

N° d'ordre : 2713

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

par **ALEXIS NAZABAL**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **CHIMIE ANALYTIQUE**

\*\*\*\*\*

**L'ÉCHANGE ISOTOPIQUE HYDROGENE/DEUTERIUM  
ET LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ÉTUDE D'INTERACTIONS  
PROTEINE-PROTEINE**

\*\*\*\*\*

Soutenue le 23 septembre 2003

Après avis de :

**M. Alain VAN DORSSELAER, DR CNRS (Strasbourg)**  
**M. Sven SAUPE, CR CNRS (Bordeaux)**

**Rapporteur externe**  
**Rapporteur externe**

Devant la commission d'examen formée de :

**M. Alain VAN DORSSELAER, DR CNRS (Strasbourg)**  
**M. Peter ROEPSTORFF, Professeur (Odense, Danemark)**  
**M. Erick DUFOURC, DR CNRS (Bordeaux)**  
**M. Sven SAUPE, CR CNRS (Bordeaux)**  
**M. Jean-Marie SCHMITTER, Professeur (Bordeaux)**

**Président**  
**Examineur**  
**Examineur**  
**Rapporteur**  
**Directeur de thèse**



# Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie dans le laboratoire de spectrométrie de masse sous la direction du professeur Jean-Marie Schmitter. Je le remercie tout particulièrement pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour tous les conseils qu'il m'a prodigués. Je lui exprime mes plus sincères remerciements pour le temps qu'il a consacré au suivi de mes recherches et à la correction de ce mémoire.

Je remercie Alain Van Dorsselaer et Sven Saupe pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour les remarques qui ont permis d'améliorer ce manuscrit. Merci également à Peter Roepstorff et Erick Dufourc pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Katell Bathany et Stéphane Chaignepain ont été mes compagnons de route durant ces trois années de thèse. Merci pour votre bonne humeur quotidienne et pour votre soutien enthousiaste. Je vous remercie également pour avoir accepté de relire ce mémoire.

Je remercie Jean Velours pour m'avoir accueilli à l'Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire à l'université de Bordeaux II. Un grand merci à Jacques vaillers pour m'avoir fait bénéficier de son expertise en purification du complexe de l'ATP synthase.

Je voudrais remercier le Professeur Tsujimoto pour m'avoir accueilli au Japan Advanced Institute of Science and Technology et m'avoir permis de me confronter à la spectrométrie de masse FT ICR. Un grand merci au Professeur Akashi et au Docteur Naito pour m'avoir guidé durant ce projet. Merci également au Docteur Takemori pour avoir su rendre mon séjour au Japon moins délicat.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Sven Saupe pour l'enthousiasme dont il a su faire preuve pour initier l'étude de la protéine HET-s par échange isotopique. Merci pour l'ensemble des idées insufflées et pour la grande disponibilité. Un grand merci à Suzana Dos Reis pour avoir entretenu sans faillir la « protein line » entre l'IBGC et l'IECB.

Un grand merci également à Marc Bonneu et à l'équipe de protéomique du Pôle de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux II pour m'avoir accueilli pour les expériences de spectrométrie de masse à piège ionique.

Je voudrais également remercier l'ensemble des étudiants du laboratoire pour tous les bons moments partagés pendant ces trois années.



# Avant-Propos

Durant la dernière décennie, des avancées significatives ont été réalisées dans le domaine de la spectrométrie de masse et de ses applications aux sciences biologiques. Actuellement, la spectrométrie de masse est un des principaux catalyseurs des actions de recherche en protéomique, un des domaines de recherche les plus dynamiques de la biologie moderne.

Cependant, un inventaire complet des bio-polymères présents dans un organisme, la connaissance de son protéome, ne permettront pas de répondre aux questions liées au fonctionnement de la vie cellulaire. La compréhension de la machinerie cellulaire nécessite la connaissance détaillée non seulement de la structure mais également de la dynamique des protéines.

Jusqu'à présent, la RMN à haute résolution restait la seule technique susceptible d'offrir des informations structurales à l'échelle de l'acide aminé en permettant d'analyser des dynamiques sur une échelle de temps allant de la nano-seconde à plusieurs jours. L'impossibilité d'analyser des molécules de hautes masses (> 30 000 Da) ou les difficultés liées aux conditions expérimentales (présence de ligands paramagnétiques...) limitent l'utilisation de la RMN pour étudier la dynamique des protéines. La plupart des autres techniques biophysiques utilisées pour ce type d'étude utilisent généralement les changements cumulatifs de structure secondaire (Dichroïsme circulaire dans les régions UV lointaines, spectroscopie Raman, etc) ou des marqueurs spécifiques d'événements dynamiques (mesure de fluorescence pour observer l'exposition au solvant des résidus aromatiques). Ces techniques présentent également de nombreuses limitations.

La spectrométrie de masse est devenue une technique d'étude de la dynamique des protéines, offrant des informations souvent non disponibles par d'autres techniques. Elle permet de détecter et de caractériser des états conformationnels qui peuvent coexister à l'équilibre. La spectrométrie de masse permet également l'étude de la dynamique des protéines en ne nécessitant que de faibles quantités de matériel, permettant l'étude des protéines à des concentrations égales ou inférieures aux concentrations endogènes.

La contribution de la spectrométrie de masse à l'étude de la fonction et de la dynamique des protéines est en partie liée à l'utilisation de l'échange isotopique hydrogène/deutérium. La très grande sensibilité de la spectrométrie de masse ainsi que la justesse de ses mesures permet d'analyser les changements de masse résultants de la réaction d'échange des hydrogènes des fonctions amides des protéines par le deutérium

présent dans son environnement. La vitesse d'échange des hydrogènes amides dans le solvant deutéré est dépendante de la conformation des protéines. Par exemple, pour une protéine dans sa conformation native, la vitesse d'échange des hydrogènes amides peut être divisée par un facteur de  $10^8$  en comparaison des vitesses d'échange observables pour de courts peptides non structurés. Cette grande différence dans les vitesses d'échange est directement liée au réseau complexe de liaisons hydrogènes présent dans les protéines natives et à l'exposition limitée de ces atomes d'hydrogènes au solvant deutéré.

Les premiers travaux utilisant l'échange isotopique hydrogène/deutérium et la spectrométrie de masse ont été réalisés en utilisant l'ionisation de type électrospray. Ce mode d'ionisation permet la désorption des protéines directement à partir de la phase aqueuse, ce qui permet une analyse directe de l'incorporation du deutérium aux positions amides des protéines. De plus, il est facile de connecter un système de chromatographie liquide à ce type de source. Récemment, des travaux ont été développés en utilisant des spectromètres de masse à ionisation MALDI. Un des principaux avantages de ce type d'ionisation, outre la rapidité d'analyse, est la possibilité d'obtenir des spectres de mélanges complexes sans nécessiter de séparation chromatographique.

Même si l'utilisation du mode d'ionisation MALDI apparaît séduisante, une des principales limitations est la difficulté à obtenir un taux de rééchange suffisamment bas pour permettre de mesurer l'incorporation du deutérium de manière pertinente. En effet, dans une source MALDI, l'ionisation est réalisée à partir d'un cristallat de matrice et d'échantillon en phase solide. La désorption n'est pas réalisée directement en phase liquide comme dans le cas de l'électronébulisation. L'étape de cristallisation entre matrice et échantillon est un facteur important de perte d'information.

L'objectif de ce travail de thèse est l'évaluation du mode d'ionisation MALDI pour l'étude d'interactions protéine-protéine par échange isotopique hydrogène/deutérium et spectrométrie de masse. Pour cela nous avons choisi deux modèles.

Le premier modèle est le complexe hétéroooligomérique F1 ATPase de la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, constitué de 5 sous-unités et ayant une masse de 400 kDa. Pour cette étude, nous avons choisi de caractériser l'accessibilité au solvant deutéré d'une des cinq sous-unités du complexe, la sous-unité  $\epsilon$  (6.6 kDa).

Le deuxième modèle étudié a été la protéine prion HET-s d'un champignon filamenteux, *Podospora Anserina*. Cette protéine a la particularité de former des fibres amyloïdes par aggrégation. Nous nous sommes attachés à caractériser les interactions entre protéines lors de la transition amyloïde. Cette étude nous a permis de souligner les bénéfices de l'utilisation conjointe de deux types de spectromètres de masse pour mener à bien les expériences d'échange isotopique hydrogène/deutérium : le spectromètre de

masse à piège ionique et ionisation nanospray couplé à la chromatographie liquide et le spectromètre de masse MALDI ToF.

Ce manuscrit présente un chapitre d'introduction rappelant brièvement le principe de l'ionisation ESI et MALDI ainsi que le principe des analyseurs à piège ionique et à temps de vol. Dans ce chapitre d'introduction est également présenté un rappel sur le principe de la technique d'échange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse.

Les résultats sont ensuite présentés en deux parties : La première partie est consacrée à l'étude de la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1 ATPase. Les résultats concernant les interactions de la sous-unité  $\epsilon$  avec les autres sous-unités du complexe sont présentés après une introduction relative à ce complexe. La deuxième partie est consacrée à la présentation de la protéine prion HET-s et à l'étude des interactions entre monomères de cette protéine au sein des fibres amyloïdes.

Les deux modèles présentés dans ce manuscrit nous ont permis de montrer la pertinence et les bénéfices de l'utilisation d'un spectromètre de masse à ionisation MALDI pour l'étude d'interactions protéine-protéine par échange isotopique hydrogène/deutérium.



# Sommaire général

<b>Première partie : Introduction .....</b>	<b>14</b>
Chapitre 1 : Description de techniques de spectrométrie de masse.....	15
Chapitre 2 : L'échange isotopique H/D et la spectrométrie de masse pour l'étude des interactions protéiques non covalentes.....	47
<b>Deuxième partie: Etude du complexe F1ATPase par HXMS .....</b>	<b>74</b>
Chapitre 3 : Le complexe ATPase: Un moteur moléculaire pour la production de l'ATP .....	75
Chapitre 4 : Utilisation de l'échange isotopique H/D pour l'étude de la sous-unité $\epsilon$ du complexe F1ATPase.....	89
<b>Troisième partie : La protéine prion HET-S : un modèle pour l'étude des fibres amyloïdes .....</b>	<b>122</b>
Chapitre 5 : Etude de la transition amyloïde par HXMS .....	123



# Sommaire détaillé

Avant propos .....	3
Première partie : Introduction .....	18
Chapitre 1 : Description de techniques de spectrométrie de masse .....	20
1. Introduction .....	20
2. L'ionisation .....	21
2.1. L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) .....	21
2.1.1. Principe de l'ionisation MALDI .....	21
2.1.2. Préparation de l'échantillon pour une analyse par MALDI .....	22
<i>Choix de la matrice</i> .....	22
<i>Mode de dépôt</i> .....	23
2.2. L'ionisation par électronébulisation (ESI) .....	24
2.2.1. Principe de l'ionisation ESI .....	24
2.2.2. Emission des ions en phase gazeuse .....	26
2.2.3. Préparation de l'échantillon en ESI .....	28
2.2.4. Interprétation des spectres en ESI .....	28
2.2.5. Le nanospray .....	29
3. Les analyseurs .....	31
3.1. L'analyseur à temps de vol (ToF) .....	31
3.1.1. Principe de l'analyseur à temps de vol .....	31
3.1.2. Principe de l'extraction retardée .....	32
3.1.3. Le mode réflectron .....	33
3.1.4. Utilisation de l'analyseur ToF avec les sources MALDI et ESI .....	34
3.2. Le piège ionique quadripolaire .....	34
3.2.1. Description du piège ionique .....	35
3.2.2. Diagramme de stabilité .....	36
3.2.3. Mouvement d'un ion .....	37
3.2.4. Modèle du puits de pseudo potentiel de Dehmelt .....	39
3.2.6. Problème de piégeage des ions .....	40
3.2.7. Gamme de rapport m/z accessible .....	41
3.2.8. Enregistrement d'un spectre de masse .....	42
<i>Injection et accumulation des ions</i> .....	42
<i>La technique de l'excitation résonante</i> .....	43
<i>Ejection résonante des ions</i> .....	43
<i>La modulation axiale : technique pour améliorer la résolution</i> .....	43

4. Techniques de fragmentation par spectrométrie de masse MALDI-ToF et ESI- piège ionique .....	44
4.1. Fragmentation en MALDI-ToF : le Post Source Decay (PSD) .....	44
4.1.1. Principe du Post Source Decay .....	44
4.1.2. Acquisition d'un spectre en mode PSD .....	46
4.2. Fragmentation dans le piège ionique .....	47
4.2.1. Isolement de l'ion parent .....	48
4.2.1.1. L'isolement aux limites du diagramme de stabilité du piège ....	48
4.2.1.2. L'isolement par éjection résonante .....	49
4.2.2. Les méthodes d'excitation .....	49
4.2.2.1. L'excitation résonante .....	49
4.2.2.2. L'excitation non résonante .....	50
4.2.2.3. L'excitation aux limites de stabilité : BAD .....	50

## **Chapitre 2 : L'échange isotopique H/D et la spectrométrie de masse pour l'étude des interactions protéine-protéine non-covalentes .....**

1. Interactions non covalentes et protéines .....	52
1.1. La structure tridimensionnelle d'une protéine .....	52
1.2. Interactions non covalentes rencontrées en biologie .....	52
1.2.1. Les liaisons hydrogène .....	53
1.2.2. Les liaisons électrostatiques .....	53
1.2.3. Les interactions hydrophobes .....	53
1.2.4. Les liaisons de van der Waals .....	54
2. L'échange isotopique H/D et la spectrométrie de masse : un outil pour l'étude structurale des protéines .....	54
2.1. Principe de l'échange isotopique hydrogène/deutérium .....	56
2.1.1. Protons échangeables et protons détectables .....	56
2.1.2. Mécanisme d'échange hydrogène/deutérium .....	57
2.1.3. Facteurs influençant la réaction d'échange .....	60
2.1.3.1. Influence du pH et de la température .....	60
2.1.3.2. Influence des chaînes latérales proches .....	62
2.1.3.3. Influence des structures secondaires et tertiaires .....	62
3. Expérimentation .....	62
3.1. Les techniques de marquage .....	62
3.1.1. Marquage par dilution et marquage par filtration sur gel .....	62
3.1.2. Marquage continu ou marquage pulsé .....	63

3.2. Détermination des constante de vitesse d'échange par spectrométrie de masse .....	65
3.3. Utilisation comparée de la RMN et de la spectrométrie de masse pour la détermination des constantes de vitesse d'échange .....	70
4. Application à l'étude des interactions non covalentes .....	72
4.1. Des travaux pionniers .....	72
4.2. Etude des interactions non covalentes .....	72
4.2.1. Etude d'interactions protéine-protéine .....	72
4.2.2. Etude d'interactions protéine-ligand.....	73
4.2.3. Interactions protéine-membrane .....	73
4.3. Etude des changements conformationnels .....	74
4.4. Ionisation ESI et ionisation MALDI .....	74
4.4.1. L'ionisation ESI .....	74
4.4.2. L'ionisation MALDI .....	75
4.5. Fragmentation CID et échange isotopique hydrogène/deutérium .....	76

**Deuxième partie: Etude du complexe F1ATPase par échange isotopique Hydrogène/deutérium et spectrométrie de masse..... 80**

**Chapitre 3 : Le complexe ATP synthase: Un moteur moléculaire pour la production de l'ATP..... 82**

1. L'ATP synthase .....	82
1.1. Présentation de l'ATP synthase .....	82
1.2. Secteurs F1 et Fo des ATP synthases .....	84
1.2.1. Le secteur F1 .....	84
1.2.1.1 La tête catalytique .....	84
1.2.1.2 La tige centrale .....	85
La sous-unité $\gamma$ .....	85
La sous-unité $\delta$ .....	86
La sous-unité $\epsilon$ .....	87
1.2.2. Le secteur Fo .....	88
2. Le fonctionnement des ATP synthases .....	88

2.1. L'ATP synthase : double moteur rotatif .....	88
2.1.1. Le stator .....	90
2.1.2. Le rotor .....	90
2.1.2.1. Rôle de la sous-unité $\gamma$ .....	90
2.1.2.2. Rôle de la sous-unité $\delta$ mitochondriale ou $\epsilon$ bactérienne .....	92
2.1.3. Translocation des protons à travers Fo .....	93
3. Les inhibiteurs des ATP synthases.....	94
<b>Chapitre 4 : Utilisation de l'échange isotopique H/D pour l'étude de la sous-unité <math>\epsilon</math></b> <b>Du complexe F1ATPase.....</b>	<b>95</b>
1. Objectif de l'étude.....	95
2. Préparation du complexe F1-ATPase à partir de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	97
2.1. Culture des levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	97
2.2. Préparation des mitochondries.....	97
2.3. Préparation des particules submitochondriales .....	99
2.4. Séparation du secteur F1 du complexe ATP synthase.....	100
2.4.1. Extraction des particules submitochondriales par le chloroforme .	100
2.4.2. Précipitation du secteur F1 en présence de sulfate d'ammonium .	101
2.4.3. Analyse et purification par chromatographie d'exclusion stérique	101
3. Séparation rapide de la sous-unité $\epsilon$ à partir du complexe F1-ATPase .....	101
3.1. Diminution du volume mort de la colonne de séparation HPLC .....	102
3.2. Refroidissement du système HPLC .....	103
3.3. Evaluation du rééchange dû à la séparation.....	104
3.4. Augmentation du débit .....	105
3.5. Réduction du rééchange par la méthode ZIPTIP .....	106
4. Séparation rapide de la sous-unité $\epsilon$ à partir du complexe F1-ATPase .....	107
4.1. Introduction .....	107
4.2. Protocole expérimentale .....	107
4.3. Résultats .....	109
5. Empreinte de digestion de la sous-unité $\epsilon$ .....	112
5.1. La pepsine immobilisée.....	112
5.2. Protocole expérimental.....	112
5.3. Assignation des fragments de digestions .....	112

6. Etude de la sous-unité $\epsilon$ par échange isotopique hydrogène/deutérium.....	115
6.1. Introduction .....	115
6.2. Effet de la structuration sur l'incorporation globale de deutérium.....	116
6.3. Topologie de l'incorporation du deutérium dans la sous-unité $\epsilon$ isolé .	118
7. Analyse topologique des zones d'accessibilité au solvant deutéré .....	119
7.1. Introduction .....	120
7.2. Protocole expérimentale .....	120
7.3. Analyse des résultats .....	120
<i>Incréments de masses</i> .....	120
<i>Peptides considérés</i> .....	121
<i>Accessibilité au solvant dans le complexe F1-ATPase</i> .....	122
<i>Représentation de l'accessibilité au solvant deutéré</i> .....	123
8. Conclusion .....	126

## Troisième partie : La protéine prion HET-s, un modèle pour l'étude des amyloïdes .....

127

### Chapitre 5 : Etude de la transition amyloïde par échange isotopique H/D .....

128

1. Introduction .....	128
2. Analyse topologique de l'interaction entre protéines HET-s au sein de la fibre amyloïde .....	131
2.1. Carte peptidique de la protéine HET-s .....	131
2.1.1. Introduction .....	131
2.1.2. Protéolyse à la pepsine immobilisée .....	131
2.1.3. Assignation des fragments de protéolyse .....	133
2.1.4. Protéolyse à la pepsine : forme soluble et forme agrégée .....	135
2.2. Echange isotopique sur les formes agrégées et soluble de HET-s .....	136
2.2.1. Introduction .....	136
2.2.2. Protocole expérimentale .....	136
2.2.2.1. Echange isotopique sur la forme soluble de HET-s .....	136
2.2.2.2. Echange isotopique sur la forme amyloïde de HET-s .....	136
2.2.2.3. Microscopie électronique .....	137

2.2.2.4. Spectrométrie de masse .....	138
2.2.3. Résultats des expériences d'échange isotopique .....	139
2.2.3.1. Analyse des données .....	139
2.2.3.2. Echange isotopique sur la forme soluble de HET-s .....	140
2.2.3.3. Echange isotopique sur la forme amyloïde de HET-s .....	144
2.3. Discussion et conclusion.....	144
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>149</b>

# Abréviations utilisées dans le document

AC : Alternative current (tension alternative)  
ACHCA : acide  $\alpha$ -cyanohydroxycinnamique  
ACN : acétonitrile  
ADP : adénosine-5'-diphosphate  
 $a_r, q_r$  : Paramètre de stabilité dans la direction r (radiale)  
 $a_u, q_u$  : Paramètre de stabilité dans la direction u=r ou z  
 $a_z, q_z$  : Paramètre de stabilité dans la direction z (axiale)  
ATP : adénosine-5'-triphosphate  
ATPase: adénosine-5'-triphosphatase  
BAD : Boundary-Activated Dissociation (dissociation induite aux limites de stabilités)  
BMF<sub>o</sub>: secteur Fo mitochondrial de boeuf  
BMF<sub>1</sub> : secteur F1 mitochondrial de boeuf  
BSA : albumine sérique bovine  
CID : Collision Induced dissociation (dissociation induite par collision)  
CD : dichroïsme circulaire  
Da : dalton  
DC: Direct Current (tension continue)  
DCCD : dicyclohexyl carbodiimide  
E.Coli : *Escherichia Coli*  
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique  
EGTA : acide éthylène glycol bis(3-aminoéthyléther)  
ESI : ionisation par electrospray  
 $\Phi_0$  : Potentiel électrique  
FAB-Fast Atom Bombardment  
FT/ICR: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier)  
GPC : chromatographie par perméation de gel  
HPLC-Chromatographie Liquide Haute Performance  
HXMS: Hydrogen eXchange Mass Spectrometry (Echange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse.)  
IT : Ion Trap (piège ionique)  
kDa : kilodalton  
LC-MS: Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse  
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/ionization  
MF<sub>1</sub>: secteur F<sub>1</sub> de l'ATP synthase mitochondriale  
MF<sub>o</sub>: secteur F<sub>o</sub> de l'ATP synthase mitochondriale  
OSCP: Oligomycin Sensitivity conferring Protein  
PAB: para aminobenzamidine  
PDB: Protein Data Bank  
Pi: Phosphate inorganique  
PSD :Post Source Decay  
R<sub>o</sub> : Rayon interne de l'électrode circulaire du piège ionique quadripolaire  
RF : Radiofrequency (radiofréquence)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TFA :Acide trifluoroacétique

ToF : Time of Flight (temps de vol)

U : Amplitude de la tension continue

V : Amplitude de la tension alternative de piègeage

$\Omega$  : Pulsation de la tension alternative de piègeage ( $\Omega = 2\pi f$ , avec f la fréquence en Hz)

$z_0$  : Distance entre le centre du piège ionique quadripolaire et une des deux électrodes chapeaux

# Première partie

## Introduction



# Chapitre 1

## Description de techniques de Spectrométrie de masse

### 1. Introduction

Un spectromètre de masse est un instrument qui produit des ions et qui les sépare suivant leur ratio masse/charge. Autour de cet instrument gravitent Physiciens, Chimistes et Biologistes qui utilisent sa puissance d'analyse pour développer la recherche à l'interface de ces disciplines. L'émergence de nouvelles techniques rendant possible l'analyse des macromolécules par spectrométrie de masse a donné à cet instrument un rôle majeur pour la compréhension de la structure et de la fonction des molécules du vivant.

Même si l'utilisation des spectromètres de masse pour décrire les processus biologiques remonte à la fin des années 1930, les améliorations techniques apportées ces deux dernières décennies ont rendu cet instrument incontournable pour l'étude des molécules biologiques. Au début des années 1980, l'introduction de nouvelles techniques d'ionisation a largement contribué à la renaissance de la spectrométrie de masse. Ainsi le FAB (Fast Atom Bombardment), la désorption à plasma (PD) et le thermospray (TSP) ont permis la production d'ions en phase gazeuse à partir de composés polaires et chargés sans dérivation chimique. Ces nouvelles techniques d'ionisation ont permis, en plus d'un gain dans le temps de préparation des échantillons, d'accéder aux hautes masses moléculaires jusque là hors d'atteinte. A partir de la fin des années 1980, d'autres techniques d'ionisation comme l'électrospray (ESI) et la désorption laser assistée par matrice (MALDI) ont été introduites et ont largement participé au développement de la spectrométrie de masse en Biologie.

Il est maintenant possible de mesurer la masse des substances avec une sensibilité proche de la zeptomole et des molécules de plus de 100 000 Da peuvent être mesurées avec une justesse supérieure à 1000 fois celle que l'on pourrait obtenir par gel d'électrophorèse. L'amélioration de la capacité d'analyse des spectromètres de masse pour les macromolécules est le fruit d'un développement (conjoint) de nouvelles techniques d'ionisation soutenues par des avancées technologiques au niveau des analyseurs et de l'électronique.

Un spectromètre de masse est un instrument composé d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. Dans la source les molécules sont ionisées et amenées en phase gazeuse. Les ions formés dans la source sont ensuite séparés au niveau de l'analyseur suivant leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) avant d'atteindre le détecteur. Pour notre étude, nous avons utilisé principalement deux types de source. Une source utilisant l'ionisation de type électrospray (ESI) et une autre utilisant l'ionisation à désorption laser assistée par matrice (MALDI). Nous avons également utilisé deux types d'analyseurs, un analyseur à temps de vol (ToF) et un analyseur à piège ionique (IT). Dans ce chapitre nous allons introduire les techniques de spectrométrie de masse qui nous ont permis de réaliser cette étude.

## 2. L'ionisation

### 2.1 L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI)

#### 2.1.1. Principe de l'ionisation MALDI

La technique MALDI fut introduite à la fin des années 1980 par Karas *et al.*<sup>1</sup> Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'une matrice, co-cristallisée avec l'échantillon. Le mélange matrice-échantillon est déposé sur un support métallique (la cible) et cristallise, après évaporation du solvant. La cible est ensuite introduite dans la source du spectromètre de masse, maintenue sous vide.

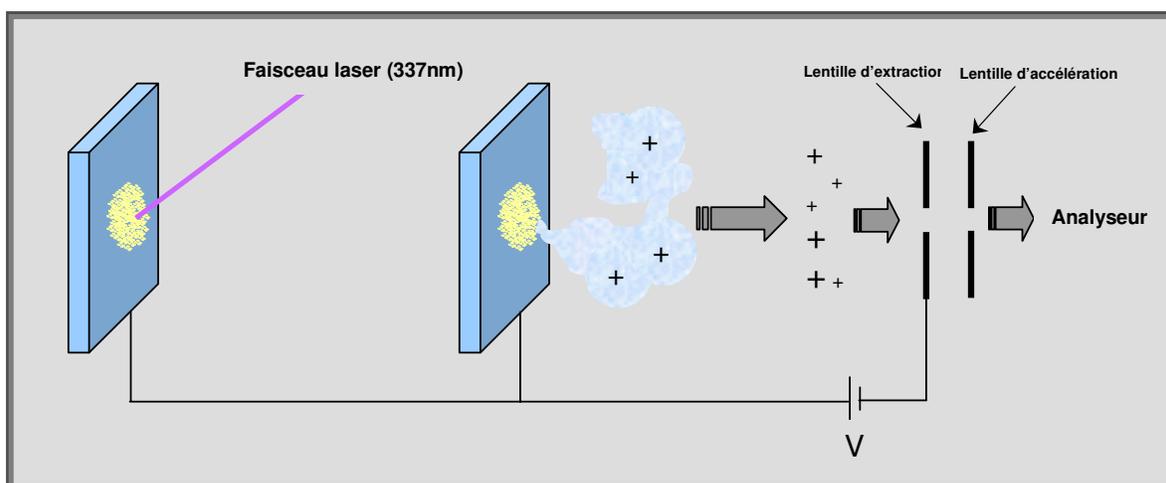


Fig1.1. Principe de l'ionisation MALDI

L'échantillon est irradié dans la source par un faisceau laser. Lorsque le rayonnement laser atteint les cristaux, son énergie est transférée à la matrice, qui se vaporise et entraîne dans la phase gazeuse des molécules intactes d'analyte. Pendant l'expansion du nuage moléculaire formé, l'analyte s'ionise par transfert de protons de la matrice vers l'analyte ou encore par collision des molécules entre elles. Notons que l'ionisation de l'échantillon peut également avoir lieu dans la phase solide, avant l'irradiation. Les protons proviennent majoritairement de la matrice (protons labiles des groupements carboxyliques ou

<sup>1</sup> Karas, M., Bahr, U., Strupat, K., Hillenkamp, F., Tarbopoulos, A., and Pramanik, D.N. *Anal. Chem.*, **67**, 675-679, 1988

hydroxyliques) mais aussi du solvant de l'analyte<sup>2</sup>. Les ions formés sont majoritairement des ions monochargés  $[M+H]^+$ .

L'utilisation d'impulsions laser (impulsions de durée 3 à 5 ns pour un laser N<sub>2</sub>) permet de transférer de l'énergie aux cristaux en un temps très court, ce qui réduit la possibilité de décomposition par la chaleur de l'analyte. Les ions sont alors accélérés par un champ électrique important (de l'ordre de 20 kV) jusqu'à leur entrée dans l'analyseur de masse (Fig. 1.1.) L'analyseur couplé aux sources d'ionisation MALDI est généralement un tube de temps de vol, particulièrement bien adapté au cas d'une ionisation discontinue. Le principe de l'analyseur à temps de vol sera développé dans le paragraphe 3.1.

### 2.1.2. Préparation de l'échantillon pour une analyse par MALDI.

#### Choix de la matrice

Les matrices les plus couramment employées sont répertoriées dans le tableau 1.1.

Matrices	Applications courantes	Affinité protonique (kJ.mol <sup>-1</sup> )
acide $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique (ACHCA)	Peptides Protéines de faibles masses Glycopeptides	841
acide 3,5-diméthoxy 4-hydroxycinnamique (acide sinapinique) (SA)	Protéines de hautes masses Peptides	887
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique) (DHB)	Peptides Oligosaccharides Glycopeptides	943
Acide 2-hydroxy 4-phénylazobenzoïque	Peptides Protéines Glycoprotéines	943
2,4,6-acide trihydroxyacétophénone (THAP)	Oligonucléotides	-

**Tab. 1.1. Utilisation des matrices en MALDI. Les valeurs des affinités protoniques ont été extraites de Jorgensen et al.<sup>3</sup> La valeur de l'affinité protonique de la matrice THAP n'est pas disponible.**

Il n'existe pas de règle concernant les applications d'un type de matrice à un type d'échantillon. Ce sont des observations expérimentales qui ont permis de préconiser l'emploi d'un type de matrice pour un type d'échantillon. Pour l'analyse de peptides, les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique et l'acide sinapinique sont couramment employés<sup>4</sup>. L'acide gentisique est utilisé pour l'analyse des oligosaccharides<sup>5</sup>, et l'acide hydroxypicolinique permet l'analyse de fragments d'ADN<sup>6</sup>.

L'affinité protonique de la matrice traduit sa capacité à transférer des protons aux molécules d'analyte. En effet, pour que le transfert de protons puisse se produire, il faut que l'affinité protonique de

<sup>2</sup> Wong, C.K.L., So, M.P., and Chan T.W.D. *Eur. J. Mass Spectrom*, 4, 223-232, 1998.

<sup>3</sup> Jorgensen, T.J.D., Bojesen, G., and Rahbek-Nielsen, H.. *Eur. Mass Spectrom*, 4, 39-45, 1998.

<sup>4</sup> Beavis, R.C., and Chait, B.T. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 3, 432,435, 1989.

<sup>5</sup> Strupat, K., Karas., M., and Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.*, 27, 156-158, 1992.

<sup>6</sup> Wu, K.J., Shaler, T.A., and Becker C.H. *Anal. Chem.*, 66, 1637-1645, 1994

la matrice soit inférieure à celle de l'analyte. Plus l'affinité protonique de la matrice est faible et plus celle-ci est capable de transférer des protons vers l'analyte.

Les matrices utilisées sont des composés qui absorbent à la longueur d'onde du laser (généralement l'ultraviolet, avec un laser N<sub>2</sub> à 337 nm). En effet le rôle de la matrice est d'absorber la plus grande partie de l'énergie laser incidente pour minimiser la dégradation de l'échantillon. Les molécules de matrice ont également la propriété de co-cristalliser sélectivement avec les biopolymères, ce qui permet de séparer les molécules d'intérêt des contaminants (sels ou détergents par exemple). C'est pourquoi l'ionisation MALDI est une technique qui tolère des quantités assez importantes de contaminants (Tab. 1.2.).

Contaminant	Quantité maximale tolérée (approximative)
Urée	0.5M
Guanidine-HCl	0.5M
Dithiothréitol	0.5M
Glycérol	1%
Tampon Tris	0.05M
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.05M
Tampon Phosphate	0.01M
Détergent (sauf SDS)	0.1%
SDS	0.01%

Tab. 1.2. Quantité de contaminant tolérées par la technique MALDI-TOF <sup>7</sup>

Pour l'analyse de mélanges de peptides, le choix de la matrice joue un rôle important. Par exemple, pour l'obtention d'une carte peptidique, l'utilisation de l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique permettra d'observer préférentiellement des peptides de masse inférieure à 2500 Da, alors que l'acide sinapinique permet d'observer plus aisément les peptides de masse supérieure à 2500 Da.

### Mode de dépôt

Les méthodes de dépôt ont été décrites en détail dans la revue de Kussmann<sup>8</sup>. La préparation d'un dépôt est déterminante pour la qualité du spectre obtenu. Parmi les nombreuses méthodes de préparation possibles, celle dite de la « goutte séchée » (ou dried droplet) est la plus courante. Dans ce cas une solution saturée de matrice (dans H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 v/v 0.1% TFA) est mélangée à la solution d'échantillon de façon à obtenir un rapport d'environ 5000 : 1 matrice-échantillon. Un faible volume de ce mélange (0.5-1  $\mu$ l) est alors déposé sur la cible. Après séchage (à l'air, par pompage sous vide ou par flux d'azote), on peut alors analyser l'échantillon.

<sup>7</sup> Coligan, J.E., Dunn, B.N., Ploegh, H.L. Eds. (Contributed by William J. Henzel and John T. Stults), *Current Protocols in Protein Science, Volume 1, John Wiley and Sons, New York. Unit 16.2, 1995.*

<sup>8</sup> Kussmann, M., Nordhoff, E., Rabek-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kroll-Kristensen, A., Palm, L., and Roepstorff P. *J. Mass Spectrom.*, **32**, 593-601, 1997.

D'autres alternatives sont possibles pour la préparation de dépôts, en plusieurs étapes cette fois. La méthode de la couche mince (ou thin layer) consiste à déposer un film de matrice sur la cible. Pour obtenir ce film, la matrice est diluée dans un solvant très volatile (acétone). En séchant très rapidement sur la cible, cette solution permet d'obtenir un film de matrice uniforme sur la surface de la cible. L'échantillon est ensuite ajouté et absorbé par le film de la matrice.

La méthode du « sandwich » est une variante de la méthode précédente : une couche mince de matrice est préalablement déposée sur la cible, puis une gouttelette d'eau contenant 0.1% TFA est ajoutée sur le dépôt. L'addition de la solution d'échantillon puis d'une autre gouttelette de solution de matrice permet d'obtenir une cristallisation en présence d'eau et d'obtenir, dans certains cas, une meilleure ionisation de l'analyte. Cette technique permet aussi de diminuer la concentration en sels de l'échantillon si celui-ci en contient une grande quantité.

Pour tous les types de dépôt que nous avons décrits, il est important de noter qu'un rinçage du dépôt formé (ou plusieurs rinçages successifs) avec de l'eau est souvent préconisé après la cristallisation du mélange matrice/échantillon. Dans de nombreux cas, cette étape améliore le signal obtenu car elle permet de diminuer considérablement la quantité de contaminants avant l'analyse.

L'homogénéité du dépôt est un facteur très important pour une analyse MALDI. Un dépôt homogène permet une meilleure reproductibilité de l'analyse. La qualité et la quantité du dépôt sont des facteurs prépondérants dans le cas d'une analyse en mode PSD (Post Source Decay) car plusieurs acquisitions successives sont nécessaires à l'obtention d'un spectre.

## 2.2 L'ionisation par électronebulisation (ESI)

### 2.2.1. Principe de l'ionisation ESI

L'ionisation par électronebulisation fut appliquée pour la première fois à l'étude de polystyrènes<sup>9</sup>. Elle fut ensuite utilisée pour l'analyse de petites molécules, de polymères synthétiques, puis de bio molécules<sup>10</sup>. Le processus de l'ionisation en ESI peut être décrit de façon simple, bien que les phénomènes d'ionisation en phase gazeuse soient complexes et encore mal compris. L'échantillon est introduit dans la source ESI à faible débit (5 à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) par un capillaire métallique auquel un potentiel élevé est appliqué (3 kV).

<sup>9</sup> Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Fergusson, L.D., and Alice, M.B. *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240-2249, 1968.

<sup>10</sup> Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Withhouse, C.M. *Sci.*, **246**, 64-71, 1989.

L'échantillon est introduit dans la source via ce capillaire à l'aide d'un gaz de nébulisation chaud (azote). Le champ électrique entre le capillaire et le cône d'entrée entraîne une accumulation de charges en surface du liquide et son élongation en forme de «cône de Taylor» dans la direction de la contre électrode. A l'extrémité du cône de Taylor, la densité de charge est telle que les répulsions électrostatiques des charges entre elles sont supérieures à la tension superficielle qui garantit la cohésion du liquide. Le cône donne alors naissance à de fines gouttelettes chargées<sup>11</sup>. Lorsque le solvant s'évapore, grâce au chauffage de la source et à l'introduction du gaz de désolvatation, les gouttelettes deviennent plus petites, mais conservent leur charge initiale. A cause des répulsions électrostatiques, la cohésion d'une goutte n'est plus assurée lorsqu'elle atteint la limite de stabilité de Rayleigh, c'est à dire son rayon maximum R en fonction de l'excès de charges  $q_R$  qu'elle contient.

La charge et le rayon critique de Rayleigh sont reliés par l'équation :

$$Q_r = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Où  $\gamma$  est la tension superficielle du liquide et  $\epsilon_0$  la permittivité du vide. Lorsque le rayon maximum R est atteint, on observe alors le phénomène d'explosion coulombienne : les gouttelettes du spray éclatent en gouttelettes « filles » de plus en plus petites, de même polarité<sup>12, 13</sup>. Le spray de gouttelettes est dirigé vers la contre électrode à cause de la polarité de celle-ci, et dans une moindre mesure, du gradient de pression dans la source.

Le processus de formation de gouttelettes chargées que nous venons de décrire est bien connu, et certains travaux ont permis d'obtenir des clichés de la formation des gouttelettes par explosion coulombienne<sup>14</sup>. En revanche, le mécanisme d'émission des ions à partir des gouttelettes vers la phase gazeuse, que nous développerons dans le paragraphe suivant, est toujours controversé.

Les ions formés à pression atmosphérique, dans la chambre d'ionisation, sont ensuite transmis dans la zone de vide primaire ( $10^{-3}$  Torr), puis dans la zone de pression décroissante, jusqu'à leur accélération vers l'analyseur de masse ou règne un vide secondaire ( $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  Torr) (Fig. 1.2.).

<sup>11</sup> Hayati, I., Bailey, A.I., and Tadros T.F. *Sci.*, **117**, 205-221, 1987

<sup>12</sup> Doyle, A., Moffett, D.R, and Vonnegut B. *J. Colloid Sci.*, **19**, 136-143, 1964

<sup>13</sup> Tafllin, D.C., Ward, T.L. and Davis E.J. *Langmuir*, **5**, 376-384, 1989.

<sup>14</sup> Gomez, A., and Tang, K. *Phys.fluids.*, **6**, 404-414, 1994.

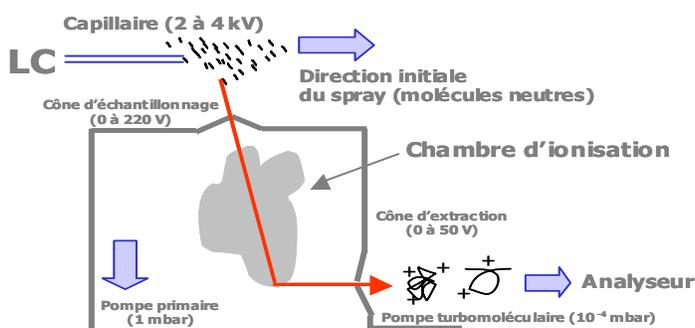


Fig. 1.2. Principe de l'ionisation ESI. La source présentée est une source orthogonale, appelée aussi en « en Z » à cause de la trajectoire des ions présentée en rouge sur le schéma.

Bien que souvent couplé à un analyseur quadrupolaire, l'électrospray peut aussi être couplé à un analyseur à temps de vol via un guide d'ion (hexapole ou octopole) ce qui améliore la sensibilité de la technique et autorise une gamme de masse plus importante.

Le développement de la technique nanospray, utilisant des débits de quelques nl/min, a permis de réduire de manière considérable les quantités de matériel nécessaires<sup>15</sup>. Les nouvelles sources orthogonales –« en Z »- ont également rendu la technique ESI plus tolérante aux contaminants, et plus sensible. Cette géométrie de source autorise également un chauffage modéré de l'interface, puisque moins de molécules de solvant pénètrent dans la chambre d'ionisation.

### 2.2.2. Emission des ions en phase gazeuse

Le passage des ions solvatés vers la phase gazeuse peut s'expliquer selon deux modèles théoriques (Fig. 1.3) :

#### *Le modèle de Dole*

Plusieurs fissions successives aboutissent à des gouttelettes très petites (de rayon 1 nm environ) contenant une ou plusieurs charges élémentaires mais une seule molécule d'analyte. Après évaporation du solvant résiduel, les charges se localisent sur les sites permettant de générer l'ion le plus stable en phase gazeuse<sup>16</sup>. Ce modèle est appelé CRM (Charged Residue Mechanism).

<sup>15</sup> Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaev, T., Breit, S., Schweigerer, L. Fotsis, T., ad Mann, M. *Nature*, **379**, 466-469, 1996.

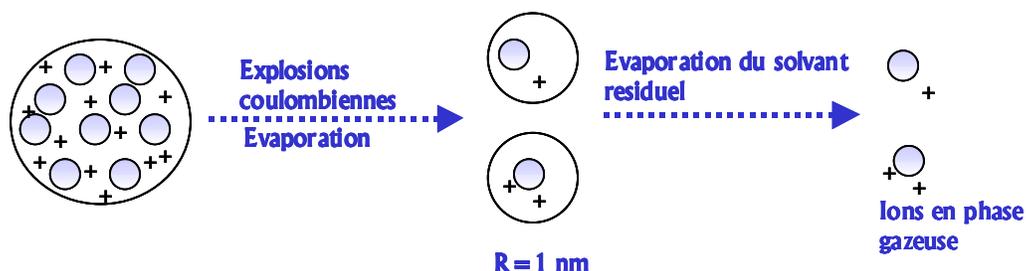
<sup>16</sup> Mack, L.L., Kralik, P., Rheude, A., and Dole, M. *J. Chem. Phys.*, **52**, 4977-4986, 1970

### Le modèle de d'Iribarne et Thomson

Lorsque le rayon des gouttelettes filles atteint un certain rayon, inférieur à la limite de Rayleigh (i.e.  $< 10$  nm), le champ électrique est suffisamment important pour que des ions solvatés soient émis dans la phase gazeuse.

Cependant, l'ionisation des molécules de hautes masses, comme les protéines, s'effectue selon le modèle CRM. En effet, les travaux de De La Mora<sup>17</sup> et al. ont montré que la charge maximale portée par des protéines de hautes masses (i.e.  $> 3300$  Da) était égale à 65-110% de la charge maximale autorisée par l'équation de la limite de Raleigh. Comme la charge portée par un polymère compact constitue une proportion aussi importante de la charge maximum possible, l'auteur conclut que le scénario du CRM est applicable dans ce cas. Si les ions étaient produits par évaporation, alors il ne devrait pas y avoir de corrélation entre la charge de l'ion et celle prédite par le calcul de la charge limite de Rayleigh (Eq. 1.1). En revanche, pour les petites molécules, l'IEM est le mécanisme dominant.

### Modèle de Dole (CRM)



### Modèle d'Iribarne et Thomson (IEM)

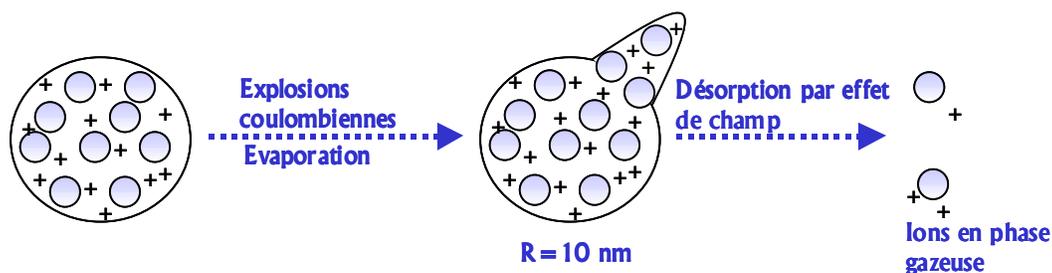


Fig.1.3. Emission des ions en phase gazeuse en ESI

<sup>17</sup> De La Mora, F.J. *Anal. Chim. Acta*, 406, 93-104, 2000.

### 2.2.3. Préparation de l'échantillon en ESI

La préparation de l'échantillon pour une analyse en ESI (mode positif) nécessite sa mise en solution dans un mélange eau/solvant organique et s'effectue le plus souvent en milieu acide (pH 2), dans le cas d'une analyse en conditions dénaturantes. Classiquement, on utilise un mélange eau/méthanol ou eau/acétonitrile ( avec un rapport volumique eau/solvant de l'ordre de 50/50) contenant 1 à 5 % d'acide formique ou acétique. On peut également utiliser du TFA à une concentration inférieure à 0.1%, bien que cet acide ne soit pas très volatile et puisse entraîner une diminution ou une perte de signal<sup>18</sup>.

Pour analyser une protéine dans son état natif, l'échantillon doit être mis en solution dans un tampon volatile de pH proche de la neutralité, comme l'acétate d'ammonium ou le bicarbonate d'ammonium (10-50 mM). Cette approche est notamment utilisée pour l'étude d'interactions non covalentes spécifiques<sup>19</sup>.

Les tensioactifs, les sels, et plus généralement les substances non volatiles, perturbent le processus d'ionisation électrospray et induisent une perte de sensibilité. En particulier, la présence de sels provoque des séries d'adduits de type  $[M+Na]^+$ ,  $[M+H+Na]^+$ , ou  $[M+K]^+$  par exemple. La présence de ces adduits compliquant le spectre, un dessalage est réalisé par dialyse ou chromatographie avant l'analyse.

### 2.2.4. Interprétation des spectres en ESI

Le spectre d'une protéine obtenu en ESI (mode positif) se présente sous la forme d'une enveloppe de pics, correspondant à la distribution statistique des états de charge  $n$  de la molécule de masse  $M$ . Il est intéressant de noter que les sites capables de porter une charge positive sont en général situés sur les résidus basiques His, Lys et Arg. Ceux-ci constituent en général 10% de la composition en acides aminés d'une protéine. Une protéine de masse 50 Kda, par exemple, pourra porter  $n=50$  charges positives. Pour une molécule de masse  $M$ , on obtient une série d'ions de masses :

$[M+nH]^{n+}$ ,  $[M+(n+1)H]^{(n+1)+}$ ,  $[M+(n+2)H]^{(n+2)+}$ , ...,  $[M+(n+i)H]^{(n+i)+}$ , où  $n$  est un entier positif dont la valeur dépend du nombre de sites basiques.

Chaque ion de la série décrite ci-dessus a un atome d'hydrogène et une charge de plus que le précédent. La seule difficulté est de connaître la valeur de l'état de charge  $n$  associé à un pic. La mesure des rapport masse sur charge :

<sup>18</sup> Apffel, A., Fisher, S., Goldberg, G., Goodley, P.C., and Kuhlmann, F.E. *J. Chrom. A*, **712**, 177-190, 1995.

<sup>19</sup> Light-Wahl, K.J., Schwartz, B.L., Smith, R.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5271-5278, 1994.

$$m_1 = \frac{(M+n)}{n} \quad \text{et} \quad m_2 = \frac{(M+n+1)}{n+1}$$

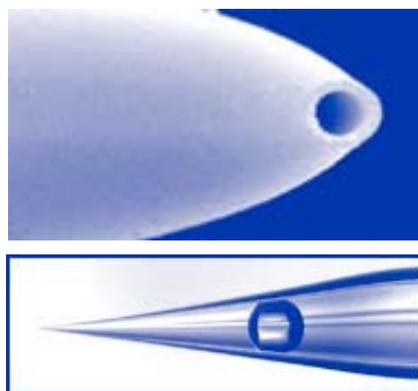
de deux pics consécutifs sur le spectre, permet, en résolvant ce système de deux équations à deux inconnues de calculer facilement M et n. On trouve ainsi que :

$$M = \frac{(m_1 - 1)(m_2 - 1)}{(m_2 - m_1)} \quad \text{et} \quad n = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1}$$

De plus, ce calcul peut être fait automatiquement par un logiciel de déconvolution qui prend en compte toutes les séries d'ions et permet de reconstruire un spectre fictif dont l'abscisse est l'unité de masse (le dalton, Da) et non plus l'unité du rapport m/z (Thomson).

### 2.2.5. Le nanospray

Les sources électrospray classiques fonctionnent avec un débit de solution allant de 1 à 10  $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$  et même supérieur si un gaz nébulisant à co-courant est utilisé pour assister la formation des gouttelettes<sup>20</sup>. Un certain nombre de sources micro spray et nanospray permettant des débits de solution plus faibles ont été mises au point. Le nanospray a été introduit pour la première fois par l'équipe de Mann en 1988<sup>21,22</sup>. Dans la source nanospray<sup>23,24</sup>, 1 à 10  $\mu\text{l}$  de la solution d'échantillon sont introduits dans des capillaires dont la pointe a été étirée et ouverte, donnant un orifice à la pointe du capillaire de diamètre interne d'environ 1 à 4  $\mu\text{m}$  (figure 1.4.).



**Fig. 1.4. Image en microscope optique de l'orifice d'une aiguille nanospray de diamètre interne 2  $\mu\text{m}$  (en haut). Dessous, le chargement de 1  $\mu\text{l}$  d'échantillon dans l'aiguille.  
Source : New objective Inc. [www.newobjective.com](http://www.newobjective.com)**

<sup>20</sup> Bruins, A.P., Covey, J.R. Henion, J.D. Anal.Chem. 59, 2642, 1987.

<sup>21</sup> Wilm, M., Mann, M. Proc. 42<sup>nd</sup> ASMS conf. Mass Spectrometry and allied Topics, Chicago, IL, , p 770, 1994

<sup>22</sup> Wilm, M., Mann, M. Anal. Chem. 68, 1, 1996.

<sup>23</sup> Wilm, M., Mann, M. Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. 136, 167, 1994.

<sup>24</sup> Korner, R., Wilm, M., Morand, K. Shubert, M., Man, M. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7, 150, 1996.

Le spray est initié et maintenu par la différence de potentiel électrostatique entre la pointe du capillaire et la contre-électrode. Cette source permet d'obtenir des gouttelettes de la taille du nanomètre à partir de débits de l'ordre du nL.min<sup>-1</sup>. Parallèlement, le concept de microspray a été introduit d'une part par Gale et Smith et d'autre part par Caprioli et coll<sup>25,26,27</sup>. Cette source opère à des débits inférieurs au µl.min<sup>-1</sup>, avec une infusion continue de l'échantillon au travers de capillaires de silice d'un diamètre interne de 5 à 50 µm (électrophorèse capillaire), donnant des gouttelettes de la taille du micromètre.

L'efficacité totale d'ionisation/désorption en spectrométrie de masse en mode électrospray peut être définie comme le nombre d'ions analyte enregistrés au détecteur sur le nombre de molécules nébulisées. C'est donc une combinaison des efficacités d'ionisation, de désolvation et de transfert. Or, la source nanospray présente une amélioration de ces trois facteurs par rapport aux sources électrospray conventionnelles. Pour déterminer l'efficacité totale d'ionisation/désorption en nanospray, un peptide synthétique a été étudié et le signal obtenu a été suivi en fonction du temps. Il en résulte que l'ionisation totale en nanospray est 500 fois plus importante qu'avec une source électrospray conventionnelle. Cela contribue à une plus grande sensibilité et à une réduction du bruit de fond. L'efficacité de désolvation augmente en nanospray parce que les gouttelettes dans ce mode de désorption sont plus petites. L'efficacité d'ionisation/désorption est renforcée du fait de l'importance du rapport charge sur volume de ces nano-gouttelettes. Un autre avantage majeur du nanospray permet de travailler, en mode positif et négatif, avec une gamme importante de solvant et de pH, mais également en présence d'une certaine quantité de sels<sup>28</sup>. Ainsi, l'étude d'oligonucléotides en mode négatif, par nanospray, dans des solutions aqueuses de fort pH, a pu être réalisée<sup>29,30</sup>. De telles expériences sont plus difficiles à réaliser en électrospray et nécessitent, avec cette source conventionnelle, l'utilisation d'une assistance pneumatique (ion spray) ou d'une assistance par un flux de solvant à co-courant (sheath liquid). La tolérance vis-à-vis des solutions tampon est également une caractéristique importante pour l'étude des interactions non covalentes. Il a été montré que ces interactions nécessitent des conditions à l'interface source-analyseur relativement douces, ce qui est le cas en nanospray (pas de gaz séchant chauffé, différence de pression moins importante)<sup>31,32,33</sup>. Le principal problème en nanospray reste le coût élevé des aiguilles nécessaires à l'injection des échantillons dans la source. Toutefois, ce désavantage est partiellement compensé lorsque les études sont menées sur des échantillons précieux car le nanospray permet de diminuer considérablement les quantités d'échantillons nécessaires à l'analyse.

<sup>25</sup> Emmet, M.R., Caprioli, R.M. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5. 605, 1994.

<sup>26</sup> Andren, P.E., Emmet, M.R., Caprioli, R.M. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5, 867, 1994.

<sup>27</sup> Andren, P.E., Caprioli, R.M. J. Mass Spectrom. 30, 817, 1995.

<sup>28</sup> Acedo, M., Tarrason, G., Piulat, J., Mann, M. Wilm, M. Eritja, R. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 1577, 1995.

<sup>29</sup> Guy, P.A., Anderegg, R.J. Anal. Chem. 69, 3188, 1997.

<sup>30</sup> Veenstta, T.D., Tomlinson, A.J., Benson, L., Kuman, R., Naylor, S. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9, 580, 1998.

<sup>31</sup> Valaskovic, G.A., Kelleher, N.L., Little, D.P., Aaserud, D.J., Mc Lafferty, F.W. Anal. Chem. 67, 3802, 1995.

<sup>32</sup> Fligge, T.A., Kast, J., Bruins, K., Przybylski, M. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10, 112, 1999.

<sup>33</sup> Robinson, C., Jarvis, S., Chung, E., Hugues, C., Green, B. Proc. 44<sup>th</sup> ASMS conf. Mass Spectrometry and allied topics, Portland, OR (1996), p 1408.

### 3. Les analyseurs

Après avoir produit des ions en phase gazeuse, plus ou moins solvatés, il reste encore à transmettre ces ions de la source (sous vide dans le cas du MALDI ou à pression atmosphérique dans le cas de l'ESI) vers un analyseur sous vide. Dans le cas du MALDI, ce transfert se réalise à l'aide des lentilles d'accélération. Pour l'ESI, le transfert se fait via un capillaire de transfert dont l'entrée et la sortie peuvent être utilisées comme deux électrodes indépendantes permettant de guider les ions. Les ions émergent de ce capillaire sont entraînés et focalisés vers l'analyseur à l'aide d'écrèmeurs, de lentille et/ou d'un guide d'ions suivant l'instrument. Tous les types d'analyseurs peuvent être couplés aux sources MALDI ou électrospray : Piège ionique, quadripôle, FT ICR, ToF. Pour la suite, nous nous attacherons à indiquer les principes des analyseurs utilisés pour notre étude : l'analyseur à temps de vol et le piège ionique.

#### 3.1. L'analyseur à temps de vol

##### 3.1.1 Principe de l'analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol fut développé par Wiley<sup>34</sup> et Mac Laren au milieu des années 1950. Lorsque des ions de même charge  $z$  sont dans le champ électrique d'accélération  $V_0$ , ils possèdent tous la même énergie cinétique  $zV_0$ . Lorsqu'un ion entre dans l'analyseur, zone libre de champ, son énergie cinétique s'exprime alors en fonction de sa masse  $m$  et du carré de sa vitesse  $v$ . On peut donc écrire l'égalité des deux expressions de l'énergie cinétique :

$$zV_0 = \frac{1}{2}mv^2 = \text{constante} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

Il est alors simple d'exprimer le temps de vol  $t$ , grandeur accessible par la mesure en fonction de la longueur du tube de vol  $L=vt$  en écrivant :

$$t = \left(\frac{m}{2zV_0}\right)^{\frac{1}{2}}L \quad (\text{Eq. 1.3})$$

La mesure du temps de vol permet alors de calculer le rapport  $m/z$  par l'équation :

---

<sup>34</sup> Wiley, W.C., and Mac Laren, I.H. *Rev.Sci.Instrum.*, 16,1150-1157,1955.

$$\frac{m}{z} = \frac{2V_0 t^2}{L^2} \quad (\text{Eq.1.4})$$

L'équation 1.2 ci-dessus montre que deux ions de masses différentes et de même charge auront des vitesses différentes, puisqu'ils ont la même énergie cinétique. Ils auront donc, dans l'analyseur, des temps de vol différents. L'ion le plus léger sera détecté avant l'ion le plus lourd, ce qui permet donc de trier les ions selon leur masse. L'étalonnage du tube de vol, à l'aide d'un mélange de molécules de masses connues, permet d'associer la masse d'un ion à un temps de vol donné.

Ceci constitue le mode linéaire de détection, utilisé pour l'analyse de protéines de haut poids moléculaire. En théorie, la gamme de masse accessible grâce à l'analyseur ToF est infinie. En pratique, les limites imposées par le détecteur permettent de mesurer des masses jusqu'à 200-500 kDa.

Notons que l'équation 1.3 exprime le temps de vol dans la zone libre de champ, c'est à dire le tube de vol. Le temps de vol total de l'ion avant sa détection prend en compte le trajet effectué dans la source. C'est pourquoi il est intéressant d'effectuer une première correction de la dispersion en énergie cinétique dans la source en utilisant l'extraction retardée.

### 3.1.2. Principe de l'extraction retardée

L'ionisation MALDI permet de produire des ions sur une surface (la cible) et en un temps très court (celui de l'impulsion laser). Les dispersions spatiale et temporelle des ions générés, qui pourraient être à l'origine de différences entre les temps de vol d'ions de même masse, sont donc faibles. Cependant, il existe une dispersion en énergie cinétique, car les ions ne reçoivent pas tous exactement la même énergie.

Pour corriger cette dispersion en énergie cinétique des ions dans le nuage moléculaire, ceux-ci sont maintenus dans la source pendant un délai de quelques centaines de nanosecondes<sup>35</sup>. Pendant ce laps de temps, les ions « refroidissent » en échangeant de l'énergie de collision. Ce procédé permet de transformer la dispersion d'énergie en dispersion spatiale, en fonction de leur vitesse initiale. Les ions sont ensuite extraits de la source par application d'une impulsion de champ électrique sur une électrode appelée « repousseur » (ou repeller), située au niveau du support de la cible. Selon leur localisation dans la source au moment de l'application de l'impulsion électrique, les ions ne recevront pas la même énergie : un ion rapide sera éloigné de l'électrode et recevra donc moins d'énergie qu'un ion lent. Les ions de même m/z forment alors un faisceau mono énergétique d'ions. Sur le schéma de la figure 1.5, on voit que l'ion 2 est plus rapide que l'ion 1. L'ion 2 recevra donc moins d'énergie que l'ion 1 après application de l'impulsion. L'ion 4, se dirigeant dans la direction opposée du tube de vol, reçoit encore plus d'énergie que les deux précédents et sera également focalisé. Cette technique est appelée extraction

<sup>35</sup> Whittall, R.M., Li, L. *Anal. Chem.*, **67**, 1950-1954, 1995

retardée des ions<sup>36,37</sup>. Cette méthode permet également de s'affranchir des collisions avec les molécules de matrice.

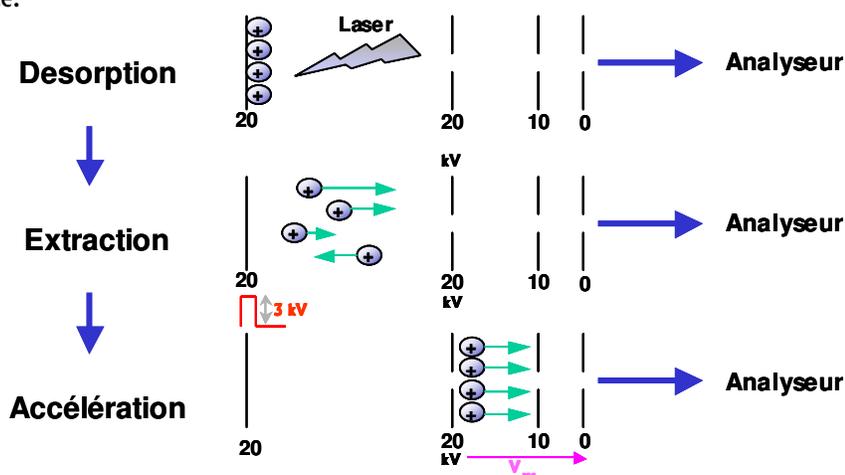


Fig. 1.5. Schéma de principe de l'extraction retardée.

### 3.1.3. Le mode réflectron

Le mode linéaire de détection que nous avons décrit est peu résolutif, car les ions de même masse peuvent avoir des vitesses légèrement différentes, malgré l'extraction retardée. Il est donc nécessaire de corriger cette dispersion, qui entraîne un élargissement des pics obtenus à une masse donnée. Pour cela, on utilise un réflecteur électrostatique à l'extrémité du tube de vol composé d'un système de lentilles placées selon un gradient de potentiels, opposé à la direction du champ d'accélération. Les ions pénètrent, selon leur énergie, plus ou moins profondément dans le miroir électrostatique (Figure 1.6.). Chaque ion parvient jusqu'à la surface du réflecteur correspondant au potentiel où sa vitesse s'annule, puis change de sens. Les ions sont donc réfléchis dans la direction opposée à celle de leur vitesse initiale. Ainsi, parmi une population d'ions de même masse, un ion « trop rapide » effectuera un trajet plus long, et sera ainsi ralenti.

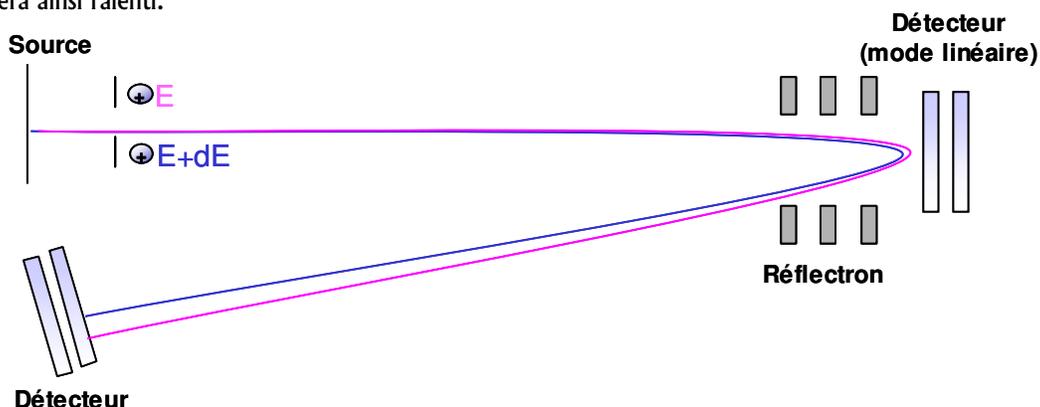


Fig. 1.6. Schéma de principe d'un analyseur à temps de vol (ToF)

<sup>36</sup> Brown, R.S. and Lennon, J.J. *Anal.Chem.*, **67**, 1998-2003, 1995

<sup>37</sup> Vestal, M.L., Juhász, P. and Martin, S.A. *Rapid Comm. Mass. Spectrom.*, **9**, 1044, 1995.

Ceci permet de compenser la dispersion de vitesse et d'obtenir une meilleure résolution. Le mode réflectron est utilisé pour l'analyse des peptides, pour lesquels on obtient une résolution des pics d'un massif isotopique jusqu'à la masse de 5000 Da environ. La combinaison de l'extraction retardée et du mode réflectron permet d'atteindre une résolution supérieure à 10 000.

### 3.1.4. Utilisation de l'analyseur ToF avec les sources MALDI et ESI

Au cours du paragraphe consacré au principe de l'ionisation MALDI, nous avons souligné l'adéquation parfaite entre cette source et l'analyseur de type ToF. En effet, l'ionisation MALDI est discontinue et génère des « paquets » d'ions successifs. L'analyseur de type ToF nécessite une introduction de type discontinu des ions pour que la mesure d'un temps de vol soit possible, à partir d'un temps initial (l'impact laser, par exemple).

Pour le couplage d'un analyseur ToF avec une source continue d'ions comme l'ESI, il est nécessaire d'échantillonner le faisceau d'ion. Ceci est possible grâce à une impulsion électrique de l'ordre de 1kV appliquée sur une électrode-appelée « pusher »- pendant une période de quelques millisecondes. Cette impulsion entraîne la déviation et l'accélération d'une partie du faisceau d'ion vers l'analyseur ToF. Cette accélération est orthogonale à la direction initiale du faisceau d'ion (configuration appelée ToF orthogonal » pour laquelle le tube de vol est perpendiculaire au faisceau d'ions généré dans la source). L'accélération orthogonale d'une petite partie du faisceau permet de limiter la large dispersion en énergie cinétique des ions générés par électrospray<sup>38,39</sup>. Les paquets d'ions peuvent être envoyés dans l'analyseur à une fréquence de 30 kHz, ce qui permet d'enregistrer et de sommer 30 000 spectres par seconde. La sensibilité obtenue est donc excellente et les temps d'acquisition obtenus avec cette technique sont faibles. La largeur finie du faisceau donne une dispersion spatiale qui doit être corrigée. Cette correction peut être facilement réalisée par refocalisation, grâce à un hexapole, par exemple.

### 3.2. Le piège ionique quadripolaire

Nous tenterons ici de décrire le principe physique de l'analyseur à trappe ionique de manière simple. Il existe néanmoins d'excellentes descriptions mathématiques<sup>40</sup> qui rendent compte des trajectoires des ions observées dans l'analyseur trappe ionique et de nombreuses revues sur cet analyseur ionique<sup>41,42</sup>.

Le piège quadripolaire a été pour la première décrit par Wolfgang Paul<sup>43</sup>. Ce qui a valu à son inventeur le prix Nobel de physique en 1989. Ce n'est qu'au début des années 80 que George Stafford et la

<sup>38</sup> Chernushevich, I.V., Ens, W., and Standing, K.G., *Anal. Chem.*, **64**, 1027A-1039A, 1992..

<sup>39</sup> Henry, C.M.. *Anal. Chem.*, **71**, 197A-201A., 1999.

<sup>40</sup> March, R.E., Londry, F.A. *J.F.J. Eds, CRC Press, Inc Boca Raton*, 1-25, 1995

<sup>41</sup> Cooks, R.G., Glish, G.L., McLuckey, S.A., Kaiser, R.E.. *Chemical and engineering news*, **Mars 25**, 26-31, 1991.

<sup>42</sup> Jonscher, K.R., Yates, J.R.III.. *Anal Chem.* **244**, 1-15, 1997.

société Finnigan Corp<sup>44</sup> développent un spectromètre de masse utilisant le piège ionique comme analyseur en masse : l'ITD (ion trap detector). Les premiers appareils avaient une gamme de rapports m/z limitée (10 à 650 Th). Les molécules étaient ionisées directement au centre du piège ; ceci permet un piégeage optimal des ions, leur énergie cinétique étant alors très faible. Assez rapidement de nombreuses améliorations techniques ont permis au piège à ion de devenir l'appareil polyvalent et performant connu aujourd'hui, surtout grâce à la possibilité de faire des études<sup>45</sup> de type MS<sup>n</sup> et à l'utilisation de sources externes. Il faut citer à ce titre les travaux de Cooks concernant l'injection des ions<sup>46</sup>, la haute résolution<sup>47</sup> et l'augmentation importante de la gamme de masse<sup>48</sup> (50000 Th), et en 1990, les travaux de McLuckey qui présente le premier piège ionique couplé à une source ESI<sup>49</sup>.

