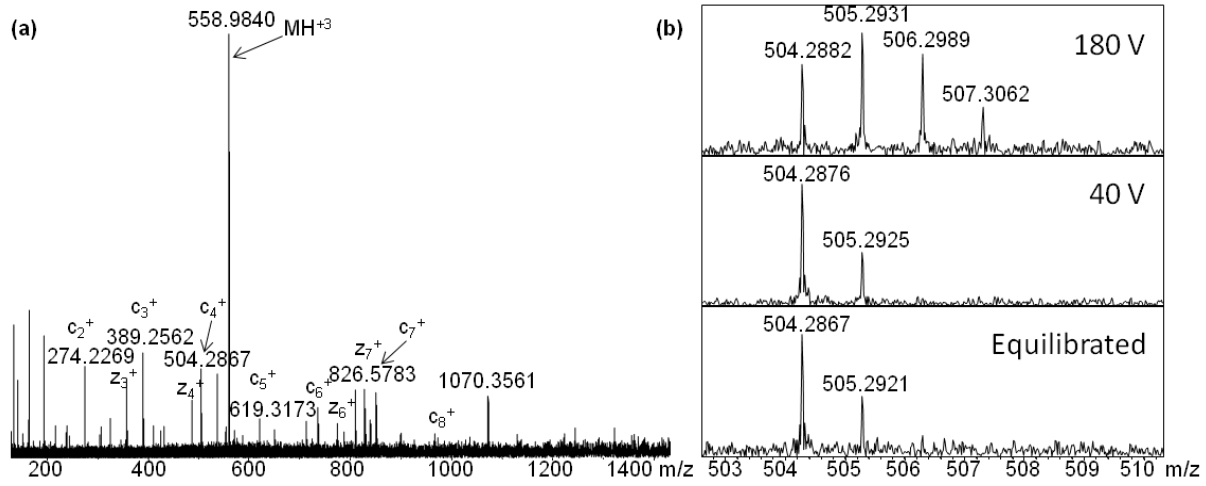
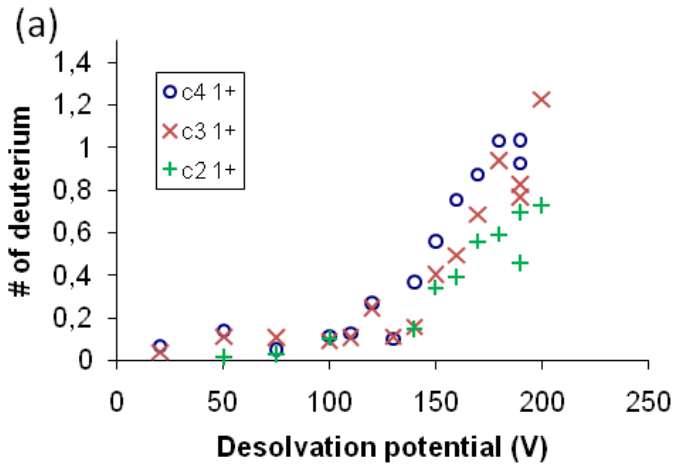
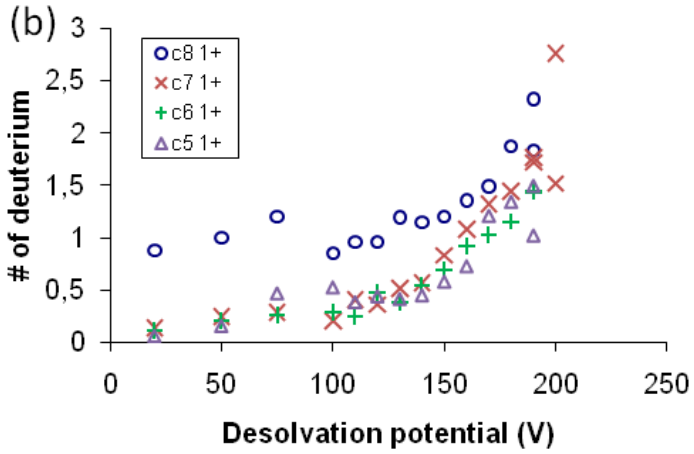


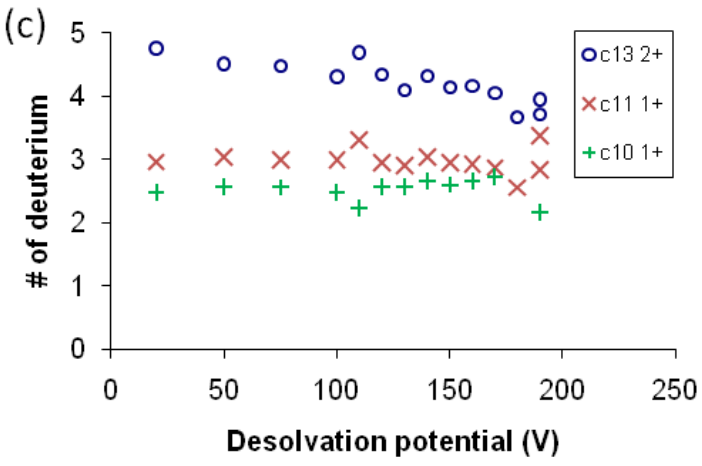
Fig. II. 1 Spectres ECD du peptide KKDDDDDDIIKIIK (P2). (a) Spectre complet du peptide non marqué. (b) Massif isotopique de l'ion fragment c_4^+ obtenu à partir du peptide sélectivement marqué pour des valeurs de potentiel de désolvatation élevée (180 V, spectre du haut) et basse (40 V, spectre du milieu). Le spectre du bas montre l'ion fragment c_4^+ obtenu à partir du peptide à l'équilibre (marquage homogène) à 100 V.

Alors qu'à 40 V, correspondant à une basse énergie de désolvatation, le massif isotopique obtenu est le même que pour le peptide non deutéré, on observe à 180 V un déplacement très clair du massif vers les hauts m/z, signature de l'incorporation de deutériums du côté N-terminal du peptide et donc de « scrambling ».

Par cette approche, différents paramètres de source ont été testés : le potentiel de désolvatation (« CapExit » sur notre instrument), la température du gaz de désolvatation et le temps d'accumulation dans l'hexapôle. Parmi ces trois paramètres, seul le potentiel de désolvatation a un effet majeur sur le « scrambling », comme le montre l'évolution du nombre de deutériums dans les différents ions *c* et *z* formés à partir du peptide P2 (Fig. II. 2).


(a)
# of deuterium
Desolvation potential (V)
c4 1+
c3 1+
c2 1+
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
0
50
100
150
200
250


(b)
# of deuterium
Desolvation potential (V)
c8 1+
c7 1+
c6 1+
c5 1+
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
0
50
100
150
200
250


(c)
# of deuterium
Desolvation potential (V)
c13 2+
c11 1+
c10 1+
0
1
2
3
4
5
0
50
100
150
200
250

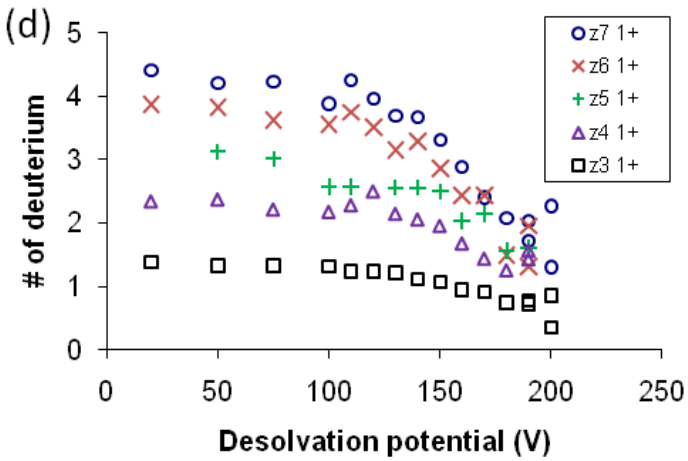


Fig. II. 2 Graphes du nombre de deutériums incorporés par chaque fragment ECD obtenu à partir de l'ion précurseur trichargé du peptide KKDDDDDDIIKIIK (P2) sélectivement marqué en fonction du potentiel de désolvatation.

Avec un potentiel de désolvatation conduisant à très peu de « scrambling » (40 V), on n'observe pas d'effet marquant de la température de la source (variée de 50 à 140°C) ni du temps d'accumulation dans l'hexapôle (varié de 0,5 à 2 s). Les conditions optimales ayant été obtenues pour limiter le « scrambling », nous n'avons pas cherché à faire varier d'autres paramètres, qui par ailleurs ont également une influence sur l'efficacité de transmission des ions.

Néanmoins, nous avons souhaité comprendre un peu mieux le rôle de l'énergie de désolvatation et pour ce faire, les spectres MS et MS/MS en ECD ont été enregistrés. Pour les peptides P1-P3, les spectres ECD obtenus à partir d'ions précurseurs trichargés montrent des courbes similaires à celles décrites sur la Fig. II. 2 : à bas potentiel de désolvatation, les fragments contiennent un nombre de deutériums constant, mais lorsque le potentiel est augmenté, on observe une incorporation de deutériums croissante pour les ions *c* et une perte de deutériums pour les ions *z*. Le seuil à partir duquel le « scrambling » commence est le même pour les différents fragments d'un même peptide mais est différent d'un peptide à l'autre. Pour le peptide P4, aucun fragment ECD n'a pu être observé à partir de l'ion doublement chargé et l'ion triplement chargé n'est apparemment pas formé.

Ces résultats sont très proches de ce qui avait été observé par T. Jørgensen sur le LTQ-FT (*18*) et sur la trappe ionique (*19*) et ne semblent pas dépendre de la taille et de la nature de la partie du peptide qui présente un échange rapide.

Un examen des spectres MS en fonction de l'énergie de désolvatation (Fig. II. 3) apporte un éclairage nouveau sur ce qui se passe dans la source, qui est un phénomène indépendant du « scrambling ».

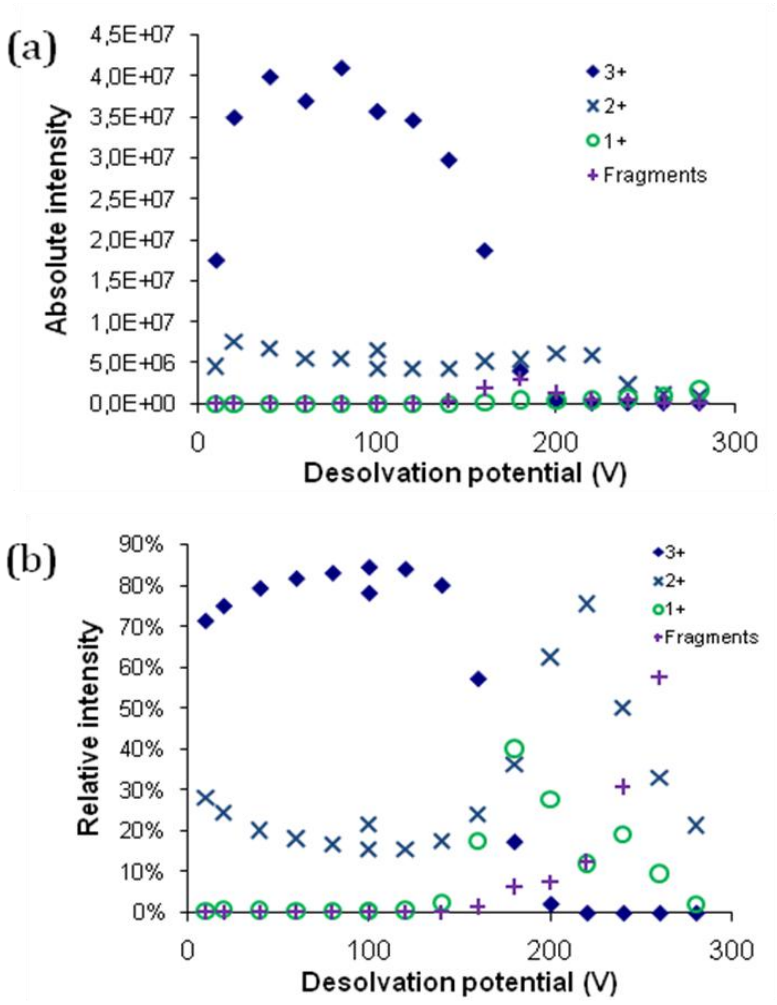


Fig. II. 3 Intensité des ions des différents états de charge du peptide KKDDDIIKIIK (P3) ainsi que celle de ses ions fragments générés dans la source ionique en fonction du potentiel de désolvatation. L'intensité des fragments correspond à la somme des intensités des ions fragments b et y. (a) Intensités absolues. (b) Intensités relatives par rapport à l'intensité totale des ions.

Tout d'abord, le type d'ion observé (simplement, doublement ou triplement chargé) et l'apparition de fragments sont corrélés avec les potentiels de désolvatation (Fig. II. 3). Comme l'indique la Fig. II. 3, les ions triplement chargés sont largement favorisés à bas potentiels de désolvatation et la fragmentation est quasi-inexistante. Pour le peptide P3, on peut observer une chute de l'intensité de l'ion triplement chargé au-delà de 160 V avec une augmentation concomitante de l'intensité de l'ion moléculaire doublement chargé et de celle des fragments. En intensité absolue, l'ion (1+) décroît quant à lui lentement à partir de 200 V. Ces résultats

s'expliquent, au moins en partie, par le fait que l'ion (3+) est le premier à se fragmenter lorsque l'on augmente le potentiel de désolvatation car chaque collision est trois fois plus énergétique que pour son équivalent monochargé.

Si l'on trace l'évolution de la deutération de l'ion parent en fonction de l'énergie de désolvatation, un résultat surprenant est obtenu (Fig. II. 4) : le nombre de deutériums diminue aux hauts potentiels de désolvatation.

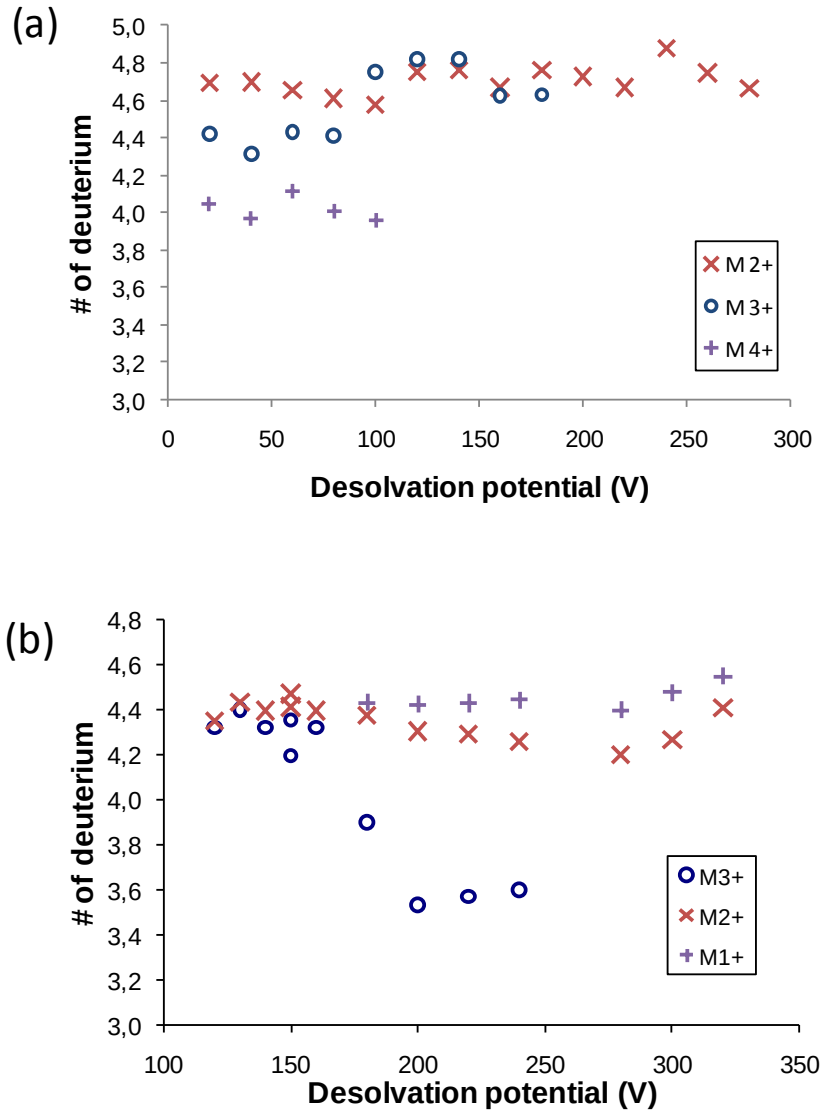


Fig. II. 4 Nombre de deutériums dans les différents états de charge de l'ion précurseur en fonction du potentiel de désolvatation. (a) Peptide P1 (HHHHHHIIKIIK). (b) Peptide P2 (KKDDDDDDIIKIIK).

Ce résultat explique le comportement observé pour les ions c_{11}^{1+} et c_{13}^{2+} aux hauts potentiels de désolvatation : la diminution du nombre de deutériums pour ces ions fragments est corrélée à celle de l'ion précurseur. Par ailleurs, le nombre de deutériums perdu semble lié

à la fois à la nature et à l'état de charge du peptide. Par exemple, le peptide P2 trois fois chargé perd 0,8 D alors que le peptide P3 avec le même état de charge perd au moins 2 D. Cette perte de deutériums ne peut s'expliquer que par l'intervention d'une autre molécule possédant des hydrogènes échangeables avec laquelle un échange inverse D → H peut avoir lieu. Cette molécule peut par exemple provenir du solvant de spray utilisé pour les expériences : eau, méthanol, acide acétique. En effet, il est possible d'émettre l'hypothèse que des réactions ion/molécule dans la source, dans laquelle la pression est importante, conduisent à cet échange d'hydrogènes et de deutériums. Le fait que P1 ne subisse aucune perte de deutérium permet même de postuler que les acides aminés responsables de cet échange sont les acides aspartiques, résidus que l'on retrouve dans tous les peptides étudiés à l'exception de P1. Compte tenu du faible nombre de peptides étudiés, il est difficile de conclure sur un mécanisme général permettant d'expliquer cet échange en phase gazeuse mais le mécanisme de flip-flop décrit par Beauchamp et al. (*28-29*) pourrait expliquer les résultats observés.

Il est intéressant de noter que les phénomènes décrits précédemment (apparition de fragments dans la source, « scrambling », perte de deutériums) apparaissent tous à une limite précise (mais différente) de potentiel de désolvatation (Tab. II. 2). Comme le potentiel de désolvatation est directement lié à l'énergie interne des ions produits par la source électrospray (*26*), il est possible d'utiliser la valeur des seuils observés comme indication de l'énergie requise pour chaque phénomène. Bien que les seuils dépendent du peptide (et de son état de charge), il est possible d'établir un ordre d'apparition de chaque phénomène car il est conservé d'une séquence et d'un état de charge à l'autre : ainsi le « scrambling » apparaît en premier, avec un seuil assez bas d'énergie de désolvatation, suivi d'une perte du marquage et enfin de l'apparition de fragments aux plus hautes énergies.

Tab. II. 2 Valeurs de potentiel de désolvatation (en V) pour l'apparition de chaque phénomène observé : « scrambling », perte de deutériums et fragmentation dans la source.

Peptide	Desolvation potential (V) at onset			
	Scrambling	Loss of D atom		Fragmentation
		from 3+	from 2+	
P1	100	-	-	150
P2	110	160	-	170
P3	100	110	180	140
P4	-	-	-	120

L'ordre des deux premiers phénomènes indique que les hydrogènes d'amide ne sont pas directement échangeables avec ceux des molécules de solvant vaporisées. Deux mécanismes différents peuvent alors être envisagés : soit un échange direct en phase gazeuse d'un atome d'hydrogène du solvant avec un deutérium porté par un azote d'une des liaisons peptidiques, ce qui implique une énergie d'activation importante ; soit un échange à un autre site labile après transfert du deutérium. Comme la courbe du démarquage est très proche de celle du « scrambling », déterminée par les expériences ECD, on peut supposer que la réaction a lieu en deux étapes : réarrangement intramoléculaire dans le peptide conduisant à échanger les deutériums d'amide avec les hydrogènes carboxyliques des acides aspartiques, puis réaction ion/molécule avec le solvant en phase gazeuse. En absence de ces acides carboxyliques relais (cas de P1), seul le « scrambling » peut avoir lieu. Ce mécanisme ne répond toutefois pas à une question qui est la suivante : pourquoi, dans le cas de P2, et pas de P3, le démarquage conduit-il à un échange limité à 0,8 D alors qu'on devrait s'attendre à suivre la courbe du « scrambling » ? Si l'on revient au schéma de la source d'ionisation de l'instrument utilisé, il convient de se souvenir qu'après leur désolvatation dans le capillaire de transfert chauffé, les ions sont stockés pendant une seconde environ dans un hexapôle dans lequel règne une pression assez importante (10^{-6} mbar environ). Ainsi, un échange H/D partiel semble indiquer que les deux phénomènes observés ont lieu dans deux régions différentes de l'instrument : le réarrangement aurait lieu dans l'interface entre le capillaire et le premier « skimmer », qui est une région à haute pression et soumise à un potentiel électrique important tandis que les réactions ion/molécule auraient plutôt lieu dans l'hexapôle. Ainsi, si tous les sites labiles du peptide ne participent pas aux réactions ion/molécule avec leur environnement gazeux (ce qui est le cas dans l'hypothèse où les acides aspartiques sont liés spécifiquement à cet échange), le réarrangement conduirait à un nombre fini de sites échangeables portant un atome de deutérium et ceux situés sur d'autres sites ne pourraient donc pas participer au démarquage.

II.3.Conclusions

II.3.1.Conclusion sur l'APEX III

L'objectif initial de ce travail était de déterminer quels paramètres expérimentaux de la source électrospray Apollo I de l'APEX III devaient être optimisés pour minimiser le réarrangement intramoléculaire des hydrogènes et des deutériums qui a lieu en source. Parmi les différents paramètres testés, les résultats présentés précédemment montrent que c'est le

potentiel de désolvatation qui est le plus critique. Grâce à l'utilisation de l'ECD sur des peptides sélectivement marqués, nous avons ainsi pu montrer que le potentiel de désolvatation doit être maintenu à une valeur légèrement inférieure à celle conduisant à un maximum d'intensité pour les ions formés soit entre 80 et 110 V pour éviter le « scrambling ». Cette valeur est sensiblement la même pour tous les peptides que nous avons étudiés.

Les résultats obtenus sur les peptides sélectivement marqués montrent clairement qu'il faut faire extrêmement attention à optimiser ce paramètre avant d'utiliser l'ECD ou l'ETD pour localiser des deutériums dans des peptides ou des protéines qui ont été marqués et pouvoir tirer des conclusions sur la présence de zones structurées ou non. Utiliser des peptides sélectivement marqués pour déterminer les conditions expérimentales de source propres à réaliser l'analyse de peptides ou de protéines deutérés (conditions qui dépendent de l'instrument utilisé) devrait ainsi être l'étape préliminaire à toute expérience HDX-MS/MS. Au cours de ce travail nous avons également mis en évidence un phénomène de réactions ion/molécule dans la source qui sont potentiellement à l'origine d'échanges entre les deutériums présents sur la séquence peptidique et des hydrogènes issus fort probablement de molécules de solvant en phase gazeuse. Il est apparu au cours de notre travail que ce phénomène était particulièrement marqué pour les peptides portant des acides aspartiques par rapport à ceux portant des histidines. Ce phénomène étant *a priori* basé sur une première étape qui est l'échange entre un deutérium présent sur une liaison amide et un hydrogène carboxylique de la chaîne latérale des Asp, il peut être réduit par un réglage approprié des paramètres de source (diminution de l'énergie de désolvatation).

II.3.2.Autres instruments FT-ICR

Nous avons procédé à l'« upgrade » de nos instruments à deux reprises (APEX III > APEX-Q en janvier 2011 et APEX-Q > SolariX en avril 2012). De la même manière que pour l'APEX III, nous avons pu déterminer, pour l'APEX-Q et le SolariX, le paramètre ou les paramètres critiques qu'il faut optimiser pour limiter le « scrambling ». En effet, à chaque changement ou modification d'instrument, une ré-optimisation de l'ensemble des paramètres entre la source et la cellule est requise pour éviter un échauffement des ions lors de leur formation ou de leur transfert. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-après (Tab. II. 3).

Tab. II. 3 Paramètre(s) critique(s) à optimiser pour limiter le phénomène de « scrambling » en fonction de l'instrument utilisé.

APEX III	Tension à la sortie du capillaire de source (Potentiel de désolvatation ou « CapExit)	< 80 V
APEX-Q APEX-Qe	Tension dans la cellule de collision (« CollisionVoltage »)	> 0 V (3-5 V)
SolariX	Tension du premier écorceur (SK1), Conditions de la cellule de collision • collision activée • tension de collision en entrée	< 50 V Non. < 2 V

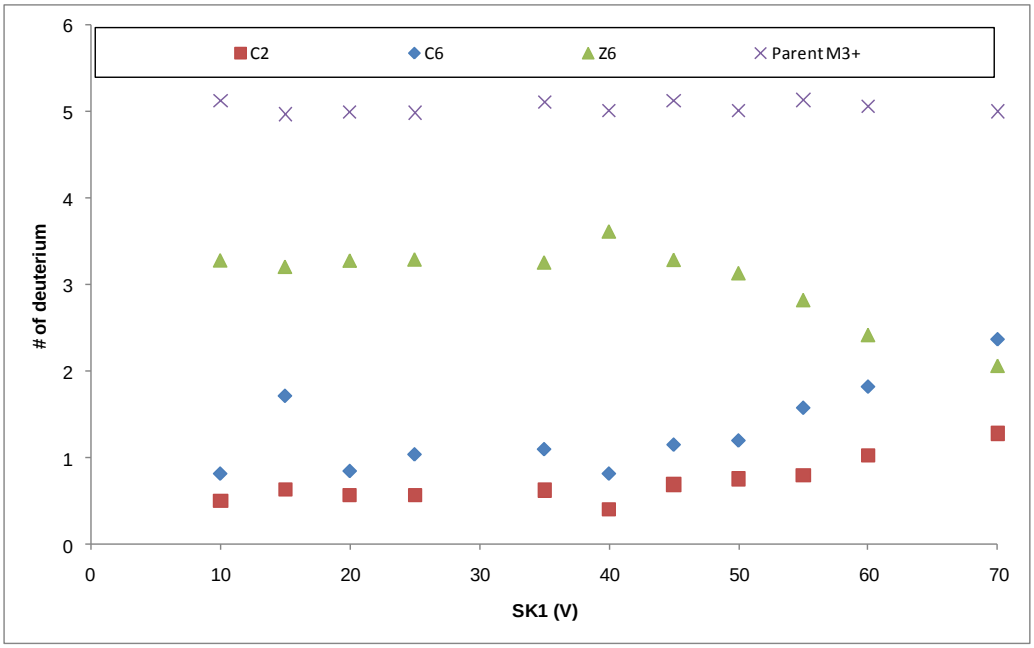


Fig. II. 5 Nombre de deutériums dans l'ion précurseur triplement chargé du peptide P2 (KKDDDDDDIIKIIK) et dans les fragments c_2, c_6 et z_6 en fonction du potentiel du premier écorceur.

A titre d'illustration, la Fig. II. 5 reprend les résultats obtenus sur le SolariX avec le peptide P1 en faisant varier la tension du premier écorceur (« skimmer ») SK1, montrant une valeur optimale vers 40 V. On notera par contre la présence d'un taux de deutération non nul sur les fragments c_2 et c_6 dès les basses tensions. Il faut noter que ces expériences ont été réalisées sur un ion précurseur triplement chargé présentant un taux de deutération plus élevé que ce qui est attendu.

Les deux versions successives (APEX-Q et SolariX) présentent une évolution majeure qui est l'introduction d'une cellule de collision sur le chemin optique des ions (Annexe, Fig. A. 4 et Fig. A. 6). En conséquence, on observe que cette seconde région à pression de gaz élevée ajoute une seconde région susceptible de conduire à un dépôt d'énergie dans les ions et par conséquent à du « scrambling ». Les paramètres optimisés concernent par conséquent ces deux régions. L'ajout d'entonnoirs à ions (« ion funnels ») au premier étage de désolvatation semble rendre la tension en sortie de capillaire (« CapExit ») nettement moins critique, sans doute parce que les distances sont plus grandes (et donc le champ électrique plus faible). Par contre, sur le SolariX, de l'énergie peut être déposée entre le premier écorceur (SK1) et le second entonnoir qui joue un rôle critique dans le dépôt d'énergie (Annexe, Fig. A. 6).

En conclusion, dans cette partie nous avons utilisé un jeu de peptides spécifiquement marqués par des deutériums pour valider notre instrumentation et trouver les paramètres optimaux par rapport au phénomène de « scrambling » ou mélange des deutériums lors des étapes de transfert en phase gazeuse et d'introduction dans le vide du spectromètre de masse. Nous avons également validé, au passage, que l'ECD permet effectivement de mesurer des fragments donc le nombre de deutériums correspond à celui attendu après démarquage sélectif de peptides modèles. Dans la partie suivante, nous allons transposer ces résultats à un système réel.

II.4.Bibliographie

1. Burlet, O., Yang, C.-Y., and Gaskell, S. J. (1992) Influence of cysteine to cysteic acid oxidation on the collision-activated decomposition of protonated peptides: evidence for intraionic interactions, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 3*, 337-344.
2. Jones, J. L., Dongre, A. R., Somogyi, A., and Wysocki, V. H. (1994) Sequence Dependence of Peptide Fragmentation Efficiency Curves Determined by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation Mass Spectrometry, *J Am Chem Soc 116*, 8368-8369.
3. Dongré, A. R., Jones, J. L., Somogyi, Á., and Wysocki, V. H. (1996) Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model, *J Am Chem Soc 118*, 8365-8374.
4. Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L., and Breci, L. A. (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation, *J Mass Spectrom 35*, 1399-1406.
5. Paizs, B., and Suhai, S. (2002) Combined quantum chemical and RRKM modeling of the main fragmentation pathways of protonated GGG. II. Formation of b(2), y(1), and y(2) ions, *Rapid Commun Mass Spectrom 16*, 375-389.
6. Ferguson, P. L., Pan, J., Wilson, D. J., Dempsey, B., Lajoie, G., Shilton, B., and Konermann, L. (2007) Hydrogen/deuterium scrambling during quadrupole time-of-flight MS/MS analysis of a zinc-binding protein domain, *Anal Chem 79*, 153-160.
7. Demmers, J. A., Rijkers, D. T., Haverkamp, J., Killian, J. A., and Heck, A. J. (2002) Factors affecting gas-phase deuterium scrambling in peptide ions and their implications for protein structure determination, *J Am Chem Soc 124*, 11191-11198.
8. Jorgensen, T. J., Bache, N., Roepstorff, P., Gardsvoll, H., and Ploug, M. (2005) Collisional activation by MALDI tandem time-of-flight mass spectrometry induces intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides, *Mol Cell Proteomics 4*, 1910-1919.
9. Jorgensen, T. J., Gardsvoll, H., Ploug, M., and Roepstorff, P. (2005) Intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides upon collisional activation, *J Am Chem Soc 127*, 2785-2793.
10. Mueller, D. R., Eckersley, M., and Richter, W. J. (1988) Hydrogen Transfer-Reactions in the Formation of Y+2 Sequence Ions from Protonated Peptides, *Org Mass Spectrom 23*, 217-222.
11. Kenny, P. T., Nomoto, K., and Orlando, R. (1992) Fragmentation studies of peptides: the formation of y ions, *Rapid Commun Mass Spectrom 6*, 95-97.
12. Deng, Y. Z., Pan, H., and Smith, D. L. (1999) Selective isotope labeling demonstrates that hydrogen exchange at individual peptide amide linkages can be determined by collision-induced dissociation mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society 121*, 1966-1967.
13. Kim, M. Y., Maier, C. S., Reed, D. J., and Deinzer, M. L. (2001) Site-specific amide hydrogen/deuterium exchange in E. coli thioredoxins measured by electrospray ionization mass spectrometry, *J Am Chem Soc 123*, 9860-9866.
14. Kim, M. Y., Maier, C. S., Reed, D. J., Ho, P. S., and Deinzer, M. L. (2001) Intramolecular interactions in chemically modified Escherichia coli thioredoxin monitored by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry, *Biochemistry 40*, 14413-14421.

15. Eyles, S. J., Speir, J. P., Kruppa, G. H., Gierasch, L. M., and Kaltashov, I. A. (2000) Protein conformational stability probed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society 122*, 495-500.
16. Hoerner, J. K., Xiao, H., Dobo, A., and Kaltashov, I. A. (2004) Is there hydrogen scrambling in the gas phase? Energetic and structural determinants of proton mobility within protein ions, *Journal of the American Chemical Society 126*, 7709-7717.
17. Abzalimov, R. R., and Kaltashov, I. A. (2010) Controlling Hydrogen Scrambling in Multiply Charged Protein Ions during Collisional Activation: Implications for Top-Down Hydrogen/Deuterium Exchange MS Utilizing Collisional Activation in the Gas Phase, *Analytical Chemistry 82*, 942-950.
18. Rand, K. D., Adams, C. M., Zubarev, R. A., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens, *J Am Chem Soc 130*, 1341-1349.
19. Zehl, M., Rand, K. D., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron transfer dissociation facilitates the measurement of deuterium incorporation into selectively labeled peptides with single residue resolution, *J Am Chem Soc 130*, 17453-17459.
20. Jorgensen, T. J., Gardsvoll, H., Dano, K., Roepstorff, P., and Ploug, M. (2004) Dynamics of urokinase receptor interaction with Peptide antagonists studied by amide hydrogen exchange and mass spectrometry, *Biochemistry 43*, 15044-15057.
21. Rand, K. D., and Jorgensen, T. J. (2007) Development of a peptide probe for the occurrence of hydrogen (1H/2H) scrambling upon gas-phase fragmentation, *Anal Chem 79*, 8686-8693.
22. Bai, Y. W., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993) Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen-Exchange, *Proteins 17*, 75-86.
23. Rand, K. D., Lund, F. W., Amon, S., and Jorgensen, T. J. D. (2011) Investigation of amide hydrogen back-exchange in Asp and His repeats measured by hydrogen (H-1/H-2) exchange mass spectrometry, *Int J Mass Spectrom 302*, 110-115.
24. Rand, K. D., Zehl, M., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. D. (2010) Loss of Ammonia during Electron-Transfer Dissociation of Deuterated Peptides as an Inherent Gauge of Gas-Phase Hydrogen Scrambling, *Analytical Chemistry 82*, 9755-9762.
25. Amon, S., Trelle, M. B., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2012) Spatially resolved protein hydrogen exchange measured by subzero-cooled chip-based nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal Chem 84*, 4467-4473.
26. Gabelica, V., and De Pauw, E. (2005) Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources, *Mass Spectrom Rev 24*, 566-587.
27. Duchateau, M. (2010) Détermination de surface d'interaction d'assemblages biologiques macromoléculaires par marquage au deutérium et analyse par spectrométrie de masse FT-ICR.
28. Campbell, S., Rodgers, M. T., Marzluff, E. M., and Beauchamp, J. L. (1994) Structural and Energetic Constraints on Gas Phase Hydrogen/Deuterium Exchange Reactions of Protonated Peptides with D2O, CD3OD, CD3CO2D, and ND3, *Journal of the American Chemical Society 116*, 9765-9766.
29. Campbell, S., Rodgers, M. T., Marzluff, E. M., and Beauchamp, J. L. (1995) Deuterium Exchange Reactions as a Probe of Biomolecule Structure. Fundamental Studies of Gas Phase H/D Exchange Reactions of Protonated Glycine Oligomers with D2O, CD3OD, CD3CO2D, and ND3, *Journal of the American Chemical Society 117*, 12840-12854.

Chapitre III : Développement de l’approche "HDX top-down ECD"

Chapitre III : Développement de l'approche "HDX top-down ECD" 99

III.1. Pourquoi faire une analyse « top-down » des échanges H/D ? 101

III.1.1. Problèmes et limitations de l'approche « bottom-up » 101
III.1.2. Etat de l'art de la stratégie « top-down » 102

III.2. Comparaison des différentes techniques de fragmentation lors d'études HDX/MS par approche « top-down » 106

III.2.1. Développement de l'approche « top-down » HDX 106
III.2.1.1. Protéines d'étude 106
III.2.1.2. Protocole d'analyse HDX/MS 107
III.2.1.3. Instruments utilisés 108
III.2.2. Fragmentation par ECD 109
III.2.2.1. Analyse de la sous-unité aIF2α3 109
III.2.2.1.1. Spectre de masse 109
III.2.2.1.2. Résultats obtenus en ECD 109
III.2.2.1.3. Résultats en HDX/ECD 113
III.2.2.1.4. Analyse des données 115
III.2.2.2. Analyse du sous-complexe aIF2α3/γ 121
III.2.2.2.1. Optimisation du protocole d'analyse 121
III.2.2.2.2. Résultats obtenus en HDX/ECD 123
III.2.3. Fragmentation par ETD 127
III.2.3.1. Spectre de masse 127
III.2.3.2. Résultats obtenus en ETD 128
III.2.3.3. Résultats en HDX/ETD 129
III.2.3.4. Analyse de données et comparaison avec les résultats d'ECD 131
III.2.3.5. Conclusion 134
III.2.4. Fragmentation par CID 135
III.2.4.1. Analyse de la protéine aIF2α3 135
III.2.4.1.1. Spectres de masse 135
III.2.4.1.2. Résultats obtenus en HDX/CID 136
III.2.4.2. Analyse de la protéine aIF2α3 avec une étiquette poly-histidines 139

III.3. Détermination du taux maximal de deutération : mise en évidence du phénomène d'échange inverse 142

III.4. Conclusion 147

III.5. Bibliographie 149

III.1.Pourquoi faire une analyse « top-down » des échanges H/D ?

III.1.1. Problèmes et limitations de l'approche « bottom-up »

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit (voir Chap. I), les échanges H/D couplés à la spectrométrie de masse (HDX/MS) permettent d'obtenir des informations sur l'organisation structurale des protéines. L'approche classique, dite « bottom-up » (Fig. III. 1), repose sur une digestion enzymatique de la protéine d'intérêt après marquage afin de déterminer la localisation des deutériums incorporés. Pour cela, les peptides issus de la digestion sont analysés par spectrométrie de masse, une étape préalable de séparation par chromatographie liquide étant le plus souvent requise. Les étapes de digestion enzymatique et de séparation chromatographique qui se déroulent en solution doivent être réalisées dans les conditions de conservation du marquage. Des cinétiques d'échange H/D peuvent alors être calculées pour chaque peptide en mesurant le déplacement de leur masse dans les spectres. Ces cinétiques sont corrélées d'une part à l'accessibilité au solvant et d'autre part à la structure locale de la protéine.

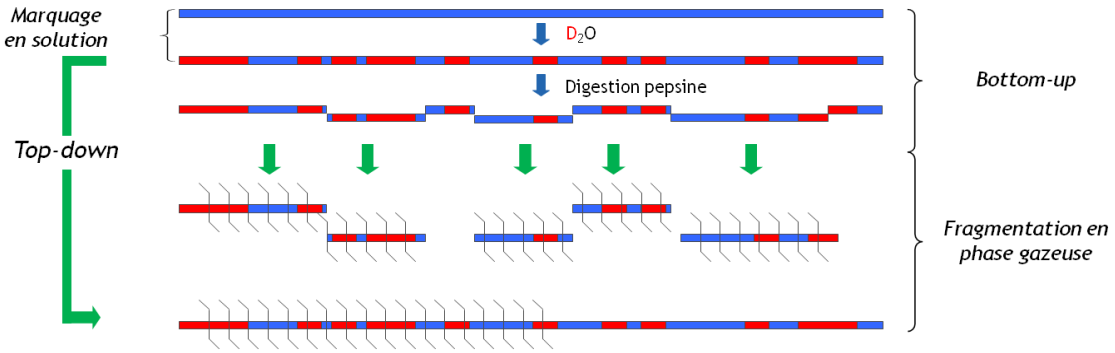


Fig. III. 1 Schéma représentant les étapes des approches « bottom-up » et « top-down » dans des études en HDX/MS. Le segment en bleu correspond à la protéine hydrogénée tandis que les portions en rouge correspondent aux zones de la protéine qui ont été deutérées. Les flèches vertes représentent le moment de la fragmentation en phase gazeuse.

Cependant, cette approche souffre de deux limitations majeures. La première est l'échange inverse entre les deutériums et les hydrogènes qui a lieu en solution lors des étapes de digestion et de séparation, avant l'analyse par spectrométrie de masse. Bien que le « back-exchange » puisse être minimisé, il ne peut être évité (*1*). La seconde limitation est la résolution qui dépend directement de la taille des peptides issus de la fragmentation enzymatique par la pepsine et qui est typiquement de l'ordre de cinq à dix acides aminés.

Une possibilité pour améliorer la résolution est de combiner différentes enzymes. Une autre est de fragmenter les peptides obtenus dans le spectromètre de masse pour localiser précisément les deutériums (*2*). Il a néanmoins été montré que les techniques classiques par chauffage lent (Collision Induced Dissociation, CID) ne peuvent être utilisées car une migration intramoléculaire, et par conséquent un mélange, des hydrogènes et des deutériums a lieu dans la séquence avant la rupture des liaisons peptidiques, ce qui fait perdre l'information de leur localisation (Fig. III. 2) (*3*). En revanche, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent (voir Chap. II), l'utilisation de méthodes de fragmentation basées sur la capture ou le transfert d'un électron (Electron Capture Dissociation, ECD, ou Electron Transfer Dissociation, ETD) permet de réduire considérablement ce phénomène de « scrambling ». De plus, l'intérêt de ces modes de fragmentation alternatifs est qu'ils peuvent être utilisés aussi bien dans une approche « bottom-up » sur les peptides protéolytiques marqués (*4-5*) que directement sur la protéine deutérée dans une approche dite « top-down ». Dans ce dernier cas, l'incorporation des deutériums peut alors être mesurée pour chaque ion fragment, comme nous l'avons fait pour les peptides modèles.

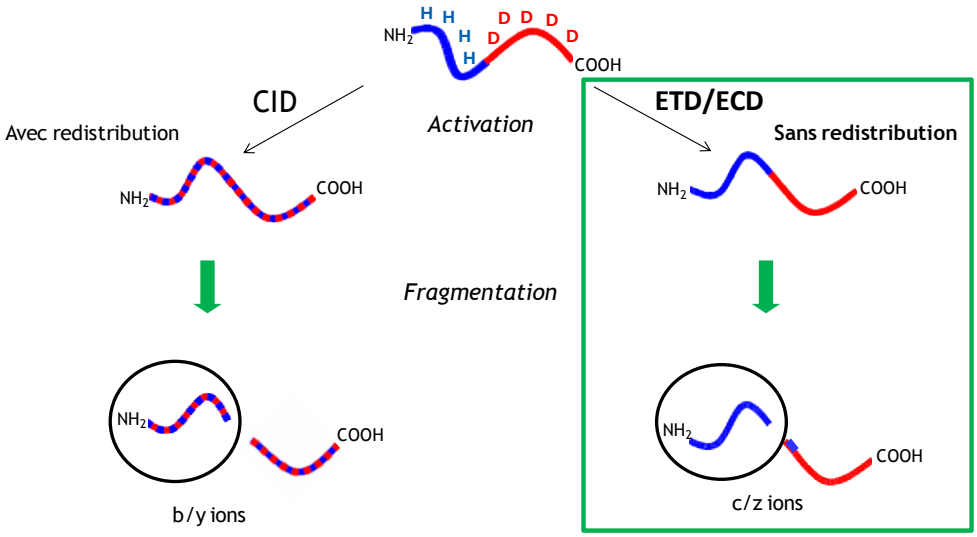


Fig. III. 2 Illustration du phénomène de « scrambling » qui est fréquent lors de la fragmentation par activation collisionnelle (CID). Les méthodes d'activation par les électrons (ECD, ETD) ne conduisent pas à de la redistribution quand les conditions sont optimales.

III.1.2. Etat de l'art de la stratégie « top-down »

Dans une approche « top-down », la protéine entière est fragmentée directement en phase gazeuse (Fig. III. 1). On s'affranchit alors de l'étape de digestion protéolytique. De cette manière, une partie du « back-exchange » qui a lieu en solution, notamment lors de la

digestion enzymatique de la protéine deutérée (*1*), est éliminée. De plus, dans la mesure où l'objet à analyser n'est pas coupé en de nombreux morceaux en solution, l'utilisation d'une séparation chromatographique n'est pas requise ce qui permet également de s'affranchir de l'échange inverse relatif à cette étape. L'approche « top-down » est généralement combinée à une fragmentation par ECD ou ETD. Comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents (voir Chap. I et II), l'utilisation de ces techniques de dissociation par capture ou transfert d'électron permet de limiter au maximum le « scrambling » qui peut avoir lieu en phase gazeuse au cours d'expériences de spectrométrie de masse en tandem. Elles sont donc particulièrement bien adaptées pour déterminer la position précise des deutériums incorporés le long de la séquence polypeptidique.

Des résultats obtenus très récemment par différents groupes utilisant aussi bien l'ETD que l'ECD sur des protéines modèles ont ainsi montré que ces techniques de dissociation utilisées en combinaison avec les échanges H/D permettent d'analyser la structure native des protéines (*6*) ou encore de caractériser des espèces transitoires, ce qui est essentiel pour la compréhension des mécanismes de repliement (*7*). Il a même été montré au cours de ces études qu'une résolution *à l'acide aminé près* peut être obtenue. Les premiers résultats provenant d'une association entre échanges H/D et analyse « top-down » ont été obtenus en 2008 par l'équipe de Lars Konermann au Canada sur une petite protéine modèle de 8,6 kDa, l'ubiquitine (*8*). Il montre dans son article que les informations de structure qu'il obtient sont très proches de celles issues de la RMN (Fig. III. 3).

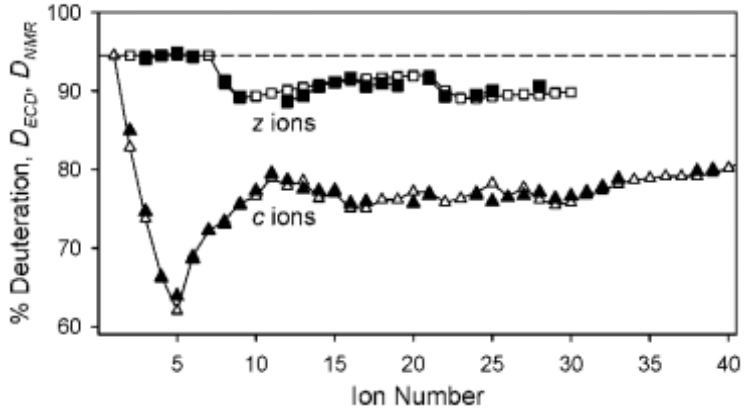


Fig. III. 3 Symboles pleins : taux de deutération des ions fragments ECD de l'ubiquitine après 30 min incubation dans 95% de D_2O à 22°C. Symboles vides : taux de deutération obtenus par RMN dans les mêmes conditions HDX.

