

# Structures de systèmes moléculaires d'intérêt pharmaceutique isolés par spectroscopie IRMPD et spectrométrie de mobilité ionique



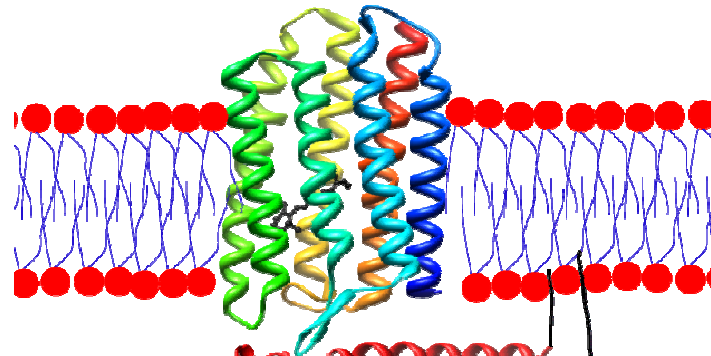
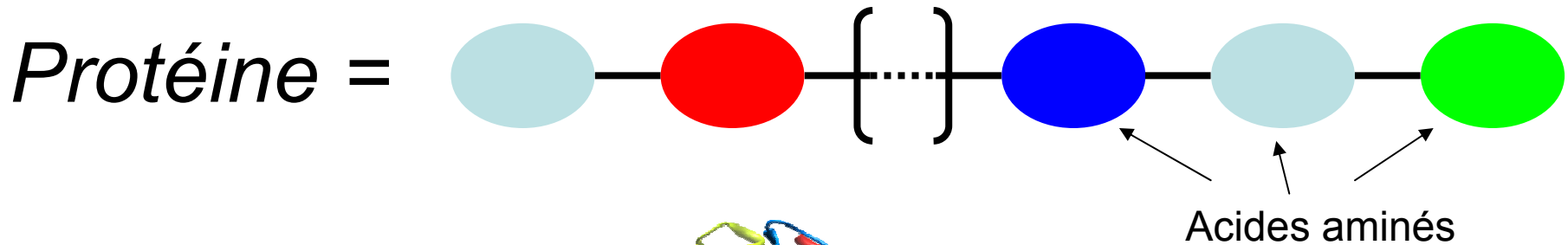
*Jean-Christophe POULLY*

*Équipe AMIBES*

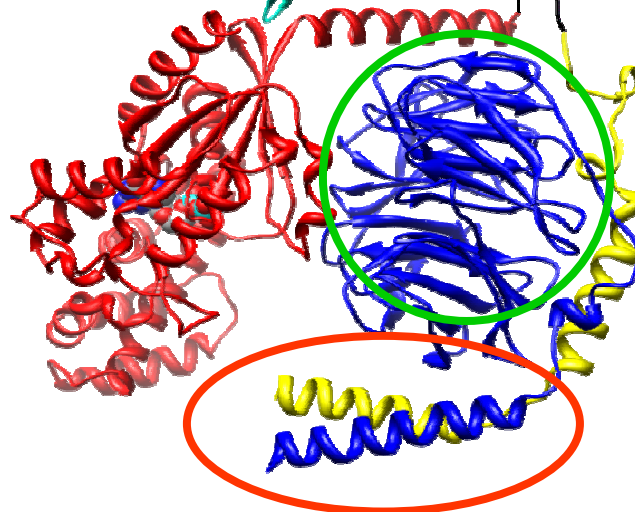
*Directeur de thèse : Charles Desfrançois*



# Structure des protéines



Rhodopsine

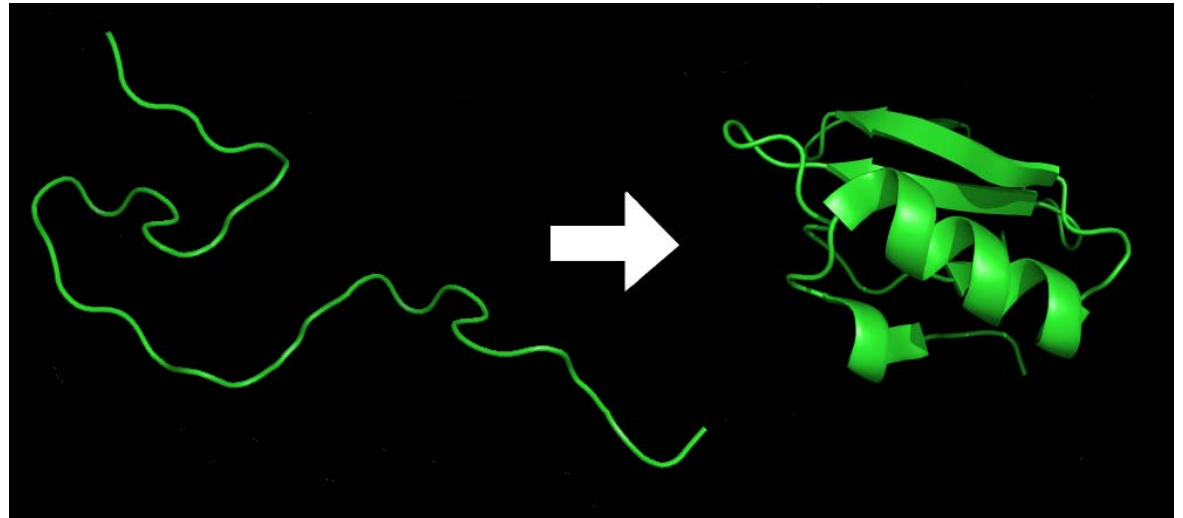


**Feuillets  $\beta$**

**Hélices**

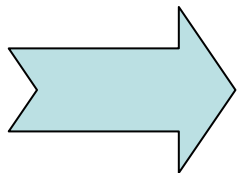
# Relation structure/activité biologique

Fabrication par les ribosomes sous forme de chaîne linéaire, puis repliement



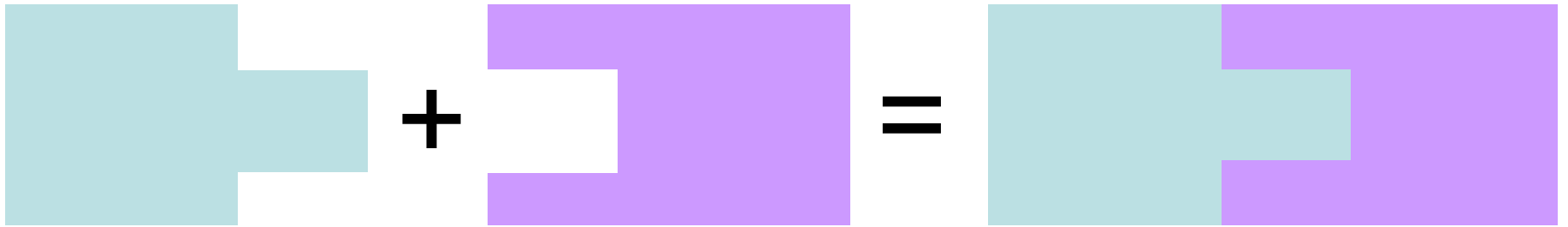
*Mauvais repliement: cause de certaines maladies neurodégénératives*

Ex: amyloïde  $\beta$  impliquée dans Alzheimer, Parkinson...



Traitement possible: médicament empêchant le mauvais repliement

# Reconnaissance moléculaire spécifique

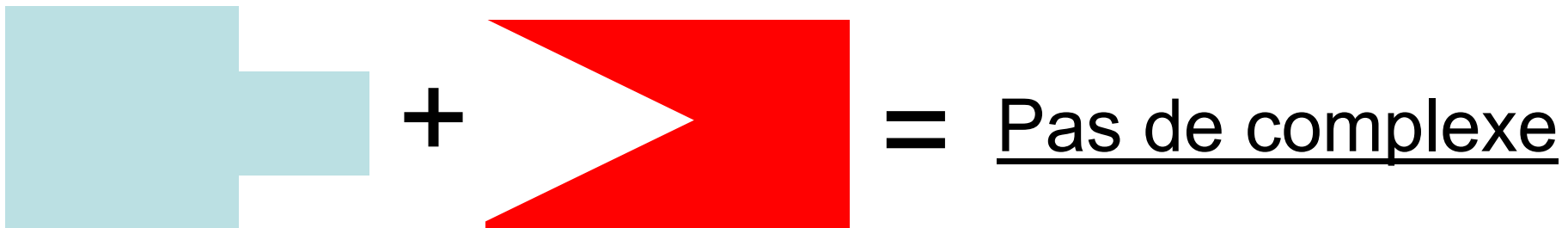


Ligand (par exemple  
médicament)

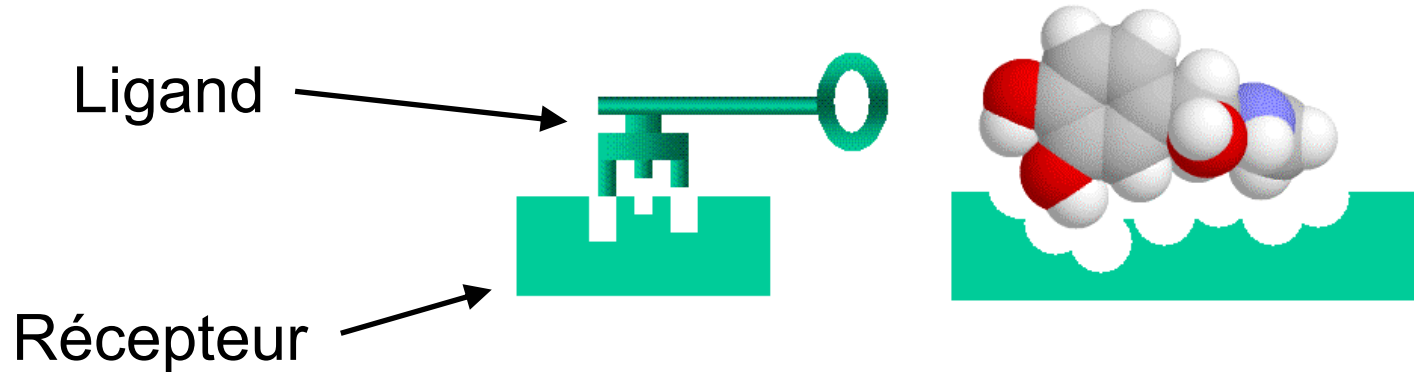
Récepteur biologique

**Complexe non-covalent  
ACTIF**

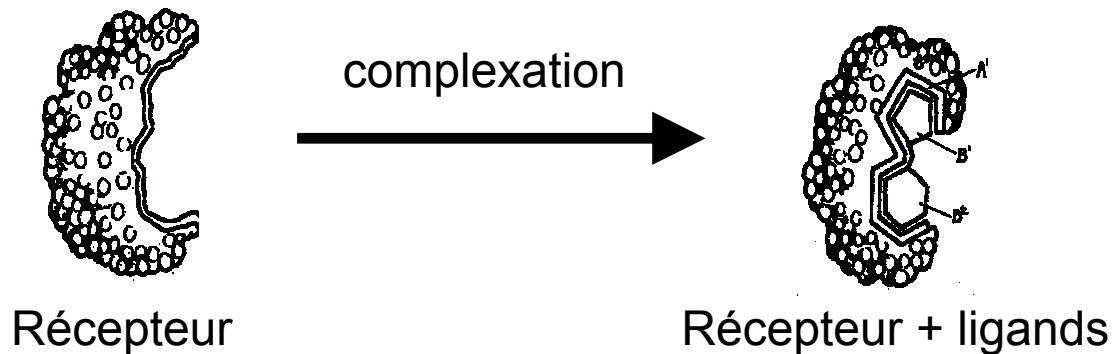
**Spécifique** = un ligand donné est reconnu par un seul récepteur



# But de nos études



**Relation structure/reconnaissance spécifique mieux décrite par *l'ajustement induit***



Description des changements de structure **en phase gazeuse**

# Pourquoi en phase gazeuse?

- Propriétés intrinsèques, sans effets de solvant
- Comparaison directe avec des calculs de chimie quantique
- Ions : stœchiométrie contrôlée