### 3.2.1. Description du piège ionique

La conception du piège ionique quadripolaire est basée sur l'assemblage de trois électrodes de géométrie hyperbolique : une électrode centrale circulaire appelée également électrode annulaire est placée symétriquement entre deux électrodes chapeaux identiques (figure 1.7.). Les électrodes chapeaux se distinguent par le nombre de perforations en leurs centres. L'une des deux électrodes doit laisser entrer les électrons dans le cas d'une ionisation in situ par impact électronique, ou les ions générés à l'extérieur de la cellule si la source d'ionisation est externe. Celle-ci possède un seul orifice central, tandis que l'autre électrode doit laisser sortir les ions (éjection des ions pour la détection) et comporte plusieurs orifices arrangés autour de son axe. Dans les pièges à ions couplés à des sources externes, les électrodes chapeaux possèdent une seule perforation. La géométrie idéale du piège à ions peut être décrite par l'équation

$$R_0^2 = 2z_0^2 \quad (\text{Eq. 1.5.})$$

$r_0$  correspond au rayon de l'électrode annulaire et  $z_0$  est la distance de séparation des deux électrodes chapeaux (avec  $r_0 = 1 \text{ cm}$  et  $z_0 = 0.707 \text{ cm}$ ). Si les premiers pièges avaient une géométrie quadripolaire parfaite, les constructeurs se sont aperçus qu'un piège légèrement étiré<sup>50</sup> renforçait les effets dus aux champs dits non linéaires, ce qui permet d'améliorer les performances de piégeage de ces cellules<sup>51</sup>. Il existe plusieurs modes de fonctionnement selon les potentiels appliqués et l'endroit où ils le sont. Généralement, l'application sur l'électrode circulaire d'une tension radiofréquence  $\phi_0$ , [ $\phi_0 = \pm U + V_{RF} \cos \Omega t$ ] superposition d'une tension continue et alternative, permet de créer un champ quadripolaire

<sup>43</sup> W. Paul, H. Steinwedel, US patent 2, 939, 952 (1960)

<sup>44</sup> Stafford, G.C., Kelley, P.E., Syka, J.E.P. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Process.*, **60**, 85, 1984

<sup>45</sup> Jonshon, J.V., Yost, R.A., Kelly, P.E., Bradford, D.C., *Anal. Chem.* **62**, 2162, 1990.

<sup>46</sup> Loures, J.N., Amy, J.W., Ridley, T.Y., Cooks, R.G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **106**, 79, 1991.

<sup>47</sup> Cooks, R.G., Hoke, K.L., Horand, S.A. Lammert, S.H. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Process.*, **118/119**, 1-35, 1991.

<sup>48</sup> Kaiser, R.E., Cooks, R.G., Stafford, G.C., Syka J.E.P. and Hemberger, P.H., *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Process.*, **106**, 79, 1991.

<sup>49</sup> Van Berkel, G.J., Glish, G.L., McLuckey, S.A., *Anal. Chem.* **62**, 1284-1295, 1990.

<sup>50</sup> Syka, J.E.P., March, R.E., Todd (Eds), *Practical Aspect of Ion Trap Mass Spectrometry*, Vol. I, CRC Press Inc, Boca Raton, p169, 1995.

<sup>51</sup> Franzen, J. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Process.*, **130**, 15, 1994.

pur tridimensionnel utilisé pour confiner les ions dans la cellule. Les électrodes chapeaux étant portées à une tension alternative déphasée de  $180^\circ$ , afin de générer un champ dipolaire permettant l'isolement et l'excitation des ions lors des expériences MS/MS et MS<sup>n</sup>.

Des ions de rapport  $m/z$  différents sont présents simultanément au sein du piège. En faisant varier les tension  $U$  et  $V_{RF}$ , on cherchera à éjecter les ions en fonction de leur rapport  $m/z$  pour obtenir un spectre de masse. L'hélium qui est introduit dans le piège, à une pression comprise en  $10^{-3}$  et  $10^{-6}$  mbar, sert à relaxer les ions en énergie cinétique pour mieux les piéger. L'addition d'hélium est particulièrement efficace pour les ions injectés (formés dans une source externe). Il est introduit par une simple arrivée de gaz régulé par une vanne.

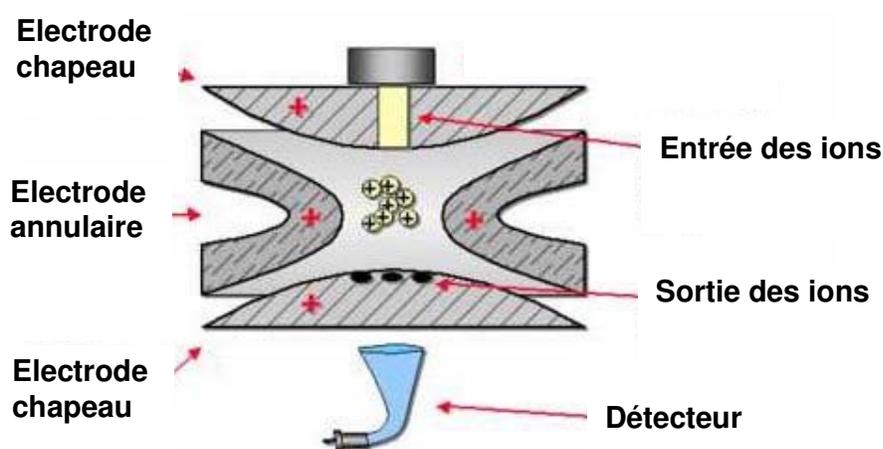


Fig. 1.7. Représentation schématique d'un analyseur à piège ionique

### 3.2.2. Diagramme de stabilité

Sous l'influence du champ électrique, l'ion est soumis à un champ quadripolaire pur, il subit une force de rappel qui tend à le ramener vers le centre de la cellule ( $z=r=0$ ). Le besoin de rationaliser les observations expérimentales a amené les chercheurs à mettre en équation les trajectoires des ions sous influencés par ce champ quadripolaire pur. Le mouvement des ions peut être décomposé de façon indépendante dans les directions axiales et radiales. Ainsi une équation différentielle du second ordre exprimant les forces agissant sur l'ion, a été comparée à une équation du second ordre déjà décrite et résolue par Mathieu<sup>52</sup> depuis plus d'un siècle. L'analogie entre les deux équations a permis par identification de chacun des termes, de déterminer les paramètres de piégeage  $q_u$  et  $a_u$  ( $u=z, r$ )

<sup>52</sup> Mathieu, E., J. Math. Pure Appl. (J. Louville) 13, 137 (1868).

dépendant des tensions U et V et définir ainsi des zones de stabilité et d'instabilité en fonction de ces paramètres.

$$a_z = -2a_r = -\frac{16zeU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (\text{Eq. 1.6.})$$

$$q_z = -2q_r = -\frac{8zeU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (\text{Eq. 1.7.})$$

Les solutions de l'équation de Mathieu peuvent être représentées schématiquement dans un plan dans les directions axiales et radiales. Les conditions adéquates de piégeage dans la cellule correspondent aux zones de recouvrement vers les deux directions. D'un point de vue technologique, seule une région de stabilité est utilisée (correspondant à la plus grande surface et à la plus pratique au vu des limitations des tensions DC et RF). Chaque point de cette région est défini par les paramètres de stabilité  $a_u$  et  $q_u$  et l'espace est délimité par les ligne  $\text{iso}\beta_u$ , avec des frontières correspondantes à des valeurs entières ou nulles de  $\beta_u$ .

Ce diagramme de stabilité définit ainsi les zones<sup>53</sup>, en fonction des paramètres de position  $a_z$  et  $q_z$ , ou les ions sont correctement piégés. En dehors de ce diagramme, (limites  $\beta_z=\beta_r=0$  et  $\beta_z=\beta_r=1$ ), les ions prennent une trajectoire instable et sont éjectés. Il faut toutefois préciser que si expérimentalement, les paramètres qui décrivent la trajectoire des ions, sont donnés dans la dimension z du piège uniquement, les conditions de piégeage impliquent également une trajectoire stable sur la dimension r ( $q_r$  et  $a_r$ ). Dans la plupart des instruments commercialisés, le paramètre  $a_z$  qui dépend de la composante continue de  $\phi_0$ , est maintenu égal à zéro. Le diagramme de stabilité revient alors à une droite de fonctionnement entre  $q_z=0$  et  $q_z=0.908$ . Le paramètre  $q_z$  étant inversement proportionnel au rapport  $m/z$ , plus l'ion est de haut rapport  $m/z$ , plus il sera situé à gauche du diagramme.

### 3.2.3. Mouvement d'un ion

Le mouvement dynamique d'un ion est décrit comme un mouvement oscillatoire, en fait il est caractérisé par la superposition de n mouvements oscillatoires de fréquences  $f_{n,u}$  et de pulsation  $\omega_{r,n}$  et  $\omega_{z,n}$ .

$$\omega_{u,n} = \left(n - \frac{1}{2}\beta_u\right)\Omega \text{ pour } 0 \leq n < \infty \text{ et} \quad (\text{Eq. 1.8.})$$

<sup>53</sup> March, R.E., J. Mass. Spectrom. 32, 351-369, 1997.

$$\omega_{u,n} = -(n - \frac{1}{2}\beta_u)\Omega \text{ pour } -\infty \leq n < 0 \quad (\text{Eq. 1.9.})$$

$$f_{u,n} = \frac{\omega_{u,n}}{2\pi} \quad (\text{Eq. 1.10.})$$

Avec l'approximation de Dehmelt<sup>54</sup>.

$$\beta_u \approx \sqrt{a_u + \frac{q_u^2}{2}} \text{ valable pour } q_z < 0.4 \text{ et } q_r < 0.2 \quad (\text{Eq. 1.11.})$$

où  $u=r, z$  et où  $n$  est un nombre entier.

Il apparaît que les fréquences séculaires de l'ion sont dépendantes des paramètres de piégeage  $a_z$  et  $q_z$  et aussi de la tension appliquée.

Le mouvement principal des ions est donné pour la composante  $n=0$  (macromouvement). Les termes d'ordre plus élevé ( $n=1, 2, \dots$ ), correspondent à des micro mouvements, ceux-ci diminuent rapidement avec  $n$  et ne sont significatifs que pour  $n=\pm 1$  et  $n=\pm 2$ . Le macromouvement de l'ion dans le piège quadripolaire apparaît très proche d'une courbe de Lissajous, une sorte de huit dans l'espace (figure 1.8). La fréquence séculaire  $f$  de l'ion est liée à la vitesse angulaire selon la relation suivante :

$$f_{u,0} = \omega_{u,0} / 2\pi \quad (\text{Eq. 1.12.})$$

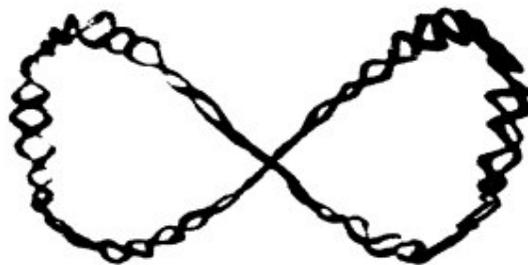


Fig. 1.8.. Trajectoire de Lissajous obtenue avec une microparticule d'aluminium chargée introduite dans un piège quadripolaire. J. Appl. Phys, 30, 342, 1959, American Institute of Physics.

### 3.2.4. Modèle du puits de pseudo potentiel de Dehmelt

Pour permettre de rationaliser le problème de la stabilité (et donc de l'efficacité du piégeage) des ions au sein du piège (et non plus d'un seul ion), Major et Dehmelt ont proposé un modèle simplifié basé sur le mouvement des ions<sup>55</sup>. Ce modèle est valable pour une valeur de  $q_z < 0.4$  et avec  $a_z=0$ , où seul le macromouvement d'oscillation  $\omega_{u,0}$  est considéré (micro mouvements négligeables). La trajectoire oscillante de l'ion peut être décrite en fonction d'un puits de potentiel harmonique. Ils ont défini  $D_z$  la profondeur du puits de pseudo potentiel en fonction de la position de l'ion sur l'axe  $q_z$  du diagramme de stabilité et de l'amplitude de la radiofréquence RF selon l'équation :

$$\overline{D_z} \cong -\frac{q_z V}{8} \cong \frac{1}{2} \overline{D_r} \quad (\text{Eq. 1.13.})$$

La relation entre  $q_z$  et  $D_z$  pour des valeurs de  $q_z < 0.4$  a pu être déterminée par simulation<sup>56</sup> et expérimentalement. Ainsi la Figure 1.9. montre qualitativement l'évolution de la profondeur du puits de potentiel en fonction du paramètre du piégeage  $q_z$ . Ce modèle simple complète la résolution mathématique de l'équation de Mathieu. Il apparaît ainsi que les ions ne sont pas piégés de la même façon en fonction de leur position sur l'axe  $q_z$ . En effet, plus le puits de pseudo potentiel est profond, meilleures sont les conditions de piégeage. Cette approche permet de mieux comprendre les problèmes de piégeage rencontrés avec une source externe ou lors d'expériences MS/MS, puisque la condition de confinement est directement liée à leur position dans le diagramme de stabilité.

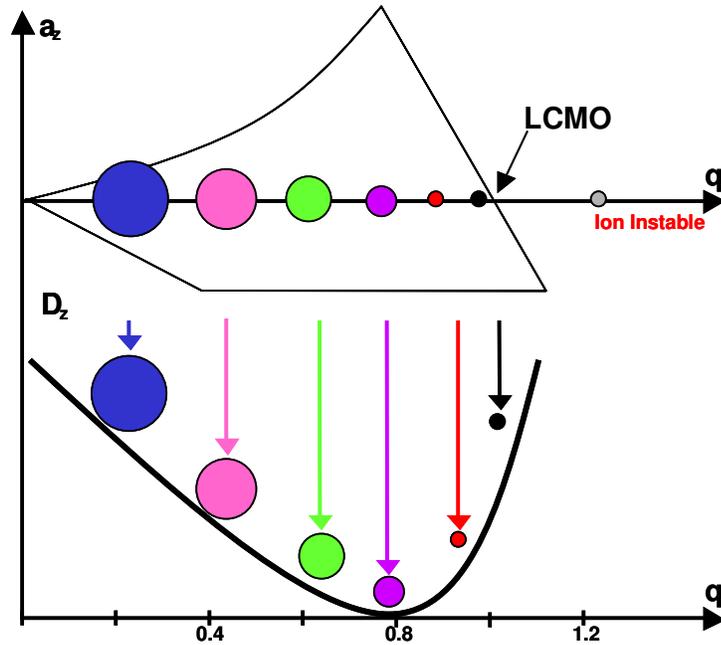


Fig 1.9. Représentation schématique du diagramme de stabilité décrivant l'évolution de la profondeur du puits de potentiel  $D_z$  en fonction de  $q_z$ . Le puits de potentiel le plus profond est obtenu pour une valeur de  $q_z = 0.8$ <sup>53</sup>

<sup>54</sup> Wuerker, R.F., Shelton, H., Langmuir, R.V., J. Appl. Phys. 30, 342, 1959.

<sup>55</sup> Major, F.G., Dehmelt, H.G., Phys. Rev. 179, 91, 1968.

<sup>56</sup> Pedder, R.E., Johson, J.V. Yost, R.A. Proceeding of the 41<sup>th</sup> ASMS, San Francisco Ca, p 711, 1993.

### 3.2.5. Résonances non linéaires : défauts et utilités

z

Le principe de piégeage des ions est basé sur l'existence d'un champ quadripolaire pur dans l'enceinte de la cellule. En réalité, il existe des imperfections liées à la présence de champs non linéaire d'ordre élevé. Lorsque les ions s'éloignent du centre du piège, ils subissent la contribution de faibles résonances non linéaires, qui modifient notablement leur mouvement et donc leurs conditions de piégeage. Ces résonances non linéaires correspondent à des points d'instabilité particuliers. Les ions voient l'amplitude de leurs fréquences séculaires augmentée, provoquant la perte des ions, ou leur dissociation par collisions (pour des ions constituant des systèmes fragiles).

De nos jours, ces effets de non-linéarité de champs trouvent de nombreuses applications, qui ont permis d'améliorer les performances du piège ionique (résolution et gamme de détection) en utilisant par exemple, ces points d'instabilité pour l'éjection des ions.

### 3.2.6. Problème de piégeage des ions

Le traitement théorique, jusqu'ici, n'a considéré qu'un seul ion. Expérimentalement un grand nombre d'ions sont présents simultanément, et la répulsion des charges entre les espèces ioniques induit une dispersion du nuage d'ions<sup>57</sup> et donc une diminution de l'efficacité de piégeage. Ce phénomène aura une influence négligeable sur l'allure du spectre pour un nombre limité d'ions dans le piège, mais en cas de surcharge, le phénomène dit de charge d'espace apparaît. En effet, un champ quadripolaire pur n'est obtenu qu'au centre du piège ; lorsque les ions s'en écartent, leurs fréquences séculaires peuvent être modifiées en entrant en résonance avec des champs dis non linéaires. Il en résulte un élargissement des pics (baisse de résolution) et un déplacement des rapports  $m/z$  vers de plus hautes valeurs, et dans certains cas extrêmes, la perte des ions de hauts rapports  $m/z$ . Pour remédier à ce phénomène parasite, différentes techniques peuvent être employées.

Sur les appareils commerciaux, des systèmes de régulation automatisés du nombre d'ions sont utilisés. Ils sont appelés contrôle automatique du gain (AGC) ou contrôle de la charge ionique (ICC). Il s'agit souvent d'un balayage rapide (*prescan*), préalable au balayage analytique, pour mesurer le courant ionique avant l'analyse ou l'appareil se base sur le courant ionique mesuré lors du balayage analytique précédent.

Une autre mesure consiste à introduire un gaz tampon comme l'hélium dans lequel le piège quadripolaire est en permanence baigné en générale dans l'hélium<sup>58, 59</sup>. Les multiples collisions élastiques

<sup>57</sup> Johnson, J.V., Yost, R.A., Kelley, P.E., Bradford, D.C., Anal. Chem, 62, 2162, 1990.

<sup>58</sup> Wu, H.F., Brodbelt, J.S., Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, 115, 67, 1992

entre les ions et les molécules de gaz permettent de « refroidir » les ions en diminuant leur énergie cinétique et ainsi de les refocaliser vers le centre du piège, où le champ quadripolaire joue le rôle le plus important et est considéré comme le plus uniforme. Ainsi, le piégeage des ions est beaucoup plus efficace. Toutefois, il faut signaler qu'une pression de gaz trop élevée va limiter les performances de l'appareil<sup>60,61</sup> (perte de résolution). L'utilisation d'un gaz léger permet de ne pas modifier la trajectoire des ions lors des collisions<sup>62</sup>. Ce gaz est aussi utilisé lors de l'excitation résonante comme gaz de collision. Dans ce cas, le mouvement des ions augmente, ce qui induit un accroissement de leur énergie interne par collision. Si cette énergie de collision est suffisante, l'ion se fragmente.

### 3.2.7. Gamme de rapports m/z accessibles

Les premiers pièges quadripolaires commerciaux permettaient d'accéder à une gamme limitée de rapport m/z. Ainsi, avec une éjection des ions à la frontière du diagramme de stabilité à  $q_z=0.908$ , le rapport m/z des ions détectés était de 650 Th. En réalité, l'appareil est capable de piéger des ions de plus grand rapport m/z. En effet, il y a théoriquement plusieurs façons d'augmenter la gamme de masses observables. Il est par exemple possible de diminuer la dimension du piège ( $r_0$ ), la fréquence  $\Omega$  de la RF, la valeur du  $q_z$  d'éjection ( $q_{ej}$ ) ou encore d'augmenter l'amplitude de la radiofréquence  $V_{Rfmax}$ . Cooks et coll.<sup>63</sup> ont obtenu une gamme de rapport m/z atteignant 2600 Th en diminuant à la fois la valeur de  $r_0$  et  $\Omega$ .

$$(m/z)_{\max} = \frac{8zeV_{\max}}{q_{ej}(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (\text{Eq. 1.14.})$$

Cependant, des limites technologiques ont été très vite atteintes. Aujourd'hui, dans les appareils commerciaux, des gammes étendues de rapport m/z sont obtenues en éjectant les ions à des valeurs de  $q_z < 0.908$ . En pratique, ces valeurs de  $q_z$  correspondent à des points d'instabilité liés à l'existence de champs multipolaires non linéaires d'ordre élevé. Cette technique, introduite par Cooks et coll.<sup>64,65</sup> utilise une modulation axiale. Comme  $q_z$  est inversement proportionnel au rapport m/z, la gamme se trouve augmentée d'autant que la valeur  $q_{ej}$  est abaissée. En appliquant la modulation axiale à une fréquence correspondante à une valeur  $q_z$  très basse, il est possible d'obtenir une gamme atteignant 50000 Th. Ainsi, les instruments à piégeage d'ions commercialisés présentent différentes gammes de masse accessibles selon le point d'éjection des ions choisis (Tab. 1.3.)

<sup>59</sup> Brodbelt, J.S., March, R.E., Todd, J.F.J., Practical aspect of ion trap mass spectrometry, Vol I, CRC Press Inc, Boca Raton p209, 1995.

<sup>60</sup> Lammert, S.A., Wells, J.M., Proceeding of the 43th ASMS, Atlanta, p985, 1995.

<sup>61</sup> Brittain, R.D., Speltz, D., Bolton, B., Proceeding of the 41th ASMS, San Francisco, p459, 1993.

<sup>62</sup> Dawson, P.H., Lambert, C. J. Vac. Sci. Technol. 12, 941, 1975

<sup>63</sup> Kaiser, R.E., Cooks, R.G. Moss, J. Hemberger, P.H., Rapid Com. Mass Spectrom, 3,50, 1989.

<sup>64</sup> Kaiser, R.E., Louris, J.N., Amy, J.W., Cooks, R.G. Rapid Com. Mass Spectrom, 3, 225, 1989.

<sup>65</sup> Kaiser, R.E., Cooks, J., Stafford, C., Syka, J.E.P., Hemberger, P.H., Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, 106, 79, 1991.

Gamme	$q_z$ d'éjection	$\beta_z$ d'éjection	Gamme m/z (Th)	Vitesse de balayage
Standard	0.78	2/3	50-3400	13000 Th/s 5500 Th/s 1650 Th/s
Etendue	0.25	2/11	200-6000	

Tab.1.3. Gamme de rapport m/z disponible sur le LCQ Deca XP, Thermo Finnigan

### 3.2.8. Enregistrement d'un spectre de masse

L'analyse nécessite plusieurs étapes temporelles (répétées un certain nombre de fois pour augmenter la sensibilité) : l'ionisation de la molécule (*in situ* ou de façon externe), la focalisation des ions dans le piège, l'isolement et l'excitation du nuage ionique pour les expériences de MS/MS et enfin leur détection après éjection dans l'ordre croissant de leurs rapports m/z.

#### ***Injection et accumulation des ions***

Dans le cas des sources internes, où l'ionisation est réalisée *in situ* au centre du piège par impact électronique ou ionisation chimique, la présence d'un bain d'hélium suffit à piéger de façon efficace les ions, par collisions avec le gaz tampon. L'émergence des nouvelles techniques ESI et MALDI ont amené les constructeurs à créer des interfaces externes compatibles avec les pièges ioniques. Dans le cas d'une source externe comme l'électrospray, les ions formés à l'extérieur du piège doivent être injectés et piégés au sein de la cellule. Ils sont guidés via un système de lentilles électrostatiques jusqu'au piège. La technique de piégeage des ions est beaucoup plus délicate car les ions possèdent une énergie cinétique initiale et pénètrent dans le piège par une de ses extrémités (en général les électrodes chapeaux). L'énergie cinétique des ions à leur entrée dans la cellule va déterminer leur capacité à être piégés efficacement. Cette valeur ne doit être ni trop importante (sinon il y a éjection des ions avant d'être piégés), ni trop faible (sinon ils sont repoussés par le champ de piégeage). Comme l'ont montré Louris et coll.<sup>66</sup>, la présence d'un bain d'hélium permet d'améliorer fortement les conditions de piégeage en focalisant le nuage d'ions au centre du piège. En outre, l'énergie cinétique des ions lors de l'injection doit être faible (< 10 eV) pour éviter les décompositions au cours de cette étape.

Après les étapes d'ionisation et d'injection des ions, ceux-ci sont confinés au centre du piège grâce à l'application d'un voltage de radiofréquence  $V_{RF}$  de fréquence fixée (dans le domaine de 0.7 à 1MHz). Une importante difficulté de l'injection des ions provient de la dépendance de l'efficacité de piégeage en fonction du rapport m/z de l'ion considéré. En effet, la profondeur du puits de potentiel  $D_z$  dépend de la valeur du paramètre  $q_z$  et donc du rapport m/z de l'ion, pour une amplitude  $V_{RF}$  donnée. Le maximum d'efficacité de piégeage est obtenu pour un ion ayant son point de fonctionnement à  $q_z \approx 0.8$ . C'est donc la valeur de la tension de la radiofréquence au moment de l'injection des ions qui va définir la capacité

<sup>66</sup> Louris, J.N., Amy, J.W., Ridley, T.Y., Cooks, R.G. Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, 88, 97 (1989)

d'un ion à être piégé (c'est à dire sa position dans le pseudo puits de potentiel). Dans les systèmes commerciaux, l'amplitude de la tension RF est définie par la notion du seuil de bas rapport  $m/z$  d'injection (LMCO, Low Molecular Weight Cut-Off, voir figure 1.9.), c'est à dire le plus petit rapport  $m/z$  qu'il est possible de piéger. D'autre part, la valeur LMCO détermine la gamme de rapport  $m/z$  accessible expérimentalement.

### ***La technique de l'excitation résonante***

La trajectoire des ions dans le piège est caractérisée par leurs fréquences séculaires axiales et radiales  $\omega_z$  et  $\omega_r$ , respectivement. Dans les pièges quadripolaires, la trajectoire axiale d'un ion peut être modifiée en superposant au champ quadripolaire principal, une oscillation secondaire dipolaire appliquée entre les deux électrodes chapeaux, déphasée de  $180^\circ$ . Selon l'amplitude de cette fréquence dipolaire, on pourra éjecter sélectivement un ion ou simplement l'exciter en augmentant l'amplitude de son mouvement dans le piège. Elle peut être appliquée aussi pendant le balayage analytique, c'est à dire la rampe de la tension RF, elle est alors appelée modulation axiale.

### ***Ejection résonante des ions.***

Après injection et accumulation des ions au sein du piège, ces derniers doivent être éjectés sélectivement vers le détecteur. Les trajectoires des ions deviennent instables par augmentation de l'amplitude de la RF. Les ions sont alors éjectés à travers les perforations des électrodes chapeaux. Différents modes de balayage ont été envisagés. Dans une configuration simple, pour effectuer le balayage analytique, la composante alternative  $V_{RF}$  de  $\Phi_0$  est augmentée progressivement. L'ensemble des ions est alors déplacé vers la droite du diagramme de stabilité ( $a_z=0$ ,  $q_z \neq 0$ ) et l'éjection a lieu, dans sa configuration originelle, à la frontière du diagramme de stabilité dans l'ordre croissant des rapports  $m/z$  ( $\beta_z=1$ ,  $q_z=0.908$ ) (instabilité axiale). Dans les analyseurs de masse modernes, l'éjection des ions à des points d'instabilité est opérée. Cette technique permet d'augmenter la gamme de rapport  $m/z$  analysable. Cependant, les vitesses de balayage doivent être adaptées, car elles ont une influence directe sur la résolution des pics obtenus. Une diminution de la vitesse de balayage augmente la résolution des pics après application de la modulation axiale.

### ***La modulation axiale : technique pour améliorer la résolution***

La technique de l'excitation résonante a été par la suite utilisée afin de résoudre certains problèmes techniques liés au piégeage d'ions. En raison du déphasage qui existe entre les trajectoires d'ions de même rapport  $m/z$ , mais surtout à cause du phénomène de charge d'espace qui disperse le nuage d'ions, une mauvaise résolution est généralement obtenue. Pour améliorer l'éjection des ions déphasés de même

rapport  $m/z$ , la modulation axiale est appliquée aux électrodes chapeaux pendant le balayage analytique pour éjecter les ions à une valeur de  $q_z$  légèrement inférieure à la valeur limite du diagramme de stabilité<sup>67</sup>. Au moment de l'éjection, les ions entrent en résonance avec cette fréquence dipolaire, ce qui augmente brusquement leurs amplitudes d'oscillations axiales et donc leurs vitesses d'éjection du piège. Cela permet d'augmenter la résolution de l'appareil, mais a pour inconvénient d'augmenter les constantes de vitesse de dissociation des ions.

## 4. Techniques de fragmentation par spectrométrie de masse MALDI ToF et ESI Piège Ionique.

### 4.1. Fragmentation en MALDI ToF : le Post Source Decay

#### 4.1.1. Principe du Post Source Decay

Dans la source MALDI, les ions ont acquis de l'énergie interne grâce à l'irradiation laser et des oscillations en phase gazeuse. Après leur accélération, les ions entrent dans le tube de vol. Dans cette zone libre de champ, ils peuvent alors se fragmenter de manière spontanée (c'est le phénomène de dégradation d'ions métastables), ou par collision. Ce phénomène de décomposition post-source (PSD, pour Post Source Decay) fut mis en évidence par Spengler et al<sup>68</sup> puis rapidement appliqué au séquençage de polypeptides<sup>69, 70</sup>. Pour favoriser les fragmentations, on utilise la matrice ACHCA, dont l'affinité protonique faible est favorable à un transfert important d'énergie vers l'échantillon. Ceci provoque une dégradation après ionisation très importante<sup>71</sup>. Les fragments générés par PSD ont tous la même vitesse que l'ion précurseur (appelé également ion parent) dont ils sont issus. On ne peut donc pas utiliser le mode ToF- linéaire pour séparer les fragments selon leur masse, car ils atteindraient le détecteur linéaire au même moment. Cependant, les fragments n'ont pas tous la même énergie cinétique, car leurs masses sont différentes. Pour une analyse en PSD, c'est le réflectron qui va jouer le rôle d'analyseur. En effet, pour une utilisation classique, le réflectron permet de corriger la dispersion de vitesse pour des ions de même masse, réfléchis en même temps dans la direction du détecteur par les potentiels électrostatiques correspondants (cas 1 fig 1.10).

---

<sup>67</sup> Tucker, D.B., Hameister, C.H., Bradshaw, S.C., Hoekman, D.J. Weber-Grabau, M. Proceeding of 36<sup>th</sup> ASMS San Francisco, p628, 1988.

<sup>68</sup> Spengler, B., Kirsh, D., Kaufmann, R. Metastable decay of peptides and proteins in matrix assisted laser desorption mass spectrometry. Rapid commun. Mass. Spectrom., 5, 198-202, 1991.

<sup>69</sup> Spengler, B., Kirsh, D., Kaufmann, R., and Jaeger, E. Peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 6, 105-108, 1992.

<sup>70</sup> Kaufmann, R., Kirsh, D., and Spengler, B. Sequencing of peptides in a time of flight mass spectrometer: evaluation of post source decay following matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, 131, 355-385, 1994.

<sup>71</sup> Karas, M., Bahr, U., Strupat, K., Hillenkamp, F., Tarbopoulos, A., and Pramanik, D.N. Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI-ToF mass spectrometry. Anal. Chem. 67, 675-679, 1995.

Le réflectron n'est pas capable de corriger une dispersion temporelle, et c'est ce qui va permettre de l'utiliser comme analyseur en PSD. En effet, des ions de masses différentes et de vitesses identiques seront réfléchis par les lentilles électrostatiques du réflectron à des temps différents. Le temps de vol total dépend donc de la masse des ions (cas 2 fig 1.10).

La sélection d'un ion précurseur est effectuée grâce à un « sélecteur d'ions » (ou « porte »). Il s'agit d'un déflecteur électrostatique placé à l'entrée du tube de vol qui transmet les ions pendant une fenêtre de temps donnée, correspondant à la gamme de masse choisie pour le précurseur et dévie tous les autres ions avant leur entrée dans l'analyseur en dehors de cette fenêtre temporelle. Le sélecteur d'ions constitue la principale limitation de l'utilisation du PSD. En effet, la sélection d'un ion de masse donnée dépend de la résolution du sélecteur, liée à sa fréquence de fonctionnement et à sa géométrie. A titre d'exemple, la résolution du sélecteur pour un spectromètre Reflex III (bruker) est proche de 100. Par exemple à une masse  $M = 1500$  Da, le sélecteur pourra différencier les masses  $M$  et  $M + 15$  seulement .

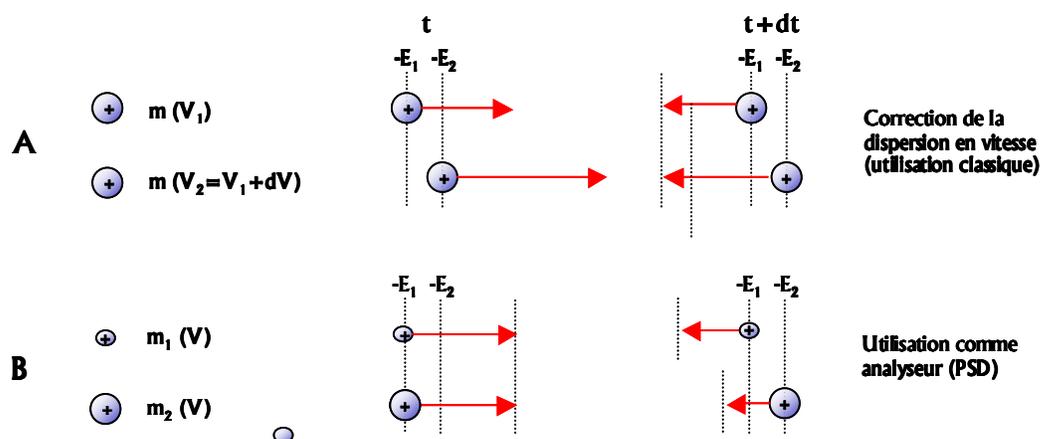


Fig. 1.10. Utilisation du mode réflectron. A. Correction de la dispersion de vitesse en mode réflectron pour deux ions de même masse. Deux ions de même masse et de vitesses différentes atteignent la surface de potentiel correspondant à leur énergie en même temps. B. Mode analyseur utilisé en PSD. Deux ions de même vitesse et de masses différentes atteignent la surface de potentiel correspondant à leur énergie à des temps différents

Une autre limitation concerne la gamme de masse des ions analysables par PSD (masse maximum de 3000 Da environ). Les ions précurseurs peuvent en effet subir plusieurs fragmentations successives pendant leur temps de vol. Lorsque les fragments générés sont des fragments internes, c'est à dire qu'ils ne contiennent ni l'extrémité N-terminale ni l'extrémité C-terminale, l'interprétation des spectres obtenus

est plus compliquée. Au-delà de 3000 Da, les spectres obtenus peuvent être complexes à cause du nombre important de fragments et de la multiplicité des fragments internes, dont l'interprétation est souvent incertaine. Les fragments les plus couramment observés ainsi que la nomenclature utilisée pour les nommer sont représentés sur figure 1.11A. La détection des ions immonium est intéressante car ces ions sont spécifiques des résidus constituant le peptide et interprétables sans ambiguïté (Fig 1.11B). De plus ils sont fréquemment retrouvés dans les spectres PSD.

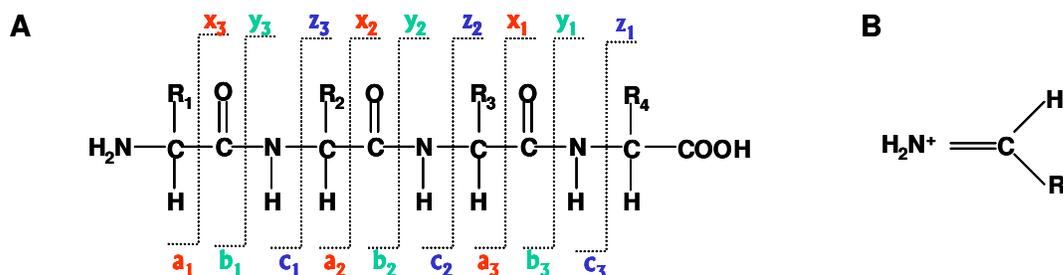


Fig 1.11. A. Fragments N- et C terminaux en PSD et nomenclature. B. Structure d'un ion immonium d'acide aminé.

#### 4.1.2. Acquisition d'un spectre en mode PSD

Pour pouvoir obtenir une bonne résolution sur toute la gamme de masse des ions fragments, il est nécessaire d'effectuer l'acquisition du spectre en plusieurs étapes. Ceci se comprend de manière intuitive, car ce sont les potentiels des lentilles du réflectron qui discriminent les ions selon leurs masses. Les potentiels appliqués sur le réflectron sont donc progressivement diminués, afin de couvrir l'intégralité de la gamme de masse. La juxtaposition de toutes les acquisitions permet alors de reconstituer le spectre complet des ions fragments.

Sans cette technique d'acquisition par étapes successives, on ne pourrait obtenir une focalisation optimale des ions sur l'ensemble de la gamme de masse. Les pics dus aux fragments de basses masses ne seraient pas résolus<sup>72</sup>.

<sup>72</sup> Cotter, R.J. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. Anal. Chem., 64, 1027A-1039A, 199

## 4.2. Fragmentation dans le piège ionique

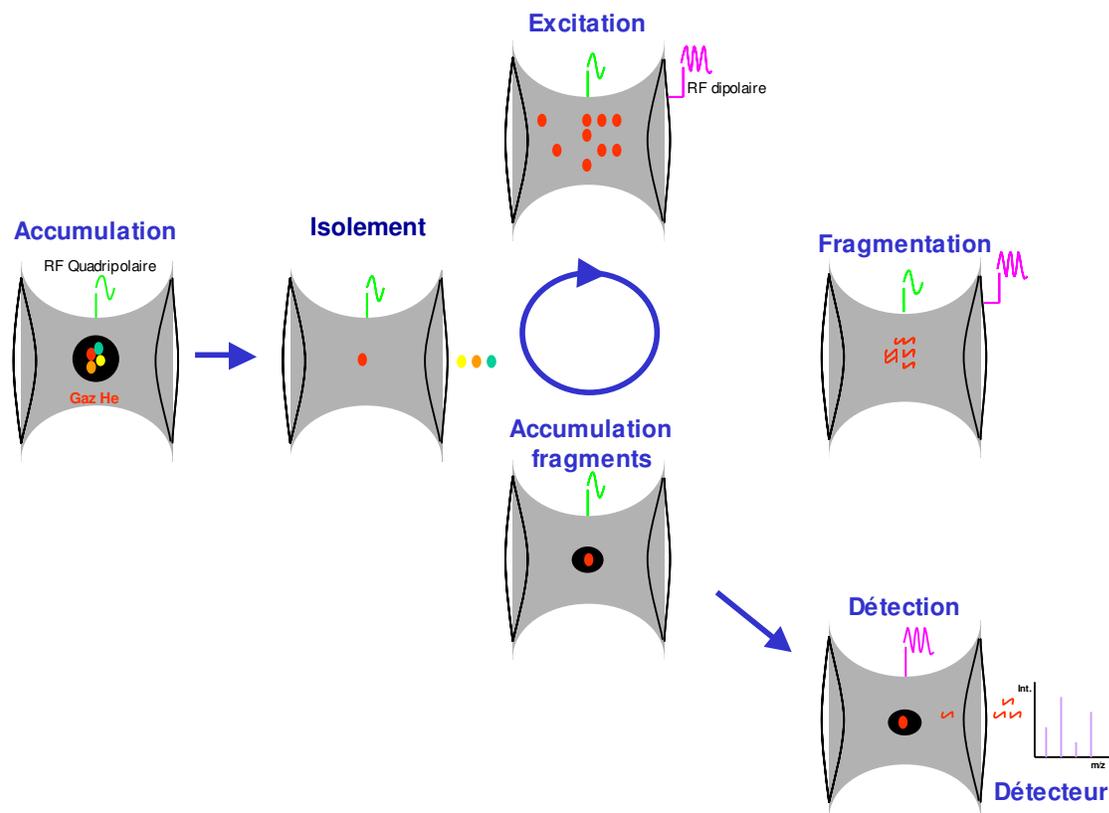


Figure 1.12. : Séquence de fonctionnement du mode MS<sup>n</sup>

Une expérience MS/MS comporte trois étapes (Figure 1.12.) :

- L'isolement de l'ion précurseur
- Sa fragmentation
- L'analyse des ions fragments.

Dans un appareil de type triple quadripolaire, ces différentes étapes ont lieu séparément dans l'espace, c'est à dire les trois quadripôles. Dans le piège ionique ces différentes étapes ont lieu au même endroit mais sont espacées dans le temps. La répétition séquentielle du mode MS/MS permet d'obtenir des

expériences MS<sup>n</sup>. Les ions sont d'abord accumulés au centre du piège, afin d'être isolés dans un second temps.

#### 4.2.1. L'isolement de l'ion précurseur

L'isolement de l'ion parent consiste à éjecter sélectivement tous les ions présents à l'exception de l'ion d'intérêt. Dans la plupart des cas, l'isolement se fait en plusieurs étapes. La première correspond à une rampe rapide de la tension  $V_{RF}$  qui permet l'éjection des ions de bas rapports  $m/z$  (inférieurs à celui de l'ion d'intérêt) le long de l'axe  $z$ . Dans un deuxième temps, les ions de plus hauts rapports  $m/z$  sont éjectés par excitation résonante en appliquant une large bande de fréquences (supérieures à celle de l'ion d'intérêt). Durant ces deux premières étapes, l'éjection des ions est grossière (large fenêtre de rapport  $m/z$ ). Enfin, un isolement plus fin est effectué en appliquant successivement une bande de fréquence avant et après la fréquence séculaire de l'ion parent. Dans ces conditions, il est possible d'effectuer un isolement très fin en éliminant les problèmes de charge d'espace. Pour accroître la sensibilité, les ions sont accumulés dans le piège en dépassant la limite de charge d'espace. Lors de l'isolement grossier, la charge d'espace diminue et l'isolement fin peut se faire alors de façon très précise ( $\pm 1$  Da)

##### 4.2.1.1. L'isolement aux limites du diagramme de stabilité du piège

Si l'ion isolé correspond à l'ion de plus fort rapport  $m/z$ , alors il peut être éjecté par la méthode d'instabilité sélective de masse. Mais ceci relève d'un cas bien particulier. Une méthode dans le même esprit consiste à éjecter les ions de haut rapport  $m/z$  en déplaçant le point de fonctionnement de l'ion cible vers la limite  $\beta_z=0$  par application d'une tension continue positive sur l'électrode circulaire. Puis, cette tension est éliminée, replaçant les points de fonctionnement des ions restants sur l'axe  $q_z$ . Ils ne restent plus qu'à éjecter les ions de plus bas rapport  $m/z$  que celui de l'ion cible par balayage de la tension RF<sup>73,74</sup>. La séquence inverse peut également être réalisée (éjection des ions de bas rapport  $m/z$  en premier, suivie de l'éjection des ions de haut rapport  $m/z$ ), mais présente un inconvénient car lors de l'éjection des ions de haut rapport  $m/z$  à la limite  $\beta_z=0$ , la dissociation des ions est favorisée. L'éjection des ions de bas rapport  $m/z$  en dernier permet l'élimination de ces ions fragments.

Une autre approche introduite par Fulford et March<sup>75</sup> et développée ultérieurement par Strife et coll.<sup>76</sup>, consiste à utiliser l'apex supérieur du diagramme de stabilité ( $q_z=0.77$  et  $a_z=0.15$ ). Ainsi, le point de fonctionnement de l'ion cible est dans un premier temps déplacé, par balayage de l'amplitude de la tension RF (pour une amplitude de la tension continue nulle), jusqu'à une valeur de  $q_z$  de 0.77. Puis une tension continue d'amplitude  $U$  négative est appliquée à l'électrode circulaire dans le but de porter le point de fonctionnement de l'ion juste en dessous de l'apex. Par application de cette tension continue

<sup>73</sup> Gronowska, J., Paradisi, P., Traldi, U., Vettori, U. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 306, 1990.

<sup>74</sup> Ardanaz, C.E., Traldi, P., Vettori, U., Kavka, J., Guidugli, F. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **5**, 5, 1991.

<sup>75</sup> Fulford, J.E., March, R.E., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **26**, 155, 1978.

<sup>76</sup> Strife, R.J., Keller, P.R., Weber-Grabau, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 105, 1988.

pendant seulement quelques millisecondes, les points de fonctionnement de tous les autres ions présents dans le piège vont se retrouver en dehors des limites de stabilité du piège et ceux-ci vont ainsi être éjectés. Lorsque cette tension est supprimée, seul l'ion cible est encore présent dans le piège et son point de fonctionnement se retrouve sur l'axe  $q_z$ , plus exactement à la valeur  $q_z=0.77$ .

#### 4.2.1.2. L'isolement par éjections résonantes.

Cette approche consiste à éjecter les ions par application d'une tension alternative déphasée de  $180^\circ$  entre les électrodes chapeaux correspondant à la fréquence de l'ion à éjecter. Ainsi, une certaine quantité d'énergie est apportée à l'ion, de telle manière que son amplitude de mouvement dépasse les dimensions du piège. Sachant qu'un ion de rapport  $m/z$  donné possède une fréquence séculaire  $\omega_z/2\pi$  qui lui est propre pour une tension de piégeage  $V$  donnée, plusieurs approches existent faisant intervenir l'éjection résonante. Dans la première méthode<sup>77</sup>, une tension alternative fixe de fréquence inférieure à la fréquence séculaire de l'ion cible est appliquée. Puis, la tension de piégeage est progressivement augmentée de manière à ce que les ions de rapport  $m/z$  supérieur à celui de l'ion cible soient éjectés sur le point de résonance de l'ion cible. Les ions de plus bas rapport  $m/z$  seront éjectés lors du balayage en masse à la limite  $\beta_z=1$ . Une deuxième méthode consiste à utiliser une tension de piégeage fixe et à balayer en fréquence la gamme de rapport  $m/z$  des ions à éjecter. Enfin tous les ions peuvent être éjectés du piège, à l'exception de l'ion à isoler, par application d'une plage de fréquences couvrant la gamme de rapport  $m/z$  à éjecter (application d'une tension alternative « large bande », et en application de ce qui avait été fait en FT/ICR<sup>78,79</sup>).

#### 4.2.2. Les méthodes d'excitation

Après isolement d'un ion cible, ce dernier est excité en vue de sa dissociation. Pour ce faire, la méthode la plus couramment utilisée est l'excitation résonante bien que d'autres approches existent également.

##### 4.2.2.1. L'excitation résonante

L'excitation résonante<sup>80</sup> consiste à appliquer une tension alternative supplémentaire appelée « tickle » entre les électrodes chapeaux à une fréquence coïncidant avec la fréquence séculaire axiale  $\omega_z/2\pi$  de l'ion à exciter. L'amplitude de la tension alternative supplémentaire doit toutefois ne pas être trop importante car sinon, l'amplitude du mouvement de l'ion dépasse les dimensions du piège et ce dernier est éjecté. Il est à noter que cette technique nécessite la connaissance exacte de la fréquence séculaire de l'ion que l'on

<sup>77</sup> Kelley, P.E., Syka, J.E.P., Ceja, P.X., Stafford, J.N., Louri, H.F., Grutzmacher, H.F. Kuck, D., Todd, J.F.J. *Proc. 34<sup>th</sup> ASMS conf. Mass Spectrometry and allied Topics, Cincinnati*, 963, 1986.

<sup>78</sup> Kenny, D.V., Callahan, P.J., Gordon, S.M., Stiller, S.W., *Rapid Commun. Mass spectrom.* 7, 1086, 1993.

<sup>79</sup> Buttrill, D.V., Shaffer, B., Karnicky, J., Arnold, J. *Proc. 40<sup>th</sup> ASMS conf. Mass Spectrometry and allied Topics, Washington, DC, 1015, 1992.*

<sup>80</sup> Louri, J.N., Cooks, R.G., Syka, J.E.P., Kelley, P.E., Stafford, G.C.J., Todd, J.F.J. *Anal. Chem.* 59, 1987.

veut exciter. Or cette fréquence peut varier suivant les conditions du piège, notamment en présence de charges d'espace ou sous l'influence de champs d'ordre supérieur. Lors de l'excitation, l'énergie cinétique de l'ion est augmentée et l'amplitude de sa trajectoire augmente dans la direction axiale. Il est alors déplacé du centre du piège. Une partie de l'énergie cinétique de cet ion est transformée en énergie interne lors des collisions avec les molécule d'hélium présentes en permanence dans le piège ( $P_{\text{He}} = 10^{-3}$  Torr). Si les ions ont assez d'énergie interne, ils vont se décomposer et donner lieu à des ions fragments (c'est ce qui est appelé la dissociation induite par collision ou CID). Les ions ainsi isolés sont soumis à des dissociations induites par collision avec l'hélium. Elles sont effectuées par application de la radiofréquence dipolaire (amplitude d'excitation nommée « tickle ») sur les électrodes chapeaux. En pratique, l'excitation d'un ion fait intervenir des centaines de collisions avec le gaz tampon durant plusieurs dizaines de millisecondes jusqu'à ce que suffisamment d'énergie soit accumulée pour induire des dissociations. Ce très long temps d'activation peut dans certains cas favoriser certaines voies de fragmentation comme des réarrangements. Finalement les ions fragments sont accumulés dans le piège puis éjectés pour être détectés.

Cette méthode nécessite donc l'ajustement d'un certain nombre de paramètres expérimentaux, tels que l'amplitude de la tension supplémentaire ajoutée entre les électrodes chapeaux, la durée de l'application de cette tension, la durée du temps de repos (cooling) introduit après excitation avant le balayage analytique, ainsi que la nature et la pression du gaz tampon. Ces contraintes ont mené à l'apparition d'autres modes d'excitation.

#### 4.2.2.2. L'excitation non résonante

Par cette méthode<sup>81</sup>, une tension alternative à ondes carrées de faible fréquence est appliquée avec un déphasage de  $180^\circ$  entre les deux électrodes chapeaux, de manière à créer un champ dipolaire axial. L'application alternée d'une tension positive avec une tension négative déplace le centre du champ quadripolaire dans l'axe z. Ainsi, les ions qui voient des lignes de champ différentes, acquièrent de l'énergie cinétique et sont activés par collision avec les atomes de gaz tampon. Ce mode d'excitation s'applique à tous les ions présents au sein du piège donc aussi bien aux ions précurseurs qu'aux ions fragments, ce qui favorise les décompositions consécutives.

#### 4.2.2.3. L'excitation aux limites de stabilité : BAD (Boundary Activated Dissociation)

Dans cette technique<sup>82</sup>, une tension continue positive est appliquée à l'électrode circulaire. Lorsque le point de fonctionnement d'un ion donné se rapproche de la limite du diagramme de stabilité  $\beta_z = 0$ , alors l'amplitude de mouvement de cet ion croît suivant la direction considérée, et ainsi son énergie cinétique

<sup>81</sup> Wang, M., Schachterle, S., Wells, G., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 668, 1996.

<sup>82</sup> Paradisi, C., Todd, J.F.J., Tradli, P., Vettori, U. *Org. Mass Spectrom.* **27**, 251, 1992.

augmente. Les collisions multiples avec l'hélium conduisent à une accumulation d'énergie interne jusqu'à dissociation de l'ion cible.

Les inconvénients de cette méthode sont qu'elle entraîne une perte d'ions assez importante aux limites de stabilité et que de surcroît, les ions fragments de rapport  $m/z$  supérieurs à celui de l'ion parent (cas des ions multi-chargés) sont perdus car ils ne sont pas compris dans le diagramme de stabilité.

# Chapitre 2 :

## L'échange isotopique Hydrogène/Deutérium et la spectrométrie de masse pour l'étude des interactions non covalentes

### 1. Interactions non covalentes et protéines

Les interactions non covalentes sont au cœur de l'ensemble des processus biologiques. Ces liaisons de faible force sont directement impliquées dans des fonctions aussi diverses que la réplication de l'ADN, la transduction des signaux de régulation, la reconnaissance enzyme-substrat, la formation des complexes supramoléculaires et leur activation ou encore la structuration des protéines sous leur forme tridimensionnelle active. La plupart de ces interactions sont réversibles, ce qui permet à la cellule de bénéficier d'une flexibilité propice à l'adaptation.

#### 1.1. La structure tridimensionnelle d'une protéine

La structure d'une protéine peut être considérée à quatre niveaux. La structure primaire comprend toutes les liaisons covalentes entre les acides aminés ; elle est normalement définie par la séquence des acides aminés liés par liaison peptidique. Les chaînes polypeptidiques ne sont pas libres de prendre au hasard n'importe quelle structure tridimensionnelle. Des contraintes stériques et les interactions non covalentes rendent certaines dispositions plus stables que d'autres. La structure secondaire fait référence aux dispositions dans l'espace régulières, récurrentes des résidus d'acides aminés adjacents dans une chaîne polypeptidique. Il existe un nombre limité de structures secondaires, les plus représentées étant l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ . La structure tertiaire fait référence à la disposition spatiale de tous les acides aminés d'un polypeptide, c'est la structure tridimensionnelle complète du polypeptide. La structure quaternaire fait référence à la disposition spatiale des sous-unités à l'intérieur d'un complexe protéique.

La conformation adoptée par une protéine est généralement la plus énergétiquement favorable dans le milieu considéré. Les atomes de la chaîne peptidique s'orientent dans la configuration qui minimise l'encombrement stérique, réduit les répulsions coulombiennes entre groupements de même charge, et optimise les interactions non covalentes entre les chaînes latérales des acides aminés, qui rigidifient et stabilisent l'ensemble de l'édifice.

## 1.2. Interactions non covalentes rencontrées dans les systèmes biologiques

Les systèmes biologiques sont caractérisés par quatre types de liaisons non covalentes : les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, les interactions hydrophobes et les liaisons de van der Waals. Alors qu'il faut 350 kJ pour rompre une mole de liaison simple C-C, il faut seulement 20 kJ pour rompre une mole de liaison hydrogène dans un solvant aqueux. Bien que ces quatre types d'interactions soient chacune faibles par rapport à l'énergie d'une liaison covalente, l'effet cumulatif de plusieurs de ces interactions peut être très significatif, conduisant à un abaissement de l'énergie libre de liaison.

### 1.2.1. Les liaisons hydrogène

Dans ce type de liaison, un atome d'hydrogène est partagé entre deux atomes électronégatifs (O, N ou S). L'atome auquel l'hydrogène est le plus fermement lié est le donneur d'hydrogène, l'autre atome est l'accepteur d'hydrogène. Les plus fortes liaisons hydrogène sont celles pour lesquelles le donneur, l'hydrogène et l'accepteur sont alignés.

### 1.2.2. Les liaisons électrostatiques (ou ioniques)

Elles résultent de l'attraction entre deux groupes ionisés portant des charges de signes opposés. Leur force est régie par la loi de Coulomb qui donne la relation entre la force électrostatique  $F$  exercée entre deux groupes de charges  $q_1$  et  $q_2$  distants de  $r$  et dans un milieu de constante diélectrique  $\epsilon$ .

$$F = \frac{q_1 q_2}{4 \pi \epsilon r^2}$$

Les liaisons électrostatiques s'affaiblissent rapidement lorsque la distance entre les deux groupes chargés augmente ; en outre, en dessous d'une certaine distance, la répulsion entre les nuages électroniques des deux groupes en interaction devient importante et compense l'attraction électrostatique : il existe donc une distance optimale pour les liaisons électrostatiques, située autour de 3 Å.

### 1.2.3. Les interactions hydrophobes

Dans une interaction hydrophobe, des molécules non polaires ou des groupes non polaires s'agrègent du fait de la présence de l'eau. La force motrice des interactions hydrophobes ne provient pas de l'affinité des molécules de soluté entre elles mais de la possibilité, par agrégation, de libérer des molécules d'eau et donc de minimiser les contacts des groupes apolaires avec le milieu aqueux. Ces interactions sont non spécifiques, mais elles jouent un rôle essentiel dans le repliement des bio molécules, la liaison de substrats aux enzymes, la compartimentation des cellules, etc.

#### 1.2.4. Les liaisons de van der Waals

Il s'agit de forces attractives non spécifiques qui s'établissent entre deux atomes distants de 3 à 4 Å, en raison de la variation dans le temps de la distribution de la charge électronique autour d'un atome. A un instant donné, une asymétrie transitoire de la charge électronique autour d'un atome peut induire une asymétrie semblable dans la distribution électronique d'un atome voisin : il en résulte une attraction entre les deux atomes, qui augmente à mesure qu'il se rapprochent. La force d'une liaison de van der Waals est optimale lorsque la distance entre les deux atomes est égale à la distance de contact de van der Waals (somme des rayons de van der Waals des deux atomes). En deçà de cette distance, les forces répulsives entre les nuages électroniques l'emportent. Une unique liaison de van der Waals compte pour très peu dans la stabilité d'une structure, puisque sa force (environ 1kcal/mol) est à peine supérieure à l'énergie thermique moyenne des molécules à température ambiante (0.6 kcal/mol). En revanche la contribution des liaisons de van der Waals peut devenir significative si la complémentarité stérique de deux molécules permet la formation simultanée de plusieurs contacts de van der Waals entre leurs atomes.

2. L'échange isotopique hydrogène/deutérium et la spectrométrie de masse : un outil pour l'étude structurale des protéines.

L'émergence de spectromètres de masse susceptibles d'analyser des protéines dans des conditions proches de leur condition native ont permis le développement d'études concernant leur structure tridimensionnelle. Ces études ont également eu pour objet les interactions protéine-protéine, protéine-ligand ainsi que la stabilité relative de variants protéiques.

Pour appliquer la spectrométrie de masse à l'étude de la structure des protéines, il est nécessaire de dégager une méthode susceptible d'établir des différences entre diverses conformations d'une même protéine.

Au début de l'Ionisation Electrospray (ESI), de nombreux travaux ont indiqué qu'une modification de conformation entraînait un changement dans la distribution des états de charge de la protéine lors de l'ionisation. Ces changements dans la distribution des états de charge sont observés pour des protéines en présence ou en absence de cofacteur et de ligand. Cependant, la comparaison des états de charge pour montrer des différences de structure tertiaire nécessite de conserver l'ensemble des paramètres expérimentaux. En particulier, des changements dans la composition des solvants lors de l'ionisation affecte la distribution de leur état de charge<sup>83</sup>. Ainsi, même si il est possible d'utiliser cette méthode pour caractériser l'état tridimensionnel d'une protéine, son usage reste limité.

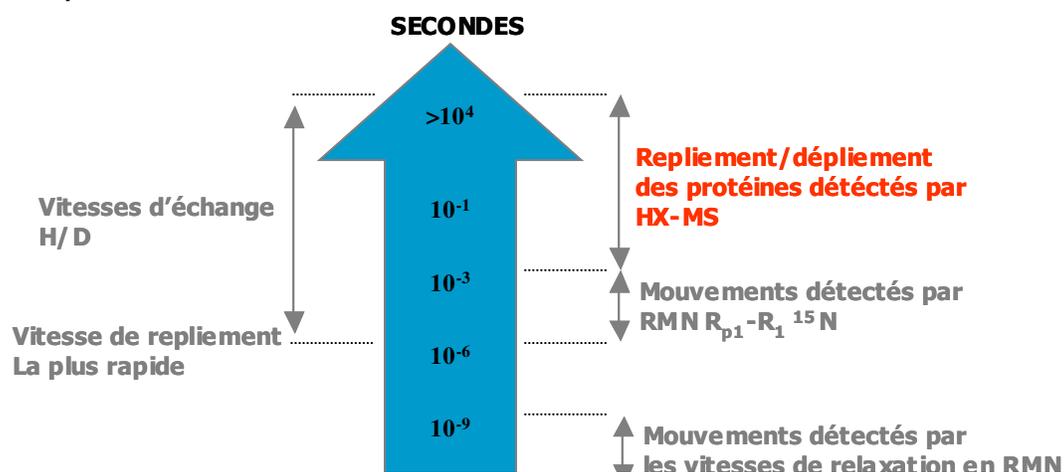
Une autre méthode, déjà développée avec succès par la RMN, est l'échange isotopique hydrogène/deutérium<sup>84</sup>. Cette technique a eu de nombreuses applications pour l'étude de la stabilité des

<sup>83</sup> Mirza, U.A., Chait, B.T. Effect of anions on the positive ion electrospray ionization mass spectra of peptides and proteins. *Anal. Chem.* **68**,2897-2904, (1994)

<sup>84</sup> Bai, Y.W., Englander, J.J., Mayne, L., Englander, S.W. *Methods. Enzymol.* **259**, 334-356, (1995)

protéines et de leur conformation en RMN<sup>85</sup>. Utilisant la différence de masse entre le deutérium et l'hydrogène, cette technique a été appliquée avec succès à la spectrométrie de masse.

L'échange isotopique hydrogène/deutérium en combinaison avec la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse de la structure et de la dynamique des protéines. Cette technique a été appliquée à la spectrométrie de masse au début des années 1990 et est utilisée pour l'étude de nombreuses protéines qui sont difficiles à étudier par d'autres méthodes. Pour rendre disponible la spectrométrie de masse à l'échange hydrogène/deutérium en solution, il a fallu développer des méthodes pour se prémunir des échanges artéfactuels inhérents à l'analyse. Cette technique a pu se développer dès lors qu'il a été possible de déterminer de manière précise l'incorporation de deutérium au niveau des hydrogènes amides des protéines<sup>86,87,88</sup>. Cette méthodologie a rendu possible l'obtention de résultats complémentaires à ceux obtenus par RMN mais également d'étendre l'étude à des protéines de tailles trop importantes pour être étudiées par RMN.



**Fig.2.2. Echelle de temps valable pour des événements dynamiques de structuration des protéines**

Les mesures d'échange isotopique vont permettre d'obtenir des informations sur la structure des protéines sur une échelle de temps spécifique (figure 2.2.). Il est ainsi possible d'étudier le repliement des protéines induit par des agents dénaturants, de mesurer le taux de repliement d'une protéine, d'observer la structuration secondaire d'une protéine<sup>89, 90</sup> et également d'étudier les interactions entre différentes protéines.

<sup>85</sup> Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L., Englander, S.W. *Proteins. Struct. Funct. Genet.* 20,4-14, (1994).

<sup>86</sup> Thévenon-Emeric, G., Kozlowski, J., Zhang, Z-Q, Smith, D.L. *Anal. Chem.* 64, 2456, 1992.

<sup>87</sup> Katta, V., Chait, B.T., *J. Am. Chem. Soc.* 115, 6317, 1993.

<sup>88</sup> Miranker, A., Robinson, C.V., Radford, R.T., Knudsen, J., Dobson and Poulsen, F.M. *Biochemistry*, 35,, 4069, 1996.

<sup>89</sup> Hvidt A., Nielsen, S.O. Hydrogen-exchange in proteins. *Adv. Protein. Chem.* 21, 287-387, (1966).

<sup>90</sup> Woodward, C.K., Hydrogen exchange rates and protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 112-113, (1994).

## 2.1. Principe de l'échange isotopique hydrogène/deutérium

### 2.1.1. Protons échangeables et protons détectables

L'échange isotopique hydrogène/deutérium utilise les propriétés des protéines dont certains protons sont susceptibles de s'échanger en présence d'un solvant deutéré.

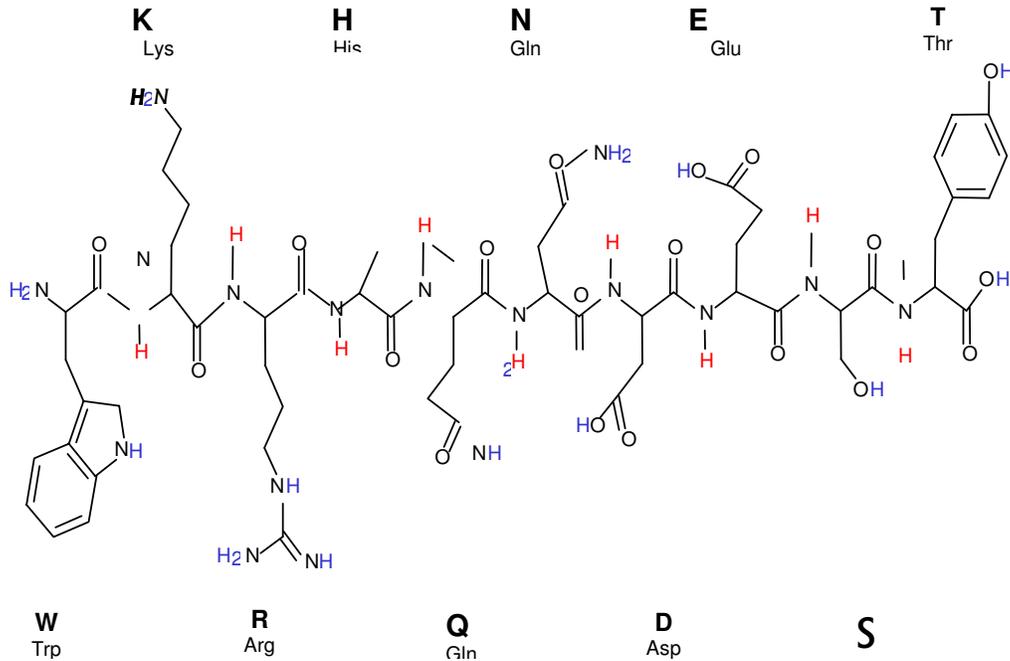


Fig.2.1. Hydrogènes échangeables dans les chaînes polypeptidiques

Au niveau des protéines, trois types de protons peuvent être discernés :

- Les protons liés de manière covalente à des atomes de carbone n'échangent pas pour l'essentiel.
- Les protons qui se situent sur les chaînes latérales des acides aminés (protons des groupements hydroxyles et amides) et aux extrémités de la protéine (hydrogènes de l'extrémité NH<sub>2</sub> et hydrogène de l'extrémité COOH) échangent de manière très rapide et généralement ne peuvent pas être détectés par les techniques de spectrométrie de masse.
- Les hydrogènes amides des liaisons peptidiques échangent à des vitesses qui peuvent être détectées par les techniques de spectrométrie de masse. Ce sont ces hydrogènes qui sont analysés par la méthode HXMS.

Ainsi, les hydrogènes amides présent tout au long de la chaîne polypeptidique (à raison de un hydrogène par acide aminé, à l'exception de la proline), constituent des capteurs de l'état

conformationnel de la protéine. La sensibilité de ces capteurs peut être facilement évaluée car la plupart des structures formées au sein des protéines font intervenir des liaisons hydrogène au niveau de ces hydrogènes amides.

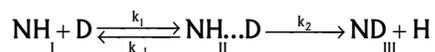
Lorsque ces protons échangeables sont impliqués dans des structures secondaires ceux ci échangent plus lentement en raison de leur implication dans des liaisons hydrogène les rendant moins accessibles au solvant deutéré. Par exemple, la formation d'une hélice  $\alpha$  au sein d'une protéine implique la mise en place de liaisons hydrogènes entre les groupements chimiques polaires qui forment les liaisons peptidiques. En effet, la structure en hélice  $\alpha$  est stabilisée par une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène attaché à l'azote électronégatif de chaque liaison peptidique et l'atome d'oxygène du carbonyle électronégatif du quatrième acide aminé de l'hélice sur le côté N-terminal. Dans la conformation en feuillet  $\beta$ , les liaisons hydrogène peuvent être soit interchaînes soit intrachaînes entre les hydrogènes des liaisons peptidiques de chaînes polypeptidiques adjacentes.

Les protons échangent avec des taux spécifiques qui sont directement liés à l'état de structuration de la protéine. Ainsi les protons situés en surface des protéines et qui ne participent pas à une structure secondaire vont échanger plus rapidement. D'autres hydrogènes, totalement protégés par des interactions hydrophobes, ne peuvent échanger même après plusieurs jours.

### 2.1.2. Mécanisme d'échange hydrogène/deutérium

Des modèles faisant intervenir la pénétration de solvant et des dépliements locaux ont été utilisés pour décrire l'échange isotopique hydrogène/deutérium dans les protéines à l'échelle moléculaire<sup>91, 92</sup>. Selon le modèle de pénétration de solvant, les catalyseurs d'échange d'hydrogène ( $\text{OH}^-$  et  $\text{H}^+$ ) pénètrent la structure tertiaire pour atteindre les hydrogènes amides pour que l'échange s'effectue. Il en résulte que les hydrogènes de type amide localisés à l'intérieur de la protéine échangent plus lentement que ceux situés en surface. Selon le modèle de dépliement local, de petits segments de 5 à 10 acides aminés vont se déplier pendant de très courtes périodes, rompant les liaisons hydrogène et exposant les hydrogènes amides au solvant contenant les catalyseurs d'échange.

Le processus d'échange de l'hydrogène, en tenant compte de chacun des modèles, peut être décrit de la manière suivante :



<sup>91</sup> Woodward, C., Simon, I., Tuchsén, E, *Mol. Cell. Biochem*, **48**, 135-160, 1982.

<sup>92</sup> Englander, S.W, Kallenbach, N.R. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521-655

où I est l'état dans lequel les hydrogènes amides et les catalyseurs d'échange sont séparés, II est l'état dans lequel les catalyseurs et les hydrogènes amides sont en contact et III est l'état suivant l'échange d'hydrogènes. A partir du modèle de pénétration du solvant, la constante de vitesse d'ordre 1 peut être déterminée pour l'échange d'hydrogène à partir de l'expression :

$$k_{\text{ex}} = (k_1 / k_{-1})k_2 = Kk_2 \quad (\text{Eq.2.1})$$

ou K est la constante d'équilibre décrivant la pénétration des catalyseurs d'échange vers les hydrogènes amides.

Dans le modèle de dépliement local, l'état replié est fortement favorisé (i.e.,  $k_{-1} \gg k_1$ ) et les constantes de vitesse d'échange peuvent être décrites par l'expression<sup>5</sup> :

$$k_{\text{ex}} = (k_1 k_2) / (k_{-1} + k_2) \quad (\text{Eq.2.2})$$

Si l'échange intrinsèque d'hydrogène est beaucoup plus élevé que la vitesse de repliement ( $k_2 \gg k_{-1}$ ), la constante de vitesse de l'échange est égale à la constante de vitesse du dépliement.

$$k_{\text{ex}} = k_1 \quad (\text{Eq.2.3.})$$

Dans ce cas, l'ensemble des atomes d'hydrogènes amides présents à l'intérieur d'un même segment d'une protéine échange lorsque le segment est ouvert. Lorsque le modèle est approprié, la constante de vitesse de l'échange d'hydrogène est une mesure directe de la vitesse de dépliement de la protéine<sup>93</sup>.