Dans une étude plus récente encore, Igor Kaltashov a présenté des résultats très prometteurs sur une protéine de 18 kDa en utilisant un spectromètre de masse FT-ICR (Bruker) sur lequel une source d'ionisation chimique permettant de faire des expériences ETD a été installée (*9*). Il a également montré très récemment en travaillant sur la même protéine modèle que la fragmentation par activation collisionnelle (CID) pouvait être combinée à une approche « top-down » dans des études HDX indiquant que le phénomène de « scrambling » pouvait être contrôlé lorsque des états de charge très élevés étaient choisis pour la fragmentation (*10*). Bien que les méthodes d'activation par les électrons pour la fragmentation de peptides (*11-12*) et de petites protéines (*6, 8, 13*) se soient révélées très encourageantes pour augmenter la résolution des études en HDX-MS/MS, elles ne fournissent pas une couverture de séquence complète, en particulier pour les gros polypeptides. C'est pour cette raison qu'il serait intéressant de pouvoir utiliser en complément les résultats de la fragmentation par CID, qui conduit à des ions fragments souvent complémentaires à ceux obtenus par dissociation ECD ou ETD. Ainsi, la possibilité d'utiliser les méthodes d'activation collisionnelle en plus des techniques d'activation par les électrons dans les études « top-down » HDX conduirait à une résolution spatiale significativement améliorée permettant de sonder la conformation et la dynamique des protéines. Une autre façon d'augmenter la résolution est l'utilisation d'un réactif tel que l'alcool m-nitrobenzylique (m-NBA), qui augmente l'état de charge des ions protéiques en provoquant leur rapide dénaturation lors du processus d'ionisation par ESI. Il en résulterait le dépliement de la protéine dans la goutte électrospray mais sans l'apparition de modifications significatives de sa structure par rapport à celle de la solution initiale, permettant d'améliorer l'efficacité de fragmentation, et donc la couverture de séquence, par ECD ou ETD. Ainsi, dans une étude récente, Evan Williams (*14*) a montré que l'ajout de m-NBA dans le spray utilisé pour ioniser l'ubiquitine permet de former des ions de plus hauts états de charge, dont la mobilité ionique a révélé qu'ils étaient, comme attendu, plus dépliés que leurs homologues de plus bas état de charge. Ainsi, comme l'efficacité de la fragmentation ECD/ETD augmente avec l'état de charge du précurseur, Williams a pu montrer dans le cas de l'ubiquitine qu'une meilleure couverture de séquence pouvait être obtenue, simplement par l'ajout de m-NBA. Une autre possibilité est de combiner les résultats obtenus pour différents états de charge d'ions précurseurs, ce qui peut améliorer un peu plus la résolution spatiale des expériences ETD. Ceci peut devenir d'autant plus important que le système protéique est grand, dans le cas où typiquement la fragmentation par ETD est limitée.

Les différents exemples récents décrits précédemment montrent que les approches « top-down » ont fait l'objet de développements importants, *dans le contexte des échanges H/D*, ces dernières années. Néanmoins, jusqu'à maintenant, seules des protéines modèles, stables et disponibles en quantité importante ont été l'objet de ces développements. Dans ce contexte, l'objet de ma thèse a été de poursuivre les études réalisées au laboratoire dans l'objectif de mettre au point une méthodologie robuste, combinant échanges H/D et approche « top-down », pour des complexes protéiques "réels", en collaboration avec le laboratoire de Biochimie de l'École Polytechnique. Notre objectif est donc (i) de disposer d'une méthode permettant de localiser rapidement et précisément les deutériums dans la séquence polypeptidique et déterminer ainsi des cinétiques d'échange *pour chaque acide aminé* (ii) de pouvoir appliquer cette méthodologie à l'étude structurale des complexes d'initiation de la traduction. La difficulté ici réside dans le fait qu'il s'agit d'échantillons biologiques réels et de grande taille. Cela implique des étapes additionnelles dans le protocole de préparation et d'analyse des échantillons et donc des précautions supplémentaires à prendre vis-à-vis de la conservation du marquage. Notre étude HDX/MS préliminaire, qui a été menée sur des peptides de référence et qui a été présentée dans le chapitre précédent (voir Chap. II), a montré que l'utilisation de méthodes de fragmentation telle que la dissociation par capture d'électron (ECD) était adaptée pour mesurer les taux d'échanges H/D pour chaque acide aminé. Pour cela, une optimisation fine des conditions de source et des paramètres instrumentaux, a été requise préalablement à l'analyse pour réduire au maximum le « scrambling » pendant les processus de désolvatation et de transfert des ions en phase gazeuse. Nous avons dans ce troisième chapitre réutilisé ces paramètres optimisés pour l'analyse « top-down » de nos échantillons protéiques. Dans un premier temps, cette partie se focalisera sur l'étude « top-down » HDX avec activation par ECD, qui est la technique d'activation pour laquelle le plus de résultats ont été obtenus. Ensuite, pour mieux comprendre le rôle des méthodes d'activation sur les migrations d'hydrogène, le même système a également été étudié avec d'autres modes d'activation (ETD et CID).

III.2. Comparaison des différentes techniques de fragmentation lors d'études HDX/MS par approche « top-down »

III.2.1. Développement de l'approche « top-down » HDX

III.2.1.1. **Protéines d'étude**

Nous avons travaillé sur le complexe protéique aIF2 (archaeal Initiation Factor 2) de *Sulfolobus solfataricus* (Fig. III. 4), qui est un des complexes responsables de l'initiation de la traduction chez les archées. Son rôle est de recruter l'ARNt méthionylé lié à l'ARNm au niveau de la petite sous-unité du ribosome. Nous savons déjà, par des données cristallographiques, qu'il est constitué de trois sous-unités : α, β et γ. La sous-unité γ (45 kDa), qui constitue la protéine centrale du complexe, est connue pour interagir avec les deux autres sous-unités α (30 kDa) et β (15 kDa) au sein d'aIF2. Afin d'obtenir des informations structurales sur l'organisation de ce complexe, nous avons développé notre méthodologie à partir de l'analyse de la protéine aIF2α3 de 10 kDa, qui est une version tronquée de la sous-unité α du complexe aIF2 mais qui contient le site d'interaction avec γ. Ce travail a été initié lors de la thèse de M. Duchateau (*15*), pendant laquelle l'étude de la protéine aIF2α3 a été réalisée par HDX/ECD sur l'APEX III. Dans le cadre du travail actuel, nous avons étendu notre étude au sous-complexe aIF2α3/γ et comparé les différents modes de fragmentation en utilisant d'autres spectromètres de masse.

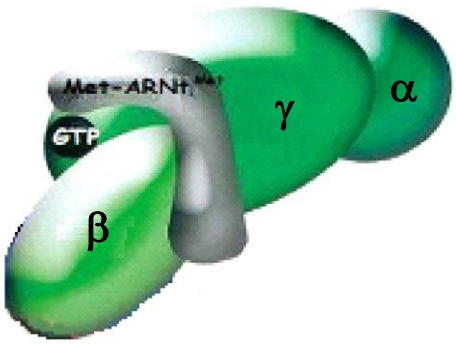


Fig. III. 4 Schéma du complexe hétérotrimérique aIF2αβγ.

III.2.1.2. **Protocole d'analyse HDX/MS**

L'analyse d'échantillons biologiques réels a nécessité une optimisation du protocole mis au point pour les peptides. En effet, ces échantillons protéiques présentent des inconvénients majeurs qui sont les suivants :

- ils ne sont pas disponibles en grande quantité
- le maintien de leur structure native nécessite des concentrations importantes de sels non volatils
- ils se dégradent rapidement à température ambiante.

L'ensemble des étapes du protocole allant des conditions de l'échange en solution (pH, température, tampons, dessalage) à la fragmentation par ECD a donc été minutieusement optimisé (Fig. III. 5) pour tenir compte de ces limitations. Au début de l'expérience, la protéine aIF2α3 est dans son état natif. En effet, elle est conservée dans son tampon de purification qui est riche en sels (chlorure de sodium), et qui lui permet ainsi de garder sa conformation native. La première étape de notre protocole qui a consisté à initier la réaction d'échange H/D, a été de diluer aIF2α3 dans un tampon deutéré, riche également en sels (solution de NaCl à 330 mM dans D_2O) afin de ne pas dénaturer la protéine et donc de sonder sa conformation active. Une incubation du mélange à 37°C sous agitation est réalisée pendant différents temps à l'issu desquels la réaction de marquage est bloquée. Cette étape d'arrêt de la réaction d'échange est effectuée par l'addition d'une solution aqueuse (H_2O) acide (pH final de 2,5) et glacée (à 0°C). Etant donné que les fortes concentrations en sels non volatils ne sont absolument pas compatibles avec une ionisation par électrospray, nous avons dû ajouter et optimiser une étape de dessalage dans les conditions de conservation du marquage. Après cette étape de dessalage dont la durée totale a été optimisée à seulement une minute (*15*), la protéine deutérée est prête pour l'analyse par spectrométrie de masse. Elle est injectée par le système de seringue refroidie, ionisée par électrospray et fragmentée par ECD dans la cellule ICR.

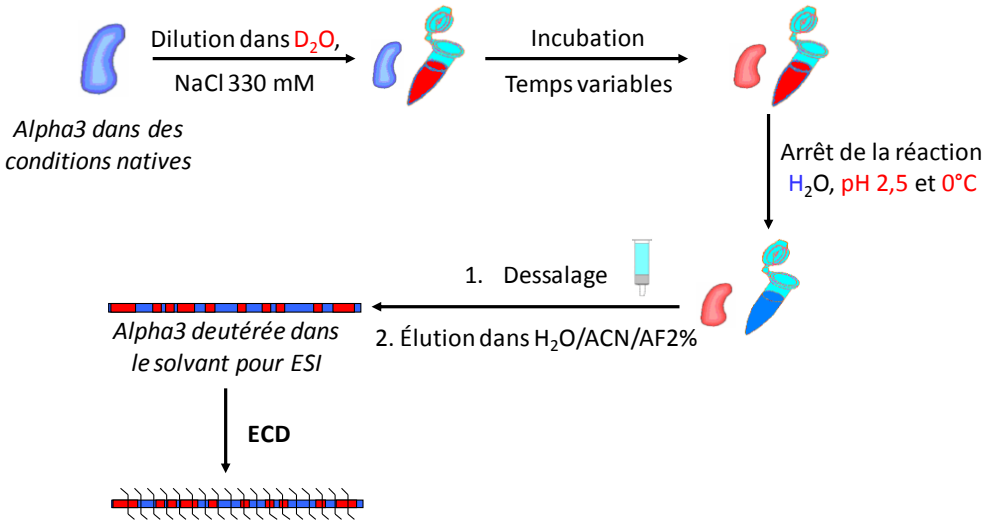


Fig. III. 5 Schéma de notre protocole optimisé pour l'étude d'aIF2α3 en HDX/MS par analyse « top-down ».

Pour éviter l'étape de dessalage et optimiser encore plus le protocole, nous avons fait de nombreux essais pour essayer de remplacer les sels non volatils par des sels volatils compatibles avec une analyse par ESI mais dans tous les cas la protéine a précipité ou s'est dégradée.

III.2.1.3. **Instruments utilisés**

Les fragmentations par ECD ont été réalisées sur des spectromètres de masse de type FT-ICR. Les premières expériences ont été réalisées sur un spectromètre APEX III, qui n'est pas équipé d'un quadripôle de sélection avant la cellule ICR puis sur un APEX-Qe, disponible à Orsay (P. Maître, Laboratoire de Chimie Physique). Les différences majeures entre les deux instruments sont : la présence d'un quadripôle sur l'APEX-Qe permettant de réaliser la sélection d'ions précurseurs avant leur entrée dans la cellule ICR, la présence d'« ion funnels » (qui améliorent la sensibilité de l'instrument) et la source d'ionisation (Apollo I sur l'APEX III, Apollo II sur l'APEX-Qe).

Les expériences ETD ont, quant à elles, été effectuées sur un instrument LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) en collaboration avec la plateforme protéomique de Paris 7, dirigée par Jean-Michel Camadro.

Les expériences CID ont été obtenues sur un spectromètre de masse Q-ToF Premier (Waters) installé au laboratoire DCMR.

III.2.2. Fragmentation par ECD

III.2.2.1. **Analyse de la sous-unité aIF2α3**

III.2.2.1.1. ***Spectre de masse***

Le spectre de masse d'aIF2α3 dont la masse monoisotopique est 10422,985 Da, a été obtenu après ionisation électrospray dans des conditions dénaturantes (Fig. III. 6).

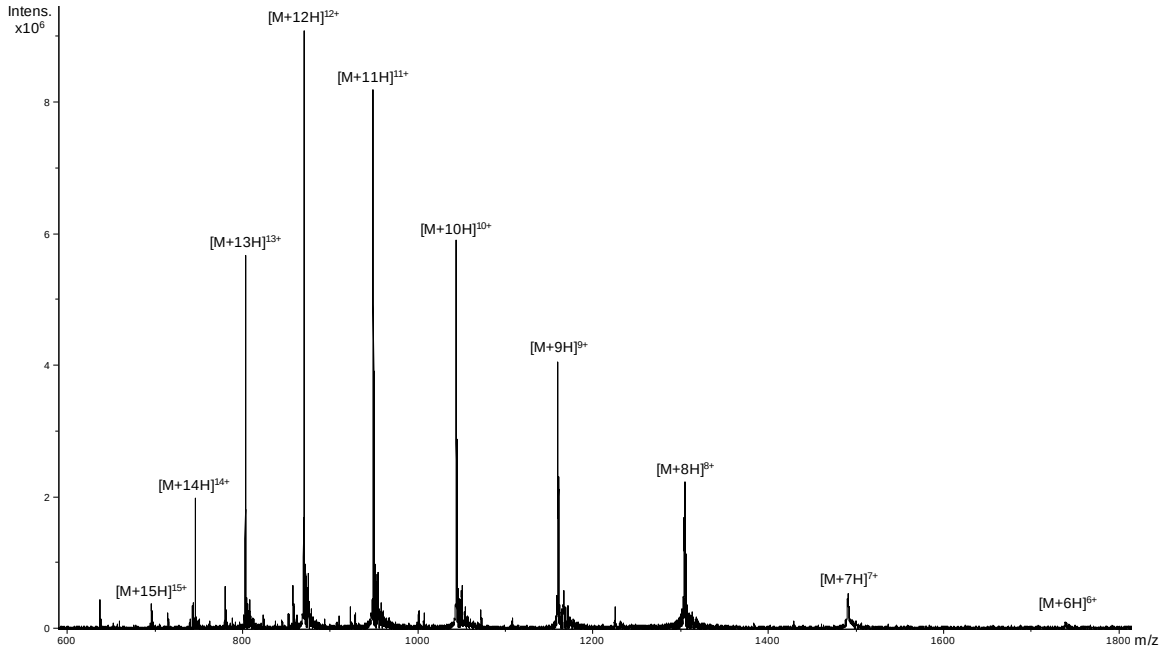


Fig. III. 6 Spectre MS d'aIF2α3 enregistré sur notre instrument FT-ICR APEX III.

III.2.2.1.2. ***Résultats obtenus en ECD***

<u>Expériences réalisées sur l'APEX III du DCMR</u>

La première étape a consisté à optimiser les paramètres pour l'ECD afin d'obtenir la plus grande couverture de séquence possible pour cette protéine de 10 kDa, sans échange H/D. Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé une autre petite protéine, l'ubiquitine (8,6 kDa) pour optimiser l'ensemble des paramètres expérimentaux.

Lors de la thèse de M. Duchateau (*15*), notre équipe a montré que la fragmentation par ECD d'aIF2α3 était beaucoup plus efficace sans sélection d'un état de charge. Nous avons donc procédé de la même manière.

Pour l'ubiquitine, les spectres ECD les plus informatifs ont été obtenus avec une cathode chauffée à 1,6 A et une irradiation par des électrons de 0,9 eV d'énergie cinétique pendant 80 ms. Nous utilisons également la technique de piégeage dynamique des ions dans la cellule afin de maximiser la quantité d'ions accumulés avant la fragmentation ECD. En effet, la qualité des spectres ECD dépend en grande partie de l'intensité des ions précurseurs et il existe un véritable seuil pour le nombre d'ions pour obtenir des spectres ECD de qualité. Le pourcentage de couverture de séquence ainsi obtenu est de 68%. Pour obtenir un résultat similaire avec aIF2α3, l'énergie cinétique des électrons a été augmentée jusqu'à 2 eV.

Les protéines marquées sont introduites dans le spectromètre de masse par le système de seringue refroidie qui est décrit dans le Chap. IV. Afin de minimiser l'échange inverse en solution, l'analyse ne doit pas excéder dix minutes. Dans ce laps de temps relativement court, deux cents scans sont accumulés par spectre ECD.

L'analyse du spectre ECD d'aIF2α3 réalisé sans sélection d'état de charge, permet l'identification d'un total de 83 ions fragments correspondant à 39 ions *c* et 44 ions *z* dont 18 paires d'ions complémentaires. Cela se traduit par un très bon pourcentage de couverture de séquence de 70,6% (Fig. III. 7). L'identification des ions fragments *b* et *y* permet d'améliorer légèrement la couverture de séquence en augmentant le pourcentage de 5,5% (1 ion *b* et 4 ions *y* supplémentaires pour lesquels il n'y a pas d'ions *c* et *z* correspondants) atteignant donc la valeur de 76,1%.

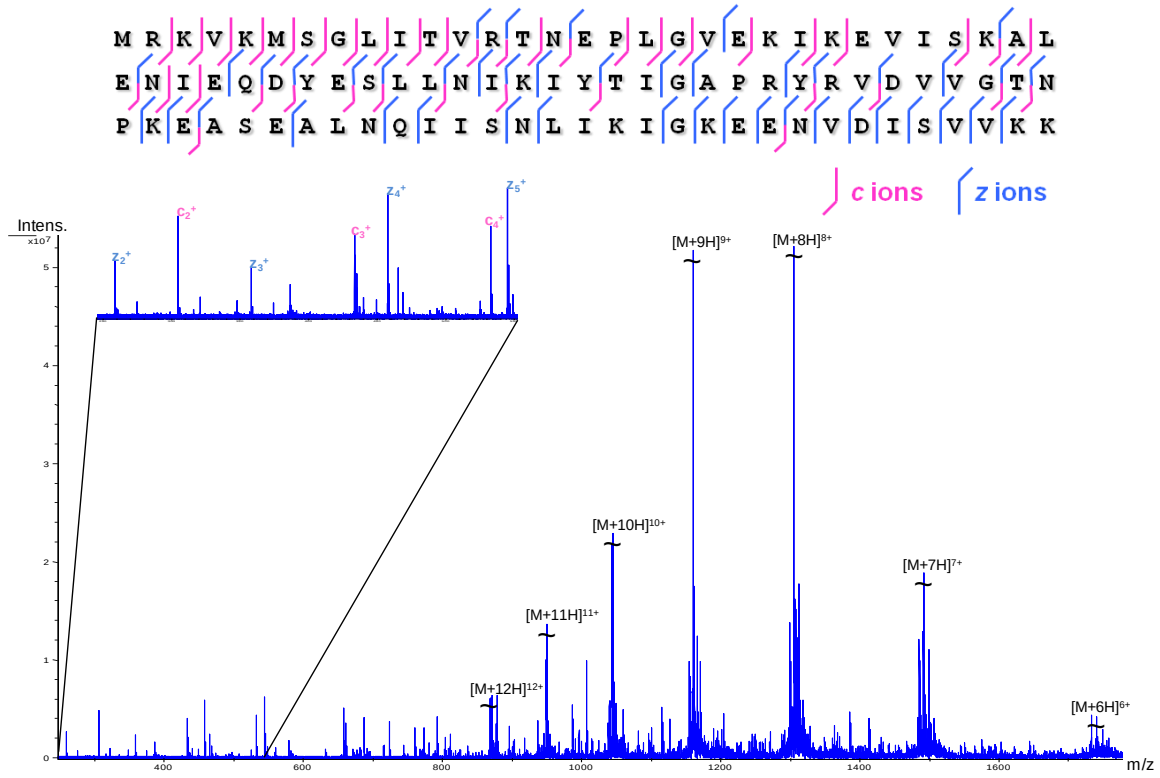


Fig. III. 7 Spectre ECD d'aIF2α3 obtenu sans sélection d'état de charge sur un instrument FT-ICR APEX III et sa couverture de séquence associée. Un agrandissement de la région m/z 250-550 a été ajouté montrant la complexité du spectre.

Des problèmes de stabilité du signal et de sensibilité sont apparus au cours de ces expériences ECD : il arrivait fréquemment que le taux de fragmentation diminue brutalement sans raison apparente au cours d'une cinétique d'échange. Pour pouvoir poursuivre nos expériences, nous avons décidé de continuer nos travaux sur l'APEX-Qe accessible à l'Université Paris-Sud. Une ré-optimisation des paramètres pour l'ECD a donc été nécessaire car cet instrument n'est pas le même que celui du DCMR, et notamment le fait que les sources d'ionisation soient différentes nous laissait à penser que des ajustements, au moins au niveau de la source, seraient nécessaires (voir Chap. II).

Expériences réalisées sur l'APEX-Qe du Laboratoire de Chimie Physique à Orsay

Pour aIF2α3, les nouveaux paramètres optimisés pour maximiser la couverture de séquence obtenue en ECD ont été les suivants : une cathode à 1,8 A et une irradiation par des électrons de 1,7 eV d'énergie cinétique pendant 10 ms. Contrairement aux expériences réalisées sur l'APEX III, nous n'avons pas utilisé la technique de piégeage dynamique des ions. En effet, un gain de sensibilité a été apporté par les « ion funnels ». Dans ces conditions expérimentales, l'analyse du spectre ECD a permis l'identification d'un total de 59 ions

fragments correspondant à 19 ions *c* et 40 ions *z* dont 3 paires d'ions complémentaires. Le pourcentage de couverture de séquence obtenu a donc été de 60,8% (Fig. III. 8).

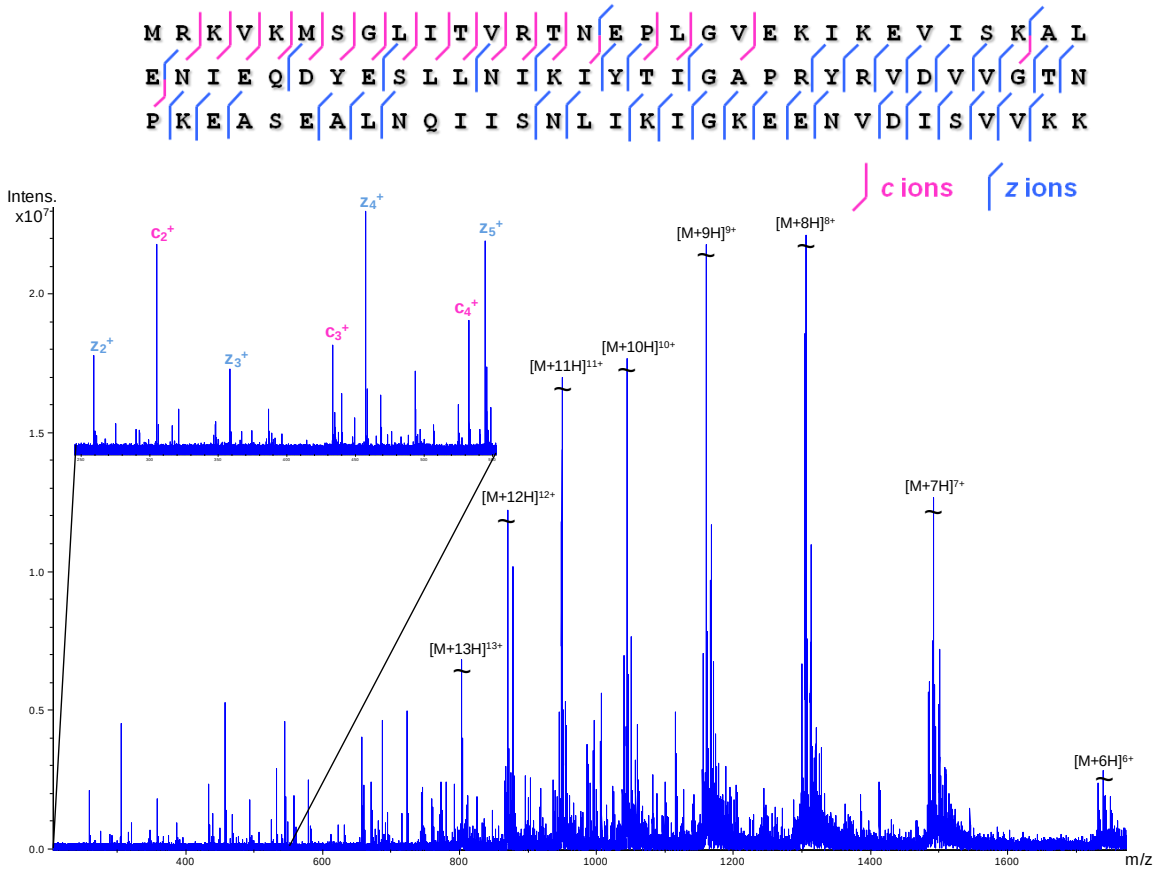


Fig. III. 8 Spectre ECD d'aIF2α3 obtenu sans sélection d'état de charge sur un instrument FT-ICR APEX-Qe. La couverture de séquence correspondante à la fragmentation et l'agrandissement de la région m/z 250-550 sont également montrés.

Si l'on compare les deux spectres ECD ci-dessus, une meilleure efficacité de fragmentation a été obtenue sur l'APEX III permettant d'avoir une meilleure résolution en ce qui concerne la zone [20-55] correspondant à la partie de la protéine aIF2α3 qui se retrouve en contact avec la sous-unité γ lorsque leur association est effective. Néanmoins, la fragmentation ECD de la protéine sur l'APEX-Qe permet aussi d'avoir un bon pourcentage de couverture de séquence pour déterminer des cinétiques d'échange H/D par acide aminé, notamment au niveau des extrémités.

III.2.2.1.3. ***Résultats en HDX/ECD***

L'étape suivante a consisté à combiner les échanges H/D et la fragmentation par ECD. Pour cela, nous avons mis en application notre protocole de marquage pour un temps d'incubation dans D_2O d'une heure (Fig. III. 5).

L'observation des spectres ECD après échange H/D montre que les massifs isotopiques, avec l'incorporation de deutériums, se déplacent vers des rapports masse sur charge plus importants tout en s'élargissant car l'incorporation progressive de deutériums ajoute des pics isotopiques dans le massif (Fig. III. 9). La première conséquence à cet élargissement est que l'intensité totale du signal obtenu pour un ion fragment est répartie sur un nombre plus grand de pics composant le massif. Il en résulte une diminution de l'intensité globale du signal pouvant entraîner une perte de détection. Dans ce contexte, le nombre de fragments pouvant être interprétés de manière correcte car l'enveloppe isotopique présente une intensité suffisante, diminue par rapport à l'expérience sans deutérium. Parfois même certains fragments disparaissent complètement dans le bruit de fond contribuant à son augmentation. En effet, les ions fragments *c* et *z* de faible intensité avant l'échange ne sont plus détectables dans les spectres après échange. Une autre conséquence de l'élargissement des massifs isotopiques ayant incorporé des deutériums est leur superposition compliquant aussi fortement l'analyse des résultats. Plus le nombre de fragments est grand, et moins il est facile de suivre l'incorporation des deutériums. Par ailleurs, pour les hauts rapports m/z, on note également l'apparition de pics intenses à toutes les unités de masse perturbant davantage l'interprétation des résultats. Ce phénomène indésirable résultant de la recapture successive d'un électron avait également été observé lors de la thèse de M. Duchateau (*15*). Une solution pour le limiter a été d'optimiser au maximum le temps d'irradiation par des électrons pour éviter les recaptures successives tout en obtenant suffisamment de fragmentations (énergie cinétique des électrons de 1,7 eV pendant 10 ms).

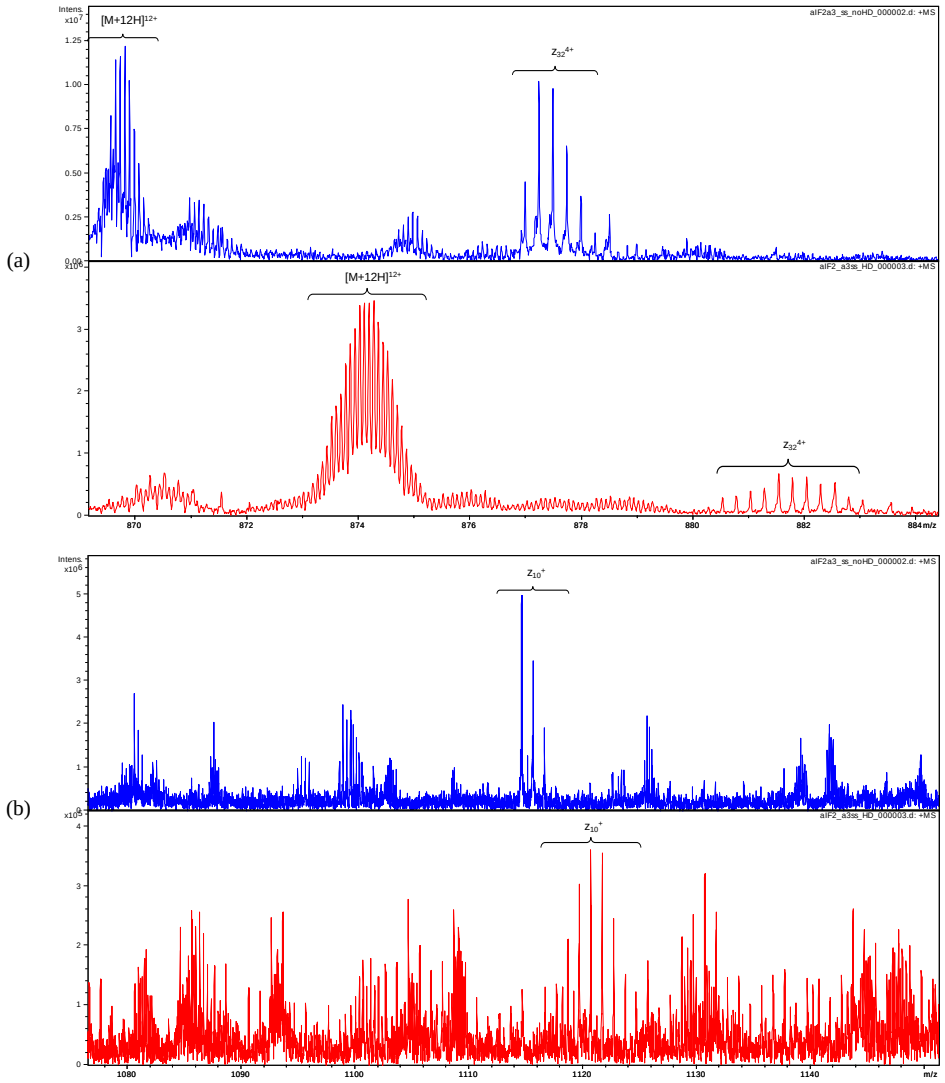


Fig. III. 9 Comparaison des spectres ECD d'aIF2α3 sans HDX (en bleu) et avec HDX t=1h (en rouge). Agrandissements des régions du spectre m/z 869-884 (a) et m/z 1080-1150 (b).

L'analyse des spectres ECD montre donc une perte importante de sensibilité après échange H/D, essentiellement pour les hauts rapports m/z. La conséquence immédiate est une diminution du pourcentage de la couverture de séquence après échange H/D, ce qui n'est pas favorable pour obtenir une bonne résolution. Nous avons identifié au total 43 ions fragments correspondant à 23 ions *c* et 20 ions *z* dont une paire d'ions complémentaires. Le pourcentage de couverture de séquence obtenu a donc été de 45,6% (Fig. III. 10).

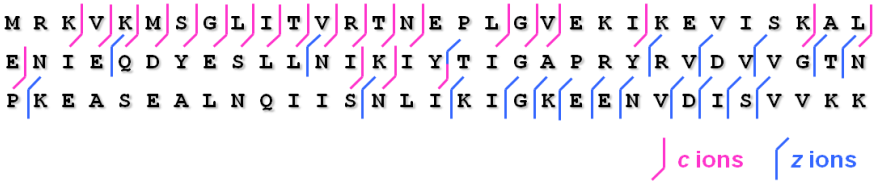


Fig. III. 10 Couverture de séquence d'aIF2α3 après échange H/D suivi d'une fragmentation par ECD.

L'analyse de la Fig. III. 10 montre clairement que si l'analyse des petits fragments (extrémités N- et C-terminales) ne pose pas de problème, l'analyse d'ions fragments plus gros, correspondant à une rupture plutôt au niveau du milieu de la séquence polypeptidique, est bien plus problématique. A la différence de l'APEX III en piégeage dynamique, il semble que sur l'APEX-Qe la capacité de piégeage du piège hexapolaire soit limitante et ne permette pas d'accumuler autant d'ions dans la cellule. Pour éviter ce problème, il faudrait pouvoir accumuler plus de temps pour faire sortir les pics peu intenses du bruit de fond (mais ce n'est pas possible avec notre système de seringue refroidie car l'échange inverse devient trop grand au bout de 10 minutes). Une autre solution à ce problème aurait pu également être une augmentation du champ magnétique, qui aurait permis d'augmenter la gamme dynamique ainsi que la vitesse de balayage.

III.2.2.1.4. ***Analyse des données***

L'extraction des données est réalisée à partir du logiciel Data Analysis (Bruker Daltonics). L'analyse des spectres de fragmentation MS/MS est effectuée entièrement manuellement ce qui la rend longue et fastidieuse.

La première étape de l'analyse consiste à identifier les ions fragments *c* et *z* présents dans le spectre enregistré avant l'échange H/D. Une liste de pics est alors générée. Elle contient tous les pics des massifs isotopiques correspondant aux ions fragments identifiés. Cette liste répertorie le rapport m/z et l'intensité de chaque pic. A partir de celle-ci, les masses moyennes pondérées des fragments n'ayant pas incorporé de deutériums sont calculées. Il s'agit ensuite de procéder de la même manière pour les fragments ayant incorporé des deutériums après échange. Pour la séparation des massifs isotopiques élargis et la détermination de leur masse moyenne pondérée, la précision sur la mesure de masse et la résolution de l'instrument sont deux critères essentiels. Afin de cartographier les échanges isotopiques des hydrogènes d'amide, le choix de spectromètres de masse à très haute résolution (FT-ICR et Orbitrap) est

justifié. Enfin, le nombre de deutériums incorporés pour chaque ion fragment peut être déterminé. Il est obtenu en faisant la différence entre la masse moyenne pondérée d'un ion fragment donné après échange isotopique avec celle obtenue sans échange, et en multipliant par la charge. Le taux de deutération correspondant est déduit en divisant le nombre de deutériums incorporés par le nombre d'hydrogènes d'amide échangeables (multiplié par cent).

La représentation la plus directe des résultats consiste à tracer le graphe du nombre total de deutériums incorporés par chaque ion fragment en fonction de sa position (numéro de résidu) dans la séquence. Pour un temps d'incubation de la protéine dans D_2O donné, deux graphes peuvent alors être réalisés correspondant à l'analyse des deux séries d'ions *c* et *z* (Fig. III. 11). La ligne noire représente une redistribution statistique dans la séquence de tous les deutériums incorporés dans la protéine. Cette courbe théorique correspond donc à l'incorporation moyenne en deutériums pour chaque ion fragment. Elle tient compte du contenu maximal de deutériums incorporés par la protéine. Dans le cas que nous présentons, qui correspond à un temps d'incubation d'une heure dans D_2O, la protéine intacte était marquée à 61%. Chaque point de la ligne noire correspond donc à une incorporation de 0,61 deutérium par résidu. Les décrochements de la courbe sont dus à la présence de proline dans la séquence de la protéine, qui est le seul acide aminé qui ne possède pas de groupement amide N-H de liaison. Si notre expérience avait abouti à un réarrangement total des deutériums sur les hydrogènes d'amide le long de la chaîne peptidique, tous les points expérimentaux en rose et en bleu se situeraient sur la courbe noire. Or, ce n'est pas le cas. Par conséquence, nous pouvons conclure que nous n'avons pas de redistribution aléatoire totale des deutériums avant fragmentation par ECD.

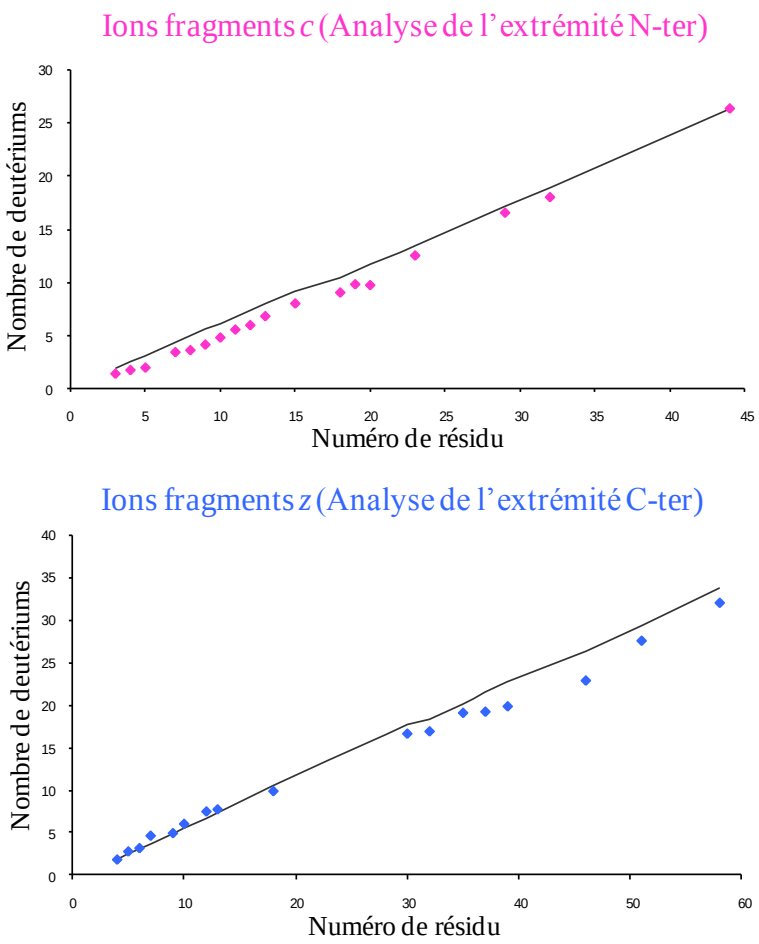


Fig. III. 11 Représentation du nombre total de deutériums incorporés par chaque ion fragment en fonction de son numéro de résidu pour les séries d'ions c et z après une heure d'incubation dans D_2O.

Une autre manière de représenter ces résultats, est de tracer le nombre de deutériums par résidu (et non plus le nombre cumulé de deutériums le long de la séquence) (Fig. III. 12). Ce nombre est calculé en faisant la différence du nombre de deutériums incorporés pour deux ions fragments consécutifs. Par exemple, si on considère l'extrémité N-terminale, le nombre de deutériums incorporés par le résidu numéro dix a été déterminé en faisant le nombre de deutériums incorporés par le fragment c_{10} moins celui du fragment c_9. Le taux de deutération obtenu pour ce résidu a été de 68%. Lorsqu'il manquait des ions fragments, une moyenne d'incorporation des deutériums entre les deux résidus les plus proches a alors été calculée. Dans ce cas, la différence du nombre de deutériums incorporés pour les deux fragments correspondants a donc été divisée par le nombre de résidus les séparant. Ainsi, entre les résidus 33 et 44, le taux moyen de 70% a été calculé en faisant le nombre de deutériums incorporés dans c_{44} moins celui dans c_{33} divisé par 11.

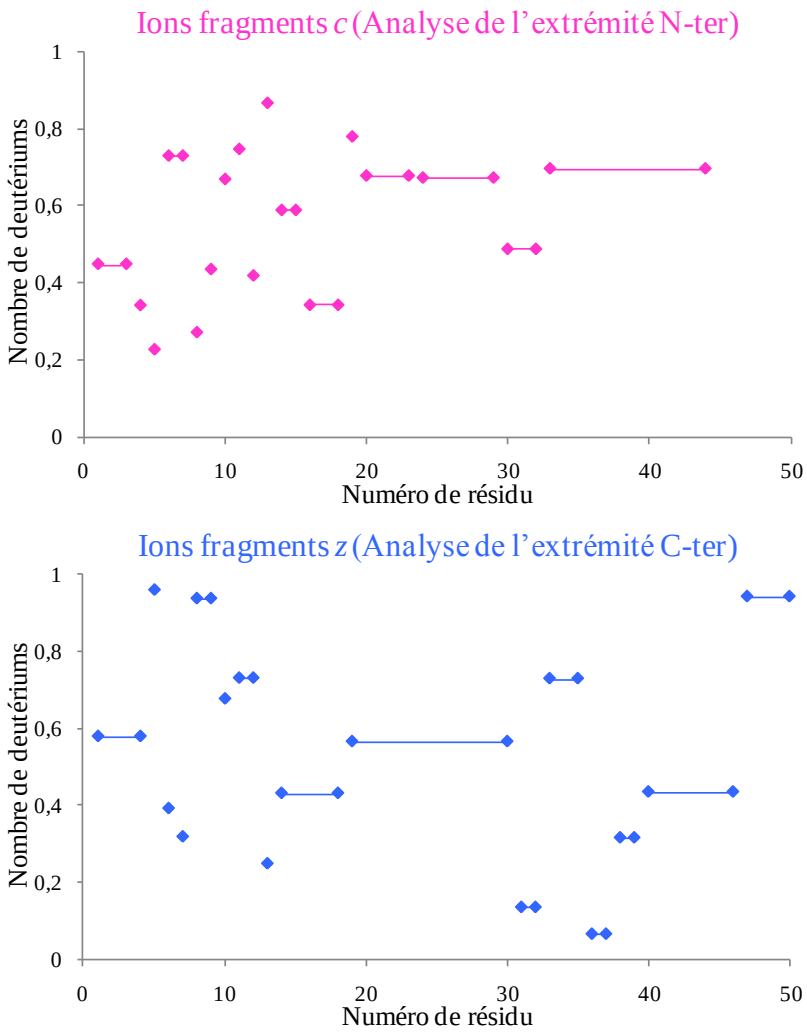


Fig. III. 12 Représentation du nombre de deutériums incorporés par acide aminé pour les séries d'ions c et z après une heure d'incubation dans D_2O.

L'ensemble des points se situe en dessous de un, qui est la valeur maximale de deutération attendue, correspondant exactement à l'incorporation d'un deutérium par hydrogène d'amide. Plus le taux de deutération s'éloigne de la valeur de un, plus la zone correspondante de la protéine est structurée. Inversement, plus le taux est proche de un, moins la protéine est structurée. Ces résultats peuvent donc être exploités pour obtenir des informations structurales sur la sous-unité α3 du complexe d'initiation de la traduction aIF2 chez *Sulfolobus solfataricus.* Ils ont été reportés sur la structure primaire d'aIF2α3 dans laquelle des éléments de structure connus (hélices, feuillets et boucles) ont été indiqués (Fig. III. 13). Les zones en bleu caractérisées par une incorporation faible de deutériums indiquent une zone très structurée de la protéine. Le passage de bleu à rouge (avec des zones intermédiaires en vert, jaune ou orange) montre des segments de la protéine de moins en moins structurés.

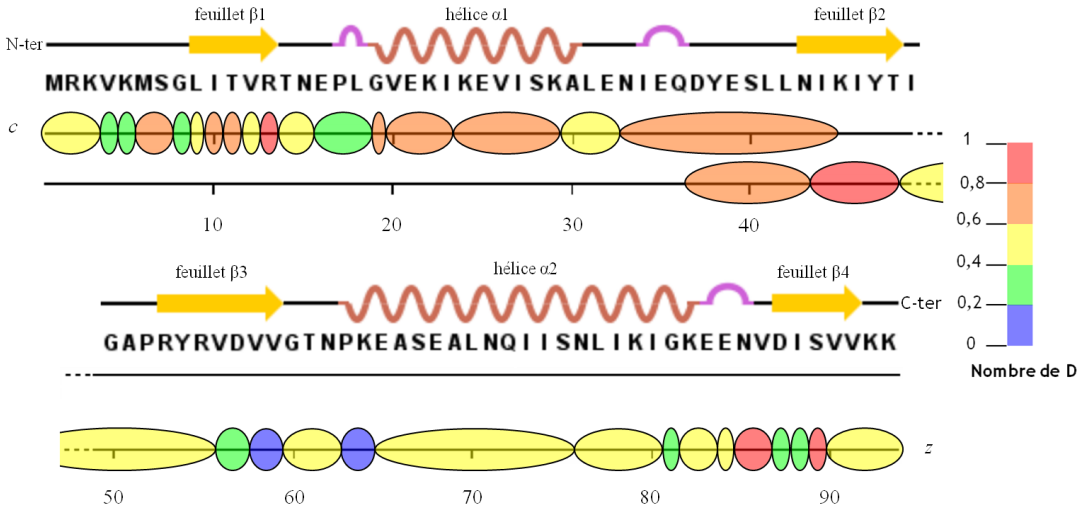


Fig. III. 13 Représentation schématique sur la structure primaire et secondaire d'aIF2α3 du nombre de deutériums incorporés par résidu. Ce nombre a été calculé à partir des taux de deutération d'ions fragments consécutifs ou proches pour les séries c et z après une heure d'incubation de la protéine dans D_2O.

Malgré la diminution du pourcentage de la couverture de séquence après échange H/D, des informations de structure sont déduites sur une grande partie de la protéine. Une résolution à l'acide aminé près est principalement obtenue au niveau des extrémités et dans des zones non structurées de la protéine. Notons que la zone pour laquelle à la fois des ions *c* et *z* sont obtenus présente une parfaite corrélation entre nos résultats, ce qui constitue une validation supplémentaire de notre approche. Néanmoins, nous n'observons pas toujours une très bonne corrélation entre les taux d'incorporation des deutériums que nous avons calculés et les éléments structuraux proposés par la cristallographie, et notamment en ce qui concerne la zone [20-55]. Cette zone qui comprend l'hélice α1, le feuillet β2 et le début du feuillet β3, correspond à la partie de la protéine qui interagit avec la sous-unité γ lorsqu'il y a formation du complexe.

Il est également possible de suivre l'incorporation de deutériums dans la protéine entière ou au niveau des ions fragments au cours du temps en réalisant des cinétiques d'échange H/D.