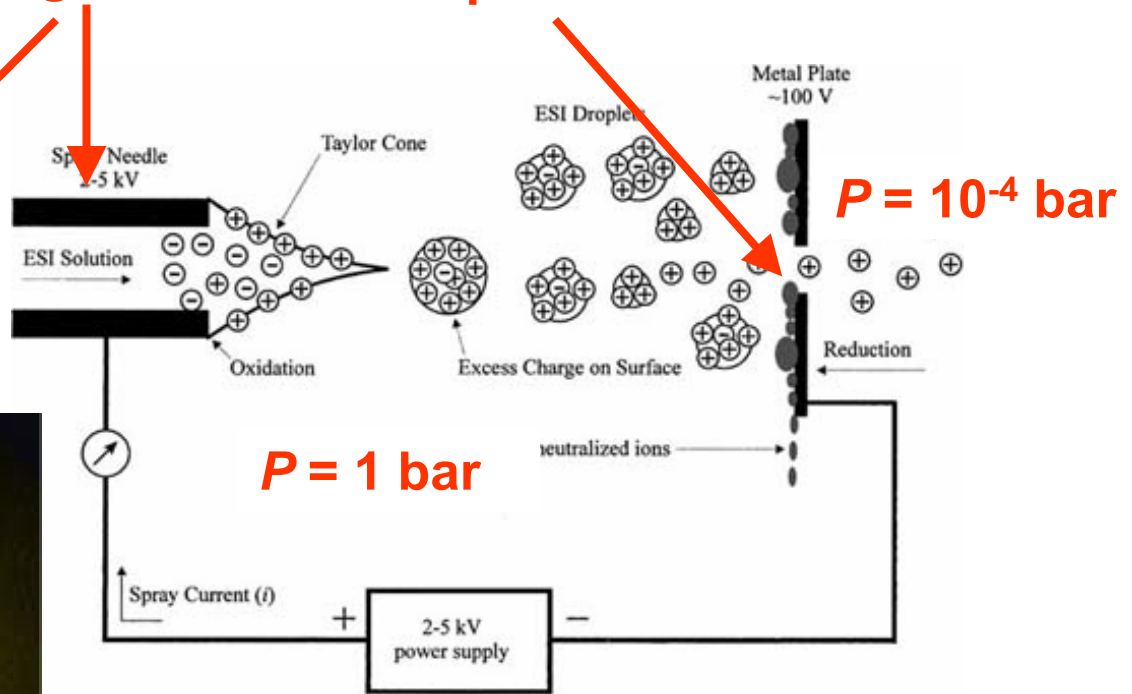
*Mais comment enlever le solvant?*

# Source électrospray

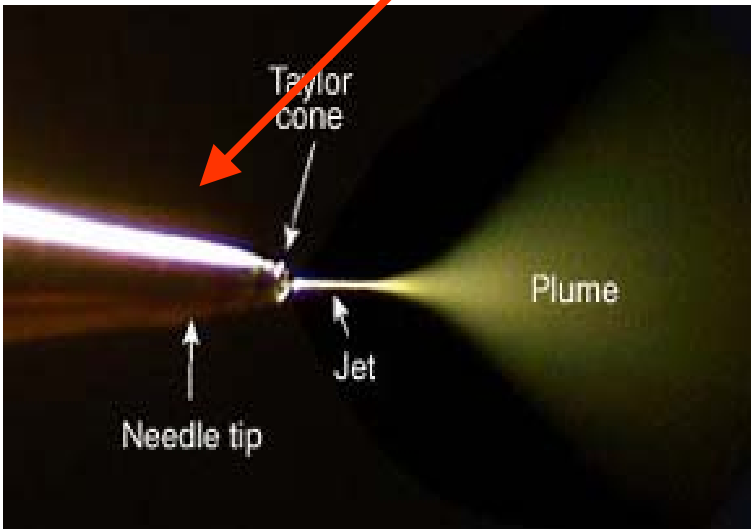
Molécules diluées dans une solution  
(H<sub>2</sub>O+CH<sub>3</sub>OH,  
TFE+CH<sub>3</sub>OH...)

Aiguille

Entrée du montage  
expérimental



$$\Delta V \approx 3 \text{ kV}$$



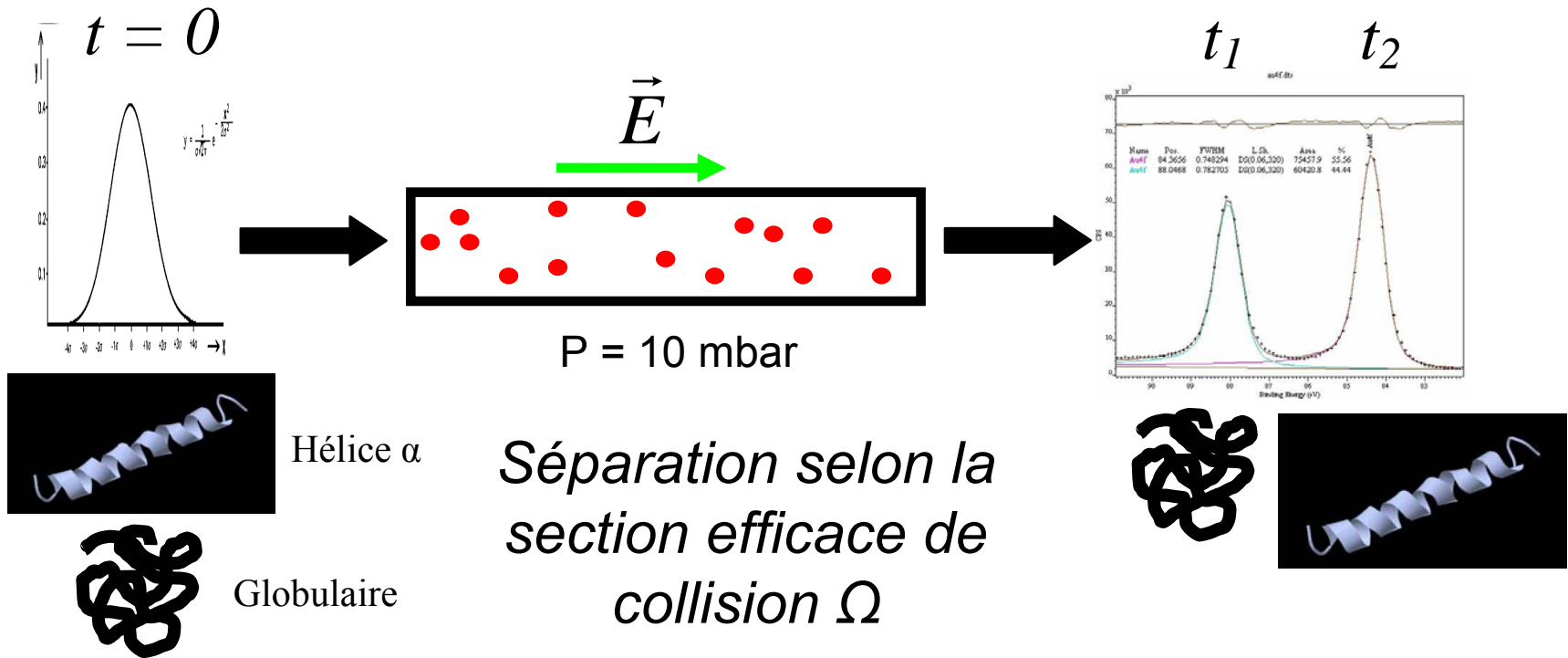
# Avantages pour nos études

- Molécules diluées dans une solution (mL)
- Concentration faible ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
- Distribution d'états de charge
- Ionisation douce sans fragmentation
- Complexes conservés

*Effet de la mise en phase gazeuse sur la structure des ions moléculaires ?*



# Spectrométrie de mobilité ionique



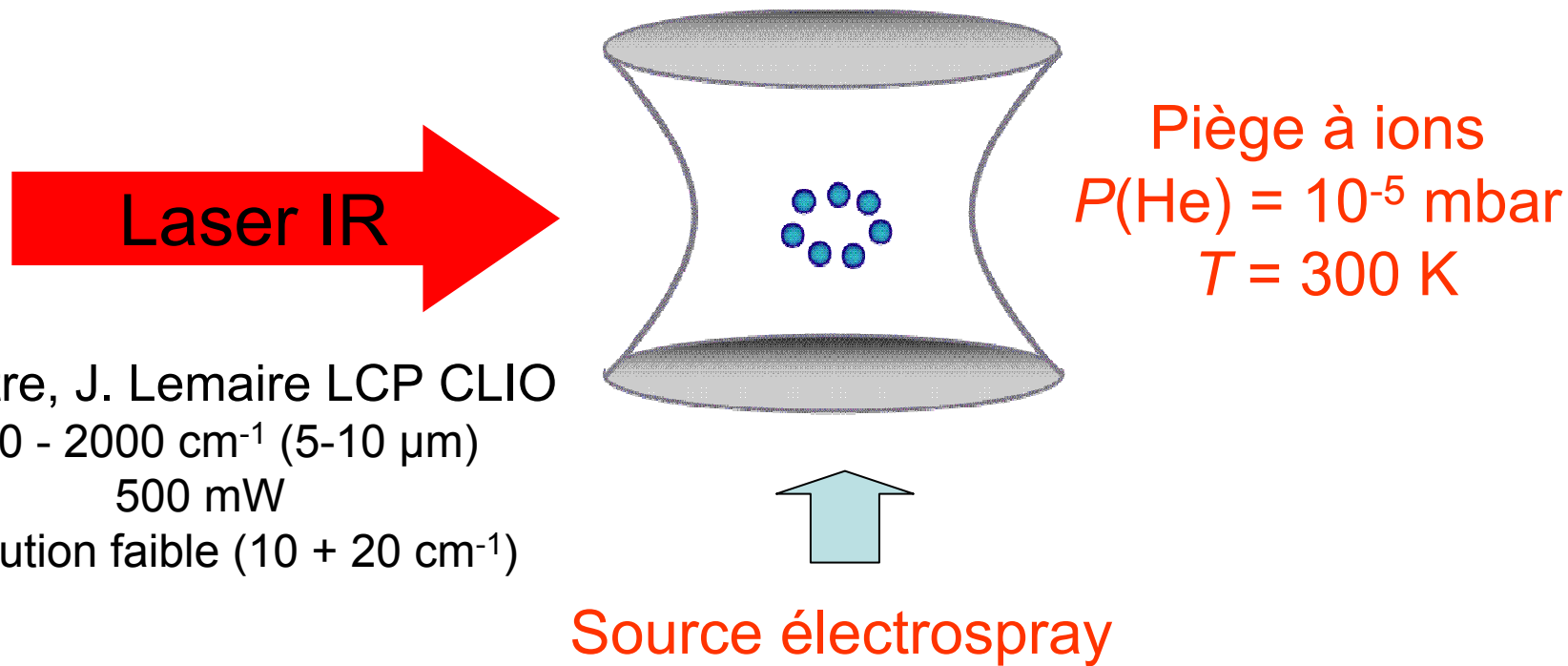
Interprétation : comparaison avec des calculs\*

Collaboration avec P. Dugourd et R. Ballivian, LASIM Université Lyon 1

\* Programme MobCal, M. F. Jarrold (Indiana University, USA)

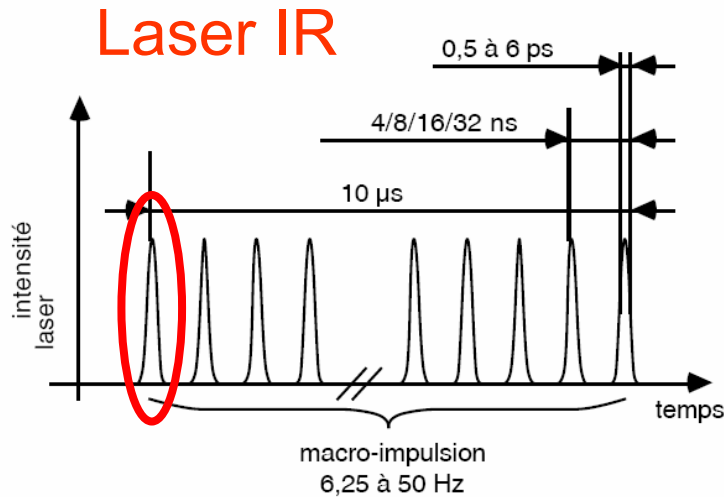
# Spectroscopie IRMPD + spectrométrie de masse