La vitesse de repliement de la protéine peut être supérieure à la vitesse intrinsèque de l'échange d'hydrogène ( $k_{-1} \gg k_2$ ). Dans ce cas, un segment de la protéine peut se déplier et se replier plusieurs fois avant que les hydrogènes amides présents sur ce segment soient susceptibles d'être totalement remplacés par du deutérium. L'échange d'hydrogène s'effectuant résidu par résidu et non pas segment par segment, ce type d'échange est dit non corrélé. La constante de vitesse de l'échange d'hydrogène est donnée par le produit de la constante d'équilibre de la forme dépliée et la constante de vitesse pour l'échange intrinsèque  $k_2$  :

$$k_{\text{ex}} = Kk_2 \quad (\text{Eq.2.3.})$$

<sup>93</sup> Roder, H., Wagner, G., Wüthrich, K. *Biochemistry*, 24,7396-7407, 1985.

Quand ce modèle est applicable, les constantes de vitesse de l'échange d'hydrogène peuvent être reliées à la constante d'équilibre de la forme dépliée, car la constante de vitesse intrinsèque de l'échange d'hydrogène peut être calculée<sup>94,95</sup>.

Les constantes de vitesse pour l'échange d'hydrogène peuvent être directement corrélées à la structure et à la dynamique de la protéine uniquement quand le mécanisme d'échange est connu. Dans une étude de Roder et al<sup>6</sup>, l'étude du mécanisme d'échange a été recherché pour un inhibiteur de la trypsine pancréatique. Il est apparu que pour cette protéine, l'échange d'hydrogène est non corrélé, et ils proposent que les constantes de vitesse d'échange peuvent être reliées à la dynamique de la protéine par l'équation 6. La répartition isotopique des ions issus de peptides pour lesquels environ 50% des hydrogènes amides ont été échangés est une indication que l'échange se produit de manière directe. Dans le cas le plus simple d'un échange corrélé (équation 2.3.), où un peptide est entièrement dérivé d'un seul segment déplié contigu, la moitié des peptides sera totalement deutérée et la moitié sera totalement protonée, donnant naissance à un massif isotopique bi-modal. Si l'échange d'hydrogène était non-corrélé, le massif isotopique devrait être binomial. Enfin, pour le cas le plus réaliste où les peptides ne sont pas dérivés entièrement à partir d'un seul segment déplié, l'échange corrélé devrait normalement aboutir à une distribution bi-modale des isotopes. Dans le cas où les massifs isotopiques des ions moléculaires des peptides analysés sont binomiales, l'échange hydrogène est non corrélé et l'équation 2.4. est appropriée pour étudier les constantes de vitesse d'échange.

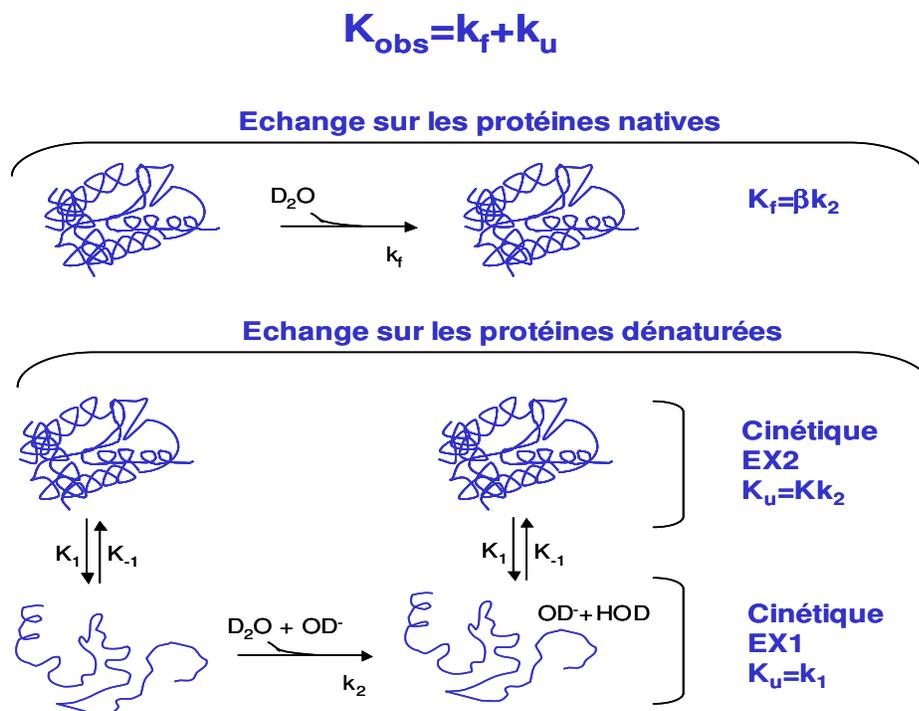


Fig.2.2. Réactions d'échange sur les protéines natives et dénaturés

<sup>94</sup> Englander, S.W., Poulsen, A. *Biopolymer*, 7, 379-393, 1969.

<sup>95</sup> Molday, R.S., Englander, S.W., Kallen, R.G., *Biochemistry*, 25, 1428-1436, 1986.

### 2.1.3. Facteurs influençant la réaction d'échange

Outre la position des hydrogènes de type amide au sein de la protéine (cf. 1.3.1.), différents facteurs sont susceptibles d'affecter la réaction d'échange isotopique hydrogène/deutérium. Parmi ces facteurs : le pH, la température, l'influence des chaînes latérales et la structure secondaire de la protéine.

#### 2.1.3.1. Influence du pH et de la température

L'échange isotopique des hydrogènes de type amide au sein des protéines est catalysé par les acides et les bases. Ainsi, la constante de vitesse de l'échange isotopique,  $k_{ex}$  peut être exprimé comme la somme de deux termes :

$$k_{ex} = k_H [H^+] + k_{OH} [OH^-]$$

où  $k_H$  et  $k_{OH}$  sont les constantes de vitesse pour les échanges respectivement catalysés par les acides et les bases. Des études détaillées réalisées sur les hydrogènes amides de polyalanine indiquent que  $k_H$  et  $k_{OH}$  ont des valeurs de 41.7 et  $1.12 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  respectivement à  $20^\circ\text{C}$ <sup>96,97</sup>. La vitesse d'échange isotopique pour la polyalanine est donnée dans la figure 3 en fonction du pH. La grande sensibilité des constantes de vitesse à la valeur du pH conduit à observer un soin tout particulier lors des expériences d'échange quant au contrôle du pH. En outre, cette sensibilité est à la base de l'utilisation du « quench » qui permet de déterminer l'incorporation du deutérium en limitant les pertes d'informations relatives au rééchange avec l'environnement qui survient lors de la préparation de l'échantillon.

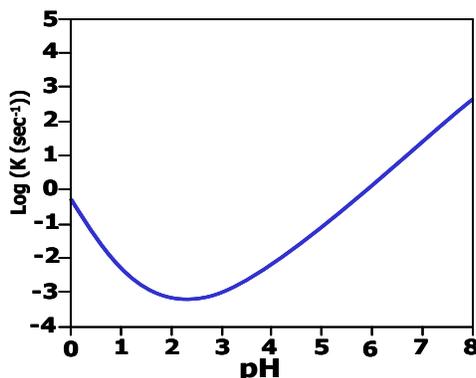


Fig 2.3. Constante de vitesse pour l'échange isotopique d'hydrogènes de type amide localisés sur les liaisons peptidiques d'une polyalanine représentée en fonction du pH<sup>13</sup>.

<sup>96</sup> Molday, R.S., Englander, S.W., Kallen, R.G., *Biochemistry*, 11, 150, 1972.

<sup>97</sup> Bay, Y., Milne, J.S., Mayne, L. Ad Englander, S.W. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 17, 75, 1993.

Un élément crucial de l'échange isotopique hydrogène deutérium est donc le contrôle du pH. Le simple changement d'une unité de pH conduit au changement d'un facteur 10 pour le taux d'échange (fig. 4).

Ainsi, si le taux d'échange d'un proton amide d'un peptide non structuré à pH 7 a une valeur de  $10 \text{ s}^{-1}$ , le même proton, dans le même peptide, va voir sa vitesse d'échange passer à  $0.1 \text{ s}^{-1}$  pour une valeur de pH de 5. Dans cet exemple, le temps de demi-vie pour les protons échangeables est très inférieur à une seconde. La même expérience réalisée à un pH 2.7 conduit à une vitesse d'échange pour ce même proton de  $0.001 \text{ s}^{-1}$ . Cette propriété est primordiale et permet de ralentir significativement l'échange pendant le temps de l'analyse par spectrométrie de masse. Suite à l'incubation de la protéine dans le solvant deutéré, un rapide abaissement du pH permet pratiquement de figer les échanges entre le solvant et la protéine. L'étude des demi-vies des protons échangés indique qu'à pH 2.7, il suffit de 11 minutes pour perdre la moitié des deutérons échangés. Ce temps reste court pour réaliser une analyse en spectrométrie de masse. Pour ralentir encore les taux d'échanges, l'abaissement de la température à  $0^\circ\text{C}$  permet d'avoir des demi-vies pour les protons amides échangés de l'ordre de 30 à 60 minutes (Figure 4). Ces conditions permettent une analyse des échantillons par spectrométrie de masse.

Dans les expériences les plus simples, la réaction d'échange est réalisée à un pH élevé, puis le pH est brutalement abaissé pour stopper l'échange. Cette étape est essentielle pour permettre une analyse par spectrométrie de masse.

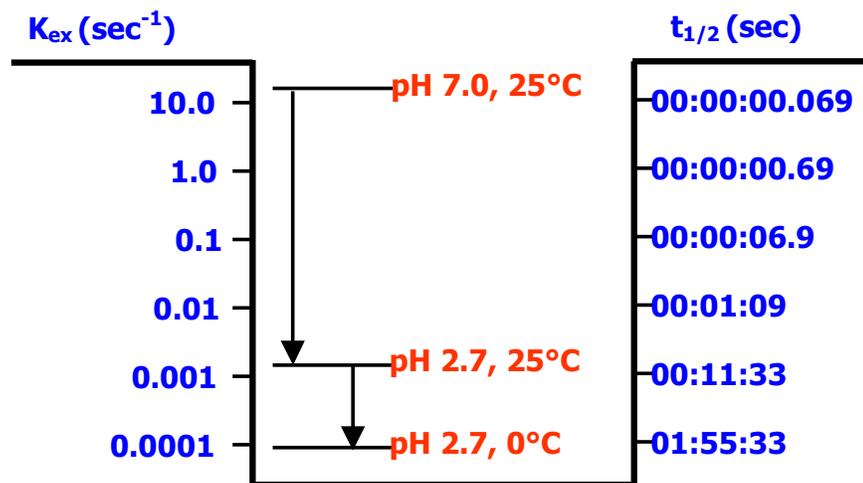


Figure 2.4. Effet du pH et de la température sur les taux d'échanges et les  $\frac{1}{2}$  vies des hydrogènes échangeables.

### 2.1.3.2. Influence des chaînes latérales proches

En plus de la sensibilité au pH et à la température la réaction d'échange est affectée par les chaînes latérales des acides aminés adjacents, mais relativement peu sensible aux chaînes latérales plus distantes. La sensibilité aux chaînes latérales voisines a été étudiée en utilisant des dipeptides modèles d'acides aminés naturels<sup>12,13</sup>. L'effet stérique semble affecter la constante de vitesse d'échange. Les effets des chaînes latérales sont en général additifs ce qui a permis d'estimer les constantes d'échange de n'importe quelle séquence polypeptidique non structurée en fonction du pH<sup>13</sup>. De plus, les énergies d'activation de  $k_H$  et  $k_{OH}$  (14 et 17 kcal mol<sup>-1</sup>) peuvent être utilisées pour prédire les constantes de vitesse d'échange pour des polypeptides non structurés à différentes températures<sup>98</sup>. La capacité à calculer les constantes d'échange isotopique pour des polypeptides non structurés a été utilisée pour déterminer les facteurs de protection des hydrogènes de type amide pour des polypeptides structurés<sup>99,100,101</sup>.

### 2.1.3.3. Influence des structures secondaires et tertiaires

Bien que les chaînes latérales affectent les constante de vitesse des hydrogènes amides par un facteur 10, cela peut être considéré comme négligeable en comparaison avec l'effet de la structuration secondaire et tertiaire. Pour les protéines structurées, les constantes de vitesse des hydrogènes amides peuvent être affectées d'un facteur 10<sup>8</sup> lorsque ces atomes d'hydrogène sont impliqués dans des structures secondaires ou tertiaires. Une telle différence de constante de vitesse entre l'état structuré et l'état non structuré permet d'utiliser l'échange des hydrogènes amides comme sondes pour détecter et localiser des changements dans la conformation des protéines.

## 3. Expérimentation

### 3.1. Les techniques de marquage

#### 3.1.1. Marquage par dilution et marquage par filtration sur gel

Il existe de nombreuses méthodes pour réaliser l'incubation de la protéine dans l'oxyde de deutérium. Les deux premières méthodes qui ont été développées sont la dilution et la filtration sur gel. L'ensemble des méthodes fait intervenir un marquage des protéines en solution. L'addition de D<sub>2</sub>O à des extraits secs de protéines complique considérablement l'analyse des résultats en raison des effets de solvation<sup>102</sup>.

<sup>98</sup> Zhang, Z-Q, Smith, D.L. *Protein Sci.* **5**, 1282, 1996.

<sup>99</sup> Engander, S.W, Kallenback, N.R., *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521, 1984.

<sup>100</sup> Marmorino, J.L., Auld, D.S., Betz, S.F., Doyle, D.F. Young, G.B. and Pielak G.J. *Protein Sci.* **2**, 1966, 1993.

<sup>101</sup> Finucane, M.D. and Jardetzky, *Protein Sci.* **5**, 653, 1996.

<sup>102</sup> Engen, J.R., Smith, D.L. *Meth. Mol. Biol. Vol 146*, 2000.

Une première méthode de marquage est la dilution. Une protéine dans un tampon aqueux, est diluée 15 à 20 fois par l'addition d'un excès du même tampon en remplaçant H<sub>2</sub>O par D<sub>2</sub>O. Cette dilution amène la concentration en deutérium à un niveau supérieur à 95%. La dilution est une méthode de marquage simple mais nécessite une assez grande quantité de protéine.

Une autre méthode est la filtration sur gel. Cette méthode consiste à introduire la protéine dans son tampon contenant H<sub>2</sub>O dans une petite colonne de type G25 susceptible d'être centrifugée. La colonne G25 contient un support de filtration sur gel. Après une courte centrifugation, les protéines sont éluées de la colonne vers un tube de réception contenant le dioxyde de deutérium. Les protéines sont alors en présence de D<sub>2</sub>O alors que H<sub>2</sub>O est piégée à l'intérieur du milieu de gel filtration. L'utilisation de cette technique nécessite une estimation précise du temps nécessaire pour l'élution de la protéine. Cette technique beaucoup plus délicate que la méthode de dilution est beaucoup moins utilisée.

### **3.1.2. Marquage continu ou marquage pulsé**

Une fois la protéine incubée en présence de deutérium, deux autres possibilités s'offrent à l'expérimentateur. Le marquage peut se faire de manière continue ou de manière pulsée.

Dans le marquage continu, la protéine est exposée au deutérium au temps  $t_0$  et incubée ainsi avant d'être analysée au temps  $t$ . Après le temps  $t$ , la réaction est « quenchée » et une fraction de la solution de protéine marquée est prélevée pour procéder à l'analyse.

La méthode de marquage pulsé est réalisée en maintenant, par exemple, la protéine dans des conditions dénaturantes pour une période de temps donnée. Un pulse de marquage au deutérium est alors réalisé et la réaction est ensuite figée. On observe alors une image instantanée de la population de protéine à un instant donné.

Dans la méthode de marquage continu, on observe l'effet cumulatif du marquage au cours du temps d'incubation. Le marquage continu est utilisé pour observer l'incorporation de deutérium dans les protéines lorsque ces protéines sont dans un état replié et que la contribution de l'état dénaturé de la protéine au cours du temps est négligeable. Le marquage pulsé est utilisé pour mesurer les constantes de vitesse de dépliement/repliement dans des conditions où l'état déplié a été artificiellement augmenté par addition d'un dénaturant, par chauffage ou par modification du pH.

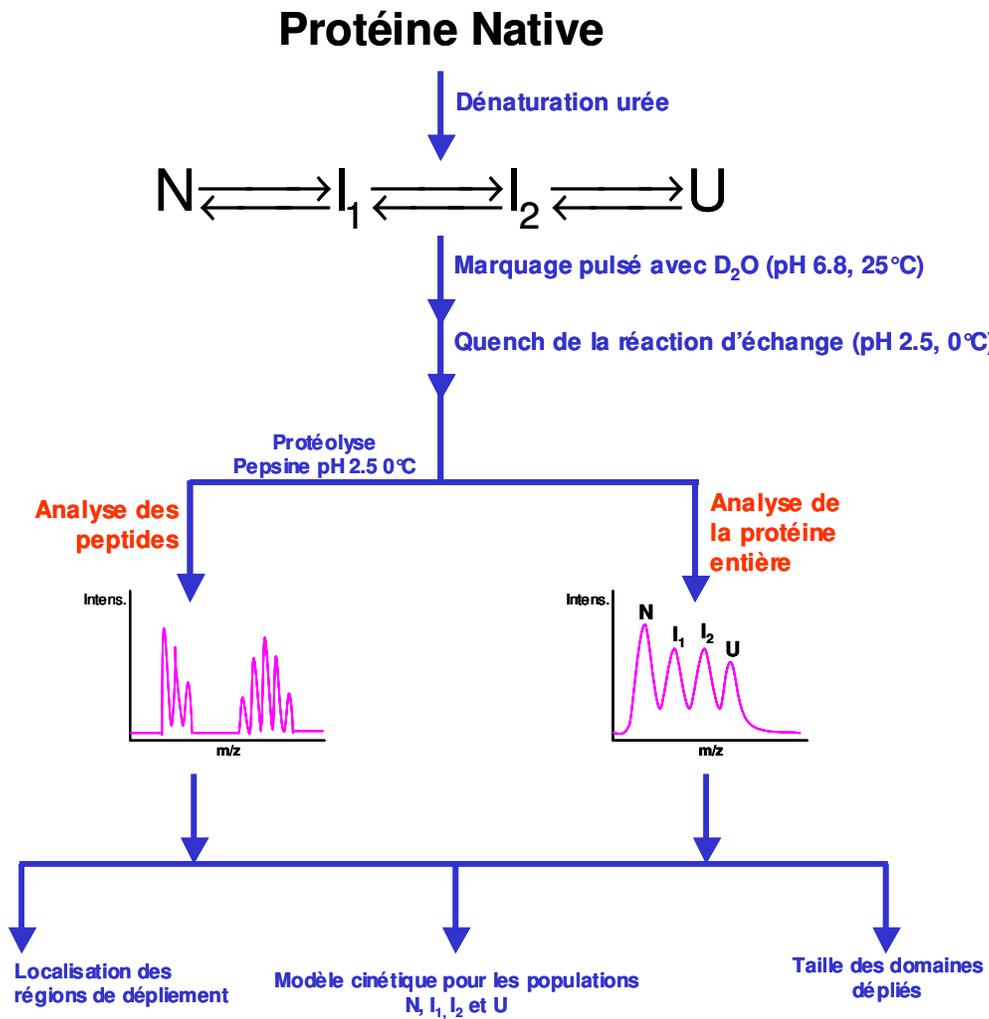


Figure 2.5. Le marquage H/D par pulse et la spectrométrie de masse pour la détermination de la dynamique de dépliement/repliement des protéine<sup>103</sup> (N : protéine native, I<sub>1</sub> : intermédiaire conformationnel 1, I<sub>2</sub> intermédiaire conformationnel 2, U : protéine dénaturée.)

<sup>103</sup> Deng, Y., Smith, D.L. *Anal. Biochem.* 276, 2, 150-160, 1999.

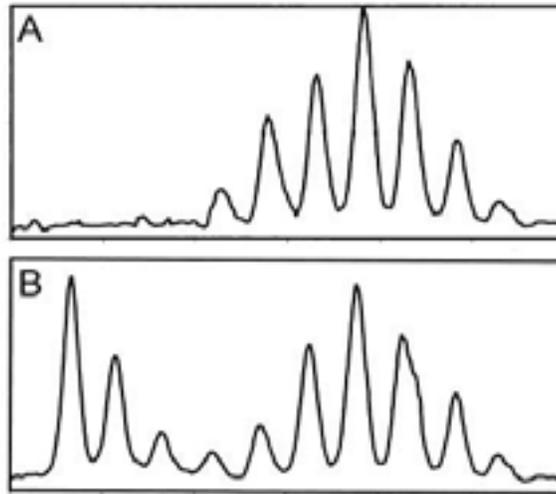


Figure 2.6. Marquage continu (A) et marquage pulsé (B) d'un même peptide.

Dans la figure 2.5. sont présentés les spectres de masse d'un même peptide d'une protéine de grande taille ayant été marquée par la méthode du marquage continu (A) ou du marquage pulsé (B). Dans l'expérience A, la protéine a été incubée dans le deutérium pour une durée de 30 minutes avant d'être analysée. Dans le second cas, la protéine a été incubée dans une solution contenant 3 M d'urée pour 30 minutes puis elle a été incubée 10 secondes dans une solution de deutérium avant d'être analysée. Dans l'expérience A, on observe l'effet cumulatif de l'incorporation dans la protéine des atomes de deutérium au cours du temps d'incubation. Ainsi, lorsque la protéine se déplie, elle est marquée par le deutérium, réaction qui ne peut reverser car la concentration en deutérium est supérieure à 95%. Dans l'expérience B, il y a deux populations de molécules, indiquées par la présence de deux massifs isotopiques. Le massif de plus haut rapport  $m/z$  représente le pourcentage de la population de molécule déplié après 30 minutes d'incubation dans la solution à 3 M d'urée.

### 3.2. Détermination de la constante de vitesse d'échange hydrogène/deutérium par spectrométrie de masse

La détermination des constantes de vitesse d'échange par spectrométrie de masse est liée aux objectifs de l'étude. Certaines études nécessitent la détermination de l'incorporation globale de deutérium sur l'ensemble de la protéine, alors que d'autres impliquent une fragmentation de la protéine pour déterminer l'incorporation de deutérium dans chacun des fragments de la protéine de manière à obtenir une information topologique.

Dans l'ensemble de nos expériences, nous utiliserons la technique faisant intervenir le clivage protéolytique, cette technique permettant l'analyse topologique de l'incorporation du deutérium dans les protéines. La combinaison du clivage protéolytique et de la spectrométrie de masse pour la détermination de constante de vitesses a été introduite par le groupe de Smith<sup>104</sup>. L'approche générale de cette méthodologie consiste à incuber la protéine structurée à une température et un pD donné dans une solution de D<sub>2</sub>O. Après incubation, la réaction d'échange est quenchée en abaissant le pD à 2.4 et la température à 0°C. En partant de conditions de pH neutre, l'abaissement à un pH 2-3 provoque une baisse de la constante de vitesse de l'ordre de 10<sup>4</sup>. En outre, un abaissement de la température de 20°C à 0°C baisse la constante de vitesse d'un facteur additionnel de 10 fois. Pour ces conditions de quench, la demi-vie des deutériums aux positions amides des peptides est de l'ordre de 30 à 120 minutes<sup>105</sup>. Pour minimiser les réactions d'échange artéfactuelles, les analyses par spectrométrie de masse doivent être menées en quelques minutes.

Pour déterminer les constantes de vitesse d'échange dans des zones précises de la protéine, il est nécessaire de fragmenter celle-ci en peptides à l'aide d'une protéase apte à fonctionner à bas pH, la pepsine. Les conditions de quench (pH 2.6, 0°C) devant être maintenues durant la digestion, un ratio enzyme/substrat de 1 :1 est utilisé pour réduire au maximum le temps de digestion pour le porter à une durée inférieure à 10 minutes.

La pepsine qui est utilisée pour produire les fragments à son maximum d'activité à pH 2-3, où les vitesses d'échange des hydrogènes amides sont les plus basses. Même si la pepsine a l'avantage de générer de nombreux peptides, un des inconvénients majeurs est sa non-spécificité et la difficulté d'assignation des peptides qui en résulte. En effet, les sites de clivage de la pepsine ne peuvent pas être prédits avec certitude, car les coupures peuvent intervenir côté N ou C terminal. Une étude des résultats de protéolyse à la pepsine pour quatre protéines différentes a indiqué une certaine priorité de clivage :

Met->Phe->Leu->-Tyr>-Phe>Glu->Cys->Tyr->Ala-

Les « - » à droite et à gauche indique les clivages en N terminal ou en C terminal respectivement. Mais des clivages à d'autres sites ont également été observés<sup>106</sup>.

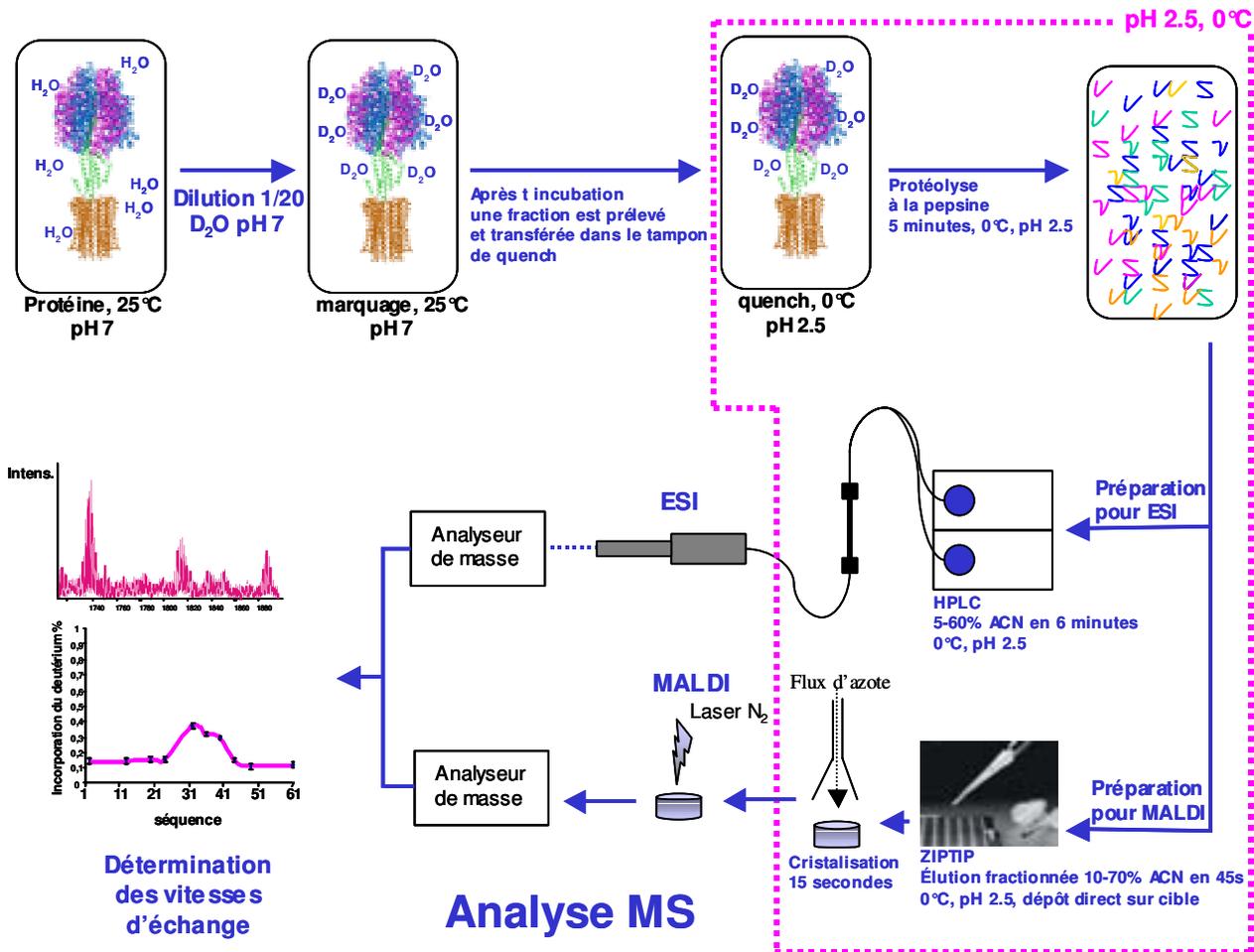
La protéolyse des protéines de tailles importantes va générer un grand nombre de peptides, dont les masses coïncideront avec plusieurs segments possibles au sein de la séquence de la protéine. Des analyses complémentaires de spectrométrie de masse MS/MS permettront de discriminer les différentes possibilités pour attribuer précisément un peptide à sa séquence. Dans une de nos études menée sur un modèle de

<sup>104</sup> Zhang, Z-Q., Smith, D.L., *Protein Sci*, 2, 522, 1993.

<sup>105</sup> Englander, J.J., Rogero, J.R., Englander, S.W. *Anal. Biochem.* 147, 234, 1985.

<sup>106</sup> Zhang, Z-Q, *PhD Thesis, Purdue University, 1995.*

protéine prion, HET-s, de 295 acides aminés, la protéolyse à la pepsine a généré 106 peptides dont la taille pouvait varier entre 3 et 35 résidus (13 résidus en moyenne) dont seulement 8 ont été assignés directement à leur séquence sans nécessiter d'analyse MS/MS.



Après digestion à la protéase, les peptides deutérés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. Les premières études ont été réalisées à l'aide de spectromètres de type FAB MS<sup>18,107,108</sup>. Ensuite sont apparues des études faisant intervenir les spectromètres de masse à ionisation ESI<sup>109,110,111</sup>. Enfin, plus

<sup>107</sup> Liu, Y., Smith, D.L., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 5, 19, 1994.

<sup>108</sup> Zhang, Z-Q., Post, C.B., Smith, D.L., *Biochemistry*, 35, 779, 1996.

<sup>109</sup> Johnson, R.S., Walsh, K.A., *Protein Sci.* 3, 2411, 1994.

<sup>110</sup> Dharmasiri, K., Smith, D.L., *Anal. Chem.* 68, 2340, 1996.

<sup>111</sup> Jaquinod, M., Guy, P., Halgand, F., Caffrey, M., Fitch, M., ovich, M., Forest, E., *FEBS Lett.* 380,44, 1996.

Enfin, plus récemment, le groupe de Komives a initié l'utilisation des spectromètres de type MALDI ToF<sup>112</sup> pour déterminer l'incorporation du deutérium dans les peptides.

Un des avantages de l'ESI est la possibilité de coupler sa source directement à un système chromatographique sans avoir à réaliser d'étape de cristallisation de l'échantillon qui est source d'échanges artefactuels. Quant à l'utilisation du MALDI, de nouvelles études ont permis d'améliorer considérablement les phénomènes de perte d'échange qui se produisaient durant la préparation de l'échantillon, en améliorant la composition de la matrice<sup>113</sup> et le mode de dépôt<sup>114</sup>. Le spectromètre de masse MALDI, en plus d'une excellente justesse et d'une grande sensibilité a l'avantage de produire essentiellement des ions mono-chargés ce qui simplifie considérablement les spectres des mélanges de peptides issus de la protéolyse à la pepsine.

L'obtention d'un spectre de masse, par un instrument MALDI ou ESI, permet de déterminer les masses des différents peptides issus de la protéolyse à la pepsine. Le niveau de deutérium dans chacun des peptides est alors calculé en comparant la masse du peptide n'ayant pas été deutéré avec celle du peptide deutéré. La masse des peptides deutérés est déterminée en déterminant le centroïde de leurs massifs isotopiques.

Lorsque l'incorporation du deutérium est déterminée pour chacun des peptides couvrant la séquence de la protéine, on obtient une image topologique de l'accessibilité des différentes régions de la protéine au solvant. La résolution des résultats de l'incorporation du deutérium dépend directement de la taille des fragments générés par la pepsine. Pour augmenter cette résolution, on peut étudier les zones de recouvrement entre les différents peptides. Ainsi, nous verrons dans le cas de HET-s, bien qu'ayant généré des fragments de 13 résidus en moyenne, après prise en compte des zones de recouvrement, que la résolution obtenue est de 7 acides aminés. Dans le cas d'une analyse par MALDI, on cherchera à produire des fragments dont le rapport m/z est supérieur à 900 Da, de manière à ne pas avoir d'interférence avec le signal de la matrice (Pour une analyse ESI, cette limite est abaissée à 500 Da et est liée à la présence des solvants).

Au cours du protocole expérimental, certains atomes de deutérium vont être perdus en particulier lors de la protéolyse à la pepsine, ou pendant l'étape de chromatographie liquide. Ces pertes sont inévitables malgré les précautions pour maintenir les échantillons à pH et température faibles. Pour prendre en compte ces pertes, on utilise des contrôles faisant intervenir une expérience dite 0% deutérium et une expérience 100% deutérium. Le contrôle 0% deutérium correspond à la protéine qui n'a jamais été

---

<sup>112</sup> Mandell, J.G., Falick, A.M., Komives, E.A. *Anal. Chem.* **70**, 3987-3995, 1998.

<sup>113</sup> Figuerosa, I., Russel, D., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 719-731, 1999.

<sup>114</sup> Kipping, M., Scherhorn, A., *J. Mass Spectrom.*, **38**, 271-276, 2003.

exposée au deutérium et l'expérience contrôle 100% correspond à la protéine dont tous les hydrogènes échangeables ont été remplacés par du deutérium.

Pour évaluer la perte de deutérium liée au protocole expérimental, on utilise l'équation suivante :

$$D = \frac{m - m_{0\%}}{m_{100\%} - m_{0\%}} \times N$$

(Eq. 2.4.)

D est le niveau de deutérium ajusté

m est la masse observée expérimentalement

$m_{0\%}$  est la masse du contrôle non deutéré

$m_{100\%}$  est la masse du contrôle totalement deutéré

N est le nombre total de protons amides dans l'échantillon

Pour les estimations de perte de deutérium, on considère que les pertes sur un fragment peptidique totalement deutéré sont proportionnelles aux pertes du même fragment lorsque celui-ci est partiellement deutéré. La justesse de l'estimation de la perte est directement liée à la séquence du peptide<sup>115</sup>. L'erreur moyenne qui résulte de l'équation Eq 2.1. est de l'ordre de 5% avec 92% des fragments ayant une erreur < 10%, 3% ayant une erreur > 15% et 0.5% ayant une erreur supérieure à 25%<sup>4</sup>.

Les ajustements liés à la perte de deutérium durant l'analyse sont indispensables lorsque l'on cherche à déterminer précisément le taux d'échange d'un fragment dans une condition expérimentale donnée. Cependant, cet ajustement n'est pas indispensable pour les études basées sur la comparaison entre deux états de structure d'une même protéine, lorsque les conditions d'analyse sont identiques dans les deux cas.

A partir d'expériences d'échange isotopique en marquage continu on peut estimer la distribution des constantes de vitesse en décrivant l'échange isotopique à chaque liaison peptidique du peptide. Ainsi dans la figure 5, on a reporté les données expérimentales correspondant à l'incorporation de deutérium dans un fragment en fonction du temps.

---

<sup>115</sup> Zhang, Z., Smith, D.L. *Protein Sci*, 2, 522-531, 1993.

Pour déterminer l'équation qui correspondait à ces données expérimentales nous avons utilisé l'équation Eq.2.2.

$$D = N - \sum_{i=1}^N \exp^{-k_i t} \quad (\text{Eq.2.2.})$$

Les constantes de vitesse ont été déterminées à partir des données expérimentales en utilisant une série d'expression d'ordre 1 ou D est le nombre de deutérium dans le peptide, N est le nombre d'hydrogènes amides dans un segment et  $k_i$  sont les taux d'échange hydrogène/deutérium pour chacun des protons amides présents le long du segment<sup>116</sup>.

### 3.3. Utilisation comparée de la RMN et de la spectrométrie de masse pour la détermination des constantes de vitesse d'échange.

La résonance magnétique nucléaire a été utilisée bien avant la spectrométrie de masse pour la détermination des vitesses d'échange des hydrogènes amides des protéines. Bien que les spectroscopies IR ou UV soient utilisées pour suivre les échanges d'hydrogène au sein des protéines, seules la RMN et la spectrométrie de masse sont susceptibles de déterminer les vitesses d'échange dans des régions spécifiques de la protéine. Le principal avantage de la RMN est sa capacité à déterminer les vitesses d'échange isotopique à une liaison peptidique particulière d'une protéine structurée. La spectrométrie de masse ne permet pas de donner les vitesses d'échange que sur de courts segments, la répartition des vitesses sur le segment ne pouvant pas être déterminée. La résolution obtenue avec une analyse par spectrométrie de masse résulte des conditions de fragmentation à la pepsine et est en général proche de 10 à 15 acides aminés. La possibilité d'augmenter la résolution autrement que par une étude des zones de recouvrement, par exemple par fragmentation MS/MS, est sujette à caution<sup>117,118,119</sup>.

La spectrométrie de masse a un avantage important sur la RMN sur le plan de la sensibilité. En effet, pour des expériences de marquage en continu, la RMN nécessite environ 50  $\mu$ moles de protéine, alors que des études similaires par spectrométrie de masse n'en nécessitent que quelques nanomoles. La quantité nécessaire pour l'analyse en RMN peut être réduite à 5  $\mu$ moles si le marquage  $^{15}\text{N}$  de la protéine est disponible. Des expériences préliminaires sont nécessaires dans le cas de la RMN et de la spectrométrie de masse. Pour la RMN, la résonance des NH des peptides doit être assignée, alors qu'en spectrométrie de masse, les peptides fragments doivent être assignés à leur séquence. Pour les études de protéines peu

<sup>116</sup> Zhang, Z., Post, C.B., Smith, D.L. *Biochemistry*, **35**, 779-791, 1996.

<sup>117</sup> Demmers, J.A., Rijkers, D.T., Haverkamp, J., Killian, J.A., Heck, A.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(37), 11191-8, 2002.

<sup>118</sup> Anderegg, R.J., Wagner, D.S., Stevenson, C.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 425, 1994.

<sup>119</sup> Johnson, R.S., Krylov, D., Walsh, K.A., *J. Mass Spectrom.*, **30**, 386, 1995

solubles ou agrégées à haute concentration, la spectrométrie de masse est avantageuse, car elle ne nécessite que des concentrations de l'ordre du micromolaire alors que la RMN nécessite des concentrations millimolaires.

La RMN est limitée à l'étude de protéines de tailles inférieures à 30 000 Da, alors que la spectrométrie de masse a permis l'étude de protéines approchant les 100 000 Da<sup>120</sup>. Il n'y a pas de limite en taille pour les études faisant intervenir la spectrométrie de masse car la protéine est clivée par la pepsine avant l'analyse. Cette observation est tout de même limitée car pour de très grandes protéines, de très nombreux peptides sont générés occasionnant des interférences dans le signal. Dans ce cas, l'utilisation de la chromatographie peut permettre de limiter les interférences en simplifiant les spectres de masse issus des digestions.

L'échelle de temps des échanges isotopiques pour des hydrogènes amides à pH neutre peut varier de quelques secondes à plusieurs mois. Les niveaux d'incorporation du deutérium dans le cas de la RMN ou de la spectrométrie de masse ne peuvent être déterminés qu'après avoir figé la réaction. Pour les analyses en RMN, l'échange isotopique est quenché en analysant la protéine dans un état structuré où les déplacements chimiques permettent l'analyse des atomes d'hydrogènes amides localisés à des liaisons peptidique précises.

Les réactions d'échange isotopique étant catalysées par les bases, le pH le plus bas coïncidant avec l'état structuré de la protéine est utilisé. C'est pour cela que les analyses en RMN des réactions d'échange sont réalisées à pH 5-6.

En combinant l'échange d'hydrogène avec la protéolyse en milieu acide directement couplé à la séparation HPLC/MS, il est possible de déterminer les vitesses d'échange sur de petits fragments peptidiques d'ions de tailles importantes, alors que la RMN même si elle permet de déterminer les vitesses d'échange des atomes d'hydrogène à des positions précises reste limitée à l'étude de protéines de petite taille.

---

<sup>120</sup> Liu, Y., Smith, D.L. *Protein. Sci.* 3. 2411, 1994.

## 4. Les applications à la biologie de la technique HXMS

### 4.1. Des travaux pionniers

Les premières applications de la technique d'échange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse ont été développées au début des années 1990. Un premier travail a été réalisé dans le but de décrire le micro-environnement de certains acides aminés de l'interleukine-2 humaine en utilisant un spectromètre de masse. Les résultats obtenus ont alors été comparés avec ceux observés par les expériences de RMN<sup>121</sup>. A la suite de ce travail, le groupe de Smith a étudié, toujours en utilisant le spectromètre de masse FAB, les vitesses d'échange des hydrogènes amides pour des segments de la bradykinine et de la chaîne  $\beta$  de l'insuline<sup>122</sup>. Ce même groupe a ensuite proposé la technique de protéolyse à la pepsine pour avoir accès aux vitesses d'échange pour les différentes régions d'une même protéine<sup>123,124</sup>.

Ces premiers travaux ont initié de nombreuses études dans le domaine des interactions non-covalentes (protéine-protéine, protéine-ligands, protéine-membranes) ainsi que dans le domaine de la dynamique (changement de conformation, structuration).

Parallèlement à ces applications, de constantes améliorations ont été apportées pour rendre la technique HXMS plus performante. Les conditions techniques d'analyse de l'échange isotopique ont été optimisées par l'introduction de l'ionisation ESI, de l'ionisation nanospray, par l'utilisation de l'ionisation MALDI. Enfin, de récents travaux visent à améliorer la précision de la détermination du marquage isotopique en utilisant la fragmentation CID.

### 4.2. Etude des interactions non-covalentes

#### 4.2.1. Etude d'interactions protéine-protéine

De nombreuses équipes ont utilisé la technique d'échange isotopique hydrogène/deutérium et la spectrométrie de masse pour l'étude des interactions protéine/protéine. Parmi ces travaux, une des premières études concernant les interactions entre peptides a été réalisée sur des peptides modèles susceptibles de former des feuillets  $\beta$ . Cette structure intermoléculaire en feuillet  $\beta$  était supposée mimer les associations entre protéines  $\beta$ -amyloïdes responsables de la maladie d'Alzheimer. Pour cette étude, l'équipe de Krause<sup>125</sup> a utilisé la spectrométrie de masse à ionisation ESI et MALDI pour caractériser la présence des feuillets  $\beta$  pour des peptides non structurés d'une part et structurés en feuillet  $\beta$  d'autre part.

<sup>121</sup> Miyano, H., Suzuki, E., Akashi, S., Furuya, M., Tsuji, T., Hirayama, K., Nagashima, N. *Anal. Sci.* **5**, 759-761, 1989.

<sup>122</sup> Thevenon-Emeric, G., Kozlowski, J., Zhang, Z., Smith, D.L. *Anal. Chem.* **2456-2458**, **64**, 1992.

<sup>123</sup> Zhang, Z., Smith, D.L. *Prot. Sci.* **2**, 522-531, 1993.

<sup>124</sup> Liu, Y., Smith, D.L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, **1**, 19-28, 1994.

<sup>125</sup> Krause, M., Janek, K., Bienert, M., Eberhard, K., *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* **14**, 1094-1104, 2000.

Un autre travail mené par Ehring concerne la détermination des zones d'interaction entre deux agonistes en utilisant l'échange inverse. Dans ce cas, c'est l'analyse du rééchange des atomes de deutérium dans l'environnement qui permet de déterminer les régions d'interactions entre les protéines. Les deux protéines agonistes sont incubées dans le D<sub>2</sub>O de manière à échanger l'ensemble des hydrogènes amides. Après interaction, les protéines sont incubées en présence d'H<sub>2</sub>O de manière à initier le rééchange de deutérium avec les hydrogènes de l'eau. Les zones de fixation entre les deux agonistes restent protégées du rééchange<sup>126</sup>.

#### 4.2.2. Etude d'interactions protéine-ligand

Un autre champ d'application de la technique HXMS est l'étude des interactions protéine/ligands. Les études menées dans ce domaine ont été réalisées pour observer l'effet sur le changement de conformation des protéines suite à la fixation d'un ligand comme l'ion Fer II<sup>127</sup> sur la protéine FUR ou lors de la fixation d'un peptide de haute affinité au domaine Src-homology-2<sup>128</sup>. L'échange isotopique hydrogène/deutérium a également été utilisé pour étudier les changements de conformation résultant de la fixation d'une protéine à un ligand, par exemple pour la calmoduline et le calcium<sup>129</sup>.

#### 4.2.3. Interactions protéine-membrane

Récemment, des études concernant l'analyse des interactions protéine-membranes ont été réalisées en utilisant la technique HXMS. L'équipe de Heck a étudié les interactions de peptides transmembranaires modèles de tailles et de séquences différentes avec des vésicules uni-lamellaires de 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine. Cette étude a démontré que la membrane des vésicules protège du solvant deutéré la partie transmembranaire des peptides<sup>130</sup>. Une autre étude a été réalisée sur la structure de la melittine. Cette protéine a été fixée à des micelles de phospholipides et étudiée en utilisant la spectrométrie de masse FT ICR. L'analyse de l'incorporation de deutérium a indiqué que la présence des micelles de DPC (dodécylphosphocholine) était responsable d'une baisse très importante de l'incorporation du deutérium dans la melittine. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés à ceux obtenus par RMN et Dichroïsme Cellulaire<sup>131</sup>, indiquant une excellente corrélation.

<sup>126</sup> Ehring, H., *Analytical Biochemistry*, 267, 252-259, 1999.

<sup>127</sup> Gonzalez de Peredo., Saint-Pierre, C., Latour, J.M., Michaud-Soret, I., Forest, E. *J. Mol. Biol.*, 310, 83-91, 2001.

<sup>128</sup> Engen, J.R., Grmeiner, W.H., Smithgall, T.E., Smith, D.L. *Biochemistry*, 38, 8926-8935, 1999.

<sup>129</sup> Nemirovskiy, O., Giblin, D.E., Gross., M.L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 711-718, 1999.

<sup>130</sup> Demmers, J.A.A., Duijn, E., Haverkamp, J., Greathouse, D.V., Koeppe, R.E., Heck, A.J.R., Killian, J.A., *J. Biol. Chem.* 276, 37, 34501-34508, 2001.

<sup>131</sup> Akashi, S., Takio, K., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 12, 1247-1253, 2001.

Des peptides transmembranaires de la protéine M2 de *Influenza A* ont également été étudiés par la technique HXMS. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un spectromètre à ionisation nanospray en utilisant des vésicules de DMPC. Comme précédemment, les résultats soulignent l'effet protecteur de la membrane des vésicules. Les vitesses d'échange des hydrogènes amides des fragments transmembranaires de la protéine baissent en présence des vésicules.

### 4.3. Etude des changements conformationnels

Différentes études ont ensuite été consacrées à l'étude des changements conformationnels de protéines de tailles importantes comme l'aldolase de muscle de lapin<sup>132</sup> (157 000 Da), l'apomyoglobine<sup>133</sup> ou encore le ferrocyclochrome C2 de *Rhodobacter capsulatus*<sup>134</sup>. L'échange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse a également été utilisé pour discriminer des protéines en fonction de leur conformation. Cette approche a été développée par l'équipe de Michael Gross, qui a utilisé 4 formes d'insuline et la spectrométrie de masse à ionisation ESI. Les différences de conformation entre ces quatre formes ont eu pour effet des différences dans l'incorporation de deutérium au cours du temps. Les profils particuliers d'incorporation du deutérium ont permis de déterminer, à partir de faibles quantités d'échantillon, les formes d'insuline présentes dans des échantillons tests<sup>135</sup>.

L'échange isotopique est également utilisé pour venir en aide aux méthodes combinatoires de production des protéines et pour vérifier si les protéines produites avaient une conformation analogue à celle des protéines naturelles. Les résultats obtenus sont très proches des méthodes orthogonales normalement utilisées pour détecter la structuration d'une protéine<sup>136</sup>. Certaines études ont pu mettre en évidence les cinétiques de dénaturation en précisant le nombre d'intermédiaires obtenus par exemple lors d'une dénaturation thermique<sup>137</sup>.

### 4.4. L'ionisation ESI et l'ionisation MALDI pour l'analyse de l'échange isotopique hydrogène/deutérium.

#### 4.4.1. L'ionisation ESI

Les premières études d'échange isotopique hydrogène/deutérium ont été réalisées à l'aide de spectromètres de masse FAB. L'introduction de l'ESI a permis une amélioration significative de la précision des résultats. Une des premières études réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse ESI a permis de caractériser des changements d'états conformationnels suite à la fixation de ligand sur un domaine SH-2 caractéristique de nombreuses kinases<sup>138</sup>.

<sup>132</sup> Zhang, Z., Post, C.B., Smith, D. *Biochemistry*, **35**, 779, 791, 1996.

<sup>133</sup> Wang, F., Tang, X.-J. *Biochemistry*, **35**, 4069-4078, 1996.

<sup>134</sup> Jaquinod, M., Guy, P., Halgand, F., Caffrey, M., Fitch, J., Cusanovich, M., Forest, E. *FEBS Letters*, **380**, 44-48, 1996.

<sup>135</sup> Ramanathan, R., Zielinski, W.L., Layloff, T., Gross, M.L. *Anal. Chem.*, **69**, 5142-5145, 1997.

<sup>136</sup> Rosenbaum, D.M., Roy, S., Hecht, M.H., *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9509-9513, 1999.

<sup>137</sup> Maier, C., Schimerlik, M.I., Deinzer, M.L. *Biochemistry*, **1999**, **38**, 1136-1143.

<sup>138</sup> Anderegg, R., Wagner, D. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1374-1377, 1995.

Le principal avantage de l'utilisation d'une ionisation ESI pour l'analyse des réactions d'échange isotopique est la possibilité de coupler directement cette source à un système HPLC. Le couplage LC-ESI-MS permet la simplification du signal obtenu lors de l'analyse de mélanges de digestion complexes. Un autre avantage est de pouvoir utiliser librement des sels, des tampons et certains détergents dans le mélange réactionnel sans que cela influe sur la qualité du signal. L'utilisation de l'HPLC permet également de se débarrasser de l'ensemble des hydrogènes échangeables des chaînes latérales des acides aminés ce qui élimine les problèmes de perte de deutérium résultant de l'échange rapide.

Une des limitations de l'utilisation du couplage LC-ESI-MS est la quantité relativement importante de matériel nécessaire à l'analyse. La plupart des études ont été réalisées avec des colonnes de 1 à 2 mm de diamètre interne couplées avec des sources ESI standard. Dans cette configuration, il est nécessaire de disposer d'environ 500 picomoles de protéine ou de peptide, ce qui est largement supérieur aux quantités utilisées en MALDI (5 à 10 picomoles). Par ailleurs, la digestion à la pepsine immobilisée a été optimisée dans le cas du couplage LC-MS en greffant l'enzyme directement à l'intérieur d'une colonne sur la ligne de transfert des échantillons vers la source d'ionisation<sup>139</sup>.

Les développements du couplage LC-ESI-MS à nano débit ont amélioré significativement la sensibilité en réduisant l'échelle du système de chromatographie. La sensibilité de l'analyse ESI-MS varie en fonction de la concentration de l'analyte. Ainsi, la réduction du diamètre interne de la colonne HPLC de 1 mm à 0.1 mm permet de réduire la quantité d'échantillon nécessaire de 100 fois. L'utilisation de l'HPLC capillaire pose cependant des problèmes à l'analyse par HXMS en raison des très faibles débits utilisés (temps de transfert lents, volumes morts importants...). Les temps de transfert longs posent des problèmes de justesse des mesures d'incorporation du deutérium en raison des phénomènes de rééchange inévitables pour du matériel difficile à refroidir. Cependant Wang et al., ont optimisé un système faisant intervenir une colonne contenant de la pepsine immobilisée et une colonne C18 capillaire pour diminuer au maximum le temps d'analyse et ont obtenu des contrôles de rééchange comparables à ceux obtenus par des systèmes HPLC de tailles supérieures<sup>140</sup>.

#### 4.4.2. L'ionisation MALDI

L'utilisation de l'ionisation de type MALDI pour la détermination des vitesses d'échange des protons amides a débuté en 1998<sup>141,60</sup>. Une des premières études menées par Mandell et al. a utilisé la spectrométrie de masse MALDI pour mesurer les vitesses d'échange d'une protéine kinase AMPc dépendante<sup>142</sup>. La spectrométrie de masse MALDI a également été utilisée pour étudier les changements de conformation de l'insuline adsorbée sur un support hydrophobique méthylé<sup>143</sup>. La spectrométrie de masse MALDI ToF a été également utilisée pour étudier l'interaction entre la thrombine et un fragment

<sup>139</sup> Wang, L., Pan, H., Smith, D.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5, 425-433; 1994.

<sup>140</sup> Wang, L., Smith, D., *Anal. Biochem.* 314, 46-53, 2003.

<sup>141</sup> Figueroa, I.D., Torres, O., Russell, D.H. *Anal. Chem.* 1998, 70, 4527-4533.

<sup>142</sup> Mandell, J.G., Falick, A.M., Komives, E.A. *Anal. Chem.* 70, 3897, 1998.

<sup>143</sup> Buijs J., Costa Vera, C., Ayala E., Steensma, E., Hakansson, P., Oscarsson, S., *Anal. Chem.* 3219-3225, 1999.

de la thrombomoduline<sup>144</sup>. Ces travaux ont mis en évidence les avantages du MALDI, comme l'élimination de l'étape d'HPLC avant l'analyse, la possibilité d'analyser des échantillons en plus faible quantité, une meilleure résolution et un temps d'analyse plus court.

Une technique utilisant l'échange isotopique et la spectrométrie de masse MALDI a été développée pour étudier la stabilité thermodynamique des protéines. Cette technique appelée SUPREX<sup>145</sup> permet l'analyse de la stabilité thermodynamique des protéines en utilisant des quantités 1000 fois inférieures aux quantités nécessaires pour les études par des méthodes conventionnelles de spectroscopie en ne nécessitant que 10 picomoles de matériel<sup>146</sup>.

Le rééchange des atomes de deutérium est un des principaux problèmes pour la mesure des constantes de vitesse d'échange des hydrogènes amides des protéines. Jusqu'à présent, il était admis que la spectrométrie de masse ESI permettait l'obtention des taux de rééchange les plus bas. Cependant de nombreux travaux d'optimisation concernant le mode de dépôt ou la composition du solvant de la matrice ont permis d'améliorer le taux de rééchange pour la technique utilisant l'ionisation MALDI. Par exemple, une amélioration significative du taux de rééchange a été obtenue par Kipping et al. en utilisant la technique des couches minces lors de la préparation de l'échantillon<sup>147</sup>.

#### 4.5. Fragmentation CID et échange isotopique hydrogène/deutérium

La digestion à la pepsine des protéines incubées dans un solvant deutéré permet d'obtenir des informations topologiques sur l'incorporation de deutérium avec une précision de l'ordre de 5 à 10 acides aminés. Certaines études nécessitent l'amélioration de cette précision pour obtenir le détail de l'incorporation du deutérium à l'acide aminé près. L'utilisation de la fragmentation CID (Collision Induced Dissociation) pour analyser les peptides issus de la digestion à la pepsine pourrait permettre d'obtenir une résolution à l'acide aminé près, identique à celle de la RMN.

En ESI, la fragmentation des protéines implique de nombreuses collisions avec les molécules du gaz de nébulisation (azote) et les molécules du solvant évaporé. De plus, la demi-vie moyenne des ions activés à l'intérieur d'un hexapole ou à l'intérieur d'un quadropole à guide d'ions (comme dans une cellule ICR) est comprise entre 10 et 100 millisecondes. Pendant ces quelques dizaines de millisecondes, les ions métastables peuvent potentiellement produire des échanges H/D intra et intermoléculaires dans la phase gazeuse avant la dissociation. De plus, un des modèles largement accepté pour la fragmentation des peptides en phase gazeuse propose la notion de proton mobile comme force d'entraînement du processus de dissociation<sup>148</sup>. Une redistribution des isotopes au sein des peptides va évidemment compromettre la qualité des mesures des vitesses d'échange par ESI-CID-MS et dans les cas extrêmes rend les données inexploitable.

<sup>144</sup> Mandell, J.G., Baerga-Ortiz, A., Akashi, S., Takio, K., Komives, E.A. *J. Mol. Biol.*, 306, 575-589, 2001.

<sup>145</sup> Ghaemaghani, S., Fitzgerald, M.C., Oas, T.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8296-8301, 2000.

<sup>146</sup> Powell, K.D., Fitzgerald, M.C. *Anal. Chem.*, 73, 14, 3300-3304, 2001

<sup>147</sup> Kipping, M., Schierhorn, A. *J. Mass Spectrom.* 38, 271-276, 2003.

<sup>148</sup> Wysochi, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L., Brei, L.A., *J. Mass Spectrom.* 35, 1399, 2000.

De nombreuses études concernant le phénomène de repositionnement intramoléculaire des deutériums (« scrambling ») aux positions amide sont menées et l'utilisation de la fragmentation CID est, pour le moment, sujette à caution. Anderegg et al., qui ont utilisé le CID MS/MS pour étudier l'échange d'hydrogène dans des peptides formant des hélices, ont observé une augmentation de l'incorporation de deutérium aux extrémités des hélices<sup>149</sup>. Ces résultats impliquent qu'il est possible d'analyser par spectrométrie de masse l'incorporation du deutérium à la liaison peptidique près en utilisant le CID MS/MS. Cependant d'autres études montrent un fort « scrambling » des deutériums au cours de l'étape CID<sup>150,151,152</sup>. Le groupe de Smith avait établi en utilisant quatre peptides modèles du cytochrome c et en comparant les résultats obtenus avec ceux de la RMN, que la fragmentation CID pouvait être utilisée pour la détermination des constantes de vitesse d'échange en prenant en compte uniquement les ions fragments b<sup>153</sup>. Une autre étude utilisant un écrémeur capillaire couplé à un CID analysé par FTICR MS a caractérisé la structure de l'ubiquitine par échange isotopique hydrogène/deutérium en montrant que les résultats obtenus étaient similaires à ceux décrits par la cristallographie rayon X ou par la RMN<sup>154,155</sup>. Le groupe de Hakansson a étudié la migration intermoléculaire et intramoléculaire des hydrogènes amides pendant l'ionisation électrospray. Des peptides modèles penta-alanine, penta-phenylalanine et penta-acide aspartique ont été étudiés à l'aide de deux cellules de collision consécutives et d'un analyseur FTICR. Cette étude indique que les échanges en phase gazeuse dans la région de haute pression entre capillaire et écrémeur provoquent une perte d'information sur l'incorporation du deutérium. Cette perte d'information est liée à la séquence du peptide étudié ainsi qu'à la position de l'acide aminé par rapport aux extrémités N et C terminales<sup>156</sup>.

Une étude récente de McLafferty et al. suggère que le scrambling d'hydrogènes qui se produit à l'intérieur du cytochrome c est très important lorsque celui-ci est activé par une irradiation SORI (Sustained Off Resonance Irradiation) dans une cellule ICR<sup>157</sup>.

Kraus et al., ont utilisé un spectromètre de masse à piège ionique ESI-MS/MS pour analyser l'incorporation du deutérium dans de petits peptides. Cette étude indique que les résultats ne sont pas affectés par le phénomène de repositionnement d'hydrogènes<sup>158</sup>. De même Demmers et col. n'ont pas détecté de scrambling d'hydrogène significatif lors de la fragmentation des peptides transmembranaires dans la cellule de collision d'un spectromètre de masse Q-TOF<sup>159,160</sup>.

Deng et al. ont utilisé la fragmentation CID à basse énergie en utilisant un spectromètre de masse à piège ionique pour déterminer le contenu en deutérium de fragments de digestion à la pepsine du

<sup>149</sup> Anderegg, R.J., Wagner, D.S., Stevenson, C.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 425-433, 1994.

<sup>150</sup> Johnson, R.S., Krylov, D., Walsh, K.A. *J. Mass Spectrom.* **30**, 386-387, 1995.

<sup>151</sup> Harrison, A.G., Yalcin, T. *Int. J. Mass. Spectrom.* **30**, 386-387, 1995.

<sup>152</sup> McLafferty, F.W., Guan, Z., Haupts, U., Wood, T.D., Kelleher, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4732-4740.

<sup>153</sup> Deng, Y., Pan, H., Smith, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1966-1967, 1999.

<sup>154</sup> Akashi, S., Naito, Y., Takio, K. *Anal. Chem.* **71**, 4974-4980.

<sup>155</sup> Eyles, S.J., Speir, J.P., Kruppa, G.H., Gierasch, L.M., Kaltashov, I.A. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 495-500, 2000.

<sup>156</sup> Buijs, J., Hagman, C., Hakanson, K., Richter, J.H., Hakanson, P., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 410-419, 2001.

<sup>157</sup> McLafferty, F.W., Guan, Z.Q., Haupts, U., Wood, T.D., Kelleher, N.L. *J. Am. Spectrom.* **120**, 4732, 1998.

<sup>158</sup> Kraus, M., Janek, K., Bienert, M., Krause, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1094, 2000

<sup>159</sup> Demmers, J.A., Haverkamp, J., Greathouse, D.V., Koeppe, R.E., Heck, A.J., Killian, J.A. *J. Biol. Chem.* **276**, 34501, 2001.

<sup>160</sup> Demmers, J.A., Haverkamp, J., Heck, A.J., Koeppe, R.E., Killian, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 3189, 2000.

cytochrome c en conditions d'échange figé<sup>161</sup>. Dans cette étude, une analyse comparée des données de CID-MS et des données obtenues par la RMN <sup>1</sup>H indique que le repositionnement d'hydrogène n'affecte pas les ions fragments de type b, mais affecte ceux de type y. Ces résultats ont été confirmés par un autre groupe<sup>162</sup>.

L'ensemble de ces observations indique que le phénomène de repositionnement d'hydrogènes dépend directement des variables expérimentales. Il semble qu'une des variables déterminantes soit l'énergie d'activation des ions. Dans la phase gazeuse, l'augmentation de l'énergie interne des ions peptides diminue considérablement les constantes de vitesse d'échange H/D<sup>163</sup> et probablement, les échanges intramoléculaires. Ainsi, si l'ion peptide est activé rapidement, résultat de quelques collision à hautes énergie alors le phénomène de repositionnement d'hydrogène devrait être minimal. Par contre, si l'activation de l'ion précurseur est lente, le phénomène de repositionnement doit être plus important. Les phénomènes d'activations très lents, comme le SORI<sup>164</sup>, sont supposés provoquer un repositionnement d'hydrogènes très important avant la fragmentation comme le suggèrent de récentes observations<sup>165</sup>. La plupart des autres analyseurs de masse utilisent des énergies d'activations plus importantes<sup>166</sup> et doivent donc permettre de limiter la perte d'information inhérente au phénomène de repositionnement intramoléculaire des hydrogènes.

L'utilisation de la fragmentation CID pour améliorer la précision des informations topologiques d'incorporation du deutérium dans une protéine est l'objet d'une recherche intense. Même si elle apparaît séduisante, l'utilisation de cette technique pour obtenir des mesures de vitesses d'échange devra faire l'objet de nombreux contrôles pour conduire à des résultats exploitables.

---

<sup>161</sup> Deng, Y., Pan, H., Smith, D.L., *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1966, 1999

<sup>162</sup> Kim M.Y., Maier, C.S., Reed, D.J., Deinzer, M.L. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9860, 2001.

<sup>163</sup> Kaltashov, I.A., Doroshenko, V.M., Cotter, R.J. *Proteins*, 28, 53, 1997.

<sup>164</sup> McLuckey, S.A., Goeringer, D.E. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9560, 2001

<sup>165</sup> McLafferty, F.W., Guan, ZQ., Haupts, U., Wood, T.D., Kelleher, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 4732, 1998.

<sup>166</sup> McLuckey, S.A., Goeringer, D.E. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9560, 2001



# Deuxième partie

Etude du Complexe F1 ATPase  
par échange isotopique  
hydrogène/deutérium  
et spectrométrie de masse



# Chapitre 3

## Le complexe ATP synthase: Un moteur moléculaire pour la production de l'ATP.

### 1. L'ATP synthase

#### 1.1. Présentation de l'ATP synthase

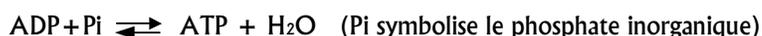
L'ATP (Adénosine TrisPhosphate) est une molécule riche en énergie qui fut découverte dès 1929<sup>167</sup>. Elle est constituée d'adénine liée à un ribose par une liaison N-osidique. Ce ribose est phosphorylé sur son carbone C5. L'ATP comporte trois radicaux phosphoriques liés par liaison anhydride d'acide, liaison très riche en énergie (énergie potentielle chimique facile à libérer ou transférer).

Le rôle de l'ATP est de mettre en réserve l'énergie pour la restituer dans la plupart des réactions biochimiques (transport actif, contraction musculaire, biosynthèse de macromolécules...). Une partie de l'ATP est synthétisée par certaines voies métaboliques comme la glycolyse, mais 90% de la synthèse s'effectue par l'intermédiaire d'une enzyme appelée F1Fo ATPase ou ATP synthase. Cette enzyme est localisée dans la membrane interne mitochondriale ou chloroplastique des cellules eucaryotes ou dans la membrane plasmique des bactéries.

L'ATP synthase est un complexe hétéro-oligomérique formé de deux secteurs principaux :

- Un secteur catalytique hydrophile F1
- Un secteur hydrophobe Fo assurant l'ancrage du complexe dans la membrane.

La synthèse d'ATP est une réaction réversible se déroulant de la manière suivante :



La formation d'une mole d'ATP exige au minimum 30 kJ. En 1961, Peter Mitchell avança une théorie<sup>168</sup> sur la synthèse d'ATP dans les mitochondries qui fait aujourd'hui l'unanimité. Il s'agit de la théorie chimiosmotique qui lui a valu le prix Nobel en 1978. L'ATP synthase est considérée comme une pompe à protons. Au cours de la respiration, la circulation des électrons dans la chaîne respiratoire s'accompagne d'un mouvement de protons (H<sup>+</sup>) qui crée un gradient de pH de part et d'autre de la

<sup>167</sup> Lohmann, K. J. *Naturwissenschaften*, 1929.

<sup>168</sup> Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-148, 1961.

membrane interne des mitochondries (de l'espace intermembranaire où la concentration des  $H^+$  est très forte vers la matrice). Ce flux de protons transite par la partie membranaire de l'ATP synthase et active cette dernière. Il y a alors synthèse d'ATP qui s'accompagne d'un transfert de  $H^+$  de l'espace intermembranaire vers la matrice. Ce processus se nomme la phosphorylation oxydative.

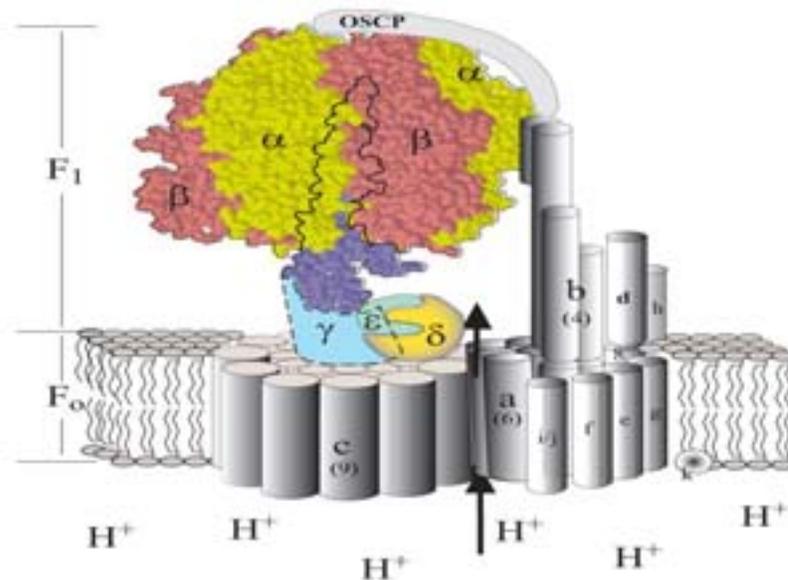


Figure 3.1. Représentation schématique de l'organisation structurale de l'ATP synthase bactérienne

L'ATP synthase est une des enzymes les plus étudiées de par son importance dans la cellule. Un de ces modèles structure/fonction a d'ailleurs valu à Boyer et Walker le prix Nobel de chimie en 1997. Toutefois de nombreuses zones d'ombre restent à éclaircir. Nous nous sommes intéressés à l'ATP synthase mitochondriale de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). L'enzyme de la levure est proche de celle des mammifères et constitue donc un système modèle. La levure est un organisme unicellulaire eucaryote formé d'une paroi rigide, d'un noyau délimité par une membrane nucléaire, d'une grande vacuole et d'un cytoplasme contenant différents organites et inclusions dont les mitochondries, siège de la synthèse de l'ATP.

## 1.2. Secteurs F1 et Fo des ATP synthases

### 1.2.1. Le secteur F1 :

Le secteur MF1 chez levure (370 kDa) est constitué de cinq sous-unités différentes nommées dans l'ordre de leurs masses moléculaires décroissantes :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . Leur stœchiométrie respective est 3 : 3 : 1 : 1 : 1. Il comprend la tête  $(\alpha\beta)_3$  et la tige  $(\gamma\delta\epsilon)$ .

La structure primaire de  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  est très conservée d'un organisme à l'autre, mais celle de  $\delta$  et  $\epsilon$  l'est moins.

#### 1.2.1.1. La tête catalytique $(\alpha\beta)_3$ :

La tête catalytique a fait l'objet de nombreuses études car le secteur auquel elle appartient est le plus facile à isoler et à manipuler. Les principales avancées dans la compréhension de la structure de la tête ont essentiellement été obtenues par microscopie électronique, diffraction des rayons X après cristallisation du secteur F1, et par mutagenèse ou modification chimique dirigée.