En faisant varier le temps d'incubation de la protéine dans D_2O, il est alors possible d'obtenir différents points de cinétique et donc de tracer une courbe de cinétique d'incorporation des deutériums (Fig. III. 14). Elle nous renseigne sur la vitesse d'incorporation des deutériums dans la protéine et sur le taux de deutération maximal atteint.

Dans le cas de la protéine aIF2α3, la vitesse d'échange H/D est très rapide. Un plateau est atteint dès trente minutes d'incubation correspondant à un marquage maximal d'environ 66%.

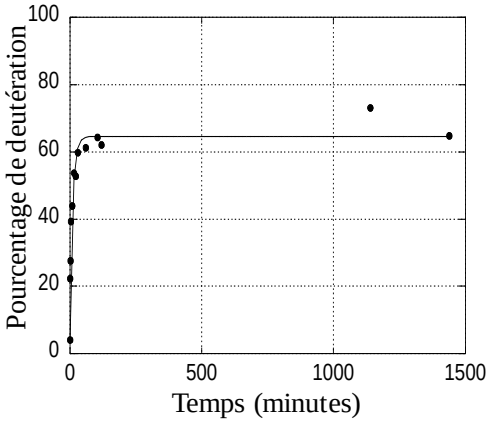


Fig. III. 14 Cinétique d'incorporation des deutériums pour la protéine entière.

Les vitesses d'échange pour les différents ions fragments peuvent également être tracées (Fig. III. 15). Une autre manière simple (autre que celle discutée dans III.2.2.1.4) de s'assurer qu'il n'y a pas eu un réarrangement aléatoire total des deutériums le long de la chaîne peptidique est de vérifier que les pourcentages de deutération observés pour les ions fragments *c* et *z* de même taille ne sont pas identiques. En effet, deux cinétiques d'échange identiques pour des ions fragments *c* et *z*, comportant le même nombre d'hydrogènes échangeables, seraient la signature d'une redistribution aléatoire totale des deutériums ayant eu lieu avant la formation de ces ions.

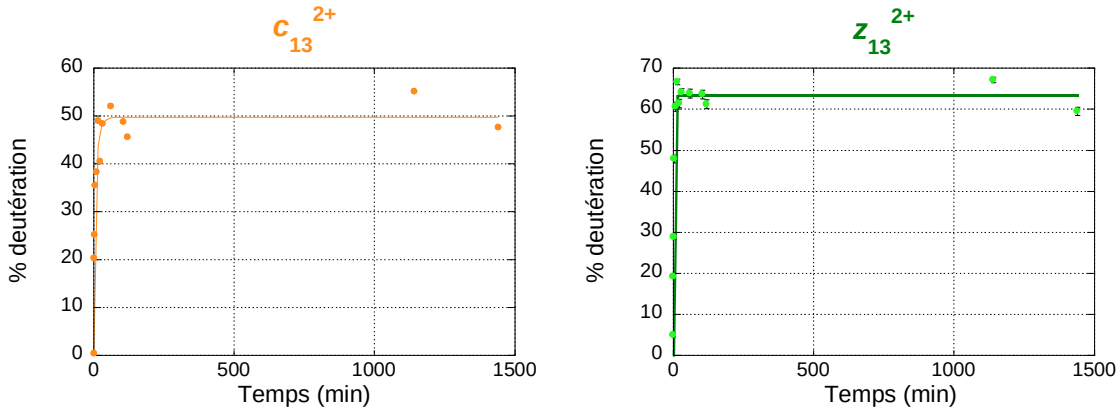


Fig. III. 15 Cinétique d'incorporation des deutériums pour les ions fragments c_{13} et z_{13} dichargés.

Nous avons donc généré un important jeu de données par la réalisation d'une cinétique d'échange H/D combinée à une fragmentation par ECD. Nous avons montré que notre approche permettait de limiter la redistribution aléatoire des deutériums le long de la chaîne peptidique en phase gazeuse, et d'obtenir des informations de structure sur une grande partie de la protéine. Néanmoins la comparaison de nos résultats de HDX avec les données obtenues par cristallographie montre des différences que l'on peut peut-être expliquer par le fait que les données de cristallographie sont issues du complexe (*16*). La protéine adopterait une conformation particulière (en hélice et feuillets) lorsqu'elle serait en interaction avec la sous-unité γ afin de stabiliser la formation du complexe tandis qu'en absence de son partenaire protéique, elle resterait déstructurée. Une analyse du sous-complexe aIF2α3/γ permettra de confirmer cette hypothèse.

En conclusion, nos résultats sont encourageants mais ils doivent également être améliorés pour que nous puissions obtenir des cinétiques d'échange H/D par acide aminé pour une grande partie de la protéine qui nous permettraient de distinguer très nettement des zones structurées de segments désordonnés.

III.2.2.2. **Analyse du sous-complexe aIF2α3/γ**

III.2.2.2.1. ***Optimisation du protocole d'analyse***

La première étape a consisté à optimiser les paramètres de source et la concentration de l'échantillon protéique afin d'obtenir une bonne intensité du signal sur l'APEX-Qe. Alors que la protéine aIF2α3 a été analysée à la concentration de 5,7 µM, une concentration de 7,4 µM après « quench » et dénaturation a été nécessaire à l'obtention d'un spectre de masse aussi intense que celui qui avait été obtenu pour la protéine seule. De plus, nous avons réglé l'instrument pour maximiser l'observation de la sous-unité α3, en particulier via les réglages du quadripôle de l'instrument, car nous avions déjà un jeu de données sur cette protéine. Le spectre de masse d'aIF2α3 en complexe avec γ ainsi obtenu est donné dans la Fig. III. 16.

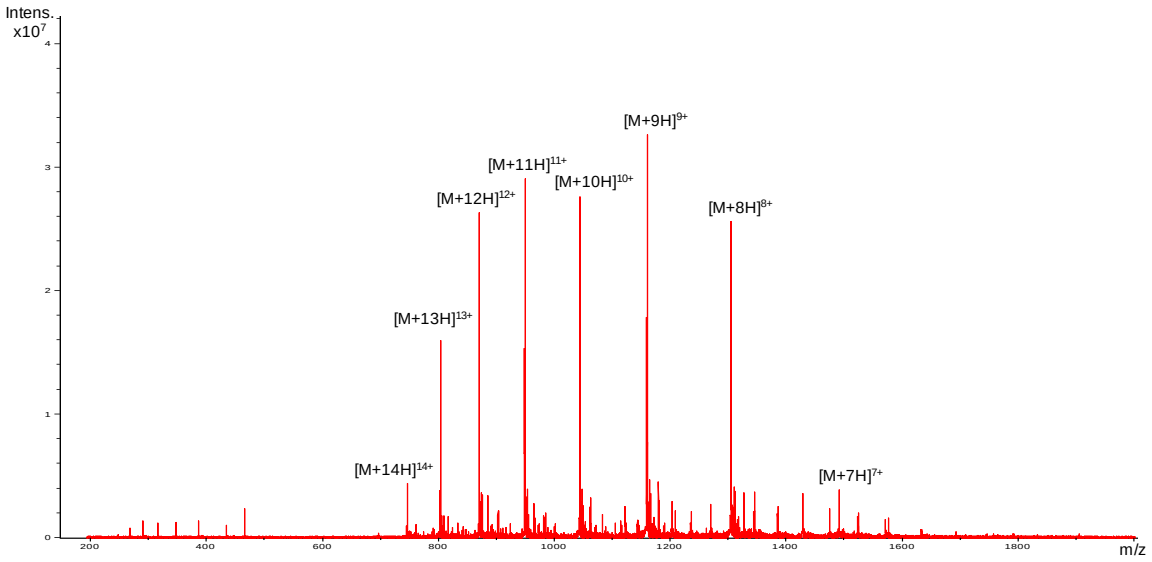


Fig. III. 16 Spectre MS d'aIF2α3 en complexe avec γ avant échange HDX obtenu sur l'APEX-Qe avec maximisation de l'intensité de la sous-unité α3.

Dans une deuxième étape, les paramètres ECD ont été optimisés pour obtenir la plus grande couverture de séquence possible pour la sous-unité α3 en complexe avec γ avant l'ajout de l'étape d'échange H/D. Le meilleur pourcentage de couverture de séquence obtenu a été d'environ 40% avec les paramètres suivants : une cathode à 1,8 A et une irradiation par des électrons de 1 eV d'énergie cinétique pendant 35 ms. Le spectre ECD correspondant est donné dans la *Fig. III. 17*.

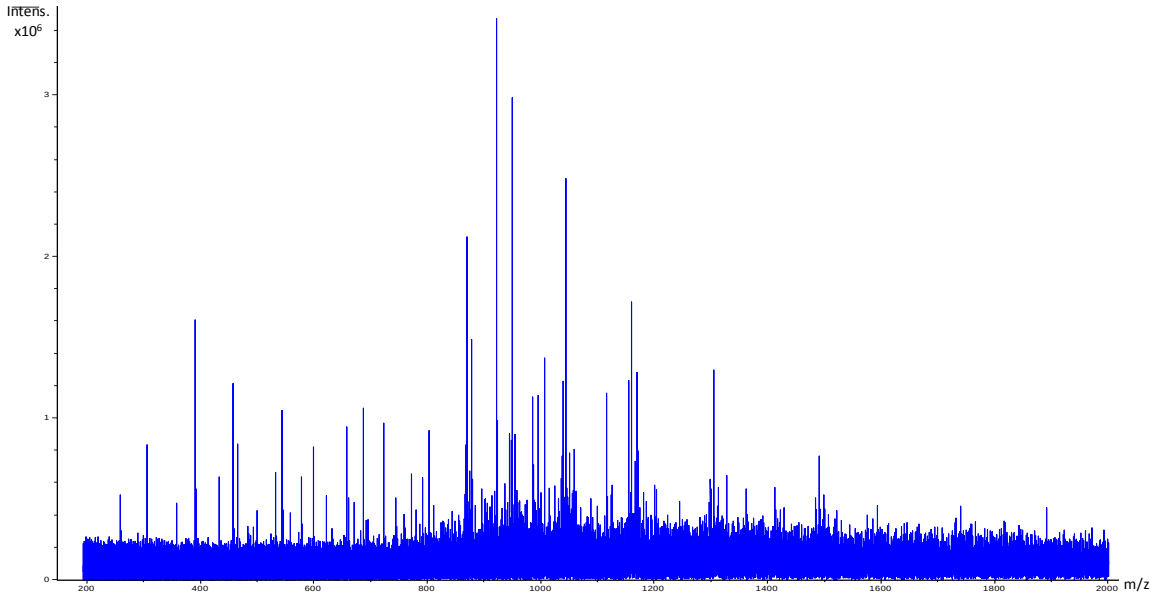


Fig. III. 17 Spectre ECD d'aIF2α3 en complexe avec γ avant échange H/D enregistré sur l'APEX-Qe.

Finalement, le complexe a été analysé par HDX/ECD. Le protocole de marquage du complexe aIF2α3/γ est identique à celui utilisé pour la protéine α3 seule. Le principe est rappelé dans la Fig. III. 18. La fragmentation ECD est réalisée sur la sous-unité α3 après différents temps d'incubation du complexe α3/γ dans D_2O.

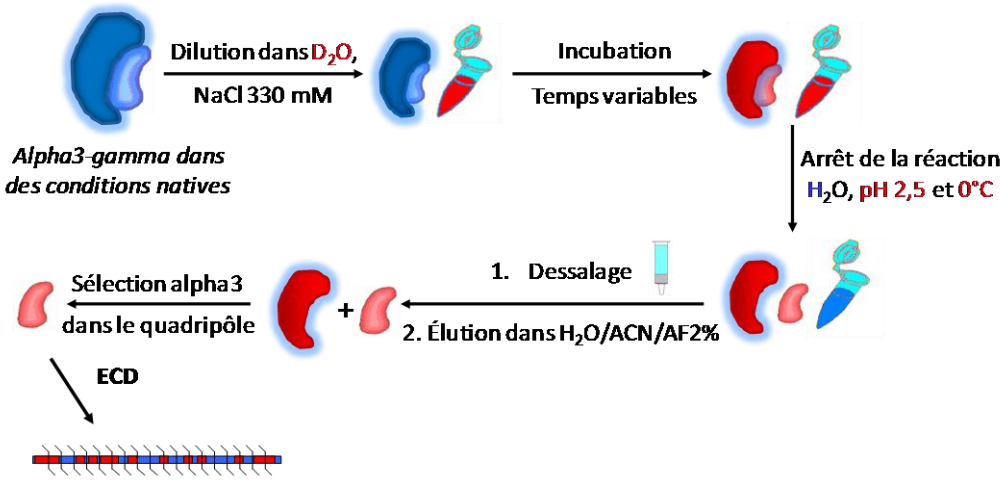


Fig. III. 18 Schéma de notre protocole optimisé pour l'étude de la sous-unité alpha3 en complexe avec gamma (aIF2α3/γ) en HDX/MS par analyse « top-down » ECD.

III.2.2.2.2. ***Résultats obtenus en HDX/ECD***

L'incorporation des deutériums dans la protéine aIF2α3 en complexe avec γ a été suivie au cours du temps et comparée à celle qui avait été obtenue pour la sous-unité α3 seule (Fig. III. 19). Les deux courbes de cinétique d'échange H/D présentent la même allure. Néanmoins, une différence notable au niveau du taux maximal de deutération, a été mise en évidence après association de la protéine. En effet, lorsque la protéine a été complexée la valeur maximale atteinte a diminué d'environ 20%, passant de 66% (pour la protéine seule) à 48% (pour la protéine en complexe). Ce résultat est encourageant dans la mesure où l'on attend une baisse de la deutération pour α3 après son association avec γ. En effet, une diminution des vitesses d'échange H/D est attendue dans la zone d'interaction des deux sous-unités.

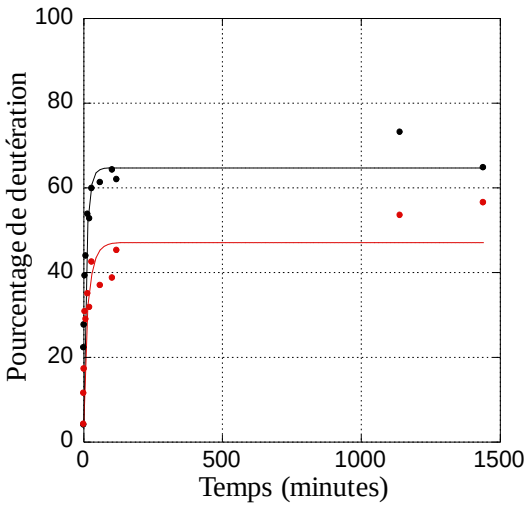


Fig. III. 19 Cinétiques d'incorporation des deutériums pour la sous-unité alpha3 seule (aIF2α3, courbe en noir) et en complexe avec gamma (aIF2α3/γ, courbe en rouge).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux différences locales d'incorporation des deutériums pour la protéine en complexe que nous avons comparées à celles qui avaient été obtenues pour la protéine seule (Fig. III. 12) afin de déterminer la surface d'interaction. Pour cela, nous avons représenté, comme nous l'avions fait pour la protéine seule (III.2.2.1.4), le nombre de deutériums incorporés par fragments en fonction du numéro de résidu correspondant ainsi que le nombre de deutériums par acide aminé calculé à partir des ions des deux séries *c* et *z*. Les résultats sont présentés dans les Fig. III. 20 et Fig. III. 21.

Ainsi, nous avons pu constater que nous n'avions toujours pas de redistribution aléatoire totale des deutériums avant fragmentation par ECD car l'incorporation des deutériums le long de la séquence ne suit pas la moyenne statistique (Fig. III. 20).

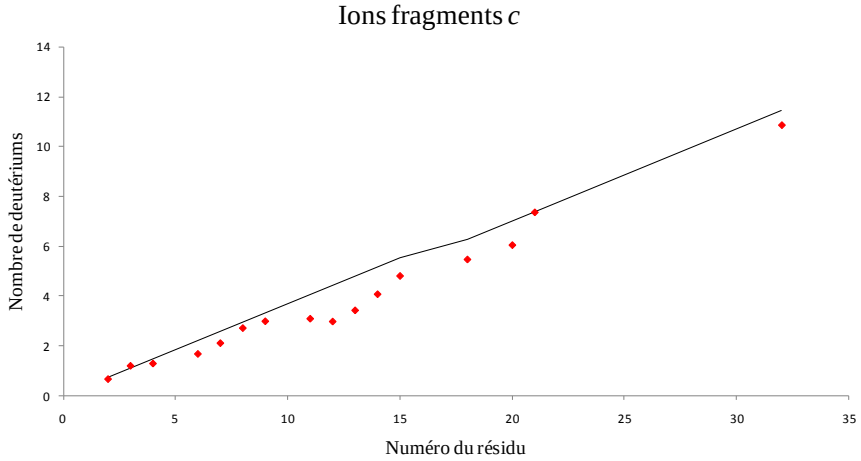


Fig. III. 20 Représentation du nombre total de deutériums incorporés par chaque ion c issu de la fragmentation ECD d'aIF2α3, en fonction de son numéro de résidu, après une heure d'incubation du complexe aIF2α3/γ dans D_2O.

De plus, en comparant le nombre de deutériums incorporés par acide aminé pour α3 seule et α3 en complexe avec γ, on a pu mettre en évidence des zones de la protéine qui échangeaient moins rapidement (flèches descendantes, Fig. III. 21) dans le cas de l'association des sous-unités. Les graphes montrent également des segments peptidiques qui ont un taux d'échange plus important (flèches ascendantes) ou similaire (signes *égal*) dans la protéine en complexe par rapport à la protéine seule.

Nous avons ensuite représenté les différences de deutération obtenues par résidu ou segment peptidique entre la protéine α3 seule et en complexe avec γ (déterminées à partir de Fig. III. 21) sur la structure tridimensionnelle de la protéine (Fig. III. 22) afin d'émettre des hypothèses quant à la manière dont les sous-unités se lient entre elles. Les résultats montrent que l'ensemble de la protéine semble voir la vitesse d'échange des hydrogènes d'amide modifiée dans le complexe et qu'il n'est pas possible de localiser précisément de surface d'interaction. On notera en particulier que la réduction de vitesse d'échange aurait pu donner la zone de contact par une baisse d'accessibilité, mais que la réduction de la vitesse d'échange peut aussi être liée à des changements conformationnels ou à des variations de la dynamique de la sous-unité α3 en complexe avec γ.

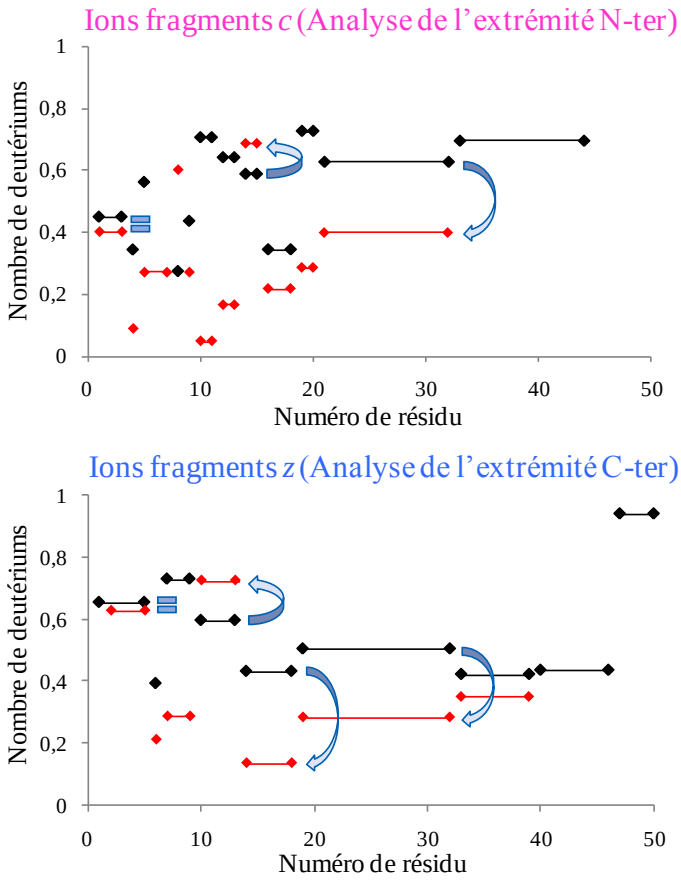


Fig. III. 21 Représentation du nombre de deutériums incorporés par acide aminé pour les séries d'ions c et z après une heure d'incubation dans D_2O. Les résultats obtenus pour la sous-unité alpha3 seule (aIF2α3, points en noir) sont comparés à ceux de la sous-unité alpha3 en complexe avec gamma (aIF2α3/γ, points en rouge).

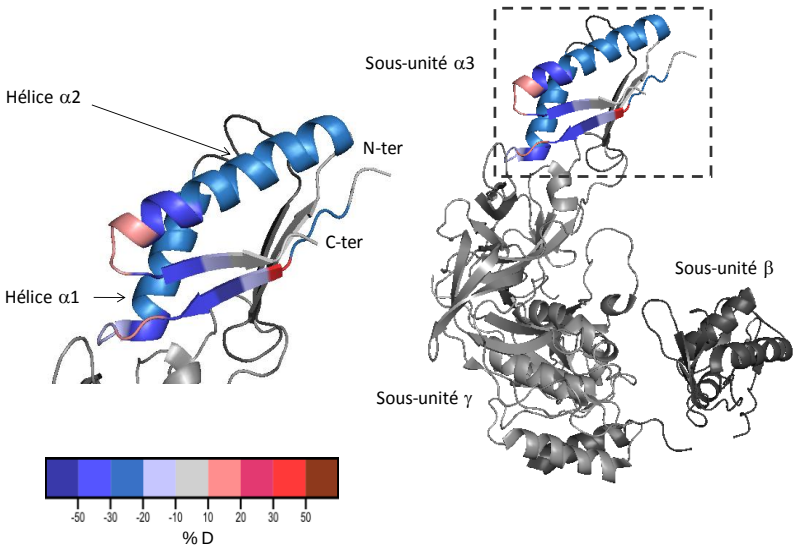


Fig. III. 22 Structure tridimensionnelle du complexe aIF2αβγ de S. solfataricus obtenu par cristallographie (16). Zoom sur la sous-unité α3 sur laquelle ont été reportées les différences de deutération entre la protéine seule et en complexe.

Nous avons ensuite voulu comparer l'ETD à l'ECD en termes de sensibilité, rapidité et efficacité de fragmentation avec pour objectif de gagner en résolution spatiale. Pour cela, nous avons fragmenté en ETD la protéine aIF2α3 et comparé ces résultats à ceux obtenus auparavant en ECD.

III.2.3. Fragmentation par ETD

III.2.3.1. **Spectre de masse**

Comme indiqué précédemment, ces expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un instrument de type Orbitrap (Fig. III. 23). Le spectre de masse d'aIF2α3 a été obtenu après infusion directe via le système de seringue refroidie de la protéine à la concentration de 5,7 µM et après son ionisation électrospray dans des conditions dénaturantes.

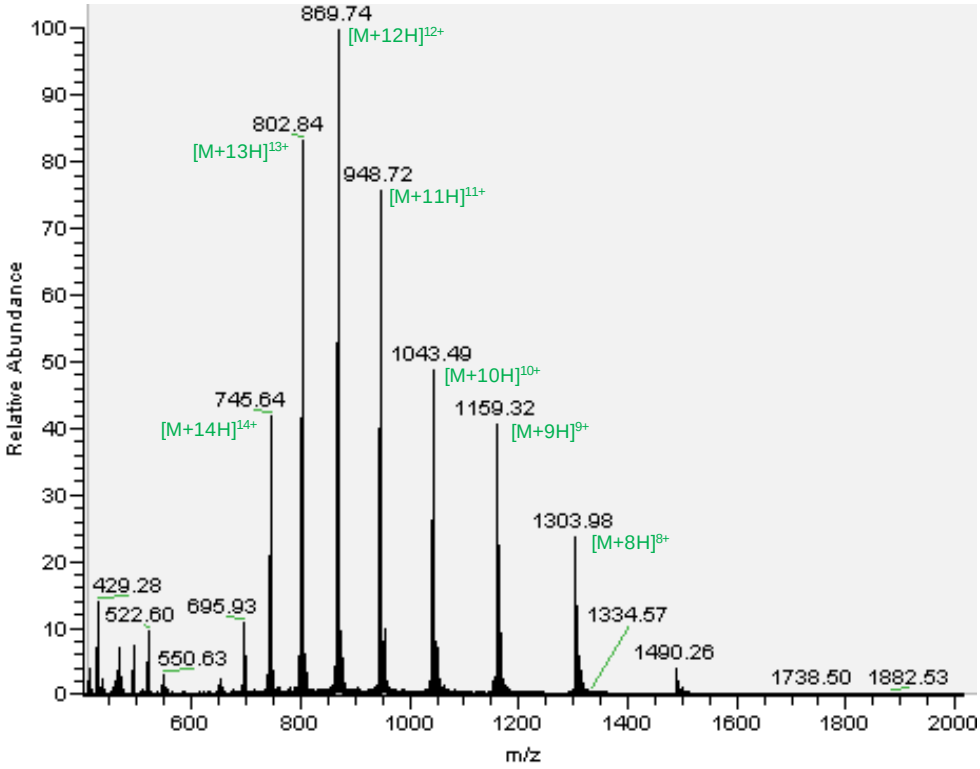


Fig. III. 23 Spectre MS d'aIF2α3 obtenu sur un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos après ionisation électrospray dans des conditions dénaturantes.

III.2.3.2. **Résultats obtenus en ETD**

Nous avons observé le même phénomène en ETD qu'en ECD : la couverture de séquence obtenue après sélection d'un état de charge particulier est moins bonne que celle obtenue sans sélection. Le problème est que si on peut travailler sans sélection sur le FT-ICR, ce n'est pas le cas pour l'Orbitrap. Nous avons également constaté que, comme en ECD, le nombre d'ions fragments détecté était lié à l'état de charge sélectionné de la protéine, même si une meilleure couverture de séquence est obtenue sans sélection. Il est classiquement observé que plus l'état de charge sélectionné est important, meilleure est la fragmentation. En ETD, comme en ECD, nous avons observé que la fragmentation était meilleure lorsqu'un état de charge pair était sélectionné et qu'elle était toujours moins bonne pour les états de charge impairs. Nous avons donc décidé de fragmenter en ETD deux états de charge pairs de la protéine correspondant à l'état de charge pair le plus élevé et à celui le plus intense. Dans notre cas, les états de charge 14+ et 12+ ont été sélectionnés (Fig. III. 23) pour être ensuite fragmentés (Fig. III. 24).

L'étude des résultats de fragmentation de l'ion précurseur d'état de charge 12+ a permis l'identification de 51 ions fragments correspondant à 29 ions *c* et 22 ions *z* dont deux paires d'ions complémentaires. Le pourcentage de couverture de séquence obtenu a donc été de 53,3% (Fig. III. 24, (a)). L'analyse du spectre ETD de l'ion précurseur d'état de charge 14+ a, quant à elle, révélé la présence de 61 ions fragments correspondant à 31 ions *c* et 30 ions *z* dont aucune paire d'ions complémentaires. Une meilleure couverture de séquence avec un pourcentage de 66,3%, a ainsi été obtenue (Fig. III. 24, (b)). Afin d'optimiser le pourcentage de couverture de séquence de la protéine, trois temps d'activation (10, 15 et 25 ms) d'une minute chacun ont été testés consécutivement. Il est apparu que la combinaison de tous les scans enregistrés pendant ces trois minutes de fragmentation ETD a permis d'obtenir le meilleur résultat de recouvrement de séquence. L'option « supplemental activation » a été utilisée. Sur la base de ces résultats, nous avons donc choisi de fragmenter l'état de charge 14+ après échange avec ces trois temps d'activation.

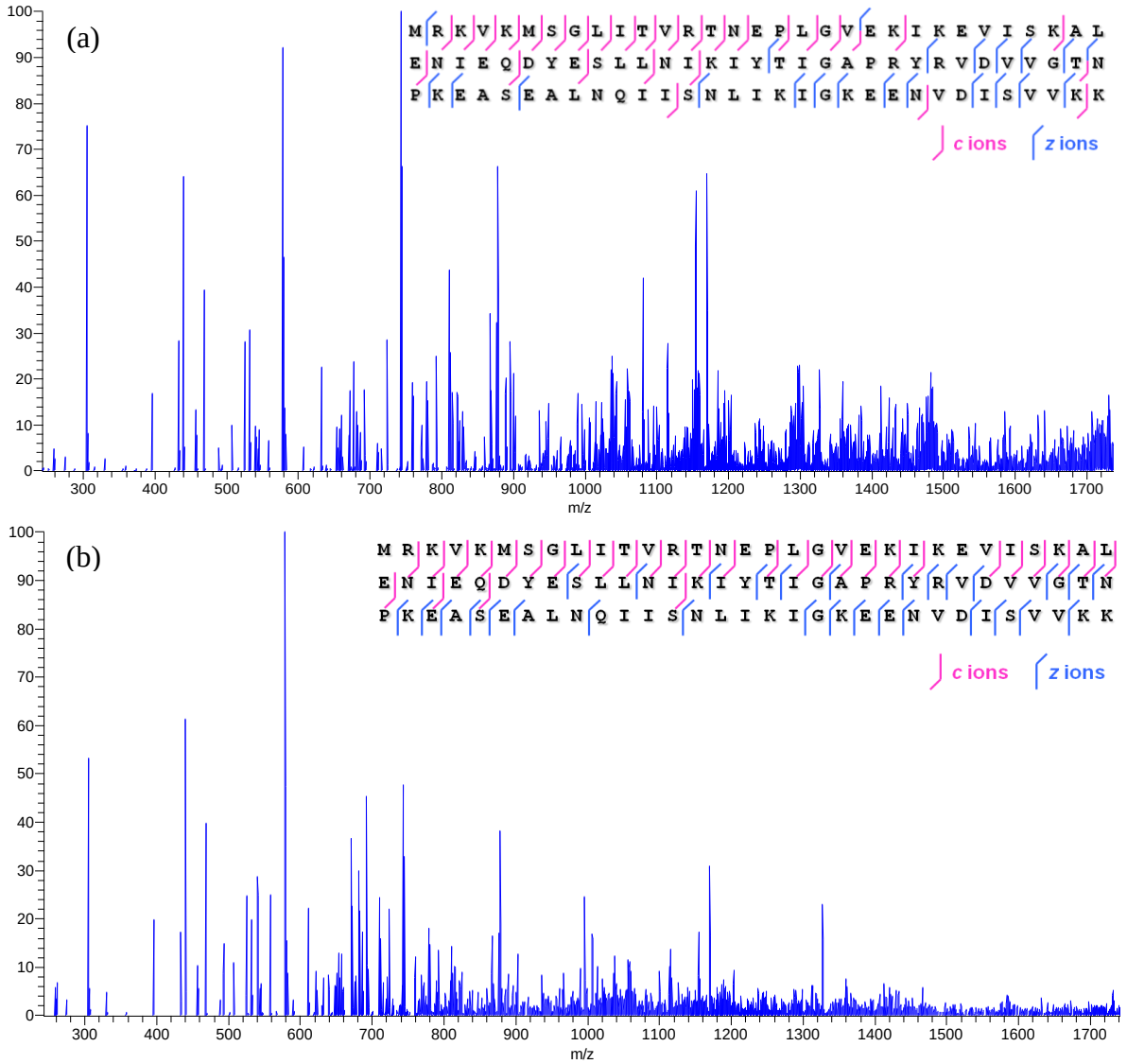


Fig. III. 24 Spectre ETD de la sous-unité aIF2α3 seule sans échange H/D avec sélection de l'état de charge 12+ (a) et 14+ (b) et leur couverture de séquence associée.

III.2.3.3. **Résultats en HDX/ETD**

L'étape suivante a consisté à combiner les échanges H/D et la fragmentation par ETD. De la même manière qu'en ECD, nous avons procédé au marquage d'aIF2α3 pendant un temps d'incubation dans D_2O d'une heure.

L'analyse du spectre ETD de l'ion précurseur d'état de charge 14+ révèle également après échange H/D une diminution du pourcentage de la couverture de séquence à 53,3% (Fig. III. 25) au lieu de 66,3%. Nous avons identifié au total 49 ions fragments correspondant à 25 ions *c* et 24 ions *z* dont aucune paire d'ions complémentaires.

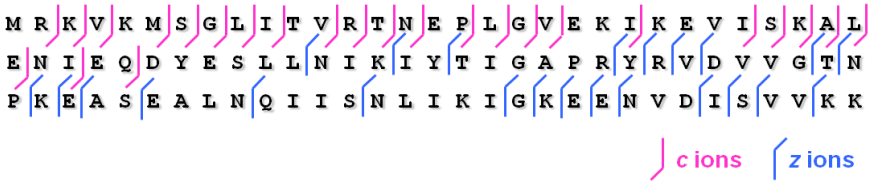


Fig. III. 25 Couverture de séquence d'aIF2α3 après échange H/D suivi d'une fragmentation par ETD de l'état de charge 14+.

Le nombre de fragments identifiés dans les spectres ETD est légèrement plus important que celui obtenu par ECD. En revanche, après échange H/D, en ETD comme en ECD, une importante perte de sensibilité est observée réduisant considérablement le pourcentage de couverture de séquence (Fig. III. 26). Comme nous l'avons vu précédemment pour l'ECD, une des améliorations à ce problème serait d'augmenter la durée d'analyse pour pouvoir accumuler (ou combiner en ETD) un plus grand nombre de scans MS/MS afin de faire sortir les "petits" pics du bruit de fond. Là où en ECD, nous avions utilisé la totalité des dix minutes d'analyse autorisées avec le système de seringue refroidie avant que le « back-exchange » devienne un problème majeur, en ETD, en revanche, seulement trois minutes de fragmentation ont été réalisées. Ces expériences HDX étant préliminaires, il conviendra par la suite de profiter des dix minutes que nous disposons avec le système de seringue refroidie pour réaliser la fragmentation ETD.

Néanmoins ces résultats nous ont paru encourageants pour l'utilisation de l'ETD plutôt que l'ECD pour ces approches « top-down » HDX car l'ETD est disponible sur un nombre de spectromètres de masse bien plus important que l'ECD qui reste spécifique des FT-ICR.

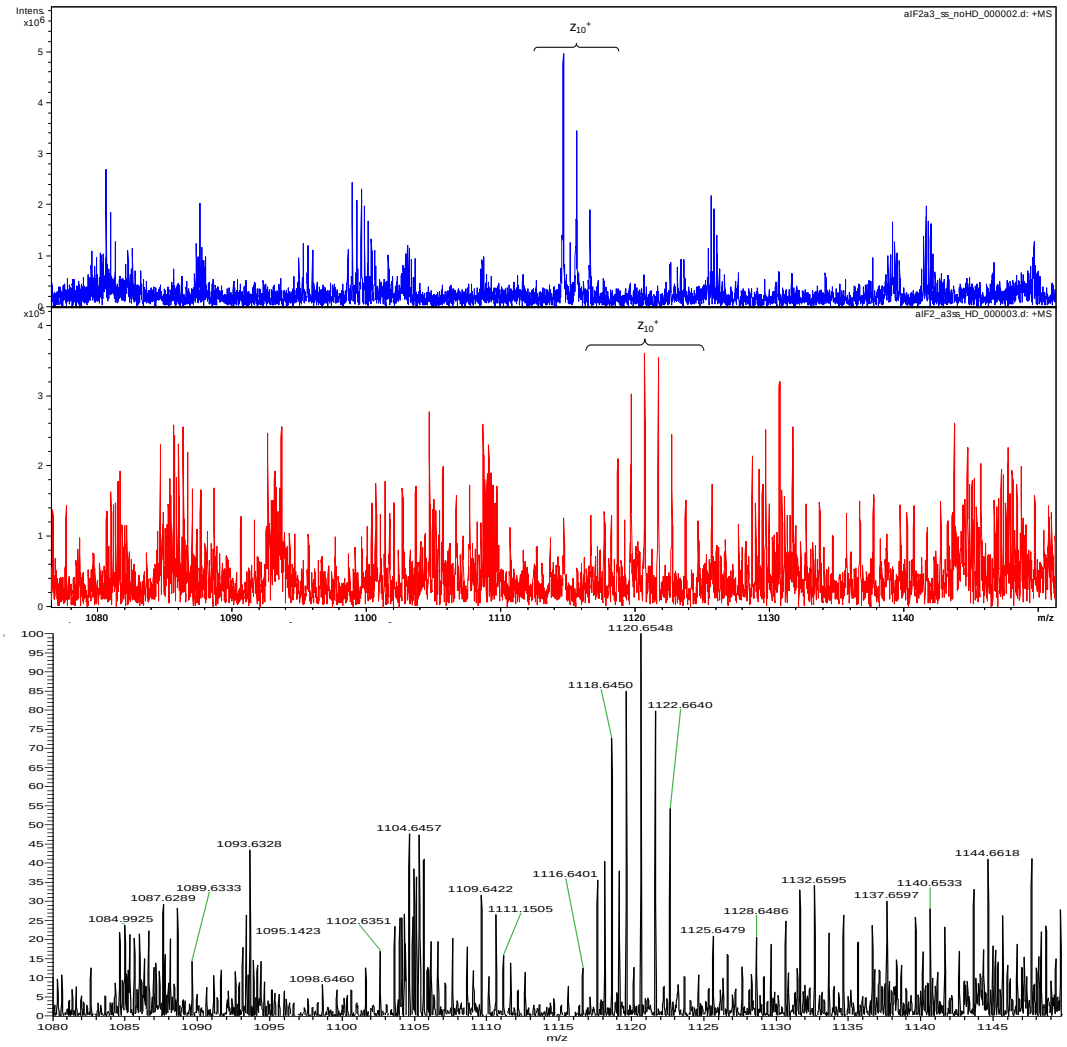


Fig. III. 26 Comparaison des spectres ECD (en rouge) et ETD (en noir) d'aIF2α3 après une heure d'incubation de la protéine dans D_2O. Agrandissements des régions du spectre m/z 1080-1150. En bleu, le spectre ECD de la protéine sans échange H/D.

III.2.3.4. **Analyse de données et comparaison avec les résultats d'ECD**

L'extraction des données est réalisée à partir du logiciel Xcalibur (Thermo Scientific). La fenêtre du logiciel peut être divisée en trois parties correspondant au chromatogramme, au spectre de masse et à la liste de pics associés (Fig. III. 27). Le spectre ETD de l'ion précurseur d'état de charge 14+ à été généré à partir du chromatogramme. Comme nous l'avons vu précédemment (III.2.3.2), il résulte de la combinaison des résultats obtenus pour trois temps d'activation (10, 15 et 25 ms) et correspond à une durée d'analyse d'environ trois minutes. Les résultats ETD peuvent également être présentés sous forme d'une liste de pics associant chaque rapport m/z d'un ion à son abondance relative dans le spectre.

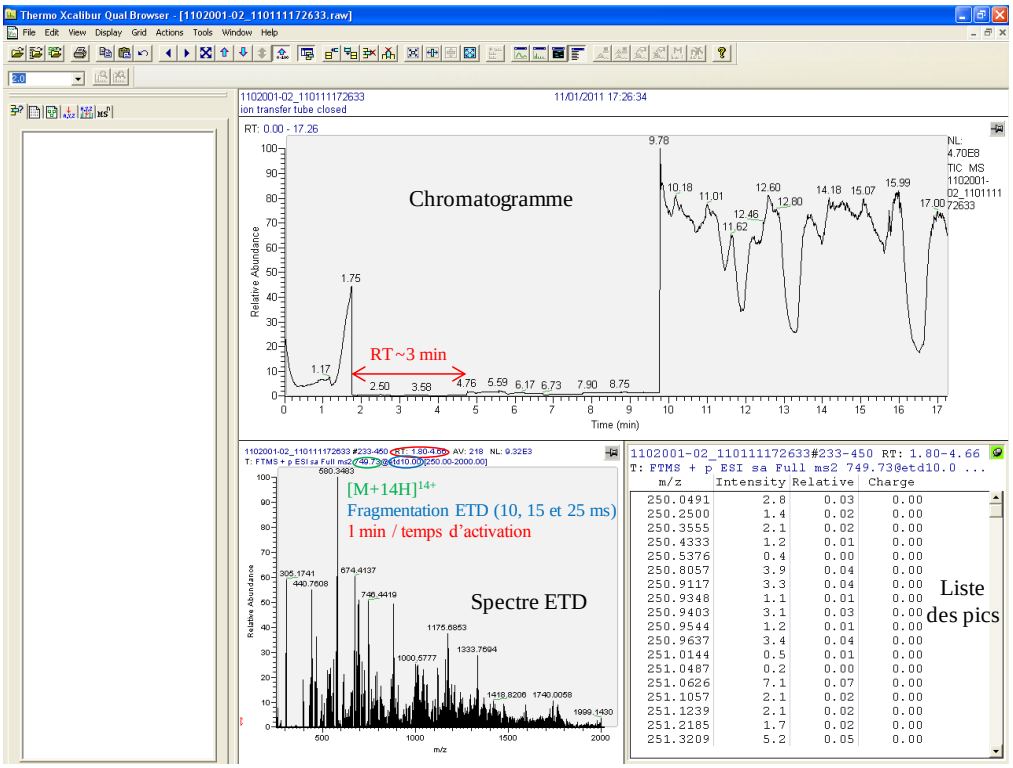


Fig. III. 27 Présentation de la fenêtre du logiciel Xcalibur pour le traitement des spectres ETD.

Les résultats ETD sont analysés de la même manière qu'en ECD. Les ions fragments sont identifiés dans les spectres sans échange et après échange. Leur masse moyenne pondérée est ensuite déterminée dans les deux conditions (sans échange et après échange). Le nombre de deutériums incorporés par chaque ion fragment est calculé en faisant la différence de ses deux masses moyennes pondérées et en multipliant le résultat par sa charge. Le nombre de deutériums incorporés par résidu est finalement déduit par soustraction du nombre de deutériums incorporés par deux ions fragments consécutifs. Dans le cas où les ions fragments ne sont pas consécutifs, cette différence de deutériums incorporés est moyennée sur l'ensemble des acides aminés les séparant. Les résultats ETD ont été comparés à ceux qui avaient été obtenus par ECD (Fig. III. 28).

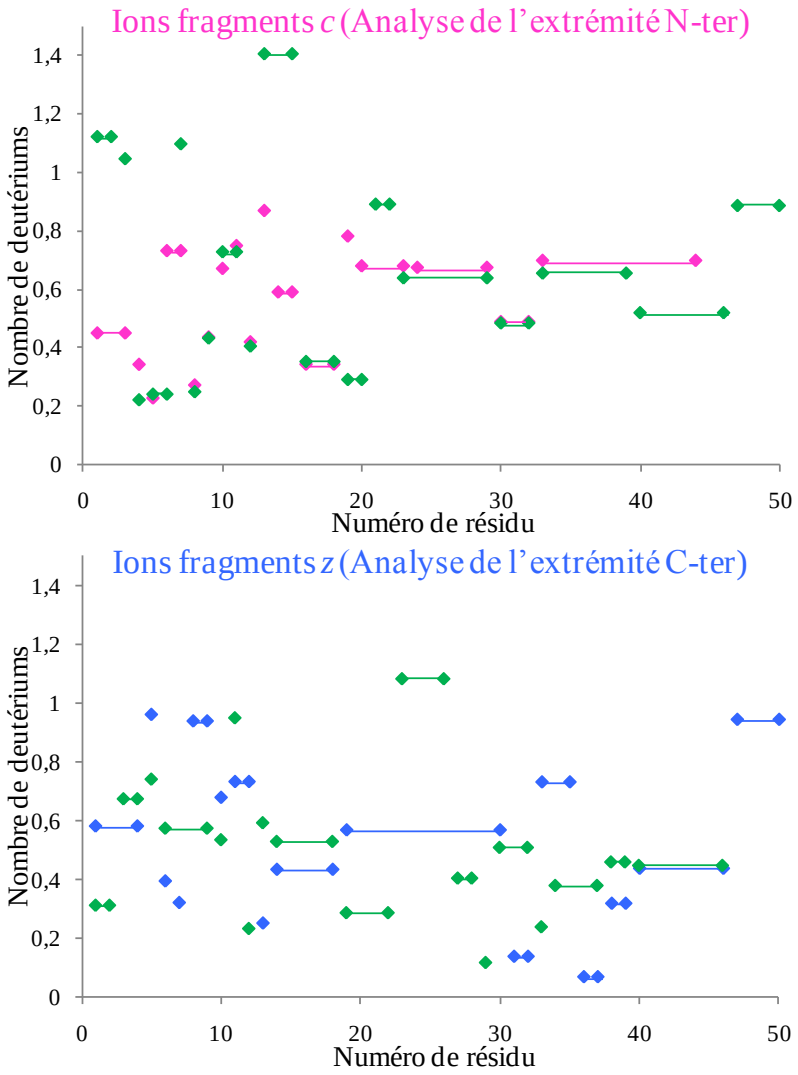


Fig. III. 28 Représentation du nombre de deutériums incorporés par acide aminé après une heure d'incubation dans D_2O. Les résultats obtenus en ETD (points en vert) sont comparés à ceux obtenus en ECD (points en rose et en bleu respectivement pour les séries d'ions c et z). Le taux de deutération de la protéine entière est de 66% en ECD contre 60% en ETD.

Le premier constat à l'issue de l'analyse des résultats ETD, a été l'obtention de nombres de deutériums incorporés supérieurs à la valeur maximale attendue (> 1) pour quelques résidus. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La première consiste à penser que le "lavage" des chaînes latérales n'a pas été total. Autrement dit, il resterait des deutériums au niveau des chaînes latérales des acides aminés, qui n'auraient pas été ré-échangés avant l'analyse. Cependant, nous avons utilisé le même protocole de marquage et le même système d'introduction des échantillons pour l'analyse des échanges isotopiques par ETD par rapport à celle qui avait été réalisée en ECD. Or, de telles valeurs n'ont pas été obtenues en ECD. Notons ici que dans le cas de l'analyse des ions *z*, les zones pour lesquelles on obtient des valeurs anormales en ETD correspondent à des régions de la protéine pour lesquelles très peu

d'informations en ECD avaient été extraites (incorporation moyenne de deutériums sur une dizaine d'acides aminés). La seconde hypothèse repose sur le fait qu'en ETD certains ions fragments suivis après échange H/D n'auraient pas été correctement attribués. Des expériences de MS/MS sur ces ions fragments (expériences de MS^3) permettraient de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Des essais ont été réalisés mais n'ont malheureusement pas été concluants. La faible intensité des fragments obtenus par MS^3 ne nous a pas permis d'identifier les ions fragments issus de la MS/MS. Un problème de fuite au niveau du montage de seringue refroidie en a été probablement la cause. Nous n'avons pas eu le temps de reproduire les expériences.