*Avantages: stœchiométrie parfaitement définie  
(sélection en masse)*



Absorption IR détectée par **fragmentation** des ions

# La fragmentation en détails



**Limite de dissociation**  
(molécule isolée:  
quelques eV)

$E_{int}$

01010  $v_i = 10000$

01010  $v_i = 00000$

RESONANCE

00000  $v_i = 10000$

00000  $v_i = 00000$

Redistribution aux  
autres modes de  
vibration

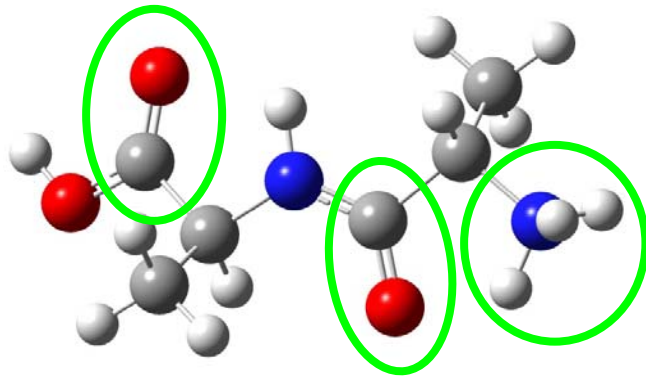
RESONANCE

***Processus répété jusqu'à dissociation de l'ion***



Taux de fragmentation proportionnel à l'intensité IR

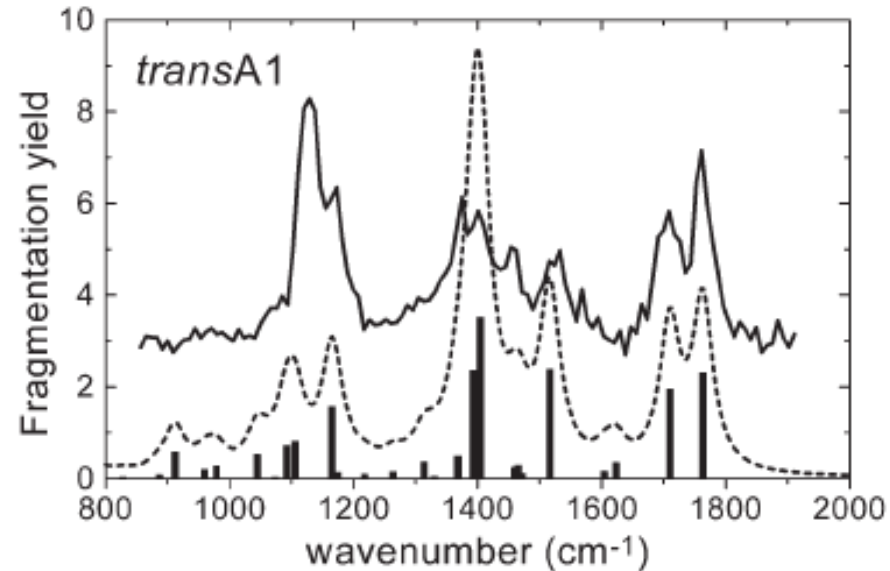
# Interprétation



Spectroscopie IRMPD



Calculs de chimie quantique



Déplacements spectraux = information sur les interactions moléculaires

Interprétation



Structure

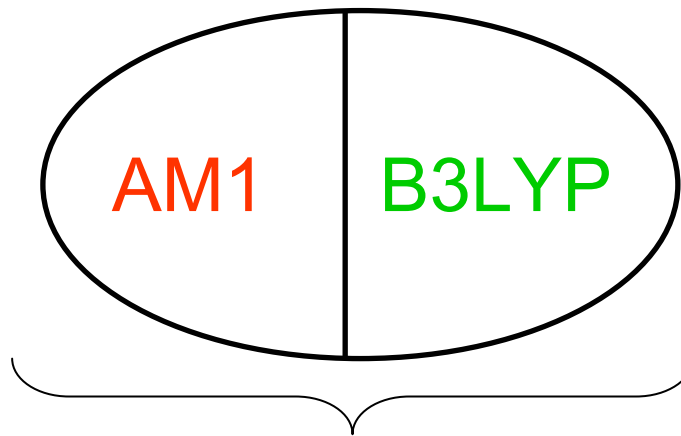
*Problème : durée des calculs*

# Comment simuler les spectres d'absorption IR de « gros » systèmes?



SIMULATIONS QM/SE au niveau  
B3LYP/6-31+g(d):AM1

*Calcul rapide mais  
peu fiable*

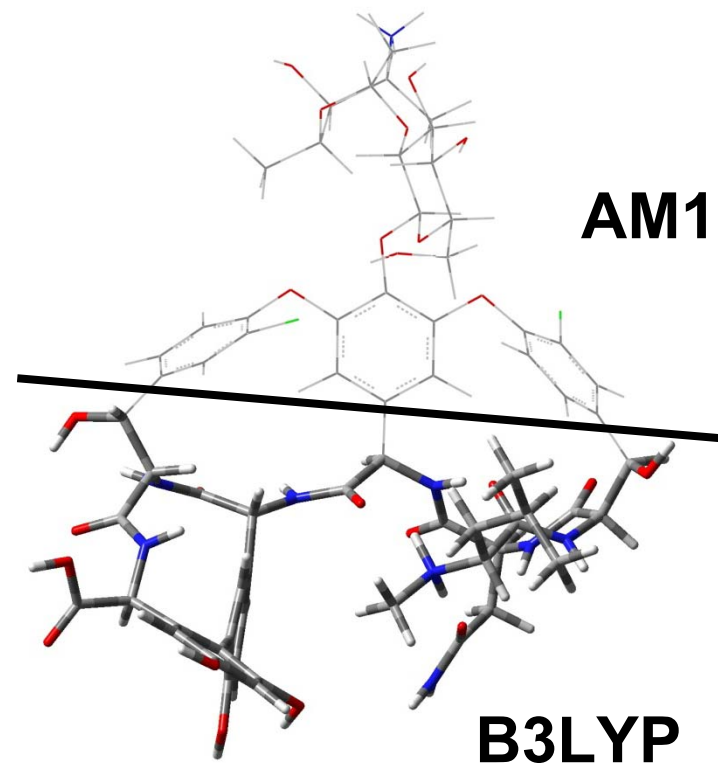
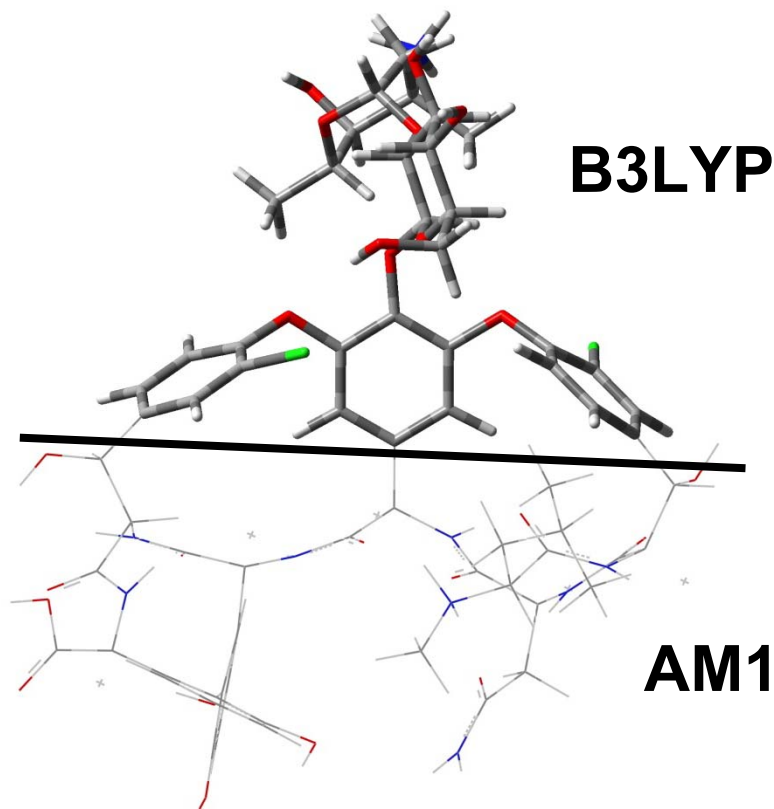


*Calcul fiable  
mais long*

Systeme total

**On ne retient que les fréquences calculées en B3LYP**<sup>13</sup>

# Un exemple : la vancomycine



Les deux structures optimisées doivent être très proches

# Méthodologie d'étude

1. Recherche de conformations par REMD\*
2. Tri par énergie
3. Regroupement par familles de structure
4. Tri par calcul de section efficace de collision
5. Simulation de spectre d'absorption IR
6. Attribution en termes de structure

\* Dynamique moléculaire par échange de répliques, collaboration avec Florent Calvo (Université Lyon 1)

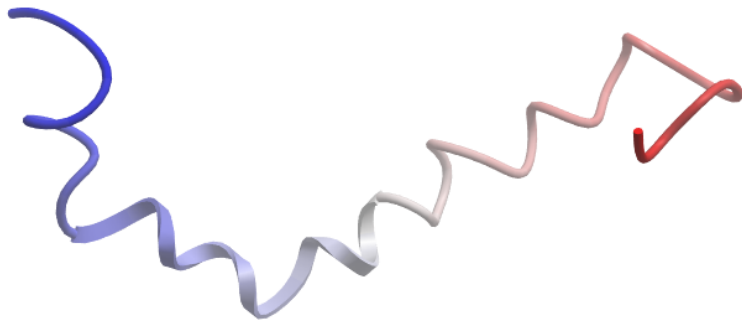
# Première partie

*Structure secondaire de brins  
d'amyloïde  $\beta$  en phase gazeuse*



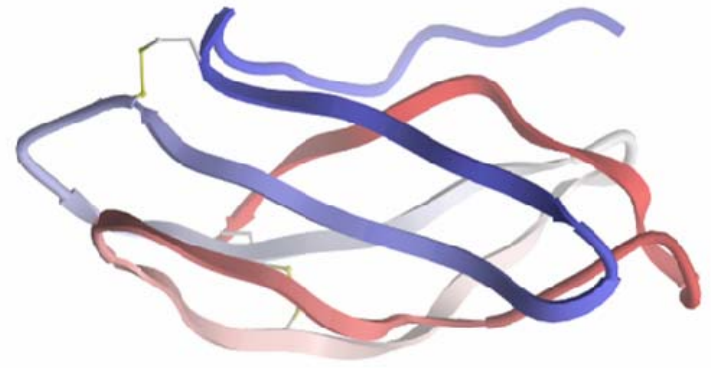
# La protéine amyloïde $\beta$

≈ 40 acides aminés, protéine naturelle

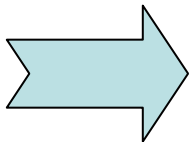


Structure native non-toxique

Mauvais  
repliement



**Feuillet  $\beta$  : germe des oligomères**  
(plaques = agrégats d'amyloïde  $\beta$ )

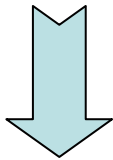


***Structure secondaire très importante***

# Études antérieures

## En phase gazeuse:

- Mobilité ionique :  
M. Bowers
- Échange H/D :  
E. Krause



Structure, agrégation

## En solution:

- Grande diversité conformationnelle
- Différents solvants = différentes structures
- TFE :  $\epsilon = 30$ ; favorise les structures en hélice  $\alpha$

# But de nos études

Avec la spectroscopie IRMPD, la spectrométrie de mobilité ionique et les calculs QM/SE:

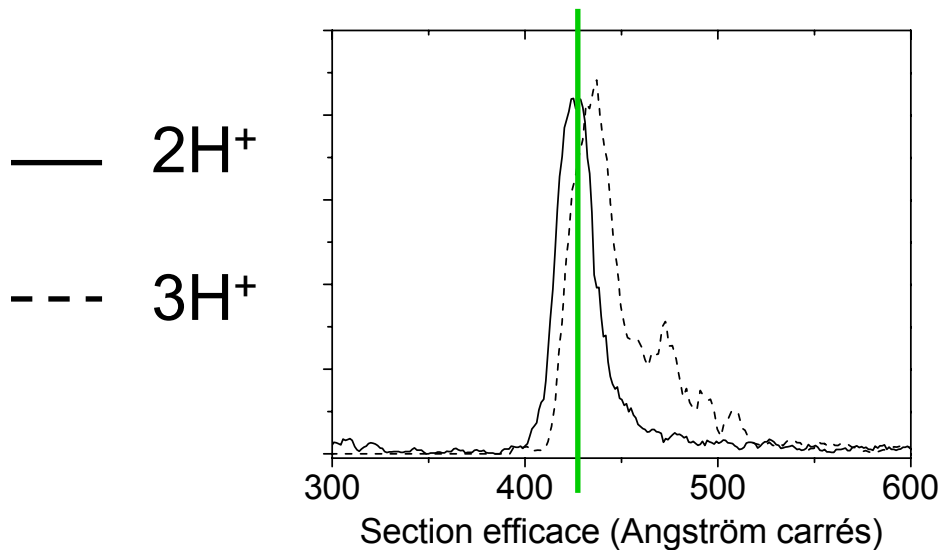
- Polarité du solvant
- État de charge
- Longueur du brin

*Influence sur la structure secondaire de l'amyloïde  $\beta$  en phase gazeuse?*

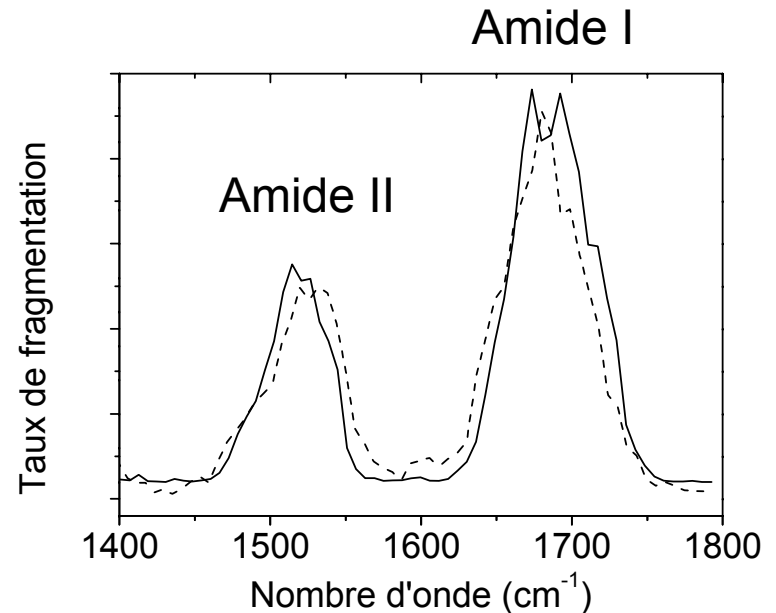
# Résultats expérimentaux avec le TFE

Brin 12-28 de la protéine amyloïde  $\beta$

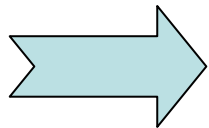
$$\langle \Omega \rangle = 426 \text{ \AA}^2$$



**Mobilité ionique**



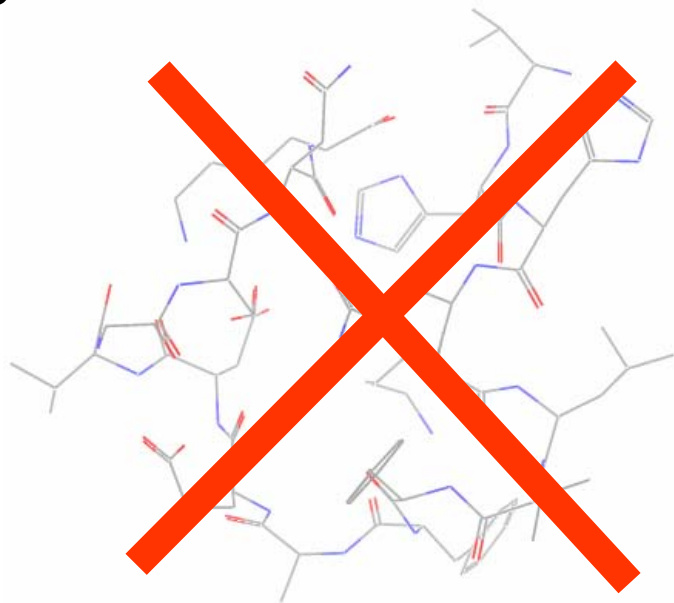
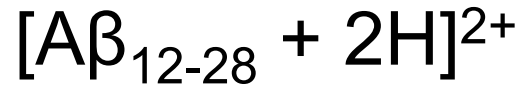
**Spectroscopie IRMPD**