De nombreux clichés de microscopie électronique d'ATP synthases mitochondriales ont été obtenus<sup>169,170</sup>. La tête est constituée de six sous-unités disposées selon une symétrie quasi hexagonale autour d'une cavité centrale totalement ou partiellement obstruée. Aujourd'hui, les structures de la tête catalytique d' *E. coli*<sup>171,172</sup> des mitochondries de levure<sup>173</sup>, de bœuf<sup>174,175</sup> ou de rat<sup>176</sup> et du chloroplaste d'épinard<sup>177</sup> sont connues. Les sous unités  $\alpha$  sont des protéines de 51.2 kDa et les sous unités  $\beta$  de 47.8 kDa. La comparaison des séquences des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  indique que ces protéines sont apparentées (25% d'identité). La duplication d'un gène ancestral pourrait être à l'origine de ces deux protéines<sup>178</sup>. Ces deux sous unités sont très conservées d'une espèce à l'autre.

La première structure 3D du secteur BMF<sub>1</sub> de cœur de bœuf a été résolue par Abrahams et coll. en 1994<sup>8</sup>. Cette structure est à la base de toutes les descriptions des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces sous-unités se replient de manière similaire. L'ensemble  $(\alpha\beta)_3$  forme un hexamère dont la partie centrale interagit avec la sous unité  $\gamma$ .

Six sites de fixation potentiel aux nucléotides sont observés à l'interface des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  :

- Trois sites sont dits non catalytiques, non échangeables ou coopératifs. Ils lient très fortement les nucléotides adényliques<sup>179,180</sup>. La spécificité de ces sites pour les nucléotides ADP et ATP,

<sup>169</sup> Böttcher, B., Gräber, P. The structure of H(+)-ATP synthase from chloroplasts and its subcomplexes as revealed by electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1458** (2-3), 404-416, 2000

<sup>170</sup> Karrasch, S., Walker, J.E. Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **290**, (2), 379-384, 1999.

<sup>171</sup> Hausrath, A.C., Gruber, G., Matthews, B.W., Capaldi, R.A. Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia Coli* F(1) ATPase revealed by a 4.4 Å resolution map obtained by X ray crystallography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 13697-13702, 1999.

<sup>172</sup> Rodger, A.J., Wilce, M.C. Structure of the  $\gamma$ - $\epsilon$  complex of the ATP synthase. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1051-1054, 2000.

<sup>173</sup> Stock, D., Leslie, A.G., Walker, J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, **286**, 1700-1705, 1999.

<sup>174</sup> Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628, 1994.

<sup>175</sup> Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-1061, 2000

<sup>176</sup> Bianchet, M.A., Hullihen, J., Pedersen, P.L., Amzel, L.M. The 2.8 Å structure of rat liver F1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11065-11070, 1998.

<sup>177</sup> Groth, G., Pohl, E. The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2, 1345-1352, 2001

<sup>178</sup> Walker, J.E., Saraste, M., Gay, N.J. E. Coli F1-ATPase interacts with a membrane protein component of a proton channel. *Nature*, **298**, 5877, 867-869, 1982.

<sup>179</sup> D'Annunzio, S.D. ATP causes a large change in the conformation of the isolated alpha subunit of *Escherichia coli* F1 ATPase. *J. Biol. Chem.* **255**, **24**, 11857-11860, 1980.

provient de l'existence de plusieurs liaisons hydrogène spécifiques, notamment entre l'azote N<sub>3</sub> de l'adénine et le groupe hydroxyle de βTyr368. Tous les sites de fixation se trouvent à l'interface αβ.

- Trois sites sont dits catalytiques : ils peuvent lier et hydrolyser l'ATP. Ces trois sites ont pu être localisés dans les sous-unités β.

L'asymétrie des sites catalytiques est nécessaire dans le modèle de catalyse par changement d'affinité proposé par Boyer. L'asymétrie résulte probablement de la stœchiométrie originale et de l'organisation du complexe catalytique.

### 1.2.1.2. La tige centrale

La structure cristalline à haute résolution du secteur BMF1 de l'ATP synthase de cœur de bœuf a été obtenue par l'équipe de Walker à 2.4 Å de résolution<sup>181</sup>. La fonction de la tige est de transmettre l'énergie entre le canal à protons dans la membrane et les sites catalytiques des sous-unités β liant les nucléotides via des changements de conformation dans les protéines formant la tige. Elles se compose des sous-unités γ, δ et ε.

#### *La sous-unité γ*

La sous-unité γ a une longueur totale de 114 Å depuis l'extrémité C-terminale jusqu'à la plante du pied. La sous-unité γ intervient dans l'assemblage du complexe car une souche de levure présentant des délétions dans le gène de structure de la sous-unité γ ne possède pas de secteur F1 assemblé<sup>182</sup>. La sous-unité γ intervient dans le couplage énergétique. Chez *E. Coli*, les revertants isolés pour la mutation γMet23 qui altère la conduction des protons à travers Fo<sup>183</sup> présentent des mutations compensatoires dans la région C-terminale γ242-280, mettant en évidence la proximité entre les extrémités N et C terminales de la protéine, mais aussi son rôle dans le couplage énergétique<sup>184</sup>. Enfin le rôle de la sous-unité γ dans la catalyse a été montré par la mutation γGln255 → Glu qui n'affecte pas la conduction des protons mais réduit considérablement le « turn over » de l'enzyme<sup>185</sup>. La proximité entre γGln255 et les sites catalytiques confirme le rôle de ce résidu dans la catalyse.

---

<sup>180</sup> Lee, J.H., Garboczi, D.N., Thomas, P.J., Pedersen, P.L. Mitochondrial ATP synthase. cDNA cloning amino acid sequence, overexpression, and properties of the rat liver alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **265**, **8**, 4664-4669, 1990.

<sup>181</sup> Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-1061, 2000.

<sup>182</sup> Paul, M.F., Ackerman, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J., Tzagolof, A., Ackermann, S. Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of atp3 mutants. *J. Biol. Chem.* **269**, **42**, 26158-26164, 1994.

<sup>183</sup> Shin, K., Nakamoto, R.K., Maeda, M., Futai, M. FOF1-ATPase gamma subunit mutations perturb the coupling between catalysis and transport. *J. Biol. Chem.* **267**, **29**, 208, 20835-20839, 1992.

<sup>184</sup> Nakamoto, R.K., Maeda, M., Futai, M., The gamma subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase. Mutations in the carboxyl-terminal region restore energy coupling to the amino-terminal mutant gamma Met-23 lys. *J. Biol. Chem.* **268**, **2**, 867-872, 1993.

<sup>185</sup> Nakamoto, R.K., Al Shawi, M.K., Futai, M. The ATP synthase gamma subunit. Suppressor mutagenesis reveals three helical regions involved in energy coupling. *J. Biol. Chem.* **270**, **23**, 14042-14046, 1995.

## La sous-unité $\delta$

La sous-unité  $\delta$  mitochondriale d'environ 15 Kda est constituée de 138 et 146 acides aminés respectivement chez la levure et le bœuf. La sous-unité  $\delta$  de l'ATP synthase de levure a été isolée et séquencée<sup>186</sup>. La sous-unité  $\delta$  forme un complexe avec la sous unité  $\epsilon$  chez la levure<sup>187</sup>, chez le bœuf<sup>188</sup>, et le porc<sup>189</sup>. La comparaison des séquences primaires des sous-unités  $\delta$  mitochondriales et des sous unités homologues bactérienne et chloroplastique ( $\epsilon$ ), a permis de montrer l'homogénéité de cette famille<sup>190,191</sup>. Il existe respectivement 60 % et 26 % d'identité de séquence entre les sous-unités  $\delta$  de bœuf et de levure et l'homologue bactérien, la sous-unité  $\epsilon$  d' *E. Coli*. Les régions présentant le plus de similitudes sont situées au niveau des 90 premiers acides aminés. Une sous-unité constituée seulement des 80 premiers résidus et de trois acides aminés additionnels provenant du vecteur de construction, permet de former une ATP synthase fonctionnelle. Toutefois, une protéine ne contenant que les 73 premiers résidus, ne permet plus de reconstituer une enzyme active<sup>192</sup>. Il a été montré que l'amputation du premier brin  $\beta$  n'altérerait pas l'interaction entre les secteurs F1 et Fo<sup>193</sup>. Le rôle de la sous-unité  $\delta$  ou de son homologue bactérien  $\epsilon$  est crucial dans le fonctionnement de l'ATP synthase tant au niveau de l'assemblage des deux secteurs que du couplage énergétique.

## La sous unité $\epsilon$

La sous-unité  $\epsilon$  de levure est une petite protéine de 61 résidus (6612 Da), la plus petite des sous unités du secteur F1 de l'ATP synthase<sup>194</sup>. Elle est spécifique aux mitochondries. A ce jour, les séquences de  $\epsilon$  chez quinze organismes différents sont connues. Une étude par alignement de séquence a montré que 24 résidus, W(R/K)X<sub>5</sub>YX<sub>2</sub>(Y/F)X<sub>3</sub>(C/A)X<sub>4</sub>RX<sub>3</sub>K, appelé motif ATP5E et situé dans la partie N-terminale est conservé. La sous unité  $\epsilon$  est très basique et une prédiction de structure secondaire est en faveur de deux hélices  $\alpha$  reliées par une petite boucle ; le motif ATP5E semble enfoui.

<sup>186</sup> Giraud, M.F., Velours, J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the F1 delata subunit, sequence and disruption of the structural gene. *Eur. J. Biochem.* **222**, **3**, 851-859, 1994.

<sup>187</sup> Giraud, M.F. Etude de la sous unité  $\delta$  de l'ATP synthase mitochondriale de la levure *Saccharomyces cerevisiae*: Purification de la protéine, clonage et disruption du gène de structure, surexpression de la protéine chez *Escherichia coli*. **Thèse n°434 université de Bordeaux II, 1996.**

<sup>188</sup> Orris, G.L., Runswick, M.J., Collinson, I.R., Miroux, B., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Walker, J.E. The  $\delta$  and  $\epsilon$  subunits of bovine F1-ATPase interact to form a heterodimeric subcomplex. *Biochem.J.* **314**, 695-700, 1996.

<sup>189</sup> Penin, F., Deleage, G., Gagliardi, D., Roux, B., Gautheron, D.C. Interaction between  $\delta$  and  $\epsilon$  subunits of F1-ATPase from pig heart mitochondria. Circular dichroism and intrinsic fluorescence of purified and reconstituted  $\delta\epsilon$  complex. *Biochemistry*, **29**, 9358-9364, 1990.

<sup>190</sup> Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Northrop, F.D., Powel, S.J., Runswick, M.J., Saraste, M., Tybulewicz, V.L. Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *J. Mol. Biol.* **184**, **4**, 677-701, 1985.

<sup>191</sup> Uhlin, U., Cox, G.B., Guss, J.M. Crystal structure of the epsilon subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure*, **5**, 1219-1230, 1997.

<sup>192</sup> Kuki, M., Noumi, T., Maeda, M., Amemura, A., Futai, M. Functional domains of epsilon subunit of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase (FOF1). *J. Biol. Chem.* **263**, **33**, 17437-17442, 1988.

<sup>193</sup> Jounouchi, M., Takeyama, M., Noumi, T., Moriyama, Y., Maeda, M., Futai, M. Role of the amino terminal region of the epsilon subunit of *Escherichia coli* H(+)-ATPase (FoF1). *Arch. Biochem. Biophys.* **292** (1), 87-94, 1992.

<sup>194</sup> Arselin, G., Gandar, J.C., Guerin, B., Velours, J. Isolation and complete amino acid sequence of the mitochondrial ATP synthase epsilon-subunit of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, **2**, 723-727, 1991.

Le clonage, la caractérisation et la localisation sur le chromosome 20q13.3 du gène humain viennent d'être effectués. Cette étude révèle également l'existence d'un pseudogène ATP5EP1<sup>195</sup>. L'expression hétérologue de  $\epsilon$  de levure, chez *E. Coli*, est délicate car les protéases bactériennes dégradent rapidement la protéine hétérogène même fusionnée à la MBP ou la GST<sup>196</sup>. Ces problèmes se retrouvent pour la surexpression de  $\epsilon$  de bœuf et pour  $\epsilon$  chez *E. Coli*.

La proximité de  $\epsilon$  et  $\gamma$  dans BMF1 a été montrée par pontage chimique<sup>197</sup>. La sous-unité  $\epsilon$  mitochondriale n'est pas indispensable à l'assemblage du complexe F1Fo, mais une souche de levure dont le gène de structure ATP15 a été perturbé est incapable de pousser sur un substrat non fermentable, elle n'est plus compétente pour les phosphorylations oxydatives. La dissipation du flux de protons constatée dans cette souche peut être colmatée par addition d'oligomycine<sup>198</sup>.

Dans la structure du BMF1 inhibé par le DCCD, la sous-unité  $\epsilon$  est visible et interagit avec les sous-unités  $\gamma$  et  $\delta$ . Sa structure présente une hélice  $\alpha$  ( $\epsilon$ 11-24) que nous appellerons h2, et deux petites hélices h1 ( $\epsilon$ 3-7) et h3 ( $\epsilon$ 28-37) séparées par deux courtes boucles<sup>199</sup>. Les deux petites hélices ne sont pas des hélices  $\alpha$ . L'hélice h1 est formée d'une succession de 4 coudes  $\beta$  de type IV, l'hélice h3 d'une suite de 7 coudes  $\beta$  de type IV et de 2 de type I. Les trois résidus de l'extrémité C-terminale ( $\epsilon$ 48-50) ne sont pas visibles sur les cartes de densité électronique.  $\epsilon$ Trp4 est enfoui dans une poche hydrophobe délimitée par  $\epsilon$ Tyr3,  $\epsilon$ Tyr11,  $\epsilon$ Tyr14, en contact avec les sous-unités  $\delta$  et  $\gamma$ . La partie N-terminale s'insère dans une fissure peu profonde entre les deux domaines de  $\delta$  : elle est bordée par l'hélice  $\alpha$ 2, la connexion interdomaine et les boucles interbrins du sandwich. Un brin ( $\epsilon$ 43-47) dans la région C-terminale s'associe antiparallèlement au brin 3 de la sous-unité  $\gamma$ , étendant ainsi le feuillet central du repliement de Rossman. 45% de la surface de  $\epsilon$  est enfouie dans le complexe  $\gamma\delta\epsilon$  et 60% des surfaces d'interaction ont un caractère hydrophobe. Le rôle de la sous-unité  $\epsilon$  semble être plus structural que fonctionnel : la stabilisation du pied de la tige. L'absence d'une telle protéine dans l'ATP synthase bactérienne ou de chloroplastes peut expliquer l'instabilité de l'association  $\gamma\delta$ .

### 1.2.2. Le secteur Fo :

Le secteur MFo de levure (210 KDa) s'assemble à partir de huit sous-unités différentes. Il est constitué du bras (OSCP, 4, d, h) et de la base (9<sub>9-12</sub>, 6, 8, f). Comme nous le verrons par la suite, la stœchiométrie de la sous-unité 9 est assez variable (9<sub>9-12</sub>). Le secteur EFo est plus simple. Il peut être isolé

<sup>195</sup> Tu, Q., Yu, L., Zhang, P., Zhang, M., Zhang, H., Jiang, J., Chen, C., Zhao, S. Cloning, characterisation and mapping of the human ATP5E gene, identification of pseudogene ATP5EP1, and definition of the ATP5E motif. *Biochem. J.* **347**, 17-21, 2000.

<sup>196</sup> Chaignepain, S. La sous-unité  $\epsilon$  de l'ATP synthase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*: exploration de différents systèmes d'expression chez *Escherichia Coli* et tentative de purification de la protéine exprimée. DEA Biologie Santé, unpublished results.

<sup>197</sup> Baird, B.A., Hammes, G.G. Chemical cross-linking studies of beef heart mitochondrial coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* **252**, 13, 4743-4748, 1977.

<sup>198</sup> Guelin, E., Chevallier, J., Rigoulet, M., Guérin, B., Velours, J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation and disruption of the ATP $\epsilon$  gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 161-167, 1993.

<sup>199</sup> Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-1061, 2000.

sous forme d'agrégats constitués de seulement trois protéines nommées a,b et c<sup>200</sup>. Les sous-unités a et c sont des protéines hydrophobes formées de plusieurs hélices transmembranaires<sup>201,202</sup>. Cependant, les protéines du secteur Fo ne sont pas obligatoirement des protéines membranaires. Les bras de EFO et de CFO n'ont pas la même constitution que celui de MFO (OSCP, 4, d, h). Le bras (OSCP, 4, d, h) fonctionne certainement comme un stator assurant un lien rigide entre la tête catalytique et la sous-unité a de FO en respectant la tige centrale mobile. La base membranaire (C9-12, a, 8, f) est la composante la moins bien connue car ses sous-unités sont partiellement ou entièrement membranaires, ce qui les rend plus difficiles à étudier. Aujourd'hui, l'obtention de la structure cristalline d'un secteur F1 associé à une partie de secteur Fo est du domaine du possible<sup>203</sup>. La résolution encore faible (3.9 Å) d'un tel sous-complexe d'ATP synthase de levure est en cours d'amélioration. Les sous-unités 9 et 6 sont souvent appelées respectivement c et a comme leurs homologues bactériens. Chez la levure, cette partie contient quatre protéines, c et a qui forment le canal à protons et 8 et f dont la fonction est mal connue. Chez *E. coli*, les trois sous-unités c, a et b constituent une structure minimale pour la conduction des protons<sup>204</sup>, a et c formant la base et b le bras.

## 1.2. Fonctionnement des ATP synthases

### 1.2.1. L'ATP synthase : double moteur rotatif

Dès 1975, Boyer a proposé que seuls des changements conformationnels, induits par la translocation de protons au niveau du secteur Fo et transmis jusqu'aux sites catalytiques, pouvaient expliquer les changements d'affinité de l'enzyme. Ces changements conformationnels ont été mis en évidence pour la première fois par Penefsky en 1985<sup>205</sup>.

En fait, l'ATP synthase est un double moteur moléculaire rotatif. Le couplage est, en effet, d'origine mécanique : Fo est un moteur, une turbine entraînée par le flux de protons et F1 est un second moteur actionné par l'hydrolyse de l'ATP<sup>206</sup>. Ces deux moteurs ont un axe commun. Le flux de protons fait tourner le rotor dans le sens des aiguilles d'une montre (lorsque l'observateur regarde de Fo vers F1), et l'hydrolyse de l'ATP fait tourner ce même rotor dans le sens inverse. L'ATP synthase est le plus petit

<sup>200</sup> Hoppe, J., Sebald, W. The proton conducting FO-part of bacterial ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 768 (1), 1-27, 1984.

<sup>201</sup> Cox, G.B., Fimmel, A.L., Gibson, F. Hatch, L. The mechanism of ATP synthase: a reassessment of the functions of the b and a subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, 849, (1), 62-69, 1986.

<sup>202</sup> Lewis, M.J., Chang, J.A., Simoni, R.D. A topological analysis of subunit alpha from Escherichia coli F1Fo-ATP synthase predicts eight transmembrane segments. *J. Biol. Chem.* 265 (18), 10541-10550, 1990.

<sup>203</sup> Stock, D., Leslie, A.G., Walker, J.E. Molecular Architecture of the rotary Motor in ATP synthase. *Science*, 286, 1700-1705, 1999.

<sup>204</sup> Schneider, E., Atendorf, K. All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (FO) of Escherichia Coli ATP synthase (F1FO). *EMBO J.* 4, 2, 515-518, 1985.

<sup>205</sup> Penefsky, H.S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 6, 1589-1593, 1985.

<sup>206</sup> Boyer, P.D., Kohlbrenner, W.E. Energy coupling in photosynthesis. Eds selman B and selman reiner S, Elsevier-north holland, New York, 231-240, 1981.

moteur rotatif du monde. Ce concept de catalyse rotationnelle fut en son temps, une idée révolutionnaire et difficile à croire avant que ne soit déterminée la structure 3D du secteur F1 par Walker et ses collègues, les travaux de pontage de Duncan et Cross ou la visualisation directe de la rotation de F1 par Noji et ses collaborateurs.

Cette dernière approche, aussi élégante que démonstrative, consiste à fixer par l'intermédiaire d'une étiquette Histidine introduite à l'extrémité N-terminale de chaque sous-unité  $\beta$ , un sous-complexe  $\alpha_3\beta_3\gamma$  de F1-ATP thermophile sur une bille enduite de Ni-NTA (acide nitrilo-triacétique) déposée sur une lamelle de verre. Par la suite, cette expérience a été reproduite sur des secteurs F1 de *E.coli* et de chloroplastes. Un filament d'actine marqué à la biotine et rendu fluorescent, est attaché à la sous-unité  $\gamma$  via la streptavidine. La rotation de la sous-unité  $\gamma$  est provoquée par l'addition d'ATP et peut être observée par la rotation du filament d'actine à l'aide d'un microscope<sup>207,208</sup>. Seulement quelques % des filaments d'actine tournent dans la chambre d'observation, mais ceux qui tournent le font dans le sens prédit à partir de la structure de Walker (sens inverse des aiguilles d'une montre), certains filaments effectuant des centaines de rotations sans arrêt ni changement de sens. Il semble que la totalité de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP soit convertie en mouvement de torsion au niveau de  $\gamma$ . De plus, des expériences complémentaires ont permis de confirmer le sens de rotation.

L'observation directe de la rotation d'un filament d'actine, complexé à une sous-unité c (cGlu2 → Cys) via la biotine-streptavidine, confirme également la rotation de l'anneau  $c_{12}$  en association avec  $\gamma$ <sup>209</sup>.

Cross et Duncan (1996) ont complété leur théorie sur la rotation de  $\gamma$  en proposant la rotation d'un cœur central asymétrique qui serait l'intermédiaire du couplage énergétique entre la translocation exergonique des protons par Fo et les changements endergoniques de conformation au niveau de F1 indispensable à la fixation des substrats et à la libération des produits. Compte tenu du fait que le couplage énergétique est inhibé par le DCCD, ils ont proposé une rotation dans le même temps au niveau du secteur Fo. Les sous unités impliquées dans cette rotation seraient les sous unités c.

L'ATP synthase, bi-moteur fonctionnant dans des sens opposés selon la source d'énergie (gradient de protons ou hydrolyse de l'ATP) a été décrite à l'aide d'un vocabulaire spécifique<sup>210</sup>.

## 1.2.2. Le stator

Le stator est composé de trois éléments : la tête, le bras et une partie de la base c'est à dire le secteur membranaire excepté l'anneau  $c_{9-12}$ . Le rôle du bras est de solidariser la tête et la base. Si on considère

<sup>207</sup> Noji, H., Yakusa, R., Yoshida, M., Kinoshita, K. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, **386**,299-302, 1997.

<sup>208</sup> Yakusa, R., Noji, H., Kinoshita, K., Yoshida, M. F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell*, **93**, 1117-1124, 1998.

<sup>209</sup> Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., Futai, M. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (FoF1): direct observation. *Science*, **286**, 5445, 1722-1724, 1999.

<sup>210</sup> Junge W., Lill, H., Engelbrecht, S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 11, 420-430, 1997.

l'hélice surenroulée asymétrique  $\gamma$  comme un corps rigide<sup>211</sup>, sa rotation exerce un couple de torsion sur  $(\alpha\beta)_3$ . Ce couple a besoin d'une résistance, assurée par un stator, pour que  $(\alpha\beta)_3$  soit obligé de changer de conformation plutôt que de tourner avec  $\gamma$ . Les modèles actuels proposent que les sous-unités a et b soient localisées à l'extérieur d'un anneau constitué de sous-unités c<sup>212</sup>. Ils ont été validés par des expériences de pontage entre les différentes sous-unités du secteur Fo<sup>213</sup>, de microscopie électronique après marquage par des anticorps monoclonaux spécifiques de a, b ou c<sup>214</sup> et analyse de revertants.

### 1.2.3. Le rotor

Dans l'ATP synthase de levure, le rotor, élément en mouvement, est constitué de la tige centrale et d'une partie de la base membranaire soit de  $\gamma\delta\epsilon c_{10}$ .

#### 1.2.3.1. Rôle de la sous unité $\gamma$

La sous-unité  $\gamma$  est au cœur du couplage énergétique. Elle engage des liaisons différentes avec chacune des trois sous-unités  $\beta$ . Les interactions  $\gamma/\beta$  varient par conséquent en fonction des nucléotides présents sur les sites catalytiques :

- 1) L'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\gamma$  est proche du site catalytique de la sous-unité  $\beta_E$ .
- 2) L'extrémité N-terminale est en interaction avec la boucle P de la sous-unité  $\beta_{DP}$ .
- 3) L'hélice  $\alpha$  en éperon  $\gamma_{73-90}$  est localisée à proximité de la boucle DELSEED de la sous-unité  $\beta_{TP}$ .

Chez *E. Coli*, la substitution  $\gamma\text{Gln269} \rightarrow \text{Glu}$  n'affecte pas la conduction des protons, mais réduit considérablement le « turn-over » de l'enzyme<sup>215</sup>. Le pontage  $\beta\text{Glu381} \rightarrow \text{Cys}$  (résidu de la boucle DELSEED) avec  $\gamma_{87}\text{Cys}$  inhibe l'activité ATPasique<sup>216</sup> ainsi qu'un pontage  $\gamma\text{-}\alpha$ <sup>217</sup>. Un pontage  $\gamma\text{-c}$  confirme l'interaction F1-Fo<sup>218</sup>.

<sup>211</sup> Wang, H., Oster, G. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature*. **396**, 6708, 279-282, 1998.

<sup>212</sup> Schneider, E., Altendorf, K. Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F1Fo): purification and reconstitution of Fo complexes and biochemical and functional characterization of their subunits. *Microbiol. Rev.* **51**, 4, 477-497, 1987.

<sup>213</sup> Hoppe, J., Sebald, W. The proton conducting Fo-part of bacterial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 1, 1-27, 1984.

<sup>214</sup> Birkenhager, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F., Altendorf K. The Fo complex of the Escherichia coli ATP synthase. Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy. *Eur. J. Biochem.* **230**, 1, 58-67, 1995.

<sup>215</sup> Nakamoto, R.K., Al-Shawi, M.K., Futai, M. The ATP synthase gamma subunit. Suppressor mutagenesis reveals three helical regions involved in energy coupling. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23, 14042-14046, 1995.

<sup>216</sup> Aggeler, R., Haughton, M.A., Capaldi, R.A. Disulfide bond formation between the COOH-terminal domain of the beta subunit and the gamma and epsilon subunits of the Escherichia coli F1-ATPase. Structural implications and functional consequences. *J. Biol. Chem.* **270**, 16, 9185-9191, 1995.

<sup>217</sup> Dou, C., Fortes, P.A., Allison, W.S. The alpha 3 (beta Y341W)3 gamma subcomplex of the F1-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 fails to dissociate ADP when MgATP is hydrolysed at a single catalytic site and attains maximal velocity when three catalytic sites are saturated with MgATP. *Biochemistry*, **37**, 47, 16757-16764, 1998.

<sup>218</sup> Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H., Capaldi, R.A. The gamma subunit in the Escherichia coli ATP synthase complex (ECF1Fo) extends through the stalk and contacts the c subunits of Fo part. *FEBS Lett.* **368**, 2, 235-238, 1995.

Les mutations ponctuelles dans les régions conservées  $\gamma 19-33$  et  $\gamma 83-89$  sont sans effet sur la phosphorylation oxydative, à l'exception de  $\gamma Met23$  qui altère la conduction des protons à travers  $Fo^{219}$ . Les mutations compensatoires des revertants isolés pour cette mutation se situent dans la région C-terminale  $\gamma 242-280$ . Cela confirme la proximité, observée sur la structure cristalline, entre les extrémités N et C-terminales et atteste de leur rôle dans le couplage énergétique<sup>220</sup>.

La rotation de la sous-unité  $\gamma$  a été confirmée grâce à un protocole expérimental établi sur la base des informations apportées par la structure cristalline du secteur F1. La stratégie reposait sur la substitution du premier acide aspartique de la région DELSEED d'une des sous-unités  $\beta$  par une cystéine ( $\beta Asp380$  Cys). La formation d'un pont disulfure entre ce résidu et la  $\gamma Cys87$ , appartenant à la petite hélice  $\alpha$  en éperon, inhibe l'enzyme. Sa réduction permet de restaurer l'activité d'hydrolyse<sup>221</sup> ou de synthèse<sup>222</sup>. Après cette étape, le résidu est à nouveau ponté à une sous-unité  $\beta$ . Ce nouveau pontage s'opère avec une sous-unité  $\beta$  quelconque, montrant que, au cours de la catalyse :

- $\gamma$  subit une rotation par rapport à la sous-unité  $\beta$  à laquelle elle était pontée avant l'étape de réduction.
- Il existe une alternance des interactions entre  $\gamma$  et chacune des sous-unités  $\beta$  sans pouvoir préciser si ces mouvements se font de façon aléatoire ou ordonnée.

En prenant en considération les mécanismes de changement d'affinité et de conduction des protons, l'équipe de Duncan a proposé un modèle de couplage énergétique. La rotation des sous-unités  $c_{12}$  du secteur  $Fo$  entraîne la rotation des sous-unités  $\gamma\delta\varepsilon$ , ce qui permet à chacune des trois sous-unités  $\beta$  d'adopter, tour à tour, les conformations O, L, et T. La mise en évidence du sens de rotation sera décrite par la suite.

### 1.2.3.2. Rôle de la sous-unité $\delta$ mitochondriale ou $\varepsilon$ bactérienne.

La sous-unité  $\varepsilon$  bactérienne participe au couplage énergétique en modifiant l'affinité des sites catalytiques pour les produits de l'enzyme. Elle module ainsi l'activité hydrolytique du secteur F1<sup>223</sup>. La sensibilité de  $\varepsilon$  aux protéases, donc son accessibilité, est grande en absence de  $P_i$  ou en présence d'ADP+EDTA ou d'AMP-PNP+ $Mg^{2+}$ , et faible en absence de nucléotide ou en présence soit d'ATP+ $Mg^{2+}$  soit d'ADP+ $P_i$ + $Mg^{2+}$ .  $P_i$  a donc indirectement une influence sur la structure de  $\varepsilon$  et, inversement,  $\varepsilon$  module l'affinité du  $P_i$  pour les sites catalytiques.

<sup>219</sup> Shin, K., Nakamoto, R.K., Maeda, M., Futai, M. FoF1-ATPase gamma subunit mutations perturb the coupling between catalysis and transport. *J. Biol. Chem.* **267**, **29**, 20835-20839, 1992.

<sup>220</sup> Nakamoto, R.K., Maeda, M., Futai, M. The gamma subunit of the Escherichia coli ATP synthase. Mutations in the carboxyl-terminal regions involved in energy coupling. *J. Biol. Chem.* **270**, **23**, 14042-14046, 1995.

<sup>221</sup> Duncan, T.M., Bulygin, V.V., Zhou, Y., Hutcheon, M.L., Cross, R.L. Rotation of subunits during catalysis by Escherichia coli F1-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 10964-10968, 1995.

<sup>222</sup> Zhou, Y., Duncan, T.M., Cross, R.L. Subunit rotation in Escherichia coli FoF1-ATP synthase during oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, **20**, 10583-10587, 1997.

<sup>223</sup> Dunn, S.D. The polar domain of the b subunit of Escherichia coli F1Fo-ATPase forms an elongated dimer that interacts with the F1 sector. *J. Biol. Chem.* **267**, **11**, 7630-7636, 1992.

L'observation directe de la rotation de la sous-unité  $\epsilon$ , marquée par un filament d'actine fluorescente, a été faite par la microscopie électronique vidéo<sup>224</sup>. Lors de cette rotation, les interactions entre la sous-unité  $\epsilon$  et les 3 paires  $\alpha\beta$  doivent être cassées puis reformées. Par contre, les interactions clés, entre la sous-unité  $\epsilon$  et les sous-unités  $\gamma$  et  $c$ , doivent être conservées.

Les modifications de conformation déduites des expériences de pontage, modification chimique ou fluorescence, s'expliquent par la coopérativité des sites catalytiques et également par les interactions des sous-unités  $\gamma$  et  $\epsilon$  avec les sous-unités  $\beta$ . Ces interactions doivent jouer un rôle clé dans le mécanisme de couplage énergétique. Ce rôle devra être précisé à la lumière des structure 3D du secteur MF1-c<sub>10</sub> de levure et du secteur BMF1 inhibé par le DCCD.

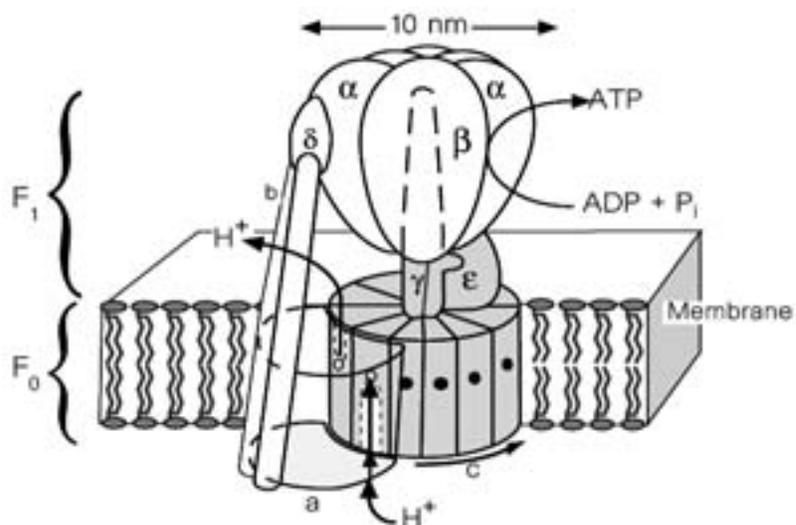


Fig.3.2. Modèle de fonctionnement de l'ATP synthase selon Elston et al.<sup>225</sup>

### 1.2.3.3. La translocation des protons à travers Fo

La synthèse d'ATP requiert l'existence d'une différence de potentiel électrochimique en protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. La sous-unité  $c$  joue un rôle central dans le transport des protons via la protonation/déprotonation d'un résidu carboxylate essentiel l'Asp61. Ce résidu étant enfoui au cœur de la membrane, des voies d'accès depuis les deux faces de la membrane doivent exister. L'accès depuis le périplasma à aArg210/cAsp61 est visible sur le modèle ac<sub>12</sub>. Un ensemble de résidus polaires appartenant à la sous-unité  $a$  forme un canal hydrophile continu entre aArg210 et le périplasma. Durant la synthèse de l'ATP, le potentiel électrochimique en protons est élevé sur la face

<sup>224</sup> Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., Yoshida, M. Direct observation of the rotation of the epsilon subunit in the F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, **31**, 19375-19377, 1998.

<sup>225</sup> Elston, T., Wang, H.Y., Oster, G. Energie transduction in F1 ATP synthase. *Nature*, **391**, 510-513, 1998.

intramembranaire et faible sur la face cytosolique. Le gradient conduit un proton par le canal décrit ci-dessus jusqu'à cAsp61 qui est alors protoné.

A partir de cette étape, deux modèles sont proposés :

Le plus ancien<sup>226</sup> propose que la fragilisation de la liaison ionique cAsp61/aArg2010 permet à cAsp61 d'une sous-unité adjacente de venir se positionner face à aArg210 et à la liaison hydrogène aGlu219/cAsp61 d'être rompue. AGlu219 cédant son proton qui génère un ion H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. cAsp61 d'une troisième sous-unité c viendrait alors au contact de aGlu219 et l'ion H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> protonerait aHis245 qui finalement céderait son proton dans un second canal aqueux en relation avec le cytosol.

Le plus récent<sup>227</sup> propose que la protonation de cAsp61 entraîne la rotation de l'hélice terminale à laquelle ce résidu appartient (dans le sens des aiguilles d'une montre si l'on regarde depuis F1). Au cours de cette rotation, la sous-unité a se déplacerait de manière concertée avec l'hélice C-terminale de c sous l'effet de liaisons hydrogène et de contraintes stériques. A la fin de cette étape, l'hélice de la sous-unité a se repositionne entre les sous-unités a fixes. CAsp61 de la sous-unité c suivante doit alors être déprotoné pour régénérer la configuration de départ. L'observation de l'état complètement protoné suggère un chemin en direction du cytoplasme formé de résidus polaires de la sous-unité a (Ser206, Lys203 et Ser199) et de deux sous-unités c (Arg50 de l'une ; Thr51 et Gln52 de l'autre).

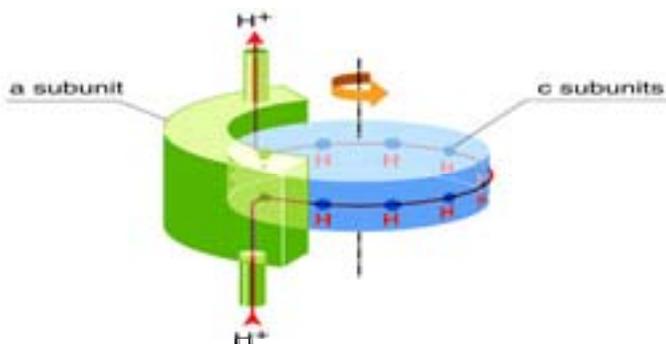


Fig.3.2. Représentation schématique de la rotation du rotor lors du passage des protons dans le secteur Fo de l'ATP synthase de levure d'après Stock et al.<sup>1</sup>

La déprotonation de cAsp61 depuis le côté cytosolique par ce chemin devrait déclencher la rotation de la prochaine hélice C-terminale dans sa conformation stable déprotonée, c'est à dire la configuration initiale. Dans ce modèle, le proton a un trajet minimum.

En un tour complet (360°), chacune des 12 sous-unités c assure la translocation d'un proton et il est supposé que la synthèse d'une molécule d'ATP ait lieu sur chacune des trois sous-unités  $\beta$  donc 12H<sup>+</sup>/3ATP ou plus simplement 4H<sup>+</sup>/ATP<sup>228, 229, 230</sup>. Au cours de la synthèse d'ATP, la translocation

<sup>226</sup> Vik, S.B., Antonio, B.J. A mechanism of proton translocation by F1Fo ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, **48**, 30364-30369, 1994.

<sup>227</sup> Rastogi, V.K., Girvin, M.E. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*, **402**, 263-268, 1999.

<sup>228</sup> Cross, R.L., Taiz, L. Gene duplication as a means for altering H<sup>+</sup>/ATP ratios during the evolution of FoF1 ATPases and synthases. *FEBS Lett.* **259**, **2**, 227-229, 1990.

<sup>229</sup> Van Walraven, H.S., Strotmann, H., Schwarz, O., Rumberg, B. The H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. *FEBS. Lett.* **379**, **3**, 309-313, 1996.

<sup>230</sup> Jones, P.C., Jiang, W., Fillingame, R.H. Arrangement of the multicopy H<sup>+</sup>-translocating subunit c in the membrane sector of the Escherichia coli F1Fo ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, **27**, 17178-17185, 1998.

des protons s'accompagnerait de la rotation des sous-unités c, dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Ce sens serait imposé par la position relative des résidus aGlu219 et aArg210 par rapport à cAsp61. Les interactions de cAsp61 avec les résidus aArg210, aGlu219 et aHis245 et l'orientation de la chaîne latérale de cAsp61 sont primordiales. Un processus inverse aurait lieu lors de l'hydrolyse d'ATP, la rotation s'effectuant alors dans le sens des aiguilles d'une montre.

D'autres modèles ont été proposés, dont l'un pour expliquer par exemple le fonctionnement de l'ATP synthase chez *P. modestum*.<sup>231</sup>.

### 1.3. Les inhibiteurs des ATP synthases

La fixation d'inhibiteurs de la translocation des protons dans le secteur Fo (DCCD ou oligomycine) diminue l'affinité de l'enzyme pour l'ATP. Le DCCD fige la sous-unité  $\epsilon$  bactérienne dans la conformation induite par les nucléotides présents sur le site catalytique au moment de l'incubation avec cet inhibiteur<sup>232</sup>.

L'équipe de Hatefi<sup>233</sup> a confirmé par l'analyse de la fluorescence de l'aurovertine, que des changements conformationnels étaient induits par la conduction des protons. L'aurovertine est un inhibiteur de l'activité ATPasique qui se fixe sur la sous-unité  $\beta$ . Le mode de fixation a été précisé par la structure cristalline du complexe BMF1/aurovertine B à 3.1 Å de résolution<sup>234</sup> (code d'accès PDB : 1COW). Deux sites de fixation existent dans une crevasse localisée entre le domaine C-terminal et le site de fixation aux nucléotides : l'un dans  $\beta_{TP}$ , l'autre dans  $\beta_E$ . L'aurovertine semble agir en contrariant la fermeture des interfaces catalytiques essentielles pour l'interconversion des sites catalytiques. Fixée à une apoenzyme (sans nucléotide), elle émet un faible signal de fluorescence<sup>235</sup>. La fixation d'ATP ou d'ADP à l'enzyme provoque une exaltation de cette fluorescence. En présence de DCCD, l'exaltation de fluorescence liée à l'addition d'ATP ou d'ADP ne se produit plus.

L'idée des changements conformationnels est aujourd'hui couramment admise. L'enjeu consiste désormais à identifier les sous-unités des secteurs F1 et Fo qui sont impliquées dans ces réarrangements locaux. A ce titre, la tige centrale est le centre d'intérêt de nombreuses équipes de recherche.

<sup>231</sup> Dimroth, P. Operation of the Fo motor of the ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **895**, 205-239, 1987.

<sup>232</sup> Mendel-Hartvig, J. Capaldi, R.A. Nucleotide-dependent and dicyclohexylcarbodiimide-sensitive conformational changes in the epsilon subunit of Escherichia coli ATP synthase. *Biochemistry*, **30**, 45, 10987-10991, 1991.

<sup>233</sup> Matsuno-Yagi, Yagi, T., Hatefi, Y. Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation: effects of specific FO modifiers on ligand-induced conformation changes of F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 22, 7550-7554, 1985.

<sup>234</sup> Van Raaij, M.J., Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Walker, J.E. The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 6913-6917, 1996.

<sup>235</sup> Wise, J.G., Latchney, L.R., Senior, A.E. The defective proton-ATPase of uncA mutants of Escherichia coli. Studies of nucleotide binding sites, bound aurovertin fluorescence, and labeling of essential residues of the purified F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **256**, 20, 10389-10389, 1981.



# Chapitre 4

## Utilisation de l'échange isotopique Hydrogène/deutérium pour l'étude de la sous-unité $\epsilon$ du complexe F1 ATPase.

### 1. Objectif de l'étude

De nombreux travaux utilisant l'échange isotopique hydrogène/deutérium et la spectrométrie de masse ont été réalisés pour l'étude de la structure des protéines de hautes masses moléculaires. Cependant, peu de travaux utilisant cette technique sont focalisés sur les interactions au sein d'un complexe hétéro-oligomérique. L'une des principales difficultés, pour l'étude des interactions non-covalentes au sein d'un complexe hétéro-oligomérique par échange isotopique, réside dans la capacité à séparer rapidement les différentes sous-unités du complexe pour limiter le phénomène de rééchange inhérent à cette technique.

Pour initier une telle étude, nous devons sélectionner un complexe susceptible de remplir un certain nombre de conditions indispensables à la simplification du système.

- Tout d'abord le complexe devra pouvoir être purifié en quantité suffisante pour nous permettre de mener à bien notre étude. Même si chaque expérience d'échange isotopique ne nécessite qu'une faible quantité de matériel (une dizaine de picomoles), la répétition des expériences préliminaires et des cinétiques requiert une quantité relativement importante de matériel.
- La sous-unité issue du complexe qui fera l'objet de l'étude doit pouvoir être purifiée à partir du complexe en une durée qui maintienne le phénomène de rééchange, observé dans les expériences HXMS au niveau le plus bas.
- L'analyse topologique des zones accessibles au solvant deutéré d'une sous-unité au sein d'un complexe nécessite la protéolyse de la sous-unité. Suite à cette protéolyse, les fragments générés doivent être assignés à leurs séquences de façon non ambiguë. Dans un premier temps, on préférera étudier une sous-unité de taille modeste pour limiter les problèmes liés à l'assignation des fragments générés par une protéolyse aspécifique engendrée par la pepsine.
- Enfin, pour nous permettre d'estimer la pertinence de nos résultats, des données structurales concernant la position des sous-unités au sein du complexe doivent être disponibles.

La sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1 ATPase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* répond à l'ensemble de ces critères et nous avons décidé de focaliser notre étude sur ce complexe et cette sous-unité. En effet :

- Nous pouvons obtenir des quantités suffisantes de complexe F1 ATPase grâce à une collaboration avec l'équipe de Jean Velours à l'Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire de Bordeaux où la technique de purification est maîtrisée.
- La purification de la sous-unité  $\epsilon$  par HPLC en phase inverse sur support C18, telle qu'elle a été mise au point par l'équipe de Jean Velours nécessite 25 minutes<sup>236</sup>. Les autres sous-unités du complexe ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ ) ont des temps de rétention supérieurs, de l'ordre de 35 minutes. Le temps de rétention de la sous-unité  $\epsilon$  demeure cependant trop important pour envisager une étude par échange isotopique. Une adaptation des conditions de purification de cette sous-unité doit être envisagée.
- $\epsilon$  est la plus petite sous-unité du complexe (61 acides aminés, 6612 Da). La protéolyse de la sous-unité, indispensable à l'analyse topologique de l'accessibilité au solvant deutéré, devrait générer un nombre limité de fragments et permettre ainsi une assignation non ambiguë aux séquences des peptides.
- Un grand nombre de données structurales sont disponibles sur le complexe de l'ATP synthase. La structure cristalline à haute résolution du secteur F1 de l'ATP synthase de cœur de bœuf (BMF1) a été obtenue par l'équipe de Walker à 2.4 Å de résolution<sup>237</sup>. Une étude de la structure de la sous-unité  $\epsilon$  de la F1-ATPase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été réalisée<sup>238</sup> par RMN.

Nous allons maintenant examiner les différentes étapes qui nous ont permis de développer ce travail :

- Préparation du complexe F1-ATPase à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*
- Mise au point d'un protocole de purification rapide de la sous-unité  $\epsilon$  à partir du complexe F1-ATPase
- Etude cinétique de l'incorporation de deutérium dans la sous-unité  $\epsilon$  au sein du complexe F1-ATPase.
- Empreinte de digestion de la sous-unité  $\epsilon$ .
- Etude de la sous-unité  $\epsilon$  isolée par échange isotopique Hydrogène/Deutérium.
- Analyse topologique des zones d'accessibilité au solvant deutéré de la sous-unité  $\epsilon$  au sein du complexe F1-ATPase.

<sup>236</sup> Arselin, A., Gandar, J.-C., Guérin, B., Velours, J. Isolation and complete Amino Sequence of the mitochondrial ATP synthase  $\epsilon$ -subunit of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, n°2, 723-727, 1991.

<sup>237</sup> Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628, 1994.

<sup>238</sup> Aznar-Derunes, C., Manigand, C., Picard, P., Dautant, A., Goetz, M., Schmitter, J.M., Precigoux, G. Study of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* F1FO-ATPase  $\epsilon$ -subunit. *J. Pep. Sci.*, **8**, 365-372. 2002

## 2. Préparation du complexe F1-ATPase à partir de levures *Saccharomyces cerevisiae*

La préparation du complexe F1-ATPase à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été réalisée au sein du laboratoire de Jean Velours à l'IBGC (UMR CNRS 5095-Université de BordeauxII). L'extraction de protéines à partir des organismes qui les produisent permet d'obtenir des molécules à l'état natif. Cela nécessite de disposer des cellules en quantité suffisante, puis de les broyer pour isoler les mitochondries. Celles-ci sont à leur tour lysées pour permettre la libération des protéines, qui sont ensuite isolées les unes des autres à l'aide des différentes étapes de purification.

### 2.1. Culture des levures *Saccharomyces cerevisiae*

Nous avons cultivé les levures en milieu liquide complet contenant 2% d'acide lactique (source de carbone) neutralisé à la soude (w/v). Au préalable, une préculture a été effectuée.

- Préculture : 200 ml de milieu liquide complet ont étéensemencés et portés à 28°C en aérobose, sous agitation pendant une nuit.
- Culture : une grande quantité de cellules est nécessaire pour espérer obtenir une petite quantité de complexe F1-ATPase. Nous avons utilisé 20 litres de milieu liquide que nous avonsensemencés avec 200 ml de préculture. La culture, à 28°C, sous agitation constante pendant 24 heures, permet d'obtenir une grande quantité de cellules sans toutefois atteindre la phase stationnaire. Une fraction aliquotée a été prélevée et diluée 40 fois avant de prendre la mesure de la densité optique à 550 nm (à cette longueur d'onde, pour les levures, 1 unité d'absorbance équivaut à  $2 \times 10^7$  cellule par ml). La valeur obtenue nous a permis de connaître la concentration cellulaire de notre milieu :  $8 \times 10^7$  cellules /ml.

### 2.2. Préparation des mitochondries

Les levures sont récoltées par centrifugation pendant 5 minutes à 4°C à 750g. Les cellules (culot) sont suspendues dans de l'eau Milli-Q et centrifugées à nouveau. Cette opération est réalisée deux fois. Les cellules sont ensuite suspendues dans le tampon 1 (0.8M mannitol, 0.1 mM EGTA, 0.5 M tris-maléate, pH 6.8) de récupération, à raison de 1 ml/gramme de poids frais, pour subir le broyage. Celui-ci a été effectué selon la technique de Lang et coll<sup>239</sup> à l'aide de billes de verre de 0.4-0.5 mm de diamètre. Cette technique est rapide, mais la structure d'une partie des mitochondries peut être altérée. Elle est donc utilisée uniquement pour purifier de grandes quantités de protéines.

---

<sup>239</sup> Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W., Kaudewitz, F. A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal. Biochem.* **77**, 1, 110-121, 1977.

L'efficacité du broyage est contrôlée au microscope : dans notre cas, environ 90% des levures ont été broyées.

La centrifugation du broyat à 750 g conduit à un culot constitué de levures non broyées et d'un surnageant dans lequel les mitochondries sont présentes. Une centrifugation à 27000 g permet de récupérer les mitochondries dans un culot qui est repris dans le tampon 1. Une nouvelle série de centrifugations à 750 g puis à 27000 g permet d'améliorer la pureté des mitochondries. A l'issue de ces étapes, le culot de mitochondries est repris dans une quantité minimale (20 ml) de tampon 1. La concentration protéique de la suspension de mitochondries résultante a été estimée par la méthode de Lowry à 40.5 mg/ml. Nous disposons donc de 800 mg de mitochondries (Figure 4.1.).

Dans le cas où les mitochondries ne sont pas utilisées immédiatement, elles sont conservées en congelant la suspension sous forme de billes dans l'azote liquide.

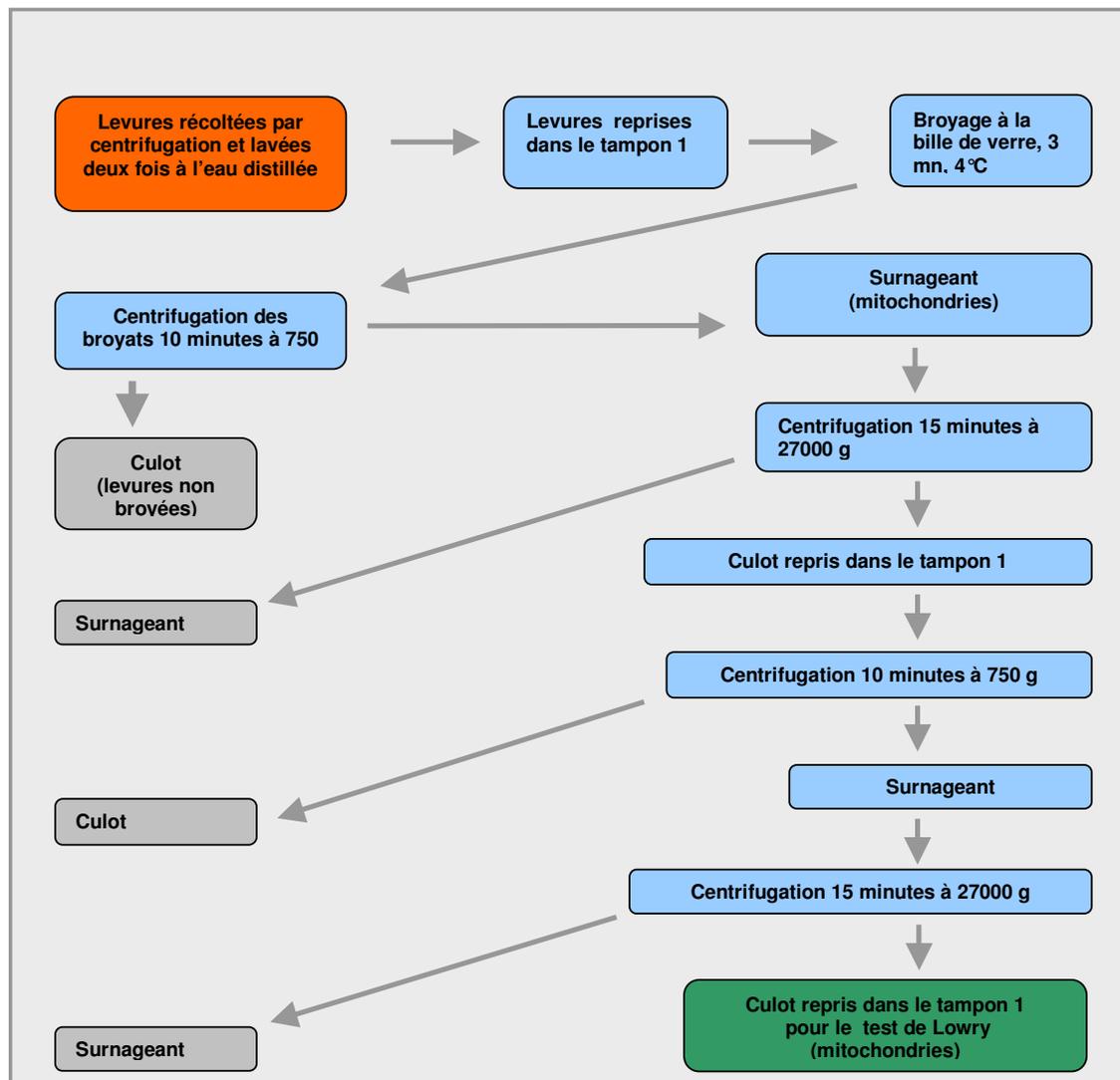


Fig. 4.1. Préparation des mitochondries.

### 2.3. Préparation des particules submitochondriales

La suspension de mitochondries dans le tampon 1 est diluée de telle sorte que la concentration avoisine 20 mg de protéines/ml, puis les mitochondries sont soumises à un choc hypoosmotique en amenant la concentration à 3.3 mg/ml. Cette dilution s'opère en faisant couler en filet la solution à 20 mg/ml dans un volume adéquat d'un tampon dépourvu de mannitol (tampon 2 : Tris maléate 0.5M, EGTA 0.1M, pH 6.8). La suspension diluée ainsi obtenue est placée sous agitation douce pendant 20 minutes à 4°C afin de permettre à toutes les mitochondries de gonfler, puis est centrifugée pendant 20 minutes à 4°C à 48 000g. Le culot est repris dans le tampon 2 pour atteindre une concentration protéique de 2 mg/ml. Après incubation pendant 5 minutes à 4 °C afin d'homogénéiser le milieu, deux sonications de 30 secondes, entrecoupées d'une phase de repos de 30 secondes, sont effectuées (Figure 4.2.). Les particules submitochondriales ainsi libérées sont sédimentées par une centrifugation de 45 minutes à 4°C à 100 000 g.

Le culot est repris dans le tampon 3 (Mannitol 0.3M, EDTA 1 mM,  $\epsilon$ -ACA (acide  $\epsilon$ -amino-n-caproïque) 10 mM, PMSF (phénylméthylsulfonyl fluorure) 1 mM, PAB (para aminobenzamidine) 10 mM, ATP 2 mM, tris-maléate 10 mM à pH 7) de telle sorte que la concentration protéique atteigne 10 mg/ml (test de Lowry).

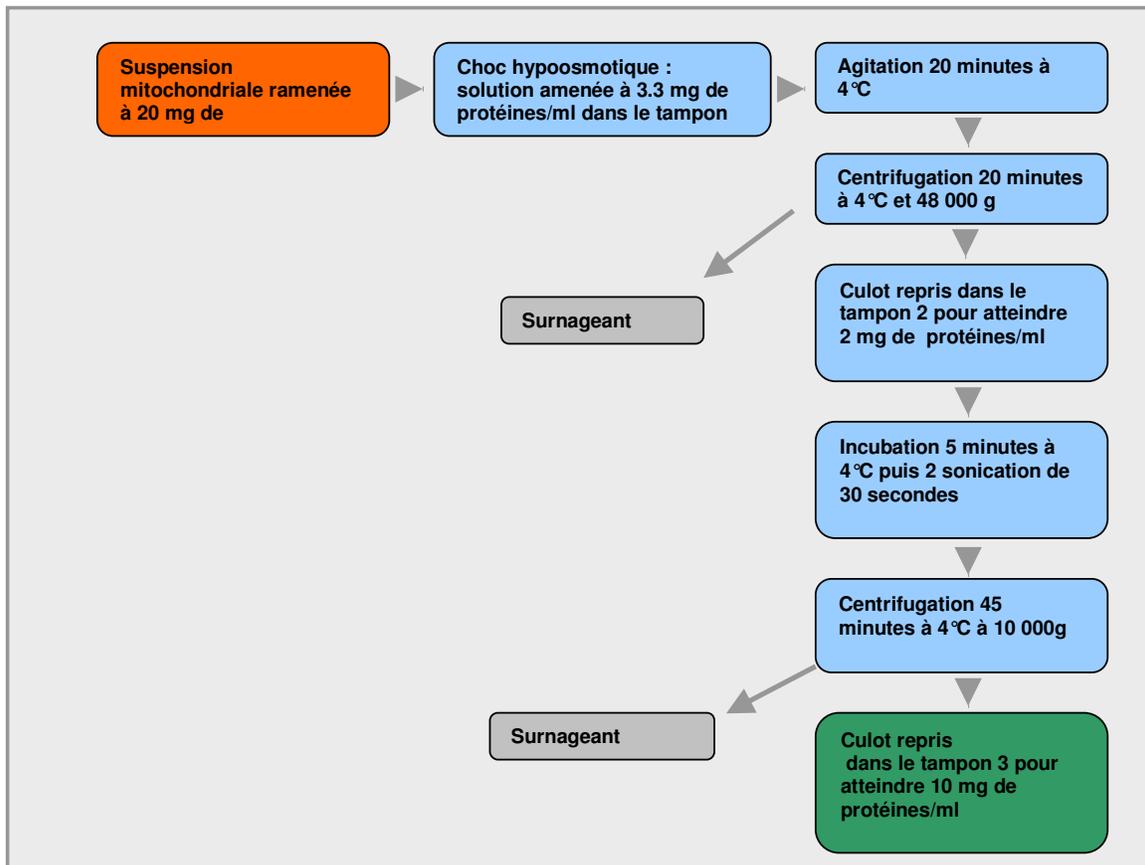


Figure 4.2. Préparation des particules submitochondriales.

## 2.4. Séparation du secteur F1 du complexe ATP synthase

### 2.4.1. Extraction des particules submitochondriales par le chloroforme

Le secteur F1 de l'ATP synthase est hydrophile. Nous avons séparé ce secteur du secteur Fo par traitement des particules submitochondriales au chloroforme<sup>240,241</sup>. Cette étape a été effectuée à température ambiante car le domaine F1 en solution est instable à basse température (4°C)<sup>242</sup>.

Il est possible de préserver l'intégrité du domaine F1 mis en solution à 4°C à condition d'opérer en présence de 50% de glycérol. Sous forme solide, après précipitation par du sulfate d'ammonium, le secteur F1 est également bien conservé<sup>243</sup>.

Un demi-volume de chloroforme a été ajouté à la suspension de particules submitochondriales dans le tampon 3. Le mélange a été agité vigoureusement pendant 20 secondes à 20 °C, puis centrifugé pendant 10 minutes à 20 °C à 1100 g. La phase aqueuse a été isolée et centrifugée pendant 10 minutes à 20 °C à 20 000g. La phase aqueuse résultante a été à nouveau isolée, puis centrifugée pendant 30 minutes à 20 °C à 100 000 g.

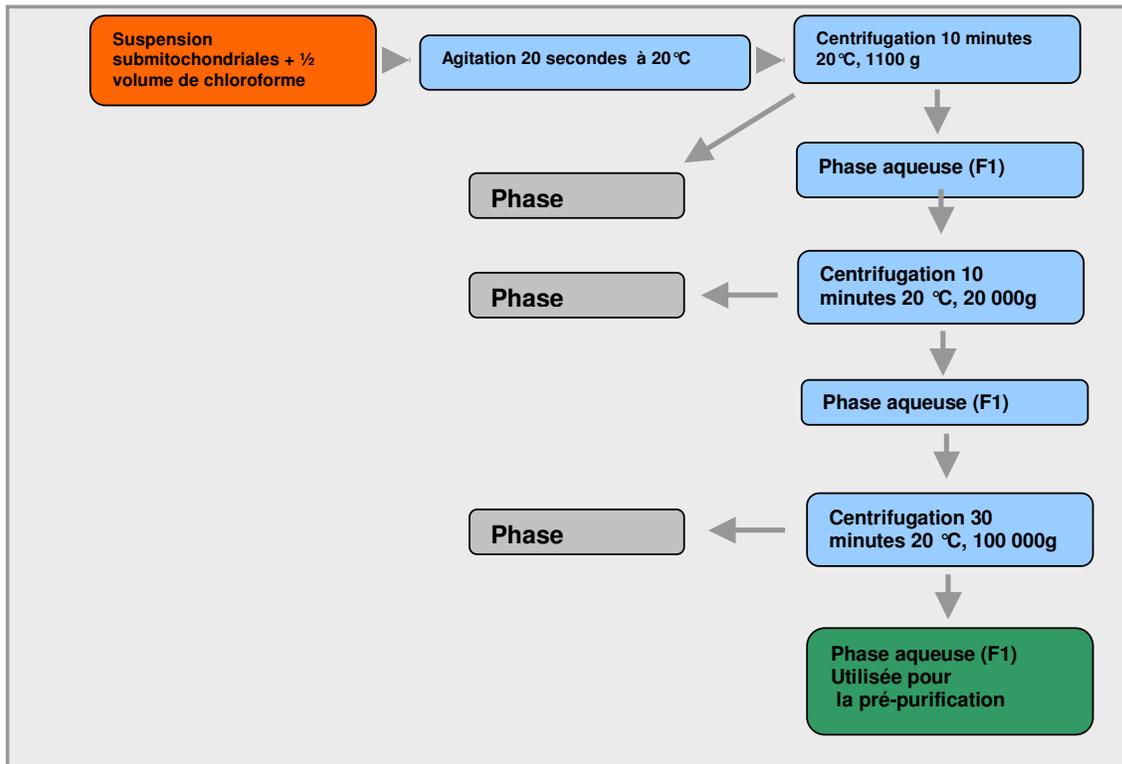


Fig. 4.3. Séparation du secteur F1 du complexe ATPasique.

<sup>240</sup> Beechey, R.B., Hubbard, S.A., Linnet, P.E., Mitchell, A.D., Munn, E.A. A simple and rapid method for the preparation of adenosine triphosphatase from submitochondrial particles. *Biochem. J.* **48, 3, 533-537, 1975.**

<sup>241</sup> Takeshige, K., Hess, B., Böhm, M., Zimmermann-Telschow, H. Mitochondrial adenosine triphosphatase from yeast *saccharomyces cerevisiae*. Purification, subunit structure and kinetics. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357, 5, 1605-1622, 1976.**

<sup>242</sup> Penefsky, H.S., Warner, R.C. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. VI. Studies on the mechanism of cold inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* **240, 12, 4694-4702, 1965.**

<sup>243</sup> Ryrie, I.J. Purification and partial characterization of the oligomycin-sensitive ATPase from yeast mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **168, 2, 712-719, 1975.**

#### 2.4.2. Précipitation du secteur F1 en présence de sulfate d'ammonium.

Il s'agit d'une pré-purification du secteur F1. Une solution d'EDTA a été ajoutée à la phase aqueuse finale pour atteindre une concentration de ce composé de 4 mM. Puis la solution a été amenée à 70% de saturation en sulfate d'ammonium, tout en maintenant le pH à 7 à l'aide d'une solution de soude. La précipitation a eu lieu pendant 12 heures à 4°C, puis une centrifugation pendant 45 minutes à 4°C et 246 000 g a été effectuée. Le culot protéique est alors repris dans le tampon 4 (20 % glycérol, EDTA 1 mM, ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, tris-HCl 100 mM à pH 7.5) et les agrégats insolubles ont été éliminés par une centrifugation à basse vitesse. Le surnageant, constitué du secteur F1 et de diverses protéines hydrophiles qui ont également précipité au sulfate d'ammonium, a été purifié par une technique chromatographique : l'exclusion stérique.

#### 2.4.3. Purification par chromatographie d'exclusion stérique

Nous avons divisé la solution surnageante obtenue en 3 fractions de 200 µl chacune, que nous avons analysées à l'aide d'une colonne d'exclusion stérique adaptée à la séparation de protéines de masses moléculaires comprises entre 10 et 300 kDa.

Le chromatogramme obtenu a un profil identique à ceux précédemment obtenus au laboratoire avec les mêmes conditions expérimentales<sup>244,245</sup>. Le pic élué entre 9 et 11.4 ml correspond au secteur F1.

### 3. Séparation rapide de la sous-unité ε à partir du complexe F1-ATPase

Les sous-unités du secteur F1 ont pu être isolées en fonction de leur caractère hydrophobe, en une seule étape, par HPLC en phase inverse sur support C18 (Vydac C18 (4.6 mm ID×2500 mm)). Cette séparation en phase inverse a été réalisée sur colonne analytique à l'aide d'un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau contenant 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA) qui permet de rompre les associations entre les différentes sous-unités et en particulier celle du complexe δ-ε<sup>246,247,79</sup>. Les fractions correspondant aux pics dont les temps de rétention sont de 32 et 34 minutes contiennent respectivement les sous-unités ε et γ. A 36 minutes apparaît δ et après 40 minutes α et β.

Ces temps de rétention, résultat de la chromatographie en phase inverse de la sous unité F1-ATPase ne sont pas compatibles avec la rapidité de la séparation indispensable aux expériences d'échange isotopique

<sup>244</sup> Giraud, MF., Velours, J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the F1 delta subunit, sequence and disruption of the structural gene. *Eur. J. Biochem.* **222**, **3**, 851-859, 1994.

<sup>245</sup> Giraud, MF. Etude de la sous-unité δ de l'ATP synthase mitochondriale de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : Purification de la protéine, clonage et disruption du gène de structure, surexpression de la protéine, clonage et disruption du gène de structure, surexpression de la protéine chez *Escherichia coli*. **Thèse n°434, Université de Bordeaux II.**

<sup>246</sup> Penin, F., Deleage, G., Gagliardi, D., Roux, B., Gautheron, D.C., Interaction between δ and ε subunits of F1-ATPase from pig heart mitochondria. Circular dichroism and intrinsic fluorescence of purified and reconstituted δ ε complex. *Biochemistry*, **29**, 9358-9364, 1990.

<sup>247</sup> Gagliardi, D., Penin, F., Gautheron, D.C. Large-scale purification and characterisation of the five subunits of F1-ATPase from pig heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **59**, **3**, 323-331, 1991.

hydrogène/deutérium. Dans les conditions précédentes, le temps de rétention de 32 minutes obtenu pour la sous-unité  $\epsilon$  ne peut permettre un maintien du marquage isotopique. La séparation des différentes sous-unités se faisant à l'aide d'un gradient d'acétonitrile dans l'eau, les deutériums fixés au niveau des positions amides des sous-unités de la F1-ATPase vont être rééchangés avec les hydrogènes de l'eau contenue dans la phase d'élution.

Pour pallier ce rééchange pendant la phase de séparation des sous-unités de la F1 ATPase, nous avons essayé de diminuer sensiblement le temps de rétention de la sous-unité  $\epsilon$ . Dans un premier temps nous avons optimisé la chromatographie en changeant la colonne utilisée pour la séparation.

#### Diminution du volume mort de la colonne de séparation chromatographique

Dans le protocole de chromatographie utilisé par l'équipe de Jean Velours, nous avons remplacé la colonne Vydac C18 (4.6 mm ID×2500 mm) avec un gréffage monomérique des unités C18 sur des particules de 5 $\mu$ m par une colonne Vydac C18 (4.6mm ID×50 mm) ayant les mêmes particularités au niveau du gréffage des unités C18. La principale différence entre ces deux colonnes est le volume mort, beaucoup moins important dans la deuxième colonne. Le but de la mise en place de cette colonne est la diminution du temps de rétention de la sous-unité  $\epsilon$  lors de la séparation chromatographique. En diminuant le volume mort de la colonne, le temps de rétention de la sous unité  $\epsilon$  passe de 32 minutes à 11 minutes (figure 4.4. et 4.5.) (gradient non linéaire de 30 à 45% d'acétonitrile et de 45% à 60% d'acétonitrile).