Néanmoins, on obtient une relativement bonne corrélation pour les ions fragments *c* si on compare les résultats ETD à ceux obtenus en ETD tandis que des différences notoires d'incorporation des deutériums par résidu pour les ions fragments *z* sont observées. Les graphes ne se superposent pas, à l'exception de petites zones qui s'alignent entre elles.

III.2.3.5. **Conclusion**

Contrairement aux analyses réalisées en ECD, les expériences ETD requièrent la sélection préalable d'un état de charge. Malgré cette "contrainte", une couverture de séquence légèrement meilleure a été obtenue en ETD (sans échange et après échange H/D). Elle a été déduite de la combinaison de spectres enregistrés pour trois temps d'activation différents (10, 15 et 25 ms) correspondant à trois minutes de fragmentation au total. Les spectres ECD résultent, quant à eux, de l'accumulation de scans correspondant à la dissociation de la protéine par un faisceau d'électrons d'énergie cinétique et de temps d'irradiation fixés, pendant dix minutes d'analyse.

Nous avons ensuite décidé de comparer la fragmentation CID sur des ions précurseurs de haut état de charge afin de limiter le « scrambling » (*10*) *vs.* les méthodes d'activation par les électrons (ECD et ETD).

III.2.4. Fragmentation par CID

III.2.4.1. **Analyse de la protéine aIF2α3**

III.2.4.1.1. ***Spectres de masse***

La protéine aIF2α3 a également été étudiée par une approche HDX « top-down » CID. La première étape a consisté à réaliser les spectres de masse sans échange et après échange H/D grâce à un instrument de type Q-ToF. La protéine deutérée a été injectée dans le spectromètre de masse par le système de seringue refroidie puis ionisée par électrospray dans des conditions dénaturantes. La faible résolution de l'instrument (Fig. III. 29) nous a ensuite obligés à vérifier les fenêtres d'isolation avant la fragmentation par CID. Finalement, les énergies de collision ont été optimisées pour chaque état de charge.

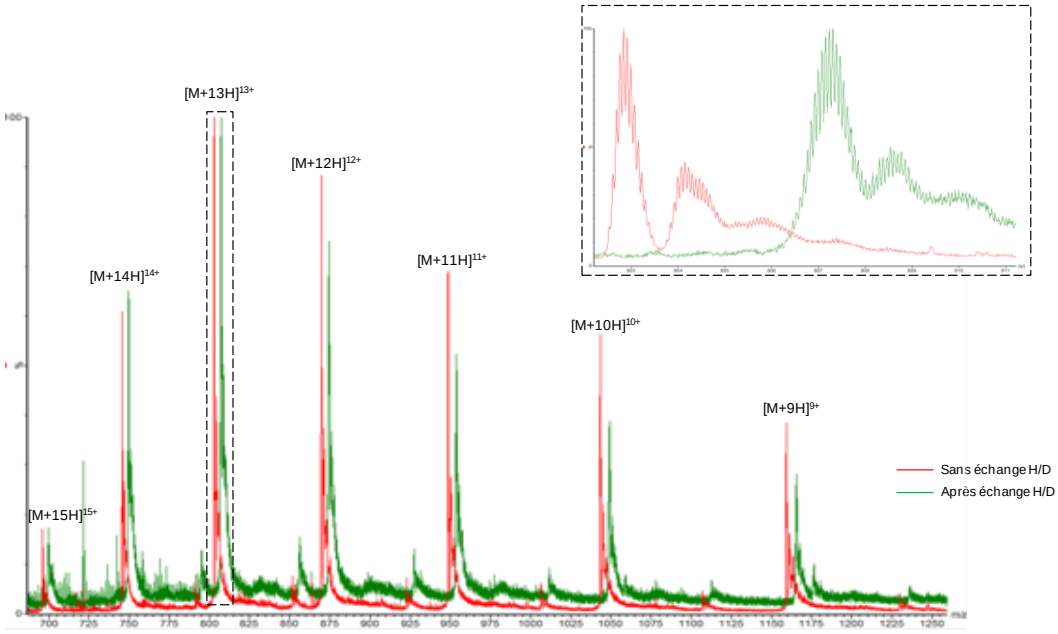


Fig. III. 29 Spectres MS d'aIF2α3 obtenus sans échange (courbe rouge) et après échange H/D pendant une heure (courbe verte) à l'aide d'un spectromètre de masse Q-ToF Premier. Un agrandissement de l'ion précurseur d'état de charge 13+ a été ajouté.

III.2.4.1.2. ***Résultats obtenus en HDX/CID***

L'analyse des spectres CID des ions précurseurs d'état de charge 10+ à 16+ de la protéine aIF2α3 dans H_2O, a permis l'identification d'un total de 54 ions fragments correspondant à 23 ions *b* et 31 ions *y* dont deux paires d'ions complémentaires. Le pourcentage de couverture de séquence obtenu a donc été de 56,5% (Fig. III. 30, (a)). Il regroupe l'ensemble de tous les ions fragments identifiés dans les spectres correspondant à la dissociation des différents états de charge. Après incubation de la protéine dans D_2O pendant une heure et fragmentation par CID, seulement 20 ions fragments au total ont pu être suivis correspondant à 14 ions *b* et 6 ions *y* dont aucune paire d'ions complémentaires. Le pourcentage de la couverture de séquence a ainsi été réduit à 21,7% après échange H/D (Fig. III. 30, (b)).

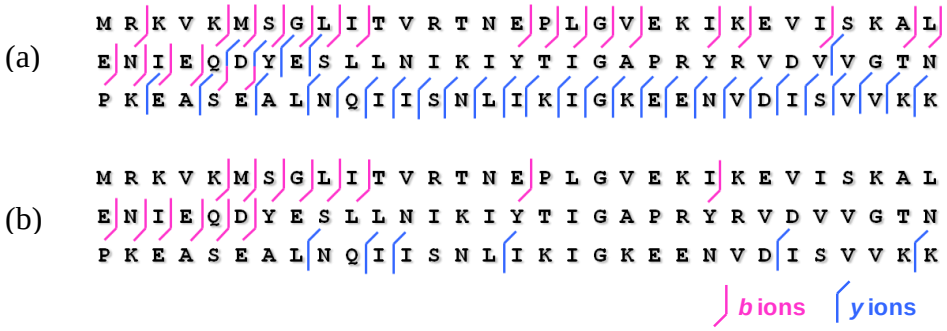


Fig. III. 30 Pourcentages de couverture de séquence d'aIF2α3 sans échange (a) et après échange H/D (b) obtenus par fragmentation CID des ions précurseurs d'état de charge 10+ à 16+.

La Fig. III. 31 illustre la complexité du traitement des données en CID. De la même manière qu'en ECD ou en ETD, l'analyse a consisté à déterminer des masses moyennes pondérées d'ions fragments. La résolution relativement faible de l'instrument ainsi que la faible abondance de certains ions fragments ont contribué à la diminution du nombre de fragments pouvant être suivis après échange H/D. Ainsi, le fragment b_{37}^{5+} a pu être interprété dans les spectres de fragmentation par CID des ions précurseurs 12+ à 16+ mais pas dans ceux des états de charge 10+ et 11+ (Fig. III. 31). D'autres (*e.g.* y_2^+, y_3^+, y_4^+, ...) n'ont pu être suivis dans aucun des spectres (Fig. III. 30).

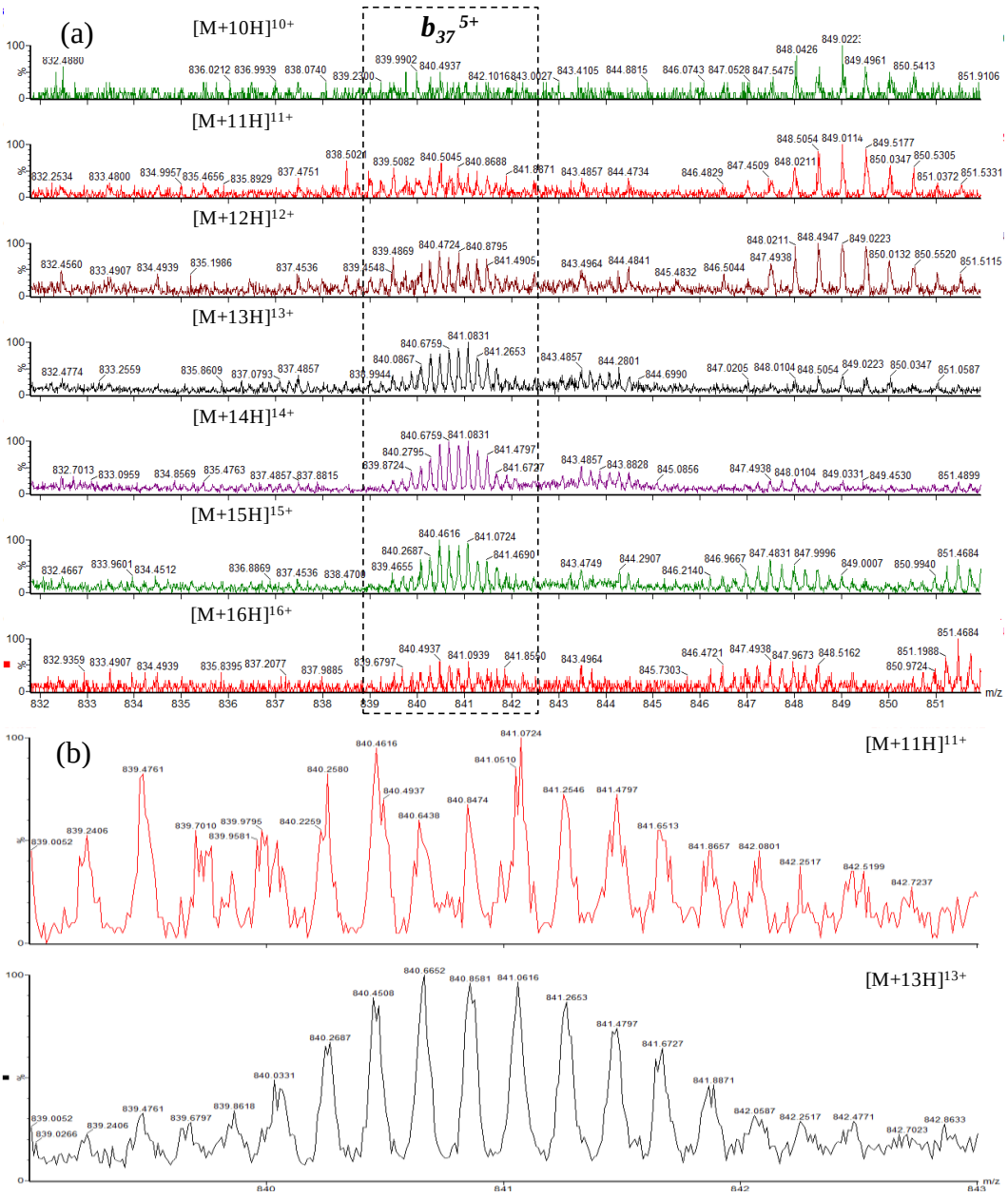


Fig. III. 31 Spectres CID des ions précurseurs d'état de charge 10+ à 16+. Agrandissement (a) de la région m/z 832-852 permettant de suivre le massif isotopique de l'ion fragment b_{37}^{5+} dans les différents états de charge et (b) du massif isotopique lui-même dans les états de charge 11+ et 13+ pour montrer la complexité de l'analyse.

Nous avons ensuite calculé le nombre de deutériums incorporés par les fragments qu'il nous était possible de suivre après échange H/D dans les spectres CID des différents états de charge. Nous avons reporté ces valeurs en fonction du numéro de résidu dans la séquence (Fig. III. 32). Rappelons que la ligne noire représente une redistribution statistique dans la séquence de tous les deutériums incorporés dans la protéine. Il s'agit donc d'une courbe théorique. Elle donne le nombre moyen de deutériums incorporés par chaque fragment, calculé à partir du contenu maximal en deutériums de la protéine. Dans le cas que nous présentons, qui correspond à un temps d'incubation d'une heure dans D_2O, la protéine intacte

était marquée à 57%. Chaque point de la ligne noire correspond donc à une incorporation de 0,57 deutérium par résidu.

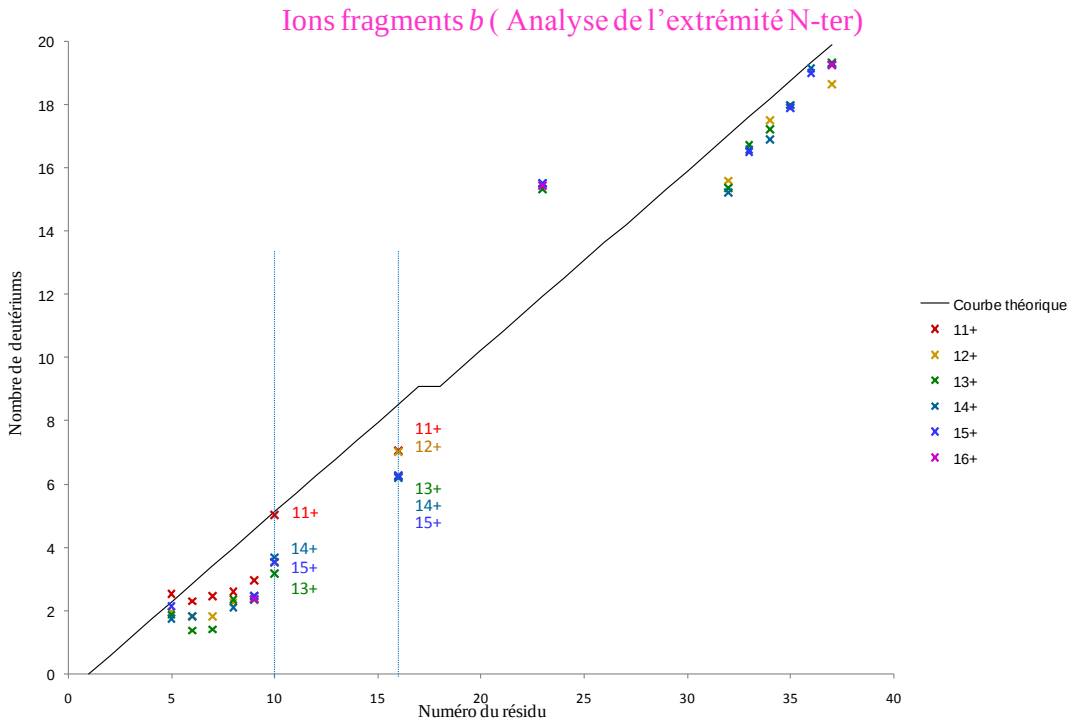


Fig. III. 32 Représentation du nombre total de deutériums incorporés par chaque ion fragment b issus de la dissociation de l'ion précurseur dans les états de charge 11+ à 16+, en fonction de son numéro de résidu. La protéine a été incubée pendant une heure dans D_2O avant analyse.

A la vue de ces résultats, on note que tous les points expérimentaux ne sont pas alignés sur la courbe théorique. Par conséquent, nous pouvons conclure de ce premier constat que nos expériences HDX/CID ne semblent pas aboutir à un réarrangement aléatoire total des deutériums le long de la chaîne peptidique. On remarque également que les points correspondant à la fragmentation du plus petit état de charge, le 11+ (points en rouge sur la Fig. III. 32), sont effectivement les plus proches de la redistribution totale des deutériums. Ainsi, il semble réellement y avoir un rapport entre le taux de redistribution H/D et l'état de charge du précurseur. Néanmoins, il est curieux d'observer que c'est l'ion chargé 13+ qui conduit aux ions fragments les plus éloignés de cette redistribution totale.

Nous avons ici voulu reproduire les expériences HDX/CID menées très récemment par l'équipe d'I. Kaltashov (*10*), sur notre système d'étude. Ils ont montré qu'il était possible d'analyser les échanges isotopiques H/D au sein des protéines par une approche « top-down » associée à une activation collisionnelle (CID). En effet, la sélection et la dissociation d'ions

protéiques de hauts états de charge limiteraient le phénomène de « scrambling ». Or, dans son article, I. Kaltashov n'a considéré qu'un seul fragment, le b_{19}, pour en arriver à cette conclusion. Il ne s'est donc intéressé qu'aux résultats contenus sur une "verticale" du graphe. Dans notre cas, si on se place au niveau des deux verticales que nous avons tracées sur la Fig. III. 32, nos résultats sont cohérents avec ceux de l'article. En revanche, la discrimination nette entre les grands et les petits états de charge n'est pas toujours évidente et parfois les résultats contredisent ceux obtenus par I. Kaltashov.

III.2.4.2. **Analyse de la protéine aIF2α3 avec une étiquette poly-histidines**

Pour rendre l'étude du phénomène de « scrambling » plus facile à mettre en évidence, l'article de I. Kaltashov (*10*) se basait sur l'utilisation d'une étiquette poly-histidines placée à l'extrémité soit N- soit C-terminale de la protéine qu'ils ont étudiée. L'intérêt était que ces segments sont connus comme étant non structurés et qu'on peut par conséquent prédire que la vitesse d'échange y sera maximale par rapport à la partie structurée de la protéine. Dans le cadre de leurs expériences, la protéine est initialement totalement marquée par des deutériums par dissolution dans du D_2O et l'incubation se fait en conditions natives après dilution dans un tampon H_2O, 10 mM acétate d'ammonium. De ce fait, on attend une perte rapide de la deutération sur l'extrémité poly-histidines des protéines. Ils observent ainsi (Fig. III. 33) que l'activation par CID conduit à un « scrambling » important pour les états de charge faibles (9+ à 11+) alors qu'il est nettement réduit pour les états de charge 14+ à 20+.

Nous avons souhaité construire un système équivalent pour notre protéine aIF2α3 afin de voir si nous aussi en CID pouvions mettre en évidence la présence de « scrambling » ou non. Pour cela, nous avons construit un mutant de la protéine aIF2α3 et l'avons exprimé en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie de l'École Polytechnique. La séquence de ce mutant est donnée sur la Fig. III. 34.

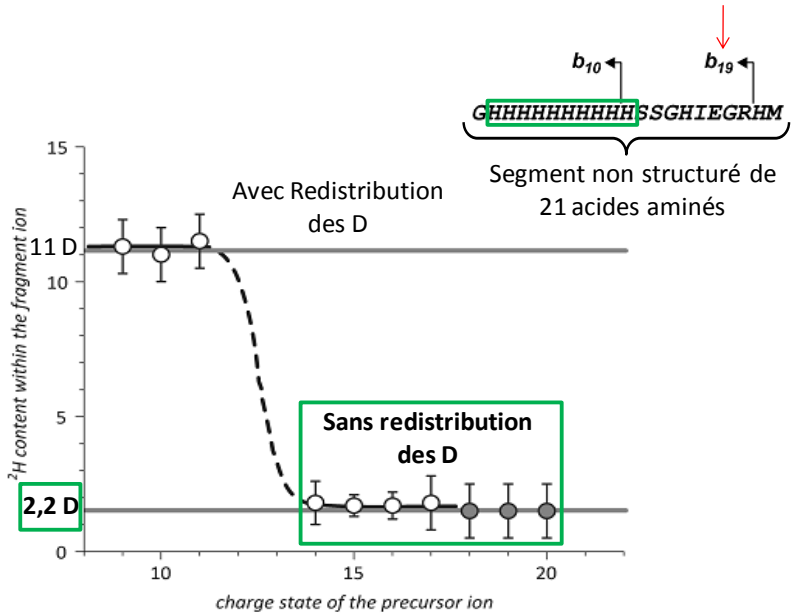


Fig. III. 33 Nombre moyen de deutériums pour le fragment b_{19} en fonction de l'état de charge de l'ion précurseur. Les lignes horizontales en gris indiquent le nombre moyen de deutériums calculé dans le cas d'une redistribution aléatoire totale des hydrogènes et deutériums labiles au sein de l'ion précurseur avant la dissociation (en haut) et dans le cas de l'absence de phénomène de « scrambling » (en bas).

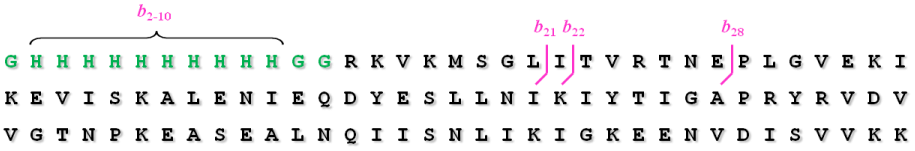


Fig. III. 34 Séquence d'aIF2α3 comportant l'étiquette poly-histidines (acides aminés en vert). En rose, les fragments étudiés par HDX/CID.

Notons dès maintenant qu'il nous était impossible de reproduire exactement l'expérience d'I. Kaltashov avec notre protéine : en effet, elle est instable dans des conditions non-salines et ne peut être lyophilisée. Par conséquent, il sera nécessaire de procéder par un double échange tel que fait jusqu'à présent, *i.e.* commencer par diluer la protéine dans une solution D_2O, NaCl 330 mM puis arrêter l'échange par une dilution ½ dans une solution H_2O, acide formique 2% avant de procéder au dessalage sur colonne. De ce fait, on ne profite plus de l'aspect déstructuré de la chaîne poly-histidines (qui sera rapidement deutérée dans l'étape d'échange) mais de la grande vitesse de ré-échange de la chaîne poly-histidines une fois celle-ci placée en condition d'arrêt, tel qu'observé sur les peptides de T. Jørgensen au Chap. II. On peut considérer que l'échange inverse (« back-exchange ») sera, de la même façon que pour le

peptide P1 (HHHHHHIIKIIK) nettement plus rapide sur la partie poly-histidines que sur le reste de la séquence protéique.

Nous avons ensuite étudié par HDX/CID les fragments $b_{2\text{-}10}$, correspondant aux fragments situés dans l'étiquette poly-histidines (en vert sur Fig. III. 34), ainsi que les fragments communs avec ceux de la protéine sans poly-histidines, soit les fragments $b_{21\text{-}22}$ et b_{28}, correspondant aux fragments $b_{9\text{-}10}$ et b_{16} de la protéine sans étiquette poly-histidines. Les résultats obtenus sont présentés dans la Fig. III. 35. Ils sont comparés à ceux de la Fig. III. 32.

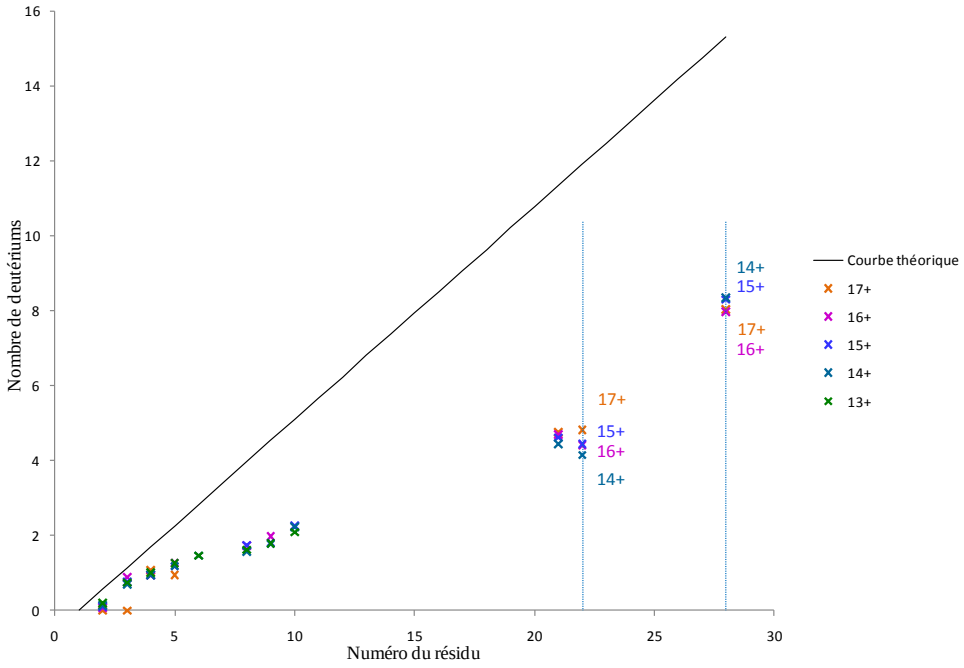


Fig. III. 35 Représentation du nombre total de deutériums contenus dans les ions b issus de la fragmentation de l'ion précurseur dans les états de charge 13+ à 17+, en fonction de leur position dans la séquence (numéro de résidu). La protéine « taggée » a été incubée pendant une heure dans D_2O. Son analyse en MS révèle un pourcentage de deutération de 57%.

On constate tout d'abord que les fragments b_2 à b_{10} présentent un taux de deutération largement inférieur (jusqu'à 2 D d'écart pour b_{10}) à la courbe de « scrambling » complet. Ceci montre deux choses. Le premier résultat est que le « scrambling » est très loin d'être total sur cette région. Par conséquent, même en cas de « scrambling » partiel, ce résultat ne peut être obtenu que si la deutération locale est très inférieure à la moyenne sur l'ensemble de la protéine. On peut donc en déduire ce second résultat : comme nous l'avions espéré, un « back-exchange » rapide des hydrogènes d'amide des histidines a bien eu lieu. On ne peut pas, par contre, savoir si ce « back-exchange » a été total ou pas. On note par ailleurs que dans cette

partie de la protéine, l'état de charge ne semble pas jouer un rôle important sur la deutération, nettement moins en tout cas que les effets observés pour la protéine sans étiquette.

Si on s'intéresse maintenant aux fragments b_{21-22} et b_{28}, on constate une dispersion des niveaux de deutération nettement réduite par rapport à celle de la protéine non-marquée et en tout cas sans aucune rupture brutale similaire à celle présentée dans l'article d'I Kaltashov. Il est par contre difficile de comparer un à un les niveaux de deutération car on ne connaît pas *a priori* le niveau de deutération restant sur la partie poly-histidines. Toutefois on notera qu'entre les fragments b_{22} et b_{28} de la protéine portant un His-tag on a 3,5 D de différence. On retrouve une différence similaire entre les fragments b_{10} et b_{16} de la protéine portant un His-tag.

Pour compléter ce travail, il nous manque un élément qui est la vérification du taux réel de deutération sur la partie poly-histidines. Ce travail reste à faire avec un suivi par ECD, en faisant l'hypothèse d'une absence de « scrambling » dans ce cas.

Mais au final une tendance nette semble néanmoins se dégager : dans une approche « top-down », l'activation par CID ne conduit pas nécessairement à un « scrambling » total des deutériums d'amide, au moins dans certaines conditions. L'article d'I. Kaltashov semble avoir identifié l'état de charge comme étant un facteur. Dans notre cas, l'état de charge ne semble pas jouer un rôle aussi marqué. Mais il faut noter d'une part que l'article d'I. Kaltashov comme notre approche avec le His-tag n'ont regardé le « scrambling » qu'au niveau des extrémités de la protéine et d'autre part que dans les deux cas, un « scrambling » partiel semble observé, puisqu'il reste une fraction de deutériums au niveau de l'extrémité.

III.3. Détermination du taux maximal de deutération : mise en évidence du phénomène d'échange inverse

Les expériences sont difficilement reproductibles par une même technique ce qui complique la comparaison entre les différentes méthodes. Plusieurs raisons permettent d'expliquer ce fait. Tout d'abord, il est très difficile d'obtenir le même pourcentage initial de deutération pour la protéine entière. De plus, l'efficacité de fragmentation varie en fonction du de l'instrument mais aussi en fonction du temps pour un même instrument. N'oublions pas de mentionner également les problèmes techniques que nous avons rencontrés qui sont liés au

montage de seringue refroidie et qui concernent la fuite du système. Un autre fait surprenant est que nous ne sommes pas parvenus, après des temps longs d'incubation dans D_2O, à un maximum de deutération pour la protéine entière proche des 90-95% décrits dans la littérature. En effet, le taux maximal de deutération obtenu pour aIF2α3, si on se réfère au « fit » de double exponentielle de sa cinétique d'incorporation des deutériums (Fig. III. 14), a été de 66% seulement. A partir de ce constat, deux hypothèses peuvent être formulées :

- nous ne sommes pas arrivés au bout de la cinétique d'échange de la protéine. Dans ce cas, des temps d'incubation dans D_2O plus longs seraient nécessaires pour que les hydrogènes d'amide qui présentent des vitesses d'échange très lentes finissent par s'échanger ! Le « fit » de la cinétique serait alors à revoir.
- d'importantes pertes de deutériums sont enregistrées, ce qui n'est pas souhaitable et pose le problème de l'interprétation des résultats.

Afin de départager ces deux hypothèses et ainsi de mieux comprendre le sens de nos résultats, nous avons décidé de déterminer la valeur maximale de référence, *i.e.* le taux maximal de deutération pour la protéine aIF2α3. Pour cela, la protéine a été analysée avec le même protocole qui a été décrit dans la Fig. III. 5, à l'exception près qu'elle a été initialement placée dans des conditions dénaturantes et non plus natives.

Afin de déterminer le taux maximal de deutération de la protéine aIF2α3, nous avons donc décidé de la dénaturer avec du chlorure de guanidinium préalablement à l'analyse HDX/MS. Il a été montré que ce composé chaotropique utilisé à forte concentration était capable de dénaturer totalement les protéines (*17*), ce qui rendrait tous les hydrogènes d'amide accessibles à l'échange.

La protéine aIF2α3 a donc été incubée dans une solution de chlorure de guanidinium à 3 M dans D_2O à 50°C sous agitation pendant 24 heures. Puis, elle a été analysée en MS afin de calculer son taux de deutération. Malheureusement, aucun signal n'a été détecté, indiquant que la protéine a été dégradée ou a précipité suite au traitement chimique. La séquence de la protéine aIF2α3 ne comportant que très peu d'acides aminés aromatiques (seulement trois tyrosines), n'a pas permis la mesure de la concentration de l'échantillon par spectrophotométrie UV à 280 nm. Par ailleurs, la solution de chlorure de guanidinium, quant à elle, absorbe à la longueur d'onde utilisée pour les protéines.

Dans le but de tester si le traitement chimique pour la dénaturation dégrade la protéine, nous avons décidé de réaliser un gel SDS-PAGE 16% permettant de tester la présence d'aIF2α3 (10 kDa). Nous avons également souhaité tester si c'est l'étape de dessalage qui conduit à la perte de la protéine. Pour cela, un autre échantillon traité mais non dessalé à été préparé. Malheureusement, les échantillons sont si visqueux qu'il est impossible de les déposer. L'origine de cette viscosité n'est pas très claire, néanmoins un temps d'incubation de 24 heures dans le chlorure de guanidinium semble trop long.

Nous avons donc réalisé d'autres tests dans des conditions différentes afin de déterminer le temps maximal d'incubation dans le chlorure de guanidinium pour lequel la protéine n'est pas dégradée. Différents temps d'incubation ont été testés : t_0=0s, t=5h et t=24h. Pour chaque temps d'incubation, le premier échantillon protéique n'a pas été dessalé tandis que le second l'a été (Fig. III. 36). Dans le cas où une étape de dessalage a été réalisée (puits 4, 6 et 8), la solution d'élution correspondant à la protéine dans H_2O/ACN/AF (49/49/2), a été évaporée par SpeedVac pour être ensuite resuspendue dans H_2O afin de faciliter son dépôt sur gel après ajout du tampon Laemmli. Sans dessalage, la protéine traitée au chlorure de guanidinium est diluée dans H_2O/AF2% afin de mimer l'étape d'arrêt de la réaction d'échange (Fig. III. 5). Les échantillons non dessalés sont ensuite préparés avec du tampon Laemmli. Néanmoins, à l'issue du mélange avec le tampon, les échantillons ont précipité empêchant leur dépôt prévu dans les puits 3, 5 et 7. Ce qui explique l'absence de bandes dans ces puits et donc l'absence de protéine. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le premier puits. Il s'agit d'un mélange de protéines de référence dont la taille est connue servant à estimer la taille des molécules d'intérêt. Un témoin positif a été déposé dans le deuxième et dernier puits. Il est constitué de la protéine aIF2α3 n'ayant pas subi de traitement chimique ni de dessalage. Une bande intense autour de 10 kDa est observée dans ces deux puits témoignant de la présence de la protéine. Une même quantité de matériel (1,8 µg) a été déposée dans tous les puits lorsque le dépôt était possible.

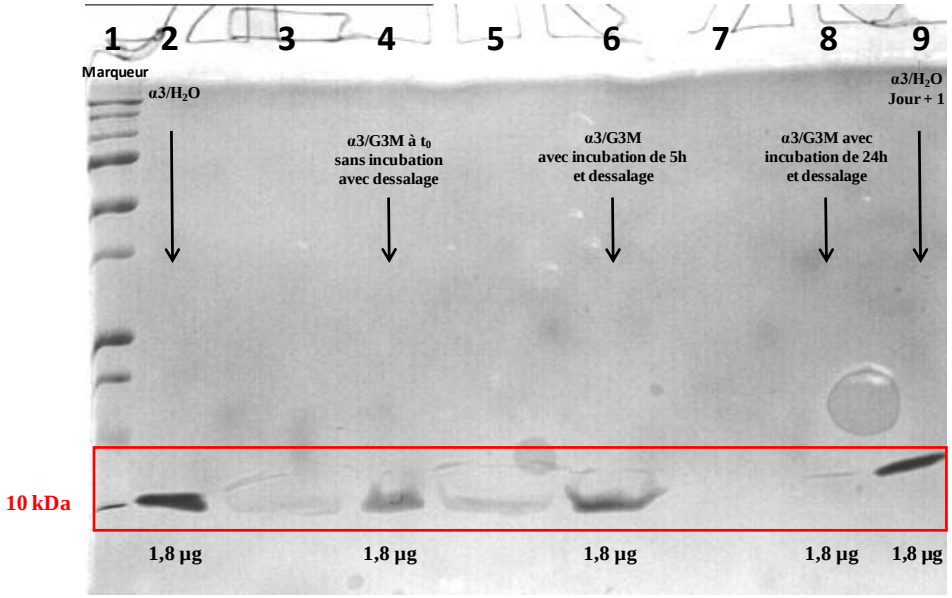


Fig. III. 36 Image du gel SDS-PAGE 16%. La protéine aIF2α3 a été dénaturée après différents temps d'incubation dans une solution de chlorure de guanidinium à 3 M. Pour chaque temps d'incubation, deux échantillons sont testés, sans et avec l'étape de dessalage.

La protéine aIF2α3 est présente dans les puits 4 et 6 alors qu'elle a subi le traitement chimique avec le chlorure de guanidinium et l'étape de dessalage mais elle n'est pas retrouvée dans le puits 8. Pourtant, dans ce cas là elle a aussi été traitée par le chlorure de guanidinium mais pendant un temps beaucoup plus long (24 heures) et dessalée.

Par conséquent, on peut conclure que c'est le temps du traitement chimique (incubation dans une solution de chlorure de guanidinium 3 M, à 50°C sous agitation) qui est critique dans le maintien de l'intégrité de la protéine. En effet, la protéine aIF2α3 est dégradée suite à une incubation pendant une durée de vingt-quatre heures tandis qu'elle est toujours présente pour un temps d'incubation inférieur ou égal à cinq heures.

Le taux de deutération maximal de la protéine aIF2α3 a donc été déterminé par spectrométrie de masse après dénaturation de la protéine dans une solution de chlorure de guanidinium 3 M préparée dans du D_2O. Les temps d'incubation t=1h et t=5h ont été testés (Tab. III. 1).

Nous obtenons des pourcentages de deutération légèrement plus élevés dans le cas d'une dénaturation de la protéine pendant des temps d'une heure et cinq heures (73%) par rapport à une incubation classique dans D_2O (66%). Afin de s'assurer que la protéine a bien été dénaturée par le traitement chimique, d'autres conditions ont été testées : température

d'incubation de 95°C, concentration en chlorure de guanidinium de 6 M. Les résultats sont présentés dans le Tab. III. 2. Malgré différentes conditions de dénaturation testées, nous n'obtenons pas de pourcentage de deutération proche de la limite supérieure de 87,5% donnée par la dilution à 1/8 de la solution H_2O dans du D_2O.

Tab. III. 1 Taux de deutération maximal dans des conditions natives (0 M de dénaturant) et dénaturantes (3 M de dénaturant). La protéine aIF2α3 a été incubée soit dans un tampon NaCl 330 mM/D_2O (conditions natives) soit dans une solution de chlorure de guanidinium 3 M/D_2O (conditions dénaturantes) pendant des temps variables. Elle a ensuite été dessalée avant d'être analysée par MS. La valeur de référence (66%) obtenue dans des conditions natives est indiquée. Une valeur moyenne (triplicats) a été calculée dans les différentes conditions dénaturantes.

Concentration du dénaturant	0 M	3 M	3 M
Conditions d'incubation	1 h, 37°C, 600 rpm	1 h, 50°C, 700 rpm	5 h, 50°C, 700 rpm
Taux de deutération	66%	73%	73%

Tab. III. 2 Taux de deutération maximal dans des conditions dénaturantes. La protéine aIF2α3 a été incubée dans une solution de chlorure de guanidinium/D_2O dans différentes conditions. Elle a ensuite été dessalée avant d'être analysée par MS. Une valeur moyenne (triplicats) a été calculée dans les différentes conditions.

Concentration du dénaturant	3 M	6 M
Conditions d'incubation	5 min, 95°C, 700 rpm	1 h, 50°C, 700 rpm
Taux de deutération	70%	72%

En reconsidérant donc les deux hypothèses formulées précédemment, il semblerait que le phénomène d'échange inverse soit important dans nos conditions expérimentales. Il a lieu en solution avant l'analyse finale en MS, lors de la préparation des échantillons (étape de dessalage) et au cours de leur introduction dans le spectromètre de masse avec le système de seringue refroidie utilisé.

Afin de mettre en évidence l'influence de l'étape de dessalage sur l'échange inverse, nous avons mesuré les pourcentages de deutération de peptide et protéine modèles complètement deutérés avec notre système de seringue refroidie. La substance P (peptide de onze résidus) a donc été incubée dans une solution ACN/D_2O (75/25) pendant une heure à 37°C sous agitation. La réaction d'échange a été arrêtée par diminution du pH et de la température, puis

le peptide totalement marqué a été dilué dans H_2O/ACN/AF (49/49/2) afin d'être analysé par MS. L'expérience a été reconduite une seconde fois mais en incluant l'étape de dessalage avant l'analyse par MS. Sur le FT-ICR, les pourcentages moyens (triplicats) de deutération obtenus sont les suivants : 91,4% sans l'étape de dessalage et 77% avec l'étape de dessalage. Sur le Q-TOF, le taux maximum sans dessalage n'atteint que 85,6%, indiquant que c'est bien l'introduction dans la source qui conduisait à un accroissement du « back-exchange » sur celui-ci. Il semblerait que l'étape de dessalage conduise à une perte d'environ 15% de la totalité du marquage pour les peptides. Il convient de noter que ces expériences ont été réalisées directement à partir de la poudre, donc sans dilution initiale. Par conséquent, si on considère les 77% de deutération obtenus après dessalage, appliqués sur une solution à 87,5% de deutériums, on trouve un maximum de deutération de 67%, soit assez proche des 72-73% obtenus après dénaturation complète.

III.4.Conclusion

Nos résultats montrent qu'il est possible d'éviter une redistribution des deutériums dans la séquence polypeptidique au moment de la fragmentation en phase gazeuse de protéines par approches « top-down ». L'ECD et l'ETD semblent présenter une bonne capacité à garder la localisation initiale des deutériums. Dans le cas de l'activation par CID, nos résultats rejoignent ceux de la littérature en restant incertains : il ne nous a pas été possible ni de montrer l'absence de « scrambling » ni de montrer un « scrambling » complet, tombant ainsi dans une zone intermédiaire où les paramètres contrôlant l'extensivité du « scrambling » restent incertains.

Un autre enseignement de cette partie est qu'un des problèmes majeurs de notre approche est l'échange inverse qui a lieu en solution avant l'analyse par spectrométrie de masse. Ce phénomène est accentué dans notre cas par l'obligation que nous avons d'effectuer une étape de dessalage des protéines avant leur analyse et la difficulté à savoir ce qui relève de cette étape ou de la source d'ionisation. Un autre problème, lié à celui-là, est qu'il est difficile d'accumuler un grand nombre de spectres car au bout d'une dizaine de minutes, l'échange inverse est devenu trop important.

Dans ce contexte, et avec l'idée de contrôler beaucoup mieux l'échange inverse, nous avons décidé de développer un système d'introduction des échantillons marqués dans le

spectromètre de masse complètement nouveau, basé sur l'utilisation d'une enceinte isolée refroidie permettant de stocker les échantillons à très basse température ce qui évite le démarquage pendant des temps longs et permet également de travailler avec des débits faibles. Le développement de cette « cryosource » et les premiers résultats obtenus en l'utilisant font l'objet du dernier chapitre de cette thèse.

III.5.Bibliographie

1. Wang, L., and Smith, D. L. (2003) Downsizing improves sensitivity 100-fold for hydrogen exchange-mass spectrometry, *Anal Biochem 314*, 46-53.
2. Kaltashov, I. A., and Eyles, S. J. (2002) Crossing the phase boundary to study protein dynamics and function: combination of amide hydrogen exchange in solution and ion fragmentation in the gas phase, *J Mass Spectrom 37*, 557-565.
3. Hamuro, Y., Tomasso, J. C., and Coales, S. J. (2008) A simple test to detect hydrogen/deuterium scrambling during gas-phase peptide fragmentation, *Anal Chem 80*, 6785-6790.
4. Rand, K. D., Zehl, M., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2009) Protein hydrogen exchange measured at single-residue resolution by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Anal Chem 81*, 5577-5584.
5. Landgraf, R. R., Chalmers, M. J., and Griffin, P. R. (2012) Automated hydrogen/deuterium exchange electron transfer dissociation high resolution mass spectrometry measured at single-amide resolution, *J Am Soc Mass Spectrom 23*, 301-309.
6. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2009) Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein, *J Am Chem Soc 131*, 12801-12808.
7. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2010) Characterizing short-lived protein folding intermediates by top-down hydrogen exchange mass spectrometry, *Anal Chem 82*, 8591-8597.
8. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2008) Electron capture dissociation of electrosprayed protein ions for spatially resolved hydrogen exchange measurements, *J Am Chem Soc 130*, 11574-11575.
9. Abzalimov, R. R., Kaplan, D. A., Easterling, M. L., and Kaltashov, I. A. (2009) Protein conformations can be probed in top-down HDX MS experiments utilizing electron transfer dissociation of protein ions without hydrogen scrambling, *J Am Soc Mass Spectrom 20*, 1514-1517.
10. Abzalimov, R. R., and Kaltashov, I. A. (2010) Controlling hydrogen scrambling in multiply charged protein ions during collisional activation: implications for top-down hydrogen/deuterium exchange MS utilizing collisional activation in the gas phase, *Anal Chem 82*, 942-950.
11. Rand, K. D., Adams, C. M., Zubarev, R. A., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens, *J Am Chem Soc 130*, 1341-1349.
12. Zehl, M., Rand, K. D., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron transfer dissociation facilitates the measurement of deuterium incorporation into selectively labeled peptides with single residue resolution, *J Am Chem Soc 130*, 17453-17459.
13. Kaltashov, I. A., Bobst, C. E., and Abzalimov, R. R. (2009) 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 81*, 7892-7899.
14. Sterling, H. J., and Williams, E. R. (2010) Real-Time Hydrogen/Deuterium Exchange Kinetics via Supercharged Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry 82*, 9050-9057.
15. Duchateau, M. (2010) Détermination de surface d'interaction d'assemblages biologiques macromoléculaires par marquage au deutérium et analyse par spectrométrie de masse FT-ICR.

16. Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S., and Schmitt, E. (2007) Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states, *P Natl Acad Sci USA 104*, 18445-18450.
17. Tanford, C. (1968) Protein denaturation, *Adv Protein Chem 23*, 121-282.

Chapitre IV : Développement d’une source refroidie

Chapitre IV : Développement d'une source refroidie 151

IV.1. Echange inverse.....153

IV.2. Différents systèmes d'introduction 155

IV.2.1. Avec une approche « bottom-up » 156
IV.2.2. Avec une approche « top-down » 158

IV.3. Développement d'un nouveau dispositif d'injection.....165

IV.3.1. Qu'est-ce que la « cryosource » ? 166
IV.3.2. Matériel et méthodes.....166
IV.3.2.1. Instrumentation 166
IV.3.2.2. Préparation et analyse des échantillons marqués 168
IV.3.3. Résultats 169
IV.3.3.1. Conception du produit et optimisation sur une petite protéine 169
IV.3.3.1.1. Réalisation de la maquette 169
IV.3.3.1.2. Réalisation des prototypes 169
IV.3.3.2. Validation de la « cryosource » et optimisation sur des peptides 174
IV.3.3.2.1. Validation de la « cryosource » pour HHHHHHIIKIIK 175
IV.3.3.2.2. Cas du peptide KKDDDDDDIIKIIK 175
IV.3.3.2.2.1. Détermination du temps d'incubation pour le démarquage sélectif 176
IV.3.3.2.2.2. Vérification de la stabilité de la deutération dans la « cryosource » 179
IV.3.3.2.3. Cas du peptide GluF 186
IV.3.4. Conclusion 187

IV.4. Bibliographie 189

IV.1. Echange inverse

Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie introductive, l'association des échanges isotopiques hydrogène/deutérium en solution avec la spectrométrie de masse (HDX/MS) est devenue une méthode de choix pour obtenir des informations sur la structure tridimensionnelle d'une protéine ou sur son changement de conformation induit par la fixation d'un ligand ou d'un partenaire protéique. Néanmoins cette approche souffre de deux limitations importantes : (i) l'échange inverse, ou « back-exchange », qui peut avoir lieu en solution à différentes étapes de l'expérience, et (ii) la migration intramoléculaire des protons et des deutérons, ou « scrambling », qui peut se dérouler en phase gazeuse, particulièrement au cours d'expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Ces deux processus doivent être minimisés pour obtenir des résultats interprétables. Nous avons vu dans le Chap. II que la minimisation du « scrambling » nécessitait une optimisation minutieuse et spécifique des potentiels de la source d'ionisation et des optiques de transfert ionique afin de rendre minimale l'excitation vibrationnelle des ions peptidiques deutérés. Les paramètres instrumentaux ne peuvent néanmoins pas être directement transférés d'un instrument à un autre. Il convient donc d'optimiser individuellement les différents réglages de l'instrument quand on en change pour éviter la redistribution aléatoire des hydrogènes et deutériums. Cela peut être commodément réalisé par l'utilisation de peptides modèles sélectivement deutérés servant de sonde du « scrambling » pendant la fragmentation ECD ou ETD (*1-3*).