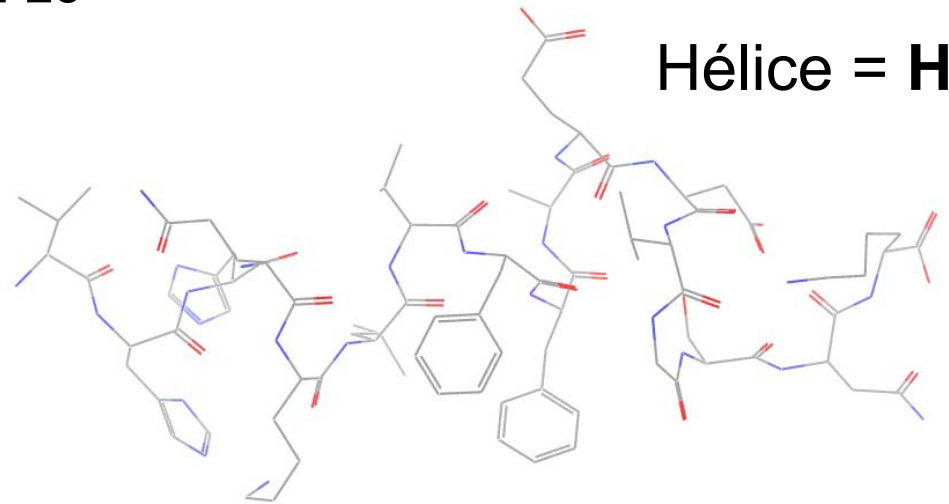
- *Une seule famille de conformations*
- *Faible effet de l'état de charge*

# Calculs de sections efficaces de collision

Désordonnée  
globulaire = **DG**



$$\langle \Omega \rangle = 384 \text{ \AA}^2$$



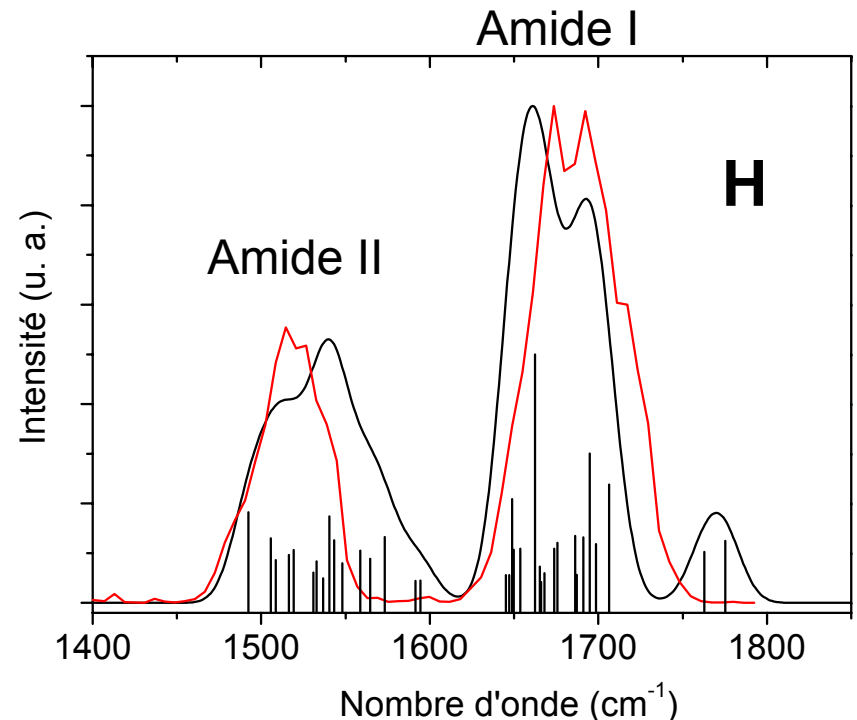
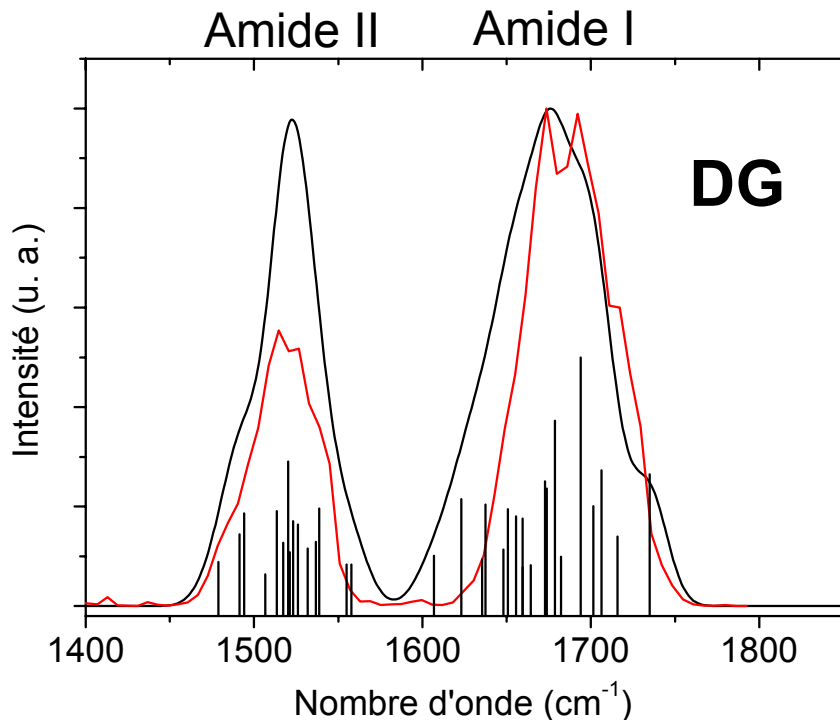
Hélice = **H**

$$\langle \Omega \rangle = 421 \text{ \AA}^2$$

$$\text{EXP: } \langle \Omega \rangle = 426 \text{ \AA}^2$$

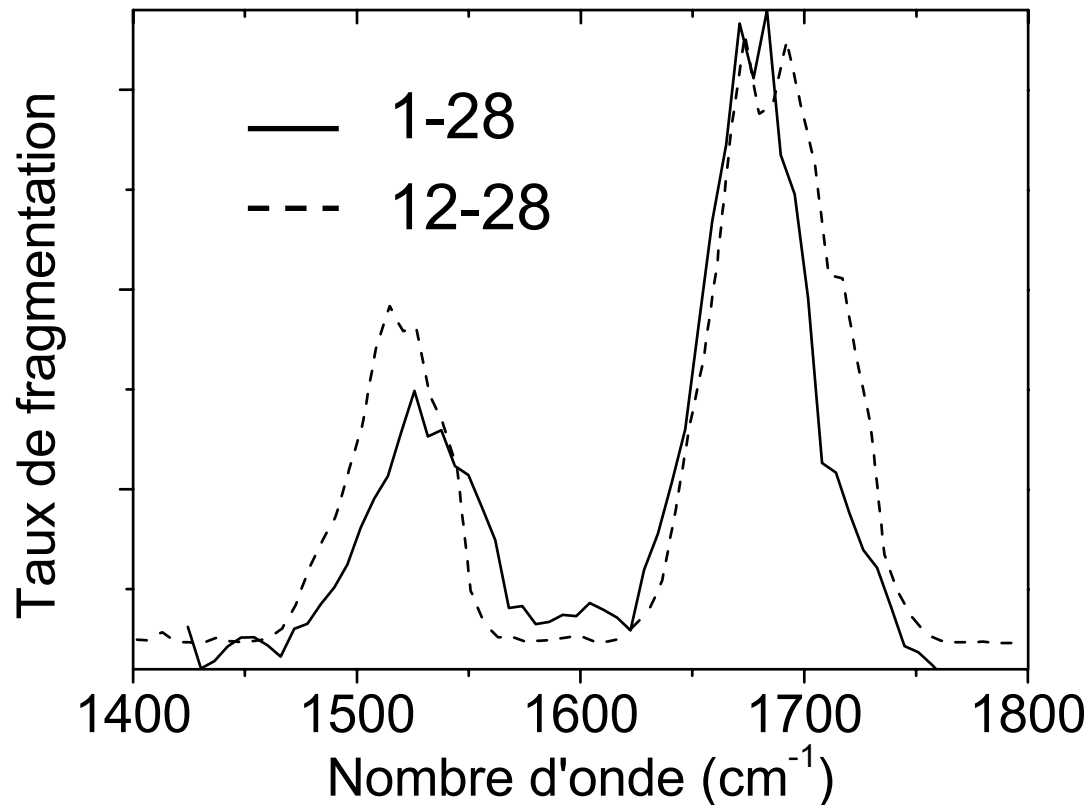
# Simulations QM/SE

Spectres IR de  $[A\beta_{12-28} + 2H]^{2+}$  calculés au niveau B3LYP/6-31g(d):AM1

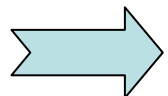


- *Positions moyennes : aucun conformère n'est satisfaisant*
- *Intensités relatives : bon accord pour H*

# Influence de la longueur du brin

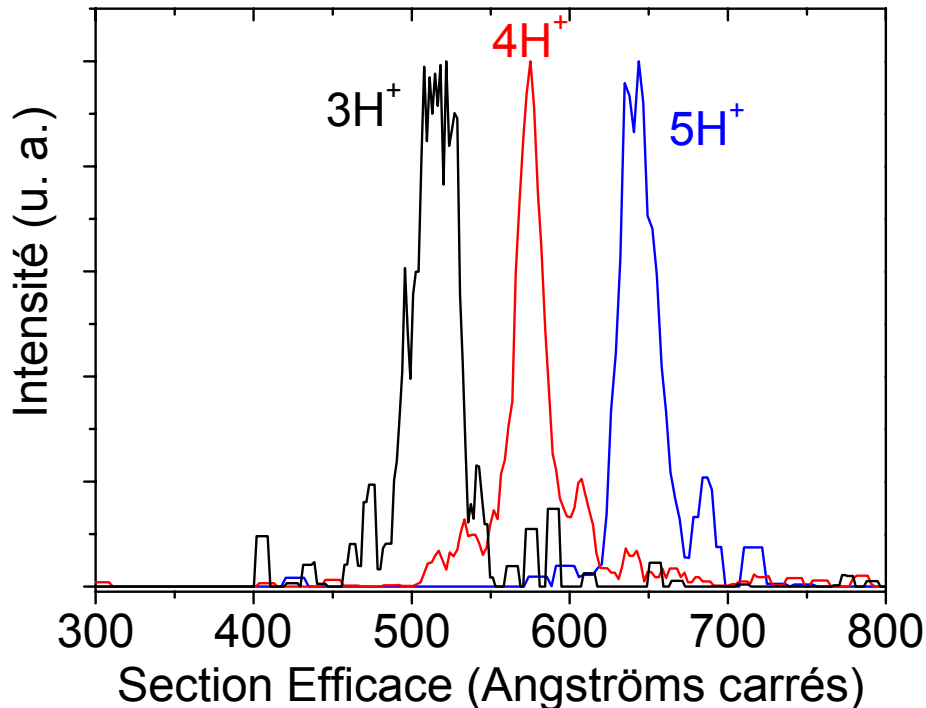


Hélice favorisée en phase gazeuse par le TFE  
pour les deux brins ?



*Plus d'informations grâce à la mobilité ionique...*

# Étude du brin 1-28 avec l'eau



## Largeur maximale :

- 30 Å<sup>2</sup> pour l'état de protonation 3H<sup>+</sup>

## Valeur moyenne :

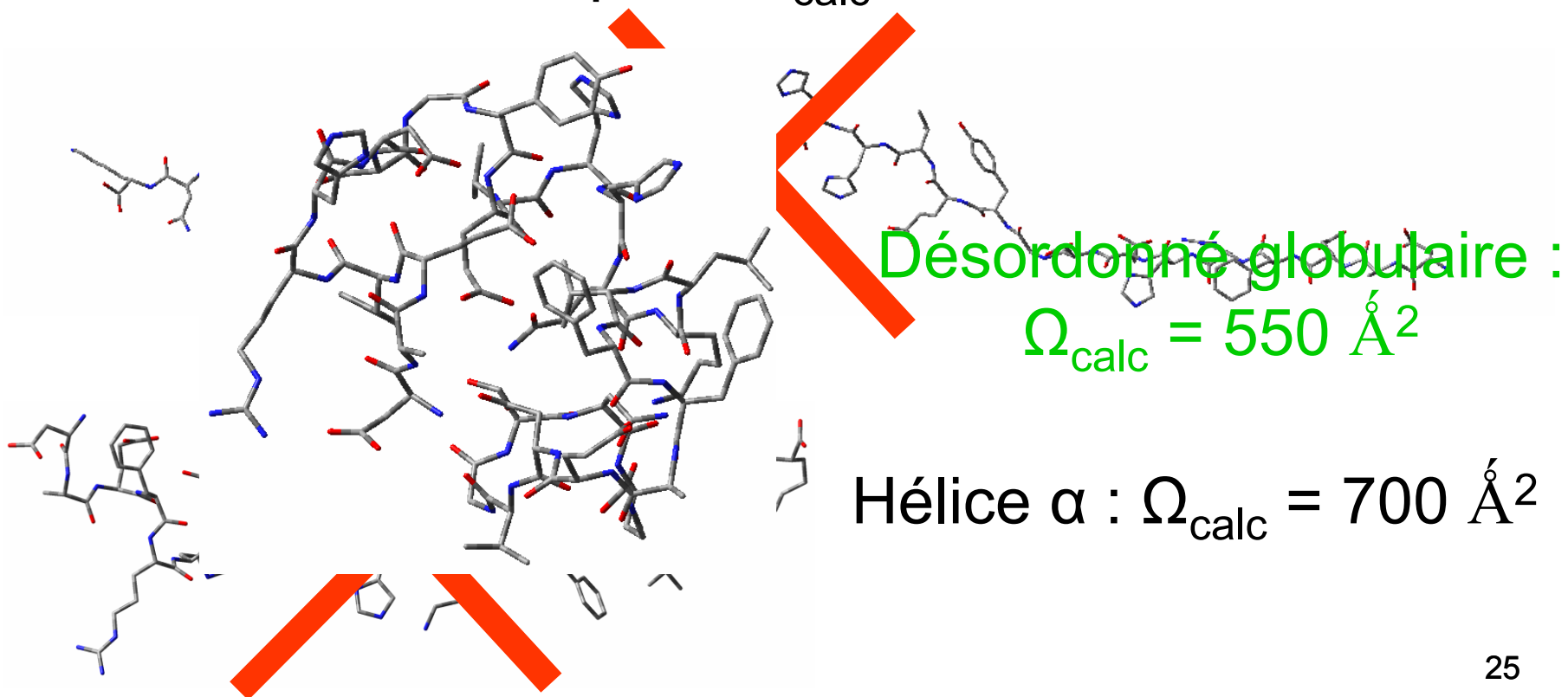
- augmente avec le nombre de protons

- Hétérogénéité conformationnelle faible
- Dépliement de la structure induite par répulsion coulombienne