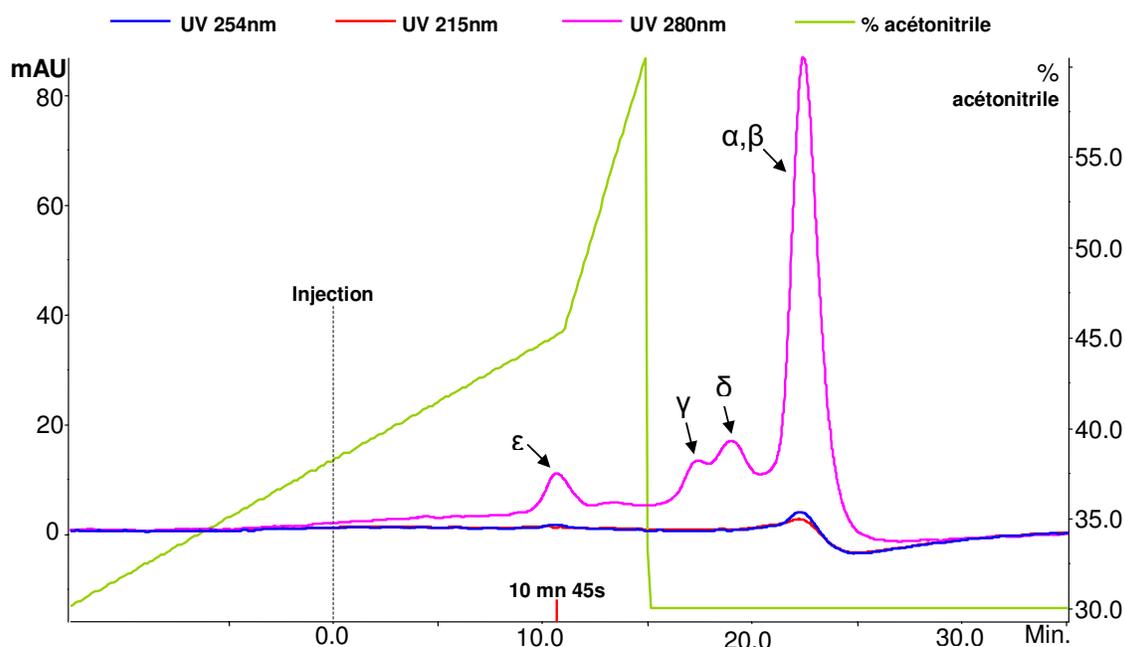


Fig. 4.4. Chromatogramme RP-HPLC du secteur F1-ATPase (Vydac C18, Äkta Explorer AP biotech).

```

Main method:
----- Block : Main -----
mn
0.0 Base Volume,1{ml},Vydac C18
0.0 Flow 1 {ml/min}
0.0 Alarm_Pressure Enabled,4 {MPa},0.0 {MPa}
0.0 Gradient 30 {%B},0.00 {base}
0.0 BufferValveA1 All
0.0 PumpBINlet B1
0.0 PumpAInlet A1
0.0 InjectionValve Load
0.0 ColumnPosition Position7
0.0 OutletValve WasteF1
0.0 Wavelength 280{nm},254{nm},215{nm}
5.0 Gradient 30 {%B},0.00 {base}
5.0 AutoZeroUV
5.0 InjectionValve Inject
5.0 OutletValve WasteF1
5.1 FeedTube
5.66 InjectionValve Load
5.76 FeedTube
6.1 FeedTube
6.43 FeedTube
6.76 FeedTube
7.0 FeedTube
7.0 Gradient 30{%B},0.00 {base}
10.0 Gradient 45 {%B},12 {base}
11.0 Fraction Collector 0.25 {ml}
15.0 Gradient 60 {%B},2 {base}
15.0 Gradient 30 {%B},0 {base}
20 Fractionation Stop
40.0 Gradient 30 {%B},0 {base}

```

**Fig.4.5. méthode utilisée pour la séparation RP-HPLC utilisant la colonne Vydac C18.**

### *Refroidissement du système HPLC*

Le temps de préparation rapide de l'échantillon n'est pas la seule condition pour réaliser une expérience d'échange isotopique hydrogène/deutérium. Nous avons déjà indiqué que pour limiter le phénomène de rééchange, les échantillons doivent être préparés en condition de quench (pH2.5, 0°C). La présence de TFA 0.1% permet le maintien d'un pH proche de 2.5. Dans un premier temps, nous avons plongé les solvants d'élution dans la glace pour les maintenir à 0°C.

Le système HPLC Äkta Explorer (AP Biotech) ne possédant pas de système de refroidissement et ne disposant pas de chambre froide, nous avons tenté de refroidir toute les parties externes du système (colonne, connexions) pour limiter le réchauffement des analytes pendant leur circulation dans les lignes de l'HPLC. Enfin, nous avons congelé dans l'azote liquide, les tubes eppendorf servant à la collection des fractions juste avant cette collection et aussitôt après.

Une amélioration notable du contrôle de la température pendant la séparation HPLC a été obtenue en utilisant le système HPLC SMART (AP Biotech) qui est muni d'un système de refroidissement permettant de maintenir l'ensemble du système (colonne, lignes, connexions) à une température de 2°C. Nous avons mesuré la température des fractions d'élution à la sortie de la chaîne d'HPLC. Cette température est comprise entre 0° C et 1 °C.

### ***Evaluation du rééchange du à la séparation chromatographique***

Pour nous permettre d'évaluer la perte d'information résultant du passage de l'analyte dans le système HPLC, nous avons utilisé comme protéine modèle l'insuline bovine de source commerciale (sigma). Deux expériences d'échange ont donc été réalisées. L'insuline, 40  $\mu\text{M}$ , est incubée pendant 24 heures en diluant 1 :20 l'échantillon dans 100 %  $\text{D}_2\text{O}$ .

Après incubation et quench de la réaction, une première fraction de l'échantillon, qui sert de témoin, est analysée directement en spectrométrie de masse MALDI ToF et une deuxième fraction de l'échantillon est injectée directement dans le système HPLC. Le temps de rétention de l'insuline dans le système HPLC a été optimisé pour qu'il soit proche de celui de la sous-unité  $\epsilon$ , environ 10 minutes (en utilisant la colonne Vydac 4.6mm ID $\times$ 50 mm). La fraction collectée suite au passage de l'insuline deutérée au travers du système HPLC est aussitôt analysée par spectrométrie masse dans les mêmes conditions que l'échantillon témoin.

Les incréments de masse obtenus pour les deux échantillons d'insuline deutérée (témoin et ayant subi la séparation HPLC) sont calculés par rapport à l'analyse d'un échantillon d'insuline non deutérée. En comparant les niveaux d'incorporation de deutérium dans les deux cas il apparaît que le passage dans le système HPLC diminue très fortement le nombre de deutérons incorporés dans l'échantillon.

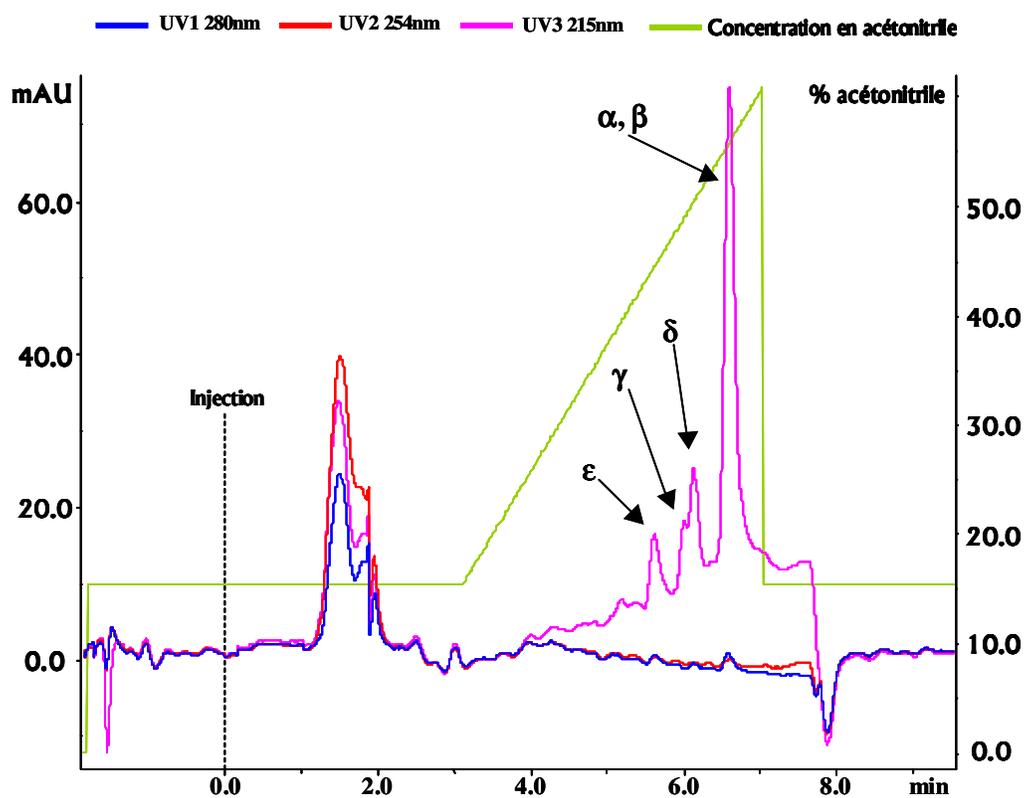
En calculant le nombre théorique de deutériums incorporables aux positions amides des liaisons peptidiques de l'insuline ( $N=n-1$  ; N est le nombre de deutériums incorporables aux positions amide, n le nombre d'acides aminés), on peut calculer le pourcentage de rééchange  $((m_0\%-m_{100\%})/N$  ; où  $m_0\%$  est la masse de l'échantillon non deutéré,  $m_{100\%}$  est la masse de l'échantillon totalement échangé et N est le nombre théorique de deutériums incorporables aux positions amide des liaisons peptidiques). Le pourcentage de rééchange passe de 14% dans le cas de l'expérience témoin à 56% lorsque l'échantillon subit une préparation par HPLC. Malgré un temps de rétention assez faible (de l'ordre de 10 minutes) et le refroidissement du système, le taux de rééchange est beaucoup trop important pour permettre de réaliser des expériences d'échange isotopique interprétables en utilisant ce système de séparation.

Nous avons réalisé le même type d'expérience avec le cytochrome c pour savoir si ce fort taux de rééchange était propre à l'insuline. Nous avons obtenu des valeurs de rééchange comparables avec celles observées pour l'insuline.

## Augmentation du débit lors de la séparation HPLC

Une des possibilités pour tenter de diminuer le temps de passage de l'échantillon au travers du système HPLC est l'utilisation d'une colonne macroporeuse. Nous avons utilisé une colonne Poros R2 (ID 4.6mm ×50 mm, particules de 10 µm) qui permet des débits plus importants (4 ml/ mn) et donc des temps de séjour dans la colonne plus courts. Dans ce cas, la sous-unité  $\epsilon$  a un temps de rétention de 6 minutes (Figure 4.6.) après chromatographie en gradient linéaire (de 15 à 60% d'acétonitrile).

Nous avons ensuite évalué le taux de rééchange dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant l'insuline. Le taux de rééchange n'est pas suffisant car celui-ci reste dans ce cas de 48%.



```

----- Block : Main -----
mn
0.0 Base Volume,0.96 {ml},Poros R2 1 ml
0.0 Flow 4 {ml/min}
0.0 Alarm_Pressure Enabled,4 {MPa},0.0 {MPa}
0.0 Gradient 15 {%B},0.00 {base}
0.0 BufferValveA1 All
0.0 PumpBInlet B1
0.0 PumpAInlet A1
0.0 InjectionValve Load
0.0 ColumnPosition Position7
0.0 OutletValve WasteF1
0.0 Wavelength 280 {nm},254 {nm},215 {nm}
1.2 Gradient 15 {%B}, 0.00 {base}
1.2 AlaPressure Enabled,3.3 {MPa},0.0 {MPa}
1.2 AutoZeroUV
1.2 InjectionValve Inject
1.2 OutletValve WasteF1
1.32 FeedTube
1.5 InjectionValve Load
1.57 FeedTube
1.82 FeedTube
2.07 FeedTube
2.32 FeedTube
2.5 FeedTube
2.5 Gradient 15 {%B}, 0.00 {base}
2.5 Gradient 60 {%B}, 12 {base}
4.25 Fraction Collector 0.25 {ml}
6.30 Fractionation Stop
7 Gradient 15 {%B}, 0 {base}
8 Gradient 15 {%B}, 7.5 {base}

```

Figure 4.6. Chromatogramme RP-HPLC du secteur F1-ATPase (Poros, Äkta Explorer AP biotech). En dessous figure la méthode utilisée.

### Réduction du taux de rééchange par la méthode ZipTip

La solution apportée pour réduire de façon importante le taux de rééchange a été trouvée par l'utilisation de cônes contenant un support C18 greffé (particules de 15  $\mu\text{m}$ , pores de 200 Å, ZipTip Millipore). Les ZipTips sont couramment utilisés en spectrométrie de masse pour dessaler les échantillons. Ils sont également utilisés pour simplifier des mélanges complexes de peptides en réalisant des éluions fractionnées. Le volume de la phase C18 est de 0.6  $\mu\text{l}$ . Les ZipTips sont recommandés pour le traitement d'échantillon dont la masse moléculaire est inférieure à 20 kDa. Nous avons préparés le ZipTip C18 en les équilibrant avec une solution eau, 0.1% TFA. Nous avons ensuite chargé la phase du ZipTip avec 15 picomoles de la suspension de F1-ATPase dans un volume de 5  $\mu\text{l}$ . La fraction d'éluion est constituée par un mélange eau/acétonitrile 20%, 0.1% TFA dans un volume de 2  $\mu\text{l}$ . 1  $\mu\text{l}$  de la fraction d'éluion est utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse MALDI ToF. La purification de la sous-unité  $\epsilon$  à partir du complexe F1-ATPase est réalisée en 45 secondes environ. La figure 4.7. montre l'analyse en MALDI-MS de la fraction.

Nous avons voulu évaluer l'effet de la préparation ZipTip sur le taux de rééchange. Nous avons donc utilisé l'insuline de la même manière que précédemment. Pour cette évaluation, les solutions de conditionnement et d'éluion du ZIPTIP sont conservées sur glace à 0°C. Les ZipTips sont également conservés à 0°C. Le taux de rééchange suite au traitement ZipTip est de 16% dans nos conditions d'analyse. Le taux de rééchange inhérent à la préparation de l'échantillon est donc considérablement réduit et nous avons retenu cette méthode.

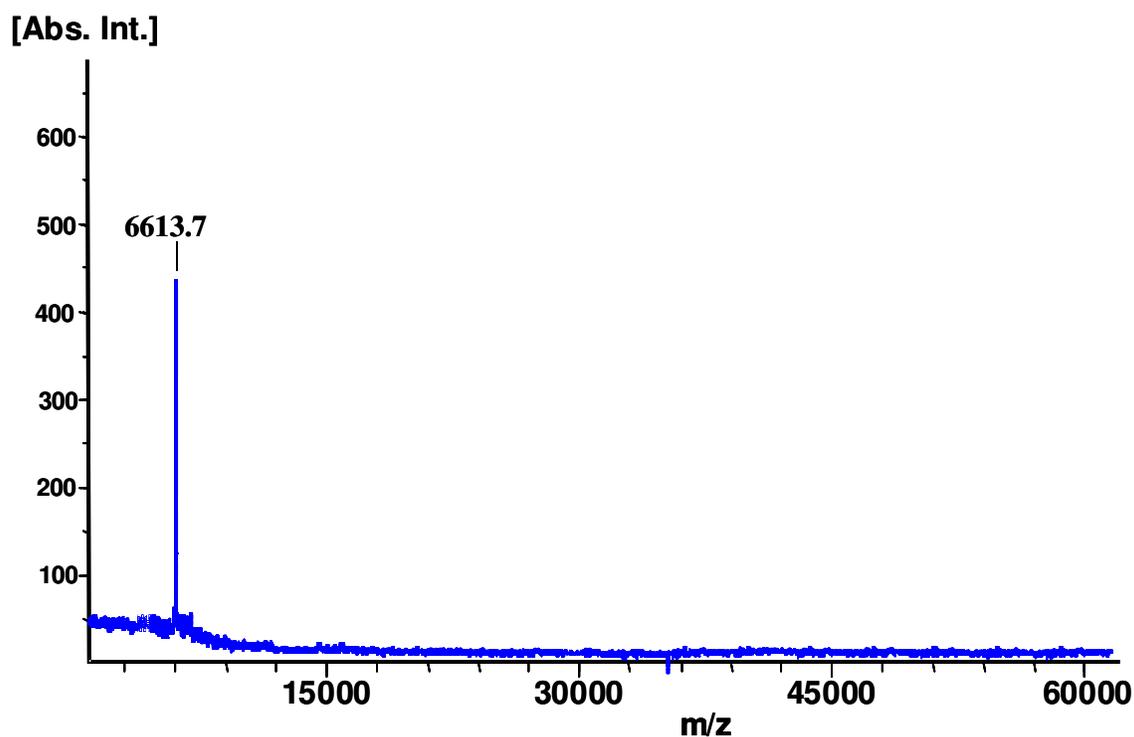


Figure 4.7. Spectre MALDI ToF de la sous-unité  $\epsilon$  isolée du complexe F1-ATPase chromatographie ZipTip (masse calculée : 6613.6 pour l'ion  $\text{MH}^+$ )

## 4. Etude cinétique de l'incorporation de deutérium dans la sous-unité $\epsilon$ au sein du complexe F1-ATPase.

### 4.1. Introduction

Pour initier une étude d'échange isotopique hydrogène/deutérium il est indispensable de réaliser la cinétique de l'incorporation du deutérium dans la sous-unité étudiée. Cette étude permet de distinguer différentes populations d'atomes d'hydrogène ayant des caractéristiques communes lors de l'échange isotopique. Nous avons réalisé une étude cinétique de la sous-unité  $\epsilon$  dans le complexe F1-ATPase.

### 4.2. Protocole expérimental

*Echange isotopique hydrogène/deutérium sur le complexe F1-ATPase*

20  $\mu$ l de la suspension de sulfate d'ammonium contenant le complexe F1-ATPase (7 mg/ml) sont centrifugés 10 minutes à 10 000 g. Le culot est alors repris dans 80  $\mu$ l de  $D_2O$ . Après le temps d'incubation désiré à 25°C, 4  $\mu$ l (45 picomoles) de la solution de F1 ATPase sont chargés sur un ZipTipC18 pour séparer la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1-ATPase (cf. 2.3.-*Reduction du taux de rééchange par la méthode ZipTip*). 1  $\mu$ l de la fraction d'éluion contenant la sous-unité  $\epsilon$  est alors mélangé à 1  $\mu$ l de matrice (acide  $\alpha$ -cyano-4 hydroxycinnamique (10 mg/ml), acétonitrile 50%, éthanol 50%, 0.1% TFA, conservé sur glace). 0.5  $\mu$ l du mélange échantillon/matrice est déposé sur cible et séché par flux d'azote. Aussitôt après cristallisation, la cible est introduite dans la source du spectromètre de masse MALDI ToF.

*Calcul des taux d'échange*

Le nombre d'atomes de deutérium incorporés dans la sous-unité  $\epsilon$  pour chaque temps d'incubation est déterminé par l'incrément de masse observé sur la sous-unité  $\epsilon$  deutérée en la comparant à une expérience réalisée dans les mêmes conditions sur une sous-unité  $\epsilon$  non deutérée.

Ainsi 
$$D_t = m_{100\%} - m_{0\%}$$

Où :  $D_t$  est le nombre de deutérons après le temps d'incubation  $t$

$m_{100\%}$  : la masse de la protéine après incubation dans le deutérium pendant le temps d'incubation  $t$

$m_{0\%}$  : la masse de la protéine sans incubation dans le deutérium.

A partir du nombre d'atomes de deutérium incorporé, on peut obtenir le nombre d'hydrogènes échangeables présents après le temps  $t$ .

$$H_t = H_{th} - D_t$$

Où :  $H_t$  est le nombre d'hydrogènes échangeables encore présents au niveau de la protéine après le temps d'incubation  $t$ .

$H_{th}$  est le nombre total théorique d'hydrogènes échangeables au niveau de la protéine.

*NB : Ici, on considère comme échangeable uniquement les atomes d'hydrogène qui échangent de manière stable pour une détection en spectrométrie de masse. Il s'agit des hydrogènes présents au niveau des amides des liaisons peptidiques de la protéine. Les hydrogènes des chaînes latérales (hydroxyle ou amide) et les hydrogènes des deux extrémités de la protéine ( $-NH_2$  et  $COOH$ ), ne sont pas considérés comme observables dans nos conditions expérimentales.*

A partir de ces données, on peut calculer le taux d'échange d'une population d'atomes d'hydrogène dans une protéine. La réaction d'échange entre l'hydrogène et le deutérium au sein d'une protéine suit une cinétique d'ordre 1<sup>248</sup>. On peut donc caractériser cette réaction par l'équation :

$$(1/H_t) \cdot H_t = e^{(-k_{ex} \cdot t)}$$

Où :  $H_t$  est le nombre d'hydrogènes échangeables encore présents au niveau de la protéine après le temps d'incubation  $t$ .

$H_{th}$  est le nombre total théorique d'hydrogènes échangeables au niveau de la protéine.

$k_{ex}$  est la constante de vitesse  $\text{min}^{-1}$ , c'est aussi le taux d'échange.

$t$  est le temps d'incubation dans le solvant deutérium en minutes

Si l'on représente  $\ln(H)$  en fonction du temps, les points obtenus laissent apparaître des droites distinctes dont les pentes sont les taux d'échange des différentes populations d'hydrogènes échangeables de la protéine étudiée.

A partir des taux d'échange, on peut calculer la demi-vie des hydrogènes échangeables en utilisant la relation :

$$t_{(1/2)} = (\ln 2 / k_{ex})$$

Où:  $t_{(1/2)}$  est le temps de demi-vie des hydrogènes échangeables

$k_{ex}$  est le taux d'échange des hydrogènes considérés.

#### *Intégrité structurale du complexe F1-ATPase*

Le complexe F1-ATPase a la propriété d'hydrolyser l'ATP. Un dosage de l'activité d'hydrolyse de l'ATP par le complexe F1-ATPase nous permet de contrôler l'intégrité structurale du complexe.

On incube 8 à 10  $\mu\text{g}$  de la préparation de F1-ATPase à 30°C pendant 2 minutes dans 900  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant 50 mM de Tris/SO<sub>4</sub> pH 8.5, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, D<sub>2</sub>O. La réaction est déclenchée par addition de 100  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique. La solution est centrifugée 7 minutes à 10 000g. Un aliquot de 0.5 ml du surnageant est utilisé pour un dosage colorimétrique du phosphate inorganique. Cet aliquot est mélangé à 2.5 ml d'acide sulfonique 0.75 N, 1 mM de sulfate ferrique et 0.1 mM heptamolybdate, et incubé à température ambiante pendant 15 minutes. La concentration en phosphate inorganique a été déterminée par un spectrophotomètre à 610 nm.

Les résultats du dosage de l'activité du complexe F1-ATPase indiquent que la présence de D<sub>2</sub>O n'a pas un effet significatif sur la capacité de ce complexe à hydrolyser l'ATP. Les expériences d'échange sont donc réalisées sur un complexe F1-ATPase fonctionnel.

### **4.3. Résultats**

Nous avons réalisé notre étude cinétique dans un intervalle de temps compris entre 2 et 2000 minutes. Lorsque la sous-unité  $\epsilon$  est insérée dans le complexe F1-ATPase, l'incorporation de deutérium est très rapide pendant les 20 premières minutes d'incubation (Figure 4.8.). Après 20 minutes, l'incorporation

<sup>248</sup> Liu, Y.Q.; Smith, D.L. Probing high order structure of proteins by fast-atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **5**, 19-28, 1994

du deutérium est très lente voire nulle. Cette étude cinétique indique qu'un grand nombre d'hydrogènes aux positions amides susceptibles d'être échangés vont être protégés au sein du complexe F1-ATPase.

Les hydrogènes échangeables sont classés suivant trois principales catégories<sup>249</sup> :

- Les hydrogènes qui échangent très rapidement : ils échangent avec des temps d'incubation compris entre 0 et 2 minutes.
- Les hydrogènes qui échangent de manière intermédiaire : ils sont échangés entre 2 et 1000 minutes.
- Enfin, l'échange lent correspond aux hydrogènes qui s'échangent après 1000 minutes.

Dans notre expérience de cinétique, après 2 minutes d'incubation, 29 hydrogènes de la sous-unité  $\epsilon$  sont échangés. Ces hydrogènes correspondent à l'échange rapide qui affecte les atomes les plus exposés au solvant deutéré (Figure 2A).

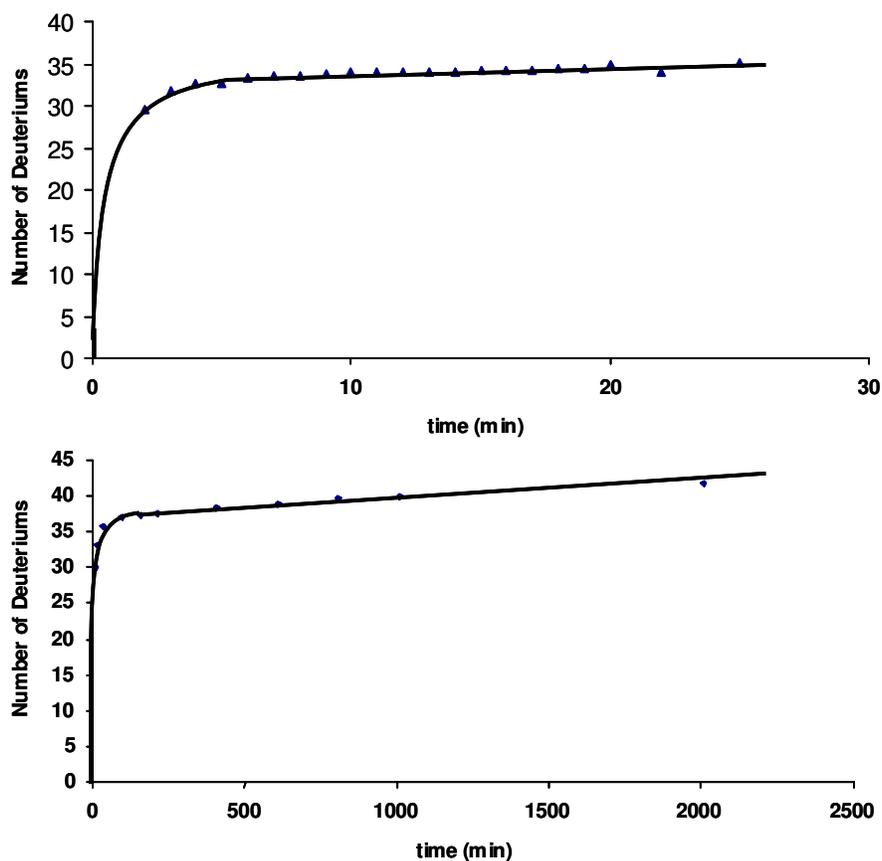
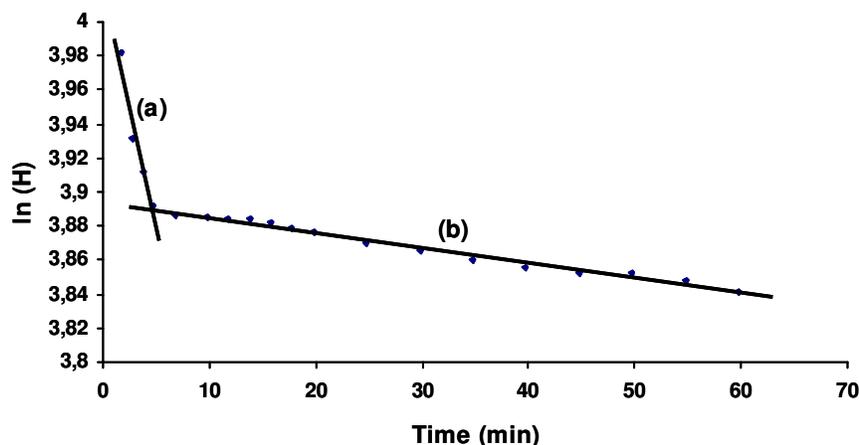


Figure 4.8. Cinétique d'incorporation du deutérium dans la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1-ATPase

<sup>249</sup> Engen, J.R., Smith, D. L. Analysis of proteins with hydrogen exchange and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 256A-265A, 2001

Les atomes d'hydrogène correspondant à l'échange intermédiaire (temps d'incubation entre 2 et 1000 minutes) sont au nombre de 10 (Figure 2B). Ainsi 1000 minutes, 39 hydrogènes ont été échangés. A partir des données d'échange des hydrogènes, en représentant  $\ln [H]$  en fonction du temps (figure), les 10 hydrogènes correspondant à l'échange intermédiaire peuvent être subdivisés en deux sous-populations. Une première, se compose de trois atomes d'hydrogène qui ont une demi-vie de 24 minutes. La deuxième sous-population se compose de 7 hydrogènes ayant une demi-vie de 69 minutes.



**Figure 4.9.** Détermination des taux d'échange des hydrogènes échangeables de la sous-unité  $\epsilon$ . On distingue deux sous populations pour l'échange intermédiaire ayant des taux d'échange différents (a :  $t_{1/2} = 24$  min et b :  $t_{1/2} = 69$  min)

Enfin, entre 1000 et 2000 minutes, seulement 2 hydrogènes échangent et correspondent à l'échange lent. Après 2000 minutes d'incubation, seulement 49 atomes d'hydrogène sur les 60 possibles ont été échangés.

Des expériences d'échange sur la sous-unité  $\epsilon$  isolée ont été menées pour évaluer l'effet de la préparation de l'échantillon sur le rééchange. Pour cela, la sous-unité  $\epsilon$  a été séparée du complexe F1-ATPase par chromatographie sur ZipTipC18. Cette sous-unité isolée a été incubée 1000 minutes dans le solvant deutéré. Après l'incubation, l'échantillon subit une nouvelle micro-chromatographie, suivie de la préparation pour l'analyse en spectrométrie de masse MALDI. Le taux de rééchange calculé est compris entre 5 et 12%.

L'ensemble des hydrogènes susceptibles d'être échangés est au nombre de 60, qui correspond au nombre de liaisons peptidiques dans la sous-unité  $\epsilon$ . Nous avons évalué le rééchange du à la préparation de l'échantillon entre 5 et 16%. Ainsi, environ 3 à 7 atomes d'hydrogène pourraient être rééchangés durant la préparation. Le maximum d'hydrogènes échangés dans notre expérience de cinétique est de 49, échangés après un temps d'incubation de 2000 minutes. Si l'on combine cette donnée avec celle

concernant le rééchange il apparaît qu'entre 4 et 8 hydrogènes restent insensibles à l'incubation dans le solvant deutéré. Ces hydrogènes doivent être impliqués dans les interactions non covalentes impliquant probablement la sous-unité  $\epsilon$  et les sous-unités  $\gamma$  et  $\delta$  au sein du complexe F1-ATPase.

Pour étudier plus précisément la topologie de l'échange isotopique, nous avons réalisé une empreinte de digestion de la sous-unité  $\epsilon$ . Après échange, on réalise une protéolyse avec la pepsine en conditions d'échange figé (pH 2, 0°C). La détermination du taux d'échange pour les peptides d' $\epsilon$  générés par la protéolyse permet d'analyser l'incorporation de deutérium le long de la séquence primaire de cette sous-unité.

## 5. Empreinte de digestion de la sous-unité $\epsilon$

### 5.1. La pepsine immobilisée

Pour permettre de préciser les régions de la sous-unité  $\epsilon$  les plus accessibles au solvant, une protéolyse est réalisée. Pour réaliser l'empreinte de digestion de la sous-unité  $\epsilon$ , on utilise la pepsine. Cette enzyme a l'avantage d'être active dans les conditions de quench d'échange (pH 2, 0°C). Cependant, cette enzyme est aspécifique. Enfin, l'enzyme est immobilisée sur des billes d'agarose ce qui permet une séparation rapide de l'enzyme et de l'échantillon par centrifugation après la protéolyse.

### 5.2. Protocole expérimental

De nombreux essais concernant le temps d'incubation et le rapport enzyme/substrat ont été effectués pour optimiser les résultats de la protéolyse. La sous-unité  $\epsilon$  (20 pmoles, dans 5  $\mu$ l, 20% acetonitrile, 0.01% TFA, 0°C) subit une digestion par 45 unités de pepsine immobilisée (15  $\mu$ l, 0.1% TFA). Après incubation sous forte agitation (0°C, 10 minutes), le mélange est centrifugé (10 000g, 45 secondes) pour séparer l'enzyme du produit de la digestion. 1  $\mu$ l du surnageant (2 pmoles) est mélangé à la matrice avant d'être analysé par spectrométrie de masse MALDI ToF en mode réflectron

### 5.3. Assignation des fragments de digestion

A partir de la sous-unité  $\epsilon$  (6612 Da), nous avons obtenu de nombreux fragments dont les masses sont comprises entre 1000 et 2500 Da.

L'étape suivante est l'assignation d'un fragment de masse  $m$  à sa séquence primaire dans la sous-unité  $\epsilon$ . La complexité d'une telle assignation réside principalement dans le fait que la pepsine est aspécifique et est susceptible de générer n'importe quelle longueur de fragment.

Pour un fragment de masse  $m$ , il apparaît plusieurs possibilités lors de l'assignation :

- A un peptide de masse  $M$  correspond un segment unique dans la séquence de  $\epsilon$  avec une justesse de 20 ppm. Nous considérons alors que ce peptide est assigné.
- A un peptide de masse  $M$  correspondent au moins deux séquences possibles dans la structure primaire de  $\epsilon$  avec une justesse de 20 ppm. Deux nouvelles possibilités s'offrent alors à nous :

- L'isolement du massif isotopique est suffisant pour nous permettre de procéder à une analyse de spectrométrie de masse de type PSD pour le MALDI ToF (fenêtre de 10 Da de part et d'autre du massif isotopique), ou de type CID pour le piège ionique (fenêtre de 2 Da de part et d'autre du massif isotopique).
  - ❖ Le résultat de l'analyse de spectrométrie de masse en tandem révèle que l'ion parent est composé de plusieurs peptides isobares que la résolution du MALDI n'a pas pu permettre de séparer dans l'analyse en mode simple MS. Dans ce cas, on ne peut attribuer à un massif isotopique donné, une séquence primaire de la sous-unité  $\epsilon$ . Ce type de peptide est exclu de la suite de l'étude.
  - ❖ Le résultat de l'analyse de spectrométrie de masse en tandem révèle que l'ion parent est composé d'une seule entité qui est de ce fait assignée à un segment de la séquence de  $\epsilon$ .
- L'isolement du massif isotopique n'est pas suffisant pour permettre une analyse par spectrométrie de masse en mode PSD ou CID. On ne peut alors assigner ce fragment.

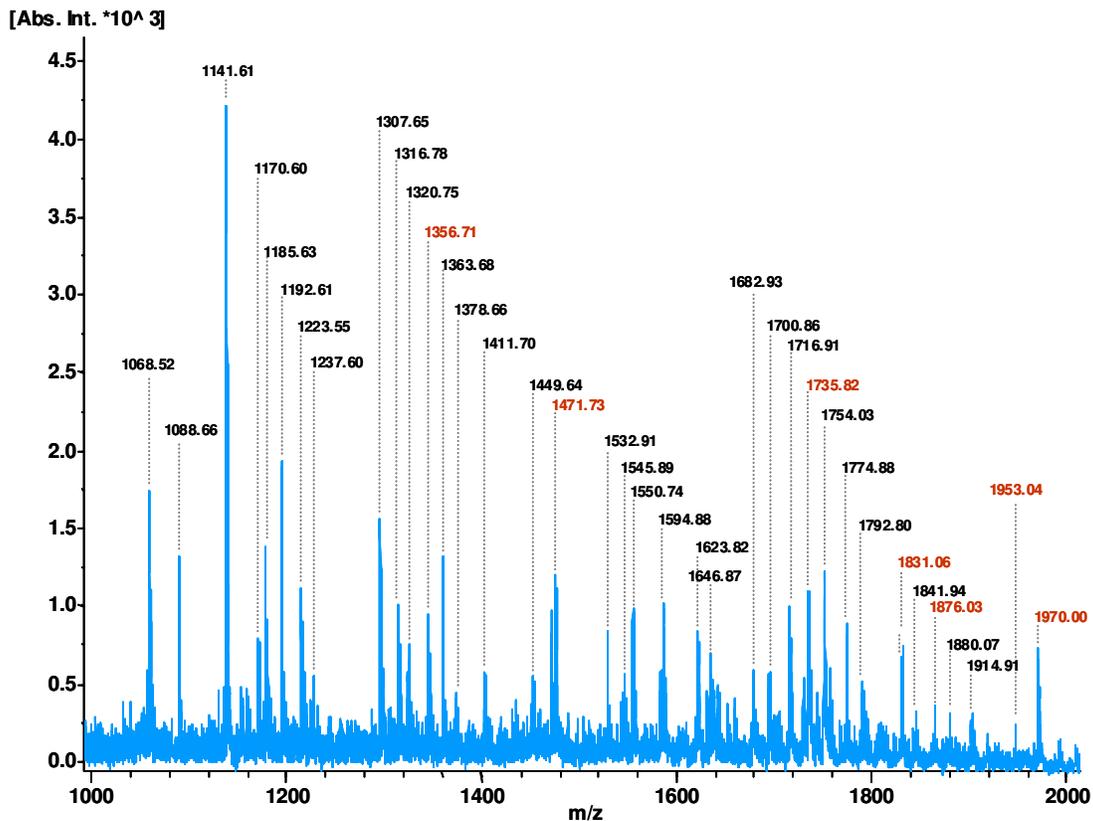


Fig.4.10. Spectre MALDI ToF d'une préparation de sous-unité  $\epsilon$  clivée par la pepsine immobilisée (10 minutes, pH 2.5, 0°C).

Masse mesurées MH <sup>+</sup>	Masses calculés	Séquences peptidiques	Position	Masse EXP MH <sup>+</sup>	Masses calculées	Séquences peptidiques	Position
1068.52	1068.49	QYKNGTAASE	[46-55]	1550.74	1550.71	TDAFY..NGTAA	[40-53]
1088.55	1088.60	LQTASVLNRS	[29-38]		1550.71	AFYTQ..TAASE	[42-55]
	1088.50	RSQDADFYT	[37-45]	1594.88	1594.84	AGISY..AAQAI	[6-21]
1141.61	1141.58	AGISYAYLNV	[6-16]		1594.84	GISYA..AQAIR	[7-22]
	1141.58	GISYAYLNVA	[7-17]	1623.82	1623.88	ISYAA..AQAIR	[8-22]
1170.60	1170.61	KAGISYAYLN	[5-15]		1623.72	SQTDA..YKNGT	[38-51]
	1170.57	SYAAYLNVAQ	[9-19]	1646.87	1646.90	RSSLK..ASVLN	[22-36]
1185.63	1185.61	KNGTAASEPTI	[48-59]		1646.90	SLKTE..VLNRS	[24-38]
1192.61	1192.56	AFYTQYKNGT	[42-51]	1682.93	1682.90	AWRKA..AYLNV	[2-16]
	1192.59	FYTQYKNGTA	[43-52]		1682.90	WRKAG..YLNVA	[3-17]
1223.55	1223.52	SQDADFYTQY	[38-47]	1700.86	1700.82	QTASV..TDAFY	[30-44]
1237.60	1237.61	SVLNRSQDADF	[33-43]		1700.82	ASVLN..AFYTQ	[32-46]
1307.65	1307.59	TDAFYTQYKNG	[40-50]	1716.91	1716.98	AIRSS..TASVL	[20-35]
	1307.56	DAFYTQYKNGT	[41-51]	1735.82	1735.80	NRSQTD..YTQYK	[36-49]
1316.78	1316.75	AQAIRSSLKTEL	[18-29]	1754.03	1753.93	AWRKA..YLNVA	[2-17]
	1316.74	LKTELQTASVLN	[25-36]		1753.95	WRKAG..LNVA	[3-18]
1320.75	1320.71	RSSLKTELQTAS	[22-33]	1774.88	1774.96	AAQAI..LQTAS	[17-33]
1356.71	1356.72	AWRKAGISYAA	[2-13]		1774.96	SLKTE..LNRSQ	[24-39]
1363.68	1363.73	AYLNV..AIRSS	[12-24]		1774.82	FYTQY..SEPTP	[43-58]
	1363.64	QYKNG..SEPTP	[46-58]	1792.80	1792.85	SVLNR..SEPTP	[33-47]
1378.66	1378.62	QDADFYTQYKN	[39-49]		1792.82	NRSQT..QYKNG	[36-50]
	1378.62	DAFYTQYKNGTA	[41-52]	1831.06	1831.03	AIRSSLK..TASVLN	[20-36]
1411.70	1411.75	KAGIS..LNVA	[5-18]	1841.94	1842.04	LNVA..KTELQ	[14-30]
	1411.72	AGISY..NVAQ	[6-19]		1841.89	YTQYK..PTPIT	[44-60]
	1411.72	GISYA..VAAQA	[7-20]	1876.03	1876.01	SLKTEL..VLNRSQT	[24-40]
1449.71	1449.66	DAFYT..NGTAA	[41-53]	1880.07	1880.03	RKAGI..AAQAI	[4-21]
	1449.58	YKNGT..PTPIT	[47-60]		1880.01	KAGIS..AQAIR	[5-22]
1471.73	1471.72	ASVLNRSQDADF	[32-44]	1914.91	1914.95	LQTAS..DAFYT	[29-45]
1532.91	1532.96	IRSSL..QTASV	[21-34]		1914.95	QTASV..AFYTQ	[30-46]
	1532.86	RSSLK..TASVL	[22-35]	1953.04	1953.03	AWRKA..NVAQ	[2-19]
1545.89	1545.86	AQAIR..TELQT	[18-31]		1953.06	WRKAG..VAAQA	[3-20]
	1545.86	QAIRS..ELQTA	[19-32]	1970.00	1969.99	YTQYKNG..TPIKYK	[44-61]

Fig. 4.11. Tableau d'assignation des peptides résultant de la protéolyse de la sous-unité  $\epsilon$  à la pepsine. Masses calculées à l'aide du logiciel GPMW.

Dans le cas de la spectrométrie de masse en tandem, un ion précurseur est fragmenté pour donner des ions fils. La liste des masses des ions fragments est comparée à celle des ions fils générés *in-silico* pour toutes les séquences primaires possibles de la sous-unité  $\epsilon$  correspondant à la masse de l'ion parent avec un écart de +/- 20 ppm. La protéolyse de la sous-unité  $\epsilon$  dans nos conditions expérimentales engendre une trentaine de pics (figure 4.10.). Pour la suite, nous nous attacherons à assigner un nombre suffisant de fragments pour disposer d'une couverture satisfaisante de la séquence de la sous-unité  $\epsilon$ . La plupart des fragments obtenus ne sont pas assignables directement car ils peuvent correspondre à plusieurs segments de la sous-unité  $\epsilon$  (Figure 4.11). Cependant, 6 fragments peuvent être assignés de manière non ambiguë car leur masse ne correspond qu'à un seul fragment dans un intervalle de 20 ppm (Figure 4.12.). Ces 6 fragments permettent de couvrir 67% de la séquence primaire.

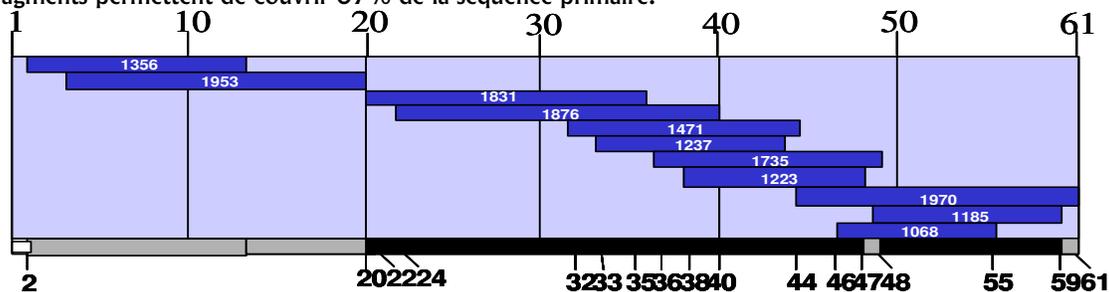


Figure 4.12. Couverture de séquence primaire de la sous-unité  $\epsilon$  par les peptides résultant de la protéolyse.

Pour améliorer le taux de couverture de séquence, nous avons procédé à une analyse en couplage LC-MS/MS des fragments de la sous unité  $\epsilon$  protéolysée par la pepsine. Cette analyse a conduit à une amélioration notable du pourcentage de couverture qui atteint alors 98% avec 8 fragments assignés avec certitude.

L'assignation des fragments de digestion à leur séquence primaire est une étape cruciale de l'analyse topologique de l'accessibilité des différentes régions de la sous-unité  $\epsilon$  au solvant deutéré. Une mauvaise assignation conduit inmanquablement à une interprétation erronée du résultat des expériences d'échange isotopique. De plus, cette couverture de séquence doit être aussi complète que possible.

## **6. Etude isolée par échange isotopique hydrogène/deutérium de la sous-unité $\epsilon$**

### **6.1. Introduction**

Des études antérieures réalisées à l'Unité de Biophysique Structurale de l'Université de Bordeaux I ont porté sur la structuration de la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1-ATPase de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine avait été obtenue par synthèse peptidique<sup>250</sup>. L'analyse par dichroïsme circulaire en présence de concentrations croissantes d'acétonitrile indique que la sous unité  $\epsilon$  est non structurée dans l'eau pure. L'augmentation de la concentration en acétonitrile (entre 0 et 40 %) provoque une structuration en hélice  $\alpha$ . De plus, le rapport  $\Delta_{220}/\Delta_{208}$  d'environ 0.8, indique une structure en hélice simple brin pour une concentration de 40% d'acétonitrile<sup>251</sup>. Au delà de 70% d'acétonitrile, cette structuration est abolie comme nous le vérifierons par la suite.

Nous avons étudié l'effet de la structuration en hélice  $\alpha$  sur l'incorporation de deutérium au sein de la sous-unité  $\epsilon$  au court de l'échange isotopique. En effet, la formation d'une hélice  $\alpha$  nécessite la mobilisation des hydrogènes amides des liaisons peptidiques qui stabilisent la structure en formant des liaisons hydrogène. La formation d'une telle structure devrait perturber l'incorporation de deutérium au cours des expériences d'échange isotopique.

### **6.2. Effet de la structuration sur l'incorporation globale de deutérium**

Pour réaliser cette étude nous avons purifié la sous-unité  $\epsilon$  à partir du complexe F1 ATPase en utilisant la technique de microchromatographie sur ZipTip (c.f. 3.). Cette purification permet l'obtention de 25 picomoles de sous-unité  $\epsilon$  dans 2  $\mu$ l, 20 % acétonitrile, 0.1% TFA. Dans ces conditions de bas pH (pH

<sup>250</sup> Aznar-Derunes, C., Manigand, C., Picard, P., Dautant, A., Goetz, M., Schmitter, J.M., Precigoux, G. Study of the yeast *saccharomyces cerevisiae* F1FO-ATPase  $\epsilon$ -subunit. *J. Pep. Sci.*, **8**, 365-372, 2002

<sup>251</sup> Goetz, M., Carlotti, C., Bontems, F., Dufourc, E.J. Evidence for an  $\alpha$  helix/ $\pi$ -bulge helicity modulation for the neu/erbB-2 membrane-spanning segment. A H NMR and circular dichroism study. *Biochemistry*, **40**, 6534-6540, 2001.

2.5), la sous-unité  $\epsilon$  est non structurée. Pour éliminer l'acide trifluoroacétique on sèche la solution purifiée à l'aide d'un flux d'azote.

La sous-unité  $\epsilon$  ainsi isolée est reprise dans une solution de  $D_2O$  contenant des concentrations croissantes d'acétonitrile (0%, 20%, 30%, 40%) dans un volume final de 10  $\mu$ l. Après une sonication de quelques secondes, l'échantillon est incubé 10 minutes à 25° C.

Après incubation, 1  $\mu$ l de l'échantillon est mélangé à 1  $\mu$ l de solution de matrice (acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique dans une solution contenant 50% acétonitrile, 50% éthanol, 0.1% TFA, 0°C, pH 2.5) comme décrit précédemment avant d'être déposé sur la cible MALDI sous un flux d'azote. Ce flux d'azote permet d'abaisser le taux de rééchange en isolant l'échantillon des molécules d'eau atmosphériques. Suite à la cristallisation, qui est obtenue après une dizaine de secondes, la cible est directement introduite dans le spectromètre et l'analyse est effectuée en mode linéaire. L'incrément de masse est déterminé en comparant la masse de l'échantillon deutéré avec un échantillon n'ayant pas subi d'échange.

Les résultats obtenus (figure 15) indiquent que, dans nos conditions expérimentales, l'incorporation maximale de deutérium est obtenue après seulement 60 minutes dans 100 % de  $D_2O$ . Pour permettre l'observation d'un échange partiel sur la sous unité  $\epsilon$ , nous avons utilisé un temps d'incubation de 10 minutes pour ces essais.

Lorsque l'on augmente la concentration de la solution deutérée en acétonitrile (de 0% à 40 %), le nombre d'atomes de deutérium incorporés après 10 minutes diminue significativement. Ainsi, 57 deutérons sont incorporés après incubation dans une solution contenant 100% de  $D_2O$  alors que 52 deutérons sont incorporés lorsque la sous-unité est incubée dans une solution contenant 20 % d'ACN, 47 après incubation dans une solution contenant 30 % d'acétonitrile. Enfin, 44 sont incorporés après incubation dans une solution contenant 40 % d'acétonitrile (Figure 4.13.). Lorsque l'on augmente la concentration en acétonitrile au-delà de 40 %, l'incorporation de deutérium au sein de la sous-unité  $\epsilon$  augmente. Ainsi, lorsque l'expérience est réalisée avec une solution de  $D_2O$  contenant 70% d'acétonitrile, la sous-unité  $\epsilon$  incorpore 56 atomes de deutérium. Ce résultat est proche de celui obtenu après une incubation dans une solution de  $D_2O$  100%.

L'incorporation de deutérium est exactement la même lorsque l'on réalise des expériences indépendantes. Le nombre d'atomes de deutérium incorporés est caractéristique de la solution de  $D_2O$  qui a été utilisée. A une concentration en acétonitrile correspond donc un nombre de deutérium déterminé. A chaque concentration en acétonitrile correspond une structuration secondaire pour la sous-unité  $\epsilon$ . L'étude par dichroïsme circulaire indique une augmentation de la structuration en hélice  $\alpha$  dans des solutions contenant des concentrations croissantes d'acétonitrile (de 20% à 40%). La sous-unité est

non structurée dans l'eau. Cette augmentation de structuration se traduit par une baisse de l'incorporation de deutérium lors des expériences d'échanges.

Cette expérience confirme le lien entre structure secondaire et niveau d'échange isotopique. Lorsque l'on augmente la structuration en hélice  $\alpha$  en augmentant la concentration en acétonitrile, on provoque des liaisons hydrogène se formant entre les hydrogènes amides au niveau des liaisons peptidiques de la protéine. Ces hydrogènes amides sont alors moins disponibles pour l'échange, ce qui explique la baisse du niveau d'incorporation des atomes de deutérium.

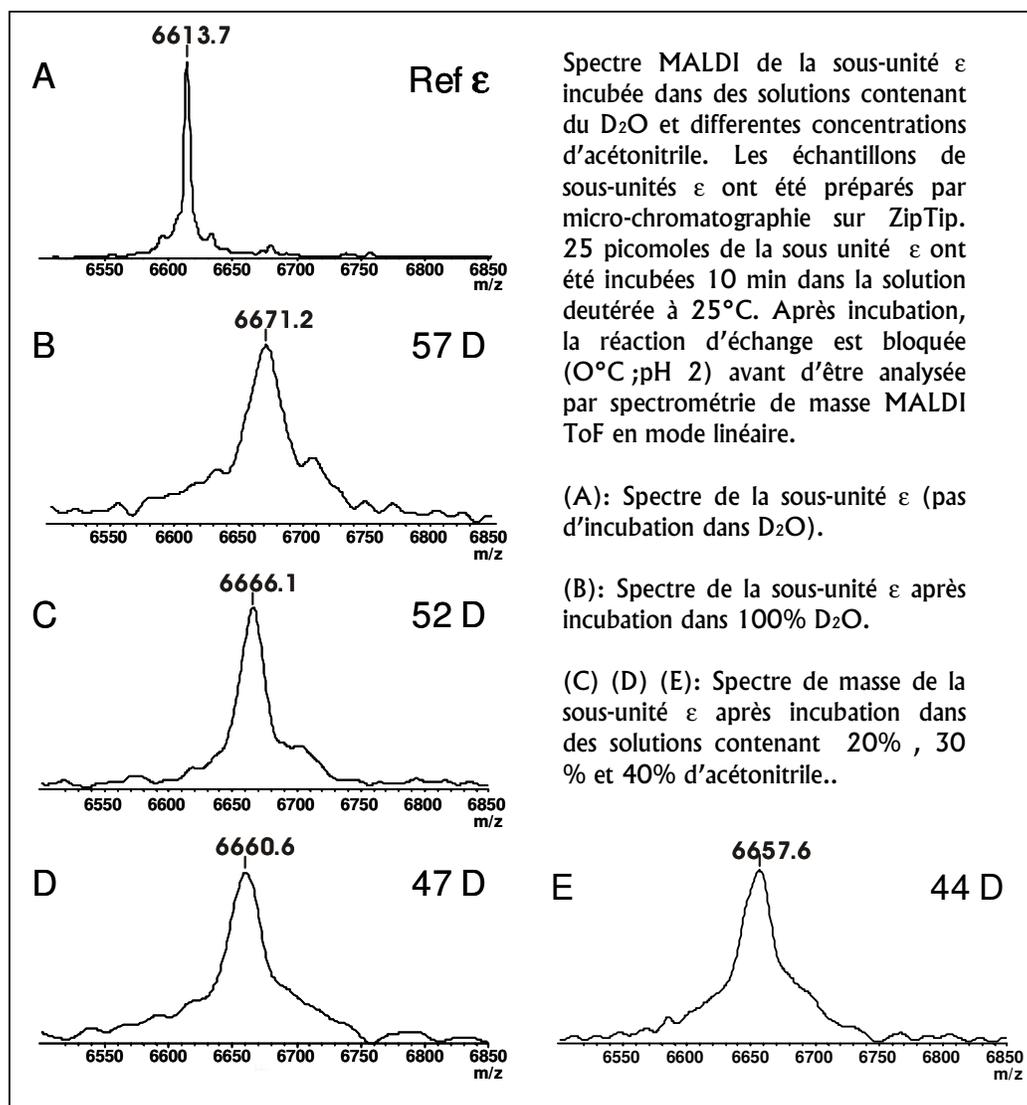


Fig. 4.13 Effet de la structuration secondaire sur l'incorporation de deutérium dans la sous-unité  $\epsilon$

### 6.3. Topologie de l'incorporation du deutérium dans la sous-unité $\epsilon$ isolé.

Nous avons voulu évaluer la corrélation entre les données structurales sur la sous-unité  $\epsilon$  et les résultats de l'échange isotopique en étudiant la topologie de l'incorporation de deutérium. Pour cela, nous avons utilisé l'empreinte de digestion à la pepsine de la sous-unité  $\epsilon$ .

Pour cette étude nous avons isolé comme précédemment la sous-unité  $\epsilon$  par micro-chromatographie. Après purification, l'échantillon (25 picomoles) est repris dans une solution deutérée ( $D_2O$ , 40% acétonitrile, 25°C, pH 7, 5  $\mu$ l) pour un temps d'incubation de 10 minutes. Après incubation, les 5  $\mu$ l d'échantillon sont soumis à protéolyse sous forte agitation (45 unités de pepsine, 0.1% TFA, pH 2.5, 0°C, 10 minutes). Après une courte centrifugation (10 000 g, 30 secondes), 1  $\mu$ l de l'échantillon est prélevé puis mélangé à 1  $\mu$ l de matrice (acide  $\alpha$ -cyano-hydroxy-cinamique, 50% acétonitrile, 50% éthanol, 0.1% TFA, pH 2.5, 0°C). Après cristallisation sous flux d'azote, l'échantillon est analysé par spectrométrie de masse MALDI en mode réflectron.

Les résultats obtenus (figure 4.14.) indiquent que le peptide [3-20] est le peptide qui incorpore le moins de deutérium. Ces données sont parfaitement compatibles avec l'existence d'une hélice  $\alpha$  dans la région [13-23] dans la structure 3-D de la sous-unité  $\epsilon$  de l'ATPase<sup>252</sup>.

Pour cette étude, nous avons utilisé un temps d'incubation de 10 minutes. Pour des temps d'incubation plus importants, le contraste d'échange le long de la séquence primaire de la sous-unité  $\epsilon$  est moins fort. La structure secondaire qui implique des liaisons hydrogène ne permet pas d'occulter définitivement les hydrogènes des fonctions amides des liaisons peptidiques à l'échange. Au-delà de 10 minutes, ces positions finissent par être affectées par l'échange.

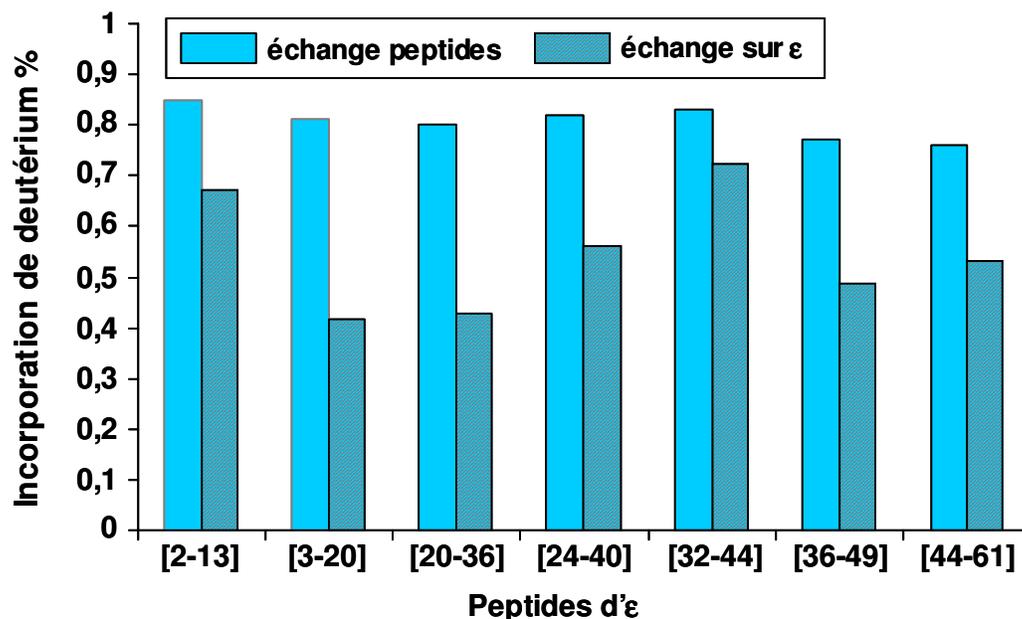


Fig. 4.14. Topologie de l'incorporation de deutérium au sein de la sous-unité  $\epsilon$  après échange sur la sous-unité isolée

<sup>252</sup> Gibbons, C., Montgomery, M.G., Lesli, A.G.W., Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-1061, 2000.

## **7. Analyse topologique des zones d'accessibilité au solvant deutéré de la sous-unité $\epsilon$ au sein du complexe F1 ATPase.**

### **7.1. Introduction**

Pour étudier l'accessibilité des hydrogènes échangeables de la sous-unité  $\epsilon$  au solvant deutéré nous avons réalisé des expériences d'échange isotopique sur le complexe F1-ATPase natif. L'étude cinétique de l'incorporation du deutérium au sein de la sous-unité  $\epsilon$ , lorsque cette sous-unité est insérée dans le complexe F1 ATPase, a indiqué que de nombreuses positions restent insensibles à la présence du solvant deutéré au delà de 20 minutes d'échange. La plupart des hydrogènes sont échangés dans les 20 premières minutes. Ensuite l'incorporation du deutérium est très lente. Pour déterminer les régions de la sous-unité  $\epsilon$  les plus accessibles au solvant deutéré, une protéolyse à la pepsine a été réalisée.

### **7.2. Protocole expérimentale**

Un aliquot de 10  $\mu$ l de la préparation de F1 ATPase précipitée dans le sulfate d'ammonium (7 mg/ml) est centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. Le culot est alors repris dans 20  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O. Après 20 minutes d'incubation à 25°C, un volume de 4  $\mu$ l de la solution est soumis à une microchromatographie sur ZipTip. La solution de conditionnement, la solution de lavage et la solution d'élution ont été placées à 0°C avant utilisation.

Après une rapide séparation de la sous-unité  $\epsilon$  (45 secondes), les 5  $\mu$ l de la solution d'élution (20% acétonitrile, 0.1% TFA, pH 2.5, 0°C) contenant la sous-unité  $\epsilon$  sont soumis à une digestion à la pepsine immobilisée sous très forte agitation (40  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, 0.1% TFA, pH 2.5).

Après incubation (0°C, 10 minutes), la solution de digestion est centrifugée (30 secondes, 10 000 g) et 1  $\mu$ l du surnageant est prélevé puis mélangé à la matrice avant analyse par spectrométrie de masse MALDI ToF en mode réflectron.

### **7.3. Analyse des résultats**

#### ***Incréments de masses***

A partir des spectres de masse obtenus, les incréments de masse sont calculés en comparant les résultats d'expériences de contrôle (où le complexe n'a pas subi d'échange) et les expériences où le complexe F1 a subi une incubation de 20 minutes dans le solvant deutéré. Pour les expériences de contrôle, l'assignation des masses est faite sur le pic monoisotopique. Pour les spectres après échange, les masses sont attribuées sur le centroïde du massif isotopique (figure 4.15.)

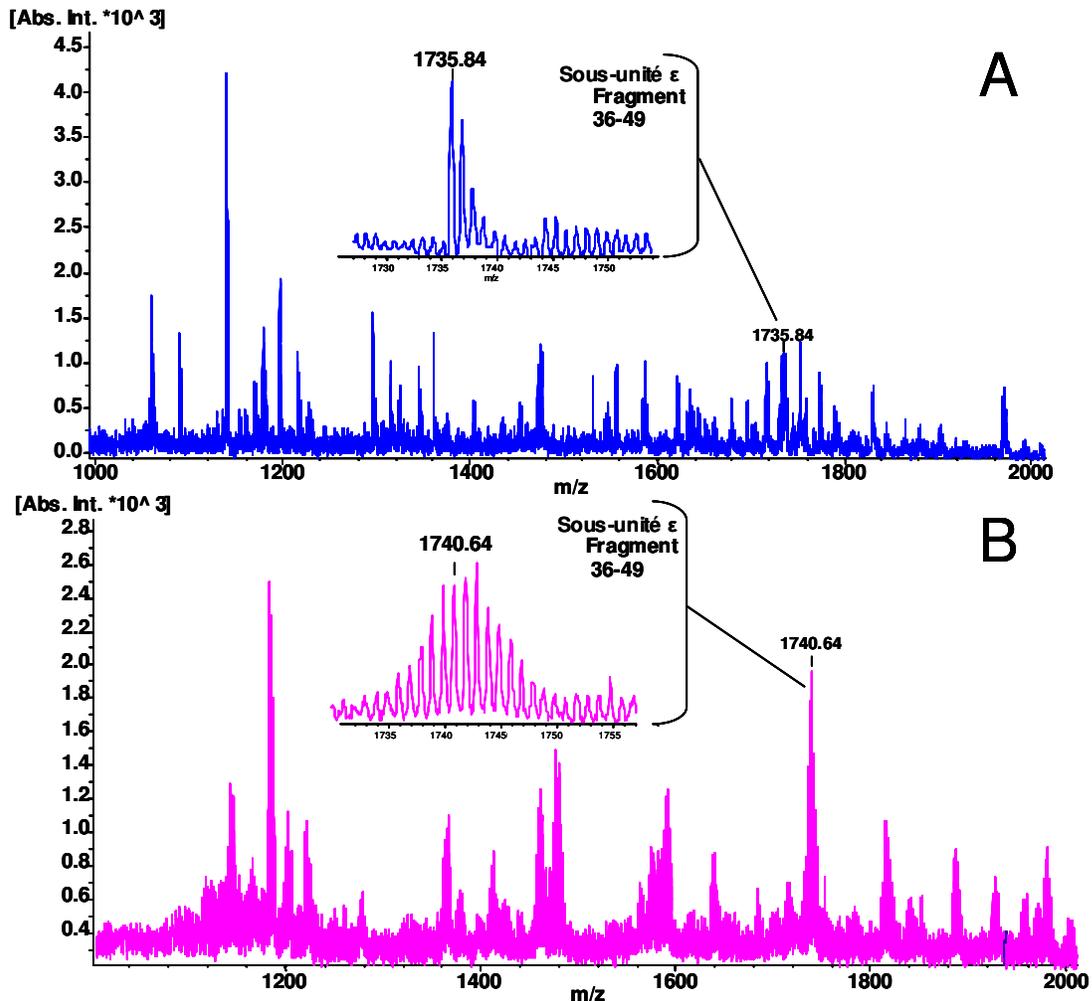


Fig.4.15. Spectre de masse MALDI ToF d'une préparation de sous unité  $\epsilon$  protéolysé à la pepsine. A. Spectre contrôle, la sous-unité  $\epsilon$  a subi une digestion à la pepsine suite à une séparation par micro-chromatographie sur ZipTip C18 à partir du complexe F1 ATPase. B. Idem que A, mais le complexe F1 ATPase a été incubé au préalable 30 minutes dans une solution de D<sub>2</sub>O.

### Peptides considérés

Nous avons précédemment déterminé de manière non ambiguë les séquences de 13 peptides issus de la digestion de la sous-unité  $\epsilon$  à la pepsine immobilisée. 12 de ces peptides ont été assignés car une seule séquence primaire correspondait à la masse du peptide avec une précision de 20 ppm. Le 13<sup>ème</sup> peptide a été assigné à l'aide du couplage LC-MS/MS. Ces 13 peptides n'ont pas pu tous être utilisés pour l'analyse topologique de l'incorporation de deutérium dans la sous-unité  $\epsilon$ . En effet, le spectre échangé révèle de nombreuses différences avec le spectre contrôle, non pas sur la présence des pics, mais sur l'intensité et la lisibilité de ceux-ci. Finalement, 7 peptides couvrant la séquence primaire de la sous-unité  $\epsilon$  ont un signal facilement interprétable après échange H/D. (Tableau 4.1).

Masse Calculée (a)	Masse Mesurée (a)	Position	Sequence	Méthode d'identification (b)
1356.71	1356.72	2-13	AWRKAGISYAAY	Exact mass
1953.04	1953.04	3-20	WRKAGISYAAYLNVAQA	LC/MS/MS
1831.03	1831.06	20-36	AIRSSLKTELQTASVLN	Exact mass
1876.01	1876.03	24-40	SLKTELQIASVLNRSQT	Exact mass
1471.72	1471.73	32-44	ASVLNRSQTDAFY	Exact mass
1735.80	1735.82	36-49	NRSQTDAFYTQYKN	Exact mass
1969.99	1970.00	44-61	YTQYKNGTAASEPTPITK	Exact mass

a : Masses monoisotopiques MH<sup>+</sup>.  
b : Masses exactes: indique que seulement un seul peptide de la séquence de  $\epsilon$  a une masse qui correspond à la masse observée à +/- 20ppm.

**Tableau 4.1. Peptides analysés pour l'étude topologique de l'incorporation du deutérium dans la sous-unité  $\epsilon$  au sein du complexe F1 ATPase.**

#### **Accessibilité au solvant dans le complexe F1-ATPase**

Nous avons évalué la topologie de l'incorporation du deutérium dans la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1-ATPase en comparant les échanges obtenus pour les peptides de cette sous-unité.

Le % d'incorporation pour chacun des peptides a été déterminé dans deux conditions expérimentales différentes :

- Pour l'expérience contrôle, la sous-unité  $\epsilon$  est obtenue par micro-chromatographie sur ZipTip, protéolysée par la pepsine immobilisée. Les peptides obtenus sont alors incubés 30 minutes dans le solvant deutéré avant d'être analysés en spectrométrie de masse MALDI ToF
- Pour déterminer l'accessibilité au solvant deutéré, le complexe F1 ATPase est incubé 30 minutes dans le solvant deutéré avant de séparer la sous-unité  $\epsilon$  par micro-chromatographie ZipTip et de lui faire subir la protéolyse.

Dans les expériences contrôle, après 30 minutes d'incubation dans D<sub>2</sub>O, chaque peptide incorpore entre 85 et 90 % de deutérium au niveau des hydrogènes amides (Figure 18, HX sur peptides). Ces niveaux d'incorporation correspondent à la valeur maximale que l'on peut observer sur les peptides après 30 minutes d'incubation. Les valeurs obtenues dans ces expériences sont très homogènes sur les sept peptides, qui sont non structurés dans les conditions expérimentales d'échange.

Dans le cas où l'échange est réalisé sur le complexe F1-ATPase, on observe des niveaux d'incorporation plus faibles que ceux obtenus lors des expériences contrôle (Figure 18, échange sur F1-ATPase). Cette baisse, largement supérieure à 10%, ne peut être imputée au phénomène de rééchange pouvant intervenir lors de la protéolyse. De plus, les valeurs d'incorporations sont très hétérogènes d'un peptide à

l'autre. Si on compare cette hétérogénéité à l'homogénéité obtenue dans les expériences contrôle il apparaît clairement que les valeurs d'incorporation sont directement liées à l'environnement structural de chacun des peptides. Les résultats indiquent que l'incorporation de deutérium est maximale pour le peptide [24-40] alors que le peptide le moins accessible au solvant est le peptide [3-20].