Ce dernier chapitre de ma thèse est consacré à la minimisation du « back-exchange » lors d'expériences HDX/MS. En effet, l'échange inverse reste et demeure une nécessité mais également un problème sérieux inhérent à la technique HDX. Il conduit à une variation du nombre de deutériums entre l'étape de marquage et l'analyse finale par spectrométrie de masse. En général, cette variation prend la forme d'une perte de deutération : après échange en solution deutérée, la réaction d'échange sur les hydrogènes d'amide est fortement ralentie, mais pas totalement arrêtée, par passage en conditions acides (pH 2,5) et à température réduite (0°C), généralement dans un solvant majoritairement hydrogéné. Par conséquent, ce « back-exchange » peut avoir lieu lors des étapes de préparation de l'échantillon (digestion, dessalage, concentration, séparation,…) jusqu'à son injection dans le spectromètre de masse et son ionisation en phase gazeuse. Ce phénomène d'échange inverse est nécessaire pour assurer un retour des hydrogènes portés par les chaînes latérales sous forme hydrogénée, mais doit être contrôlé pour maintenir en place le plus grand nombre possible des deutériums en position amide pendant le temps nécessaire à l'analyse.

La manière la plus simple de minimiser l'échange inverse est de maintenir un pH où l'échange est minimal, et de rester à froid (Fig. I. 11). Comme nous l'avons vu précédemment, le pH et la température sont ajustés respectivement à 2,5 et à 0°C. Sous ces conditions de « quench », l'échange des hydrogènes d'amide est diminué de cinq ordres de grandeur par rapport à un pH de 7 et une température de 25°C.

La demi-vie pour l'échange inverse dans des conditions d'arrêt de la réaction est entre trente et cent vingt minutes en fonction de la séquence peptidique. Par conséquent, les étapes d'analyse doivent être réalisées le plus rapidement possible dès lors que la réaction est bloquée. Ainsi, il n'est pas envisageable de réaliser une digestion enzymatique d'une heure suivie d'un gradient d'une heure supplémentaire pour l'étape de séparation chromatographique ! Des protocoles et dispositifs expérimentaux ont été mis au point afin d'optimiser les étapes de digestion et de séparation (*4-5*). Si ces étapes tiennent dans un minimum de temps d'environ trente minutes au total, le recouvrement en deutériums peut être supérieur à 85%. Il faut noter que quelques échanges inverses ont lieu dans l'interface de l'électrospray mais qu'ils n'excèdent pas 5% généralement.

Comme nous l'avons vu précédemment, les hydrogènes des chaînes latérales s'échangent plus vite que les hydrogènes d'amide. Par conséquent, lorsque la protéine ou les peptides marqués sont placés dans les solvants hydrogénés utilisés pour la digestion ou l'analyse chromatographique, tous les deutériums des chaînes latérales redeviennent rapidement des hydrogènes. Ainsi, un incrément de masse pourra être associé à l'incorporation d'un deutérium sur une fonction amide du squelette polypeptidique. Le problème est un peu plus compliqué pour les protéines ou les peptides riches en arginine car, comme nous l'avons vu, l'arginine possède sur sa chaîne latérale deux hydrogènes qui échangent à la vitesse des hydrogènes d'amide, et pour lesquels l'étape de lavage (substitution de D en H) sera donc moins efficace.

Notons également que les conditions de l'échange inverse (pH acide, solvant organique) favorisent *a priori* une forme dénaturée pour la protéine initiale, conduisant à un échange inverse moins dépendant des structures secondaire, tertiaire et quaternaire. Par conséquent les vitesses d'échange ne dépendent globalement que de la séquence primaire. Pour des peptides typiques, cette séquence conduit à une vitesse d'échange globalement proche pour tous les sites, conduisant à un échange inverse de type « aléatoire ». Ceci rend en partie compte de la forme gaussienne des distributions isotopiques obtenues pour les peptides deutérés.

Finalement, le choix d'une approche « top-down » semblerait être la meilleure solution pour minimiser l'échange inverse. Dans ce cas, la protéine entière, après arrêt de la réaction d'échange par diminution du pH et de la température, est fragmentée directement en phase gazeuse. Cette approche offre donc la possibilité unique de réduire considérablement l'effet du « back-exchange », voire même de presque l'éliminer dans des conditions expérimentales strictes (*6*). Ceci est dû au fait qu'il n'y a pas d'étape préalable à l'analyse par spectrométrie de masse telle qu'une digestion enzymatique à la pepsine ou une séparation chromatographique en phase liquide. Cependant, il faut noter le fait qu'il n'est pas toujours possible d'opter pour une approche « top-down ». En effet, pour des systèmes de taille trop importante, par exemple, l'efficacité de fragmentation en ECD est trop faible pour obtenir une résolution à l'acide aminé près pour la plus grande partie de la protéine.

Dans tous les cas, après le « quench » de la réaction de marquage, l'échantillon doit être injecté si possible à froid et le plus rapidement dans la source du spectromètre de masse pour limiter le « back-exchange ».

IV.2. Différents systèmes d'introduction

Plusieurs modes d'introduction de l'échantillon marqué dans le spectromètre de masse ont été développés en fonction de l'approche MS adoptée : « bottom-up » ou « top-down ». La mise au point de ces différents systèmes d'injection doit également prendre en compte la technique d'ionisation utilisée. La technique d'analyse par MS la plus communément utilisée pour les expériences HDX est l'électrospray (ESI) tandis que la méthode MALDI est plus rarement employée (*7-11*). Cela s'explique par le fait que contrairement à la technique ESI, elle ne peut être couplée en ligne avec des systèmes de chromatographie liquide, qui sont très utiles pour l'analyse de mélanges complexes.

Autrement dit, seule l'électrospray autorise le couplage avec une chromatographie liquide en phase inverse (HPLC-ESI-MS) permettant l'isolation de peptides et de protéines en mélange complexe. Cette étape de séparation est indispensable dans beaucoup d'études d'identification et de caractérisation de biomolécules par spectrométrie de masse. Elle est d'autant plus nécessaire dans le cas d'analyses de systèmes protéiques de grande taille en HDX/MS. En effet, la superposition des nombreux massifs isotopiques qui ont été déplacés et élargis par le marquage complique énormément l'analyse. En pratique, après avoir arrêté la

réaction d'échange, l'échantillon est directement introduit dans la source électrospray via une HPLC (« High-Performance Liquid Chromatography »).

La technique HPLC-ESI-MS présente donc plusieurs avantages. Elle est tout d'abord particulièrement bien adaptée pour la séparation temporelle d'un grand nombre de peptides. L'étape de séparation en HPLC participe également au "lavage" des chaînes latérales des acides aminés (*12*). Elle est compatible avec la plupart des tampons et avec la présence d'agents dénaturants et offre la possibilité de concentrer rapidement des échantillons dilués. En contre partie, l'avantage du MALDI-MS par rapport à l'ESI-MS est qu'un grand nombre d'échantillons peuvent être analysés dans une courte période de temps. De plus, cette technique est plus tolérante aux sels que l'électrospray et ne requiert donc pas d'étape préalable de dessalage de l'échantillon. Bien que l'ionisation MALDI soit plus facilement réalisable et interprétable, elle conduit néanmoins à une perte en deutériums significativement plus élevée par rapport à la méthode ESI, même si des essais ont été menés pour réduire ces pertes (*13*). De plus, il n'est pas envisageable d'utiliser la technique MALDI pour l'analyse de systèmes protéiques complexes de hauts poids moléculaires. En effet, les informations de tous les peptides sont fournies dans un même spectre de masse le rendant « illisible » et il n'est pas possible de réaliser préalablement à l'analyse une séparation par HPLC qui serait pourtant indispensable pour ce type d'échantillon.

Les deux sous-paragraphes suivants constitueront un bilan des différents systèmes d'introduction de l'échantillon marqué dans le spectromètre de masse, qui ont été développés avant mon arrivée au laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ils ont été mis au point par l'équipe ou par d'autres groupes dans un contexte de minimisation de l'échange inverse.

IV.2.1. Avec une approche « bottom-up »

Une extension évidente de la méthode HDX/ESI-MS est l'utilisation du nano-débit, bien qu'elle ne soit pas encore systématique. En effet, ce choix est particulièrement pertinent pour des protéines qui sont difficiles à obtenir (échantillons biologiques précieux) ainsi que pour celles qui forment des agrégats protéiques à forte concentration. Ces dernières suscitent un vif intérêt car elles sont pour la plupart responsables de maladies neurodégénératives telles que les maladies à prion, d'Alzheimer ou de Parkinson. Dans la littérature, on trouve quelques études HDX utilisant la technique d'analyse nano-ESI-MS « off-line » (*14-15*) ou couplée en

ligne aux étapes de digestion enzymatique et de séparation chromatographique (*16*). Par la réduction du système, il a été obtenu une sensibilité supérieure d'un facteur cent tout en conservant la deutération.

Lors de la thèse de Thorsten Daubenfeld (*17*), notre équipe a validé un système par injection directe nano-ESI-FTMS pour l'étude structurale de protéines par HDX. En effet, les très hautes performances d'un instrument de type FT-ICR, tant au niveau de la résolution que de la précision sur la mesure de masse, ont permis de s'affranchir d'une séparation chromatographique pour les protéines étudiées (*18*). L'échange inverse relatif à cette étape a ainsi été éliminé. Cependant, comme le système n'était pas refroidi, une aiguille nanospray autorisait un temps d'analyse de trois minutes seulement avant le réchauffement de la solution menant au phénomène d'échange inverse. Il faut noter ici que plus le temps d'analyse est faible, moins il est aisé de détecter des peptides deutérés couvrant une gamme dynamique importante : seule l'accumulation d'un nombre important de spectres permet de gagner en gamme dynamique. Par ailleurs, plus la taille du système protéique est grande, moins il est facile de suivre l'incorporation de deutériums des peptides car leur nombre croît fortement et leurs massifs isotopiques déplacés et élargis se superposent.

Ce problème de superposition des massifs isotopiques est classiquement résolu par le couplage du spectromètre de masse avec une technique de séparation chromatographique (*16, 19*) permettant d'isoler les différents peptides présents dans l'analyte dans une seconde dimension. Cette séparation doit, dans le cas d'études en HDX/MS, respecter les contraintes liées à la technique, *i.e.* qu'elle doit limiter les échanges inverses. Pour cela, plusieurs méthodes ont été développées. Elles utilisent soit des solvants protiques, auquel cas la séparation doit se faire à froid, en conditions acides et rapidement, soit des solvants non-protiques. Par exemple, la chromatographie supercritique a été proposée comme alternative aux gradients sur phase inverse classiques permettant de s'affranchir des problèmes de température et de durée d'élution (*20*). De plus, le temps de rétention associé à un peptide reste inchangé quel que soit son degré de deutération. En effet, l'incorporation en deutériums des peptides n'altère que très peu leur temps de rétention (*21-22*). Par conséquent, ils serviront de référence pour identifier les peptides après échanges H/D.

Lors de la thèse de Magalie Duchateau (*23*), notre équipe a mis au point et optimisé un système nano-LC-ESI-FTMS refroidi pour l'analyse structurale de protéines de haut poids moléculaire et de complexes protéiques tels que des complexes d'initiation de la traduction chez les archées et les eucaryotes par HDX. Le montage comprenant deux vannes nano, une pré-colonne et une colonne, est immergé dans de l'eau glacée pendant toute la durée de l'analyse pour refroidir un maximum le système et ainsi minimiser les échanges inverses. Il est couplé à une chaîne de nano-chromatographie liquide.

Notons également que Waters commercialise désormais un système complètement intégré pour les études HDX/MS, appelé « nanoACQUITY UPLC System with HDX Technology », qui peut être couplé à un spectromètre de masse du même constructeur. Le système intègre également une protéolyse « on-line ». Les vannes et colonnes sont refroidies à 0°C par des modules à effet Peltier.

IV.2.2. Avec une approche « top-down »

Une méthode populaire consiste à générer et à envoyer un flux continu de solution contenant la protéine deutérée vers la source d'ionisation. Ce dernier résulte du mélange de la solution de protéine dans son tampon d'échange avec celle d'arrêt de la réaction. Sur ce principe, un dispositif avec deux seringues reliées ensemble et connectées également avec le spectromètre de masse a été imaginé (*24*) (Fig. IV. 1). Les deux seringues contiennent les deux solutions à mélanger, données ci-dessus. Ce montage permet de procéder à l'arrêt de la réaction d'échange au point de connexion des deux seringues. Cette étape s'effectue « on-line » puisque le flux résultant du mélange des deux solutions est directement dirigé vers l'entrée du spectromètre de masse. Dans ces conditions, le temps pendant lequel peut avoir lieu le « back-exchange » correspond uniquement à la courte durée de résidence dans le tube capillaire (*e.g.* une minute) qui s'étend du nœud de connexion reliant les deux seringues à la source d'ionisation électrospray (schématisé en violet sur la Fig. IV. 1). De cette façon, le « back-exchange » peut être efficacement réduit.

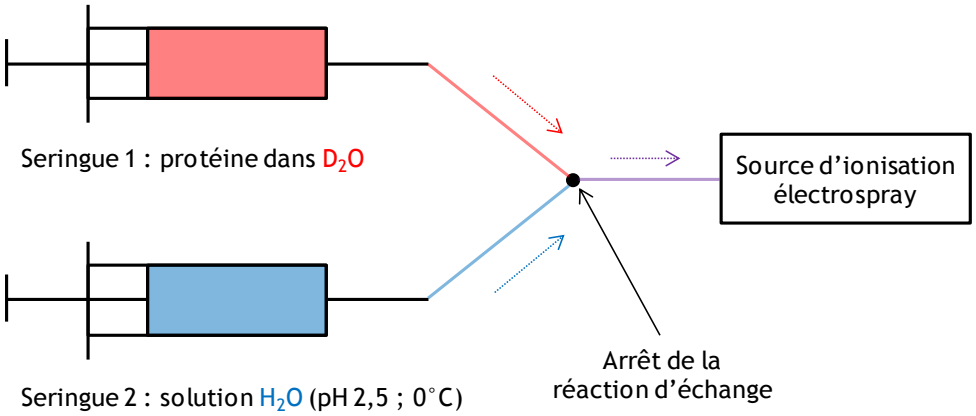


Fig. IV. 1 Schéma d'un dispositif d'introduction des échantillons dans une approche « top-down » HDX mettant en œuvre le flux continu.

Une autre méthode d'introduction minimisant le « back-exchange » consiste à désolvater et ioniser directement la solution de protéine dans son tampon d'échange sans passer par une étape préalable d'arrêt de la réaction (*25*) (Fig. IV. 2). La réaction d'échange H/D est alors arrêtée au moment même où la protéine est désolvatée. Des ions en phase gazeuse sont alors générés.

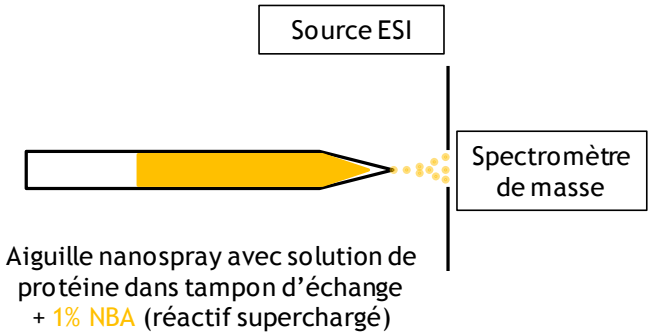


Fig. IV. 2 Schéma du mode d'introduction des échantillons par spray direct dans une approche « top-down » HDX.

Le profil de deutération en phase gazeuse devant impérativement refléter celui en solution, ces deux modes d'injection sont privilégiés car ils permettent de réduire le « back-exchange ». D'autre part, l'ajout d'une solution acide pour l'arrêt de la réaction d'échange H/D ou l'utilisation d'un réactif superchargé tel que le NBA (« nitrobenzyl alcohol ») augmente de façon significative l'état de charge de la protéine. Cela se traduit donc par une amélioration considérable de l'efficacité de fragmentation par ECD (ou ETD), méthode choisie pour limiter le « scrambling ». Toutefois notons que ces deux montages excluent la possibilité de réaliser une étape de dessalage préalable à l'injection dans le spectromètre de masse. Or, dans le cas d'échantillons réels, les protéines sont initialement conservées en conditions natives dans leur

tampon de purification qui est riche en sels. L'électrospray étant très sensible à la présence de sels ou d'additifs qui contribuent à la suppression du signal, une étape de dessalage est alors nécessaire avant leur analyse. Par conséquent, afin de pouvoir analyser des échantillons protéiques réels, le développement de nouveaux dispositifs d'introduction « off-line » s'est révélé indispensable. Il est donc très important de travailler à froid.

Le système d'injection que j'ai utilisé au début de ma thèse, a été mis en place au sein du laboratoire trois mois avant mon arrivée avec la collaboration du Professeur Jørgensen. Il s'agit également d'un montage en flux continu mais « off-line » constitué d'une seule seringue (Fig. IV. 3).

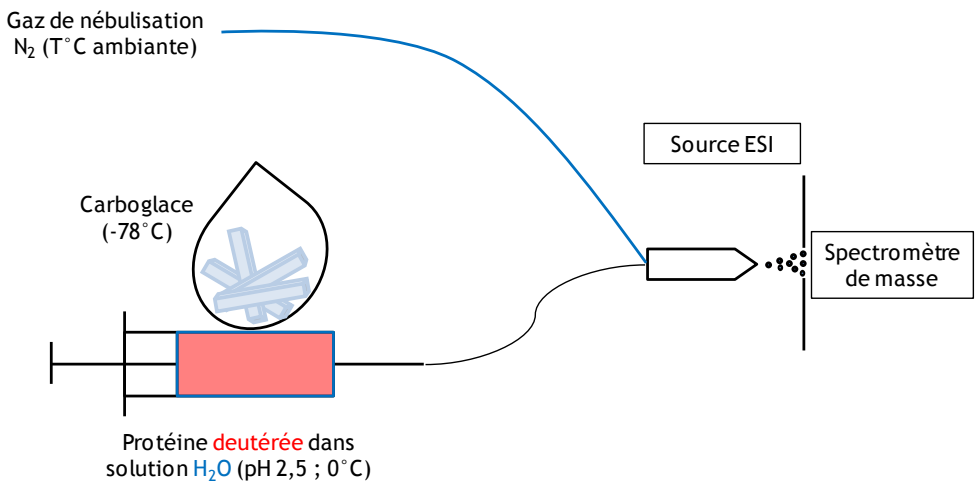


Fig. IV. 3 Schéma de notre ancien dispositif d'introduction des échantillons en flux continu « off-line » : la seringue refroidie.

Avec ce type de dispositif, la préparation de l'échantillon, correspondant à son marquage et à son dessalage, peut être réalisée en amont. Elle se décline en trois étapes qui sont les suivantes : (1) initiation de la réaction d'échange H/D en diluant la protéine dans son tampon de purification deutéré, puis (2) fixation du marquage après un temps d'incubation *t* donné en ajoutant une solution acide (pH final de 2,5) à basse température (0°C) et enfin (3) dessalage et concentration de l'échantillon à l'aide d'une colonne de phase inverse C8. Cette dernière étape doit être réalisée dans la glace et pendant un temps très court (une minute environ) afin de limiter l'échange inverse. L'échantillon est ensuite chargé immédiatement dans la seringue préalablement refroidie à 0°C puis injecté dans la source électrospray du spectromètre de masse FT-ICR.

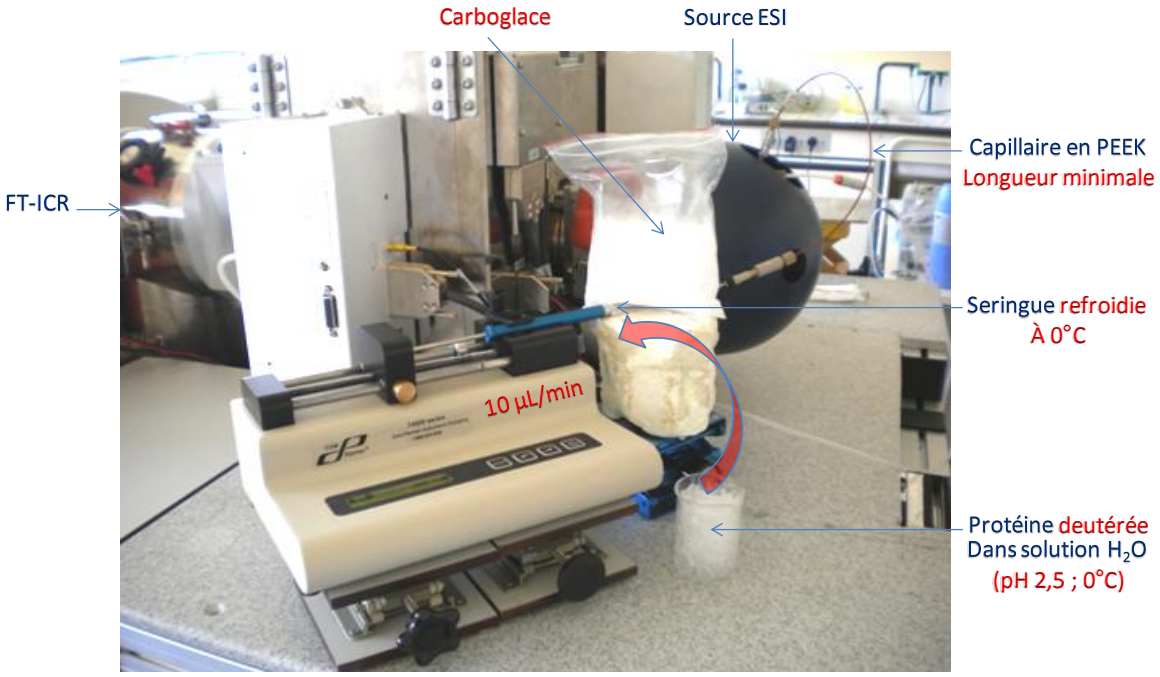


Fig. IV. 4 Photographie de notre système d'introduction des échantillons marqués : la seringue refroidie.

La photographie de notre système d'introduction des échantillons marqués est présentée ci-dessus (Fig. IV. 4). Ce dernier a été minutieusement optimisé afin de réduire au maximum le « back-exchange ». Pour cela, la seringue d'injection est préalablement refroidie à 0°C entre deux sachets de glace. Au terme de la durée d'échange H/D prédéfinie, la réaction est arrêtée en diluant l'échantillon dans une solution acidifiée (pH final de 2,5) à 0°C. L'échantillon est conservé dans la glace. Pour des échantillons réels, une étape de dessalage est réalisée sous ces mêmes conditions strictes. L'échantillon est alors prélevé grâce à la seringue refroidie et injecté dans la source du spectromètre de masse FT-ICR. Pendant toute la durée de l'analyse, il est lui-même refroidi par un sachet de carboglace surplombant la seringue. Il est transféré par un capillaire en PEEK, qui lui est à température ambiante, et dont la longueur a par conséquent été rendue minimale. Pour des raisons techniques, le capillaire ne mesure pas moins de trente et un centimètres. Un débit d'injection important, égal à 10 µL/min, a donc été utilisé. Dans ces conditions, il avait été montré que ce dispositif permettait un maintien des deutériums à leur place pendant au moins dix minutes d'acquisition de données. Ainsi, l'analyse d'un point de cinétique, de l'arrêt de la réaction d'échange H/D à la fin de l'acquisition en MS, durait environ douze minutes. Le dispositif d'analyse idéal combinerait la consommation d'une faible quantité d'échantillon tout en minimisant les échanges inverses, avec un temps d'acquisition le plus long possible.

Après quelques mois d'expérimentation de ce système, j'ai pu dresser un rapide bilan des difficultés liées à son utilisation. La première surprise a été le nombre de seringues que l'on peut fêler ou casser avec ce dispositif. En effet, bien que le modèle de seringue choisi (seringues Hamilton, série 800) propose un piston renforcé, l'échantillon refroidi par la carboglace a tendance à congeler. Il forme alors un glaçon. Tandis que le pousse-seringue continue à fonctionner et à envoyer l'échantillon vers le spectromètre de masse, une surpression finit par être exercée au niveau du verre de la seringue jusqu'à sa fêlure si l'analyse n'est pas interrompue ou l'échantillon réchauffé. Par ailleurs, les débits d'injection utilisés impliquent de disposer d'importantes quantités d'échantillon. Dans le cas de l'analyse d'échantillons biologiques précieux, cette technique ne pourrait pas être utilisée. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les expériences sont difficilement reproductibles. Ayant pour objectif d'améliorer le système, j'ai testé l'effet du refroidissement de l'échantillon par la carboglace lors de l'analyse par MS et l'influence du débit d'injection sur le « back-exchange ».

Pour cela, j'ai utilisé un système modèle, l'ubiquitine. Il s'agit d'une petite protéine de 76 résidus (8,6 kDa) dont la structure a été complètement décrite dans la littérature et qui est souvent utilisée dans la mise au point d'approches par échange H/D. Après avoir deutéré complètement l'ubiquitine par incubation dans D_2O (Annexe Matériel et méthodes), elle est diluée au centième dans une solution acidifiée H_2O/MeOH (40/60) à environ 0°C. Des mélanges H_2O/ACN (50/50) étaient auparavant utilisés. Le fait de choisir le méthanol comme solvant et de l'utiliser en plus grande proportion, permet d'une part, d'améliorer le processus d'ionisation par électrospray, et d'autre part, de diminuer considérablement le point de congélation de la solution à analyser. Cela empêche la formation systématique de glaçons dus au refroidissement de la solution par la carboglace. L'ubiquitine est ensuite directement prélevée par la seringue refroidie et injectée dans la source ESI du spectromètre de masse FT-ICR. L'analyse MS est réalisée avec ou sans le sachet de carboglace surplombant la seringue puis en testant différents débits d'injection. Le pourcentage de deutération de l'ubiquitine est suivi au cours des dix minutes d'analyse autorisés par le système de seringue refroidie afin de mesurer l'échange inverse. Les expériences sont réalisées en duplicats ou triplicats pour estimer l'erreur de mesure.

En théorie, en absence d'échange inverse, la valeur du pourcentage de deutération devrait rester constante et maximale en fonction du temps. Dans la situation idéale, l'ensemble des hydrogènes d'amide devraient être marqués et aucun autre site ne devrait être deutéré,

définissant ainsi un 100% théorique. En pratique, ce pourcentage doit être corrigé pour prendre en compte la présence de deutériums dilués dans la solution d'eau légère acidifiée. On peut par conséquent corriger le ratio maximal par la formule suivante :

$$\%\mathrm{Dexp} = \%\mathrm{Damide} + R \times \frac{(Ntot - Namide)}{Namide}$$

où N_{tot} est le nombre total de sites échangeables (hydrogènes d'amide et chaînes latérales), N_{amide} est le nombre de liaisons peptidiques, R est le pourcentage de deutériums dans la solution diluée rapporté au nombre total d'hydrogènes et de deutériums. $\%D_{amide}$ est le taux de deutération réel des hydrogènes d'amide dû au marquage et $\%D_{exp}$ est le ratio de deutération expérimental, donné par la formule suivante :

$$\%\mathrm{Dexp} = \frac{nD}{Namide}$$

où n_D est le nombre de deutériums (mesuré par spectrométrie de masse par exemple). Du fait de la présence de deutériums dans la solution, on s'attend donc à une surestimation du taux de deutération. Ainsi, par exemple si on considère une dilution au 1/100^{e} dans une solution 60/40 méthanol/eau, on trouve un ratio de deutération R de 1,9% :

$$R = 1{,}9\% = \frac{\frac{2}{18}}{60 \times \frac{0{,}79}{32} + 2 \times \frac{40}{18}}$$

où 18 et 32 sont les masses molaires de l'eau et du méthanol, 0,79 est la densité du méthanol (celle de l'eau est prise à 1), 40/60 sont les proportions d'eau et de méthanol.
On s'attend par conséquent à un taux de deutération maximal (avec N_{tot} = 146, N_{amide} = 72) d'environ 102%.

De plus, un excès de deutération supplémentaire peut être dû au non ré-échange d'un hydrogène pour les chaînes latérales d'arginine, or l'ubiquitine comporte 4 arginines dans sa séquence. Dans la suite de ce manuscrit, une référence à 105% sera prise, qui correspond au maximum expérimentalement observé pour les différents montages qui seront tentés.

Dans le cas des injections utilisant le montage d'origine, l'évolution présentée ci-dessous est observée (Fig. IV. 5).

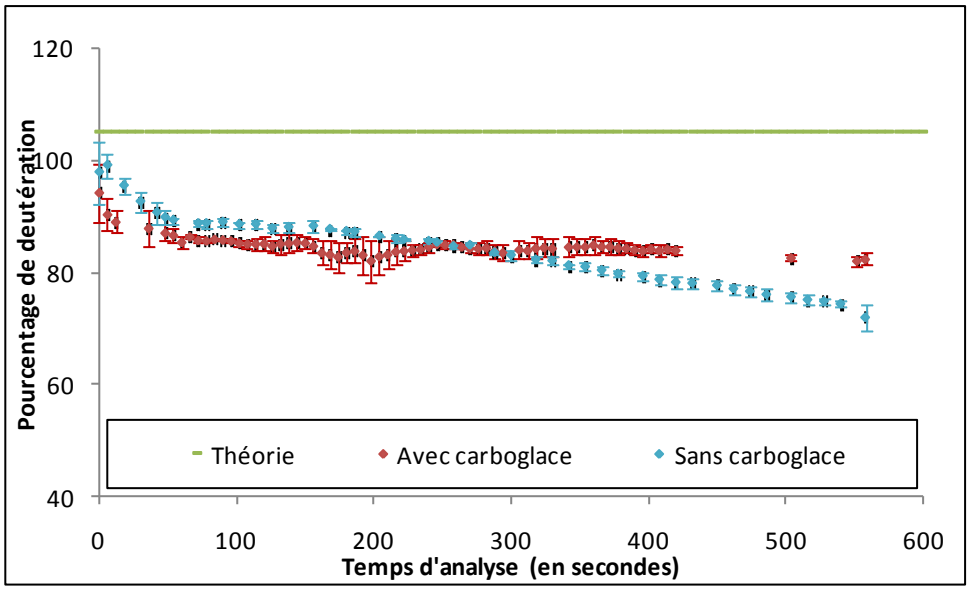


Fig. IV. 5 Evolution du taux de deutération de l'ubiquitine mesuré en fonction du temps après le début de l'injection. L'ubiquitine complètement deutérée est introduite dans la source ESI par le système de seringue refroidie. Bleu : pas de carboglace placé sur la seringue ; rouge : avec carboglace.

Lors des cinq premières minutes, les courbes avec et sans carboglace présentent la même allure et se confondent presque. La solution d'ubiquitine à 0°C injectée à 10 µL/min par la seringue refroidie n'a pas le temps de se réchauffer même en l'absence de carboglace. Au bout de cinq minutes, la solution d'ubiquitine se réchauffe en l'absence de carboglace. Ils s'opèrent alors des échanges inverses faisant chuter le pourcentage de deutération. Par conséquent, en l'absence de carboglace, on divise le temps d'analyse par deux au moins dans des expériences HDX/MS. La partie initiale, avec un taux de deutération plus élevé correspond à la combinaison d'une perte de deutériums au cours du temps avec un effet de débit, car initialement la seringue est maintenue à un débit élevé jusqu'à apparition du signal à t=0.

L'effet du débit d'injection de l'échantillon sur l'échange inverse (Fig. IV. 6) a ensuite été testé pour le débit de référence de 10 µL/min et pour un débit, divisé par cinq, de 2 µL/min.

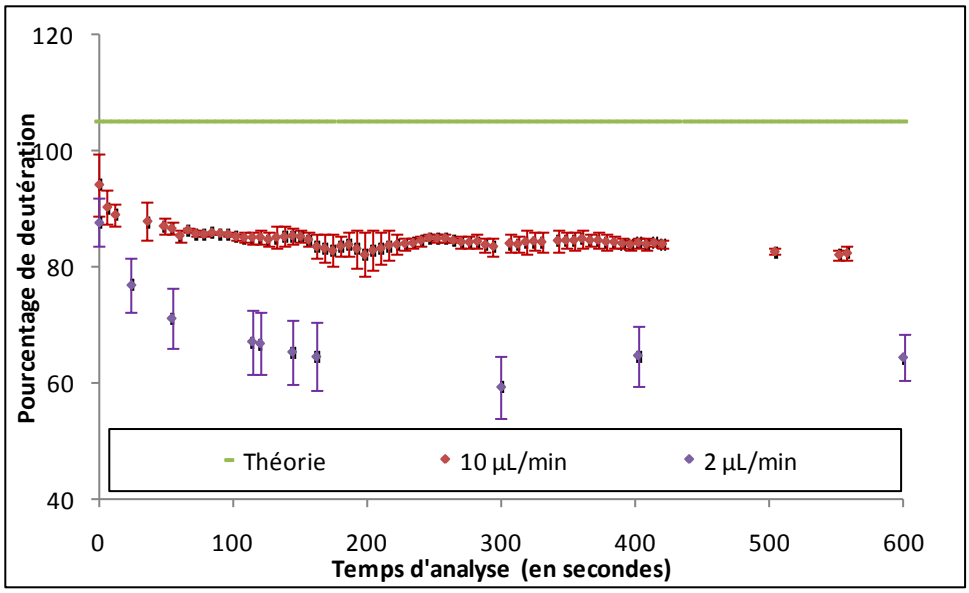


Fig. IV. 6 Effet du débit d'injection sur le maintien en place des deutériums lors de l'analyse MS. L'ubiquitine complètement deutérée est introduite dans la source ESI par le système de seringue refroidie surplombée de carboglace. Rouge : débit de 10 µL.min^{-1} ; violet : débit de 2 µL.min^{-1}.

Avec un faible débit d'injection (2 µL/min) de l'échantillon marqué, le pourcentage de deutération de l'ubiquitine diminue considérablement au cours de l'analyse MS. Les échanges inverses sont donc plus nombreux dans ces conditions expérimentales. On enregistre un « back-exchange » moyen après équilibration de 35%.

Les graphes des Fig. IV. 5 et Fig. IV. 6 montrent que le système de seringue refroidie permet de réduire au maximum le « back-exchange » si l'échantillon est lui-même refroidi par la carboglace lors de l'analyse MS et qu'il est injecté à un débit élevé (10 µL/min). Cependant, le « back-exchange » moyen reste non négligeable, égal à 20%. Ayant étudié l'ensemble des paramètres possibles, en restant sur la base de ce système, nous ne pouvons guère plus l'améliorer. Nous avons donc décidé d'inventer et de développer un nouveau système d'introduction.

IV.3. Développement d'un nouveau dispositif d'injection

L'idée a été d'imaginer un dispositif capable de stocker l'échantillon marqué aux deutériums à très basse température, en dessous de zéro degré, avant son analyse finale par spectrométrie de masse.

IV.3.1. Qu'est-ce que la « cryosource » ?

La « cryosource » est le nom que nous avons donné à notre dispositif d'injection (Fig. IV. 7). Il s'agit d'une enceinte close thermostatée à température contrôlée, avec comme objectif initial une plage de température allant de la température ambiante à -100°C. C'est une boîte thermiquement isolée issue de la transformation d'une glacière. Elle se branche directement sur la source ESI. Elle est traversée par un flux régulé de gaz refroidi à l'azote liquide (78 K). La température interne de la boîte est mesurée en continu par une sonde thermique et ajustée par un régulateur de température contrôlant une résistance chauffante. L'échantillon est introduit dans la « cryosource » puis injecté dans la source ESI du FT-ICR par un système de vanne et boucle d'injection. Il est entraîné vers le spectromètre de masse grâce à l'entrée d'un flux continu de solvant généré par un pousse-seringue situé à l'extérieur de la « cryosource ».

Fig. IV. 7 Photographie de la « cryosource ».

IV.3.2. Matériel et méthodes

IV.3.2.1. **Instrumentation**

Dans un premier temps, voici la description de la version optimisée de la « cryosource » et des conditions expérimentales nécessaires à la réalisation d'expériences pour l'étude de la

structure de petites protéines en HDX/MS. Elle est illustrée dans le schéma ci-après (Fig. IV. 8).

L'enceinte intérieure de la « cryosource » est refroidie à une température de -30°C par l'arrivée d'un gaz froid via un tuyau en cuivre. Celui-ci forme un serpentin plongé dans un récipient rempli d'azote liquide (78 K) qui permet le refroidissement du flux continu de gaz entrant dans le système. Une partie du gaz froid est envoyée dans la « cryosource » à l'aide d'un raccord en T, tandis que l'autre partie traverse le système et vient refroidir la ligne de transfert de l'échantillon qui est introduit dans la source ESI.

L'intérieur de la boîte est maintenu à une température constante par un régulateur de température équipé d'une sonde thermique et d'un ruban chauffant. La sonde thermique de type K est positionnée au niveau de la boucle contenant l'échantillon tandis que le ruban chauffant entoure les tuyaux en cuivre déposés au fond de la boîte. Un ventilateur placé dans l'enceinte assure l'homogénéité de la température dans celle-ci.

L'échantillon introduit dans une boucle de 75 µL par une vanne d'injection est poussé vers la source ESI du spectromètre de masse FT-ICR par le solvant à l'aide d'un pousse-seringue. Il est programmé à 2 µL/min correspondant à la valeur minimale du débit pour laquelle le spray est stable pour notre montage. Les débits inférieurs deviennent instables lors du refroidissement du montage, probablement à cause de l'augmentation de la viscosité des solvants à -30°C. Le volume injecté pour le remplissage de la boucle est de 100 µL.

Finalement, le gaz de nébulisation est également refroidi par l'azote liquide. Il est envoyé à l'intérieur du dispositif par un second tuyau en cuivre et est relié à l'aiguille de nébulisation de la source ESI, permettant son refroidissement.

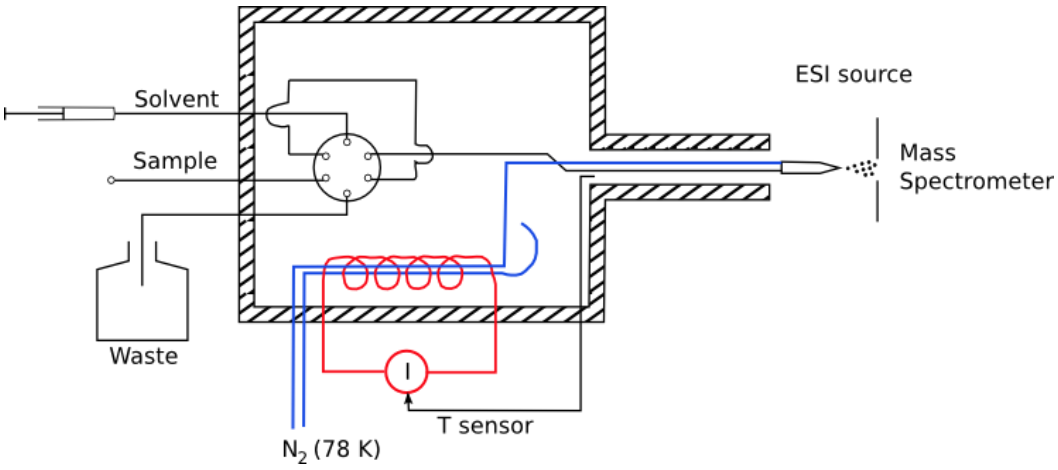


Fig. IV. 8 Schéma du principe de la « cryosource ».

IV.3.2.2. **Préparation et analyse des échantillons marqués**

L'optimisation de tous les paramètres expérimentaux pour la « cryosource » a été réalisée à l'aide de l'ubiquitine, protéine modèle, et de peptides de référence que l'on peut deutérer de manière sélective (peptides modèles conçus par le Prof. T. Jørgensen, Université d'Odense, Danemark).

L'ubiquitine (100 µM) et les peptides modèles (1 mM) sont complètement deutérés par incubation dans D_2O. Ils sont ensuite dilués (au 1/100^e) dans une solution H_2O/MeOH (40/60), à basse température, contenant de l'acide formique (2%) pour l'ubiquitine et de l'acide acétique pour les peptides (0,5 M, pH=2,3). L'ubiquitine est alors immédiatement analysée par FT-ICR MS. Les peptides, quant à eux, sont analysés après une incubation dans H_2O glacée pendant un temps à déterminer (environ 10 min avec le système de seringue refroidie) afin de démarquer sélectivement l'extrémité N-terminale et conserver un nombre moyen de 4,5 deutériums du côté C-terminal (*26-27*).

L'étape de dessalage a été réalisée manuellement sur colonne. Une cartouche Sep-Pak™ C_8 a été utilisée.

IV.3.3. Résultats

IV.3.3.1. **Conception du produit et optimisation sur une petite protéine**

IV.3.3.1.1. ***Réalisation de la maquette***

Cette phase de réalisation de la maquette initiale a permis une grande créativité de notre part et a déterminé la faisabilité technologique des choix de conception. Elle a été conçue à l'aide d'un bac à glace isotherme et de son couvercle. Cette boîte en polystyrène a montré de bonnes capacités de stockage à basse température malgré des fuites thermiques non négligeables causant une perte de froid. En particulier elle a permis de valider la plage de température atteignable (0°C à -100°C) et de vérifier la faisabilité de l'utilisation de mélanges eau/solvant organique à ces températures. On notera en particulier que bien que les températures de cristallisation des mélanges eau/méthanol et eau/acétonitrile soient connues, la viscosité de ceux-ci ne l'est pas. Pour les mélanges eau/méthanol, qui présentent des températures de cristallisation inférieures à -100°C à forts rapports méthanol/eau, il s'est avéré impossible d'obtenir un débit stable à des températures inférieures à -80°C. Pour les mélanges eau/acétonitrile, la limite se situe vers -25°C pour un minimum théorique à -43°C.

IV.3.3.1.2. ***Réalisation des prototypes***

Le produit a ensuite été développé et des prototypes ont été réalisés pour permettre sa validation après une série de tests.

Pour cela, une glacière de la marque Campingaz, qui présentait l'avantage d'avoir des joints d'étanchéité ainsi qu'une résistance garantie à des températures de -78°C, a été transformée en « cryosource ». Dans la première version de notre dispositif d'introduction à froid des échantillons marqués dans le spectromètre de masse, le gaz de nébulisation a été laissé à température ambiante (Fig. IV. 9).

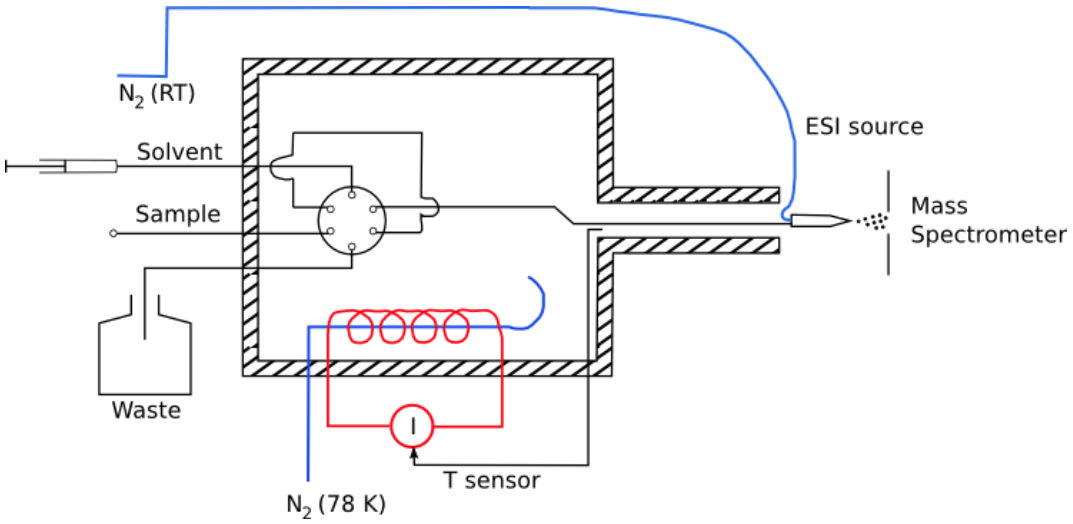


Fig. IV. 9 Schéma du prototype de la « cryosource » avec le gaz de nébulisation à température ambiante.

Afin de valider le prototype, nous l'avons comparé à l'ancien système d'injection, la seringue refroidie. Les résultats obtenus avec la première version de la « cryosource » (courbe en violet) sont assez similaires à ceux enregistrés avec la seringue refroidie (courbe en rouge) (Fig. IV. 10). L'ubiquitine présente un taux de deutération un peu plus élevé lorsqu'elle est introduite par la « cryosource » par rapport à la seringue refroidie. Par contre, le pourcentage de deutération est instable au cours de l'analyse MS. La « cryosource » dans cette configuration n'apporte pas de valeur ajoutée à la seringue refroidie. Elle doit donc être améliorée pour être validée.

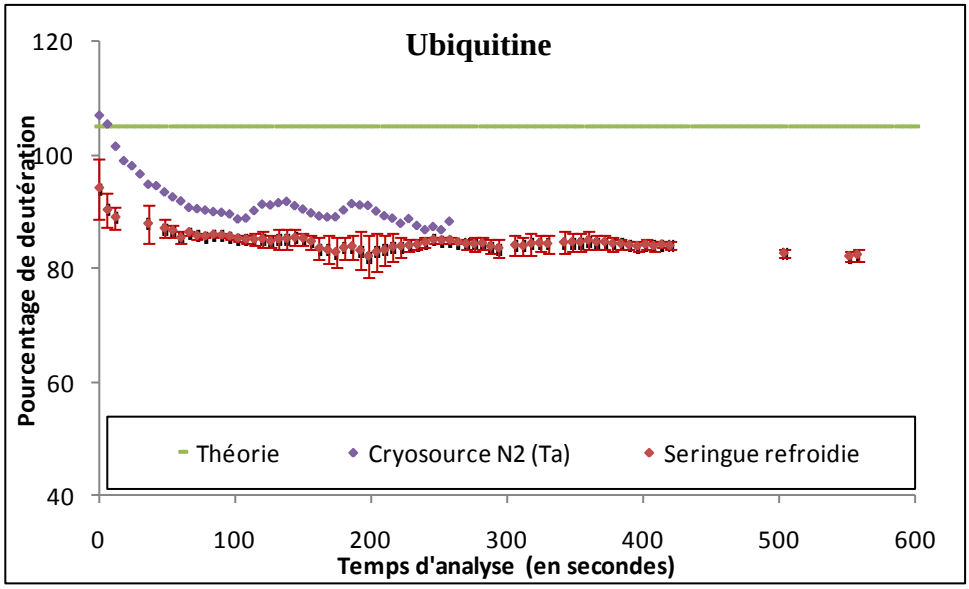


Fig. IV. 10 Effet du système d'injection utilisé sur le maintien en place des deutériums lors de l'analyse MS. Les dispositifs ici comparés sont le système de seringue refroidie et la première version de la « cryosource » avec le gaz de nébulisation à température ambiante.