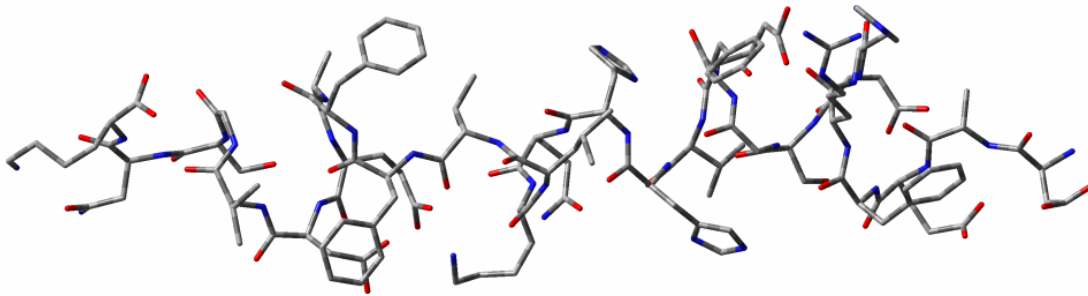
État de charge	$[A\beta_{1-28} + 3H]^{3+}$	$[A\beta_{1-28} + 4H]^{4+}$
Section efficace mesurée ( $\text{Å}^2$ )	525	575

Brin déplié :  $\Omega_{\text{calc}} = 951 \text{ Å}^2$

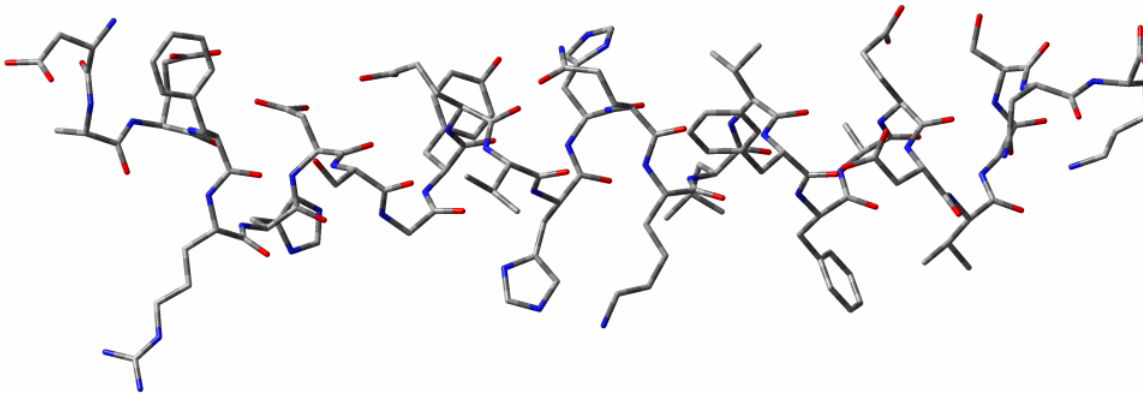


Hélice  $\alpha$  :  $\Omega_{\text{calc}} = 700 \text{ Å}^2$

État de charge	$[\text{A}\beta_{1-28} + 5\text{H}]^{5+}$
Section efficace mesurée ( $\text{Å}^2$ )	650



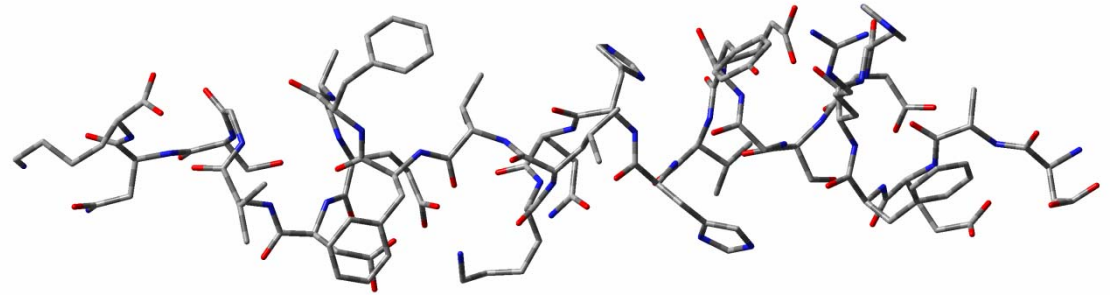
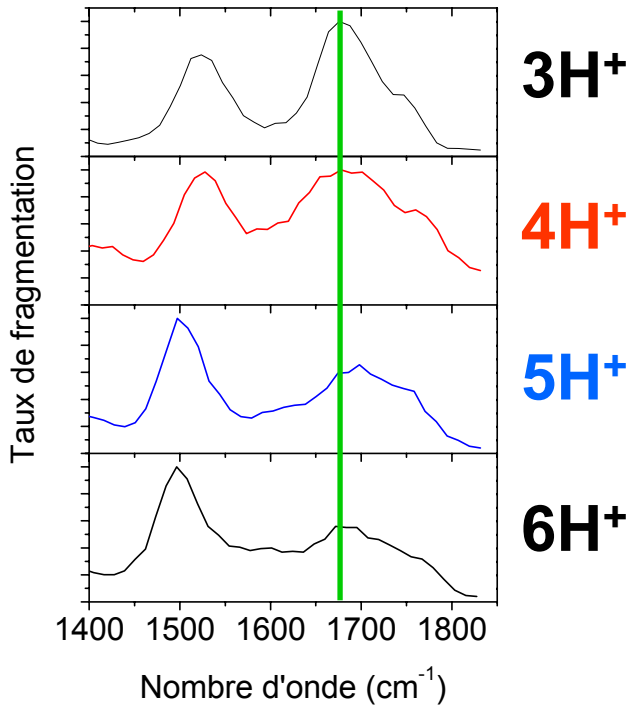
Désordonné déplié :  
 $\langle \Omega_{\text{calc}} \rangle = 654 \text{ Å}^2$



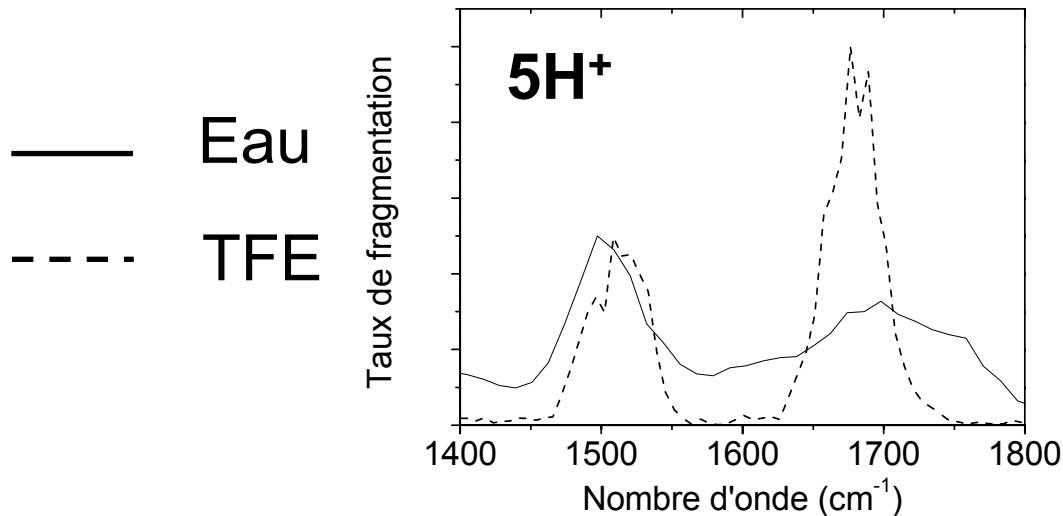
Hélice  $\alpha$  :  
 $\Omega_{\text{calc}} = 700 \text{ Å}^2$

# C=O engagés

Conformère désordonné déplié:



Deux fois moins de C=O engagés que le conformère désordonné globulaire

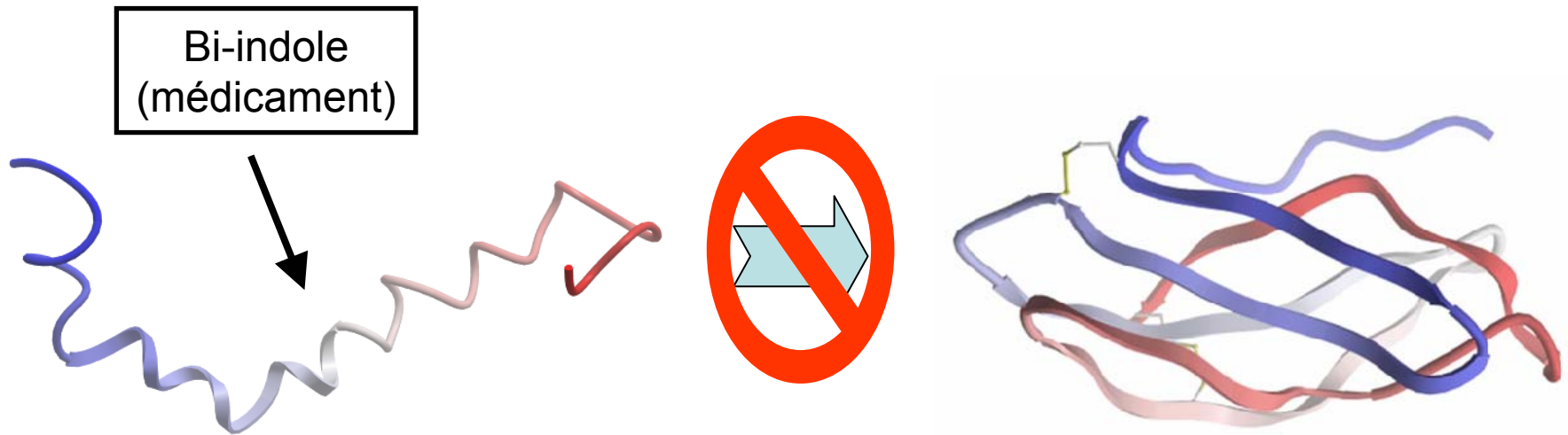


*Le dépliement ne tend pas vers une hélice*

# Conclusions des études sur les brins d'amyloïde $\beta$ isolés

- Influence du solvant sur la structure en phase gazeuse
- Tendence de la phase liquide conservée
- Validation de l'approche expérimentale spectroscopie IRMPD + spectrométrie de mobilité ionique pour les gros systèmes

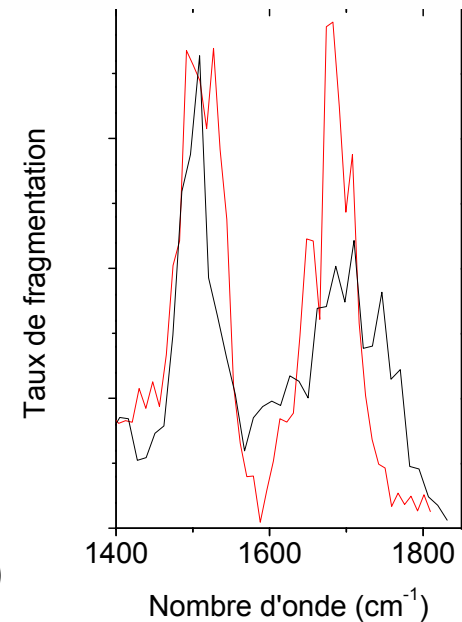
# Effet de la complexation



Amyloïde  $\beta$  1-28 +  $5H^+$

— Sans bi-indole

— Avec bi-indole



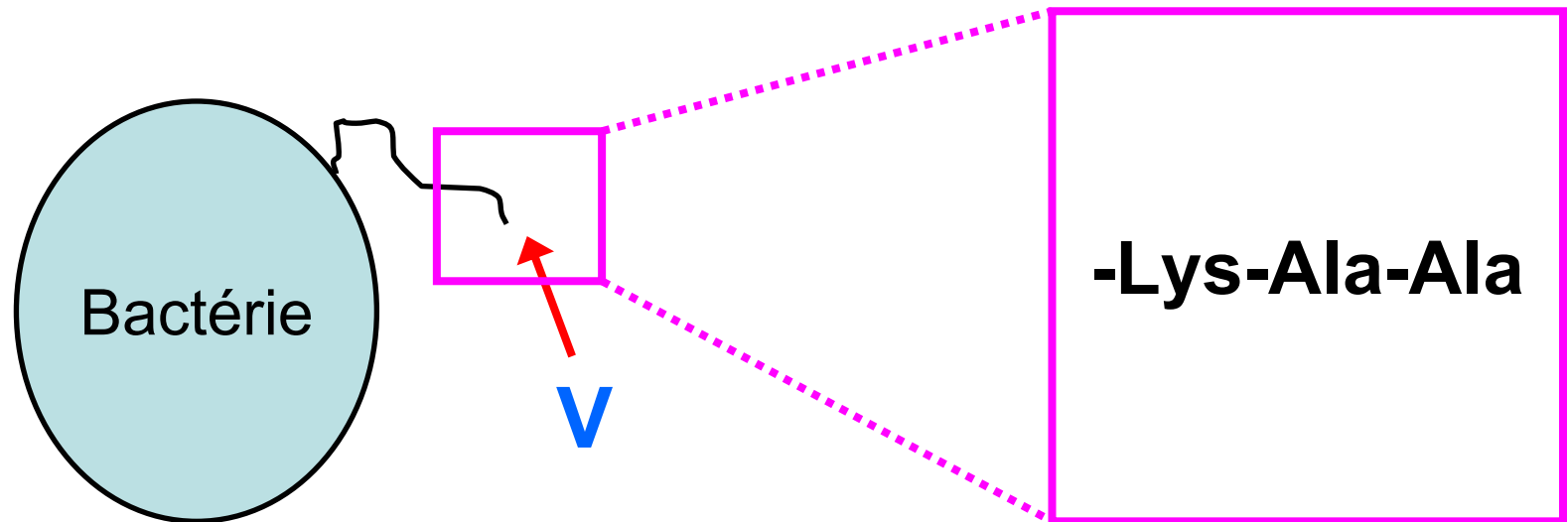
Collaboration avec D. Weaver, Halifax (Canada)