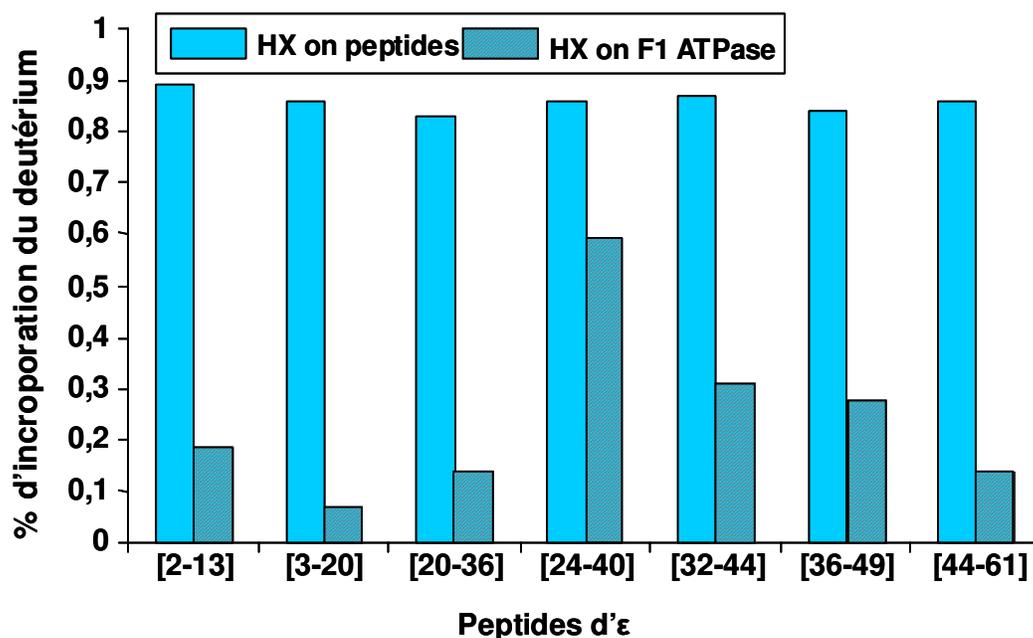


Fig.4.15. Effet des interactions protéine-protéine dans le complexe F1-ATPase sur l'incorporation de deutérium dans la sous-unité ε.

#### **Représentation de l'accessibilité au solvant deutéré**

Nous avons voulu confronter la pertinence de nos résultats aux données structurales établies pour le complexe F1-ATPase. La structure 3D du complexe F1-ATPase n'étant pas disponible, nous avons utilisé celle de la structure bovine.

Les calculs ont été réalisés sur une station SGI Octane utilisant InsightII et discover 2000 (Accelrys Inc). L'ensemble du travail de modélisation a été réalisé en collaboration avec Michel Laguerre à l'IECB. La construction des homologies de séquence a été réalisé dans le module d'homologie. La séquence utilisée pour la sous-unité ε de levure est référencée P21306 par SwissProt (<http://www.expasy.ch>). La structure 3-D utilisée comme référence pour la construction d'homologies est la structure bovine<sup>253</sup> (2.4 Å de résolution, PDB code 1E79) dans laquelle les 47 premiers acides aminés de la sous-unité ont été résolus (50 acide aminés, SwissProt : P05632)

L'alignement des séquences de la sous-unité  $\epsilon$  de levure et de la sous-unité bovine indique une forte homologie dans les régions structurées de la sous-unité bovine comprenant les trois hélices  $\alpha$ . (59% d'homologie avec 44% d'homologie stricte) (figure 4.16).

```

E_YEAST : SAWRKAGISYAAYLNVAQAIRSSLKTELOTASVLNRSOTDAFYTOYKNGTAASEPTPI TK
EPS_BOV : VAYWRQAGLSYIRYSQICAKAVRDALKTEFKANAMKTSGSTIKIVKV
  
```

**Fig.4.16. Alignement de séquences entre la sous-unité  $\epsilon$  bovine et levure.**

Comme aucune donnée n'est disponible pour la structure de la partie C-terminale de la sous-unité  $\epsilon$  de levure, nous avons utilisé les programmes de prédiction de structure secondaire.(JPRED (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>),PHD(<http://cubic.bioc.columbia.edu/pp>),PSIpred (<http://insulin.brunel.ac.uk/psiform.html>), SSPRO (<http://www.promoter.ics.uci.edu/BRNN-PRED>), SAM-T99 (<http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T99-query.html>) et PROF (<http://www.aber.ac.uk/IP5phiwww/prof/index.html>). Des résultats identiques ont été obtenus dans chaque cas, avec une prédiction de trois hélices  $\alpha$  dans la partie N terminale. Elles se situent de A2 à A6, de S9 à L25, et de Q30 à L35, correspondant à la structure cristallographique (h1 de S1 à A6, h2 de S9 à S24 et h3 de E28 à V34). Aucun de ces programmes n'indique une structure secondaire pour la partie C terminale, mais seulement une structure étendue pour la partie D41/A42 et Y47/K48. Le reste de la protéine apparaît comme non structuré.

Les cartes de potentiels de lipophilicité ont été calculées et dessinées pour la sous-unité  $\epsilon$  à partir d'un programme développé par Michel Laguerre (IECB). Il apparaît une forte zone lipophile autour de W3, Y10 et Y13, dans une partie fortement structurée de la protéine. Comme ces trois résidus aromatiques sont proche dans l'espace, cette zone semble impliquée dans une interaction protéine-protéine.

A partir du modèle de structure de la sous-unité F1-ATPase bovine, un modèle de la sous-unité  $\epsilon$  de levure a été construit en tenant compte des homologies de séquences et des prédictions de structure secondaire. Ainsi, une partie structurée [1-44] est suivie par un domaine étendu C-terminal (Figure 4.17.). Le codage de couleur indique que les parties les plus exposées au solvant deutéré sont localisées dans le tour [24-27] et [28-37] de l'hélice h3.

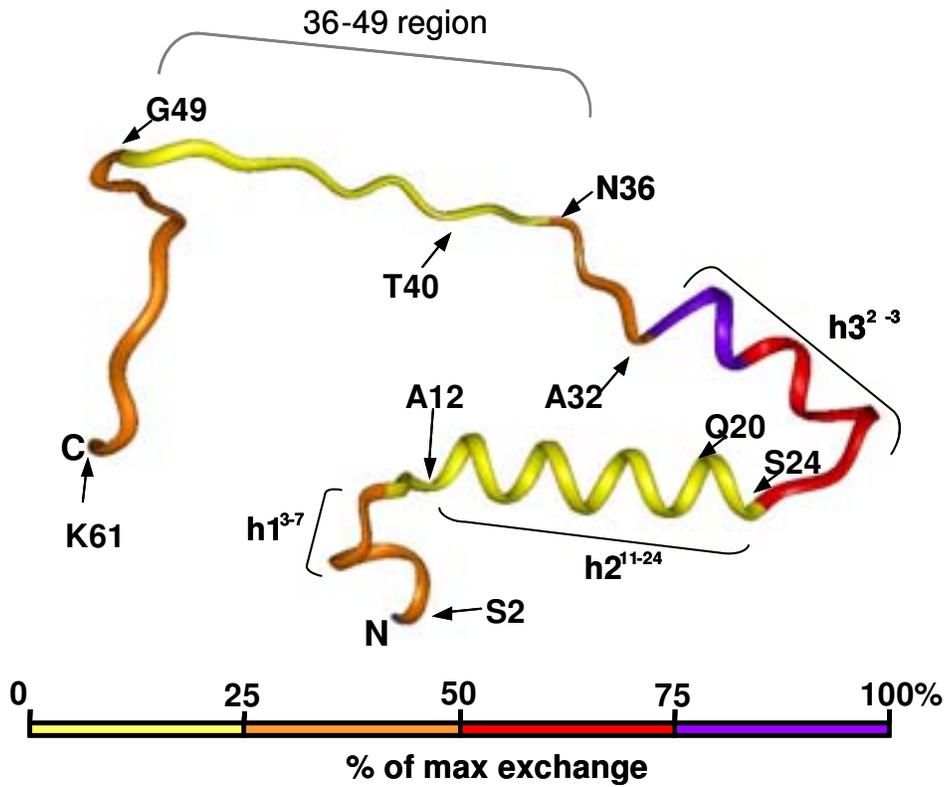


Fig.4.17. Topologie de l'incorporation de deutérium au sein de la sous-unité  $\epsilon$  après échange sur la sous-unité isolée

Un modèle de la tige F1-ATPase a ensuite été réalisé sur la base de la structure bovine, laissant apparaître les interactions entre sous-unités  $\delta$  et  $\gamma$  (Figure 4.18.). La sous-unité  $\epsilon$  de levure a été remplacée dans la structure bovine. Cette construction est en parfait accord avec les résultats de l'échange isotopique H/D qui indiquent un maximum d'échange dans la région [24-40].

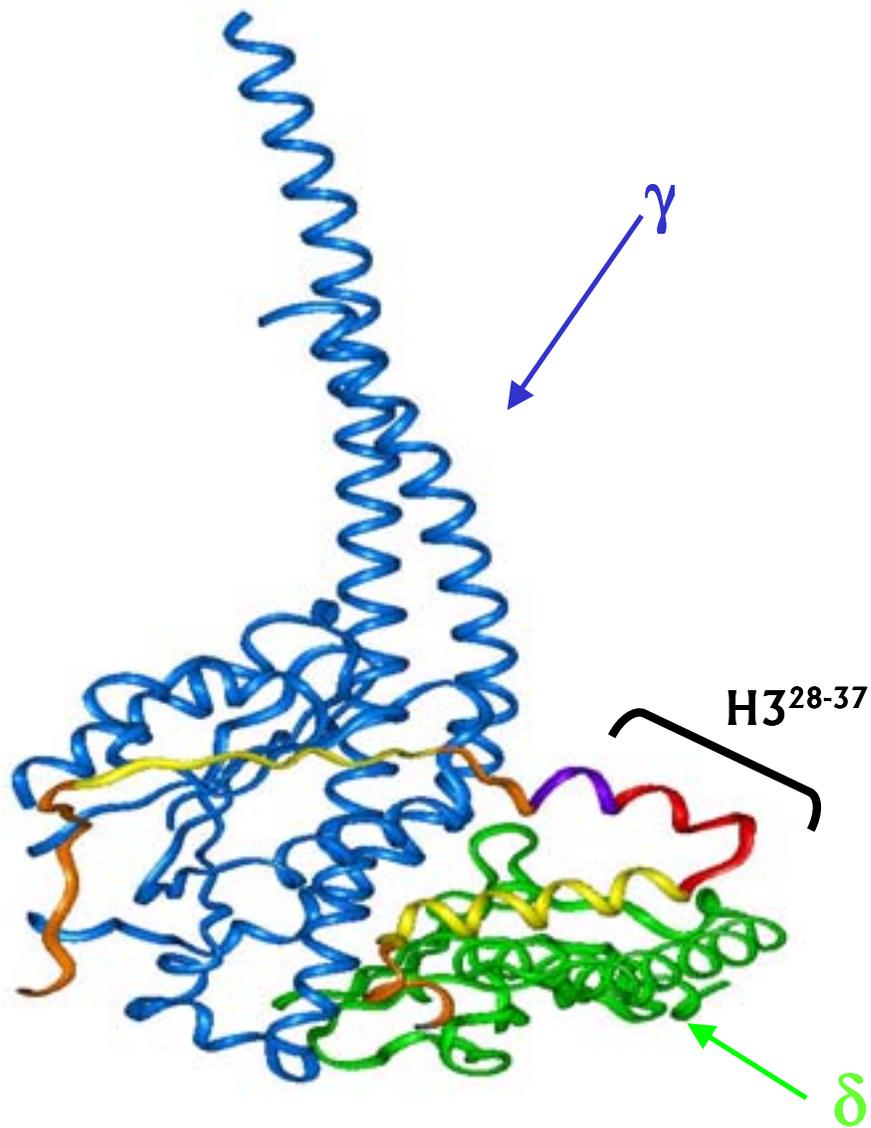


Fig.4.18. Modélisation moléculaire de la tige centrale de l'ATP synthase de levure. En bleu la sous-unité  $\gamma$ , en vert la sous-unité  $\delta$ , la troisième sous-unité est la sous-unité  $\epsilon$ .

## 7.4. Conclusion

L'échange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse MALDI est une technique efficace pour étudier les interactions au sein d'un complexe hétéro-oligomérique. L'utilisation de la micro-chromatographie par ZipTip nous a permis de résoudre les problèmes liés au rééchange du deutérium pendant la purification des sous-unités. Nous avons utilisé l'échange isotopique pour observer l'accessibilité d'une sous-unité au solvant au sein du complexe. Cette technique permet l'obtention d'informations sur l'état conformationnel de la protéine et sur ses interactions supramoléculaires au sein d'un complexe, en ne nécessitant que quelques picomoles de matériel.

Cette approche pourrait être étendue aux sous-unités de masse plus importante dans le complexe F1-ATPase. Il faut cependant pouvoir mettre au point une technique de séparation rapide de ces sous-unités pour pouvoir en réaliser l'analyse par HXMS. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI, même si elle a permis une bonne couverture de séquence dans le cas de l'empreinte de digestion de la sous-unité  $\epsilon$ , ne pourra vraisemblablement pas permettre à elle seule une bonne couverture de séquence lorsque les protéines étudiées sont de tailles plus importantes. Dans ce cas, une analyse utilisant une analyse MS/MS systématique pourra être déterminante.



# Troisième partie

**La protéine Prion HET-s:  
Un modèle pour l'étude des  
amyloïdes.**



# Chapitre 5 : Etude d'une transition amyloïde par échange isotopique hydrogène/deutérium.

## 1. Introduction

Les prions sont des protéines infectieuses qui sont capables de se propager sous un état conformationnel anormal. Chez les mammifères, la forme prion de la protéine PrP est responsable de nombreuses affections neurologiques fatales appelées ESTs (Encéphalopathies spongiformes transmissibles)<sup>254</sup>.

Les maladies à prion appartiennent en fait à une famille plus large d'affections neuro-dégénératives qui sont toutes caractérisées par le dépôt d'agrégats de protéines appelés amyloïdes<sup>255</sup>. Parmi ces maladies, certaines sont liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Les amyloïdes sont des agrégats de fibres de protéines caractérisés par une structure cross- $\beta$  et une forte résistance à la protéolyse<sup>256</sup>. Il y a cependant une différence majeure entre les maladies à prion et les autres affections amyloïdes, résidant dans le caractère transmissible de ces maladies.

Les protéines prions existent également dans les microorganismes comme la levure ou le champignon filamenteux *Podospora anserina*<sup>257</sup>. La propagation de ces prions est intimement liée à la formation d'amyloïdes<sup>258</sup>, indiquant que les prions levures et champignons peuvent servir de systèmes modèles valables, non seulement pour analyser la propagation des prions mais aussi pour l'étude du processus de la formation des amyloïdes.

Chez les champignons filamenteux, il existe une réaction de mort cellulaire programmée génétiquement, qui porte le nom d'incompatibilité végétative et qui a lieu lorsque des cellules végétatives d'individus génétiquement différents fusionnent<sup>259, 260</sup>. Il a été montré que cette réaction de mort cellulaire s'accompagne de l'induction d'un mécanisme d'autophagie. L'activation massive de ce mécanisme d'autodigestion serait responsable de la mort cellulaire par incompatibilité<sup>261,262</sup>. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée serait de type autophagique plutôt qu'apoptotique. Cette réaction de mort

<sup>254</sup> Prusiner, S. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 13363-83. (1998).

<sup>255</sup> Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr., and Kelly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 9989-90, (1999).

<sup>256</sup> Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 60-8, (2000).

<sup>257</sup> Wickner, R. B., Edskes, H. K., Maddelein, M. L., Taylor, K. L., and Moriyama, H. *J. Biol. Chem.* **274**, 555-8, (1999).

<sup>258</sup> Wickner, R. B., Taylor, K. L., Edskes, H. K., Maddelein, M. L., Moriyama, H., and Roberts, B. T. *J. Struct. Biol.* **130** 310-22, (2000).

<sup>259</sup> Glass, N.L., Jacobson, D.J., et Shiu, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous fungus ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 165-186, (2000).

<sup>260</sup> Saupé, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 489-502, 2000.

<sup>261</sup> Pinan-Lucarre, B., Paoletti, M.; Dementhon, K., Couлары-Salin, B. et Clave, C. *Mol. Microbiol.* **47**, 321-333, 2003.

<sup>262</sup> Dementhon, K., Paoletti, M.; Minan-Lucarré, B.; Bourges, N., Sabourin, M., Saupé, S.J. et Clavé, C. *Eukaryotic Cell*, in press.

cellulaire est contrôlée par des loci particuliers appelés « het » pour « heterokaryon incompatibility ». Lorsque deux isolats présentant une différence génétique au niveau d'un de ces loci fusionnent, la cellule mixte formée est détruite par cette réaction de mort cellulaire.

Le locus *het-s* est un des neuf loci d'incompatibilité de l'espèce *Podospora anserina*. Il existe deux allèles d'incompatibilité à ce locus *het-s* (petit « s ») et *het-S* (grand « s »). Les protéines HET-s et HET-S diffèrent par 13 résidus et ne présentent pas de similarités avec des protéines de fonctions connues. La particularité génétique du locus *het-s* est que la protéine HET-s est une protéine de type prion<sup>263</sup>. Les souches portant HET-s sous sa forme normale sont désignées [Het-s\*], les souches portant HET-s sous sa forme prion sont désignées [Het-s]. Une souche [HET-s\*] peut acquérir le phénotype [Het-s] de façon spontanée avec une faible fréquence, ou de façon systématique après un simple contact avec une souche [Het-s] portant le prion. C'est sous sa forme prion que la protéine HET-s induit la réaction de mort cellulaire par incompatibilité en présence de la forme HET-S (Figure 1). Ainsi, le prion [Het-s] n'est pas toxique en soi mais le devient lorsque la protéine HET-s sous sa forme prion est co-exprimée avec le variant HET-S. Il faut aussi souligner que bien qu'étant extrêmement semblable à HET-s, le variant naturel HET-S est dépourvu des propriétés prions.

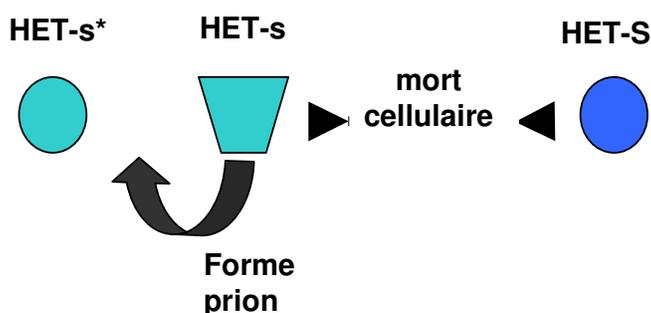


Figure 5.1. Représentation schématique des propriétés du système prion [Het-s]

*In vivo*, la protéine de fusion HET-s-GFP produit une forme de transition entre état soluble et agrégé durant la transition vers l'état prion, ce qui suggère que [HET-s] se propage au travers des agrégats de HET-s<sup>264</sup>.

La protéine recombinante de HET-s forme des agrégats amyloïdes *in vitro*<sup>265</sup>. La transition de la forme soluble vers la forme agrégée est accompagnée par une augmentation des feuillettes  $\beta$ . L'introduction par biolistique d'agrégats de protéines HET-s recombinantes dans des cellules de *Podospora anserina* induit

<sup>263</sup> Coustou, V., Deleu, C., Saube, S., and Begueret, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 9773-8, (1997).

<sup>264</sup> Coustou-Linares, V., Maddelein, M. L., Begueret, J., and Saube, S. *J. Mol. Microbiol.* **42**, 1325-35, (2001).

<sup>265</sup> Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Begueret, J., and Saube, S. *J. Biol. Chem.* **277**, 5703-6, (2002).

l'émergence de la forme [Het-s] prion avec une haute fréquence, ce qui démontre que l'infectiosité du prion peut être déclenchée *in vitro* par la protéine recombinante<sup>266</sup>.

La protéine HET-s est formée de deux domaines, un domaine N-terminal globulaire, comprenant les résidus de 1 à 230 approximativement, et la région C-terminale, qui est supposée peu structurée<sup>267</sup>. Ce domaine C-terminal d'HET-s est essentiel à la propagation du prion *in vivo* et la formation des amyloïdes *in vitro*<sup>12</sup>.

Les agrégats amyloïdes sont résistants aux études structurales supra-moléculaires conventionnelles. L'échange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse peut permettre d'obtenir des informations concernant le processus de formation des amyloïdes. L'échange isotopique a déjà été mis en oeuvre pour l'étude de peptides amyloïdes de la maladie d'Alzheimer en utilisant la spectrométrie de masse à ionisation ESI. Il a été montré que les protons amides échangeables sont très résistants à l'échange isotopique<sup>268,269,270</sup> au sein des fibres amyloïdes.

Dans ce travail, nous avons étudié la protéine prion HET-s par HXMS en utilisant la spectrométrie de masse MALDI. Cette méthode a été utilisée pour déterminer l'accessibilité de la protéine au solvant deutéré lorsque celle-ci est sous forme amyloïde ou sous forme soluble.

### Objectif de l'étude

L'étude de la transition amyloïde de la protéine HET-s par échange isotopique hydrogène/deutérium et spectrométrie de masse soulève deux questions :

- La technique HXMS permet-elle de déterminer les zones d'interactions entre protéines HET-s au sein de la fibre amyloïde ?
- Peut-on obtenir, par cette technique, des informations d'ordre structural sur le détail de l'interaction entre monomères ?

Pour tenter de répondre à la première question concernant l'analyse topologique des interactions au sein de la fibre amyloïde, notre étude se déroule en trois parties :

- ✓ Détermination de l'empreinte de digestion de la protéine HET-s à la pepsine
- ✓ Etude cinétique de l'incorporation du deutérium dans la protéine HET-s dans sa forme soluble

<sup>266</sup> Maddelein, M. L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Coulyary-Salin, B., and Saupe, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 7402-7, (2002).

<sup>267</sup> Balgueríe, A., Dos Reis, S., Ritter, C. Chaignepain, S. Coulyary-salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lasclu, I., Schmitter, JM. Riek, R., Saupe, S.J. *EMBO, in press*, (2003).

<sup>268</sup> Kheterpal, I., Zhou, S., Cook, K., and Wetzel, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, n°25, 13597-13601, (2000).

<sup>269</sup> Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. *Nat. Struct. Bio.* **9**, 332-336, (2002).

<sup>270</sup> Kraus, M., Bienert, M., and Eberhard, K. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **17**, 222-228, (2003).

- ✓ Etude cinétique de l'incorporation du deutérium dans la protéine HET-s dans sa forme amyloïde

Pour mener à bien ce travail, nous disposons d'une préparation de protéines HET-s recombinantes, produite par surexpression hétérologue dans la bactérie E. Coli. La séquence de cette protéine (289 acides aminés) a été modifiée par l'ajout d'une étiquette 6 His en C terminal pour permettre sa purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. L'analyse de la protéine entière en spectrométrie de masse MALDI indique que la méthionine N terminale a été excisée. La protéine étudiée a donc une longueur de 294 acides aminés et une masse de 32651 Da.

## **2. Analyse topologique de l'interaction entre protéines HET-s au sein de la fibre amyloïde.**

### **2.1. Carte peptidique de la protéine HET-s.**

#### **2.1.1.Introduction**

La détermination de la carte peptidique de HET-s est un pré-requis indispensable à l'étude de la topologie fine de l'interaction entre les protéines HET-s au sein des fibres amyloïdes. Pour réaliser cette carte, HET-s est protéolysée par la pepsine, seule enzyme susceptible de générer des fragments dans les conditions de quench de la réaction d'échange isotopique (pH 2.5, 0°C). Une des difficultés inhérentes à la constitution de la carte peptidique est le très grand nombre de peptides qui résultent de la protéolyse. Plus la protéine est de masse importante, plus le nombre de peptides générés est important, et plus l'identification de ces peptides est délicate.

#### **2.1.2.Protéolyse à la pepsine immobilisée**

La protéine HET-s purifiée (1 ml H<sub>2</sub>O MQ, 30 µM) est centrifugée 20 minutes à 10 000g. 5 µl du surnageant sont protéolysés par la pepsine immobilisée sous très forte agitation et dans les conditions de quench d'échange (45 unités, 0.1 % TFA, pH 2.5, 0°C). Cette protéolyse est suivie par une centrifugation rapide (30 secondes, 10 000g), qui permet de séparer le produit de digestion de la pepsine immobilisée. Suite à cette centrifugation, 5 µl de surnageant sont alors prélevés et l'échantillon est soumis à une analyse par spectrométrie de masse MALDI Tof en mode réflectron.

Le résultat de l'analyse MALDI Tof indique que 62 pics correspondant à des fragments de HET-s sont générés par la protéolyse. Une analyse MALDI en mode linéaire indique que la totalité de la protéine est digérée après 10 minutes.

De manière à augmenter la diversité des fragments observables suite à la protéolyse, nous avons essayé de diminuer au maximum les problèmes liés à la désorption sélective observée en spectrométrie de masse MALDI. Pour cela, une micro-chromatographie ZipTip suivie d'une élution fractionnée est réalisée sur le produit de protéolyse. L'élution fractionnée doit permettre d'augmenter le nombre de fragments observables par MALDI-MS suite à la protéolyse. Pour cela, 5  $\mu$ l du produit issu de la protéolyse sont chargés sur un ZipTip C18, dessalés, puis trois fractions d'élution contenant 20%, 40% et 70% d'acétonitrile sont analysées par spectrométrie de masse MALDI en mode réflectron (Figure 5.2.). De fait, après analyse des trois spectres de masse correspondant aux trois fractions d'élution, un total de 86 pics différents a été dénombré.

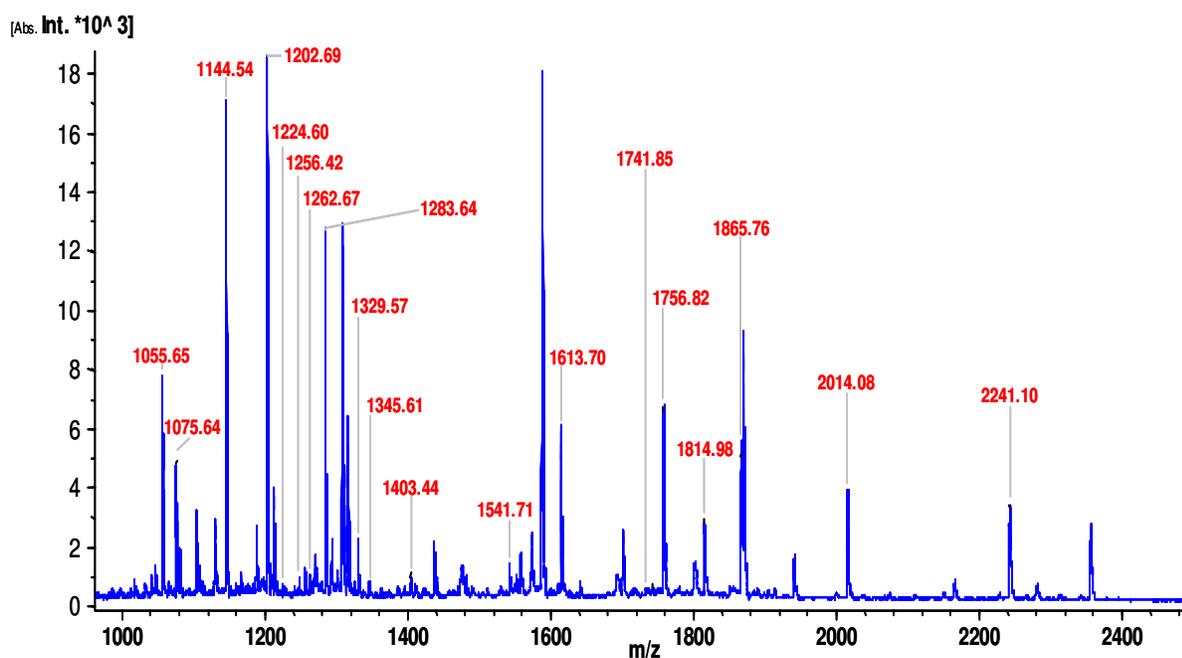


Figure 5.2. Spectre de masse MALDI du produit de protéolyse de la protéine HET-s suite à une digestion à la pepsine immobilisée. Le spectre présenté correspond à la fraction d'élution à 20% acétonitrile.

### 2.1.3. Assignment des fragments de protéolyse

La deuxième étape pour déterminer la carte peptidique de la protéine HET-s consiste à essayer d'assigner les peptides générés par la protéolyse à leurs séquences. Pour cela, on utilise un programme d'assignation (GPMaw).

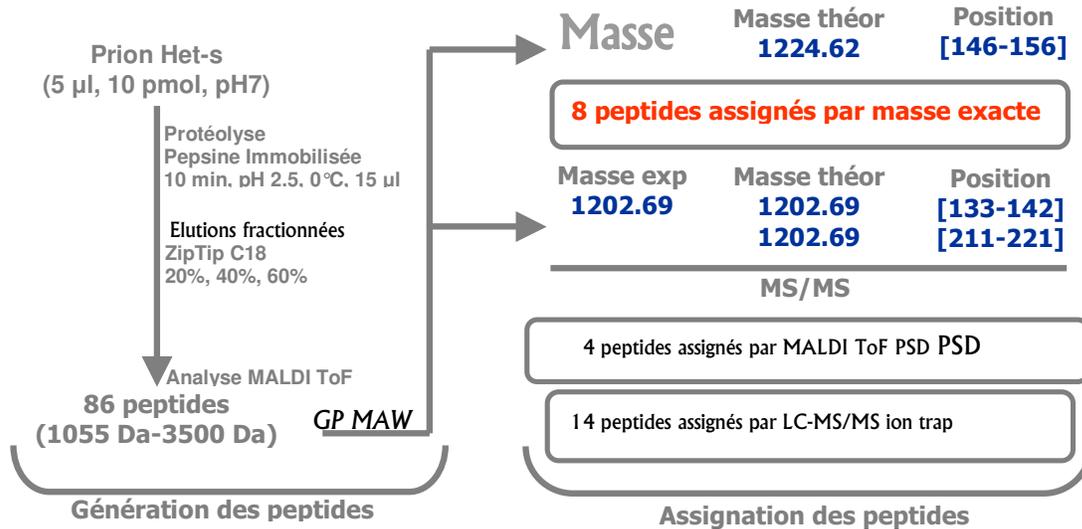


Figure 5.3. Assignment des fragments de digestion de HET-s après protéolyse à la pepsine.

Sur 86 fragments observés en spectrométrie de masse, seuls 8 fragments ont pu être assignés directement par leur masse sans nécessiter de fragmentations. La masse de ces fragments correspondait à une seule séquence possible avec une précision de 20 ppm. Ces 8 fragments représentent seulement 26 % de la séquence de la protéine HET-s.

Pour permettre d'améliorer la couverture de séquence de HET-s, nous avons analysé les fragments par spectrométrie de masse en tandem. Dans un premier temps nous avons réalisé une analyse MALDI en utilisant le mode Post Source Decay (PSD) pour les peptides dont l'assignation demeurait ambiguë. L'utilisation du PSD a permis l'assignation de 4 peptides supplémentaires. De nombreux PSD ont indiqué la présence de plusieurs peptides différents dans ce qui pouvait être considéré comme un ion isolé. Cette technique reste cependant limitée pour l'assignation des séquences, car pour réaliser un PSD, la résolution de la sélection de l'ion parent nécessite que celui-ci soit suffisamment isolé de ses plus proches voisins sur le spectre (la résolution est d'environ 100 à 150 pour la sélection de l'ion précurseur). De plus la réalisation d'une analyse en mode PSD se heurte souvent à des problèmes de sensibilité pour la détection des ions fragments.

Les douze peptides ainsi assignés par masse exacte ou par PSD couvrent 45% de la séquence de la protéine HET-s. La couverture de séquence a été complétée en utilisant le couplage LC-MS<sup>2</sup>. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'une chromatographie à nanodébit couplée à un spectromètre de masse à

piège ionique et utilisant une ionisation de type ESI. Cette technique nous a permis d'assigner 14 peptides supplémentaires permettant ainsi une couverture de séquence de 87% (figure 5.4.).

Carte peptidique de la protéine HET-s

masse (MH <sup>+</sup> ) (theor) <sup>1</sup>	mass (MH <sup>+</sup> ) <sup>2</sup>	position	sequence	ZIP TIP elution fraction <sup>3</sup>	method of identification <sup>4</sup>
1055.66	1055.65	43-51	RLDIAKAR	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1075.62	1075.64	158-166	KIVDQVARF	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1144.62	1144.54	28-37	VQLGRPFGRD	20% acetonitrile	MALDI ToF-PSD
1202.69	1202.69	133-142	VSRRQKQTSI	20% acetonitrile	MALDI ToF-PSD
1224.62	1224.60	146-156	TAWALYDGKSL	20% acetonitrile	Exact mass
1256.52	1256.38	287-295	WDNHHHHHH	20% acetonitrile	Exact mass
1262.60	1262.67	209-221	AAMSDAAAQKIDA	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1283.75	1283.64	236-247	RARVQLGNVVTA	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1329.65	1329.57	65-76	PRFHSSAPTDKS	20% acetonitrile	Exact mass
1345.71	1345.61	223-234	VGRNSAKDIRTE	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1403.58	1403.44	286-295	FWDNHHHHHHH	20% acetonitrile	Exact mass
1541.85	1541.71	173-186	AFPIEAVCHKLAEI	20% acetonitrile	Exact mass
1613.78	1613.70	251-265	HGGIRSDQTTNSVE	20% acetonitrile	Exact mass
1741.98	1741.85	44-58	RLDIAKARLSRWGEA	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1756.92	1756.82	91-105	FESAQKTSKRYELVA	20% acetonitrile	MALDI ToF-PSD
1815.09	1814.98	132-147	LVSRRQKQTSIAKTTA	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1865.81	1865.76	281-295	YGGKGFWDNHHHHHHH	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
1983.09	1983.02	89-105	LLFESAQKTSKRYELVA	40% acetonitrile	Exact mass
2014.10	2014.08	217-234	QKDAIVGRNSAKDIRTE	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
2072.20	2072.16	132-149	LVSRRQKQTSIAKTTAWA	40% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
2241.08	2241.10	4-25	PFIVAGALNVAGLFNNVDCF	20% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
2277.09	2277.12	193-216	DEASLTILKDAAGGIDAAMSDAAA	40% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
2376.15	2376.17	25-43	FEYVQLGRPFGRDYERCQL	40% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
2622.43	2622.69	111-132	VVFEDKDKPIGRALHRRINDL	70% acetonitrile	MALDI ToF-PSD
2647.25	2647.49	274-295	RVLIENEYGGKGFWDNHHHHHHH	70% acetonitrile	Ion Trap-LCMS <sup>2</sup>
3403.85	3403.78	227-258	SAKDIRTEERARVQLGNVVTAALHGGIRISD	70% acetonitrile	Exact mass

<sup>1</sup>Masse calculée (Monoisotopique MH<sup>+</sup>) pour les peptides identifiés

<sup>2</sup>Masse Observée après assignation expérimentale.

<sup>3</sup>Concentration en acétonitrile dans la fraction d'éluion lors de la simplification ziptip.

<sup>4</sup>Méthode d'identification du peptide. Masse exacte indique que seulement une seule possibilité dans la séquence de HET-s a une masse qui correspond à la masse du peptide avec une précision de 20 ppm. Les autres peptides ont été analysé par MALDI PSD ou LC-MS<sup>2</sup>.

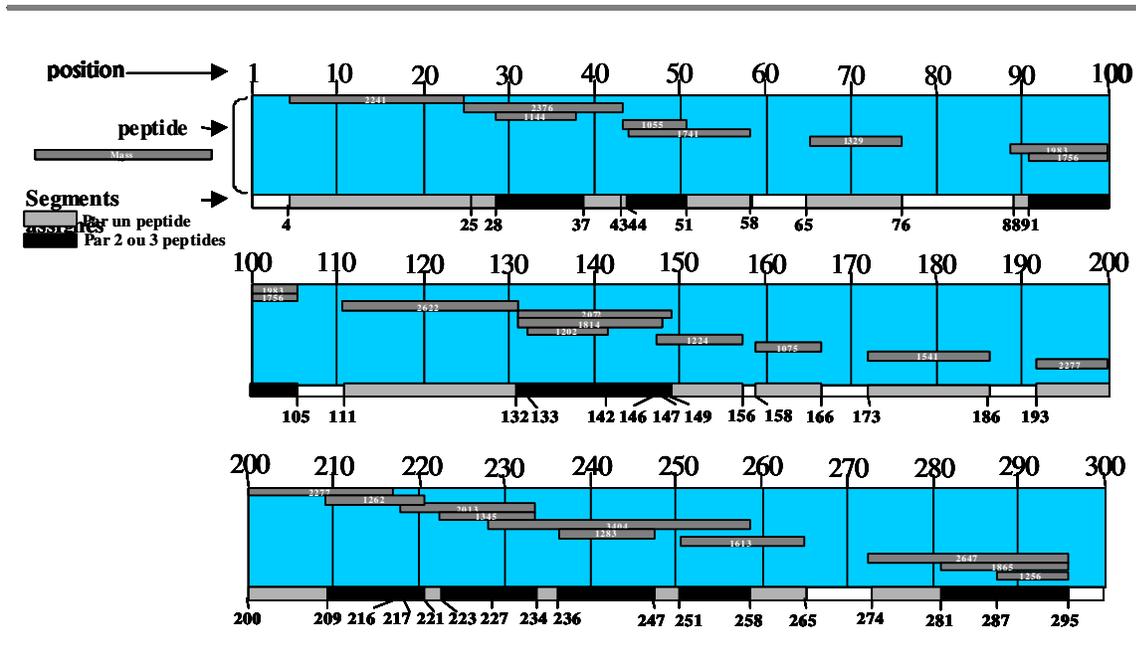


Figure 5.4. Carte peptidique de la protéine HET-s

#### 2.1.4. Protéolyse à la pepsine : forme soluble et forme agrégée de la protéine HET-s

La pepsine est une enzyme aspécifique qui conduit cependant à une cartographie peptidique très reproductible pour une protéine donnée et des conditions expérimentales données. Qu'en est-il pour la protéolyse d'une même protéine dans des conditions supramoléculaires différentes ?

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une protéolyse à la pepsine immobilisée sur la forme soluble, puis sur la forme amyloïde de HET-s. Après protéolyse, les échantillons sont traités de la même manière que précédemment en les simplifiant par micro-chromatographie ZipTip.

Après analyse des résultats par spectrométrie de masse MALDI ToF, il apparaît que le profil de digestion à la pepsine est différent lorsque HET-s est sous forme soluble ou amyloïde. Pour pouvoir comparer directement l'incorporation du deutérium dans la forme soluble et dans la forme agrégée de HET-s, il nous fallait obtenir des profils de digestion comparables pour les deux formes de la protéine.

Pour permettre l'obtention d'un même profil de digestion, nous avons essayé de réaliser de manière concomitante la dissociation de la fibre amyloïde et la protéolyse à la pepsine. Pour cela nous avons ajouté une solution contenant 4M d'urée au mélange de digestion. Les peptides générés suite à cette opération sont très similaires à ceux générés par la digestion sur la forme soluble de HET-s. (Figure 5.5.)

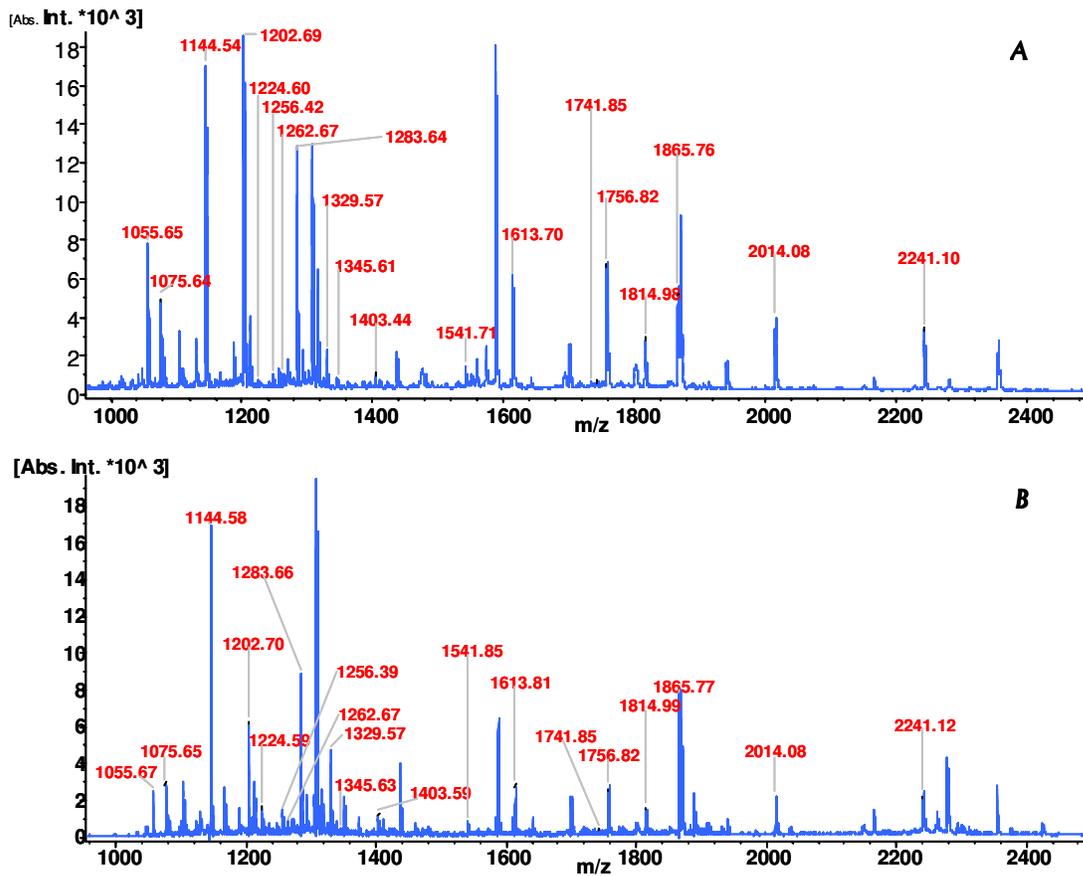


Figure 5.5. Spectre de masse MALDI ToF du produit de protéolyse de la protéine HET-s par la pepsine immobilisée. Suite à la protéolyse, les échantillons sont soumis à une micro-chromatographie ZIPTIP C18 comportant trois fraction d'éluion (20%, 40%, 70% acétonitrile). Les spectres présentés correspondent à la fraction d'éluion 20% acétonitrile. A : La protéolyse est réalisée sur la protéine HET-s sous sa forme soluble. B : La protéolyse est réalisée sur la protéine HET-s sous sa forme amyloïde. Dans ce cas 4M urée ont été ajoutés à la solution de protéolyse.

## **2.2. Echange isotopique Hydrogène/Deutérium sur la protéine HET-s sous forme soluble et sous forme amyloïde.**

### **2.2.1. Introduction**

Pour identifier les zones de la protéine HET-s impliquées dans les interactions au sein de la fibre amyloïde, nous avons réalisé une cinétique de l'incorporation du deutérium dans chacun des peptides assignés pour la carte peptidique de HET-s.

La protéine recombinante HET-s est donc incubée dans du D<sub>2</sub>O, soit sous forme amyloïde, soit sous forme soluble, et l'incorporation du deutérium le long de la séquence primaire de HET-s est déterminée pour des temps d'incubations allant de 5 minutes à 120 minutes.

L'objectif de cette étude est de distinguer les régions de la protéine HET-s directement impliquées dans les interactions au sein de la fibre amyloïde.

### **2.2.2. Protocole expérimental**

#### **2.2.2.1. Echange isotopique sur la forme soluble de HET-s**

La protéine HET-s (1 ml, 30 µM ; MQ H<sub>2</sub>O) a été centrifugée 20 minutes à 10 000g. 5 µl du surnageant sont alors dilués 20 fois dans une solution de D<sub>2</sub>O et incubés à 25°C pour des temps variant entre 5 et 120 minutes. Après incubation, 5 µl de la solution deutérée sont aliquotés et traités 10 minutes à la pepsine immobilisée sous forte agitation (10 µl, 45 unités, 0.01% TFA, pH 2.5, 0°C). Après protéolyse, l'échantillon subit une centrifugation rapide (10 000g, 30 secondes) pour permettre de séparer l'enzyme immobilisée du produit de la digestion d'HET-s. 5 µl du surnageant contenant les fragments de HET-s sont soumis à une simplification ZipTip C18 avec un gradient d'élution à trois étapes. Les trois fractions ont été éluées avec 1 µl de solution contenant 10 mg/ml d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique dans (2 :8 :1) ; (4 :6 :1) ; (7 :3 :1) acétonitrile, éthanol, 0.1% TFA et directement déposées sur la cible sous un flux d'azote. Après cristallisation de la matrice (10 secondes), la cible est transférée le plus rapidement possible à l'intérieur du spectromètre de masse avant d'être analysée en mode réflectron.

#### **2.2.2.2. Echange isotopique sur la forme amyloïde de HET-s**

La protéine HET-s sous forme agrégée (1 ml, 30 µM ; MQ H<sub>2</sub>O) a été centrifugée 20 minutes à 10 000 g. 5 µl du culot sont dilués 20 fois dans une solution de D<sub>2</sub>O et vortexés avant incubation à 25°C pour des temps variables (de 5 minutes à 120 minutes). Après incubation, 5 µl de la solution deutérée sont traités sous forte agitation à la pepsine immobilisée (10 µl, 4 M urée, pH 2.5, 0°C). Après digestion, l'échantillon est traité de la même manière que pour l'échange sur la forme soluble de HET-s.

### 2.2.2.3. Microscopie électronique

Pour contrôler l'état d'agrégation de la forme amyloïde de la protéine HET-s, une analyse de microscopie électronique a été réalisée par le service de microscopie de l'université de Bordeaux II. Pour cela, une partie de la suspension protéique utilisée pour les expériences d'échange isotopique sur la forme amyloïde a été déposée sur une grille de microscopie électronique (400 mesh) recouverte par un film plastique (Formvar). Pour empêcher un dessèchement rapide, une sédimentation est réalisée 10 à 30 minutes dans une boîte de Petri. Les grilles ont alors été rincées 15 à 20 fois avec une solution fraîchement préparée d'acétate d'uranyle (2%) dans de l'eau (passée à travers un filtre Millipore 0.22  $\mu\text{m}$ ), séchées avec un papier filtre et observées avec un microscope Philips Tecnai 12 Biowin à 80 kV.

L'image obtenue est présentée sur la figure 5.6.

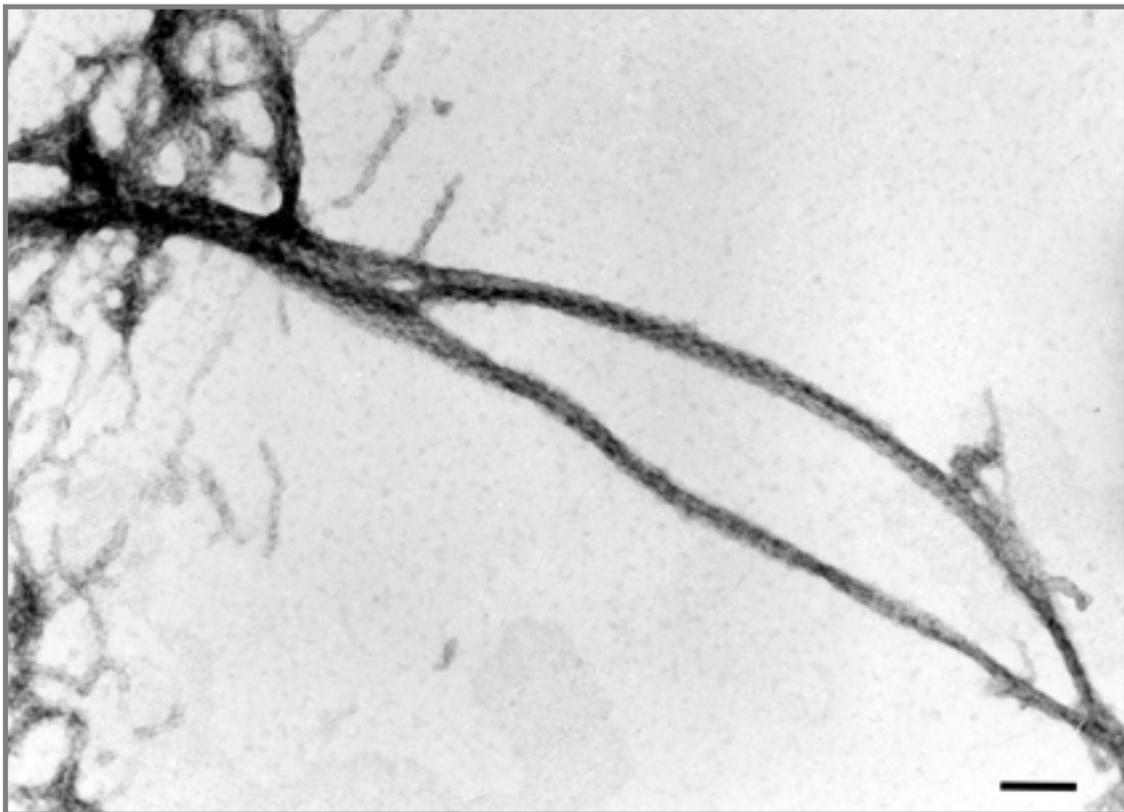


Figure 5.6. Forme agrégée de la protéine HET-s observée par microscopie électronique

#### 2.2.2.4. Spectrométrie de masse

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre MALDI ToF Bruker Reflex III équipé avec un laser N<sub>2</sub> d'une longueur d'onde d'émission de 337 nm. Les spectres obtenus correspondent à une accumulation de 100 tirs en mode d'ionisation positif, avec un déplacement manuel de l'impact laser sur une surface de 0.2 mm<sup>2</sup>. La déflexion des ions de basses masses a été utilisée pour limiter le phénomène de suppression spectrale et favoriser le signal des peptides d'intérêt. Les spectres de masses des peptides de HET-s ont été observés en mode réflectron, en utilisant un étalonnage externe avec un mélange de 8 peptides dont la gamme de masse est comprise entre 900 et 3500 Da. Dans ces conditions, les masses mesurées correspondent aux ions mono-isotopiques [M+H]<sup>+</sup>. Les valeurs de masses obtenues suite aux expériences d'échange isotopique correspondent à la valeur m/z du centroïde du massif isotopique considéré (Figure 5.7)

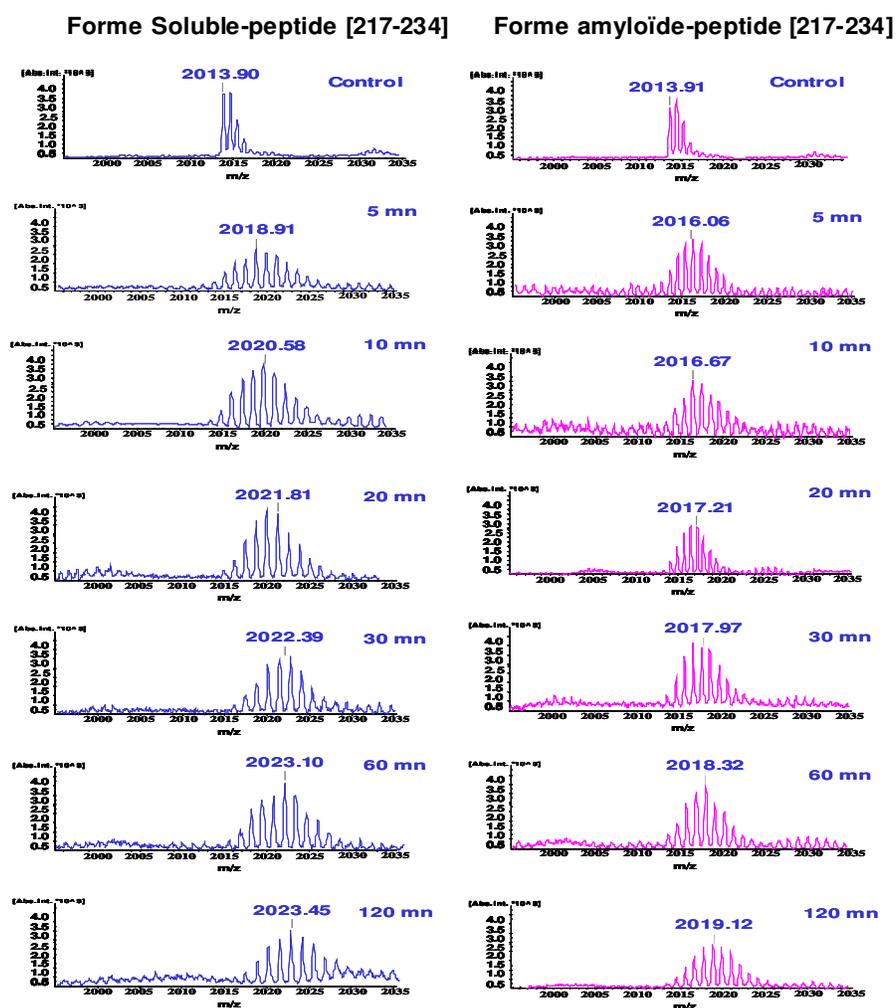


Figure 5.7. Spectres MALDI ToF de la cinétique d'incorporation du deutérium dans le peptide [217-234]. La protéine HET-s, sous forme soluble ou agrégée a été incubée de 5 à 120 minutes. La valeur de la masse donnée pour l'expérience contrôlée correspond au pic mono-isotopique [M+H]<sup>+</sup> du peptide. Les masses données pour les expériences d'échange correspondent au centroïde du massif isotopique [MH]<sup>+</sup> de l'ion pseudo-moléculaire.

### 2.2.3.1. Analyse des données

La ligne de base des spectres de masse a été corrigée et le nombre d'atomes de deutérium dans un peptide donné a été déterminé à partir de la valeur du centroïde de son massif isotopique.

Le nombre d'atome de deutérium incorporés est calculé à partir de la formule :

$$D_{(t)} = \frac{m(t) - m(0)}{m(100) - m(0)} \times N$$

avec

$m(t)$  : masse observée pour le peptide au temps  $t$ .

$m(0)$  : masse observée pour le peptide au temps 0 (peptide non deutéré)

$m(100)$  : masse observée pour un peptide totalement échangé (procédure de contrôle de rééchange)

$N$  : Nombre total de protons amides échangeables

Après avoir déterminé le nombre d'atomes de deutérium incorporés dans un peptide suite à la réaction d'échange, on peut calculer le pourcentage d'incorporation du deutérium dans ce peptide.

$$D_{(t)}\% = N / D_{(t)} \times 100$$

Pour chacun des 26 peptides du PMF (Peptide Mass Fingerprint), le pourcentage d'incorporation du deutérium a été calculé pour des temps d'incubation dans le solvant deutéré compris entre 5 minutes et 120 minutes. Dans la figure 5.8., les valeurs du pourcentage d'incorporation en deutérium ont été reportées en fonction du temps d'incubation dans le solvant deutéré pour le peptide [287-295] de la protéine HET-s incubée dans sa forme amyloïde.

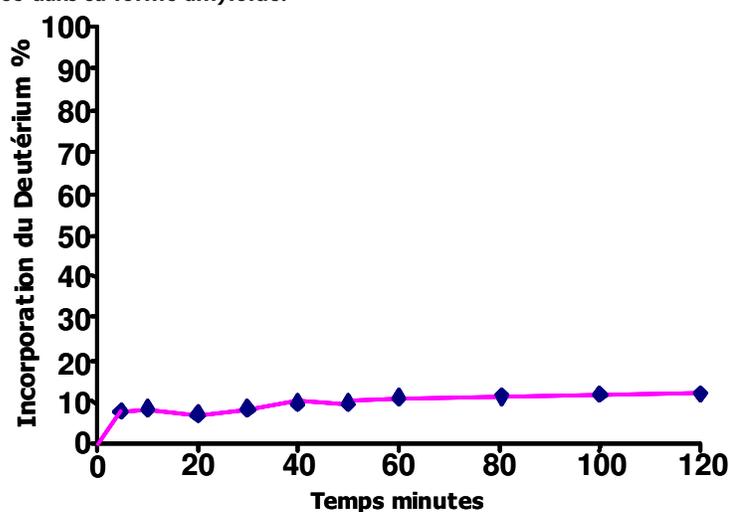


Figure 5.8. Incorporation du deutérium dans le peptide [287-295] après incubation de HET-s sous amyloïde dans le solvant deutéré pour des temps d'incubation entre 5 minutes et 120 minutes

des constantes de vitesses permet alors une analyse plus quantitative des données et peut être obtenus à partir de l'expression suivante :

$$(1/N) \times P = e^{-(k_{ex} t)} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

avec :

P est le nombre d'hydrogènes échangeables protégés dans un peptide

$k_{ex}$  est la somme des constantes de vitesse de chaque hydrogène amide échangeable du peptide

t est le temps d'incubation dans le solvant deutéré.

A partir de l'équation 5.1., on peut déterminer les constantes de vitesse en exprimant  $\ln [P]$  en fonction du temps.

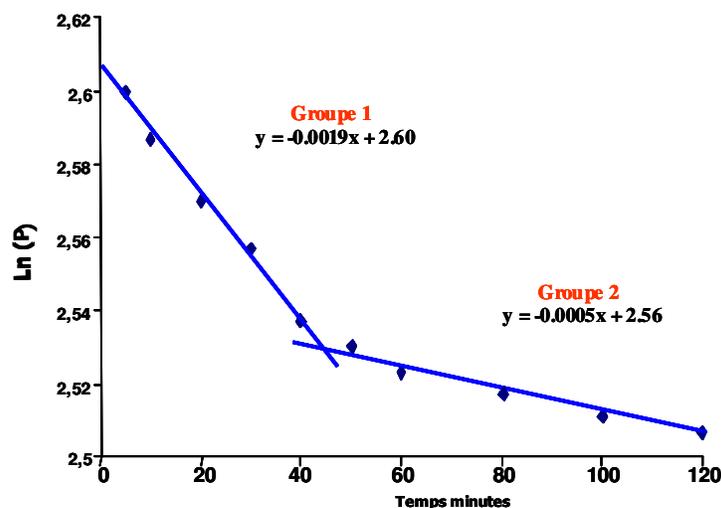


Figure 5.9. Détermination des constantes de vitesse de la réaction d'échange H/D. Le logarithme Népérien des hydrogènes échangeables encore présents après un temps t d'incubation au sein du peptide [287-295] est reporté en fonction du temps d'incubation dans le deutérium. Le calcul des régressions linéaires à partir des points reportés laisse apparaître deux populations d'hydrogènes échangeables ayant des constantes de vitesses distinctes.

#### 2.2.4. Echange isotopique sur la forme soluble de HET-s

Après des temps d'incubation variables dans l'oxyde de deutérium (de 5 minutes à 120 minutes) et la protéolyse à la pepsine, l'ensemble des peptides du PMF sont analysés par MALDI-MS. Pour l'ensemble des peptides, l'incorporation de deutérium est déterminée, ainsi que les constantes de vitesse (cf. 4.3.1.). Deux populations d'hydrogènes ayant des constantes de vitesses distinctes ( $k_{ex1}$  et  $k_{ex2}$ ) peuvent être observées sur l'intervalle de temps considéré (de 5 minutes à 120 minutes). Les constantes de vitesse ont été reportées en les classant par ordre décroissant. (Tableau 5.1., Forme soluble de HET-s).

Les constantes de vitesse les plus élevées sont retrouvées pour un ensemble de peptides tous situés dans la partie C-terminale de la protéine HET-s dans une région située entre les acides aminés 274 et 295. Dans cette région, 4 peptides ([281-295] ; [286-295] ; [287-295] ; [274-295]) ont des constantes de vitesse comprises entre  $3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  et  $3.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{ex1}$  et entre  $4.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  et  $5.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{ex2}$ . Un autre groupe de peptides, ayant des constantes d'échange comprises entre  $2.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  et  $2.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{ex1}$  et entre  $2.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  et  $3.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{ex2}$  est

composé de 5 peptides également situés dans la partie C terminale de la protéine ([217-234] ; [251-265] ; [236-247] et [227-258]). Un troisième groupe est composé de trois peptides ([146-166] ; [25-43] ; et [173-186] qui échangent avec des constantes de vitesse comprises entre  $1.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  et  $1.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{\text{ex}1}$  et entre  $1.3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  et  $1.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{\text{ex}2}$ . Pour l'ensemble des autres fragments, les constantes de vitesse sont comprises entre  $1.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  et  $2.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{\text{ex}1}$  et entre  $1.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  et  $7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{\text{ex}2}$ . L'analyse des résultats pour ces derniers peptides ne permet pas de distinguer une région particulière de la protéine HET-s pouvant correspondre à un groupe de constantes de vitesse particulier.

Tableau 5.1. Constantes de vitesse des hydrogènes échangés

Forme soluble de HET-s				Forme amyloïde de HET-s			
masse (MH <sup>+</sup> ) (theor) <sup>1</sup>	position	Echange intermédiaire <sup>2</sup>		masse (MH <sup>+</sup> ) (theor) <sup>1</sup>	position	Echange intermédiaire	
		$k_{\text{ex}}^3$ Group 1 <sup>4</sup> (mn <sup>-1</sup> )	$k_{\text{ex}}$ Group 2 (mn <sup>-1</sup> )			$k_{\text{ex}}$ Group 1 (mn <sup>-1</sup> )	$k_{\text{ex}}$ Group 2 (mn <sup>-1</sup> )
1865.86	281-295	$3.8 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-3}$	2376.15	25-43	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$
1403.58	286-295	$3.4 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-3}$	1224.62	146-166	$1.7 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-3}$
1256.52	287-295	$3.1 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{-3}$	1815.09	132-147	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$
2647.25	274-295	$3.0 \times 10^{-2}$	$4.9 \times 10^{-3}$	1055.68	43-51	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$
3403.85	227-258	$2.8 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-3}$	1541.85	173-186	$9.3 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$
1283.75	236-247	$2.7 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-3}$	1075.62	158-166	$7.8 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$
1613.78	251-265	$2.7 \times 10^{-2}$	$3.0 \times 10^{-3}$	2241.08	4-25	$7.6 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$
1345.71	223-234	$2.2 \times 10^{-2}$	$2.5 \times 10^{-3}$	1983.09	88-105	$5.8 \times 10^{-3}$	$9.4 \times 10^{-4}$
2014.10	217-234	$2.2 \times 10^{-2}$	$2.1 \times 10^{-3}$	1756.92	91-105	$5.2 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$
1224.62	146-166	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-3}$	1144.62	28-37	$3.9 \times 10^{-3}$	$8.4 \times 10^{-4}$
2376.15	25-43	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-3}$	1202.69	133-142	$3.9 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^{-4}$
1815.09	132-147	$1.1 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$	2072.20	132-149	$3.7 \times 10^{-3}$	$6.9 \times 10^{-4}$
1055.68	43-51	$9.9 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	1741.98	44-58	$3.6 \times 10^{-3}$	$7.7 \times 10^{-4}$
1541.85	173-186	$9.9 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	2622.43	111-132	$3.5 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-4}$
2241.08	4-25	$7.8 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$	1262.56	209-221	$3.4 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1075.62	158-166	$7.5 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	2277.09	193-216	$2.9 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
2277.09	193-216	$7.5 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	2014.10	217-234	$2.8 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1329.65	65-76	$6.1 \times 10^{-3}$	$9.7 \times 10^{-4}$	1613.78	251-265	$2.2 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1983.09	88-105	$5.8 \times 10^{-3}$	$9.7 \times 10^{-4}$	1256.52	287-295	$2.2 \times 10^{-3}$	$5.7 \times 10^{-4}$
1756.92	91-105	$5.5 \times 10^{-3}$	$9.2 \times 10^{-4}$	1345.71	223-234	$2.2 \times 10^{-3}$	$6.9 \times 10^{-4}$
1202.69	133-142	$3.6 \times 10^{-3}$	$9.1 \times 10^{-4}$	2647.25	274-295	$2.0 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1144.62	28-37	$3.6 \times 10^{-3}$	$8.4 \times 10^{-4}$	1403.58	286-295	$1.9 \times 10^{-3}$	$6.3 \times 10^{-4}$
2622.43	111-132	$3.6 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-4}$	3403.85	227-258	$1.9 \times 10^{-3}$	$6.3 \times 10^{-4}$
2072.20	132-149	$3.6 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-4}$	1283.75	236-247	$1.9 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-4}$
1741.98	44-58	$2.8 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$	1865.86	281-295	$1.9 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-4}$

<sup>1</sup> Masses calculées (monoisotopique, MH<sup>+</sup>) pour les peptides identifiés.

<sup>2</sup> L'échange intermédiaire est défini pour des temps d'incubation de 2 à 1000 minutes.

<sup>3</sup> Constante de vitesse (en min<sup>-1</sup>) pour les peptides de HET-s,

<sup>4</sup> Pour chaque peptide, deux populations d'hydrogènes échangeables, ayant des constantes de vitesse distinctes peuvent être discernées.

Le pourcentage d'incorporation a été calculé pour chaque fragment et à chaque temps d'incubation.

Pour les parties de la séquence de HET-s qui sont couvertes par plusieurs peptides, le pourcentage d'incorporation du deutérium a été calculé comme une moyenne des pourcentages d'incorporation de chacun des peptides recouvrant ces parties. Trois régions peuvent alors être distinguées (Figure 5.10.,

A). Le maximum d'incorporation du deutérium est obtenu dans la partie C terminale de la protéine ([221-293]) et atteint 60 à 74 % après 120 minutes d'incubation dans le solvant deutéré. Pour le même temps d'incubation, la partie intermédiaire incorpore de 35 à 60 % de deutérium. Les peptides appartenant à la région N-terminale [1-193] ont un niveau de deutération plus bas ( de 27 à 35%). Ces résultats permettent de désigner la région C terminale de 221 à 295 comme partie la plus accessible au solvant lorsque la protéine HET-s est sous sa forme soluble.

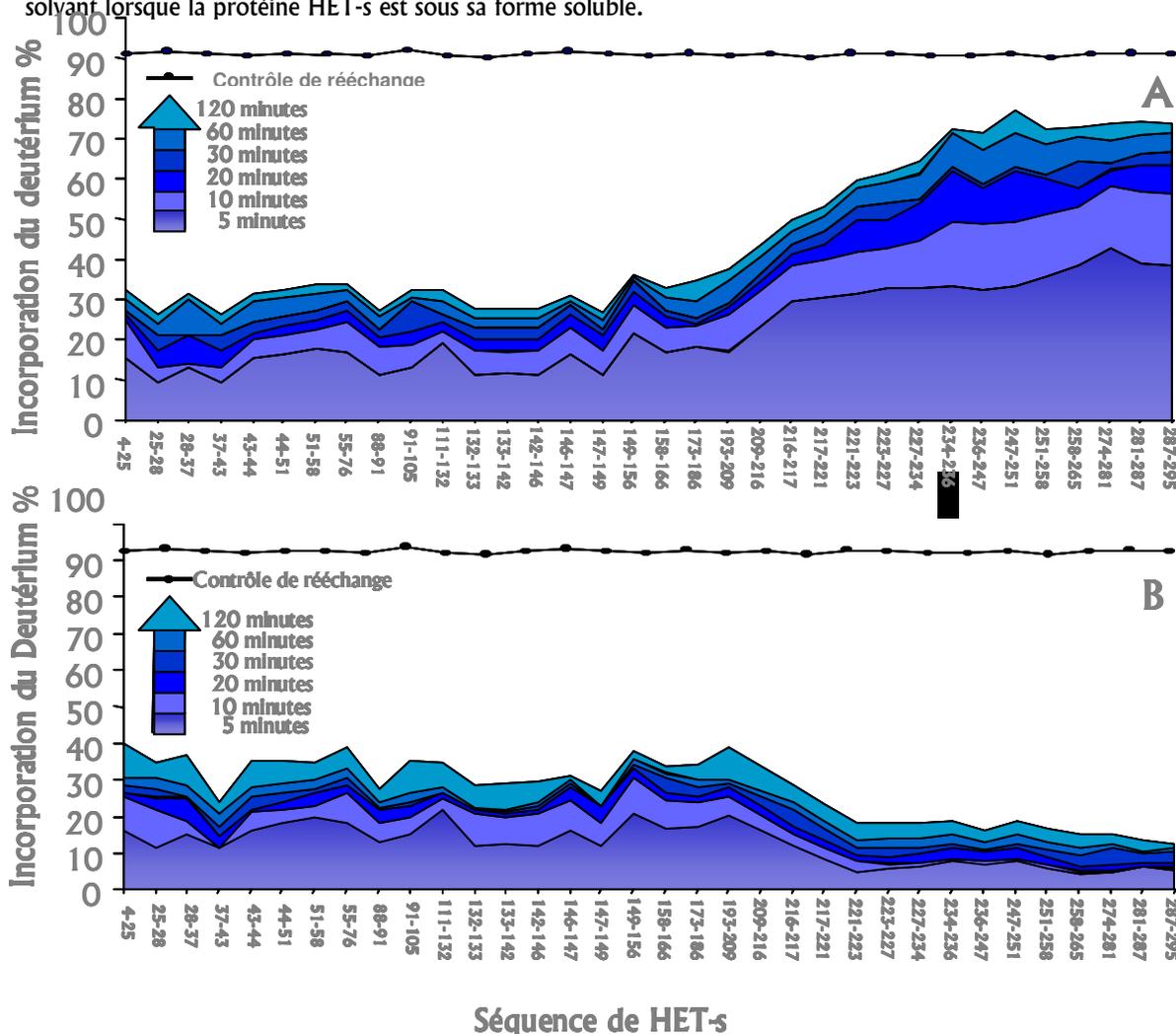


Figure 5.10: Incorporation du deutérium le long de la séquence de HET-s. A: La forme soluble de HET-s a été incubée pour différents temps d'incubations (de 5 à 120 minutes) dans le D<sub>2</sub>O. Après digestion à la pepsine et une analyse MALDI-MS, l'incorporation du deutérium a été calculée pour chaque peptide de HET-s. B: La forme agrégée a été analysée comme en A. Pour le contrôle de rééchange, une digestion de HET-s a été incubée 120 min dans le D<sub>2</sub>O et après analyse MALDI-MS l'incorporation du deutérium pour chacun de ces peptides a été déterminée.