L'amélioration de notre dispositif a porté sur le refroidissement du gaz de nébulisation par l'azote liquide (78 K) (Fig. IV. 8). Il est envoyé dans l'enceinte isolée à -30°C par un tuyau en cuivre qui traverse la boîte. L'extrémité du tuyau de cuivre, à la sortie de la « cryosource », est branchée au niveau de la source ESI. L'aiguille de spray est par ce système elle-même refroidie.

On obtient alors un spray refroidi stable qui nous donne les résultats suivants (courbe en bleu foncé) (Fig. IV. 11). Dans cette configuration, l'ubiquitine présente un pourcentage moyen de deutération nettement supérieur à celui obtenu avec les autres systèmes (ou versions de systèmes), et le taux de deutération est stable tout au long de l'analyse MS (Fig. IV. 11, Tab. IV. 1).

Tab. IV. 1 Pourcentages moyens de deutération de l'ubiquitine, obtenus à l'aide de la seringue refroidie et de la « cryosource », dans les versions 1 et 2, et calculés à différents temps de l'analyse par MS.

	1 min d'analyse	5 min d'analyse	10 min d'analyse
Seringue refroidie	88,70%	85,18%	84,84%
Cryosource version 1	97,73%	91,67%	
Cryosource version 2	103,88%	104,33%	103,88%

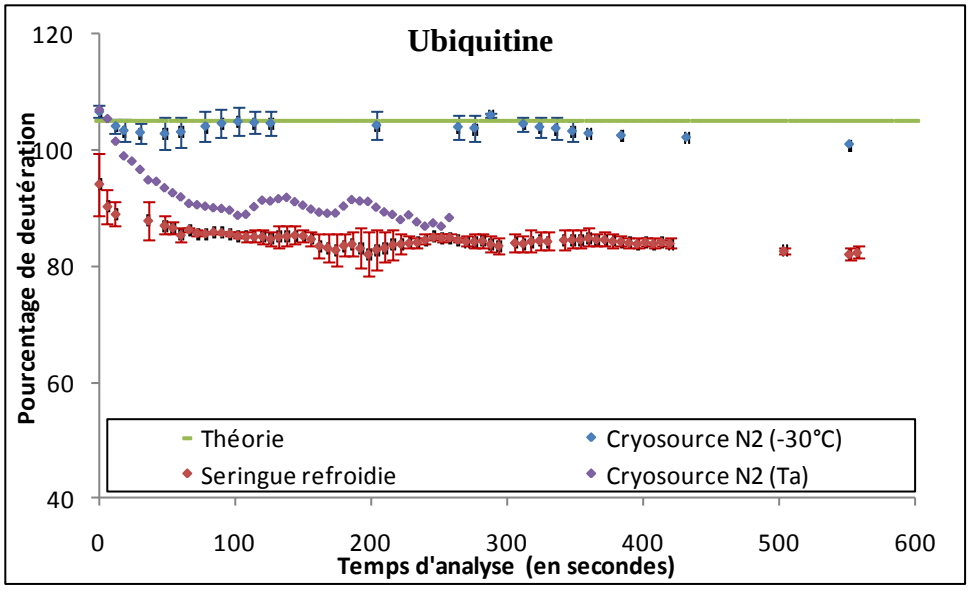


Fig. IV. 11 Effet du refroidissement du gaz de nébulisation à -30°C avec la « cryosource » sur le maintien en place des deutériums lors de l'analyse MS.

La Fig. IV. 11 montre que la “cryosource” dans sa version améliorée (avec le gaz de nébulisation refroidi), à -30°C et pour un débit d’injection de 2 µL/min, conduit à un pourcentage de deutération très proche de la valeur maximale attendue (105%) et qui reste stable pendant toute la durée de l’analyse par rapport au système de seringue refroidie. La « cryosource » avec ses différents paramètres optimisés est alors validée.

Nous avons ensuite testé différentes températures dans la cryosource, pour voir l’influence du paramètre température sur la deutération. J’ai donc également testé les températures de -20°C (courbe en violet) et -10°C (courbe en rouge) (Fig. IV. 12). Quelle que soit la température de la « cryosource », elle nous permet de maintenir constant le taux de deutération au cours de l’analyse. Cependant, plus la température augmente plus le « back-exchange » est important. En effet, à -30°C il est inférieur à 3% tandis qu’à -20°C le « back-exchange » moyen est de 25% et à -10°C il est de 35%. Ceci peut s’expliquer par le fait que la partie correspondant à la sortie de « cryosource », juste avant l’entrée dans la source ESI, n’est pas recouverte par un manchon isolant. Elle est certes refroidie par l’arrivée d’un gaz froid à -30°C mais qui se réchauffe au contact de l’air conduisant à une perte de froid. Lorsque l’intérieur de la boîte est à -30°C alors la sortie de la « cryosource » enregistre une température d’environ -10°C, suffisante pour éviter le ré-échange des deutériums avec les hydrogènes. Mais lorsque la température de la « cryosource » est supérieure à -30°C, *i.e.* à -20°C ou à -10°C, la sortie présente des températures positives conduisant à du « back-exchange ».

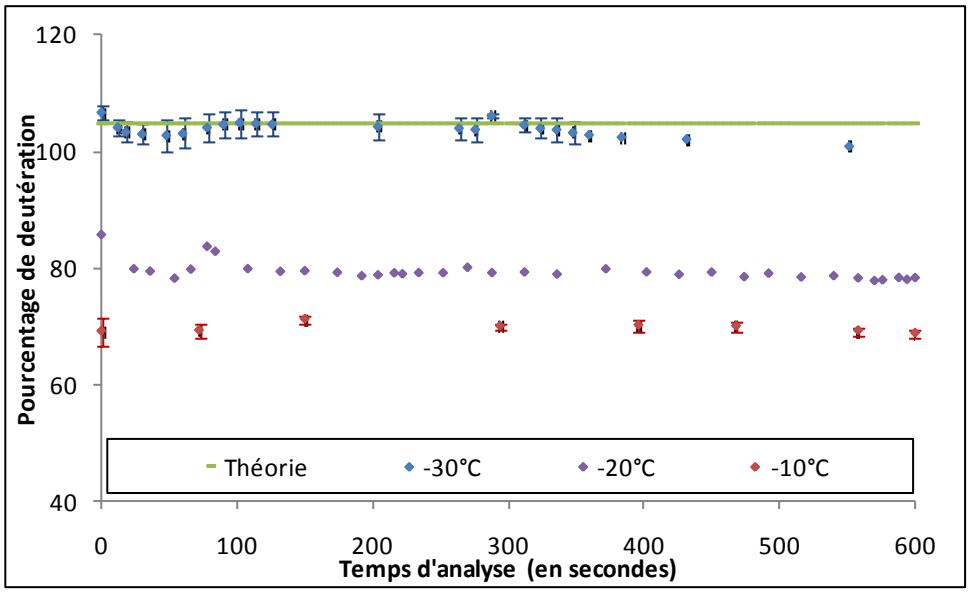


Fig. IV. 12 Effet de la température interne de la « cryosource » sur le maintien en place des deutériums lors de l’analyse MS.

Les Fig. IV. 11 et Fig. IV. 12 montrent que l'utilisation de la « cryosource » à -30°C et avec le refroidissement du gaz de nébulisation, permet de réduire le débit d'injection à 2 µL/min avec un « back-exchange » minimal (< 3%).

Nous avons ensuite voulu quantifier le « back-exchange » imputable à l'étape de dessalage. En effet, le but ultime de cette étude est de pouvoir utiliser notre dispositif d'introduction des échantillons marqués pour l'analyse structurale de protéines et de complexes protéiques réels. D'après le graphe de la Fig. IV. 13, nous concluons que l'étape de dessalage conduit à une perte de 20% de la deutération, lui aussi très stable au cours du temps.

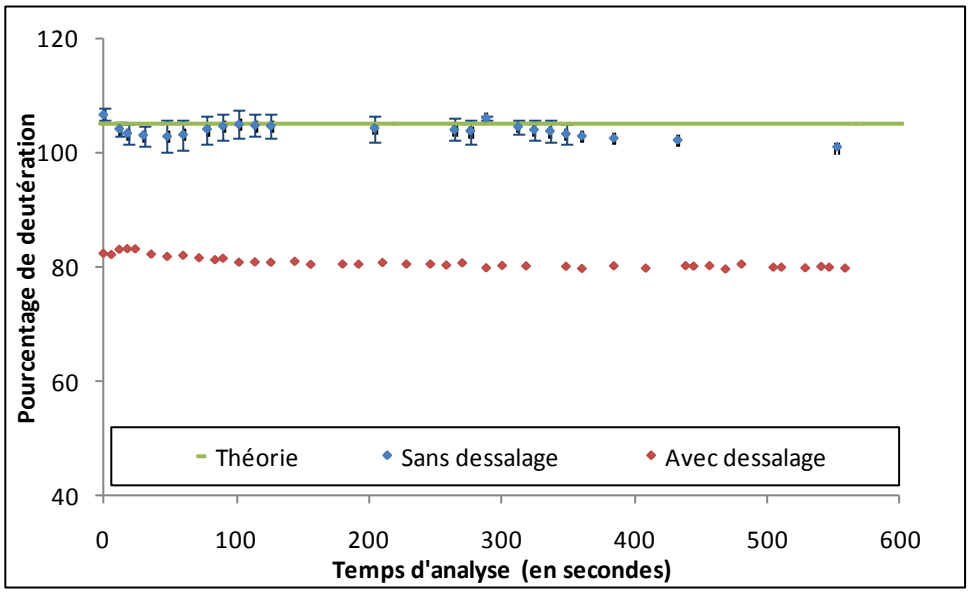


Fig. IV. 13 Effet du dessalage sur le maintien en place des deutériums lors de l'analyse MS.

Nous avons développé un dispositif d'introduction des échantillons marqués dans le spectromètre de masse qui réduit considérablement le « back-exchange ». Nous avons déterminé un ensemble de paramètres optimisés conduisant à moins de 3% d'échange inverse en solution. Pour cela, il est indispensable d'utiliser la « cryosource » pour refroidir l'échantillon, la température optimale du système étant de -30°C pour un débit d'injection de l'analyte de 2 µL/min. Le gaz de nébulisation doit être également refroidi à -30°C. La « cryosource » présente plusieurs avantages. Elle permet de refroidir l'échantillon à très basse température, à une valeur bien au-dessous de zéro degré Celsius, ce qui allonge considérablement le temps d'analyse. La température est en effet stable pendant des temps longs allant jusqu'à une heure. Et elle autorise de plus faibles débits d'injection. Les différents paramètres optimisés au niveau de l'ancien et du nouveau dispositif d'introduction des échantillons marqués sont récapitulés et comparés dans le tableau (Tab. IV. 2). Le dessalage

est maintenant l'étape critique pour la minimisation du « back-exchange ». Il faudrait être capable de le réaliser également à -30°C dans la « cryosource ».

Tab. IV. 2 Comparaison des paramètres optimisés pour les systèmes de seringue refroidie et de « cryosource ».

Paramètres	Seringue refroidie	Cryosource
Température de l'échantillon	0°C	-30°C
Débit d'injection	10 µL/min	2 µL/min
Temps d'analyse maximum	10 min	1 h

Finalement, il convient de noter qu'une dernière amélioration a été apportée à la « cryosource » suite à l'observation de problèmes de reproductibilité présentés ci-dessous. Il apparaissait régulièrement des problèmes de "bouchage" du montage, où après injection le montage se retrouvait à monter en pression au-delà de la limite permise par le pousse-seringue. Après recherche de l'origine de ce problème récurrent, nous avons pu identifier ce problème comme étant arrivé lors de l'ajout du gaz de nébulisation refroidi, et étant lié à une température du tuyau d'amenée de ce gaz largement inférieure à celle de l'enceinte (-65°C mesurés à la jonction avec la source ESI). L'augmentation de viscosité voire la cristallisation au niveau de ces "points froids" pourrait être à l'origine de ces phénomènes de bouchage. Ce problème a été réglé en améliorant les échanges thermiques dans l'enceinte, à la fois par l'augmentation du contact tuyau du gaz de nébulisation/ruban chauffant, mais également par l'ajout d'un ventilateur dans l'enceinte. Une contrepartie de ces ajouts est une perte de la capacité de refroidissement en dessous de -30°C.

IV.3.3.2. **Validation de la « cryosource » et optimisation sur des peptides**

Nous avons ensuite souhaité valider notre dispositif d'introduction des échantillons marqués permettant la minimisation du « back-exchange » sur des peptides modèles sélectivement deutérés. En effet, ces peptides sont spécifiquement construits pour la mise au point d'expériences HDX/MS. Leur analyse permet d'étudier les phénomènes de « back-exchange » et plus particulièrement de « scrambling ».

IV.3.3.2.1. *Validation de la « cryosource » pour HHHHHHIIKIIK*

Le peptide HHHHHHIIKIIK complètement deutéré est sélectivement démarqué du côté N-terminal après dilution dans une solution H_2O acide et à basse température. Après dix minutes d'incubation dans H_2O glacée, le peptide introduit par la cryosource dans le spectromètre de masse FT-ICR contient bien 4,5 deutériums. Le résultat est conforme à la publication de T. Jørgensen (*26*). De plus, au cours de l'analyse MS, le nombre de deutériums reste constant par rapport à l'utilisation du système de seringue refroidie (Fig. IV. 14). La « cryosource » permet donc de réduire au maximum l'échange inverse dans le cas également de l'analyse du peptide HHHHHHIIKIIK par HDX. Le système peptide modèle/ « cryosource » permettra d'étudier par la suite le « scrambling » avec précision.

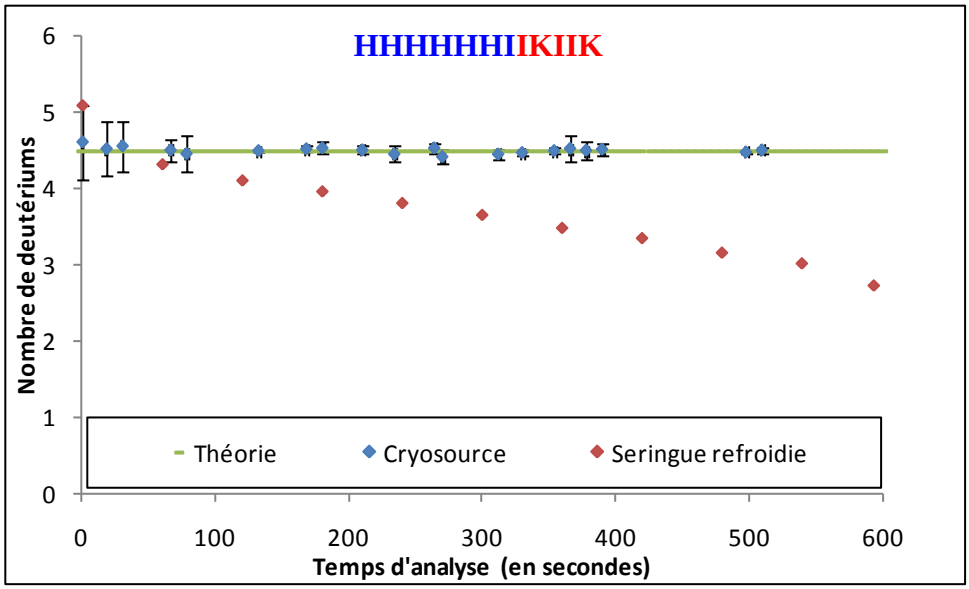


Fig. IV. 14 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse. Comparaison de la « cryosource » vs. la seringue refroidie.

IV.3.3.2.2. *Cas du peptide KKDDDDDDIIKIIK*

La même expérience est réalisée avec le peptide KKDDDDDDIIKIIK qui appartient à la même famille que HHHHHHIIKIIK. Dans un premier temps, il est complètement deutéré par incubation dans D_2O. Puis, il est sélectivement démarqué du côté N-terminal par dilution dans une solution H_2O acide et à basse température. Après dix minutes d'incubation dans H_2O glacée, le peptide est finalement injecté dans la « cryosource » puis analysé en spectrométrie de masse. Son nombre de deutériums est alors supérieur (5,6) à celui attendu (4,5) (Fig. IV. 15). Avant de tester la stabilité de la « cryosource », il nous faut déterminer le temps

d'incubation dans H_2O glacée pour lequel le peptide aura incorporé 4,5 deutériums. Apparemment, ce temps serait supérieur à quatorze minutes.

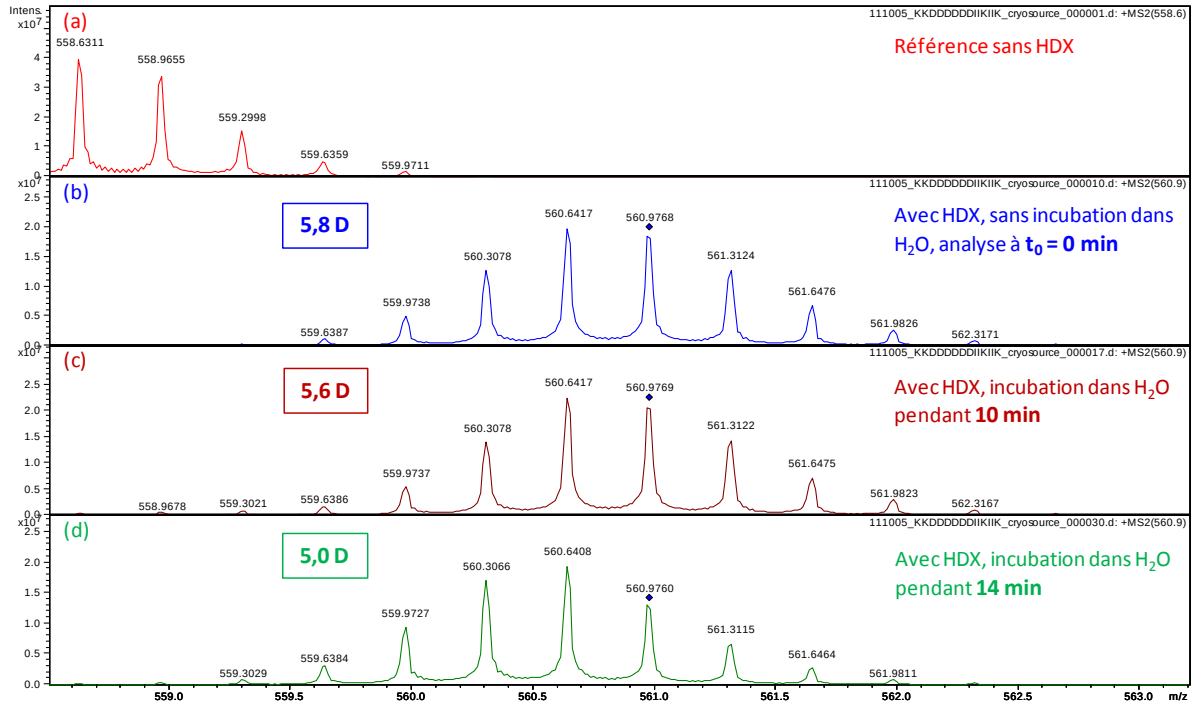


Fig. IV. 15 Zoom du massif isotopique de l'ion parent [M+3H] $^{3+}$ *dans les spectres MS du peptide KKDDDDDDIIKIIK. Les échantillons marqués sont introduits par la « cryosource » et le nombre de deutériums incorporés est calculé après différents temps d'incubation dans* H_2O*,* t_0*=0 min (b), 10 min (c) et 14 min (d), par rapport à la référence sans marquage (a).*

IV.3.3.2.2.1. Détermination du temps d'incubation pour le démarquage sélectif

J'ai donc décidé de retravailler avec le système de seringue refroidie pour pouvoir déterminer ce temps. Le montage réalisé a été le suivant : après que l'échantillon ait été complètement deutéré, il a été dilué dans une solution H_2O acide et à basse température pour bloquer la réaction d'échange H/D. Il a ensuite été immédiatement prélevé et injecté à 10 µL/min par la seringue refroidie qui a été entourée par deux sachets de glace. L'acquisition des données a été réalisée pendant vingt-cinq minutes. Les résultats sont donnés dans la Fig. IV. 16. Avec le système de seringue refroidie, le temps requis semble être de quatorze minutes alors qu'il paraissait être supérieur avec la « cryosource ».

La difficulté générale à laquelle nous n'avions pas pensé initialement est la suivante : les hydrogènes d'amide ne se démarquent pas à la même vitesse, et dans les expériences de T. Jørgensen, la fin du démarquage a lieu dans le capillaire de transfert qui est à température

ambiante. Elle est donc incontrôlable. La « cryosource », quant à elle, ne comporte pas de capillaire de transfert à température ambiante pour finir le démarquage. Par conséquent, il nous faut déterminer, avec ce nouveau mode d'introduction, le temps d'incubation des peptides dans H_2O pour les démarquer sélectivement et avoir exactement le bon nombre initial de deutériums. Il semblerait que ce temps d'incubation soit plus long dans le cas de l'utilisation de la « cryosource ».

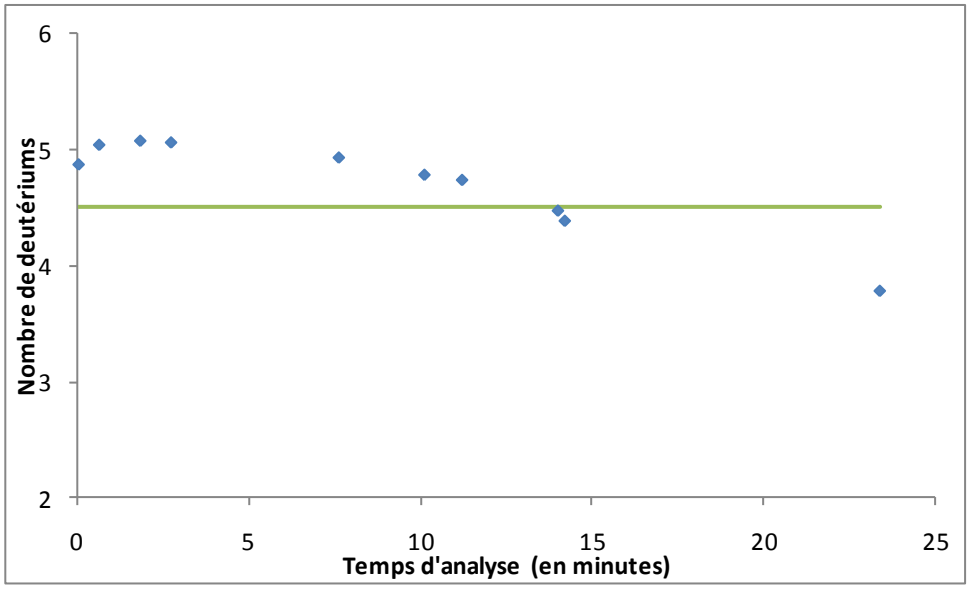


Fig. IV. 16 Nombre de deutériums de l'ion parent $[M+3H]^{3+}$ du peptide KKDDDDDDIIKIIK calculé en fonction du temps de résidence dans la seringue refroidie à 0°C tout au long de l'analyse.

Par conséquent, j'ai travaillé de nouveau avec la « cryosource », par tâtonnements. J'ai réalisé plusieurs essais (Fig. IV. 17). Un essai correspond à une incubation du peptide complètement marqué dans H_2O glacée et à une ou plusieurs injections dans la « cryosource » à différents temps. D'après les résultats du premier essai (points en bleu), le nombre de deutériums retenu par le peptide sélectivement démarqué après vingt minutes d'incubation est supérieur (5,3) à ce qui est attendu (4,5) mais après trente minutes il est inférieur (4,0). Un deuxième essai a donc été réalisé après vingt-cinq minutes d'incubation (point rouge), supposé être le temps que l'on cherche à déterminer. Mais le nombre de deutériums s'est avéré bien supérieur (6,8) à ce que nous attendions. Un troisième essai (point orange) à trente minutes d'incubation a donné exactement le même nombre de deutériums (5,3) qu'une mesure effectuée précédemment à vingt minutes (1^{er} essai). Un dernier essai a été réalisé pour différents temps d'incubation allant de vingt à soixante minutes (points en violet) laissant supposer que vingt-cinq minutes serait le temps recherché. Notons ici que je n'ai pas eu de

signal en spectrométrie de masse pour des temps d'incubation inférieurs à vingt minutes. Pourtant, j'ai testé les temps t= {0 ; 15} min. Par conséquent, les résultats ne sont pas reproductibles et il semblerait que j'ai rencontré des problèmes de bouchage en raison de l'apparition de "points froids" dans le montage.

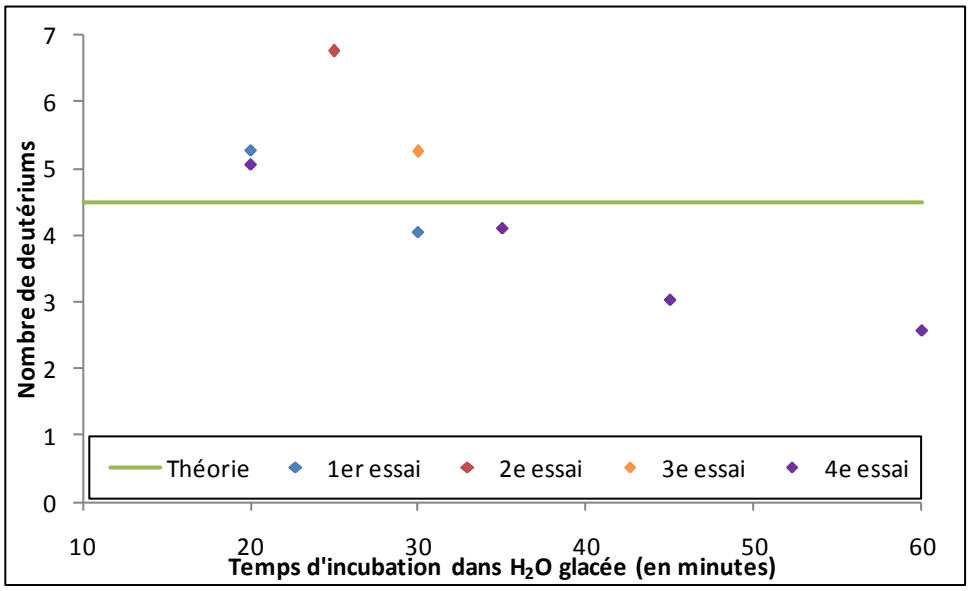


Fig. IV. 17 Nombre de deutériums en fonction du temps d'incubation dans H_2O glacée.

J'ai alors réalisé le même type d'expérience un autre jour en augmentant le débit à 2,5 µL/min (courbe noire, Fig. IV. 18). Cela m'a permis finalement d'obtenir du signal pour des temps t= {0 ; 15} min. Cependant, le temps d'incubation dans H_2O glacée pour avoir le bon nombre de deutériums initial semble avoir considérablement été réduit (de 25 à 10 min environ). Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, la même expérience est réalisée un autre jour (courbe orange). Puis, j'ai effectué deux autres essais (courbes bleue et rouge) le même jour après avoir recouvert la sortie de la « cryosource » qui se branche sur la source ESI du FT-ICR par un manchon isolant. L'idée ici est de limiter au maximum les pertes de froid à cet endroit. La température diminue passant de -8°C à -15°C. Ainsi, le nombre de deutériums est augmenté. Les résultats semblent reproductibles et désormais un temps d'incubation de quinze minutes semble convenir.

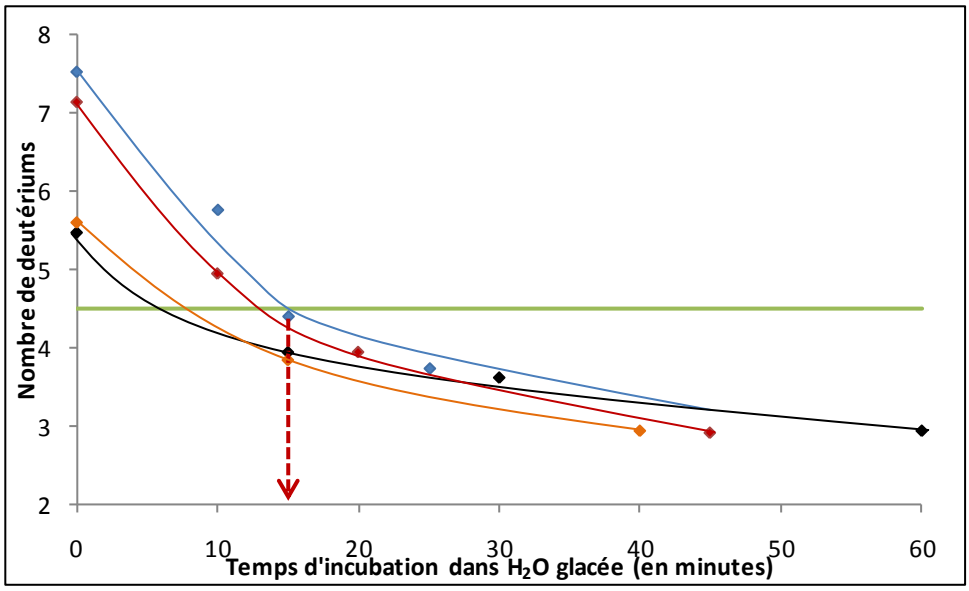


Fig. IV. 18 Nombre de deutériums en fonction du temps d'incubation dans H_2O glacée. Le débit d'injection a été augmenté à 2,5 µL/min et la sortie de la « cryosource » isolée thermiquement (courbes en bleu et en rouge).

IV.3.3.2.2.2. Vérification de la stabilité de la deutération dans la « cryosource »

Après quinze minutes d'incubation dans H_2O glacée, le peptide est de nouveau injecté dans la « cryosource » puis analysé par spectrométrie de masse. Son nombre de deutériums est, une nouvelle fois, supérieur (5,6) à celui attendu (4,5). De plus, un phénomène tout à fait incompréhensible est observé : le nombre de deutériums augmente lors des premières minutes de l'analyse alors que le peptide est stocké à -30°C dans la « cryosource ». Le peptide gagne deux deutériums supplémentaires au bout de cinq minutes, passant de 5,6 à 7,6 deutériums (Fig. IV. 19). Dans ces conditions, la minimisation du « scrambling » en utilisant le peptide KKDDDDDDIIKIIK et la « cryosource » ne peut pas être envisagée.

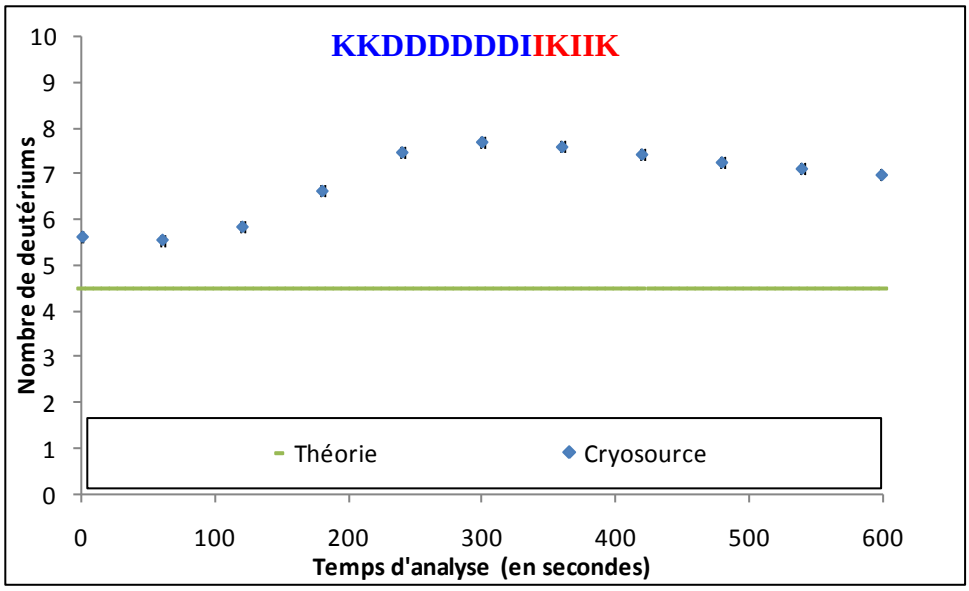


Fig. IV. 19 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse.

Pour s'assurer que ce phénomène n'est pas un artéfact expérimental mais qu'il est reproductible, la même expérience est réalisée à différents temps t= {0 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30} min d'incubation dans H_2O glacée (Fig. IV. 20). Les différentes courbes présentent la même allure définie par deux parties. La première partie qui correspond aux cinq premières minutes d'analyse montre une augmentation du nombre de deutériums tandis que la seconde partie est caractérisée par une diminution du nombre de deutériums. Le temps d'incubation dans H_2O glacée a été changé et vingt minutes semblent maintenant convenir.

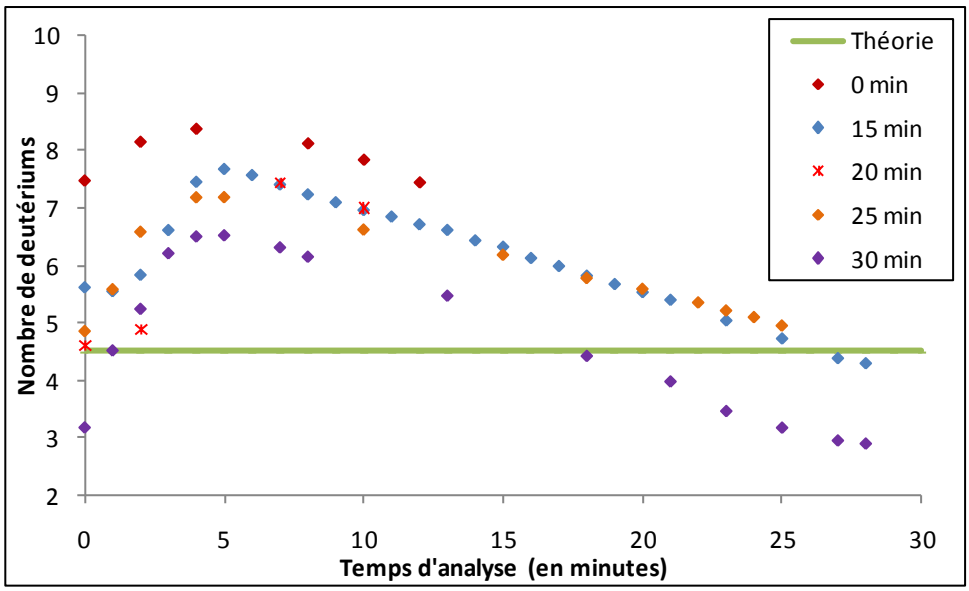


Fig. IV. 20 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse pour différents temps d'incubation dans H_2O glacée.

Pour essayer de comprendre scientifiquement le phénomène, en utilisant le même jeu de données, j'ai tracé le graphe suivant : intensité des ions formés en fonction du temps d'analyse (Fig. IV. 21). Les courbes présentent la même allure que celles du graphe de la figure précédente (Fig. IV. 20). L'intensité des ions semble varier comme le nombre de deutériums.

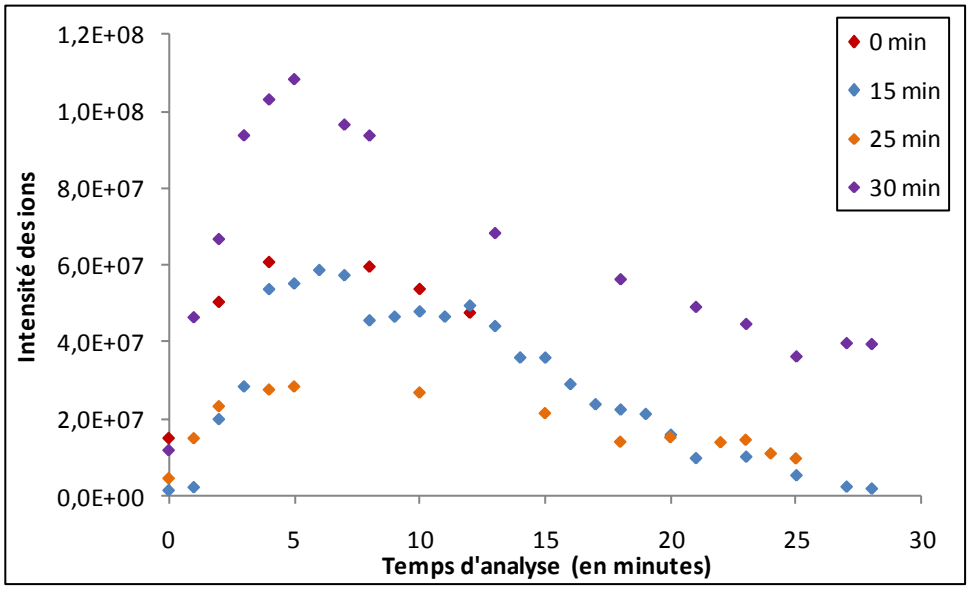


Fig. IV. 21 Intensité des ions en fonction du temps d'analyse pour les différents temps d'incubation testés.

Nous décidons alors de tracer le graphe de l'intensité des ions en fonction du nombre de deutériums (Fig. IV. 22). Il apparaît alors clairement qu'il existe une corrélation entre le nombre d'ions formés et le nombre de deutériums retenus. Or, les facteurs qui peuvent influencer le nombre d'ions formés sont le pH et la concentration en analyte. En effet, un pH acide et une concentration élevée d'échantillon favorisent la formation d'ions. Sachant que les échanges H/D sont contrôlés non seulement par la température mais aussi par le paramètre pH, alors le phénomène que nous observons ressemblerait à un effet de pH. Cet effet de pH s'expliquerait par un effet de mélange entre la solution contenant l'échantillon (peptide complètement deutéré dilué au 1/100^{e} dans une solution H_2O/MeOH : 40/60 acidifiée) et le solvant (H_2O/MeOH : 40/60) qui sert à pousser l'analyte vers la source du spectromètre de masse (Fig. IV. 23).

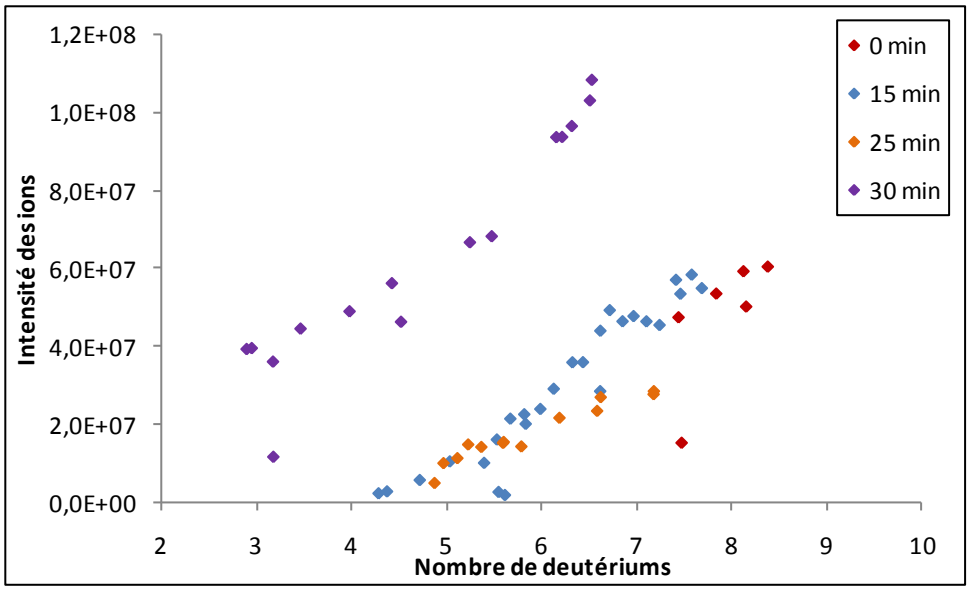


Fig. IV. 22 Intensité des ions en fonction du nombre de deutériums pour les différents temps d'incubation testés.

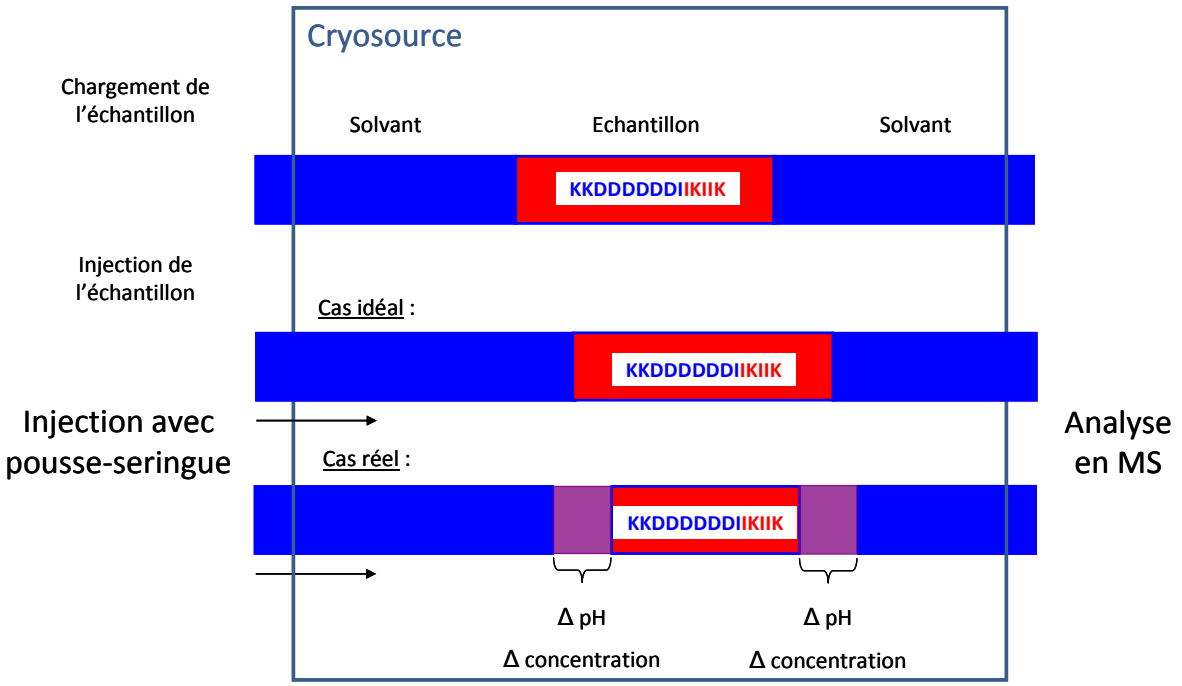


Fig. IV. 23 Schéma explicatif de l'hypothèse de l'effet de mélange observé.

Afin de s'affranchir de l'effet de mélange, nous avons décidé de modifier la composition du solvant, de façon à avoir exactement la même que pour l'échantillon. Autrement dit, nous l'avons acidifié et légèrement deutéré. Le nouveau solvant est un mélange H_2O/MeOH : 40/60 auquel a été ajouté 0,5 M d'acide acétique et 1% de D_2O. Il est conservé à -20°C avant chaque utilisation. Un sachet de glace est également déposé sur la seringue contenant le solvant lors de l'analyse par MS. Le lavage des capillaires en PEEK (boucle et celui

d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse) est désormais réalisé grâce au nouveau solvant. Puis, j'ai testé l'effet du débit d'injection sur la rétention du marquage dans la « cryosource » (Fig. IV. 24 et Fig. IV. 25). Les résultats montrent que phénomène s'amplifie avec l'augmentation du débit, ce qui est inattendu.

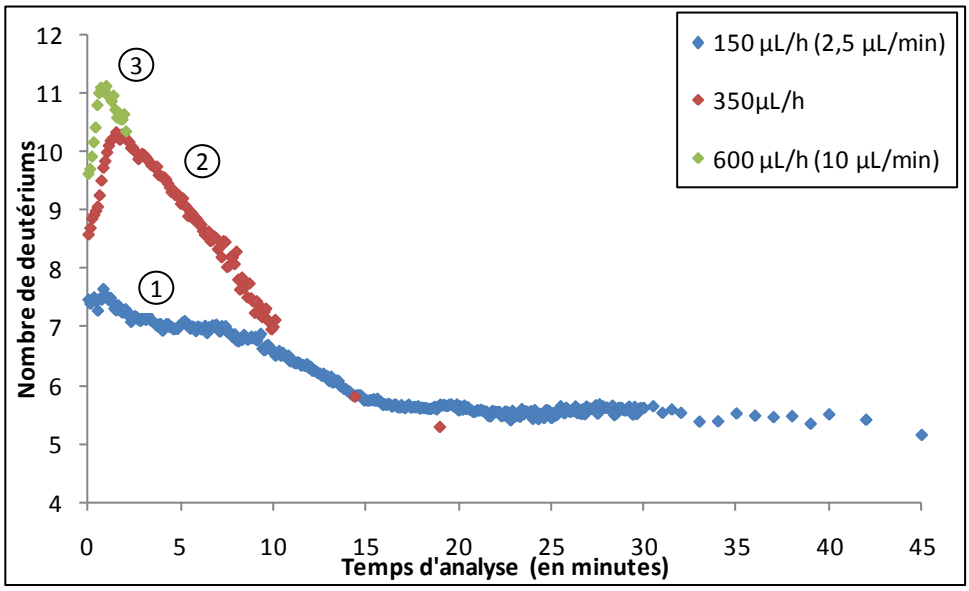


Fig. IV. 24 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse pour différents débits d'injection sans incubation dans H_2O glacée. Les analyses sont réalisées dans l'ordre croissant du débit d'injection.

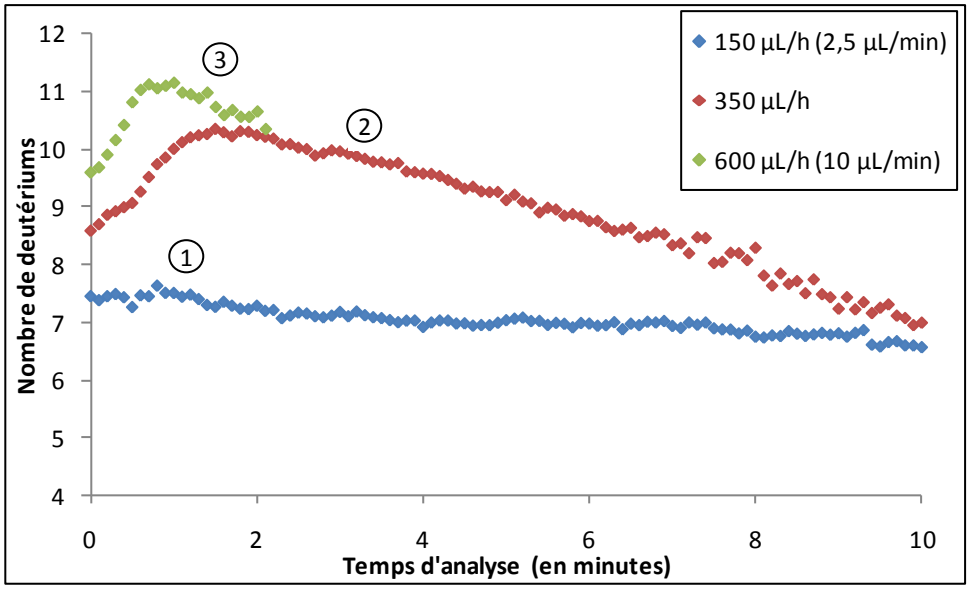


Fig. IV. 25 Zoom de la Fig. IV. 24 pour les dix premières minutes d'analyse.