# Seconde partie

*Reconnaissance moléculaire  
spécifique en phase gazeuse*

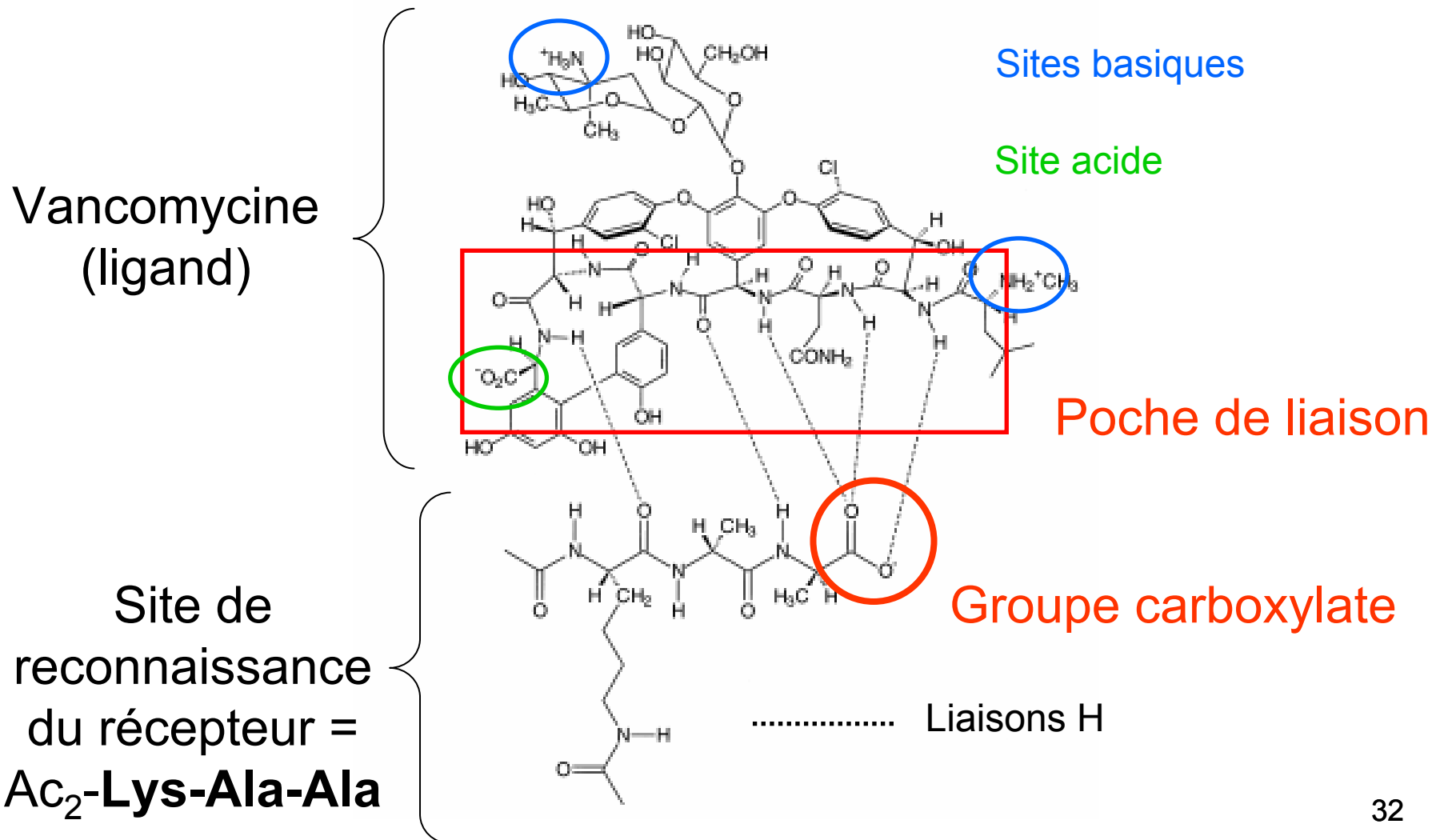
# Vancomycine = ligand naturel

Antibiotique de dernier recours contre certaines infections bactériennes



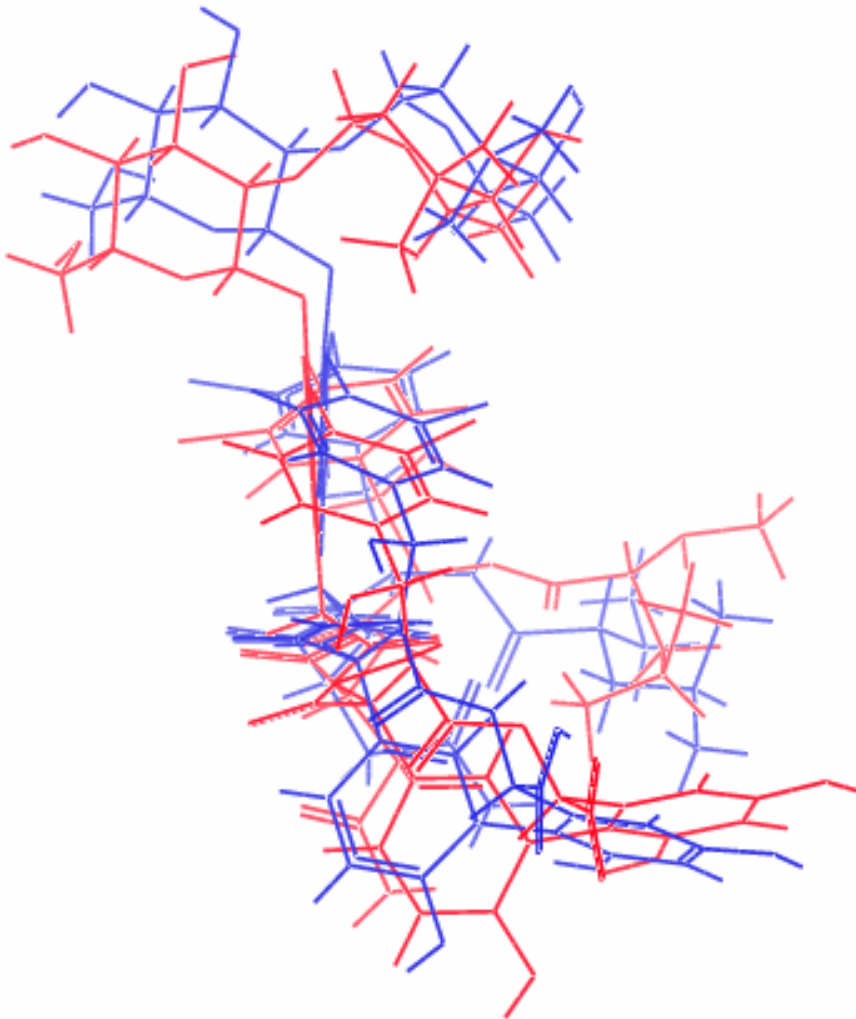
*Attachement spécifique au récepteur  
= mort de la cellule*

# Un modèle de la reconnaissance spécifique

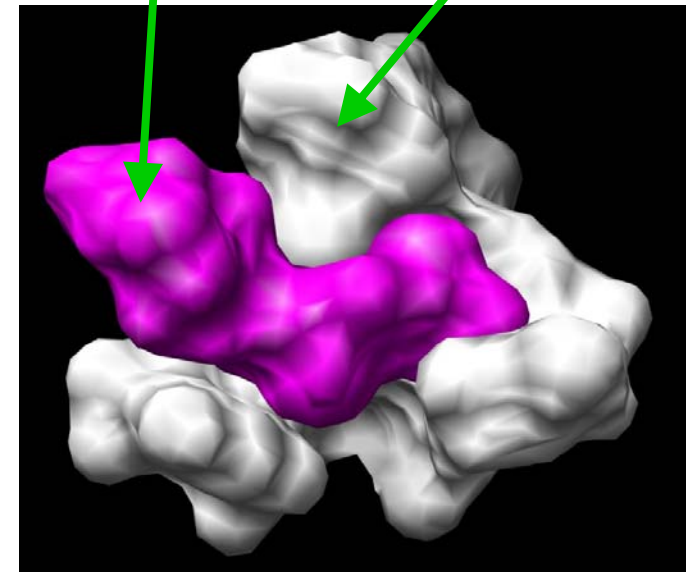




# Ajustement induit : structure cristalline



récepteur vancomycine



PDB: 1fvm

Vancomycine: PDB 1aa5

PDB = Protein Data Bank

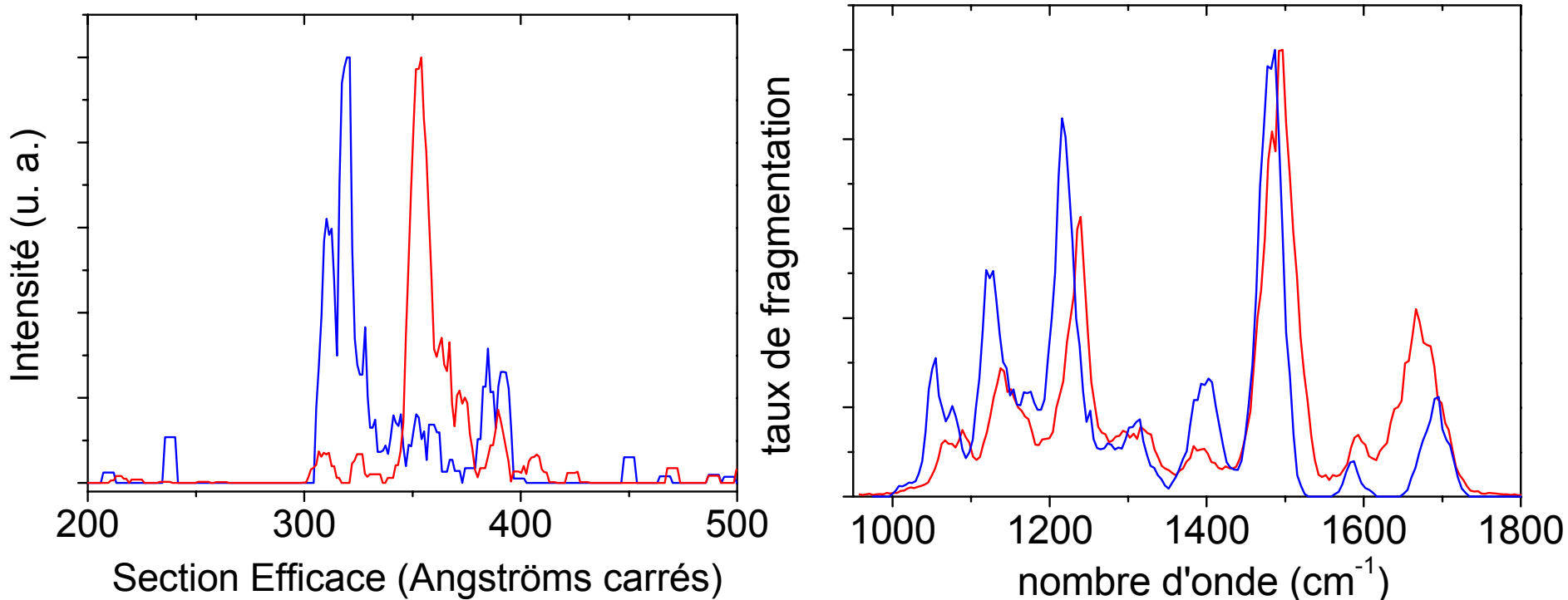
# Études antérieures du même système en phase gazeuse

*Fragmentation et spectrométrie de masse*

- Étude des modes positif et négatif
- affinité relative de différents récepteurs
- énergie de liaison