La forme agrégée de HET-s a été obtenue comme décrit précédemment et la formation des amyloïdes a été contrôlée par microscopie électronique. Lorsque la forme amyloïde de HET-s est incubée dans le solvant deutéré puis analysée par spectrométrie de masse, les vitesses d'échange les moins importantes sont obtenues pour un groupe de peptides situés dans la partie C terminale. Ce groupe est composé de

11 peptides ([281-295], [236-247], [227-258], [286-295], [274-295], [223-234], [287-295], [251-265], [217-234], [193-216], [209-221]) qui ont des vitesses d'échanges comprises entre  $3.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  et  $1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{\text{ex}1}$  et entre  $7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  et  $5.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  pour  $k_{\text{ex}2}$  (Tableau 5.1. Forme amyloïde de HET-s). Le calcul de l'incorporation du deutérium pour chaque peptide de la protéine HET-s indique que la région la moins accessible au solvant deutéré est située dans la partie C terminale de la protéine entre les résidus 221 et 295. Dans cette région, l'incorporation du deutérium est comprise entre 17 et 20% après 120 minutes d'incubation dans le deutérium (Figure 5.10.B). Les vitesses d'échange dans la partie N-terminale de la protéine sont comparables que la protéine HET-s soit incubée sous sa forme soluble ou sous sa forme amyloïde.

### 2.3. Discussion et conclusion

L'échange isotopique Hydrogène/deutérium est utilisé pour obtenir des informations sur la structure et la dynamique des protéines. Comme cette réaction d'échange est analysée par spectrométrie de masse, cette méthode est particulièrement utile pour l'analyse des structures amyloïdes qui reste difficile à aborder par des techniques classiques de biologie structurale<sup>271, 272, 273</sup>.

Nous avons combiné l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI ToF et ESI piège ionique pour mener à bien notre étude. L'utilisation du piège ionique s'est révélée indispensable pour améliorer significativement la couverture de séquence HET-s lors de la réalisation de la carte peptidique. L'utilisation conjointe des deux instruments s'avère judicieuse pour la détermination fine des interactions au sein de la fibre amyloïde.

- Le MALDI ToF pour sa rapidité d'analyse et la simplicité du signal obtenu (essentiellement formé d'ions monochargés)
- Le piège ionique, pour la détermination de la carte peptidique (couplage avec la chromatographie liquide et analyse de spectrométrie de masse en tandem).

L'utilisation du couplage LC-MS<sup>2</sup> est d'autant plus indispensable que la protéine étudiée est de masse importante. Pour la protéine HET-s (32651 Da, 295 acides aminés), la protéolyse à la pepsine immobilisée génère un grand nombre de peptides qui produisent un signal complexe sur le spectre MALDI ToF. La proximité des massifs isotopiques correspondant aux peptides générés ne laisse que peu de possibilités pour la détermination des séquences par MALDI ToF en mode PSD. Seule l'utilisation du couplage LC-MS<sup>2</sup>, nous a permis de réaliser la carte peptidique de la protéine HET-s en approchant 90 % de couverture de séquence.

<sup>271</sup> Nettleton, E. J., and Robinson, C. V. *Methods. Enzymol.* **309**, 633-46, 1999.

<sup>272</sup> Kheterpal, I., Zhou, S., Cook, K., and Wetzal, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, n°25, 13597-13601, 2000.

<sup>273</sup> Kraus, M., Bienert, M., and Krause, E. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **17**, 222-8, 2003.

Notre étude montre que l'incorporation de deutérium décroît nettement dans la région C-terminale de la protéine pour la forme amyloïde alors que cette incorporation ne varie pratiquement pas sur le reste de la protéine. La chute de l'incorporation du deutérium commence à partir du résidu 217. Le peptide [193-216] a une vitesse d'échange similaire pour la forme amyloïde et pour la forme soluble, alors que l'échange sur le peptide [217-234] change brutalement entre ces deux formes (Figure 5.11.).

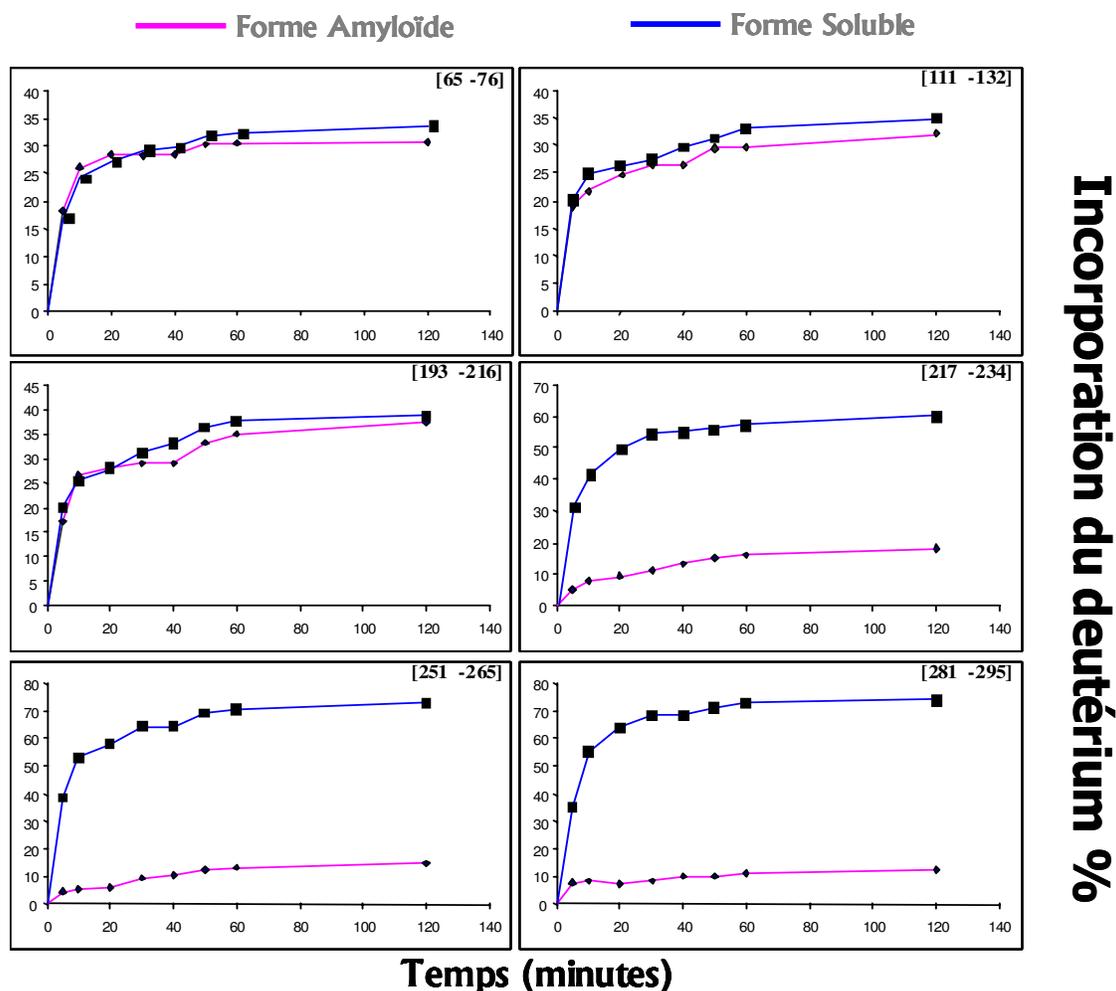


Figure 5.11. Représentation du pourcentage d'incorporation du deutérium en fonction du temps dans des peptides d'HET-s lorsque l'incubation dans le solvant deutéré a été réalisée sur HET-s dans sa forme soluble (bleu) ou dans sa forme amyloïde (rose)

pe très

minutes. La protection au niveau de la partie C terminale peut être la conséquence des nombreuses liaisons hydrogènes, caractéristiques d'une structure secondaire comme, par exemple, les feuillets  $\beta$ , qui sont des structures qui ont été observées dans les fibres amyloïdes.

<sup>274</sup> Nettleton, E. J., and Robinson, C. V. *Methods. Enzymol.* **309**, 633-46, 1999.p

<sup>275</sup> Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. *Nat. Struct. Bio.* **9**, 332-336, 2002.

<sup>276</sup> Kraus, M., Bienert, M., and Krause, E. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **17**, 222-8, 2003.

Cette observation indique que l'agrégation en fibres amyloïdes est principalement réalisée au niveau d'une région limitée de la protéine HET-s, la région C-terminale. La délimitation du core de la protéine par l'étude HXMS est en accord avec les résultats obtenus par protéolyse ménagée. La partie résistante à la protéinase K de la protéine sous forme amyloïde se situe entre les acides aminés 218 et 289<sup>277</sup>. Les données issues de ces expériences suggèrent que le niveau de protection à l'échange est relativement homogène à l'intérieur de la région C-terminale.

La région N-terminale de HET-s forme un domaine globulaire entre les résidus 1 et 230<sup>22</sup>. Les vitesses d'incorporation du deutérium calculées pour chacun des peptides présents dans cette région ne sont pas modifiées de manière importante entre la forme amyloïde et la forme soluble. La protéine prion Ure2p présente également une structure avec deux domaines, un domaine peu structuré N-terminal et un domaine C-terminal. Il a été montré que la partie globulaire de la protéine Ure2p conservait sa structure native lors de la formation des fibres<sup>278</sup>. Nos observations indiquent que l'accessibilité au solvant dans la partie N-terminale de la protéine HET-s est très peu modifiée lors de la formation des amyloïdes, ce qui suggère que la structure globulaire de HET-s n'est pas affectée lors de l'agrégation, que cette région de la protéine conserve une structuration secondaire substantielle.

L'analyse indique que, dans sa forme soluble, la partie C-terminale de HET-s, des résidus 240 à 289, est la région qui incorpore le maximum de deutérium, c'est la région la plus accessible au solvant. Cette forte accessibilité au solvant indique que cette région présente une forte dynamique et peu de structuration secondaire. La flexibilité structurale de cette région a également été documentée en utilisant d'autres approches, incluant la protéolyse limitée, la RMN et le dichroïsme circulaire<sup>22</sup>. La RMN et les expériences de protéolyse ménagée ont donné des résultats sensiblement différents. Les expériences de protéolyse ménagée indiquent un domaine non structuré qui débute à l'acide aminé 240, alors que la RMN suggérerait une région de désordre flexible plus importante<sup>22</sup>. Les données issues de la RMN, de la protéolyse ménagée et de l'étude HXMS indiquent que la région au-delà du résidu 240 est hautement flexible. Les études par HXMS et protéolyse ménagée suggèrent que la région entre les résidus 220 et 240 a un niveau intermédiaire de structuration. Il semble que le domaine non structuré de HET-s commence au résidu 240, alors que le « core » amyloïde commence au résidu 218. Il n'y aurait donc pas un parfait recouvrement entre la région flexible et la région du core amyloïde.

Pour conclure, cette étude a permis d'obtenir des renseignements directs sur les réarrangements structuraux qui apparaissent lors de la transition amyloïde de la protéine prion HET-s. Les principales modifications de l'accessibilité au solvant concernent la partie C-terminale. La formation des amyloïdes implique spécifiquement la partie C-terminale de la protéine, qui réalise une transition entre une forme

---

<sup>277</sup> Balguerie, A., Dos Reis, S., Ritter, C. Chaignepain, S. Couлары-salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lascu, I., Schmitter, JM. Riek, R., Saupe, S.J. *EMBO, in press*, 2003.

<sup>278</sup> Bousset, L., Thomson, N. H., Radford, S. E., and Melki, R. *Embo J* 21, 2903-11, 2002.

non structurée vers une forme structurée et très résistante à l'échange isotopique hydrogène/deutérium. La flexibilité conformationnelle est un prérequis à la formation des fibres<sup>279,280</sup>. Pour certaines protéines formant des amyloïdes, il a été montré que la formation des fibres est liée à la déstabilisation de l'état natif de la protéine<sup>281,282, 283, 284, 285</sup>. En particulier, il a été montré en utilisant la technique HXMS que certaines protéines amyloïdogéniques présentent une augmentation de leur dynamique conformationnelle lors des conditions de formation des fibres<sup>286</sup>. D'autres protéines amyloïdogéniques comme l' $\alpha$ -synucléine, impliquée dans la maladie de Parkinson sont non-structurées dans leur état natif (aussi appelées protéines « nativement non structurées »)<sup>287</sup>. Dans le cas de la protéine HET-s, la région C-terminale apparaît comme non-structurée dans sa forme native, et la formation spontanée des fibres dans les conditions physiologiques ne semble pas nécessiter une déstabilisation de l'état natif de la protéine. Sup35 et Ure2p présentent également un domaine flexible impliqué dans la formation des agrégats amyloïdes attaché à un domaine globulaire. Cette similitude d'organisation pour les protéines prions de champignons pourrait suggérer que ces domaines soient une caractéristique des protéines amyloïdes infectieuses.

---

<sup>279</sup> Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 60-8. 2000.

<sup>280</sup> Dobson, C. M. *Trends. Biochem. Sci.* **24**, 329-32. 1999.

<sup>281</sup> Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C., and Pepys, M. B. *Nature* **385**, 787-93. 1997.

<sup>282</sup> Chiti, F., Taddei, N., Stefani, M., Dobson, C. M., and Ramponi, G. *Protein. Sci.* **10**, 879-86, 2001.

<sup>283</sup> Dobson, C. M. *Biochem. Soc. Symp.*, 1-26. 2001.

<sup>284</sup> Fandrich, M., Fletcher, M. A., and Dobson, C. M. *Nature* **410**, 165-166. 2001.

<sup>285</sup> Chiti, F., Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99 Suppl 4**, 16419-26. 2002.

<sup>286</sup> Nettleton, E. J., and Robinson, C. V. *Methods. Enzymol.* **309**, 633-46. 1999.

<sup>287</sup> Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., and Lansbury, P. T., Jr. *Biochemistry* **35**, 13709-15, 1996.



# Conclusion Générale



## Conclusion générale

Le nombre des applications utilisant l'échange isotopique hydrogène/deutérium analysé par spectrométrie de masse (HXMS) a rapidement augmenté ces dix dernières années. Cette méthodologie permet d'appréhender la structure et la dynamique des protéines dans de nombreuses conditions expérimentales.

L'échange de tritium, la spectroscopie infra-rouge, la spectroscopie ultraviolet et la RMN ont été utilisés antérieurement pour déterminer les constantes de vitesses d'échange des hydrogènes amides des protéines. Parmi ces méthodes conventionnelles, l'échange isotopique hydrogène/deutérium couplé à la RMN permet de mesurer les vitesses d'échange sur des résidus particuliers, offrant une information hautement résolutive.

Comparée à la RMN, la spectrométrie de masse dispose de nombreux avantages, comme une meilleure sensibilité et la possibilité d'étudier des protéines de grandes tailles dans de très nombreuses conditions expérimentales. A ce jour, la plupart des expériences HXMS ont été réalisées avec des spectromètres de masse à ionisation électrospray. L'utilisation de spectromètres de masse de type MALDI pour les études HXMS est récente. Ce type d'ionisation offre la possibilité d'analyser en une seule analyse spectrale et de manière très rapide des mélanges complexes de peptides, bénéficiant de la prépondérance des ions mono-chargés.

La première partie de ce travail, consacrée à l'étude de la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1 ATPase de la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, a permis d'évaluer la pertinence de la spectrométrie de masse à ionisation MALDI pour l'étude d'interactions au sein d'un complexe hétéro-oligomérique par échange isotopique hydrogène/deutérium. La taille du complexe F1 ATPase (400 kDa), a imposé une étape de séparation par chromatographie de la sous-unité  $\epsilon$  des autres sous-unités du complexe. Cette séparation chromatographique a été réalisée en condition d'échange figé à l'aide d'un cône ZIP TIP C18. L'utilisation de la micro-chromatographie ZIPTIP a permis de réduire considérablement la quantité de matériel nécessaire à l'analyse, le temps de préparation de l'échantillon et le taux de rééchange du deutérium dans le milieu. Une première série d'expériences d'échange isotopique a été réalisée sur la sous-unité  $\epsilon$  isolée en solution contenant des concentrations croissantes d'acétonitrile. La structuration en hélice  $\alpha$  de la sous-unité  $\epsilon$ , relative à l'augmentation de la concentration de l'acétonitrile en solution, provoque une baisse de l'incorporation du deutérium au position amide pour un temps d'incubation donné. Par la suite, les interactions de la sous-unité  $\epsilon$  au sein du complexe F1 ATPase ont été étudiées en incubant directement le complexe fonctionnel dans le solvant deutéré. Les résultats obtenus sont concordants avec les données structurales disponibles pour la sous-unité  $\epsilon$ .

La seconde partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la transition amyloïde de la protéine prion HET-s. Pour cette étude, nous avons réalisé une carte de digestion à la pepsine en utilisant le couplage LC/MS/MS. La chromatographie liquide à nano-débit et le spectromètre de masse à piège ionique nous ont permis d'assigner 26 peptides qui couvrent 87% de la séquence de la protéine. Nous avons ensuite utilisé un spectromètre de masse MALDI ToF pour mesurer les constantes de vitesse d'échange isotopique aux positions amide des différents peptides lorsque la protéine HET-s était incubée sous forme soluble ou sous forme amyloïde. Les résultats indiquent une forte diminution de l'incorporation de deutérium dans la partie C terminale de la protéine lorsque celle-ci est agrégée en fibres amyloïdes. Ces résultats suggèrent que la partie 240-295 de la protéine HET-s est fortement impliquée dans des interactions au sein de la fibre amyloïde. Cette étude a largement bénéficié de la complémentarité des spectromètres MALDI ToF et ESI-piège ionique.

La détermination à l'acide aminé près des vitesses d'échange H/D s'avère délicate par spectrométrie de masse. Typiquement, la résolution que l'on peut espérer en utilisant cette méthodologie est de l'ordre de 5 à 10 acides aminés, niveau de résolution obtenu grâce à une digestion enzymatique en condition d'échange figé. Cette résolution peut être améliorée en calculant les différences du taux d'incorporation de deutérium au niveau des zones de recouvrement des différents peptides. Une des solutions envisagée pour améliorer la résolution de la méthodologie HXMS est l'utilisation de la fragmentation CID pour permettre d'accéder à la même résolution que celle obtenue par RMN. Le problème de l'utilisation de la fragmentation CID pour la mesure des constantes de vitesse d'échange est lié au phénomène de repositionnement des hydrogènes amides durant l'excitation précédant la fragmentation. En effet, ce phénomène provoque le déploiement des deutériums sur les différentes positions amides de manière aléatoire, rendant caduques les informations structurales découlant de la mesure des constantes de vitesses. Les travaux déjà réalisés pour évaluer le phénomène de repositionnement indiquent une forte dépendance aux facteurs expérimentaux tel que la nature des peptides analysés, les énergies de fragmentation mise en jeu ou encore la prise en compte de certains types d'ions fragments. Par conséquent, la suite de ce travail pourrait être consacrée à l'évaluation des effets du phénomène de repositionnement (au niveau d'un spectromètre de masse à piège ionique ou d'un spectromètre de masse ToF-ToF) en prenant pour modèle d'application la partie C terminale de la protéine prion HET-s.

# Annexes



# Hydrogen/Deuterium Exchange on Yeast ATPase Supramolecular Protein Complex Analyzed at High Sensitivity by MALDI Mass Spectrometry

Alexis Nazabal, Michel Laguerre, and Jean-Marie Schmitter

Institut Européen de Chimie et Biologie, Pessac, France

Jacques Vaillier, Stéphane Chaignepain, and Jean Velours

Institut de Biologie et Génétique Cellulaire, Bordeaux, France

To evaluate the ability of hydrogen/deuterium exchange of amide protons followed by mass spectrometry (HXMS) to yield topological information about supramolecular protein complexes, this approach has been tested with the 370 kDa hetero-oligomeric complex of yeast F1-ATPase. The study was focused on the  $\epsilon$  subunit (6612 Da) of the complex. Deuterium back exchange due to the chromatographic isolation step of this subunit was strongly reduced by means of fast micro-chromatography, and MALDI-MS was used to analyze either the intact subunit or peptide mixtures resulting from its proteolytic cleavage. A deuterium labeling kinetic study was conducted with  $\epsilon$  subunit being a part of the F1 native complex. The effect of a secondary structure was also investigated by means of HXMS on the isolated  $\epsilon$  subunit. Finally, to determine which regions of  $\epsilon$  subunit are accessible to solvent in F1-ATPase during exchange, the complex was submitted to hydrogen/deuterium exchange, the  $\epsilon$  subunit was purified by micro-chromatography, digested by pepsin, and resulting peptide fragments were analyzed by MALDI-MS. The combination of hydrogen/deuterium exchange, fast micro-chromatography and MALDI-MS was shown to be a fast and efficient way to obtain detailed topological information for the  $\epsilon$  subunit when it is engaged in the ATPase complex. (J Am Soc Mass Spectrom 2003, 14, 471–481) © 2003 American Society for Mass Spectrometry

In native proteins, hydrogen/deuterium (H/D) exchange of amide protons not only depends on solvent accessibility and spatial arrangement of amino acid residues into structure elements such as  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets, but also on the supramolecular organization of proteins. Thus, the analysis of H/D exchange may yield a fingerprint of the 3-D structure of a protein as well as a fingerprint of its direct environment within a supramolecular complex [1, 2].

Hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry (HXMS) allows the detection of isotopic exchange at backbone amide positions of proteins (H atoms covalently bound to carbon do not exchange, whereas H atoms on side chains exchange too fast to be evidenced by this methodology), and has been used to investigate various aspects of protein structure [3–5].

A major difficulty associated to HXMS methodology is deuterium back exchange. To limit this phenomenon

after an exchange usually performed under native conditions, the reaction must be quenched (pH 2, 0 °C) and the samples analysis has to be performed quickly under these last conditions [6]. To gain access to the distribution of exchanged deuterons over the protein sequence, peptides are generated by proteolytic cleavage with pepsin. This enzyme works properly at low pH, but its lack of specificity induces constraints for mass spectrometric peptide assignments.

Although many HXMS studies have been conducted with electrospray ionization (ESI), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) turns out to be a convenient tool for this purpose, taking advantage of its high speed of analysis, excellent sensitivity, and accuracy [7, 8]. Furthermore, the analysis of peptide maps by MALDI-MS after pepsin digestion neither requires combined liquid chromatography-mass spectrometry, nor tedious back exchange corrections [9, 10].

One step further, solvent accessibility of subunits belonging to a hetero-oligomeric supramolecular protein complex may also be investigated by means of

Published online April 3, 2003

Address reprint requests to A. Nazabal, Institut Européen de Chimie et Biologie, CNRS FRÉ 2247, 16, Avenue Pey Berland, Pessac Cedex 33607, France. E-mail: a.nazabal@iecb-polytechnique.u-bordeaux.fr

HXMS. However, such experiments require an additional step, because the subunits of interest must be isolated by means of liquid chromatography, and again back exchange must be kept as low as possible during this separation step.

To evaluate if HXMS may lead to a precise characterization of the solvent accessibility of a given subunit within a hetero-oligomeric complex, we report here a topological study of yeast F1-ATPase, a 370 kDa complex. The F1 domain is the catalytic sector of ATP synthase, a mitochondrial enzyme responsible for ATP synthesis. F1 domain comprises five different subunits:  $\alpha$  (55.3 kDa),  $\beta$  (52.5 kDa),  $\gamma$  (30.6 kDa),  $\delta$  (14.5 kDa), and  $\epsilon$  (6.6 kDa), in 3:3:1:1:1 stoichiometry. We have chosen to focus our study on the  $\epsilon$  subunit (61 amino acids long, 6612 Da average mass, for the mature protein having undergone methionine excision) [11].

A fast micro-chromatographic method has been designed in order to disrupt the F1-ATPase complex and to isolate  $\epsilon$  from the other subunits in less than one min. HXMS studies were performed first with the  $\epsilon$  subunit isolated in this way. The extent of H/D exchange could be determined by MALDI-MS measurement of the average mass of the whole subunit. The effect of the fast micro-chromatographic purification step on deuterium back exchange was evaluated. To study the effect of the secondary structure of this subunit on H/D exchange, deuterium labeling was measured using various solvent conditions.

A kinetic HXMS study was then realized on  $\epsilon$  subunit while embedded in F1-ATPase. To determine which regions of  $\epsilon$  subunit are accessible to solvent in F1-ATPase, H/D exchange of the whole F1-ATPase complex was followed by a micro-chromatographic isolation of the  $\epsilon$  subunit, which was then submitted to a proteolytic cleavage using pepsin, prior to MALDI-MS analysis of the resulting peptides. Owing to the poor specificity of pepsin, the critical point of the methodology lies in the requirement for a complete sequence coverage of the subunit of interest, with all peptides reliably assigned. Thus, peptide ions selected for our study were either unambiguously attributed to a given stretch from their mass values, or were assigned after fragment ion analysis [MALDI post source decay (PSD) fragmentation or ESI/MS/MS analysis by means of an ion trap].

Results were evaluated with the help of the 3-D model structure of the bovine enzyme. The possible extension of this MALDI-HXMS methodology to larger subunits belonging to supramolecular complexes is discussed.

## Experimental

Deuterium oxide (99.9%) was purchased from Eurisotop (Gif-sur-Yvette, France). Sequence grade trifluoroacetic acid (TFA) and immobilized pepsin were obtained from Pierce (Rockford, IL). Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Mallinckrodt Baker, (De-

venter, The Netherlands). ZipTip  $C_{18}$  pipette tips were purchased from Millipore (Bedford, MA). pH Indicator strips were obtained from Microessential Laboratory, (New York, NY). Polypropylene micro-centrifuge tubes were from Treff (Degersheim, Switzerland). Folin and Ciocalteu's phenol reagent was obtained from Sigma (Saint Louis, MO). Water was purified over a MilliQ apparatus (Millipore), and is hereafter referred as MQ grade.

### *Purification of Saccharomyces cerevisiae F1-ATPase*

Mitoplasts were prepared according to Daum et al. [12] with slight modifications. A suspension of mitochondria (20 mg of protein/ml in 0.6 M mannitol, 2 mM EGTA, 10 mM p-aminobenzamide (PAB), 10 mM  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM Tris-maleate, pH 6.8) was diluted with 5 volumes of the same buffer without mannitol. The suspension of mitochondria was stirred very gently on a magnetic stirrer at 4 °C for 20 min. The suspension was sedimented at 4 °C (48,000 g for 20 min). The pellet was kept frozen overnight at -80 °C. Mitochondrial membranes were thawed at 4 °C and resuspended in the same buffer as above to a protein concentration of 2 mg/ml. After 5 min, the suspension was exposed twice to ultrasonic irradiation (Annemasse sonicator, 30 s at 120 V). Total mitochondrial membranes were sedimented at 4 °C (45 min at 100,000 g). Extraction by chloroform was used to remove F1-ATPase from mitochondrial membranes [13].

Purification of yeast F1-ATPase was according to Penin et al. [14] and Falson et al. [15] with some modifications. The mitochondrial membranes were homogenized in 0.3 M mannitol, 1 mM EDTA, 10 mM PAB, 10 mM  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM ATP, 10 mM Tris-maleate, pH 7.0 to a final concentration of 10 mg/ml. The suspension was firmly shaken in the presence of half a volume of chloroform for 20 s at room temperature. The aqueous phase was recovered after centrifugation at 1,100 g for 10 min at 20 °C, and was centrifuged again at 100,000 g for 30 min at 20 °C. EDTA was added to the supernatant to a final concentration of 4 mM. The solution was maintained at pH 7 by NaOH addition, brought to 70% saturation with solid ammonium sulfate and stored at 4 °C.

The ammonium sulfate suspension was centrifuged at 100,000 g for 45 min at 4 °C. The pellet was solubilized in a minimal volume of 50% (wt/vol) glycerol, 5 mM EDTA, 10 mM PAB, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, and centrifuged twice in an Eppendorf centrifuge tube to remove potential aggregates. The supernatant was applied to a small Sephadex (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) G-50 (fine grade) centrifuge column that had been equilibrated with 50% (wt/vol) glycerol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5,

according to Penefsky [16]. The eluate was submitted to high performance gel permeation chromatography over a TSK Spherogel SW 4000 column (0.7 cm i.d., 30 cm long, Altex, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), equilibrated and eluted at room temperature with the above buffer, without PAB, at a flow rate of 0.3 ml/min. Detection was monitored at 280 nm. The fraction of eluate containing the enzyme was concentrated by means of ultracentrifugation membranes and stored as ammonium sulfate precipitate.

#### *F1-ATPase Assay*

Purified and concentrated F1-ATPase (8–10  $\mu\text{g}$ ) was incubated at 30 °C for 2 min in 900  $\mu\text{l}$  of a reaction mixture containing 50 mM Tris/SO<sub>4</sub> pH 8.5, 4 mM MgSO<sub>4</sub> in D<sub>2</sub>O. The reaction was started with 50  $\mu\text{l}$  of 0.1 M ATP pH 7, allowed to proceed for 2 min and stopped by addition of 100  $\mu\text{l}$  of trichloroacetic acid. The mixture was centrifuged for 7 min at 10,000 *g*. An 0.5 ml aliquot of the deproteinized supernatant was used for the colorimetric quantification of released inorganic phosphate. This aliquot was mixed with 2.5 ml of 0.75 N sulfonic acid, 1 mM ferric sulfate and 0.1 mM heptamolybdate, and incubated at room temperature for 15 min. Inorganic phosphate concentration was determined spectrophotometrically at 610 nm.

#### *Fast Isolation of $\epsilon$ Subunit from F1-ATPase*

The fast isolation of  $\epsilon$  subunit from F1-ATPase was obtained by micro-chromatography over a C<sub>18</sub> ZipTip (15  $\mu\text{m}$  particles, 20 nm pore size, 0.6  $\mu\text{l}$  stationary phase, Millipore). Before use, the C<sub>18</sub> support was wetted with 70% acetonitrile in MQ water, 0.1% TFA (by aspirating and dispensing 5 times to waste) and the ZipTip was equilibrated in H<sub>2</sub>O MQ, 0.1% TFA. 4  $\mu\text{l}$  of the F1-ATPase solution (7 mg/ml) were loaded. After binding, the support was washed (H<sub>2</sub>O MQ, 0.1% TFA, aspirated and dispensed to waste three times). The  $\epsilon$  subunit was eluted with 2  $\mu\text{l}$  of 20% acetonitrile in H<sub>2</sub>O MQ, 0.1% TFA. In this way, the isolation of  $\epsilon$  subunit from F1-ATPase was achieved in less than 1 min.

#### *Back Exchange in Relation to Chromatographic Isolation of $\epsilon$ Subunit*

An aliquot of  $\epsilon$  subunit, previously isolated by micro-chromatography, was dried completely, redissolved in labeling solvent (D<sub>2</sub>O, acetonitrile 4:1) and incubated 60 min at room temperature to achieve complete H/D exchange of backbone amide protons. Isotopic exchange was quenched by mixing the sample with matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in a solution containing 1:1:1 acetonitrile, ethanol, and 0.1% TFA, pH 2, kept at 0 °C). The incorporation of deuterium was directly determined by MALDI-MS analysis. To evaluate the effect of the chromatographic separation step on back

exchange, the  $\epsilon$  subunit was submitted to fast micro-chromatography after 60 min incubation time. The collected fraction containing  $\epsilon$  was mixed with the matrix solution and the incorporation of deuterium was determined by MALDI-MS analysis and compared to the previous one.

#### *HXMS on Isolated $\epsilon$ Subunit—Effect of Acetonitrile*

The  $\epsilon$  subunit solution isolated from F1-ATPase (2  $\mu\text{l}$ ) was dried in its vial using a gentle nitrogen flow. Solutions used for H/D exchange had the following acetonitrile:D<sub>2</sub>O compositions: 20:80, 30:70, 40:60, and 70:30. The deuteration solution was added to the vial and sonicated for a few seconds. After the desired incubation time at room temperature, 1  $\mu\text{l}$  of the sample was mixed with 1  $\mu\text{l}$  of the matrix solution. The matrix used in these experiments was 10 mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, in a solution containing 1:1:1 acetonitrile, ethanol, and 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O. The matrix solution was kept over ice and mixed by vortexing before use. Immediately after mixing, 0.7  $\mu\text{l}$  of the sample was spotted onto the target and dried by a nitrogen flow. After drying, the target was transferred as quickly as possible (about 1 min after quenching) to the mass spectrometer sample inlet.

#### *HXMS on F1 ATPase Complex*

A 10  $\mu\text{l}$  aliquot of the ammonium sulfate suspension of F1-ATPase (7 mg/ml) was centrifuged at 10,000 *g* for 10 min and the pellet was dissolved in 20  $\mu\text{l}$  D<sub>2</sub>O. After the desired incubation time at 25 °C, 4  $\mu\text{l}$  of F1 solution in D<sub>2</sub>O were submitted to micro-chromatography by means of a ZipTip. The equilibrating solution, the washing solution, and the eluent solution were kept over ice before use. After fast isolation,  $\epsilon$  subunit samples were prepared for mass analysis (see below).

#### *Proteolytic Cleavage by Pepsin*

The  $\epsilon$  subunit (20 pmol in 5  $\mu\text{l}$  of 20% acetonitrile, 0.01% TFA, 0 °C) was digested with 45 u of immobilized pepsin (Pierce) in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  of 0.1% TFA. After incubation (10 min, 0 °C), the digest was centrifuged (10,000 *g*, 1 min) to separate the beads from the peptide fragments. 1  $\mu\text{l}$  of the supernatant (2 pmol) was mixed with the matrix and spotted on the MALDI target under nitrogen flow.

#### *Structure Prediction and Models*

Calculations were performed on a SGI Octane workstation running InsightII and Discover version 2000 (Accelrys Inc., San Diego, CA). Sequence homology building was performed within the Homology module. The sequence used for the yeast  $\epsilon$  subunit was referenced as

SwissProt P21306 (<http://www.expasy.ch>). The 3-D structure used as reference for homology building was the bovine F1-ATPase structure of Gibbons et al. [17] (2.4 Å resolution, PDB code: 1E79) in which the 47 first amino-acids of the  $\epsilon$  subunit have been solved (full length of 50 aminoacids, SwissProt accession number P05632).

Secondary structure predictions were obtained by means of the following softwares: JPRED (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>), PHD (<http://cubic.bioc.columbia.edu/pp>), PSIPred (<http://insulin.brunel.ac.uk/psiform.html>), SSpro (<http://promoter.ics.uci.edu/BRNN-PRED>), SAM-T99 (<http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T99-query.html>), and PROF (<http://www.aber.ac.uk/~P5phiwww/prof/index.html>).

Lipophilicity potential maps have been calculated and drawn around the model of the yeast  $\epsilon$  subunit by means of in-house software [18].

### Mass Spectrometry

MALDI mass spectra were acquired on a Bruker Reflex III mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337 nm emission wavelength). Spectra were obtained by accumulating an average of 100 shots in the positive ion mode, while the laser spot was manually scanned over a surface area of about 0.2 mm<sup>2</sup>. Deflection of the low mass ions was used to enhance the target protein signal. Mass spectra of the whole  $\epsilon$  subunit were obtained in the linear mode (20 kV accelerating voltage). An external calibration was performed for each measurement with the singly and doubly charged ions of the unlabeled  $\epsilon$  subunit. Mass values given in the text correspond to  $m/z$  of the centroid of the envelope of the mass peaks for  $[M + H]^+$  pseudo-molecular ions. Mass spectra of  $\epsilon$  subunit digests were acquired in the reflectron mode, using external calibration with a mixture of eight peptides covering a 900 to 3500 mass range. In this case, measured masses were monoisotopic  $[M + H]^+$  ions.

For post source decay analysis, the reflectron voltage was stepped down from 30 kV in 10–12 steps in order to records all fragment ions, including immonium ions.

In order to control the assignment of peptides, MS/MS analysis of some peptide sequences was performed by means of an ion trap mass spectrometer operated in the electrospray mode (LCQ DecaXP, Thermo Finnigan, San Jose, CA) and interfaced to a Dionex-LC Packings (San Francisco, CA) chromatographic system ( $C_{18}$  column, 75  $\mu$ m i.d., 150 mm long).

## Results and Discussion

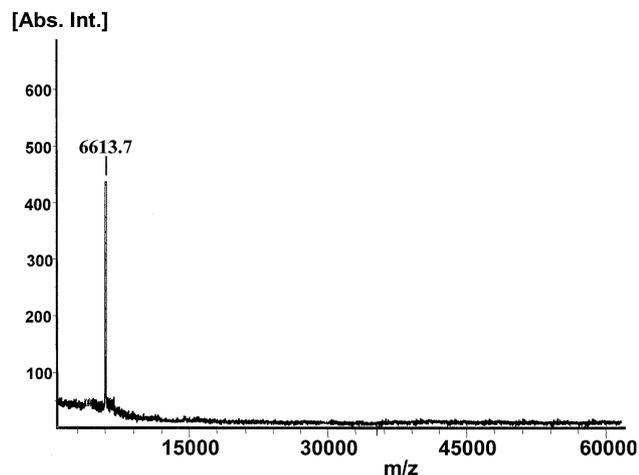
### MALDI-HXMS Conditions

MALDI-HXMS combines the advantages of high speed of analysis and excellent sensitivity and accuracy of mass measurements with the capability to analyze

peptide maps in a single spectral acquisition. Back exchange may be neglected for MALDI-HXMS experiments, provided that the sample preparation allows a quick transition between the moment of exchange quenching and the transfer into the ion source of the spectrometer [9]. We have chosen to prepare the matrix in a 1:1:1 acetonitrile, ethanol, and 0.1% aqueous TFA mixture kept on ice, to apply a small sample volume (0.7  $\mu$ l) on the target, and to dry it under a nitrogen flow. In this way, the target was ready to load in the mass spectrometer vacuum lock in less than one min. Since we found that water condensation on a cold target did affect the sample crystallization process, and that much time was spent to eliminate this condensate prior to mass analysis without benefit in terms of back exchange minimization, we did not follow the recommendation of Mandell et al. [9] who kept the target on ice. A deuterated matrix is not required, since the H/D exchange occurring on the MALDI target within the ion source is slow (it takes several hours to observe 50% back exchange on a fully deuterated peptide).

### Control of Back Exchange During Chromatographic Separation of $\epsilon$ Subunit

In order to conduct HXMS experiments on the F1-ATPase complex, with focus on the  $\epsilon$  subunit embedded in this assembly, controls were performed to evaluate the impact of a chromatographic separation process on back exchange. For this, the maximal exchange level was measured first with an  $\epsilon$  subunit sample previously isolated by liquid chromatography: in this case, labeling reached 95% of exchangeable amide protons (57 out of 60). In a separate experiment, the isolated  $\epsilon$  subunit was incubated for 60 min in deuterium oxide, then submitted again to liquid chromatography. In this latter case, the level of back exchange resulting from the use of a reversed phase chromatographic system was found to be very high. Two different columns were tested for this purpose, using a water/acetonitrile gradient in 0.1% TFA with a sharp slope. The first one was a  $C_{18}$  grafted silica column (Vydac 238, Hesperia, CA, with monomeric bonding, 5  $\mu$ m particles, 30 nm pores, 4.6 mm i.d., and 50 mm length). The  $\epsilon$  subunit eluted after 10 min and the corresponding fraction was immediately analyzed by MALDI-MS, or kept frozen in liquid nitrogen prior to this analysis. The maximal H/D exchange measured in this case by MALDI-MS was 44%. In a second attempt, a Poros R2 (Perseptive Biosystems, Framingham, MA) column was used (10  $\mu$ m particles, 4.6 mm  $\times$  50 mm). This support tolerated higher flow rates and the  $\epsilon$  subunit eluted after 6 min, but the exchange level was only slightly better (52%). We then developed a micro-chromatographic gradient separation using a ZipTip ( $C_{18}$  support, 0.6  $\mu$ l stationary phase in the tip, cf experimental part). In this case, the  $\epsilon$  subunit was isolated with a step gradient elution at 20% acetonitrile,



**Figure 1.** MALDI mass spectrum of  $\epsilon$  subunit isolated by reversed phase fast micro-chromatography. Out of the F1-ATPase complex (10 pmol in 0.04M  $\text{MgSO}_4$ , 50 mM Tris- $\text{SO}_4$  in a 5  $\mu\text{l}$  volume), only the  $\epsilon$  subunit elutes from the C18 ZipTip at 20% acetonitrile concentration. One half of the elution fraction (1  $\mu\text{l}$ ) was mixed with the matrix, spotted on the target and analyzed in the linear mode. The observed mass at  $m/z$  6613.7 Da corresponds to the  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ion. The calculated average mass  $[\text{M}]$  for  $\epsilon$  subunit is 6612.6 Da.

allowing to separate it in less than one min from other F1 subunits, as shown by MALDI-MS analysis (Figure 1). In this way, the maximal exchange level was found to be  $(92 \pm 3\%)$  when the  $\epsilon$  subunit was incubated for various times (from 60 min to several h) before chromatographic separation.

This control was conducted with the isolated  $\epsilon$  subunit, but could not be performed on the whole F1-ATPase complex because it is not possible to determine in a single experiment if a measured decrease of the exchange level is due to back exchange, or if this decrease is due to interactions between subunits within the F1-ATPase complex.

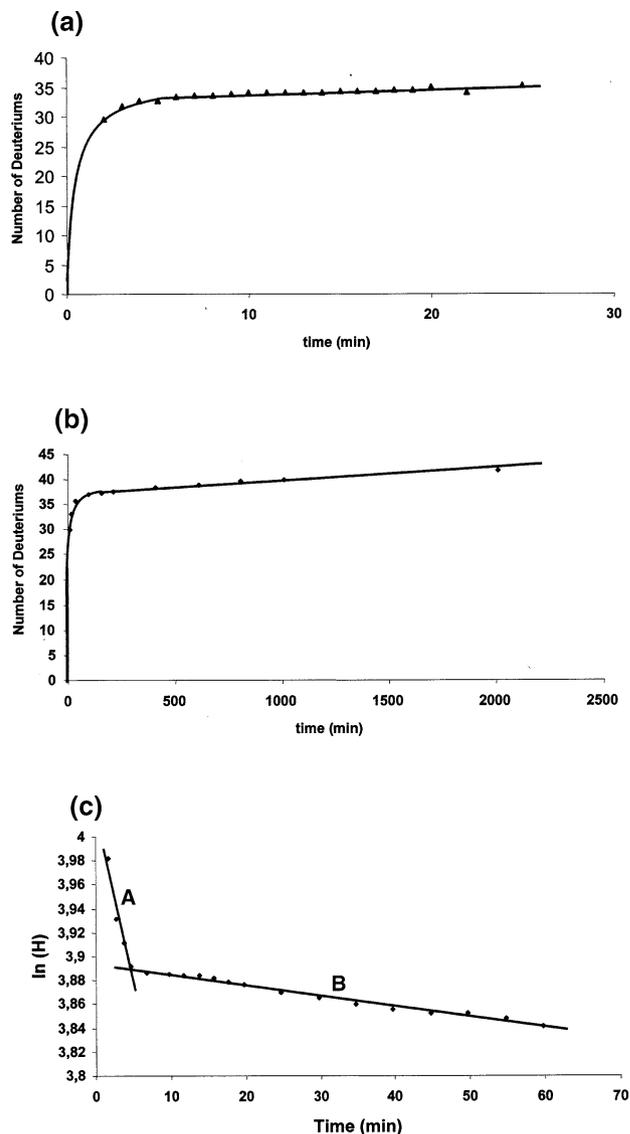
### *Incorporation of Deuterium in $\epsilon$ Subunit as a Function of Incubation Time*

H/D exchange was allowed to occur on F1-ATPase with variable times between 2 and 2000 min, followed by an isolation of the  $\epsilon$  subunit by means of fast micro-chromatography. Starting from a  $\epsilon$  subunit embedded in F1-ATPase, the deuterium content was found to increase rapidly during the first 20 min (Figure 2). After this incubation time, only a very slow variation of deuterium content was observed. This result indicates that a large part of the exchangeable hydrogen atoms of  $\epsilon$  subunit is still protected after 20 min of incubation in a deuterated solvent.

The exchange level can be quantified by means of the following equation [19]:

$$(1/H_t) \cdot H = e^{(-k_{ex}t)} \quad (1)$$

with:



**Figure 2.** (a) Incorporation of deuterium in  $\epsilon$  subunit as a function of incubation time between 0 and 25 min. After incubation in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\epsilon$  subunit was isolated from F1-ATPase and analyzed by MALDI-MS. Because no data are available for  $t < 2$  min., the dotted line between 0 and 2 min is an extrapolation of the graph. (b) Same as above, for the 0 to 2000 min time interval. (c) Kinetics of H/D exchange of  $\epsilon$  subunit; the natural logarithm of the amount of protected hydrogens in  $\epsilon$  subunit  $\ln(H)$  is plotted versus time ( $t$ ). For the  $\epsilon$  subunit, intermediate exchange data are represented by the lines (A)  $\ln[H] = -2.9 \times 10^{-2}t + 4.0$  ( $r^2 = 0.93$ ) and (B)  $\ln(H) = -9.0 \times 10^{-4}t + 3.9$  ( $r^2 = 0.98$ ).

- $H_t$ : Total amount of exchangeable hydrogen atoms
- $H$ : Number of hydrogens present after time  $t$ .
- $k_{ex}$ : H/D exchange rate constant
- $t$ : Incubation time in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Half-lives of exchangeable hydrogen atoms can be calculated from the plot  $\ln[H]$  versus  $t$  [20], which may also reveal populations of hydrogen atoms having different exchange rate constants. In our HXMS experiments, fast exchanging H atoms (between 0 and 2 min) were already exchanged at the time of the first mea-

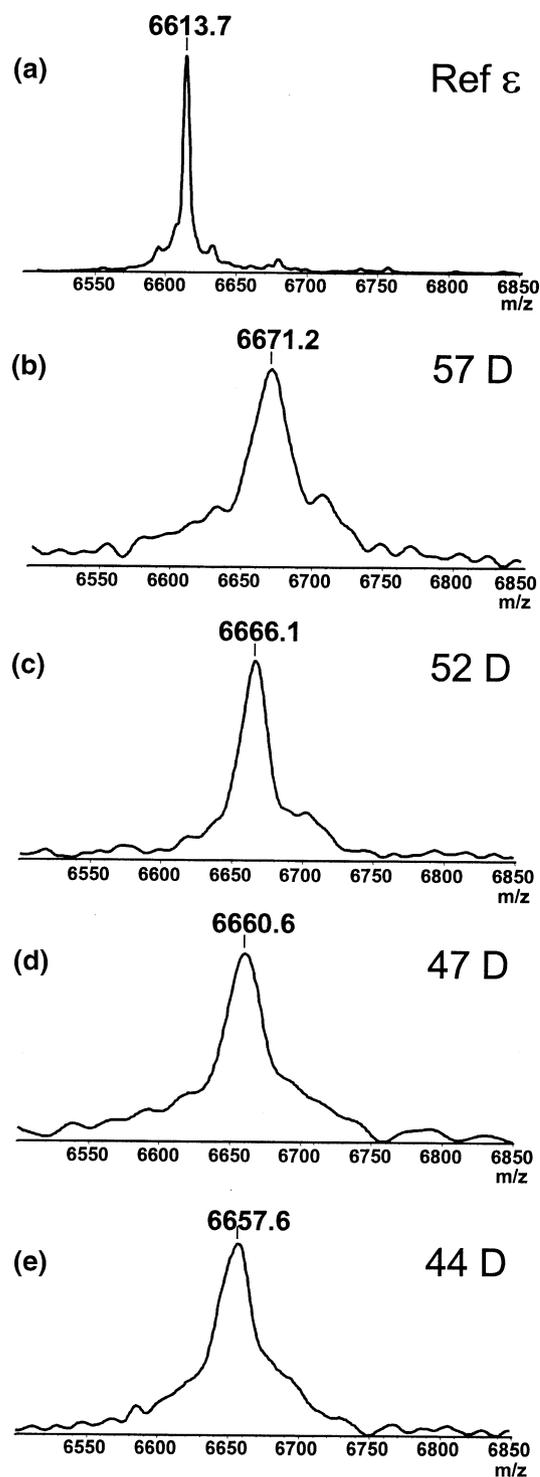
surements. These hydrogen atoms are most accessible to the solvent and are not protected by hydrogen bonding involved in secondary structuration or supramolecular interactions of the  $\epsilon$  subunit within the complex. This accounts for about 29 amide protons for the  $\epsilon$  subunit in F1-ATPase (Figure 2a). The category corresponding to intermediate exchange (between 2 and 1000 min) comprises 10 H atoms (Figure 2b, 39 D atoms exchanged at 1000 min). As shown on Figure 2c, two populations may be distinguished in our case for this intermediate exchange. The first subpopulation is composed of 3 H atoms with a half-life of 24 min. The second subpopulation is composed of 7 H atoms with a half-life of 69 min. This leaves two slowly exchangeable H atoms (41 D atoms exchanged at 2000 min, Figure 2b), that are highly protected.

This study of H/D exchange highlights the importance of the protecting effect due to interactions between the subunits. When the  $\epsilon$  subunit is embedded in the F1 complex, secondary structure and interactions with the neighboring  $\gamma$  and  $\delta$  subunits result in a protection of various exchangeable positions.

#### Effect of $\epsilon$ Subunit Secondary Structure on Deuterium Labeling

In this experiment,  $\epsilon$  subunit was first isolated from F1-ATPase using fast micro-chromatography. After an incubation time of 10 min in deuterated solvent, samples were analyzed by MALDI-MS. We have shown that the maximal exchange level observed for an isolated  $\epsilon$  subunit was obtained only after 60 min in 100%  $D_2O$ . In order to observe a partial exchange situation for the  $\epsilon$  subunit, we have chosen an incubation time of 10 min.

The MALDI-MS spectra displayed in Figure 3 show the incorporation of deuterons upon incubation in various  $D_2O$ /acetonitrile mixtures, as determined from the average mass measurement of the  $\epsilon$  subunit. Thus, 57 deuterons were incorporated after incubation in 100%  $D_2O$  (Figure 3a and b). When increasing amounts of acetonitrile were mixed with  $D_2O$ , the number of exchanged amide protons diminished: 52 deuterons were incorporated after an incubation in  $D_2O$  with 20% acetonitrile, 47 deuterons after incubation in  $D_2O$  with 30% acetonitrile and 44 deuterons after an incubation in  $D_2O$  with 40% acetonitrile (Figure 3c to e). In parallel to these experiments, a sample of  $\epsilon$  subunit obtained by solid phase synthesis [21] was analyzed by circular dichroism (CD) with an increasing concentration of acetonitrile. This study (data not shown) indicated that  $\epsilon$  subunit is mostly non-structured in neat water, and that an increase of acetonitrile concentration from 0 to 40% results in an increased  $\alpha$ -helical structuration for this polypeptide. Indeed, a  $\Delta\epsilon_{220nm}/\Delta\epsilon_{208nm}$  ratio of about 0.8, indicative of a single stranded helical structure, was found at 40% acetonitrile, whereas a possible peptide oligomerization would have given a value of



**Figure 3.** MALDI mass spectra of whole  $\epsilon$  subunit incubated in solutions containing  $D_2O$  and different concentrations of acetonitrile. Isolated  $\epsilon$  subunit samples were prepared as described under Experimental. 25 picomoles of  $\epsilon$  subunit were incubated 10 min in the  $D_2O$  solution at room temperature. After incubation, the exchange reaction was quenched (pH 2 and 0 °C), the sample was mixed with matrix and analyzed by MALDI-MS in the linear mode. (a) Mass spectrum of reference  $\epsilon$  subunit (no incubation in  $D_2O$  solution); (b) mass spectrum of  $\epsilon$  subunit after incubation in 100%  $D_2O$ ; (c), (d), (e) mass spectra of  $\epsilon$  subunit after incubation in  $D_2O$  solution containing 20, 30, and 40% acetonitrile, respectively.

about 1.0 [22]. Thus, the partial protection of exchangeable H atoms on  $\epsilon$  subunit observed with increasing acetonitrile concentration likely results from  $\alpha$ -helical structure, characterized by hydrogen bonding between amino acid residues involved in the helix. Noteworthy, acetonitrile concentrations above 40% led to a loss of helical structuration of  $\epsilon$  subunit, resulting in an increase of the H/D exchange (56 exchanged deuterons found at 70% acetonitrile concentration, close to the number found for the incubation in neat deuterium oxide.)

### Peptide Mapping of $\epsilon$ Subunit

In order to determine which regions of  $\epsilon$  subunit are most accessible to solvent, a peptide mass fingerprint was generated. The  $\epsilon$  subunit was cleaved using immobilized pepsin and the resulting peptides were analyzed by MALDI-MS [23]. The complex mixture of peptides is easily analyzed by MALDI-MS because  $[M + H]^+$  ions are by far the major ions observed for peptides in the 700–3000 Da mass range. The MALDI mass spectrum of the whole  $\epsilon$  subunit pepsin digest showed approximately 30 major peaks (Figure 4a). The major concern of spectrum processing was to assign an experimental mass to a given fragment without any ambiguity, while obtaining a maximal sequence coverage. All operations pertaining to this peptide mapping were performed with non-deuterated samples.

By means of MALDI-MS analysis alone, six peaks representing 89% of the primary sequence of  $\epsilon$  subunit could be assigned (Table 1). These selected peaks matched only one possible fragment belonging to  $\epsilon$  subunit, within a 20 ppm interval corresponding to the confidence limit of our external calibration system based on a mixture of eight reference peptides (see Experimental). All peaks that did contain a mixture of two or more peptides were not taken into consideration. Only the [3–20] segment could not be assigned with certainty by MALDI-MS alone. In this particular case, we could not apply PSD fragment analysis to obtain a related sequence tag because the resolving power of the ion gate of our MALDI-TOF instrument did not allow a proper isolation of the peptides that could account for this peptide stretch. Therefore, we have used combined LC/MS/MS on an ion trap to identify the  $m/z$  1953.06 peak, which turned out to correspond to an unique peptide in the digest, thus completing the sequence coverage of the  $\epsilon$  subunit.

Assigning and selecting the peptide peaks that allow counting deuterium incorporation along a polypeptide sequence represents the most time consuming part of HXMS experiments relying on MALDI-MS. Extending this kind of study to larger subunits belonging to a supramolecular complex often requires the assistance of LC/MS/MS for unambiguous peptide mapping, an interesting alternative certainly being the use of MALDI-TOF/TOF instruments with improved ion gates.

### Solvent Accessibility in F1-ATPase Complex

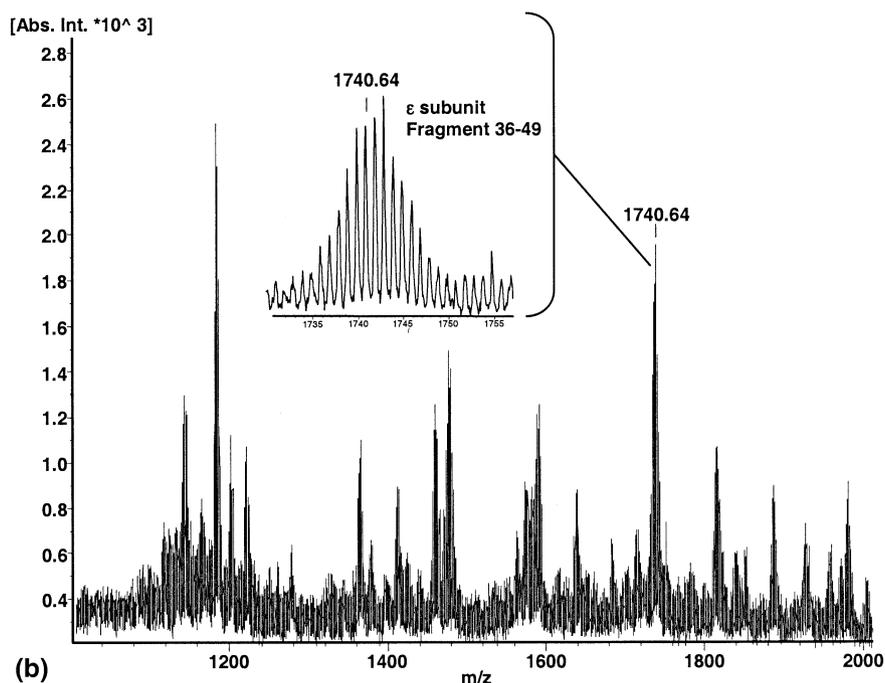
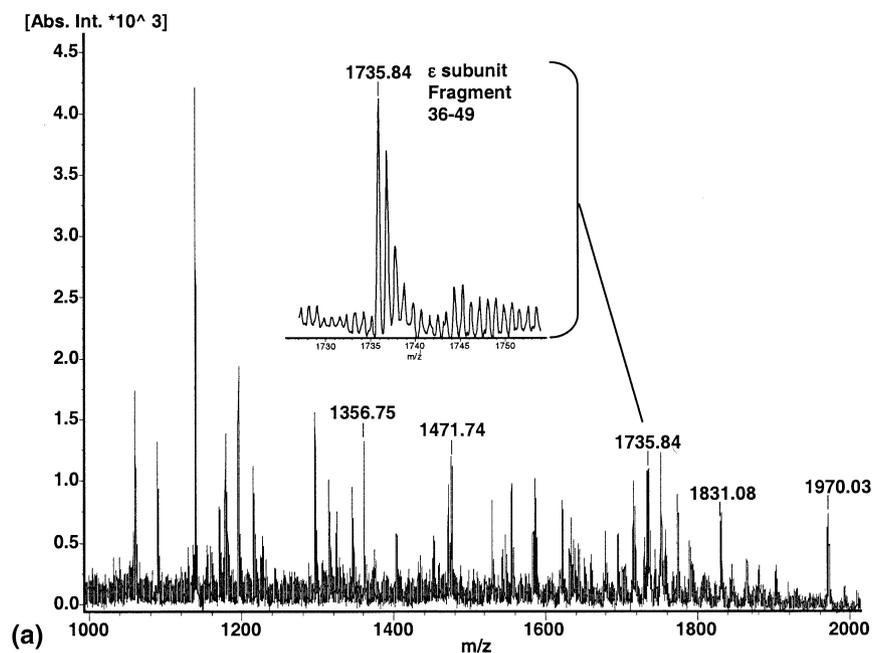
Once the peptide mapping was completed, the H/D exchanged  $\epsilon$  subunit was submitted to proteolytic cleavage with pepsin. Subsequently, the deuteration level of each selected peptide fragment was determined from the mass spectrum of the complex mixture (Figure 4b). For this, the centroids of the mass envelope for the undeuterated and deuterated peptide were calculated [24, 25]. As a control, the  $\epsilon$  subunit was isolated from F1-ATPase by means of fast micro-chromatography and cleaved by immobilized pepsin. The resulting fragments were dried and incubated in 100% D<sub>2</sub>O for 30 min to allow exchange control and the amount of deuterium incorporated by each assigned peak was determined. For each peptide, 80 to 90% of the amide protons were exchanged by deuterium after 30 min. This value corresponds to the maximal experimental exchange level observed for  $\epsilon$  subunit peptides after 30 min, because neither secondary structuration nor supramolecular interactions may diminish the exchange level (Figure 5b).

To confirm the hypothesis of the influence of  $\epsilon$  subunit  $\alpha$ -helical structuration on deuterium labeling, the  $\epsilon$  subunit previously isolated by chromatography was incubated 10 min in D<sub>2</sub>O in presence of 40% acetonitrile. After this time, the  $\epsilon$  subunit was digested and the incorporation of deuterium was determined for each peptide. The [3–20] peptide displayed the lowest deuterium incorporation (Figure 5a). These data are in full agreement with the existence of an  $\alpha$ -helix for the [13–23] region in the 3-D structure of the bovine  $\epsilon$  subunit of ATPase [17].

In a final experiment, native F1-ATPase was submitted to HXMS in order to determine which regions of  $\epsilon$  subunit are the most accessible to deuterium oxide. Thus, these experiments used a buffered medium for H/D exchange in order to maintain a high enzymatic activity level for the F1-ATPase complex (cf Experimental for assay conditions). A kinetic study indicated that after 20 min incubation time, the deuterium content remained constant for the  $\epsilon$  subunit. This strongly underlines the importance of supramolecular interactions for the incorporation of deuterium. The highest exchange level was found for the [24–40] peptide, while the less exchangeable peptide was the [3–20] (Figure 5b).

A 3-D structure of yeast F1-ATPase not being available, we evaluated the results of our H/D exchange experiments by means of the known structure of the bovine enzyme. Indeed, the sequence alignment of the yeast  $\epsilon$  subunit with its bovine counterpart is straightforward: a large homology region comprising the highly structured core of the bovine subunit encompasses the three  $\alpha$ -helices (59% homology with 44% strict identity; see Figure 6).

Since there was no data available on the structure of the C-terminal part of the yeast  $\epsilon$  subunit, we used secondary prediction softwares (cf Experimental sec-



**Figure 4.** (a) MALDI mass spectrum of the peptide mixture obtained after pepsin digestion of non-deuterated  $\epsilon$  subunit. The inset is an expansion of the peptide peak 1735.84 (fragment [36–49]). (b) MALDI mass spectrum of the mixture obtained after pepsin digestion of deuterated  $\epsilon$  subunit following a 30 min incubation of 30 pmol ATPase in  $D_2O$ . After fast micro-chromatography, the isolated  $\epsilon$  subunit was cleaved using immobilized pepsin and analyzed in the same conditions as in (a). The inset is an expansion of the peptide peak corresponding to the deuterated fragment [36–49]. Mass values correspond to the centroid of the envelope of the mass peaks for  $[M + H]^+$  pseudo-molecular ions.

tion). Identical results were obtained in all cases, with an accurate prediction of the three  $\alpha$ -helices of the N-terminal part: On average from A2 to A6, from S9 to

L25, and from Q30 to L35, corresponding to the X-ray structure (h1 from S1 to A6, h2 from S9 to S24, and h3 from E28 to V34). Conversely, none of these software-

**Table 1.** Assignment of peptide ions covering the sequence of  $\epsilon$  subunit

Calculated mass <sup>a</sup>	Measured mass <sup>a</sup>	Position	Sequence	Identification method <sup>b</sup>
1356.71	1356.72	2–13	AWRKAGISYAAY	Exact mass
1953.04	1953.04	3–20	WRKAGISYAAYLNVAQA	LC/MS/MS
1831.03	1831.06	20–36	AIRSSLKTELTASVLN	Exact mass
1876.01	1876.03	24–40	SLKTELTQIASVLNRSQT	Exact mass
1471.72	1471.73	32–44	ASVLNRSQTDAFY	Exact mass
1735.80	1735.82	36–49	NRSQTDAFYTQYKN	Exact mass
1969.99	1970.00	44–61	YTQYKNGTAASEPTPIK	Exact mass

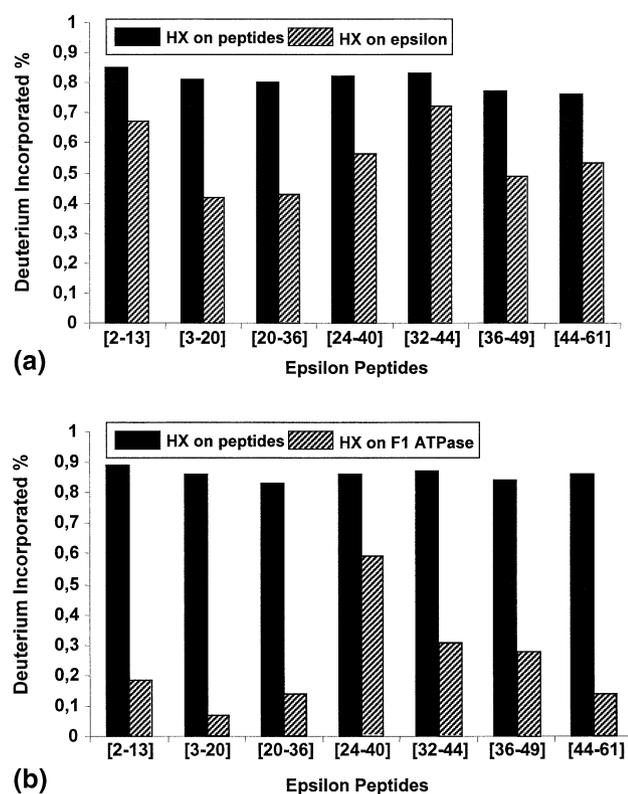
<sup>a</sup>MH<sup>+</sup> monoisotopic masses.<sup>b</sup>Exact mass indicates that only one possible peptide from  $\epsilon$  subunit had a mass that matched the experimental mass within 20 ppm.

aided predictions indicated a secondary structure for the C-terminal domain of the sequence, but only an

extended conformation for the part between D41/A42 and Y47/K48, the remaining part of the sequence predicted to be a random coil.

A sharp and highly lipophilic zone appears clearly around W3, Y10, and Y13 residues, in a well structured part of the protein. As these three aromatic moieties are in close spatial proximity, it is very likely that this area is involved in protein-protein interaction.

In order to visualize which regions of  $\epsilon$  subunit are the most accessible to deuterium in F1-ATPase complex, a model based on the bovine structure reflecting the sequence homology and secondary structure prediction has been built: Thus, the structured [1–44] part is followed by an extended C-terminal domain (Figure 7a). The grey scale encoding shows the highest H/D exchange level localized on the [24–27] turn and [28–37] h3  $\alpha$ -helix. Further, a model structure of the three neighboring subunits  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  has been built on the basis of the bovine structure, the yeast  $\epsilon$  subunit replacing its bovine homologous subunit (Figure 7b). This model shows the interaction domains between subunits, and is in excellent agreement with our observation of the highest H/D exchange level located in the [24–40] region.



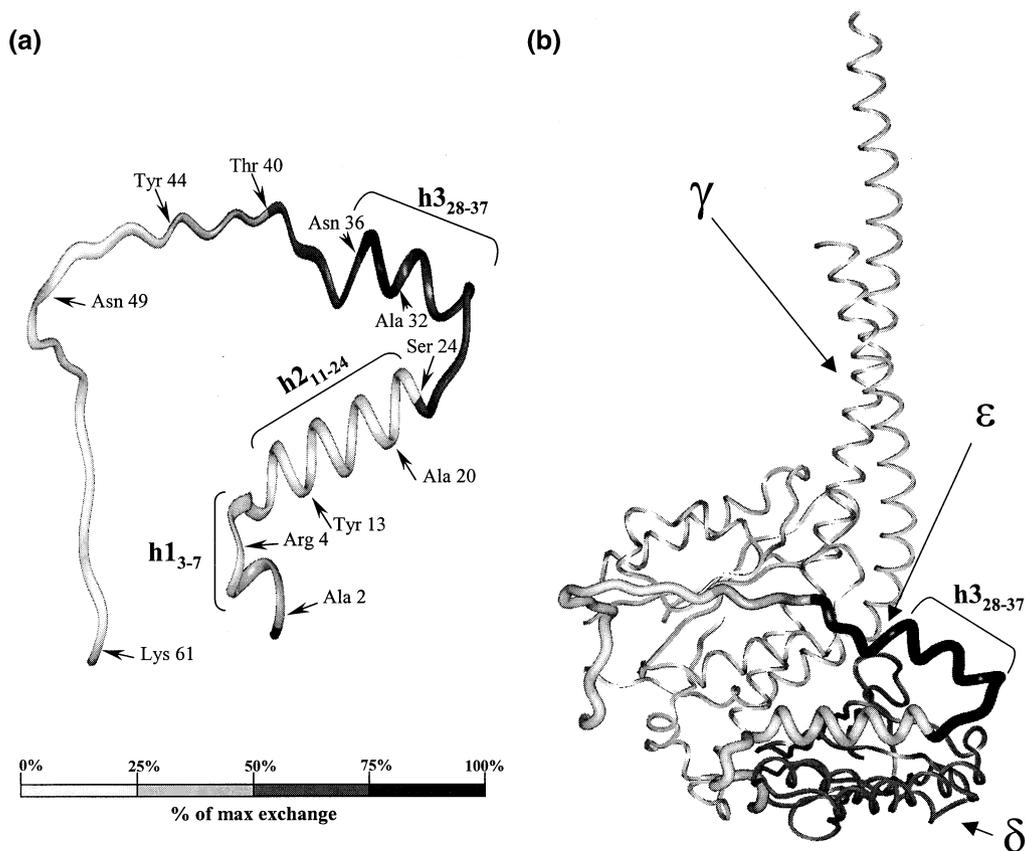
**Figure 5.** (a) Effect of  $\alpha$ -helical structure on H/D exchange level along the primary structure of the  $\epsilon$  subunit. The deuterium incorporated (%) is calculated for each  $\epsilon$  fragment (as  $D/H_i$ , where D is the measured amount of deuterium incorporated and  $H_i$  is the total of exchangeable hydrogens for the fragment). These histograms result from four independent experiments ( $s \# 0.015$ ). HXMS on peptides: A pepsin digest of  $\epsilon$  subunit was incubated 10 min in  $D_2O$ :acetonitrile 6:4. HXMS on  $\epsilon$ : isolated  $\epsilon$  subunit was submitted to H/D exchange (10 min in  $D_2O$ :acetonitrile 6:4) and then digested with pepsin. (b) Effect of protein-protein interactions within the ATPase complex on H/D exchange level along the primary structure of the  $\epsilon$  subunit. The deuterium incorporated (%) is calculated as in the case of (a). These histograms result from four independent experiments ( $s \# 0.015$ ). HXMS on peptides: A pepsin digest of  $\epsilon$  subunit was incubated 30 min in  $D_2O$ , 0.04M  $MgSO_4$ , 50 mM Tris  $SO_4$ . HX on F1 ATPase: The F1-ATPase complex was incubated 30 min in  $D_2O$ , 0.04M  $MgSO_4$ , 50 mM Tris  $SO_4$ , then the  $\epsilon$  subunit was isolated by fast micro-chromatography and submitted to pepsin digestion.