Les mêmes expériences ont ensuite été réalisées en changeant l'ordre des différents débits d'injection testés (Fig. IV. 26 et Fig. IV. 27).

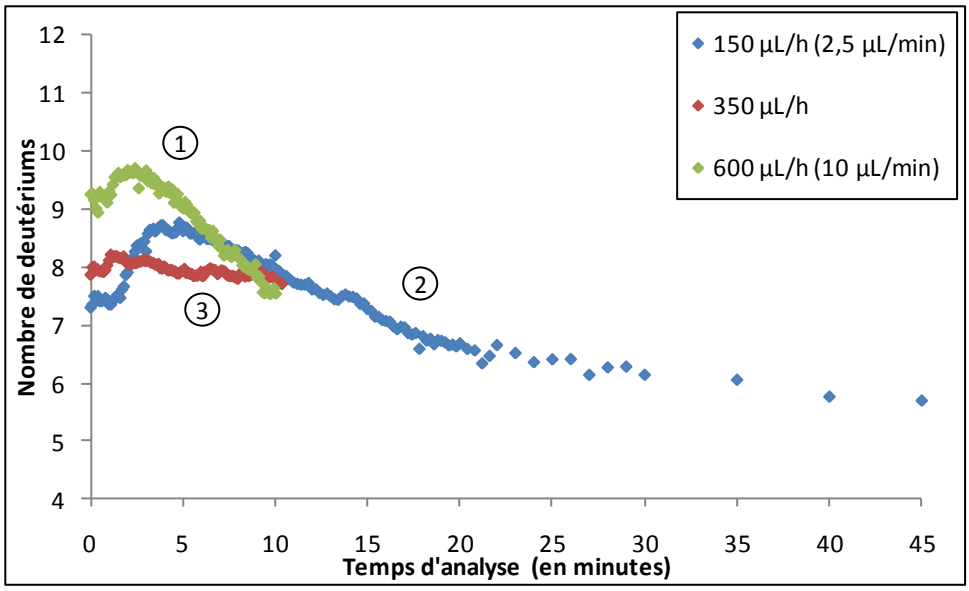


Fig. IV. 26 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse pour différents débits d'injection sans incubation dans H_2O glacée. Le débit d'injection de 600 µL/h est testé en premier puis celui de 150 µL/h et enfin celui de 350 µL/h.

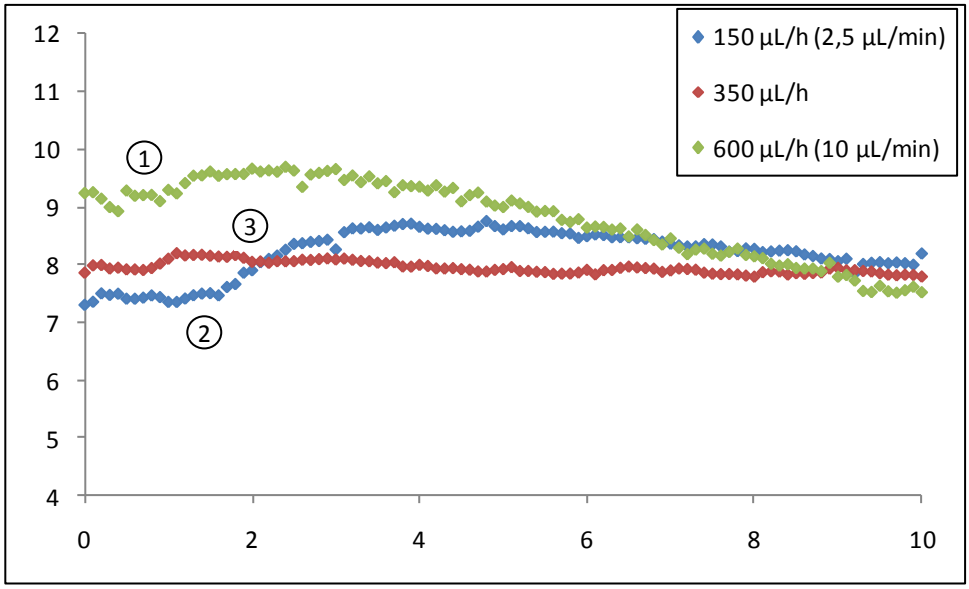


Fig. IV. 27 Zoom de la Fig. IV. 26 pour les dix premières minutes d'analyse.

Les résultats ne sont pas reproductibles. Nous décidons alors de raccourcir au maximum le capillaire en PEEK qui transfère le solvant dans la « cryosource » (67 cm → 22 cm) et de recommencer une nouvelle série de mesures en changeant une nouvelle fois l'ordre des différents débits d'injection testés (Fig. IV. 28). Les résultats obtenus ne sont toujours pas satisfaisants.

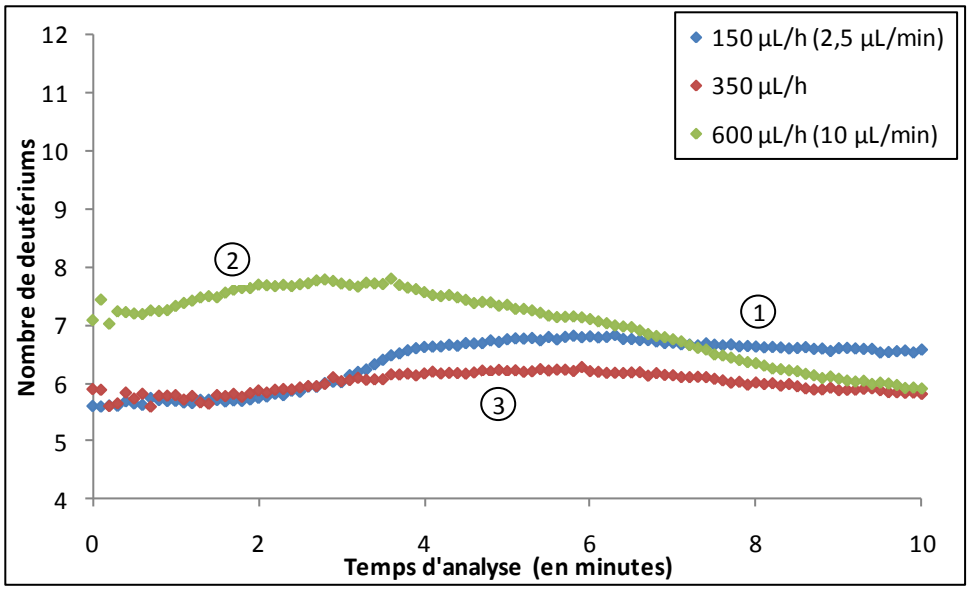


Fig. IV. 28 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse pour différents débits d'injection sans incubation dans H_2O glacée. Le débit d'injection de 150 µL/h est testé en premier puis celui de 360 µL/h et enfin celui de 350 µL/h.

Nous avons ensuite voulu découpler l'effet du débit à celui du temps en réalisant trois fois consécutivement la même expérience dans les mêmes conditions avec le même débit et en testant les deux débits extrêmes 2 µL/min et 10 µL/min (réalisation de triplicats). De nouvelles conditions expérimentales ont été définies. La « cryosource » est équilibrée pendant trente minutes après qu'elle ait atteint sa température de -30°C. Auparavant, les analyses étaient lancées sans l'étape de stabilisation de la « cryosource ». De plus, l'ajout d'azote liquide dans le récipient servant à refroidir le système n'est désormais plus effectué pendant l'analyse mais uniquement entre deux analyses. Les résultats sont donnés dans la Fig. IV. 29. Le nombre de deutériums n'est toujours pas stable lors de l'analyse par MS.

Il semblerait que la température à l'intérieur de la « cryosource » ne soit pas homogène en tout point. L'ajout d'une seconde sonde thermique proche de la source du spectromètre de masse pourrait mettre en évidence le différentiel de température.

Une idée serait de rincer la boucle d'injection avec un solvant identique mais complètement deutéré (D_2O/CH_3OD/CH_3COOD) afin de comparer les résultats.

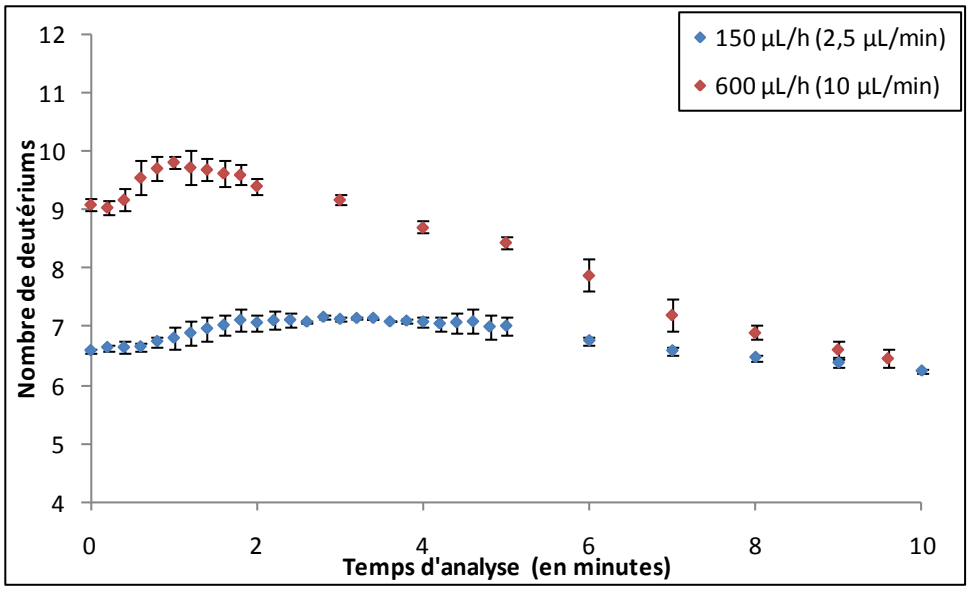


Fig. IV. 29 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse pour les débits d'injection de 2 µL/min et 10 µL/min sans incubation dans H_2O glacée.

Le peptide KKDDDDDDIIKIIK semble être très sensible vis-à-vis de la deutération à un (ou plusieurs) paramètre(s) relatif(s) à l'utilisation de la « cryosource » que nous n'identifions ni ne contrôlons. Pour vérifier si ces problèmes étaient généraux ou spécifiques de ce peptide, nous avons décidé d'effectuer nos tests sur un peptide plus classique, le Glufibrinopeptide (GluF).

IV.3.3.2.3. ***Cas du peptide GluF***

Le peptide GluF n'est pas un peptide classiquement utilisé pour la mise au point d'expériences HDX/MS mais il nous sert au laboratoire comme standard de calibration en MS/MS car il se fragmente pour donner de nombreux ions *b* et *y* en CID.

Fort heureusement, l'analyse du GluF à l'aide de la cryosource, après incubation dans D_2O et dilution dans les solvants hydrogénés indique que le marquage reste stable au cours de l'analyse par spectrométrie de masse. (Fig. IV. 30). Ces résultats montrent que les problèmes que nous avons rencontrés précédemment semblent liés à la nature du peptide $K_2D_6IIKIIK$ et permettent, enfin, de valider l'utilisation de la « cryosource » minutieusement optimisée pour des études HDX/MS.

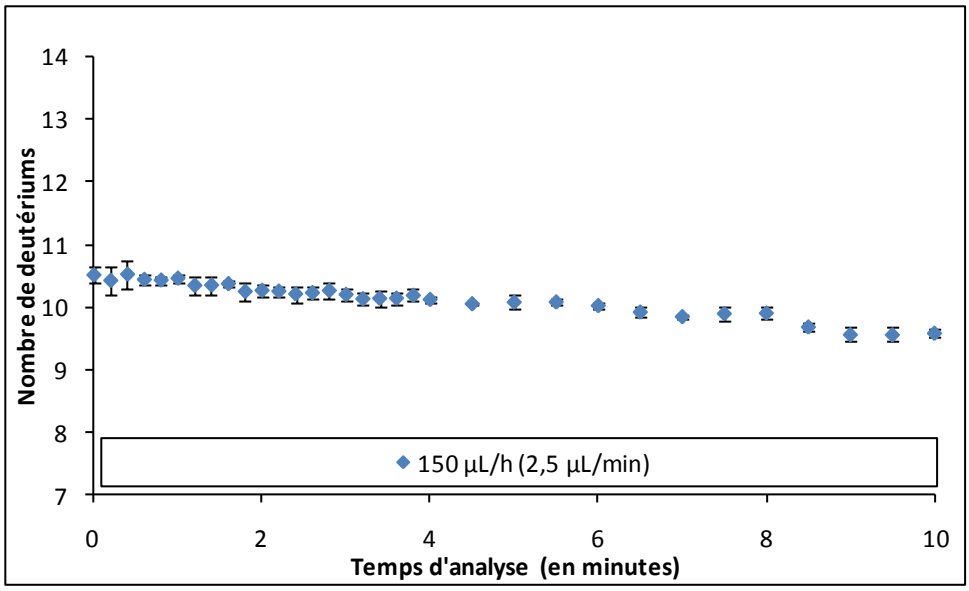


Fig. IV. 30 Nombre de deutériums en fonction du temps d'analyse après injection du peptide GluF deutéré dans la « cryosource ».

IV.3.4. Conclusion

Nous avons développé un nouveau système d'introduction des protéines deutérées dans le spectromètre de masse que nous avons appelé « cryosource ». L'utilisation de cette « cryosource » permet le stockage des échantillons dans une enceinte isolée à -30°C, ce qui évite le démarquage pendant des temps longs (une heure) et permet également de travailler avec des débits faibles de l'ordre de 2 µL/min.

L'optimisation de tous les paramètres expérimentaux pour la « cryosource » a été réalisée à l'aide de peptides sélectivement marqués et également sur l'ubiquitine, protéine modèle de 8,6 kDa.

L'analyse du peptide de référence KKDDDDDDIIKIIK a permis une optimisation plus fine des paramètres. Des améliorations techniques ont été apportées. Le solvant utilisé pour pousser l'échantillon jusqu'à la source du spectromètre de masse, a été modifié. Il a été acidifié (acide acétique 0,5M) et deutéré (1% D_2O) afin d'avoir la même composition que celle de l'échantillon. Il a également été conservé à -20°C avant son utilisation. L'analyse est réalisée avec un sachet de glace sur la seringue contenant le solvant et le capillaire en PEEK d'entrée dans la « cryosource » a été raccourci (67 cm → 22 cm). La sortie de la « cryosource » assurant le couplage avec la source ESI, a été, quant à elle, isolée. La

température optimale de la « cryosource » est de -30°C pour un débit optimum de 2,5 µL/min. Avant le début des analyses, la « cryosource » est équilibrée à -30°C pendant trente minutes pendant lesquelles le solvant est continuellement injecté permettant le rinçage des capillaires. Le remplissage d'azote liquide pour le refroidissement du système est réalisé entre deux analyses concomitamment à une étape de lavage des capillaires de vingt minutes grâce au solvant.

La toute dernière innovation apportée à la « cryosource » est l'ajout d'un ventilateur afin d'homogénéiser la température à l'intérieur de la boîte.

Notre objectif final est d'utiliser le dispositif d'introduction des échantillons marqués que nous avons développé dans une approche HDX top-down ECD pour obtenir des informations structurales sur des complexes protéiques responsables de l'initiation de la traduction dans le cadre d'une collaboration avec laboratoire de Biochimie de l'École Polytechnique. Et plus généralement, de fournir à la communauté des biologistes structuraux une méthodologie robuste pour l'analyse de protéines et complexes protéiques par échanges isotopiques H/D et spectrométrie de masse à très haute résolution (FT-ICR).

J'aimerais souligner le fait que des travaux similaires ont été menés par l'équipe du Prof. T. Jørgensen au Danemark pour le même objectif de réduire le « back-exchange » lors d'études HDX par top-down ECD ou ETD. Dans leur cas, ils ont développé un système de refroidissement des échantillons à -15°C tout aussi efficace à partir du système TriVersa NanoMate de la société Advion (*28*).

IV.4. Bibliographie

1. Zehl, M., Rand, K. D., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron transfer dissociation facilitates the measurement of deuterium incorporation into selectively labeled peptides with single residue resolution, *J Am Chem Soc 130*, 17453-17459.
2. Rand, K. D., Adams, C. M., Zubarev, R. A., and Jorgensen, T. J. (2008) Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens, *J Am Chem Soc 130*, 1341-1349.
3. Rand, K. D., Zehl, M., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2009) Protein hydrogen exchange measured at single-residue resolution by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Analytical Chemistry 81*, 5577-5584.
4. Liuni, P., Rob, T., and Wilson, D. J. (2010) A microfluidic reactor for rapid, low-pressure proteolysis with on-chip electrospray ionization, *Rapid Commun Mass Spectrom 24*, 315-320.
5. Lam, T. T., Lanman, J. K., Emmett, M. R., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G., and Prevelige, P. E. (2002) Mapping of protein:protein contact surfaces by hydrogen/deuterium exchange, followed by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass analysis, *J Chromatogr A 982*, 85-95.
6. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2010) Characterizing short-lived protein folding intermediates by top-down hydrogen exchange mass spectrometry, *Analytical Chemistry 82*, 8591-8597.
7. Mandell, J. G., Falick, A. M., and Komives, E. A. (1998) Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility, *Proc Natl Acad Sci U S A 95*, 14705-14710.
8. Baerga-Ortiz, A., Hughes, C. A., Mandell, J. G., and Komives, E. A. (2002) Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein, *Protein Sci 11*, 1300-1308.
9. Tuma, R., Coward, L. U., Kirk, M. C., Barnes, S., and Prevelige, P. E., Jr. (2001) Hydrogen-deuterium exchange as a probe of folding and assembly in viral capsids, *J Mol Biol 306*, 389-396.
10. Hosia, W., Johansson, J., and Griffiths, W. J. (2002) Hydrogen/deuterium exchange and aggregation of a polyvaline and a polyleucine alpha-helix investigated by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Mol Cell Proteomics 1*, 592-597.
11. Nazabal, A., Laguerre, M., Schmitter, J. M., Vaillier, J., Chaignepain, S., and Velours, J. (2003) Hydrogen/deuterium exchange on yeast ATPase supramolecular protein complex analyzed at high sensitivity by MALDI mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom 14*, 471-481.
12. Zhang, Z., and Smith, D. L. (1993) Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci 2*, 522-531.
13. Kipping, M., and Schierhorn, A. (2003) Improving hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry by reduction of the back-exchange effect, *J Mass Spectrom 38*, 271-276.
14. Demmers, J. A., Haverkamp, J., Heck, A. J., Koeppe, R. E., 2nd, and Killian, J. A. (2000) Electrospray ionization mass spectrometry as a tool to analyze hydrogen/deuterium exchange kinetics of transmembrane peptides in lipid bilayers, *Proc Natl Acad Sci U S A 97*, 3189-3194.

15. Last, A. M., Schulman, B. A., Robinson, C. V., and Redfield, C. (2001) Probing subtle differences in the hydrogen exchange behavior of variants of the human alpha-lactalbumin molten globule using mass spectrometry, *Journal of Molecular Biology 311*, 909-919.
16. Wang, L., and Smith, D. L. (2003) Downsizing improves sensitivity 100-fold for hydrogen exchange-mass spectrometry, *Anal Biochem 314*, 46-53.
17. Daubenfeld, T. (2006) Etude de complexes protéiques non covalents par spectrométrie de masse FT-ICR.
18. Eghiaian, F., Daubenfeld, T., Quenet, Y., van Audenhaege, M., Bouin, A. P., van der Rest, G., Grosclaude, J., and Rezaei, H. (2007) Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage, *Proc Natl Acad Sci U S A 104*, 7414-7419.
19. Woods, V. L., Jr., and Hamuro, Y. (2001) High resolution, high-throughput amide deuterium exchange-mass spectrometry (DXMS) determination of protein binding site structure and dynamics: utility in pharmaceutical design, *J Cell Biochem Suppl Suppl 37*, 89-98.
20. Emmett, M. R., Kazazic, S., Marshall, A. G., Chen, W., Shi, S. D., Bolanos, B., and Greig, M. J. (2006) Supercritical fluid chromatography reduction of hydrogen/deuterium back exchange in solution-phase hydrogen/deuterium exchange with mass spectrometric analysis, *Analytical Chemistry 78*, 7058-7060.
21. Botosoa, E. P., Silvestre, V., Robins, R. J., Rojas, J. M., Guillou, C., and Remaud, G. S. (2009) Evidence of 13C non-covalent isotope effects obtained by quantitative 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy at natural abundance during normal phase liquid chromatography, *J Chromatogr A 1216*, 7043-7048.
22. Filer, C. N. (1999) Isotopic fractionation of organic compounds in chromatography, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 42*, 169-197.
23. Duchateau, M. (2010) Détermination de surface d'interaction d'assemblages biologiques macromoléculaires par marquage au deutérium et analyse par spectrométrie de masse FT-ICR.
24. Pan, J., Han, J., Borchers, C. H., and Konermann, L. (2008) Electron capture dissociation of electrosprayed protein ions for spatially resolved hydrogen exchange measurements, *J Am Chem Soc 130*, 11574-11575.
25. Sterling, H. J., and Williams, E. R. (2010) Real-Time Hydrogen/Deuterium Exchange Kinetics via Supercharged Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry 82*, 9050-9057.
26. Rand, K. D., and Jorgensen, T. J. (2007) Development of a peptide probe for the occurrence of hydrogen (1H/2H) scrambling upon gas-phase fragmentation, *Analytical Chemistry 79*, 8686-8693.
27. Bache, N., Rand, K. D., Roepstorff, P., and Jorgensen, T. J. (2008) Gas-phase fragmentation of peptides by MALDI in-source decay with limited amide hydrogen (1H/2H) scrambling, *Analytical Chemistry 80*, 6431-6435.
28. Amon, S., Trelle, M. B., Jensen, O. N., and Jorgensen, T. J. (2012) Spatially resolved protein hydrogen exchange measured by subzero-cooled chip-based nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry 84*, 4467-4473.

Conclusion générale

L'objectif initial de ce travail de thèse était de mettre au point une méthode robuste "top-down HDX-MS/MS" (c'est-à-dire combinant échanges hydrogène/deutérium en solution et fragmentation de protéines entières en phase gazeuse) pour pouvoir obtenir des informations structurales sur des complexes protéiques réels. Combiner échanges H/D et spectrométrie de masse n'est pas nouveau, mais les méthodes classiquement utilisées dites "bottom-up" et basées sur une digestion enzymatique présentent l'inconvénient majeur d'être peu résolutives (5-10 acides aminés en moyenne). Mettre au point des approches sur protéines entières présente sur le principe un grand nombre d'avantages : le premier gain attendu est pour la résolution (qui peut atteindre un seul acide aminé), le second est pour l'échange inverse (« back-exchange ») qui devrait en théorie être plus limité car le nombre d'étapes lors desquels ce phénomène peut se produire (digestion enzymatique, séparation chromatographique) est réduit.

Ce travail de thèse montre cependant qu'il n'est pas aisé de mettre une méthode "top-down HDX" au point et que nous avons dû faire face à un certain nombre de problèmes.

Tout d'abord les résultats obtenus pour les peptides que l'on peut sélectivement marquer montrent qu'il est important d'optimiser de manière fine un certain nombre de paramètres expérimentaux, que ce soit dans la source d'ionisation ou à différents endroits de l'instrument pour éviter au maximum l'échange inverse entre deutériums et hydrogènes. Nos résultats montrent également que ces paramètres sont dépendants du spectromètre de masse sur lequel les expériences sont réalisées et que l'analyse de peptides sélectivement marqués devrait être un pré-requis pour toutes les études par échange H/D. Nos résultats confirment également que l'ECD peut être utilisé pour localiser de manière précise les deutériums dans la séquence et qu'une résolution à l'acide aminé près peut être obtenue, ce qui est une amélioration majeure par rapport aux expériences classiques de bottom-up sans fragmentation.

Sur la base du protocole optimisé pour des peptides, nous avons souhaité poursuivre l'analyse du complexe aIF2 impliqué dans l'initiation de la traduction chez les archées. Nous avons alors fait face à un certain nombre de problèmes. Le premier a été le manque de reproductibilité de nos expériences, avec des variations importantes au niveau du nombre de deutériums incorporés et de leur localisation. Un point crucial que nous avons mis en évidence au cours de nos travaux est que pour une protéine, contrairement à un peptide, le nombre de fragments est important, leur intensité couvre un large domaine dynamique et la deutération réduit fortement l’intensité totale. Par conséquent, il est nécessaire d’accumuler un

grand nombre de scans MS/MS pour faire augmenter le rapport signal sur bruit des fragments peu intenses et que dans ce cas le problème de l'échange inverse devient majeur. En effet, alors que pour des peptides, l'élargissement des pics dû à la deutération ne pose pas réellement de problème d'analyse car les masses des fragments ne sont pas très élevées, et le nombre de fragments n'est pas très important, le problème est tout autre quand on passe sur des systèmes plus grands, ne serait-ce que pour une petite protéine de 10 kDa. Ainsi, il devient tout à fait crucial de pouvoir accumuler pendant un temps suffisant pour pouvoir analyser correctement les massifs isotopiques larges qui sont obtenus (et qui s'élargissent au fur et à mesure que la cinétique de deutération avance). Par ailleurs, le nombre de fragments obtenus pour une protéine de 10 kDa est bien supérieur à ce que l'on attend pour un peptide et le chevauchement des massifs isotopiques dans les spectres MS/MS devient également un problème qui conduit à une diminution importante des couvertures de séquence entre l'échantillon non deutéré et l'échantillon deutéré.

Nos résultats obtenus sur aIF2 sont néanmoins prometteurs et montrent qu'il est réellement possible d'obtenir une résolution à l'acide aminé près sur certains segments de la protéine et que de nouvelles améliorations de l'approche devraient permettre d'arriver à l'objectif initial que nous nous étions fixés. L'ECD et l'ETD sont des méthodes de choix pour ces approches mais certains résultats que nous avons obtenus en CID montrent qu'il est sans doute possible d'utiliser ce mode de fragmentation, installé sur tous les spectromètres de masse, sous certaines conditions qui restent encore à déterminer.

L'ensemble de nos résultats nous a ainsi conduits à considérer que notre système d'introduction des échantillons, basé initialement sur une seringue refroidie, ne convenait pas aux approches "top-down" et qu'il était absolument essentiel de trouver une solution alternative permettant de maintenir le taux de deutération initial pendant un temps suffisamment long pour qu'un grand nombre de scans MS/MS puissent être accumulés. Nous avons donc décidé de mettre au point un système complètement différent de ce qui existe aujourd'hui dans les différentes équipes travaillant dans le domaine, basé sur l'utilisation d'une enceinte isolée refroidie permettant de stocker les échantillons à très basse température ce qui évite le démarquage pendant des temps longs et permet également de travailler avec des débits faibles. Le développement de cette "cryosource" nous a pris plusieurs mois car maintenir une température de -30°C pour le stockage des échantillons jusqu'à leur introduction dans le spectromètre de masse induit un certain nombre de contraintes (viscosité du solvant, formation de bouchons, difficulté à réaliser des mélanges homogènes sur des

temps courts). Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus avec la dernière version optimisée sont très encourageants car ils montrent qu'il est désormais possible de travailler pendant des temps longs avec les échantillons deutérés sans que le taux de deutération ne varie au cours de l'analyse. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps, au cours de ma thèse, de revenir sur les protéines du complexe aIF2 et de les analyser avec ce nouveau système d'introduction mais nous pensons que l'utilisation de cette source devrait, enfin, rendre notre approche robuste et applicable à des échantillons réels.

Ainsi, je considère que mon travail de thèse a permis de faire un grand pas en avant pour rendre les approches "top-down HDX" applicables à des systèmes présentant un intérêt biologique important (ce qui n'est pas exactement le cas de tout ce qui a été décrit dans la littérature jusqu'ici) et que dans quelques années, ces approches complèteront de manière robuste l'arsenal des méthodes d'analyse utilisées en biologie structurale, apportant des informations complémentaires à ce que la RMN ou les rayons X sont capables de fournir.

Annexe : Matériels et méthodes

Annexe : Matériels et méthodes 197

A.1. Instrumentation 199

A.1.1. Ionisation par électrospray 199
A.1.1.1. Formation des gouttelettes chargées 200
A.1.1.2. Evaporation du solvant et explosions coulombiennes 201
A.1.1.3. Formation d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir de petites gouttelettes fortement chargées 201
A.1.2. Spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT-MS) 203
A.1.2.1. Principe de la spectrométrie de masse FT-ICR 203
A.1.2.1.1. Principe physique 206
A.1.2.1.2. Piégeage des ions 206
A.1.2.1.3. Obtention des spectres de masse 208
A.1.2.2. Performances de la spectrométrie de masse FT-ICR 212
A.1.2.2.1. Résolution et précision en masse 212
A.1.2.2.2. Sensibilité 212
A.1.2.2.3. Gamme dynamique 213
A.1.2.2.4. Gamme de masse 213
A.1.2.3. Technologie Orbitrap 214
A.1.3. Fragmentation en phase gazeuse 216
A.1.3.1. Fragmentation par ECD sur le FT-ICR 216
A.1.3.2. Fragmentation par ETD sur l'Orbitrap 218
A.1.3.3. Fragmentation par CID sur le Q-ToF 220

A.2. Expériences d'échange hydrogène/deutérium 220

A.2.1. Marquage 220
A.2.1.1. Peptides modèles sélectivement deutérés 220
A.2.1.2. Protéine modèle ubiquitine 221
A.2.1.3. Protéine aIF2α3 et complexe protéique aIF2α3/γ 221
A.2.2. Dessalage 222
A.2.3. Analyse par spectrométrie de masse 222

A.3. Bibliographie 224

A.1. Instrumentation

A.1.1. Ionisation par électrospray

La première étape d'une expérience par spectrométrie de masse consiste à vaporiser et ioniser l'analyte (des molécules), *i.e.* à former à partir d'un milieu gazeux, liquide ou solide des molécules ionisées isolées, manipulables dans le vide poussé présent dans le spectromètre de masse. Pour cela, différentes sources d'ionisation ont été développées, adaptées à différents types d'échantillons et à différents analyseurs.

L'électronébulisation (ou électrospray, ESI) est une méthode d'ionisation à pression atmosphérique qui permet de transférer et ioniser simultanément des macromolécules intactes (*e.g.* des protéines) présentes en solution en phase gazeuse. La formation des ions en phase gazeuse par cette technique est réalisée par des mécanismes de désolvatation peu énergétiques n'induisant quasiment pas de fragmentation. L'électrospray est donc considérée comme une technique d'ionisation "douce" par opposition à d'autres techniques comme l'impact électronique, technique très énergétique qui conduit à un grand nombre de fragmentations lors de l'étape d'ionisation. De plus, les ions isolés sont formés directement à partir des molécules en solution, ce qui permet d'éviter une étape de vaporisation par chauffage qui peut conduire à la dégradation de l'analyte. L'électronébulisation a été développée par John Fenn (*1*) sur la base de travaux plus anciens de Malcolm Dole (*2*) et John Zeleny (*3*), et aujourd'hui, elle est (avec le MALDI) la méthode de choix pour l'étude des biomolécules par spectrométrie de masse.

La formation des ions en phase gazeuse par électrospray se déroule en trois étapes principales : (i) formation des gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire métallisé, (ii) évaporation du solvant et fission des gouttelettes par explosions coulombiennes successives, et finalement (iii) obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir des gouttelettes fortement chargées issues des deux premières étapes. Les mécanismes précis de la formation des espèces ionisées et désolvatées dans les deux dernières étapes sont, aujourd'hui encore, assez mal définis et sujets à controverse.

A.1.1.1. Formation des gouttelettes chargées

L'étape initiale du processus d'électrospray est la formation de gouttelettes chargées à partir d'une solution. Pour cela, l'échantillon est introduit dans un capillaire métallique (ou une aiguille métallisée) porté à un fort potentiel électrique de plusieurs kilovolts (kV). L'application d'une telle différence de potentiel, entre ce capillaire et une contre-électrode, placée quelques millimètres plus loin, induit une séparation des charges à l'intérieur du liquide par un phénomène électrophorétique de migration des électrolytes (cations et anions). Lorsque le capillaire est utilisé comme électrode positive, les espèces cationiques s'accumulent alors à son extrémité tandis que les anions migrent en sens inverse en s'accumulant à l'intérieur, jusqu'à s'oxyder à la surface du capillaire (Fig. A. 1).

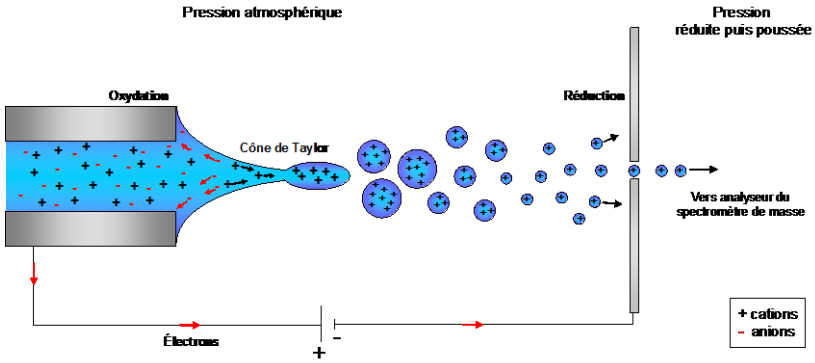


Fig. A. 1 Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray (4).

Ainsi, en mode dit "positif", les cations sont attirés par l'électrode négative (contre-électrode) et les anions par l'électrode positive (capillaire). La séparation des charges induit une déformation du liquide à l'extrémité du capillaire, déformation qui met en jeu un équilibre entre les forces électrostatiques (répulsives) et la tension de surface (attractive) du liquide. Lorsque les forces électrostatiques atteignent la valeur de la tension de surface du liquide, la déformation est conique et porte le nom de cône de Taylor (5). Une faible augmentation du champ électrique suffit alors à déstabiliser le cône qui se rompt à son extrémité, dispersant la solution en nombreuses gouttelettes qui emportent une partie des charges présentes à la pointe. Après cette étape, les gouttelettes se déplacent sous l'influence du champ électrique mais également sous celle d'un gradient de pression créé par la dépression à l'entrée du spectromètre de masse.

A.1.1.2. Evaporation du solvant et explosions coulombiennes

Les gouttelettes chargées issues du cône de Taylor migrent donc vers l'interface du spectromètre de masse. Sur leur trajet, elles entrent en collision avec le gaz atmosphérique, et suivant les interfaces avec un gaz de séchage, et subissent une évaporation du solvant alors que le nombre de charges reste constant. L'évaporation du solvant est favorisée par la température souvent élevée de la source d'ionisation (80-140°C). La diminution du rayon R des gouttelettes possédant une charge constante q conduit à l'augmentation de la répulsion électrostatique des charges à sa surface jusqu'à ce que les gouttelettes atteignent la limite de stabilité de Rayleigh donnée par :

$$q_{Ry} = 8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}$$

où ε_0 : permittivité du vide, R : rayon de densité de charges et γ : tension de surface stabilisant la goutte.

Cette équation donne les conditions pour lesquelles les forces de répulsions électrostatiques deviennent égales à celles de tension de surface. A partir de la limite de Rayleigh, la gouttelette chargée devient instable, ce qui conduit à une explosion coulombienne correspondant à la fission de la gouttelette en gouttelettes de plus petites tailles. Les travaux de Rayleigh en 1882 (*6*) puis de Gomez et Tang en 1994 (*7*), ont montré que la fission des gouttelettes s'effectuait par émission d'un jet très fin de gouttelettes, sans réelle relation de symétrie. Ce phénomène d'évaporation se reproduit jusqu'à ce que les nouvelles gouttelettes aient à nouveau atteint la limite de Rayleigh.

A.1.1.3. Formation d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir de petites gouttelettes fortement chargées

Dans la littérature, deux mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier modèle dit "modèle des résidus chargés" ou « Charged Residue Model » (CRM) a été décrit par Dole en 1968 (*2*). L'hypothèse est la suivante : la succession d'explosions coulombiennes conduirait à des gouttelettes de plus en plus petites jusqu'à ce que la dernière "gouttelette" ne possède plus qu'une seule et unique molécule d'analyte (Fig. A. 2, (a)). Dans ce modèle, l'évaporation totale du solvant résiduel accumule les charges sur l'analyte et permet l'obtention d'ions multichargés en phase gazeuse.

En 1979, une seconde théorie basée sur de nouveaux mécanismes, a été proposée par Iribarne et Thomson (*8*). Il s'agit du modèle de l'évaporation ionique ou « Ion Evaporation Model » (IEM). Leur théorie repose, comme celle de Dole, sur une succession initiale de fissions de type coulombiennes qui réduit la taille des gouttelettes et augmente leur densité de charge. Cependant, selon la théorie d'Iribarne et Thomson, pour des gouttelettes avec un rayon très petit (de l'ordre de 10 nm) et une densité de charge très élevée, le champ électrostatique à leur surface serait assez intense pour expulser directement des ions préformés en phase gazeuse (Fig. A. 2, (b)). Ce phénomène, appelé évaporation ionique, suggère que l'explosion coulombienne ne constitue pas le mécanisme majoritaire pour les petites gouttelettes de rayon $R \leq 10$ nm.

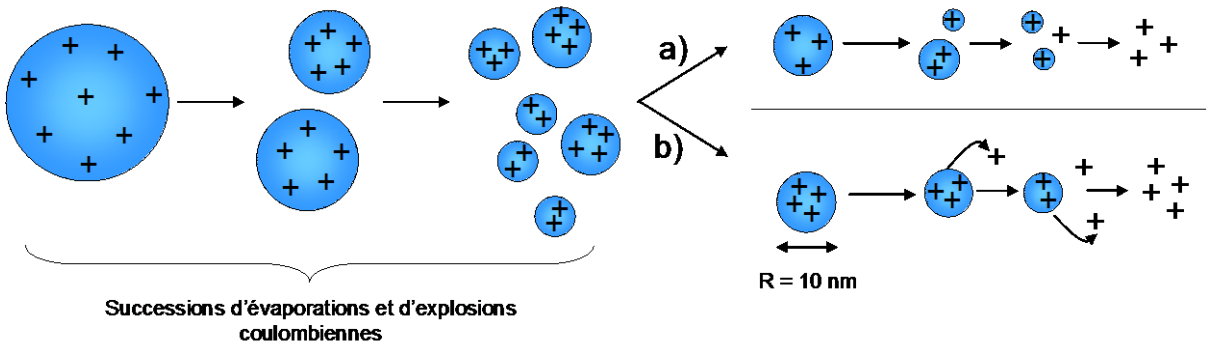


Fig. A. 2 Les deux théories de l'obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir de gouttelettes chargées. (a) Modèle des résidus chargés par Dole. (b) Modèle de l'évaporation ionique par Iribarne et Thomson.

Cependant, aujourd'hui encore, aucun de ces deux modèles n'est considéré comme applicable à l'ensemble des phénomènes observés en électrospray (*9*). Le consensus semble être l'existence d'un effet de taille de l'analyte, les grosses molécules étant plutôt orientées vers une formation d'ions en phase gazeuse par le mécanisme de résidus chargés de Dole (*10-12*). John B. Fenn émet l'hypothèse que cette théorie s'applique aux molécules de haut poids moléculaire à partir du moment où les dimensions linéaires de ces molécules sont sensiblement plus grandes que la gouttelette qui les contient.

Quel que soit le mécanisme responsable de la formation des ions en phase gazeuse, l'électrospray est aujourd'hui une méthode d'ionisation extrêmement utilisée, dans des domaines variés (biologie, chimie, pharmacie…).

A.1.2. Spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT-MS)

Parmi les différents spectromètres de masse commercialisés, les instruments FT-ICR et Orbitrap occupent une place de choix pour l'étude de protéines entières par approche « top-down », en raison de leurs très grandes performances en termes de résolution et de précision sur la mesure de masse.

A.1.2.1. Principe de la spectrométrie de masse FT-ICR

Notre étude sur les peptides modèles développés par T. Jørgensen qui est présentée dans le Chap. II de ce manuscrit, a été réalisée sur un spectromètre APEX III de Bruker (Brême, Allemagne) équipé d'un aimant supraconducteur de 7 Tesla, d'une cellule ICR de type Infinity Cell et d'une source électrospray Apollo I.

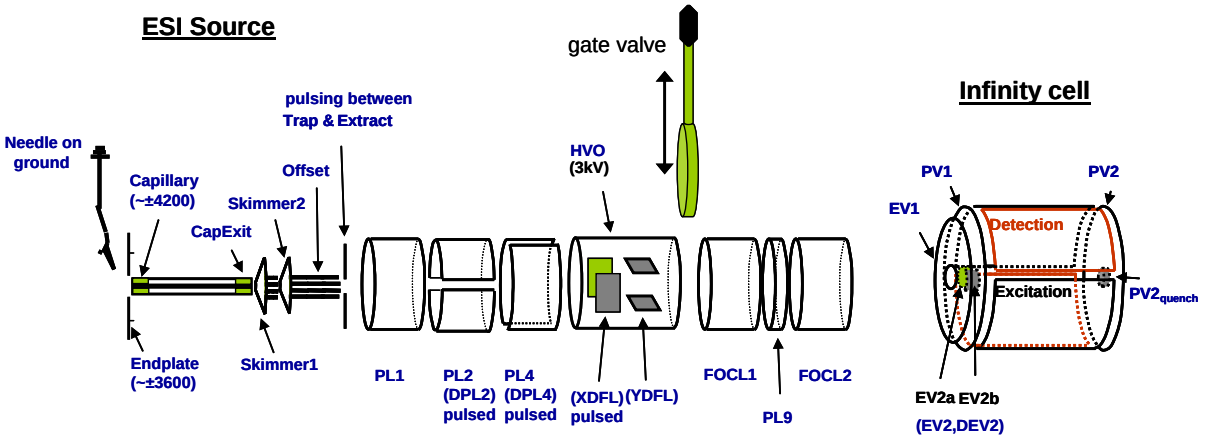


Fig. A. 3 Schéma du FT-ICR APEX III Bruker, de la source électrospray à la cellule ICR Infinity Cell (d'après la documentation de Bruker).

Les ions sont formés au niveau de la source ESI puis transférés, *via* un ensemble de lentilles électrostatiques, au centre de la cellule de piégeage située au cœur de l'électroaimant supraconducteur (Fig. A. 3).

Un hexapôle de stockage est inséré après le capillaire de transfert de la source électrospray, et avant le système de transfert électrostatique, afin d'y accumuler les ions avant de les envoyer dans la cellule ICR. Cette dernière, placée dans un vide poussé (10^{-10} mbar environ), représente l'élément clé du spectromètre puisqu'elle va servir d'analyseur et de détecteur, par la mesure de la fréquence cyclotron des ions piégés.

Au cours de cette thèse, notre spectromètre a bénéficié d'importantes évolutions instrumentales. Ainsi, en janvier 2011 nous avons fait l'acquisition du chariot de la société Sanofi-Aventis de Toulouse, notre APEX III devenant alors APEX-Q. Les principales différences entre les deux instruments sont : l'ajout d'un quadripôle et d'une cellule de collision, et la source d'ionisation (Apollo I sur l'APEX III et CombiSource premier modèle sur l'APEX-Q) (Fig. A. 4).

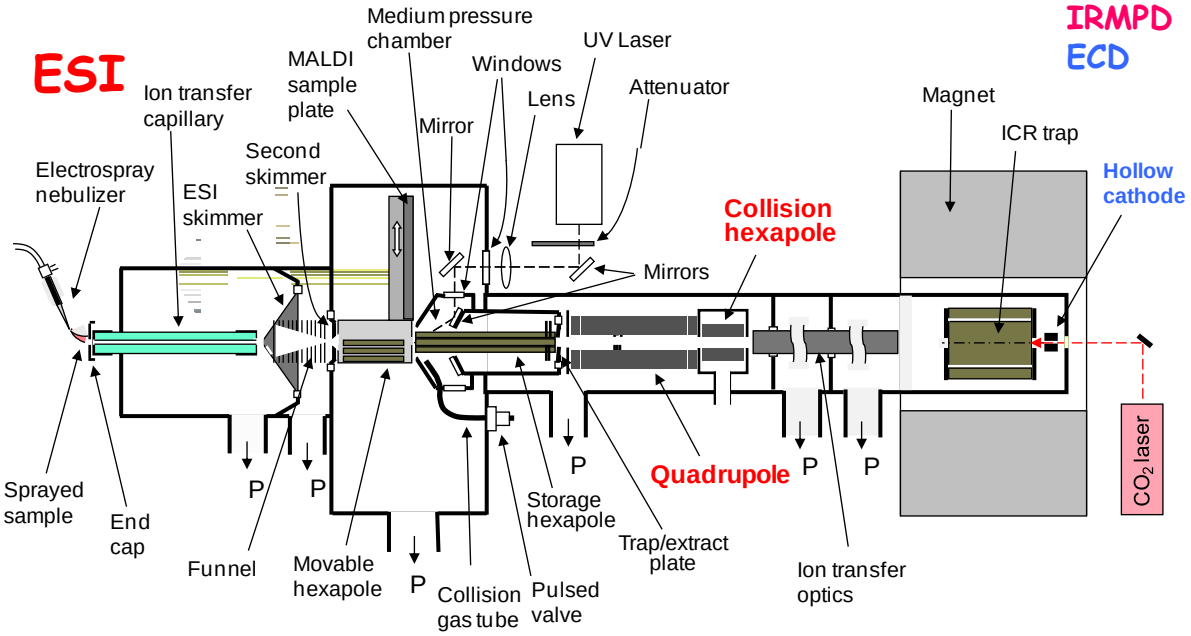


Fig. A. 4 Schéma du FT-ICR APEX-Q Bruker, de la combi-source à la cellule ICR Infinity Cell (d'après la documentation de Bruker).

Puis, en avril 2012 nous avons reçu le nouveau chariot de Bruker, le SolariX (Fig. A. 5). Il apporte les améliorations suivantes : une combisource nouvelle génération, l'ajout d'un module ETS (possibilités de CID ou d'ECD/ETD) et d'un hexapôle pour acheminer les ions de la cellule de collision à la cellule ICR (Fig. A. 6).

Fig. A. 5 Photographie du FT-ICR SolariX (Bruker).