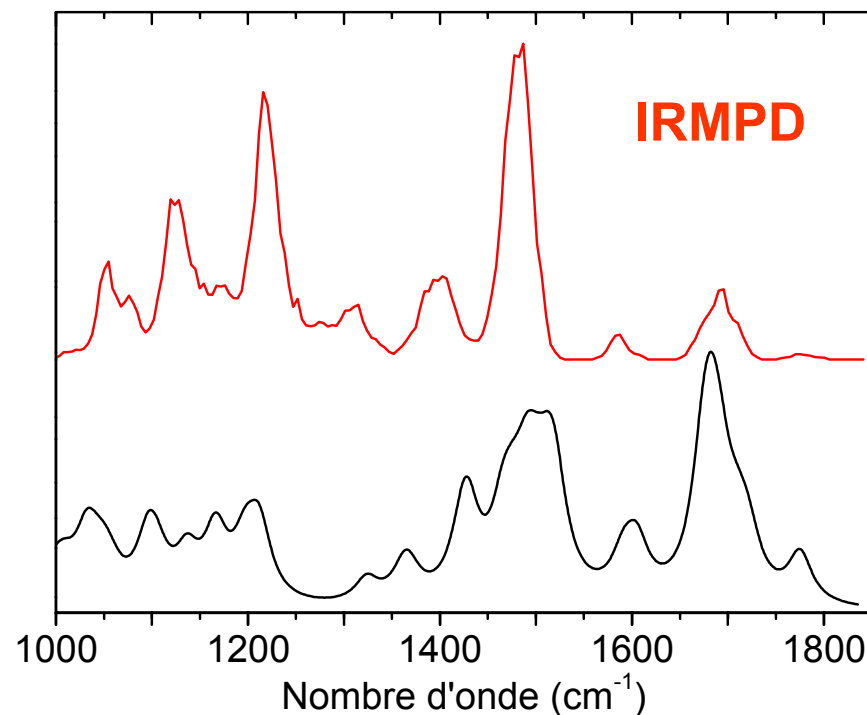
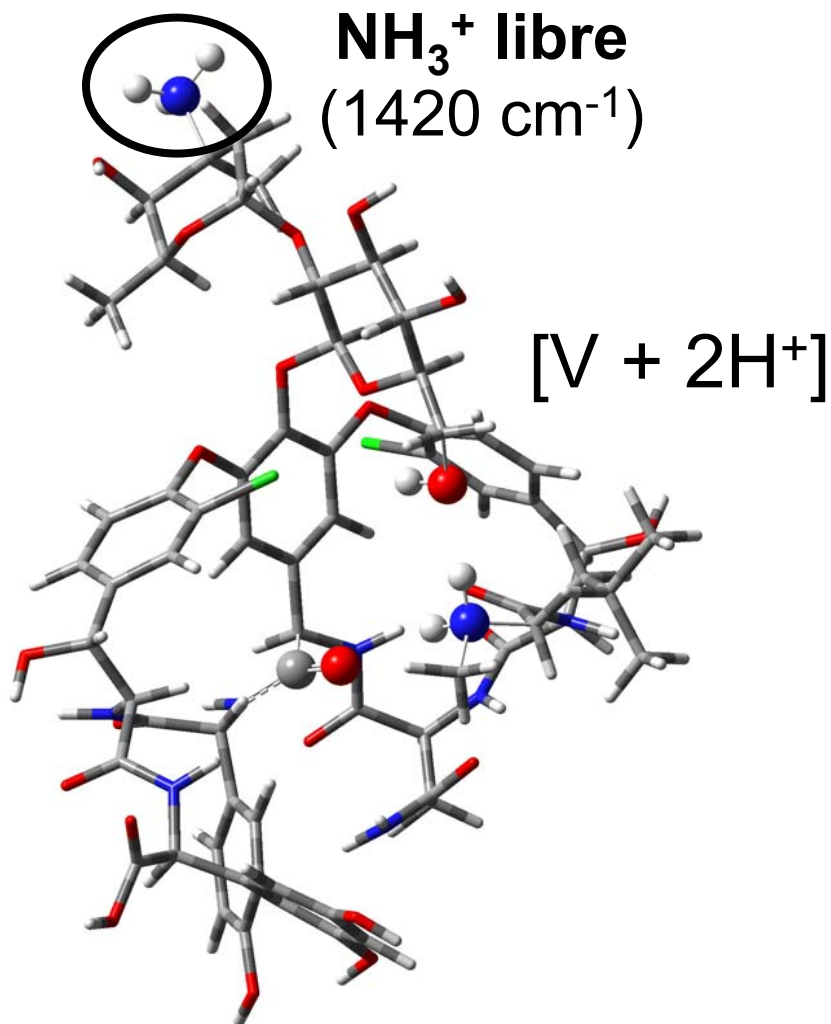
Pas d'étude structurale directe...

# Mode positif: résultats expérimentaux pour l'état de protonation $2H^+$



— Vancomycine seule  
— Complexe

# Vancomycine protonée



$$\Omega_{\text{EXP}} = 318 \pm 10 \text{ \AA}^2$$

$$\Omega_{\text{CALC}} = 316 \text{ \AA}^2$$

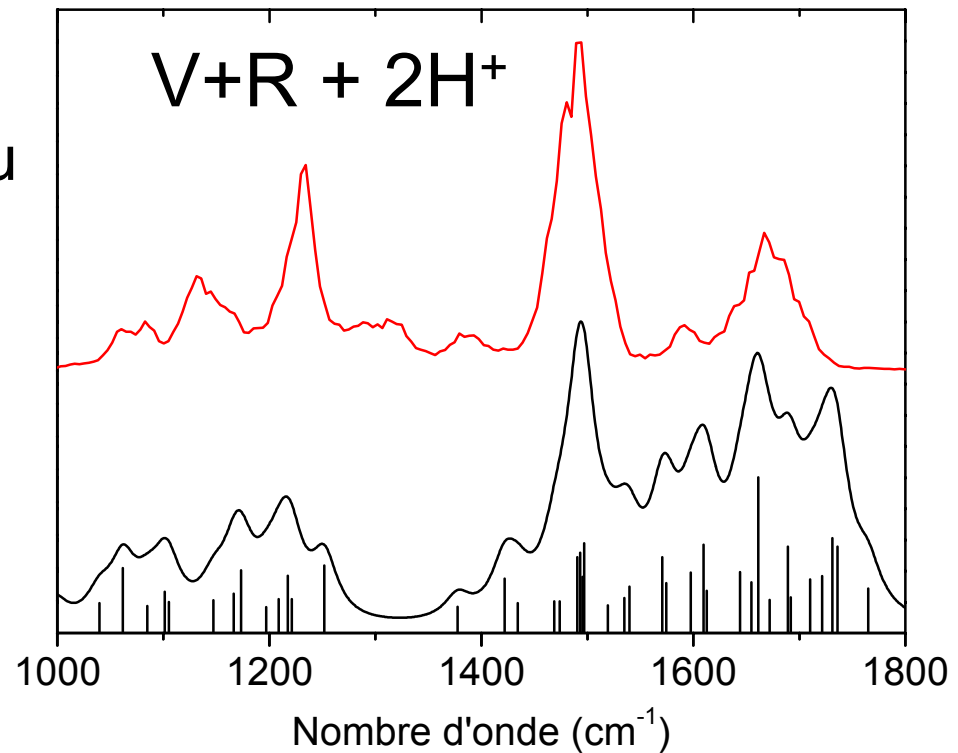
*Proposition d'une famille de structure*

# Complexe protoné

— Expérience IRMPD  
— Simulation QM/SE du conformère PDB

$$\Omega_{\text{EXP}} = 355 \pm 10 \text{ \AA}^2$$

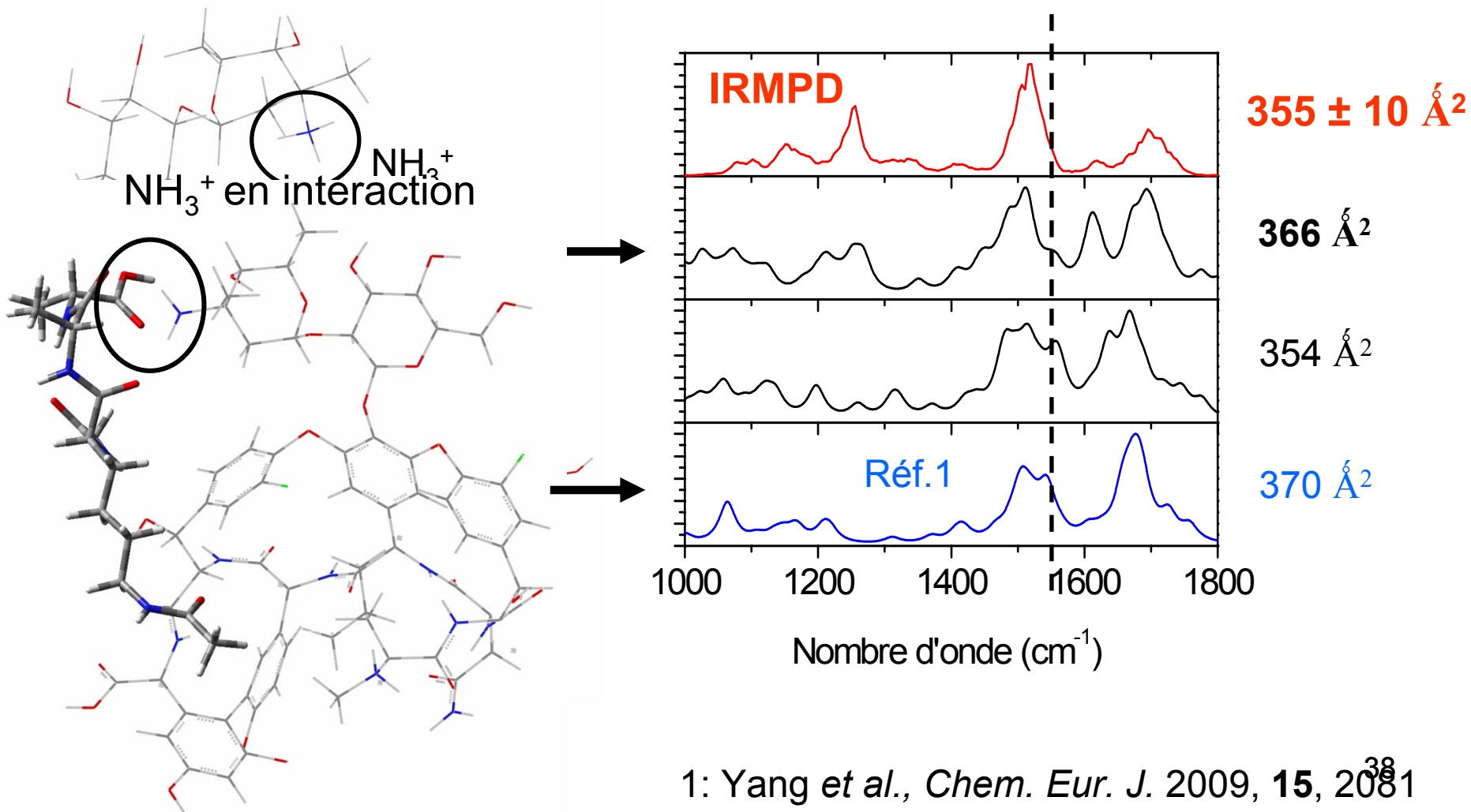
$$\Omega_{\text{PDB}} = 370 \text{ \AA}^2$$