## Conclusion

Hydrogen/deuterium exchange monitored by MALDI mass spectrometry is a well-performing technique to study the topology of supramolecular hetero-oligomeric complexes. The use of fast reversed phase microchromatography solved the problem of deuterium back exchange that may result from the steps required for complex disruption and subunit purification. HXMS was used to study the kinetics of deuterium incorporation in ATPase  $\epsilon$  subunit, the effect of secondary structure on deuterium incorporation and finally the accessibility of  $\epsilon$  to solvent within the native complex. The results establish the ability of MALDI-HXMS to provide useful information on the conformational state of a protein and on its supramolecular interactions, while only requiring a few picomoles of sample. This approach may be extended to larger subunits and other supramolecular complexes, provided that target sub-

E\_YEAST : SAWRKAGISYAAAYLNVAQAIRSSLKTELOQTASV LNRSQTDAFYTQYKNGTAASEPTPITK  
 EPS\_BOV : VAYWRQAGLSYIRYSQICAKAVRDALKTEFKANAMKTSGSTIKIVKV

**Figure 6.** Sequence alignment of bovine and yeast  $\epsilon$  subunits; the frame shows the highest homology area.



**Figure 7.** Representation of  $\epsilon$  subunit accessibility to  $D_2O$  in F1-ATPase. (a) A model structure of the yeast  $\epsilon$  subunit has been built on the basis of the bovine enzyme for the first 47 aminoacids, leaving a random coil for the remaining amino acids that do not exist in the bovine enzyme. Four levels of H/D exchange are indicated from very low level in white to high level in black. (b) The yeast  $\epsilon$  subunit model structure (instead of its corresponding bovine subunit) is shown in interaction with the neighboring  $\gamma$  and  $\delta$  subunits. This scheme reveals a [24–37] domain highly exposed to the solvent, in agreement with the highest measured H/D exchange levels.

units can be separated by fast chromatography, and that peptide mapping is conducted carefully in order to deliver unambiguous sequence coverage. MALDI-MS alone might not be accurate enough to achieve successfully this task in all cases, and should then be associated to MS/MS sequence assignment for this first part of HXMS methodology.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of CNRS (ACI program "Dynamique et réactivité des assemblages biologiques") and of the Région Aquitaine, and the help of Dr. Marc Bonneau for ion trap mass measurements.

## References

1. Woodward, C. K. Hydrogen Exchange Rates and Protein Folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 112–116.
2. Hvidt, A. Hydrogen Exchange in Proteins. *Adv. Protein Chem.* **1966**, *21*, 287–385.
3. Miranker, A.; Robinson, C. V.; Radford, S. E.; Aplin, R. T.; Dobson, C. M. Detection of Transient Protein Folding Populations by Mass Spectrometry. *Science* **1993**, *262*, 896–900.
4. Englander, S.; Mayne, W.; Bai, Y.; Sosnick, T. R. Hydrogen Exchange: The Modern Legacy of Linderstrom-Lang. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1101–1109.
5. Hoofnagle, A.; Resing, K.; Goldsmith, E.; Nathalie, G. Changes in Protein Conformational Mobility Upon Activation of Extracellular Regulated Protein Kinase-2 as Detected by Hydrogen Exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *98*, 956–961.

6. Englander, J. J.; Rogero, J. R.; Englander, S. W. Protein Hydrogen Exchange Studied by the Fragment Separation Method. *Anal. Biochem.* **1985**, *147*, 234–244.
7. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *78*, 53–68.
8. Burlingame, A. L.; Boyd, R. K.; Gaskell, S. J. Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1994**, *68*, 634R–683R.
9. Mandell, J. G.; Falick, A. M.; Komives, E. A. Measurement of Amide Hydrogen Exchange by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3987–3995.
10. Figuerosa, I.; Russel, D. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Hydrogen/Deuterium Exchange Studies to Probe Peptide Conformational Changes. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**, *10*, 719–731.
11. Arselin, G.; Gandar, J. C.; Guérin, B.; Velours, J. Isolation and Complete Amino Acid Sequence of the Mitochondrial ATP Synthase  $\epsilon$ -Subunit of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 723–727.
12. Daum, G.; Böhni, P. C.; Schatz, G. Import of Proteins into Mitochondria. Cytochrome b2 and Cytochrome c Peroxidase are Located in the Intermembrane Space of Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13023–13033.
13. Beechey, R. B.; Hubbard, S. A.; Linnet, P. E.; Mitchell, A. D.; Munn, E. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Adenosine Triphosphatase from Submitochondrial Particles. *Biochem. J.* **1975**, *148*, 533–537.
14. Penin, F.; Godinot, C.; Gautheron, D. C. Optimization of the Purification of Mitochondrial F<sub>1</sub>-Adenosine Triphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1979**, *548*, 63–71.
15. Falson, P.; Di Pietro, A.; Gautheron, D. C. Chemical Modification of Thiol Groups of Mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase from the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7151–7159.
16. Penefsky, H. S. Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 2891–2899.
17. Gibbons, C.; Montgomery, M. G.; Lesli, A. G. W.; Walker, J. E. The Structure of the Central Stalk in Bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1055–1061.
18. Laguerre, M.; Saux, M.; Dubost, J. P.; Carpy, A. MLPP: A Program for Calculation of Molecular Lipophilicity in Proteins. *Pharmacol. Sciences* **1997**, *3*, 217–222.
19. Liu, Y. Q.; Smith, D. L. Probing High Order Structure of Proteins by Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1994**, *5*, 19–28.
20. Demmers, J.; Haverkamp, J.; Heck, A.; Koeppe, R.; Killian, A. 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.* **2000**, *97*, 3189–3194.
21. Aznar-Derunes, C.; Manigand, C.; Picard, P.; Dautant, A.; Goetz, M.; Schmitter, J. M.; Precigoux, G. Study of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase  $\epsilon$ -Subunit. *J. Pep. Sci.* **2002**, *8*, 365–372.
22. Goetz, M.; Carlotti, C.; Bontems, F.; Dufour, E. J. Evidence for an  $\alpha$ -helix- $\rightarrow$  $\pi$ -Bulge Helicity Modulation for the *neu/erbB-2* Membrane-Spanning Segment. A <sup>1</sup>H NMR and Circular Dichroism Study. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6534–6540.
23. Juhasz, P.; Martin, S. A. The Utility of Nonspecific Proteases for Characterization of Glycoproteins by High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **1997**, *169*, 217–230.
24. Mardsen, J. E.; Tromba, A. J. *Vector Calculus*; 3rd ed. W. H. Freeman and Co: New York, 1988, Chapter VI.
25. Zhang, Z.; Smith, D. Determination of Amide Hydrogen Exchange by Mass Spectrometry: A New Tool for Protein Structure Elucidation. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 522–531.

# Conformational Transition Occurring upon Amyloid Aggregation of the HET-s Prion Protein of *Podospora anserina* Analyzed by Hydrogen/Deuterium Exchange and Mass Spectrometry<sup>†</sup>

Alexis Nazabal,<sup>\*,‡</sup> Suzana Dos Reis,<sup>§</sup> Marc Bonneu,<sup>§</sup> Sven J. Saupe,<sup>§</sup> and Jean-Marie Schmitter<sup>‡</sup>

CNRS FRE 2247 Institut Européen de Chimie et Biologie, 16, Avenue Pey Berland 33607 Pessac, France, and  
Laboratoire de Génétique Moléculaire des Champignons, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires,  
UMR 5095 CNRS Université Victor Segalen Bordeaux 2-1, Rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France

Received March 17, 2003; Revised Manuscript Received May 28, 2003

**ABSTRACT:** The [Het-s] infectious element of the filamentous fungus *Podospora anserina* corresponds to the prion form of the HET-s protein. HET-s (289 amino acids in length) aggregates into amyloid fibers in vitro. Such fibers obtained in vitro are infectious, indicating that the [Het-s] prion can propagate as a self-perpetuating amyloid aggregate of the HET-s protein. Previous analyses have suggested that only a limited region of the HET-s protein is involved in amyloid formation and prion propagation. To document the conformational transition occurring upon amyloid aggregation of HET-s, we have developed a method involving hydrogen/deuterium exchange monitored by MALDI-MS. In a first step, a peptide mass fingerprint of the protein was obtained, leading to 87% coverage of the HET-s primary structure. Amyloid aggregates of HET-s were obtained, and H/D exchange was monitored on the soluble and on the amyloid form of HET-s. This study revealed that in the soluble form of HET-s, the C-terminal region (spanning from residues 240–289) displays a high solvent accessibility. In sharp contrast, solvent accessibility is drastically reduced in that region in the amyloid form. H/D exchange rates and levels in the N-terminal part of the protein (residues 1–220) are comparable in the soluble and the aggregated state. These results indicate that amyloid aggregation of HET-s involves a conformational transition of the C-terminal part of the protein from a mainly disordered to an aggregated state in which this region is highly protected from hydrogen exchange.

Prions are infectious proteins that are able to propagate an abnormal conformational state. In mammals, the prion form of the PrP protein is responsible for a class of fatal neurological diseases termed TSEs (transmissible spongiform encephalopathies) (1). Prion diseases in fact belong to a larger class of debilitating affections that are all characterized by the deposition of protein aggregates termed amyloids (2). Among these amyloid diseases are common age-related neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Amyloids are fibrillar protein aggregates characterized by a cross- $\beta$  structure and a high resistance to proteolysis (3). There is, however, a major difference between prion diseases and other amyloidoses since only prion diseases are transmissible. Prion proteins also exist in fungal microorganisms (yeast and the filamentous fungus *Podospora anserina*) (4). Propagation of these fungal prions is intimately connected with amyloid formation (5), indicating that yeast and fungal prion proteins can represent valuable model systems not only to analyze prion propagation but also the general process of amyloid formation.

The [Het-s] infectious element of the fungus *P. anserina* corresponds to the prion form of the HET-s protein (6). Strains expressing the HET-s protein exist under two states: a normal state termed [Het-s\*], and a prion infected state termed [Het-s]. A [Het-s\*] strain is converted to the prion infected state by simple contact with a [Het-s] strain (7). The [Het-s] prion is involved in a genetically controlled cell death reaction termed heterokaryon incompatibility. Namely, when the HET-s protein (in its prion state) is coexpressed with a variant of HET-s termed HET-S, a cell death reaction occurs. In other words, the [Het-s] prion is not detrimental per se but becomes lethal only when coexpressed with HET-S. HET-s and HET-S differ by 13 residues, and HET-S lacks the prion properties (8). In vivo, a HET-s-GFP fusion protein undergoes a transition from a soluble to an aggregated state upon transition to the prion state, thus suggesting that [Het-s] propagates as a self-perpetuating HET-s aggregate (9). Recombinant full-length HET-s forms amyloid aggregates in vitro (10). The transition from the soluble to the aggregated state is accompanied by an increase in  $\beta$ -sheet content. Biolistic introduction of aggregated recombinant HET-s protein into fungal cells induces emergence of the [Het-s] prion with a high frequency, thus demonstrating that prion infectivity can be created in vitro from recombinant protein in this system (11). The HET-s protein displays two domains, a N-terminal globular domain spanning residues 1–230, approximately, and a C-terminal region that is proposed to

<sup>†</sup> We gratefully acknowledge the financial support of CNRS and of the Région Aquitaine, including a grant for A.N. This work was supported in part by the GIS prion. S.D.R. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: a.nazabal@iecb-polytechnique.u-bordeaux.fr.

<sup>‡</sup> CNRS FRE 2247 Institut Européen de Chimie et Biologie.

<sup>§</sup> UMR 5095 CNRS Université Victor Segalen Bordeaux 2-1.

be poorly structured (12). This C-terminal domain of HET-s is essential for prion propagation in vivo and amyloid formation in vitro (12).

Mass spectrometric analysis of hydrogen/deuterium exchange (HXMS) is a powerful tool to probe protein structure and dynamics. The technique exploits the fact that hydrogen atoms involved in hydrogen bonds or buried in the core of the protein do not exchange readily with solvent deuterons. Rates of hydrogen exchange reflect solvent accessibility. Generally, high exchange rates are indicative of poor structure. Conversely, when the labile hydrogen atoms of a protein are involved in secondary structure or in noncovalent interactions, exchange rates are decreased (13, 14). For a detailed characterization of solvent accessibility in specific regions, the protein can be submitted to proteolysis prior to HXMS analysis. H/D exchange is quenched by lowering both pH and temperature (pH 2, 0 °C). Under these conditions, short cleavage times can be obtained with immobilized pepsin, thus limiting back exchange during this step (15).

Amyloid aggregates are resistant to conventional methods of higher-order structure determination. One has therefore to rely on alternate methods to gain insight into the process of amyloid formation. Hydrogen exchange has been used to analyze the structural properties of several amyloid peptides. It was shown that amide protons in amyloid aggregates are highly resistant to hydrogen exchange (16–18). In the present work, the HET-s prion protein has been studied by HXMS, using matrix assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS). This methodology has been used to probe solvent accessibility for the soluble and amyloid form of the protein. The time-course incorporation of deuterium characterized along the sequence revealed that exchange rates are drastically reduced in the C-terminal region of the protein upon transition from the soluble to the amyloid state.

## MATERIALS AND METHODS

**HET-s Expression and Purification.** The *het-s* open-reading frame was amplified by PCR from plasmid DNA using oligonucleotides s1 (5'-CT-CAAACTCATATGTCA-GAACCG-3') and s2 (5'-ATAAGCTTAGTGATGATGGT-GATGGTGATTATCCCAGAACCC-3'), cloned into the *NdeI* and *HindIII* sites of the pET21a vector (Novagen) and introduced into BL21(DE3) pLysS cells. Cells were grown to 0.5 OD in 2× YT medium, and expression was induced by addition of 1 mM isopropyl β-D-thiogalactoside. After 4 h, cells were harvested by centrifugation, frozen at -80 °C, and lysed in 150 mM NaCl and 100 mM Tris-HCl, pH 8. The lysate was centrifuged for 20 min at 20 000g. The pellet was washed in the same buffer and resuspended in denaturing buffer (8 M guanidinium HCl, 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 8). The lysate was incubated with Talon Resin (Clontech) for 1 h at 20 °C, and the resin was washed with 8 M urea, 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 8. The HET-s protein was eluted from the resin in the same buffer containing 200 mM imidazole. For renaturation, dithiothreitol was added to 20 mM final concentration, and the sample was applied to a HiTrap desalting column (Amersham Biosciences) equilibrated with 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8, and 1 mM dithiothreitol. HET-s amyloids were obtained as previously described (10). In brief, soluble HET-s

protein at 30 mM was inoculated with 3 mM preformed aggregates and incubated for 12 h at room temperature. Aggregates were recovered by centrifugation for 20 min at 10 000g.

**Back Exchange Controls.** A pepsin digest of HET-s was diluted 19:1 in D<sub>2</sub>O and incubated for 2 h at 25 °C to achieve complete exchange of backbone amide protons for deuterium. After incubation, the exchange was quenched at 0 °C by addition of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, Pierce). After quenching, the peptide mixture was loaded on a C18 ZipTip (Millipore). The peptide fraction eluted from the ZipTip (the eluent was a 10 mg/mL solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (MALDI matrix) in 7:3 acetonitrile/ethanol (Mallinckrodt Baker) containing 0.1% TFA, kept at 0 °C) was directly spotted on the MALDI target under nitrogen flow. After drying, the sample was analyzed by MALDI-MS in the reflex mode. The relative back exchange (%) was determined for each peptide by comparing the maximal theoretical number of exchanged amide hydrogen atoms and the corresponding experimental value.

**Hydrogen/Deuterium Exchange on Soluble HET-s Protein.** HET-s protein (1 mL, 30 μM MQ H<sub>2</sub>O) was centrifuged for 20 min at 10 000g. A total of 5 μL (30 μM) of the supernatant was diluted 1:20 in D<sub>2</sub>O and incubated at 25 °C for variable times (from 5 to 120 min). After incubation, a 5 μL aliquot (7.5 pmol) of the labeled solution was treated under strong agitation with immobilized pepsin (10 μL, 45 units) at pH 2 and 0 °C (exchange quenching conditions). Digestion was followed by a short centrifugation (10 000g, 30 s), and a 5 μL aliquot of the supernatant containing the HET-s digest was submitted to C18 ZipTip purification by means of a gradient in three steps. The three fractions were eluted with 1 μL of a solution of 10 mg/mL α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 2:8:1; 4:6:1; 7:3:1 acetonitrile/ethanol/0.1% aqueous TFA, respectively, and were directly spotted on the target under nitrogen flow. After drying, the target was transferred as quickly as possible (less than 1 min) to the mass spectrometer. The time from sample spotting to data collection is kept constant for each sample analysis.

**Hydrogen/Deuterium Exchange on HET-s Amyloid Fibrils.** Aggregated HET-s (1 mL, 30 μM, H<sub>2</sub>O MQ) was centrifuged for 20 min at 10 000g. The pellet was resuspended with 1 mL of H<sub>2</sub>O MQ. A 5 μL aliquot (30 μM) of the aggregated solution was diluted 1:20 in D<sub>2</sub>O and vortexed before incubation at 25 °C for variable times (between 5 and 120 min). After incubation, 5 μL of the labeled solution was treated under strong agitation in 4 M urea with immobilized pepsin (10 μL, 45 units) at pH 2 and 0 °C (exchange quenching conditions). After digestion, the sample was treated in the same way as the soluble form.

**Microscopy.** A fraction of the protein suspension (30 μM) used for exchange experiments on amyloid fibers was put onto a 400 mesh copper electron microscopy grid coated with a plastic film (Formvar). To avoid rapid desiccation, sedimentation was allowed during 10–30 min in a moist Petri dish. Grids were then rinsed with 15–20 drops of freshly prepared 2% uranyl acetate in water (passed over 0.22 μm Millipore filters), dried with filter paper, and observed with a Phillips Tecnai 12 Biowin electron microscope at 80 kV.

**Data Analysis.** The spectra were baseline corrected, and the number of deuterium atoms incorporated in a given

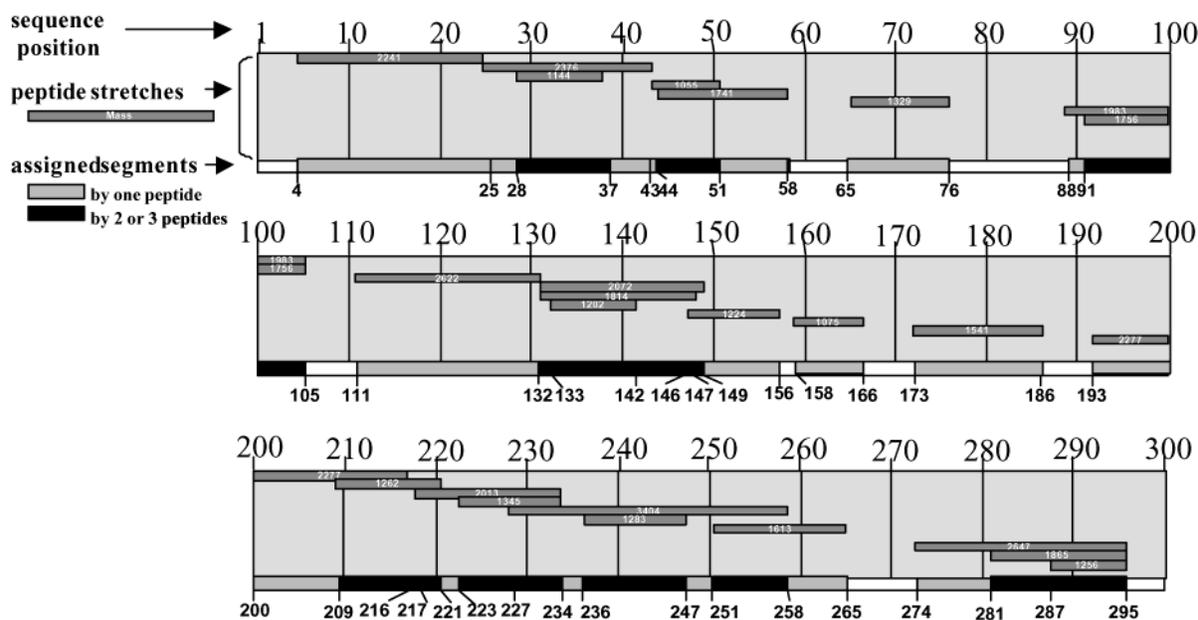


FIGURE 1: Sequence coverage of HET-s obtained by combined MALDI-MS, MALDI-PSD, and LC-MS/MS analysis of the peptide mixture obtained after pepsin digestion of nondeuterated HET-s.

Table 1: Peptide Mass Fingerprinting of HET-s Protein<sup>a</sup>

peptides analyzed by H/D exchange					
calculated mass <sup>b</sup>	observed mass <sup>b</sup>	position	sequence	ZipTip elution fraction <sup>c</sup>	method of identification <sup>d</sup>
1055.66	1055.65	43–51	RLDIAKAR	20% ACN	LC-MS/MS
1075.62	1075.64	158–166	KIVDQVARF	20% ACN	LC-MS/MS
1144.62	1144.63	28–37	VQLGRPFGRD	20% ACN	MALDI-PSD
1202.69	1202.69	133–142	VSRRQKQTSL	20% ACN	MALDI-PSD
1224.62	1224.60	146–156	TAWALYDGKSL	20% ACN	exact mass
1256.52	1256.48	287–295	WDNHHHHHH	20% ACN	exact mass
1262.60	1262.57	209–221	AAMSDAAAQKIDA	20% ACN	LC-MS/MS
1283.75	1283.71	236–247	RARVQLGNVVTA	20% ACN	LC-MS/MS
1329.65	1329.67	65–76	PRFHSSAPTDKS	20% ACN	exact mass
1345.71	1345.70	223–234	VGRNSAKDIRTE	20% ACN	LC-MS/MS
1403.58	1403.54	286–295	FWDNHHHHHH	20% ACN	exact mass
1541.85	1541.82	173–186	AFPIEAVCHKLAEI	20% ACN	exact mass
1613.78	1613.75	251–265	HGGIRISDQTTNSVE	20% ACN	exact mass
1741.98	1741.95	44–58	RLDIAKARLSRWGEA	20% ACN	LC-MS/MS
1756.92	1756.89	91–105	FESAQKTSKRYELVA	20% ACN	MALDI-PSD
1815.09	1814.06	132–147	LVSRRQKQTSLAKKTA	20% ACN	LC-MS/MS
1865.81	1865.77	281–295	YGGKGFWDNHHHHHH	20% ACN	LC-MS/MS
1983.09	1983.07	89–105	LLFESAQKTSKRYELVA	40% ACN	exact mass
2014.10	2014.08	217–234	QKIDAIVGRNSAKDIRTE	20% ACN	LC-MS/MS
2072.20	2072.16	132–149	LVSRRQKQTSLAKKTAWA	40% ACN	LC-MS/MS
2241.08	2241.10	4–25	PFGIVAGALNVAGLFNNVCVDCF	20% ACN	LC-MS/MS
2277.09	2277.12	193–216	DEASLTILKDAAGGIDAAMSDAAA	40% ACN	LC-MS/MS
2376.15	2376.17	25–43	FEYVQLGRPFGRDYERCQL	40% ACN	LC-MS/MS
2622.43	2622.38	111–132	VVFEDKDMKPIGRALHRRRLNDL	70% ACN	MALDI-PSD
2647.25	2647.31	274–295	RVLIGNEYGGKGFWDNHHHHHH	70% ACN	LC-MS/MS
3403.85	3403.79	227–258	SAKDIRTEERARVQLGNVVTAALHGGIRISD	70% ACN	exact mass

<sup>a</sup> Peptide mass fingerprinting of the HET-s protein. The HET-s protein was digested with pepsin, and generated peptides were assigned using MALDI-MS exact mass matching, MALDI-MS-PSD, or LC-MS/MS. To limit as much as possible selective desorption phenomena associated with MALDI-MS, a microchromatographic gradient separation in three steps was applied using C18 ZipTips. <sup>b</sup>  $[M + H]^+$  monoisotopic peaks. <sup>c</sup> Acetonitrile content in ZipTip eluent fraction. <sup>d</sup> Identification method. Exact mass indicates that only one peptide from HET-s matches the experimental mass within 20 ppm. Other peptides were identified using MALDI-PSD or Ion Trap LC-MS/MS.

peptide was determined from the centroid value of its isotopic peak cluster using the formula given in eq 1 (19)

$$D_{(t)} = \frac{m(t) - m(0)}{m(100) - m(0)}N \quad (1)$$

where  $m(t)$  is the observed centroid mass of the peptide at

time point  $t$ ,  $m(0)$  is the observed mass at time point 0 (for unlabeled peptides),  $m(100)$  is the observed mass for a fully exchanged peptide (see back exchange control procedure), and  $N$  is the total number of peptide amide protons in the peptide.

Because in-exchange occurring during pepsin digestion is very limited for each peptide (less than 5% of deuterium

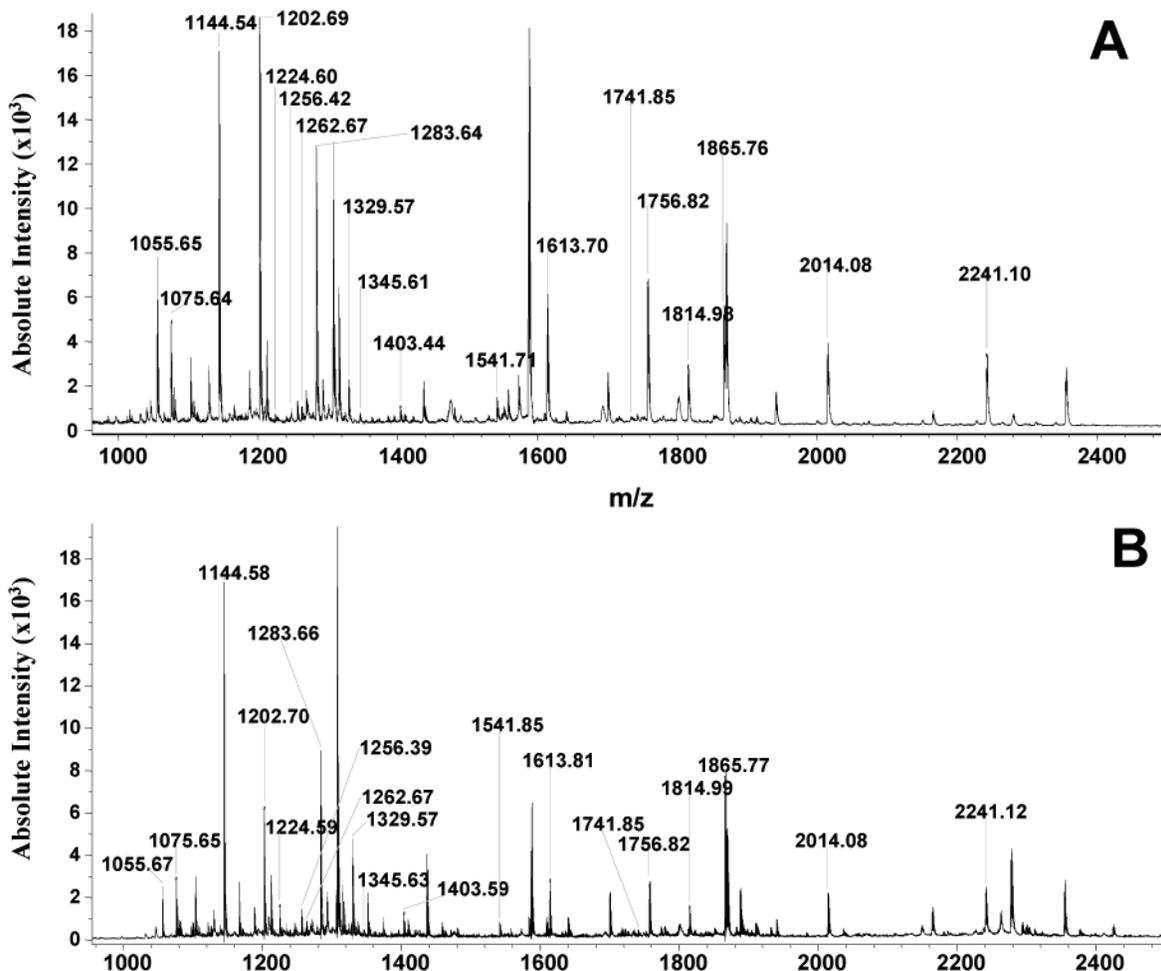


FIGURE 2: MALDI-MS analysis of the peptide mixture obtained after pepsin digestion of HET-s (nondeuterated) in soluble (A) and aggregated form (B). In both cases, the protein digest was submitted to C18 ZipTip simplification. The spectra presented correspond to the 20% acetonitrile elution step.

incorporation), we have chosen to consider  $m(0)$  as the mass of unlabeled peptide observed for each peptide. When a large deuterium oxide concentration and a constant pH and temperature are maintained during exchange experiments, each amide hydrogen follows first-order kinetics. The exchange rate quantification leads to a more quantitative interpretation of the data and can be obtained from the following expression:

$$(1/N)P = e^{(-k_{ex}t)} \quad (2)$$

where  $P$  is the number of protected hydrogen atoms in the peptide,  $k_{ex}$  is the sum of each amide hydrogen exchange rate constant of the peptide, and  $t$  is the incubation time in D<sub>2</sub>O.

From eq 2, it follows that populations of hydrogen atoms having different exchange rate constants can be distinguished in plots of  $\ln[P]$  versus  $t$ . Exchange rates were calculated from logarithmic plots of the data. To characterize the solvent accessibility to deuterium oxide for peptides that have different total numbers of amide protons, we have calculated the percentage of deuterium incorporation (%D<sub>(t)</sub>/N). For the determination of deuterium incorporation into the HET-s primary sequence, we have chosen to consider the percentage of deuterium incorporation of an overlapping region as the

average of the percentage of deuterium incorporation of all peptides involved in the overlapping region (Figure 1).

**Mass Spectrometry.** MALDI mass spectra were acquired on a Bruker Reflex III mass spectrometer equipped with a nitrogen laser with an emission wavelength of 337 nm. Spectra were obtained by accumulating an average of 100 shots in the positive ion mode, while the laser spot was manually scanned over a surface area of about 0.2 mm<sup>2</sup>. Deflection of the low mass ions was used to enhance the target protein signal. Mass spectra of full-length HET-s were obtained in the linear mode (20 kV accelerating voltage). Mass spectra of HET-s digests were acquired in the reflectron mode, using an external calibration with a mixture of eight peptides covering a 900–3500 Da mass range. In this case, measured masses were monoisotopic  $[M + H]^+$  ions. Mass values given in the text for exchange experiments correspond to  $m/z$  of the centroid of the envelope of the cluster for protonated molecular ions  $[M + H]^+$ . For post source decay analysis, the reflectron voltage was stepped down in 10–12 steps to record all fragment ions, including immonium ions. LC-MS/MS analysis of HET-s peptides was performed by means of an ion trap mass spectrometer operated in the electrospray mode (LCQ DecaXP, Thermo Finnigan) and interfaced to a Dionex-LC Packings chromatographic system (C18 column, 75  $\mu$ m ID, 150 mm long). After analysis, the

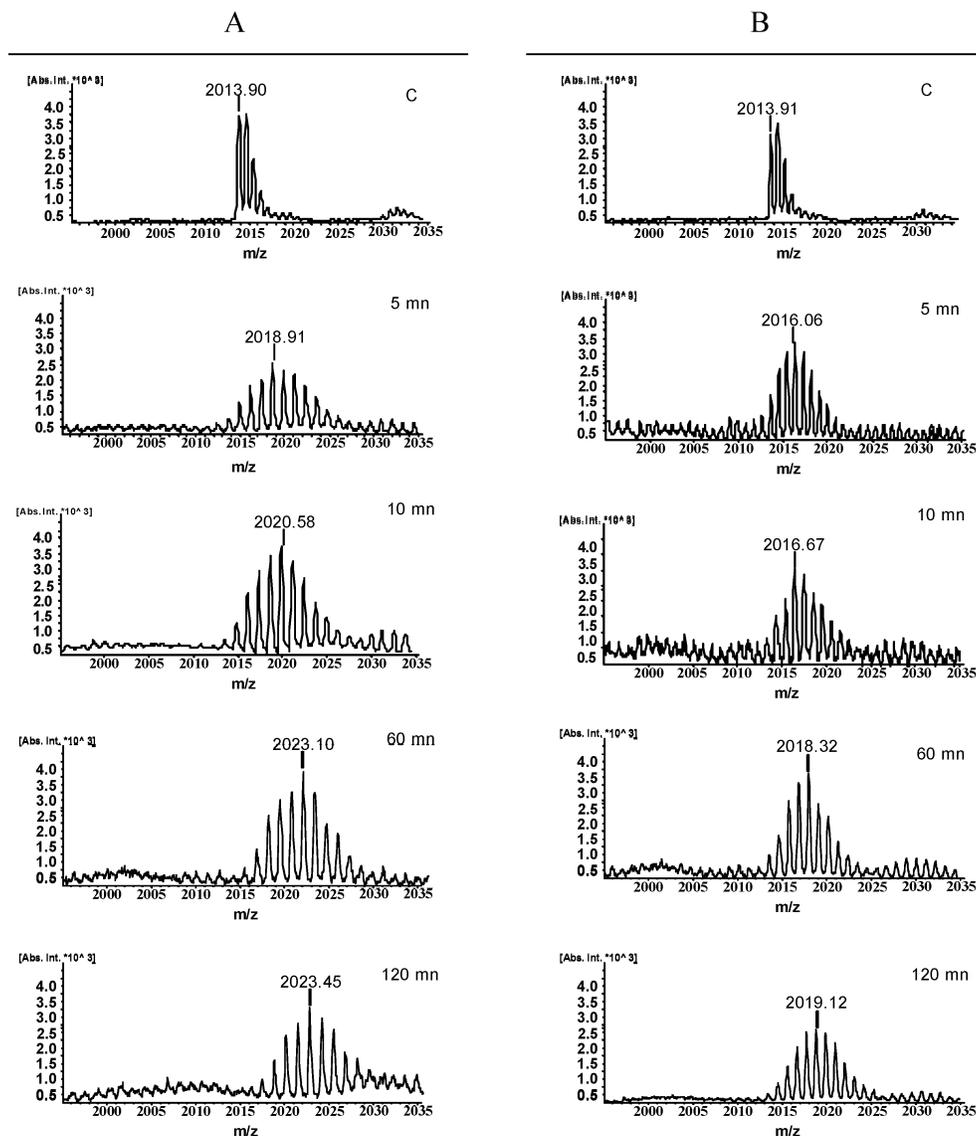


FIGURE 3: MALDI-TOF mass spectra of the peptide [217–234]. HET-s protein (30 pmol/ $\mu$ L) in soluble form (A) or in aggregate form (B) was incubated for various times (from 5 to 120 min). After exchange quenching and pepsin digestion, Ziptip simplification is processed, and the elution fraction is directly spotted on the target before MS analysis. Mass values given for the control experiment (C) corresponds to  $m/z$  of the monoisotopic peak for the peptide [217–234]. Mass values given for exchange experiments correspond to  $m/z$  of the centroid of the envelope mass peaks for  $[M + H]^+$  pseudo-molecular ions.

TurboSequest program was used to assign peptide sequences from their fragment ions.

## RESULTS

*Peptide Mapping of HET-s Protein.* HXMS experiments require the determination of the peptide map of the protein of interest to evaluate which part of the protein is most accessible to the solvent (20). The lack of specificity of pepsin complicates this task since several isobaric peptide ions may be found in the case of HET-s peptides.

In a first step, the conditions of proteolytic cleavage of the soluble form of HET-s by means of immobilized pepsin were adjusted to obtain a majority of peptides in the 1000–3500 Da mass range. In our conditions, this digest produced 62 peaks upon MALDI-MS analysis. To limit as much as possible selective desorption phenomena associated with MALDI-MS, a microchromatographic step gradient separation was applied (on C18 ZipTips, with three elution steps

at 20, 40, and 70% acetonitrile, respectively) (21). Altogether, 86 different peaks were observed in the three mass spectra of these fractions. Only eight peaks out of 86 could be assigned unambiguously (by exact mass, with a single peptide match within a 20 ppm range, which corresponds to our confidence limit for MALDI-MS measurements). For the other peaks, two or more primary sequences were possible candidates. Thus, in a second step, post source decay (PSD) experiments were performed and allowed the assignment of four other peptides on the basis of their fragmentation. However, these 12 peaks together represented only 45% of HET-s primary structure. Further mass assignments were then sought by means of LC-MS/MS analysis, using an ion trap mass spectrometer operated in the electrospray mode. In this way, we have determined 14 other peptide stretches, for an overall 87% sequence coverage (Table 1 and Figure 1).

The same pattern of digestion was obtained for both HET-s structural conditions (soluble and amyloid form), but the

Table 2: Exchange Rate Calculation of Protected Hydrogen Atoms<sup>a</sup>

exchange rates of protected hydrogen atoms							
HET-s soluble form				HET-s amyloid form			
mass (MH <sup>+</sup> ) (theor) <sup>b</sup>	position	intermediate exchange <sup>c</sup>		mass (MH <sup>+</sup> ) (theor) <sup>b</sup>	position	intermediate exchange <sup>c</sup>	
		$k_{\text{ex1}}^d$ (mn <sup>-1</sup> )	$k_{\text{ex2}}$ (mn <sup>-1</sup> )			$k_{\text{ex1}}^d$ (mn <sup>-1</sup> )	$k_{\text{ex2}}$ (mn <sup>-1</sup> )
1865.86	281–295	$3.8 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-3}$	2376.15	25–43	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$
1403.58	286–295	$3.4 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-3}$	1224.62	146–166	$1.7 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-3}$
1256.52	287–295	$3.1 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{-3}$	1815.09	132–147	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$
2647.25	274–295	$3.0 \times 10^{-2}$	$4.9 \times 10^{-3}$	1055.68	43–51	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$
3403.85	227–258	$2.8 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-3}$	1541.85	173–186	$9.3 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$
1283.75	236–247	$2.7 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-3}$	1075.62	158–166	$7.8 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$
1613.78	251–265	$2.7 \times 10^{-2}$	$3.0 \times 10^{-3}$	2241.08	4–25	$7.6 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$
1345.71	223–234	$2.2 \times 10^{-2}$	$2.5 \times 10^{-3}$	1983.09	88–105	$5.8 \times 10^{-3}$	$9.4 \times 10^{-4}$
2014.10	217–234	$2.2 \times 10^{-2}$	$2.1 \times 10^{-3}$	1756.92	91–105	$5.2 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$
1224.62	146–166	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-3}$	1144.62	28–37	$3.9 \times 10^{-3}$	$8.4 \times 10^{-4}$
2376.15	25–43	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-3}$	1202.69	133–142	$3.9 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^{-4}$
1815.09	132–147	$1.1 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$	2072.20	132–149	$3.7 \times 10^{-3}$	$6.9 \times 10^{-4}$
1055.68	43–51	$9.9 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	1741.98	44–58	$3.6 \times 10^{-3}$	$7.7 \times 10^{-4}$
1541.85	173–186	$9.9 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	2622.43	111–132	$3.5 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-4}$
2241.08	4–25	$7.8 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$	1262.56	209–221	$3.4 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1075.62	158–166	$7.5 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	2277.09	193–216	$2.9 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
2277.09	193–216	$7.5 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3}$	2014.10	217–234	$2.8 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1329.65	65–76	$6.1 \times 10^{-3}$	$9.7 \times 10^{-4}$	1613.78	251–265	$2.2 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1983.09	88–105	$5.8 \times 10^{-3}$	$9.7 \times 10^{-4}$	1256.52	287–295	$2.2 \times 10^{-3}$	$5.7 \times 10^{-4}$
1756.92	91–105	$5.5 \times 10^{-3}$	$9.2 \times 10^{-4}$	1345.71	223–234	$2.2 \times 10^{-3}$	$6.9 \times 10^{-4}$
1202.69	133–142	$3.6 \times 10^{-3}$	$9.1 \times 10^{-4}$	2647.25	274–295	$2.0 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$
1144.62	28–37	$3.6 \times 10^{-3}$	$8.4 \times 10^{-4}$	1403.58	286–295	$1.9 \times 10^{-3}$	$6.3 \times 10^{-4}$
2622.43	111–132	$3.6 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-4}$	3403.85	227–258	$1.9 \times 10^{-3}$	$6.3 \times 10^{-4}$
2072.20	132–149	$3.6 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-4}$	1283.75	236–247	$1.9 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-4}$
1741.98	44–58	$2.8 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$	1865.86	281–295	$1.9 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Exchange rate calculation of protected hydrogen atoms. For the 26 peptides, covering 87% of the HET-s primary sequence, the exchange rates were determined using a kinetic study from 5 to 120 min. This kinetic study indicates the presence of two populations of protected hydrogens having different exchange rates ( $k_{\text{ex1}}$  and  $k_{\text{ex2}}$ ) for each peptide. The calculation was realized after the hydrogen exchange on soluble and amyloid forms of HET-s protein. In each row, the peptides were classified from the fastest to the slowest exchange rate. <sup>b</sup> Calculated masses (monoisotopic, MH<sup>+</sup>) for identified peptides. <sup>c</sup> Intermediate exchange is defined as between 2 and 1000 min. <sup>d</sup> Rate constant (in min<sup>-1</sup>) of HET-s peptides. Two populations of hydrogens having different constant rates can be distinguished ( $k_{\text{ex1}}$  and  $k_{\text{ex2}}$ ).

addition of 4 M urea, well-tolerated by the immobilized protease, was required to obtain reproducible results for the amyloid form (Figure 2).

**Back Exchange Control.** To conduct HXMS experiments on HET-s, we have evaluated the impact of sample preparation on back exchange. The maximal exchange level was determined for peptides of a HET-s pepsin digest after a 120 min incubation in D<sub>2</sub>O (26 peptides were considered). The back exchange varied between 10 and 16%. Because some HET-s peptides are thought to aggregate after a few hours, the maximal deuterium incorporation cannot be determined for very long incubation times.

**Hydrogen/Deuterium Exchange on the Soluble Form of HET-s.** After variable incubation times in deuterium oxide (from 5 to 120 min) and pepsin proteolysis, all assigned sequence stretches were characterized by MALDI-MS. The average mass used for calculation was determined by integrating the cluster of isotopic peaks (Figure 3). For each peptide, deuterium incorporation was plotted as a function of time, and exchange rates were determined from plots of ln(*P*) versus *t* (eq 2). Two populations of exchangeable hydrogens having different rate constants ( $k_{\text{ex1}}$  and  $k_{\text{ex2}}$ ) can be distinguished within the envelope time from 5 to 120 min. The different exchange rates were classified from the highest to the lowest (Table 2, HET-s soluble form). The highest exchange rates are found in the C-terminal region from 274 to 295. In this region, four peptides ([281–295], [286–295], [287–295], and [274–295]) have exchange rates between

$3 \times 10^{-2}$  and  $3.8 \times 10^{-2}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex1}}$  and between  $4.9 \times 10^{-3}$  and  $5.7 \times 10^{-3}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex2}}$ . Another group having exchange rates between  $2.2 \times 10^{-2}$  and  $2.8 \times 10^{-2}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex1}}$  and between  $2.1 \times 10^{-3}$  and  $3.6 \times 10^{-3}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex2}}$  is composed of five peptides also located in the C-terminal region ([217–234], [223–234], [251–265], [236–247], and [227–258]). A third group of three peptides ([146–166], [25–43], and [173–186]) has exchange rates between  $1.1 \times 10^{-2}$  and  $1.8 \times 10^{-2}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex1}}$  and between  $1.3 \times 10^{-3}$  and  $1.8 \times 10^{-3}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex2}}$ . For the other fragments, exchange rates range from  $1.8 \times 10^{-2}$  to  $2.8 \times 10^{-3}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex1}}$  and from  $1.8 \times 10^{-3}$  to  $7 \times 10^{-4}$  min<sup>-1</sup> for  $k_{\text{ex2}}$ . For these peptides, there is no specific region of HET-s protein corresponding to a cluster of exchange rate values.

The percentage of deuterium incorporation was calculated for each fragment and each incubation time. For the overlapping segments, the deuterium incorporation value was calculated as an average of deuterium incorporation of each peptide involved in the overlap. Three regions can be distinguished (Figure 4). The maximal deuterium incorporation is located in the [221–293] C-terminal part of HET-s and reaches 60–74% after 120 min incubation time. For the same incubation time, a [193–221] intermediate region displays a deuterium incorporation ranging from 35 to 60%. Peptides belonging to the [1–193] region have a lower deuteration level (from 27 to 35%). These results clearly designate the C-terminal domain spanning residues 221–

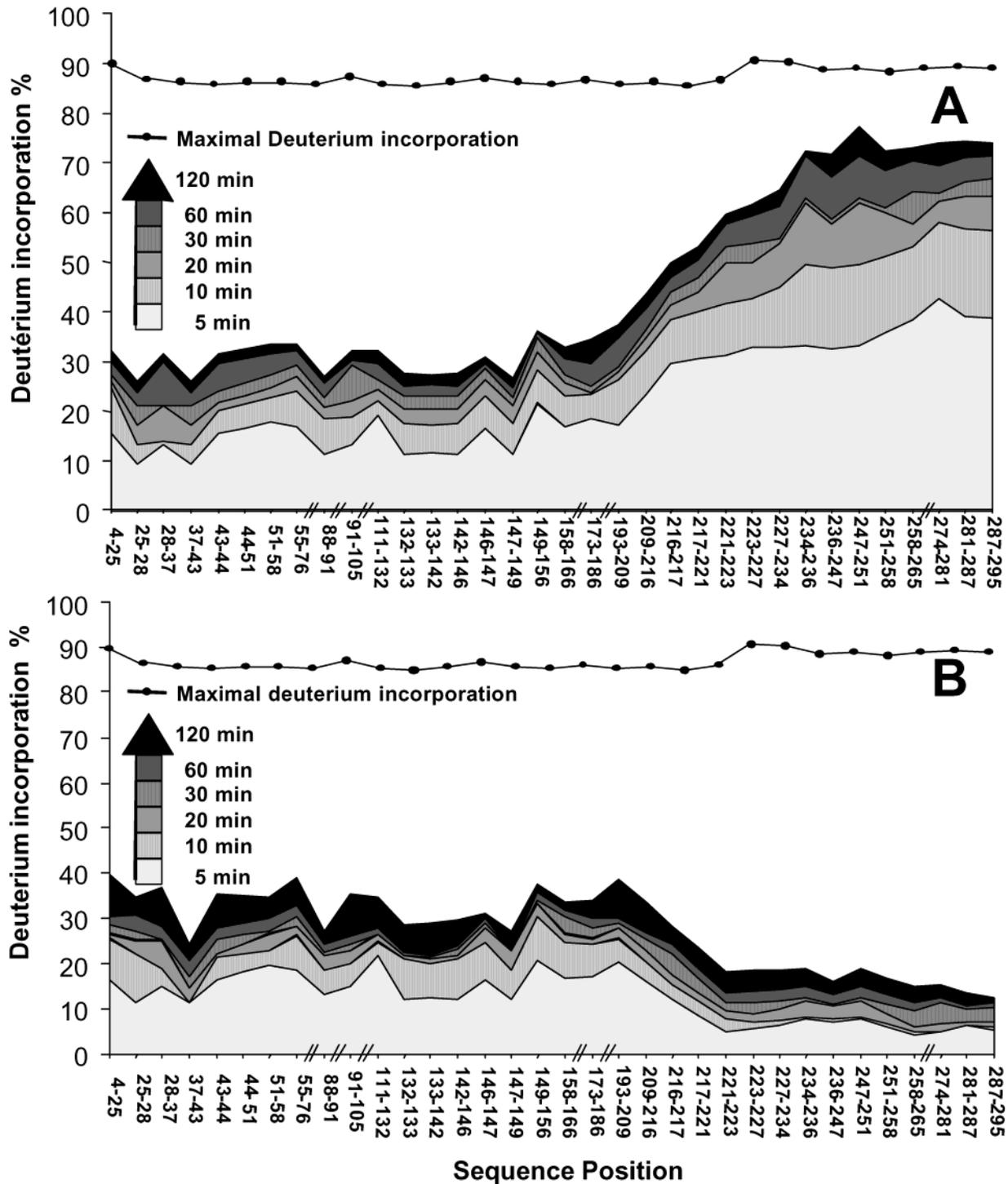


FIGURE 4: HXMS analysis along the sequence of HET-s. (A) A soluble form of HET-s protein was incubated for various time (from 5 to 120 min) in D<sub>2</sub>O. After pepsin digestion and MALDI-MS analysis, the exchange level was calculated for each HET-s fragment (as D/H<sub>i</sub> where D is the measured amount of deuterium incorporated, and H<sub>i</sub> is the total of exchangeable hydrogens for the fragment). The exchange level of stretches belonging to different peptides was calculated as an average of individual values. (B) An aggregated form of HET-s was analyzed as in panel A. For back exchange control, a pepsin digest of HET-s was incubated for 120 min in D<sub>2</sub>O, and after MALDI-MS analysis, the maximal deuterium incorporation was determined for each of these peptides.

295 as the most accessible region of HET-s protein when under its soluble form.

*Hydrogen/Deuterium Exchange on Amyloid Form HET-s Protein.* Aggregates of HET-s were obtained as previously described (10), and amyloid formation was monitored by electron microscopy (Figure 5). When the amyloid form of HET-s protein was incubated in deuterium oxide and subsequently analyzed by MALDI-MS, the lowest exchange

levels were evidenced for peptides clustered in the C-terminal region. This cluster is composed of 11 peptides ([281–295], [236–247], [227–258], [286–295], [274–295], [223–234], [287–295], [251–265], [217–234], [193–216], and [209–221]) having exchange rates between  $3.4 \times 10^{-3}$  and  $1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  for  $k_{\text{ex}1}$  and between  $7 \times 10^{-4}$  and  $5.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  for  $k_{\text{ex}2}$  (Table 2, HET-s amyloid form). The calculation of deuterium incorporation for each peptide of HET-s

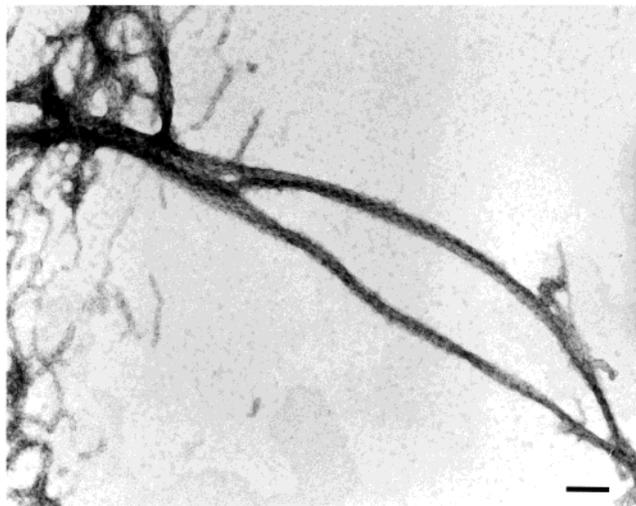


FIGURE 5: Electron microscopy of an aggregated form of HET-s showing amyloid fibrils.

protein revealed that the most protected region is located in the C-terminal region between residues 221 and 295. In this region, the deuterium incorporation reached only 17–20% after 120 min incubation time (Figure 4B). Exchange levels in the N-terminal region of the protein are similar for the soluble and the amyloid form of the protein.

## DISCUSSION

Hydrogen exchange can be used to gain insight into the structure and dynamics of proteins. When coupled with mass spectrometry, this method is particularly relevant for the study of amyloid proteins that are otherwise difficult to analyze using other structural biology techniques (16, 22, 23). Owing to its high speed of analysis, excellent sensitivity, and accuracy, hydrogen exchange coupled to MALDI-MS turns out to be a valuable methodology in structural biology (24). The analysis of peptide maps by MALDI-MS after pepsin digestion does not require combined liquid chromatography–mass spectrometry (15, 25). However, in the case of HET-s (289 residues), the mass fingerprint generated by pepsin cleavage was highly complex and required the combined information of MALDI-MS experiments and of electrospray MS/MS analysis to approach 90% sequence coverage. MALDI-MS alone was then used for the rest of the experiments.

Our study indicates that deuterium incorporation is drastically decreased in the C-terminal region of the protein in the amyloid state, while H/D exchange is mostly unchanged in the rest of the protein. Deuterium incorporation drops sharply around residue 217. The [193–216] peptide shows similar exchange levels in both the soluble and the amyloid form, while exchange in the [217–234] peptide is dramatically decreased (Figure 6). Several studies have indicated that the core regions of amyloid aggregates show very limited hydrogen exchange (16–18). We thus interpret the protection measured in the C-terminal region of HET-s as a consequence of H-bonding in the  $\beta$ -sheet structure of the HET-s amyloid aggregate. This observation indicates that aggregation into a  $\beta$ -sheet rich amyloid structure involves only a limited part of the HET-s protein, namely, the C-terminal region. Delimitation of the amyloid core region of HET-s

by our HX experiment is perfectly consistent with the definition obtained by limited proteolysis. The proteinase K resistant core of the HET-s amyloid was found to span residues 218–289 (12). This delimitation of the HET-s amyloid core by HXMS constitutes an important confirmation of the results obtained by limited proteolysis. Moreover, HXMS experiments suggest that the level of protection against hydrogen exchange is relatively homogeneous within this C-terminal core region.

The N-terminal region of HET-s forms a globular domain spanning residues 1 to about 230 (12). Hydrogen exchange rates measured for most of the peptides corresponding to that region are not drastically modified upon amyloid formation. The Ure2p yeast prion protein also displays a two domain structure with a poorly structured N-terminal prion forming domain and a globular C-terminal domain. It was shown that the globular domain of Ure2p retains its native fold in the fibrils (26). Our observation that solvent accessibility in the N-terminal domain of HET-s is almost unmodified upon amyloid formation may suggest that the structure of the globular domain of HET-s is not affected upon aggregation of the C-terminal region. Alternatively, it is conceivable that the structure of the globular domain of HET-s is affected upon aggregation but that the protein retains a substantial amount of secondary structure so that H/D exchange levels are not drastically modified.

The present analysis indicates that in the soluble form of HET-s, a C-terminal region spanning approximately residues 240–289 shows the highest deuterium incorporation and thus displays the highest solvent accessibility. This high solvent accessibility may indicate that this region is highly dynamic and lacks a defined secondary structure. Structural flexibility of that region of HET-s has also been documented using other approaches, including limited proteolysis, NMR, and circular dichroism (12). NMR and limited proteolysis experiments gave slightly different results. Limited proteolysis experiments pointed toward an unstructured domain of HET-s starting at residue 240, while NMR suggested that the flexibly disordered region is somewhat longer (12). Our HXMS data show that maximal solvent accessibility is reached past residue 240. However, solvent accessibility starts to gradually increase around residue 220. Data from NMR, limited proteolysis, and HXMS studies all indicate that the region past residue 240 is highly flexible. Now, both the limited proteolysis and the HXMS data suggest that the region from residues 220–240 displays an intermediate level of structuration. In other words, it appears that the unstructured domain of HET-s starts at residue 240, while the amyloid core starts at residue 218. Our data thus suggest that the flexible region of HET-s does not overlap completely with the amyloid core.

In summary, this study provides some direct insights into the structural rearrangements occurring upon amyloid aggregation of the HET-s prion protein. We show that modifications in solvent accessibility concern mainly the C-terminal region of the protein. HET-s amyloid formation specifically involves the C-terminal region of the protein, which undergoes a transition from an unstructured to an aggregated state that is highly resistant to hydrogen exchange. Conformational flexibility is thought to be a prerequisite for fibril formation (3, 27). For several amyloid forming proteins, it was shown that fibril formation is linked to destabilization

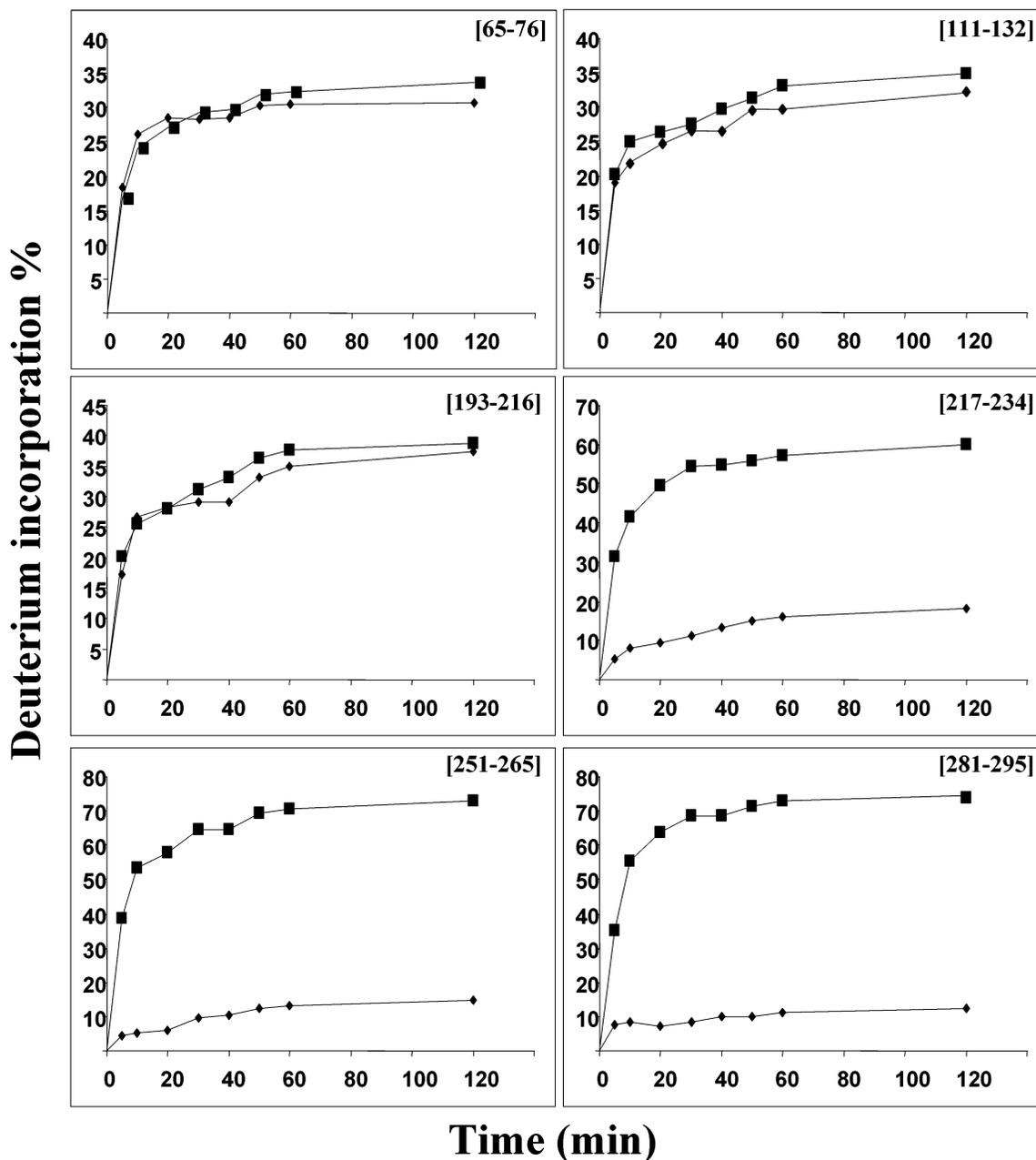


FIGURE 6: Plot of the H/D exchange level (% of D incorporation) as a function of time for HET-s peptides from the soluble (■) and aggregated forms (●). In both cases, HET-s was incubated in D<sub>2</sub>O at 25 °C and digested with immobilized pepsin (pH 2, 0 °C, 10 min), and the peptide mixture was separated on a ZipTip and analyzed by MALDI-MS.

of the native state of the protein (28–32). In particular, it was shown using HXMS that several amyloidogenic proteins show the occurrence of increased conformational dynamics under fibril forming conditions (22). Other amyloidogenic proteins such as  $\alpha$ -synuclein involved in Parkinson's disease are unstructured in their native state (so-called natively unfolded proteins) (33). In the case of HET-s, the C-terminal region appears unstructured in the native form of the protein; thus, fibril formation occurs spontaneously in near physiological conditions and does not require destabilization of the native state of the protein. Like HET-s, the two yeast prion proteins, Sup35 and Ure2p, also display a flexible domain involved in amyloid aggregation attached to a globular domain. This similarity in the overall organization of the fungal prion proteins could suggest that this domain

organization is a relevant feature of infectious amyloid proteins.

#### ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge the help of Prof. Satako Akashi for her contribution to scientific discussions. The authors wish to thank Jacques Shaeffer and Bénédicte Couлары-Salin for the electron microscopy of HET-s fibrils.

#### REFERENCES

1. Prusiner, S. B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13363–83.
2. Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr., and Kelly, J. W. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9989–90.
3. Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 60–8.

4. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Maddelein, M. L., Taylor, K. L., and Moriyama, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 555–8.
5. Wickner, R. B., Taylor, K. L., Edskes, H. K., Maddelein, M. L., Moriyama, H., and Roberts, B. T. (2000) *J. Struct. Biol.* **130**, 310–22.
6. Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9773–8.
7. Beisson-Schecroun, J. (1962) *Ann. Genet.* **4**, 3–50.
8. Turcq, B., Deleu, C., Denayrolles, M., and Begueret, J. (1991) *Mol. Gen. Genet.* **228**, 265–9.
9. Coustou-Linares, V., Maddelein, M. L., Begueret, J., and Saupe, S. J. (2001) *Mol. Microbiol.* **42**, 1325–35.
10. Dos Reis, S., Coulyary-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Begueret, J., and Saupe, S. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5703–6.
11. Maddelein, M. L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Coulyary-Salin, B., and Saupe, S. J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7402–7.
12. Balguerie, A., Dos Reis, S., Ritter, C., Chaignepain, S., Coulyary-salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lascu, I., Schmitter, J. M., Riek, R., and Saupe, S. J. (2003) *EMBO J.* **22**, 2071–2081.
13. Hvidt, A. (1966) *Adv. Protein Chem.* **21**, 287–385.
14. Woodward, C. K. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 112–6.
15. Mandell, J. G., Falick, A. M., and Komives, E. A. (1998) *Anal. Chem.* **70**, 3987–95.
16. Kheterpal, I., Zhou, S., Cook, K., and Wetzel, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(25), 13597–601.
17. Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 332–6.
18. Kraus, M., Bienert, M., and Eberhard, K. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 222–8.
19. Liu, Y., and Smith, D. L. (1994) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 19–28.
20. Juhasz, P., and Martin, S. A. (1997) *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **169**, 217–30.
21. Belghazi, M., Bathany, K., Hountondji, C., Grandier-Vazeille, X., Manon, S., and Schmitter, J. M. (2001) *Proteomics* **1**, 946–54.
22. Nettleton, E. J., and Robinson, C. V. (1999) *Methods. Enzymol.* **309**, 633–46.
23. Kraus, M., Bienert, M., and Krause, E. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 222–8.
24. Nazabal, A., Vaillier, J., Chaignepain, S., Laguerre, M., Velours, J., and Schmitter, J. M. (2003) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 471–481.
25. Figueroa, I. D., and Russell, D. H. (1999) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 719–31.
26. Bousset, L., Thomson, N. H., Radford, S. E., and Melki, R. (2002) *EMBO J.* **21**, 2903–11.
27. Dobson, C. M. (1999) *Trends. Biochem. Sci.* **24**, 329–32.
28. Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C., and Pepys, M. B. (1997) *Nature* **385**, 787–93.
29. Chiti, F., Taddei, N., Stefani, M., Dobson, C. M., and Ramponi, G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 879–86.
30. Dobson, C. M. (2001) *Biochem. Soc. Symp.*, 1–26.
31. Fandrich, M., Fletcher, M. A., and Dobson, C. M. (2001) *Nature* **410**, 165–166.
32. Chiti, F., Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** Suppl. **4**, 16419–26.
33. Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., and Lansbury, P. T., Jr. (1996) *Biochemistry* **35**, 13709–15.

BI0344275

## L'échange isotopique Hydrogène/Deutérium et la spectrométrie de masse pour l'étude d'interactions protéine-protéine

Ce travail de thèse a été consacré au développement et à l'application d'une méthodologie qui permet d'obtenir par spectrométrie de masse des informations sur la façon dont les sous unités d'un complexe protéique sont agencées ainsi que sur la conformation adoptée par les sous-unités. La méthodologie utilisée est basée sur le remplacement des hydrogènes amides mobiles des liaisons peptidiques lors de la mise en présence séquentielle des protéines dans de l'eau lourde et de l'eau légère. Le temps qu'il faut pour réaliser ces échanges varie avec l'accessibilité des hydrogènes et leur engagement plus ou moins poussé dans les liaisons hydrogènes. Pour mesurer ces temps nécessaires à l'échange en divers points de la protéine, il faut soumettre celle-ci à une digestion enzymatique qui génère des peptides dont la masse moléculaire est mesurée dans des expériences de couplage chromatographie-spectrométrie de masse (LC-MS). On différencie ainsi les zones de la protéine en terme d'accessibilité différentes et de structure 3D différentes. Le manuscrit présente ensuite un travail de mise au point de la méthodologie sur la sous-unité  $\epsilon$  du complexe F1 ATPase de *Saccharomyces Cerevisiae*. Les interactions de la sous-unité  $\epsilon$  ont été étudiées. Cette partie a permis de mettre au point une méthode de micro-chromatographie ZIPTIP qui nécessite des quantités de matériel très réduites par rapport aux méthodes décrites dans la littérature. Cette partie a donc permis d'évaluer la pertinence de l'approche pour l'étude des interactions au sein d'un complexe hétéro-oligomérique par échange H/D. La méthodologie a ensuite été utilisée pour l'étude structurale de la protéine prion HET-s de *Podospora Anserina*. L'étude par LC-MS à nano-débit a permis de déterminer les taux d'échange pour 87% de la séquence peptidique. L'interprétation des résultats montre une forte diminution de l'incorporation de deutérium dans la partie C-terminale de la protéine lorsque celle-ci est agrégée en fibre amyloïde ce qui suggère que la partie 240-295 de la protéine HET-s est fortement impliquée dans les interactions au sein de la fibre amyloïde.

### Hydrogen/Deuterium exchange and mass spectrometry for the structural study of protein interactions

We have evaluated the ability of hydrogen/deuterium exchange of amide protons followed by mass spectrometry (HXMS) to yield topological information about supramolecular protein complexes, this approach has been tested with the 370KDa hetero-oligomeric complex of yeast F1-ATPase. The study was focused on the  $\epsilon$  subunit (6612 da) of the complex. Deuterium back exchange due to the chromatographic isolation step of this subunit was strongly reduced by means of fast micro-chromatography, and MALDI-MS was used to analyse either the intact subunit or peptide mixtures resulting from its proteolytic cleavage. A deuterium labeling kinetic study was conducted with  $\epsilon$  subunit being a part of the F1 native complex. The effect of a secondary structure was also investigated by means of HXMS on the isolated  $\epsilon$  subunit. Finally, to determine which regions of the  $\epsilon$  subunit are accessible to solvent in F1-ATPase during exchange, the complex was submitted to hydrogen/deuterium exchange, the  $\epsilon$  subunit was purified by micro-chromatography, digested by pepsin, and resulting peptide fragments were analyzed by MALDI MS.

The second part of the study was dedicated to the protein prion HET-s of *Podospora Anserina*. HET-s aggregates into amyloid fibers in vitro. Such fibers obtained in vitro are infectious, indicating that [HET-s] prion can propagate as a self-perpetuating amyloid aggregate of the HET-s protein. Previous analyses have suggested that only a limited region of the HET-s protein is involved in amyloid formation and prion propagation. In a first step, a peptide mass fingerprint of the protein was obtained, leading to 87% coverage of the HET-s primary structure. Amyloid aggregates of HET-s were obtained, and H/D exchange was monitored on the soluble and on the amyloid form of HET-s. This study revealed that in the soluble form of HET-s, the C-terminal region (spanning from residues 240-289) displays a high solvent accessibility. In sharp contrast, solvent accessibility is drastically reduced in that region in the amyloid form. H/D exchange rates and levels in the N-terminal part of the protein (residues 1-220) are comparable in the soluble and the aggregated state. These results indicate that amyloid aggregation of HET-s involves a conformational transition of the C-terminal part of the protein from a mainly disordered to an aggregated state in which this region is highly protected from hydrogen exchange.