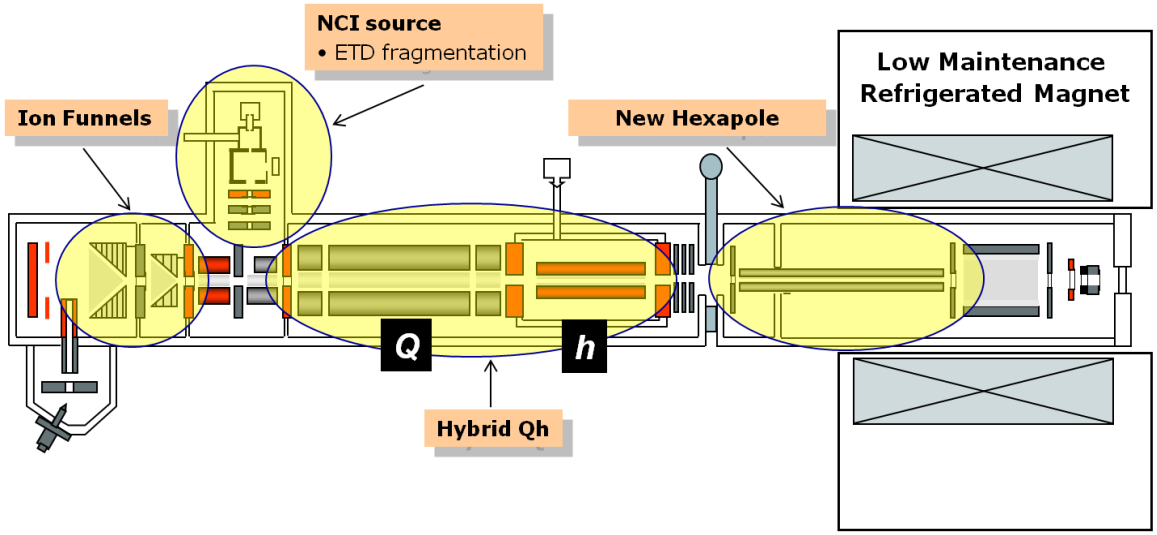


Fig. A. 6 Schéma du FT-ICR SolariX Bruker, de la combi-source à la cellule ICR Infinity Cell (d'après la documentation de Bruker).

Comme il a déjà été spécifié dans le Chap. III de ce manuscrit, nous avons également été amenés à travailler sur l'APEX-Qe d'Orsay. Les différences majeures entre l'APEX III et l'APEX-Qe sont : la présence d'un quadripôle sur l'APEX-Qe permettant de réaliser la sélection d'ions précurseurs avant leur entrée dans la cellule ICR, la présence d'« ion funnels » (qui améliorent la sensibilité de l'instrument) et la source d'ionisation (Apollo I sur l'APEX III, Apollo II sur l'APEX-Qe).

A.1.2.1.1. *Principe physique*

Le principe de la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (« Ion Cyclotron Resonance », ICR) repose sur le fait qu'une particule chargée, animée d'une vitesse *v*, se déplaçant dans un champ magnétique uniforme *B* subit la force de Lorentz (Eq. A. 1).

$$\vec{F} = q\vec{v} \wedge \vec{B} \quad \textit{(Eq. A. 1)}$$

Cette force conduit la particule chargée à adopter une trajectoire hélicoïdale autour d'un axe parallèle à celui du champ magnétique *B* (conventionnellement axe *z*) dont la projection dans le plan orthogonal (*xy*) est un mouvement circulaire uniforme (Fig. A. 7).

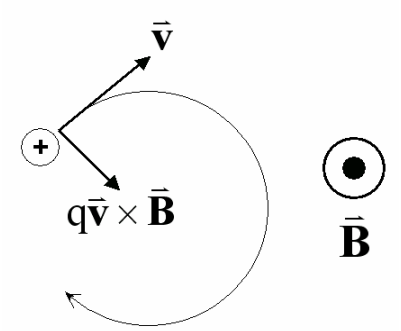


Fig. A. 7 Mouvement cyclotron d'un ion dans un champ magnétique.

Ce mouvement de rotation est appelé mouvement cyclotron et, en l'absence de champ électrique, sa fréquence ν_c ne dépend que du champ magnétique et du rapport masse sur charge (Eq. A. 2). On conçoit dès lors qu'une mesure de cette fréquence de rotation permet une détermination du rapport *m/z* de l'espèce considérée.

$$\nu_c = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{q\vec{B}}{m} = \frac{1.535611 \times 10^7 \vec{B}}{m/z} \quad \textit{(Eq. A. 2)}$$

A.1.2.1.2. *Piégeage des ions*

Jusqu'ici seul le mouvement dans le plan *xy* a été considéré. En l'absence d'autres champs, la vitesse, suivant l'axe *z*, reste constante et la trajectoire résultante est un mouvement hélicoïdal autour d'un axe parallèle à *z*, qui se poursuivra indéfiniment. Pour construire un piège, une possibilité est de "fermer" le mouvement suivant *z* par deux plaques de piégeage

perpendiculaires à l'axe *z* portées à un potentiel répulsif. Ainsi est née la cellule ICR aussi appelée piège de Penning, et le premier modèle en est la cellule cubique (Fig. A. 8).

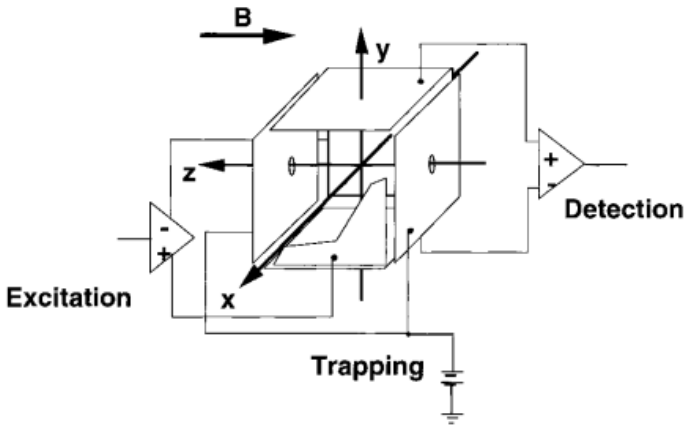


Fig. A. 8 Cellule cubique simple (13).

S'il était possible d'appliquer un champ électrique homogène parallèle au champ magnétique avec des plaques de longueurs infinies, le mouvement d'un ion serait hélicoïdal avec des oscillations périodiques suivant l'axe *z*. Cette fréquence d'oscillations ou fréquence de piégeage ν_t est principalement due aux répulsions successives des deux plaques de piégeage et peut être exprimée par (Eq. A. 3).

$$\nu_t = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{2.q.V_{trap}.\alpha}{m.a^2}} \quad \textit{(Eq. A. 3)}$$

où V_{trap} : potentiel de piégeage, a : distance entre les deux plaques et α : facteur géométrique égal à 2 dans le cas idéal.

Cependant, il n'est pas possible de se situer dans le cas idéal d'un champ électrique homogène qui suppose des plaques infinies. Le champ électrique ne peut pas être exactement parallèle au champ magnétique et une composante radiale est alors à prendre en compte. Par conséquent, un troisième mouvement propre au mouvement de déplacement des charges piégées s'ajoute aux deux précédents mouvements (cyclotron et piégeage). Ce mouvement dit "mouvement magnétron" s'oppose à la force de Lorentz et se traduit par un abaissement de la fréquence cyclotronique.

Ce piégeage suppose toutefois que la trajectoire des ions les ait amenés à être confinés dans la cellule. Cela peut être obtenu en produisant des ions *in situ* (ionisation électronique, MALDI) mais des difficultés supplémentaires sont à prendre en compte lorsque les ions sont formés initialement à l'extérieur de la cellule (cas de l'ionisation par électrospray). En effet, la conservation de l'énergie cinétique impose que, pour des ions transportés suivant l'axe *z*, s'ils ont suffisamment d'énergie pour entrer dans la cellule et que le potentiel des plaques ne change pas, ils en ont assez pour ressortir.

Le piégeage dynamique est une solution à ce problème : au lieu d'appliquer des tensions continues sur les plaques de piégeage, on va jouer sur des variations de tension pour s'assurer du piégeage des ions. On synchronise les tensions sur la plaque de la cellule située côté source avec le déplacement des ions (Fig. A. 9). Néanmoins, cette technique introduit une discrimination en masse par la différence de temps de vol des espèces.

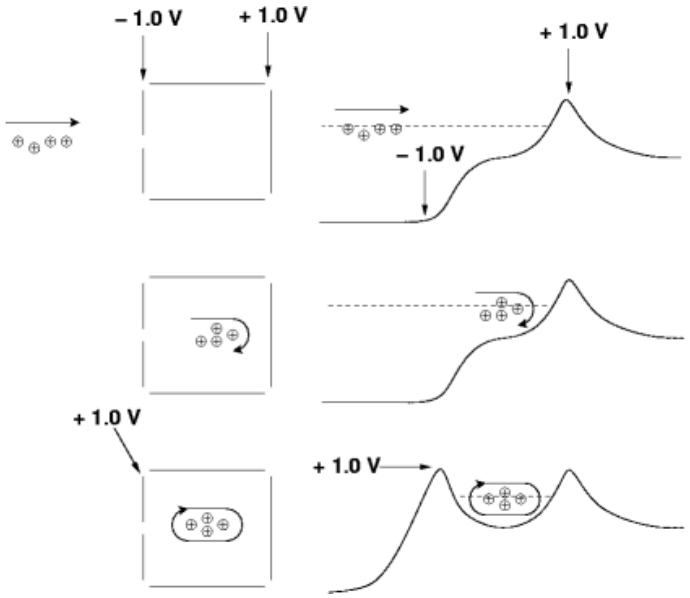


Fig. A. 9 Principe du piégeage dynamique des ions.

A.1.2.1.3. *Obtention des spectres de masse*

Une fois les ions piégés, la mesure de leur fréquence cyclotronique n'est pas possible directement. Bien qu'ayant une fréquence de rotation identique, tous les ions de même rapport masse sur charge ne présentent pas un mouvement cohérent. En effet, les ions ont été produits à des temps variables et avec des énergies cinétiques différentes, ce qui se traduit par une

phase (position sur l'orbite) et un rayon variables. Afin de pouvoir mesurer les fréquences cyclotroniques, il est nécessaire que ce mouvement global devienne cohérent, *i.e.* que tous les ions, de même rapport masse sur charge, se présentent avec la même phase et avec le même rayon. Ce résultat est obtenu par une procédure d'excitation-détection détaillée ci-après.

Excitation des ions

Comme cela vient d'être dit, une fois piégés, les ions de même rapport masse sur charge ont la même fréquence cyclotronique, mais ne forment pas un "paquet" cohérent. En effet, la position de leur axe de rotation et la phase de leur mouvement ne sont pas égales. De plus, le rayon de leur orbite cyclotronique est trop faible pour induire un quelconque signal sur les plaques de détection. L'application d'un pulse de radiofréquence sur les plaques d'excitation à leur fréquence cyclotron, permet de rendre le mouvement des ions cohérent et de les conduire sur une trajectoire de même rayon, à proximité des plaques de détection. En effectuant un balayage de fréquence, il est possible d'exciter des populations d'ions de rapports masse sur charge différents qui adoptent alors une trajectoire circulaire de même rayon avec des fréquences de rotation différentes. Cette étape permet non seulement d'obtenir des "paquets" d'ions décrivant un mouvement cohérent mais aussi de les rapprocher des deux plaques de détection afin de pouvoir analyser ce mouvement. Dans le cas idéal, il conviendrait d'exciter les ions sur une orbite la plus grande possible afin d'augmenter le signal et la sensibilité. Cependant, ceci n'est pas applicable puisque la non homogénéité du champ électrique près des plaques conduirait à l'éjection progressive des ions. C'est la raison pour laquelle il est usuel de ne pas exciter les ions sur des rayons supérieurs à 0,8 fois le rayon de la cellule. Plusieurs types de champs électriques sinusoïdaux peuvent être appliqués pour exciter les ions. La Fig. A. 10 présente trois types d'excitations différentes.

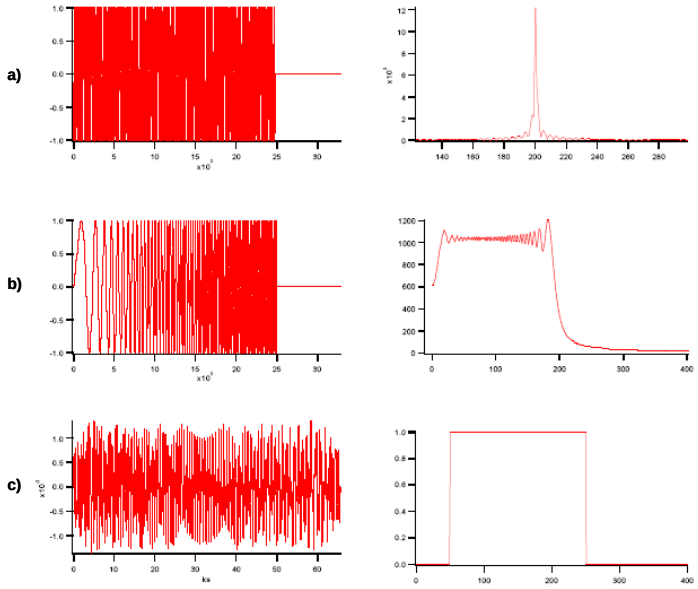


Fig. A. 10 Types d'excitations usuellement utilisées, à gauche dans le domaine temporel et à droite dans le domaine des fréquences. (a) sinusoïde monofréquence tronquée, (b) balayage de fréquence (chirp), (c) balayage par SWIFT.

Le premier type permet l'excitation des ions à une seule fréquence (Fig. A. 10, (a)). L'excitation monofréquence n'est donc pas vraiment utile pour la détection de tous les ions présents dans la cellule, qui est le cas le plus couramment rencontré. En effet, dans ce cas, il faudrait réaliser une excitation monofréquence pour chacun des ions présents. Il est donc préférable d'utiliser un mode d'excitation par balayage de fréquence (Fig. A. 10, (b)) qui va balayer toute la gamme de fréquences des ions en une seule impulsion. Le balayage par SWIFT (« Stored-Waveform Inverse Fourier Transform ») (Fig. A. 10, (c)) permet de calculer l'onde d'excitation à partir du domaine des rapports masse sur charge étudié. Cependant, le SWIFT n'est employable que sur les instruments équipés d'un générateur arbitraire de fréquences.

Détection du courant induit

La rotation cohérente des ions sur une orbite large crée un courant induit sur les deux plaques de détection, qui est détectable après amplification par une électronique adaptée. Ce courant est proportionnel à la charge totale du "paquet" d'ions ayant un mouvement cohérent et ne dépend pas de la fréquence cyclotronique des ions.

Forme du signal mesuré

La collision des ions avec des molécules de gaz résiduelles pendant le temps de mesure conduit à une perte de cohérence du "paquet" d'ions et donc à une perte d'intensité du signal.

De ce fait, le signal obtenu correspond à une sinusoïde amortie exponentiellement (Fig. A. 11). Or, la précision en masse est directement liée à la précision sur la mesure de la fréquence de rotation cyclotron des ions piégés. Par conséquent, une mesure de masse précise nécessite une pression la plus faible possible dans la cellule.

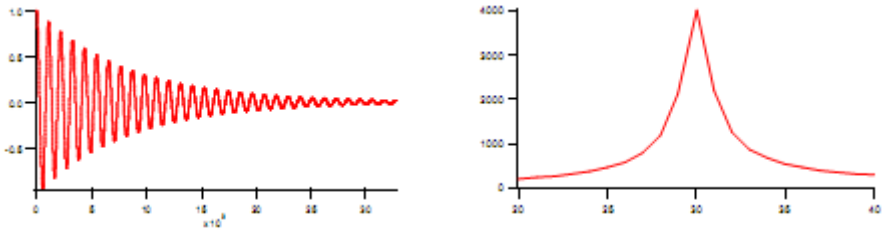


Fig. A. 11 Signal sinusoïdal amorti exponentiellement (à gauche, échelle en temps) et le résultat après transformation de Fourier (à droite, échelle en fréquence).

Digitalisation et transformation de Fourier

Comme l'indique le nom de l'appareil, c'est la transformée de Fourier (« Fourier Transform », FT) qui permet de mesurer en une seule expérience l'ensemble des fréquences de rotation des ions (Fig. A. 12).

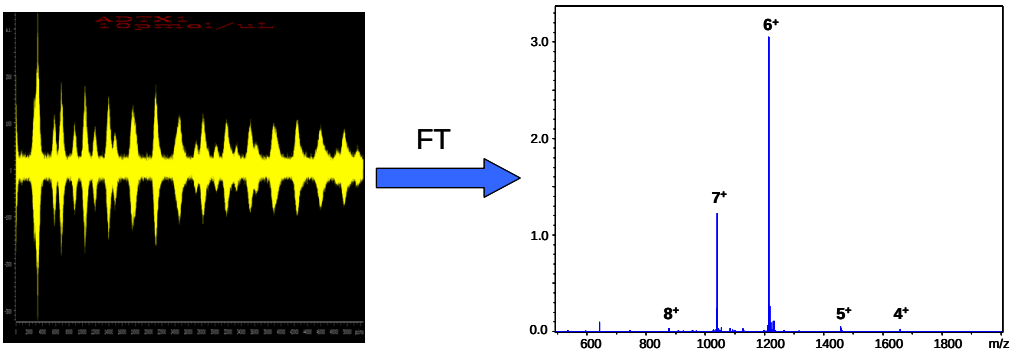


Fig. A. 12 Spectre de masse obtenu après transformée de Fourier du signal.

Le courant induit mesuré sur les plaques de détection correspond à un interférogramme (ou « Free Induction Decay », FID) où les sinusoïdes amorties de l'ensemble des ions présents dans la cellule sont additionnées les unes aux autres. La digitalisation de ce signal, suivie d'une transformation de Fourier permet de convertir cet interférogramme en un spectre contenant les informations sur les fréquences (convertibles en rapport masse sur charge via la relation A. 2) et les abondances des ions piégés dans la cellule. En additionnant plusieurs détections successives, il est possible d'améliorer le rapport signal sur bruit du spectre transformé.

A.1.2.2. Performances de la spectrométrie de masse FT-ICR

A.1.2.2.1. *Résolution et précision en masse*

La particularité de la spectrométrie de masse FT-ICR qui consiste à ramener la mesure des rapports masse sur charge à la mesure d'une fréquence, lui confère ses caractéristiques en termes de résolution. Dans des conditions appropriées, *i.e.* avec un vide très poussé dans la cellule permettant un enregistrement pendant un temps suffisamment long sans perte de signal, il est possible d'atteindre des résolutions supérieures à 10^6 pour un ion de *m/z* 1000 dans un champ magnétique de 7 Tesla. En plus du temps d'enregistrement pour obtenir de la haute résolution, la principale contrainte est le transfert et le stockage d'interférogrammes de grande taille (jusqu'à 8 Mega points). De ce fait, la résolution expérimentale utilisée est fréquemment de l'ordre de 60 000 pour minimiser les temps d'acquisition ainsi que la taille de stockage.

La précision en masse dépend principalement de la résolution mais également de la charge d'espace. En effet, la présence d'un très grand nombre d'ions piégés dans la cellule modifie le champ électrique et génère une force de répulsion entre les ions. Cette force a pour conséquence, la déviation de la trajectoire des ions, ce qui biaise les mesures de masses. Ce phénomène pose le problème évident de la calibration externe. En effet, pour que l'étalonnage externe soit le plus précis possible, il faut qu'il soit effectué avec une charge d'espace comparable à celle de l'échantillon, ce qui est difficilement contrôlable. Il est ainsi recommandé de travailler avec de faibles quantités d'ions pour limiter au maximum la déviation due à ce phénomène. Une précision de l'ordre de quelques ppm est alors obtenue. Cependant, l'étalonnage interne permet de s'affranchir de ce problème de charge d'espace puisque les ions calibrants sont présents dans la cellule en même temps que les ions de l'échantillon et subissent la même charge d'espace. On atteint alors en routine des précisions en masse de l'ordre d'une ppm, voire moins.

A.1.2.2.2. *Sensibilité*

Des calculs théoriques ont montré que le nombre de charges minimum ayant un mouvement cohérent, nécessaire pour détecter un signal était de l'ordre de 200. Ceci constitue une limite ultime de la sensibilité de ce type d'instrument. En pratique, il faut tenir compte de

l'efficacité de chacune des étapes permettant de passer de l'analyte neutre aux ions piégés et excités dans la cellule. Il faut également tenir compte des états de charge et de l'existence de massifs isotopiques qui augmentent le nombre de fréquences sur lesquelles se répartissent les ions. Les sensibilités *records* atteintes actuellement sur des peptides de masse 1000 Da sont de l'ordre de 10 attomoles consommées en nano-électrospray. Dans un instrument commercial avec les protocoles standards, on peut obtenir un signal exploitable avec environ 10 femtomoles de produit consommé.

A.1.2.2.3. *Gamme dynamique*

Un point sur lequel la spectrométrie de masse FT-ICR n'est pas particulièrement bien placée est la gamme dynamique qui représente la capacité à discriminer des ions d'abondances différentes dans un même spectre. Le problème est lié à celui de la charge d'espace dans la mesure où les mouvements des ions de faible abondance sont perturbés par ceux des ions majoritairement présents dans la cellule. Il est admis qu'il est difficile de mesurer avec une bonne précision la masse d'un ion dont l'abondance est inférieure à 1% de celle de l'ion le plus abondant.

A.1.2.2.4. *Gamme de masse*

La gamme de masse est, quant à elle, en théorie quasiment illimitée. La limite de masse inférieure dépend uniquement de l'électronique et plus précisément des capacités du digitaliseur et du générateur de fréquences. Pour un aimant de 7 Tesla, équipé d'un digitaliseur à 8 MHz, cela équivaut à une limite inférieure de *m/z* 29. En ce qui concerne la limite supérieure, elle dépend de la capacité de la cellule à piéger les ions. Dans le cas d'un aimant de 7 Tesla, cette limite est atteinte pour un ion de *m/z* 274 000. Malheureusement, des problèmes apparaissent avant cette limite, notamment à cause des limites sur les durées d'acquisition de signal. Les signaux des masses élevées correspondant à de basses fréquences se trouvent considérablement élargis (*m/z* 274 000 équivaut à mesurer une fréquence de 393 Hz). De ce fait, la limite expérimentale couramment admise se situe à *m/z* 27 000 pour un aimant de 7 Tesla.

A.1.2.3. Technologie Orbitrap

L'Orbitrap est une technologie relativement récente (basée sur le principe d'un piège orbitalaire électrostatique) inventée par A. Makarov (*14*). L'Orbitrap repose sur le piégeage des ions par un champ électrostatique quadripolaire qui crée l'oscillation des ions piégés. Ces oscillations proportionnelles au rapport $(m/z)^{-1/2}$, sont détectées par la mesure du courant induit et traduites en spectre de masse par la transformée de Fourier (Fig. A. 13). Il existe donc de grandes similitudes au niveau de la détection des ions par spectrométrie de masse FT-ICR et Orbitrap.

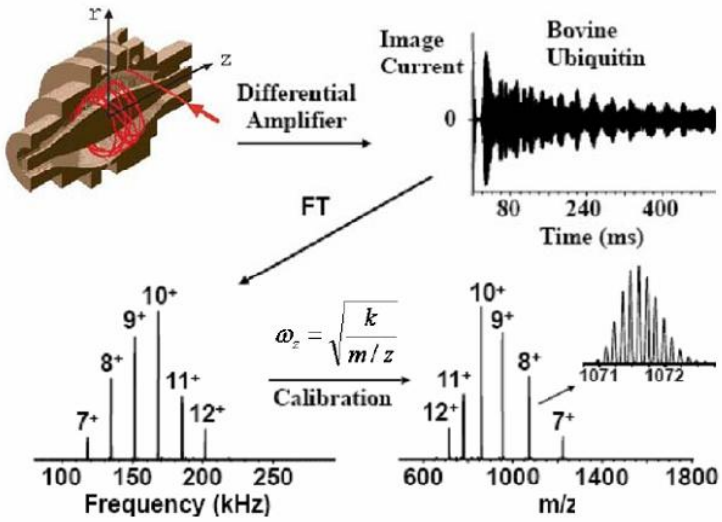


Fig. A. 13 Détection des ions par la technologie Orbitrap. Les courants induits correspondent à un interférogramme qui est la superposition de fréquences de plusieurs espèces. Le traitement du signal, qui est réalisé de la même manière que par spectrométrie de masse FT-ICR avec les mêmes contraintes et limitations, suivi également d'une transformation de Fourier permet de convertir cet interférogramme en un spectre de fréquence facilement convertible en spectre de masse.

De ce fait, les performances de la technologie Orbitrap en termes de résolution (jusque 100 000) et précision sur la mesure de masse (de l'ordre de 1-2 ppm) rivalisent avec celles de la spectrométrie de masse FT-ICR. De plus, la résolution de l'Orbitrap étant proportionnelle au rapport $(m/z)^{-1/2}$, elle diminue moins vite avec l'augmentation du rapport m/z que dans le cas du FT-ICR. Par ailleurs, la gamme dynamique de l'Orbitrap, contrairement à la spectrométrie de masse FT-ICR, est satisfaisante (> 3 décades) (*15*). L'Orbitrap est principalement utilisée en spectrométrie de masse en tandem, associée à un piège linéaire.

Le schéma et la photographie du spectromètre LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher) que nous avons utilisé pour nos expériences HDX correspondent aux Fig. A. 14 et Fig. A. 15.

L'instrument est composé d'une source ESI de type « Z-spray » suivie d'une optique ionique de type « S-lens » permettant de mieux focaliser les ions et d'améliorer la sensibilité. Une optique de transfert ionique (quadripôle, octopôle) performante en termes de stabilité et efficacité de transmission des ions permet leur acheminement dans une trappe linéaire. Dans cette trappe ionique, il est possible de fragmenter les ions par CID ou ETD et de procéder à leur détection. Il est également possible de les détecter par transformation de Fourier dans l'Orbitrap avec une meilleure résolution. Dans ce cas, les ions sont transférés de la trappe linéaire à la C-trappe *via* un quadripôle, puis éjectés dans l'analyseur Orbitrap. Une cellule de collision placée à proximité de la C-trappe permet également de fragmenter les ions par HCD (« High-energy Collisional Dissociation »). Les ions sont ensuite analysés dans l'Orbitrap.

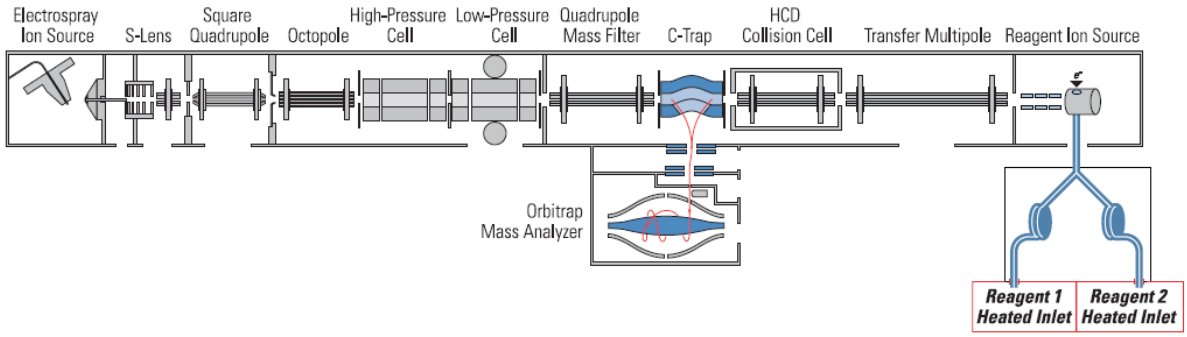


Fig. A. 14 Schéma du LTQ-Orbitrap Velos (d'après la documentation de Thermo Ficher Scientific).

Fig. A. 15 Photographie du spectromètre LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) de la plateforme protéomique de l'Institut Jacques-Monod (Paris 7).

A.1.3. Fragmentation en phase gazeuse

La spectrométrie de masse en tandem consiste (i) dans une première étape, à sélectionner l'ion d'intérêt (appelé "ion parent" ou "ion précurseur") et (ii) dans une seconde étape, à analyser les ions fragments (ou "ions fils") obtenus par la dissociation de l'ion parent. Selon les instruments utilisés, les étapes de sélection et d'analyse des fragments se font soit dans l'espace (tQ, Q-TOF, TOF-TOF), soit dans le temps (IT, FT-ICR), soit en combinant des étapes dans le temps et l'espace (q-FT-ICR, IT-Orbitrap).

Comme les sources d'ionisation dites "douces" (ESI, MALDI), celles utilisées pour l'analyse des biomolécules, conduisent à des ions avec peu d'énergie interne, il faut induire la fragmentation par un apport d'énergie au système. Cet apport d'énergie peut se faire de différentes façons (*16*) : collision avec un gaz inerte (fragmentation de haute ou basse énergie), collision avec une surface, irradiation par des photons, irradiation par des électrons (spécifique des FT-ICR), réactions ion-molécule ou ion-ion (dont l'ETD). Le contrôle de l'énergie déposée est un paramètre important comme nous avons pu le voir dans le Chap. I : dans le cadre des études HDX, il est important de pouvoir contrôler l'énergie apportée aux ions pour ne pas conduire à un réarrangement aléatoire total des hydrogènes et deutériums le long du squelette polypeptidique.

La spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir des informations de structure de l'ion fragmenté (qu'il soit organique ou biologique) et permet, dans le cas de mélanges complexes, de sélectionner spécifiquement une espèce parmi les autres pour obtenir son spectre de fragmentation.

Les deux principaux types de fragmentation utilisables dans le cadre des études HDX, sont détaillés dans les sous-paragraphes suivants. Il s'agit des méthodes d'activation par les électrons (ECD/ETD) présentées précédemment dans le Chap. I.

A.1.3.1. Fragmentation par ECD sur le FT-ICR

Ce mode de dissociation consiste à irradier les ions multichargés par un faisceau d'électrons. La recombinaison entre un électron et l'ion conduit à la formation d'un cation radical (Fig. A. 16) et permet un gain d'énergie de l'ordre de quelques eV (2-3 eV) (*17*). Ce type de fragmentation est spécifique des FT-ICR et a été présenté dans le Chap. I, dans la

partie consacrée à la fragmentation des peptides protéolytiques marqués. La grande différence avec la fragmentation CID repose sur la formation initiale d'un radical cation dont les voies de fragmentation seront, pour des polypeptides, très différentes de celles du cation. Cela se traduira en particulier par la formation de fragments de type *c* et *z*. De plus, comme vu dans le Chap. II, l'ECD conduit à une faible redistribution des deutériums avant fragmentation, ce que les proposants de mécanismes pour l'ECD ont attribué soit à une vitesse de fragmentation rapide ne permettant pas une redistribution initiale de l'énergie (hypothèse non-ergodique), soit plus vraisemblablement à une barrière de fragmentation suffisamment abaissée pour rendre la vitesse de rupture des liaisons amide dans le radical cation supérieure à celles des autres voies de fragmentation et/ou de transferts de protons.

$$[M, nH]^{n+} \xrightarrow{e^-} [M, nH]^{(n-1)+\bullet} \longrightarrow F_1^{m+} + F_2^{k+\bullet}$$

Fig. A. 16 Capture exothermique d'un électron par une molécule multichargée (positive). Mode d'activation ECD passe par une voie de fragmentation de type radicalaire.

D'un point de vue technique, les électrons sont formés par une cathode chauffée indirectement qui a remplacé le filament afin d'obtenir un flux suffisant pour que la capture d'électron soit efficace. La fragmentation a lieu dans la cellule ICR où les ions sont piégés à proximité du centre de la cellule. Trois paramètres influencent l'efficacité de fragmentation par ECD : (i) le potentiel de la cathode qui contrôle l'énergie des électrons mais a également un effet sur le courant d'électrons, (ii) la température de la cathode et (iii) la durée d'irradiation par des électrons qui contrôle le taux de fragmentation. Notons que l'efficacité de capture décroît rapidement avec l'énergie des électrons et qu'il est important d'optimiser au maximum le temps d'irradiation par des électrons pour éviter les recaptures successives tout en obtenant suffisamment de fragmentations (voir Chap. III).

Lors de nos expériences ECD, nous avons utilisé une cathode chauffée à 1,6 A pour l'APEX III et 1,8 A pour l'APEX-Qe, avec une irradiation par des électrons de l'ordre de quelques eV d'énergie cinétique (de 0,9 eV pour l'ubiquitine à 2 eV pour aIF2α3) pendant quelques dizaines de millisecondes (optimum à 10 ms). Nous avons travaillé sur tous les états de charge sans sélection.

A.1.3.2. Fragmentation par ETD sur l'Orbitrap

L'ETD est un analogue de l'ECD. Il procède par une réaction ion-molécule entre un radical anion, formé généralement dans une source CI négatif, et un cation multichargé. La difficulté est de maximiser le transfert d'électron en limitant le transfert de proton. Les réactifs ont été optimisés pour cela et le fluoranthène utilisé dans ce travail est le réactif généralement utilisé. De plus, il est possible via le choix du réactif de contrôler la thermochimie du transfert d'électrons. On obtient en ETD une fragmentation similaire à celle en ECD mais pas identique.

L'ETD présente tous les avantages de l'ECD : il ne dépend pas de la séquence polypeptidique (nature en acides aminés et longueur), il permet de localiser des modifications post-traductionnelles labiles et il permet d'obtenir une couverture de séquence importante pour les peptides non tryptiques (issus de la digestion de la protéine à la trypsine), pour les protéines et les peptides hautement basiques. La méthode ETD comme la technique ECD, est donc particulièrement bien adaptée aux analyses « top-down ». Par ailleurs, contrairement à l'ECD qui requiert un FT-ICR, la fragmentation ETD peut être réalisée dans une trappe ionique quadripolaire radiofréquence, voire dans un piège hexapolaire, qui demandent une faible maintenance et que l'on retrouve sur une grande variété d'instruments moins coûteux.

D'un point de vue technique, le fluoranthène est utilisé comme réactif pour la fragmentation ETD réalisée à l'aide du spectromètre LTQ-Orbitrap Velos. L'anion radicalaire du fluoranthène qui constitue donc le réactif ETD est produit par la réaction présentée dans Fig. A. 17.

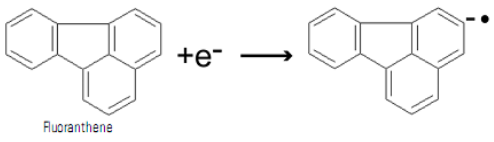


Fig. A. 17 Production du réactif ETD (anion radicalaire) à partir du fluoranthène.

Cette réaction est réalisée dans le module ETD (Fig. A. 18) de l'instrument qui est donc constitué d'une source à ionisation chimique utilisant :

- deux réservoirs indépendants de réactifs dont un pour les réactions de type transfert d'électron (ETD), et l'autre pour les réactions par transfert de proton (PTR),
- une ligne de transfert chauffée,

- un volume d'ion chargé en électron par un filament,

- une optique de transfert utilisant un quadripôle pour filtrer le réactif chargé en électron. Il est placé à proximité de la C-trappe (Fig. A. 14).

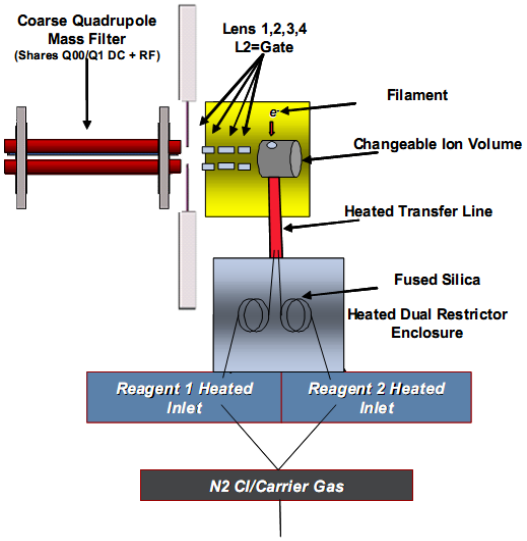


Fig. A. 18 Module ETD de l'instrument LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific).

Le réactif ETD est ensuite envoyé dans la trappe linéaire où la réaction ion/ion entre le peptide multiprotoné et un anion radicalaire aura lieu conduisant à la fragmentation de l'ion peptidique considéré. La dissociation est réalisée sur un état de charge particulier qui a été au préalable sélectionné dans la cellule de haute pression de la trappe ionique.

Trois temps d'activation (5, 15 et 25 ms) correspondant à trois durées pendant lesquelles se déroule la réaction ETD, ont été utilisés consécutivement sur un même état de charge afin de maximiser la couverture de séquence. En effet, des profils de fragmentation différents sont obtenus en fonction du temps d'activation. Pour chaque temps d'activation, une minute environ de fragmentation a été enregistrée.

L'option « Supplemental Activation » a également été utilisée. Elle permet d'apporter au système une petite quantité d'activation collisionnelle supplémentaire afin de faciliter la dissociation de l'ion précurseur. En effet, il a été montré que dans beaucoup de cas le transfert d'électron avait lieu sans que la dissociation soit pour autant effective.

A.1.3.3. Fragmentation par CID sur le Q-ToF

Des expériences de collision avec un gaz inerte (CID) ont été réalisées sur le Q-ToF Premier (Waters) (*Fig. A. 19*). Les différents états de charge des ions multichargés (positifs) ont été sélectionnés dans le quadripôle du spectromètre de masse avant d'être fragmentés dans la cellule de collision. L'énergie de collision est le paramètre à optimiser pour la dissociation de chaque état de charge.

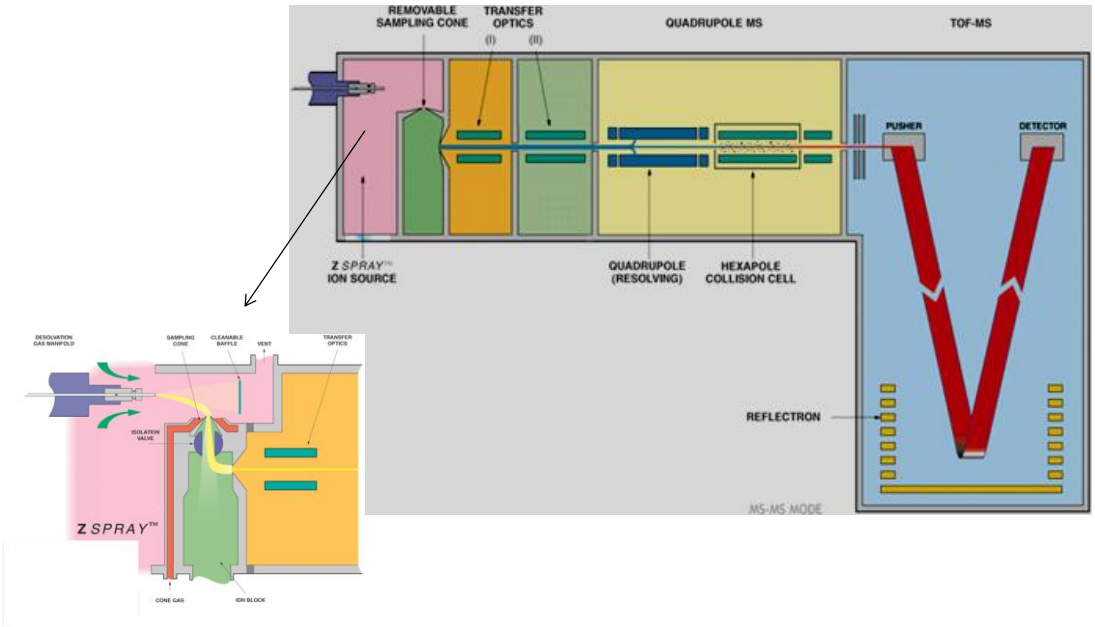


Fig. A. 19 Schéma du Q-ToF Premier (Waters).

A.2. Expériences d'échange hydrogène/deutérium

A.2.1. Marquage

A.2.1.1. Peptides modèles sélectivement deutérés

Les peptides de synthèse (P1 : HHHHHHIIKIIK, P2 : KKDDDDDDIIKIIK, P3 : KKDDDIIKIIK, P4 : KKDDDIIK) ont été achetés chez Genscript Corporation (Piscataway, NJ). Une solution stock à 1 mM de chaque peptide a été préparée en diluant le peptide lyophilisé dans D_2O. Afin d'échanger complètement tous les sites échangeables (hydrogènes d'amide de la liaison peptidique et hydrogènes labiles des chaînes latérales des acides aminés), la solution est incubée à température ambiante pendant au moins 1 heure. Le

démarquage (sélectif, du côté N-terminal) est initié en diluant au 1/100^{e} la solution stock dans H_2O glacée (0°C) et acide (AA 0,5 M, pH 2,3) / MeOH 1:1 (v/v).

A.2.1.2. Protéine modèle ubiquitine

L'ubiquitine, petite protéine modèle, a été utilisée (avec les peptides modèles de T. Jørgensen) pour étudier le « back-exchange ». Elle a donc été totalement marquée par dilution de sa poudre lyophilisée dans D_2O à la concentration finale de 100 µM et incubation pendant 1 heure à 37°C sous agitation (600 rpm).

De la même manière, la substance P et le Glu F sont deux peptides qui ont été ponctuellement utilisés comme sonde de l'échange inverse. Leur poudre lyophilisée a donc été également diluée dans D_2O à la concentration finale de 100 µM puis le mélange a été incubé pendant 1 heure à 37°C sous agitation (600 rpm).

A.2.1.3. Protéine aIF2α3 et complexe protéique aIF2α3/γ

L'échange isotopique de la protéine ou du complexe protéique d'intérêt, sous sa forme native, se fait par incubation dans une solution correspondant à son tampon de purification contenant des deutériums échangeables. Une fois le temps d'échange souhaité atteint, le marquage doit être arrêté dans des conditions figeant les deutériums d'amide du squelette polypeptidique sur leur position et en démarquant les autres sites échangeables (hydrogènes labiles des chaînes latérales). Pour cela, il faut diminuer très rapidement la température du milieu et repasser en conditions acides et en milieu protoné. Dans ces conditions, seuls les deutériums des chaînes latérales des acides aminés seront échangés par des hydrogènes et les deutériums sur la fonction amide de la liaison peptidique conserveront leur localisation.

aIF2α3 Sulfolobus solfataricus

112 µL de D_2O, NaCl 330 mM ont été ajoutés à 16 µL de solution protéique aIF2α3 à 178 µM dans H_2O, NaCl 330 mM. Le mélange a été incubé pendant des temps variables à une température de 37°C sous agitation (600 rpm) et l'échange hydrogène/deutérium a été bloqué lors de l'étape de dessalage par ajout de 128 µL de H_2O/AF 2%.

aIF2α3/γ Sulfolobus solfataricus

112 µL de D_2O, NaCl 330 mM ont été ajoutés à 16 µL de solution protéique à aIF2α3/γ à 115,6 µM dans H_2O, NaCl 330 mM. Le mélange a été incubé pendant des temps variables à une température de 37°C sous agitation (600 rpm) et l'échange hydrogène/deutérium a été bloqué lors de l'étape de dessalage par ajout de 128 µL de H_2O/AF2 %.

A.2.2. Dessalage

Le dessalage se déroulant après les échanges hydrogène/deutérium il doit obligatoirement être effectué à faible température (dans la glace) et pH afin de minimiser les échanges inverses. Pour cette même raison, il est obligatoire d'utiliser une technique de dessalage rapide, excluant de ce fait bon nombre de systèmes.

Un dessalage « off-line » a été réalisé, imposé par le type d'approche choisi (approche « top-down »). Une Sep-Pak™ C8 (Waters) a été utilisée.

Les colonnes sont activées deux fois avec 1 mL ACN/MeOH/AF 49,9 : 49,9 : 0,2, puis rincées deux fois avec 1 mL H_2O/AF 1%. La colonne conditionnée est conservée au réfrigérateur jusqu'à utilisation. L'échantillon mélangé à égal volume avec H_2O/AF 2% (étape d'arrêt de la réaction) est chargé immédiatement sur la colonne. Les sels sont éliminés par trois lavages successifs avec 1 mL H_2O/AF 1% glacé.

A.2.3. Analyse par spectrométrie de masse

Le mode d'ionisation utilisé a été l'électrospray. Les échantillons protéiques ont été injectés dans le spectromètre de masse par le dispositif de seringue refroidie (ou par le nouveau système d'introduction, la « cryosource », que nous avons mis au point et présenté dans Chap. V).

Pour cela, les protéines dessalées sont finalement éluées avec un mélange H_2O/ACN/AF, 49 : 49 : 2 (500 µL pour aIF2α3, concentration finale à 5,7 µM et 250 µL pour aIF2α3/γ, concentration finale à 7,4 µM) et immédiatement analysées par FT-ICR.

Les peptides sélectivement marqués sont analysés dans H_2O glacée (0°C) et acide (AA 0,5 M, pH 2,3) / MeOH 1:1 (v/v) à la concentration finale de 10 µM.

Les échantillons totalement marqués (ubiquitine, peptides) sont dilués au 1/100^{e} dans H_2O/ACN/AF, 49 : 49 : 2 pour être analysés en spectrométrie de masse à la concentration finale de 1 µM.

A.3. Bibliographie

1. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science 246*, 64-71.
2. Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., and Alice, M. B. (1968) Molecular Beams of Macroions, *The Journal of Chemical Physics 49*, 2240-2249.
3. Zeleny, J. (1914) The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces, *Physical Review 3*, 69-91.
4. Kebarle, P. (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J Mass Spectrom 35*, 804-817.
5. Taylor, G. (1964) Disintegration of Water Drops in an Electric Field, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences 280*, 383-397.
6. Rayleigh, L. (1882) XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity, *Philosophical Magazine Series 5 14*, 184-186.
7. Gomez, A., and Tang, K. (1994) Charge and fission of droplets in electrostatic sprays, *Physics of Fluids 6*, 404-414.
8. Iribarne, J. V., and Thomson, B. A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets, *The Journal of Chemical Physics 64*, 2287-2294.
9. Cole, R. B. (2000) Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry 35*, 763-772.
10. Fernandez de la Mora, J. (2000) Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism, *Analytica Chimica Acta 406*, 93-104.
11. Kebarle, P., and Peschke, M. (2000) On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions, *Analytica Chimica Acta 406*, 11-35.
12. Fenn, J. B. (1993) Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 4*, 524-535.
13. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., and Jackson, G. S. (1998) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, *Mass Spectrom Rev 17*, 1-35.
14. Makarov, A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis, *Anal Chem 72*, 1156-1162.
15. Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., and Horning, S. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, *Anal Chem 78*, 2113-2120.
16. Sleno, L., and Volmer, D. A. (2004) Ion activation methods for tandem mass spectrometry, *J Mass Spectrom 39*, 1091-1112.
17. Zubarev, R. A. (2003) Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase, *Mass Spectrom Rev 22*, 57-77.