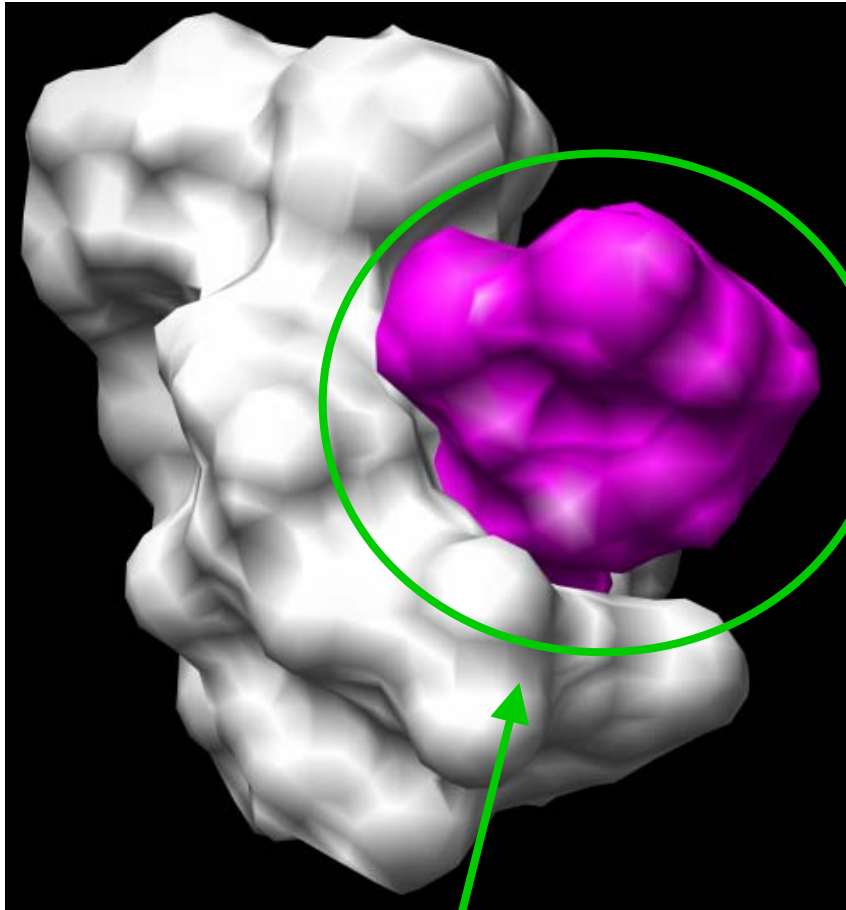


*La structure native n'est pas conservée*

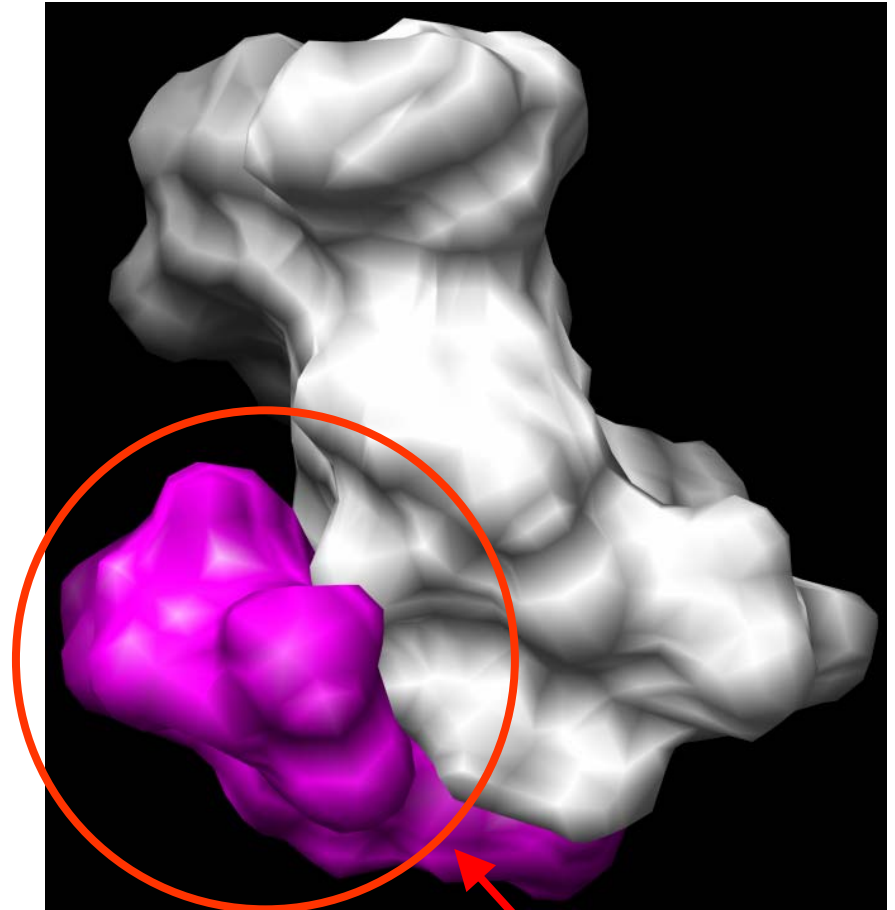
# Recherche du site de complexation

## Pliage $\text{NH}_3^+$ en interaction



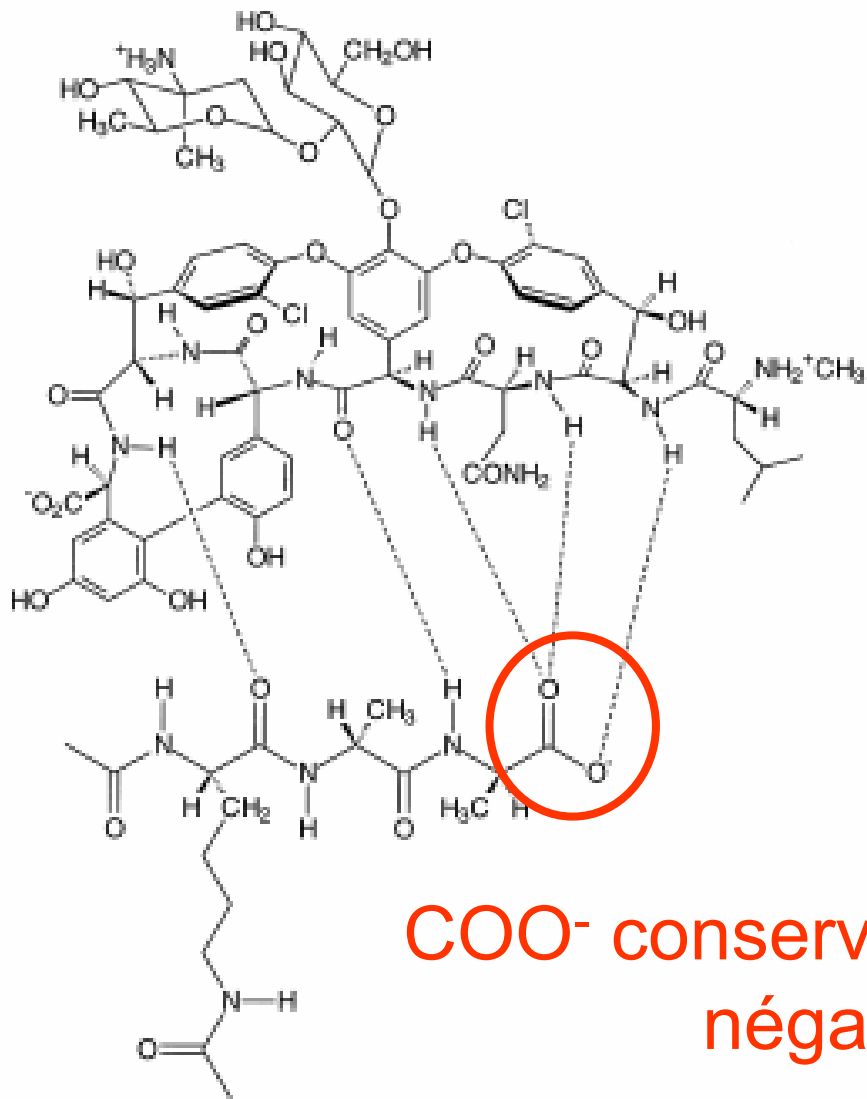


Site de  
reconnaissance  
spécifique



Site de complexation  
proposé en mode  
positif

Vancomycine

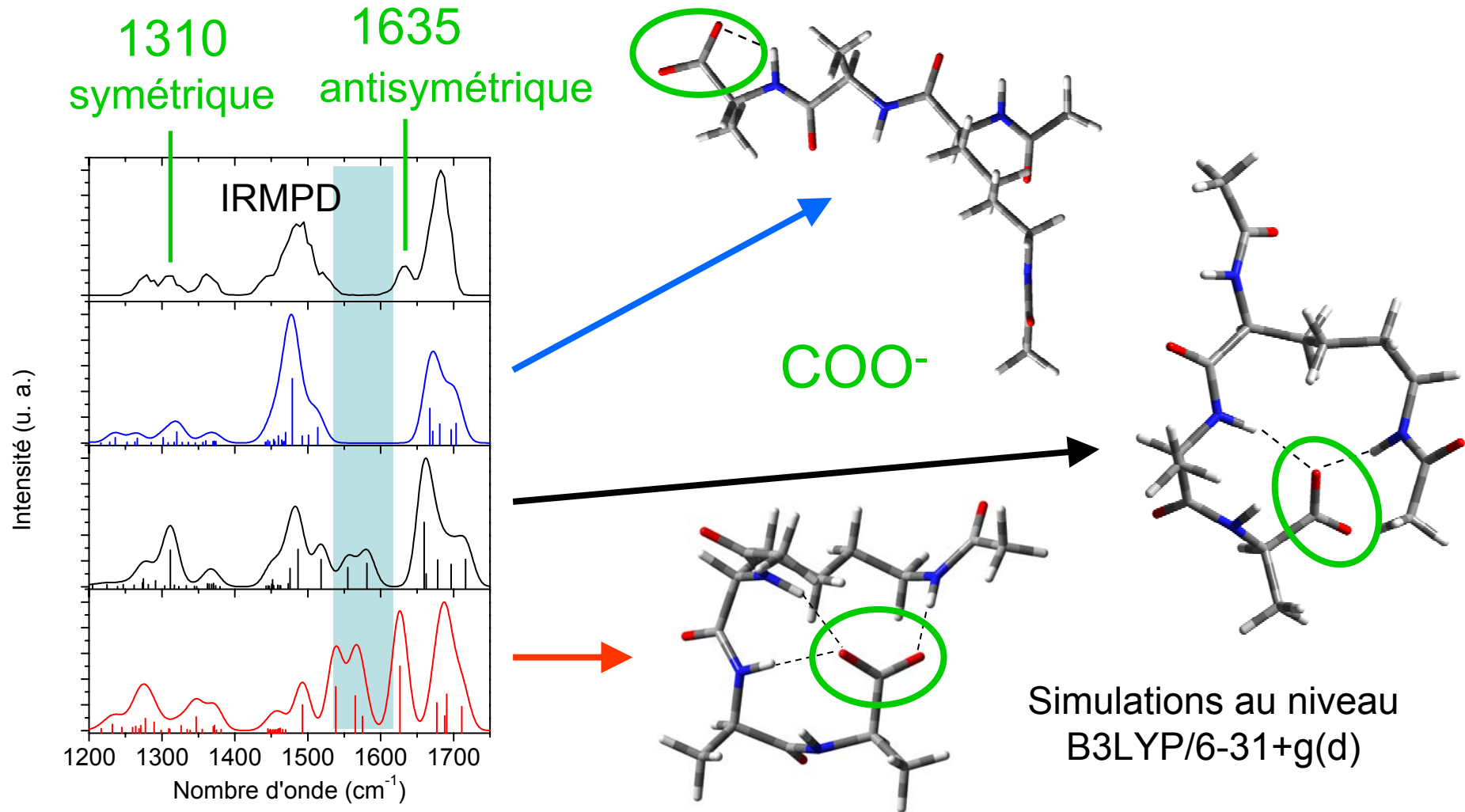


COO<sup>-</sup> conservé en mode négatif

*Peu de données IR sur les espèces déprotonées...*



# Étude du récepteur déprotoné

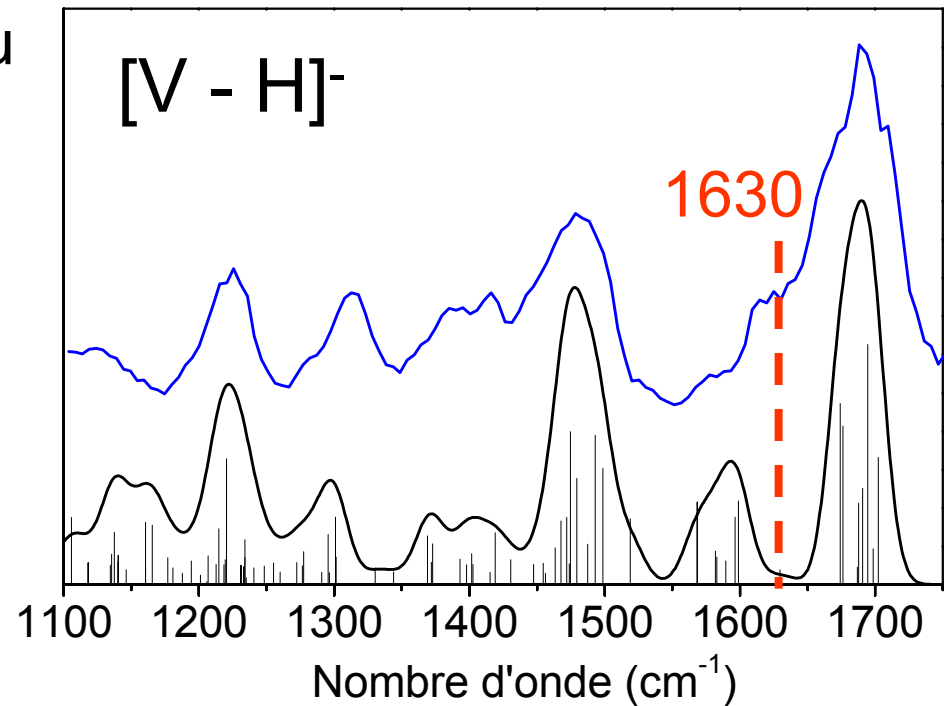
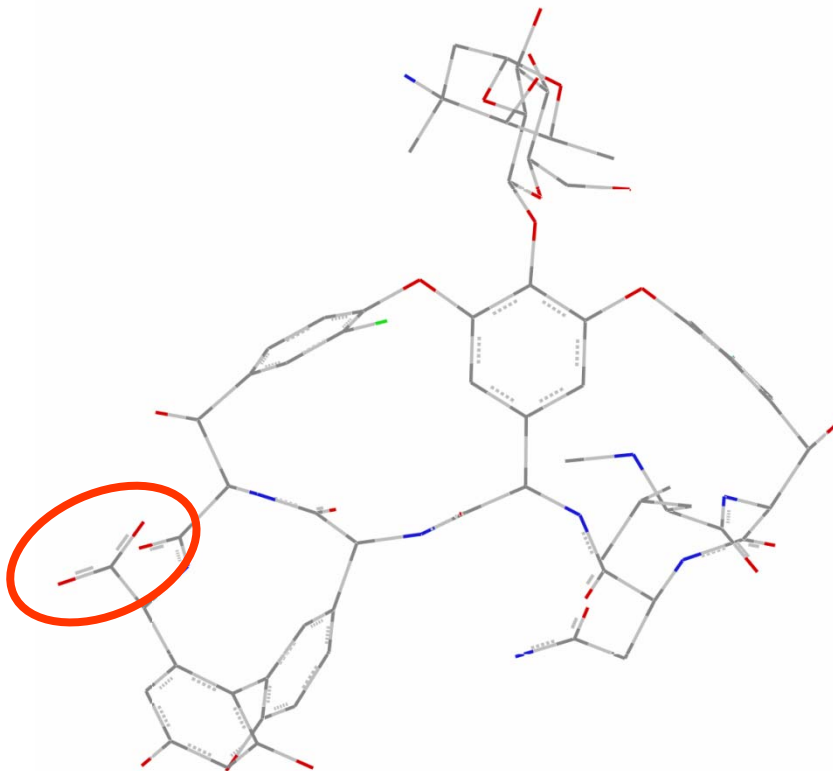


Mesure du spectre de la phénylalanine déprotonée: COO<sup>-</sup> libre ( $1330, 1640 \text{ cm}^{-1}$ )  
J. Oomens *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (2009) **131**, 4310

# Résultats en mode négatif: vancomycine

— Simulation QM/SE du  
**conformère PDB**

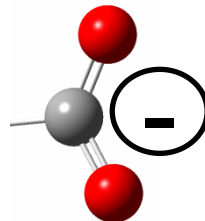
— Expérience IRMPD



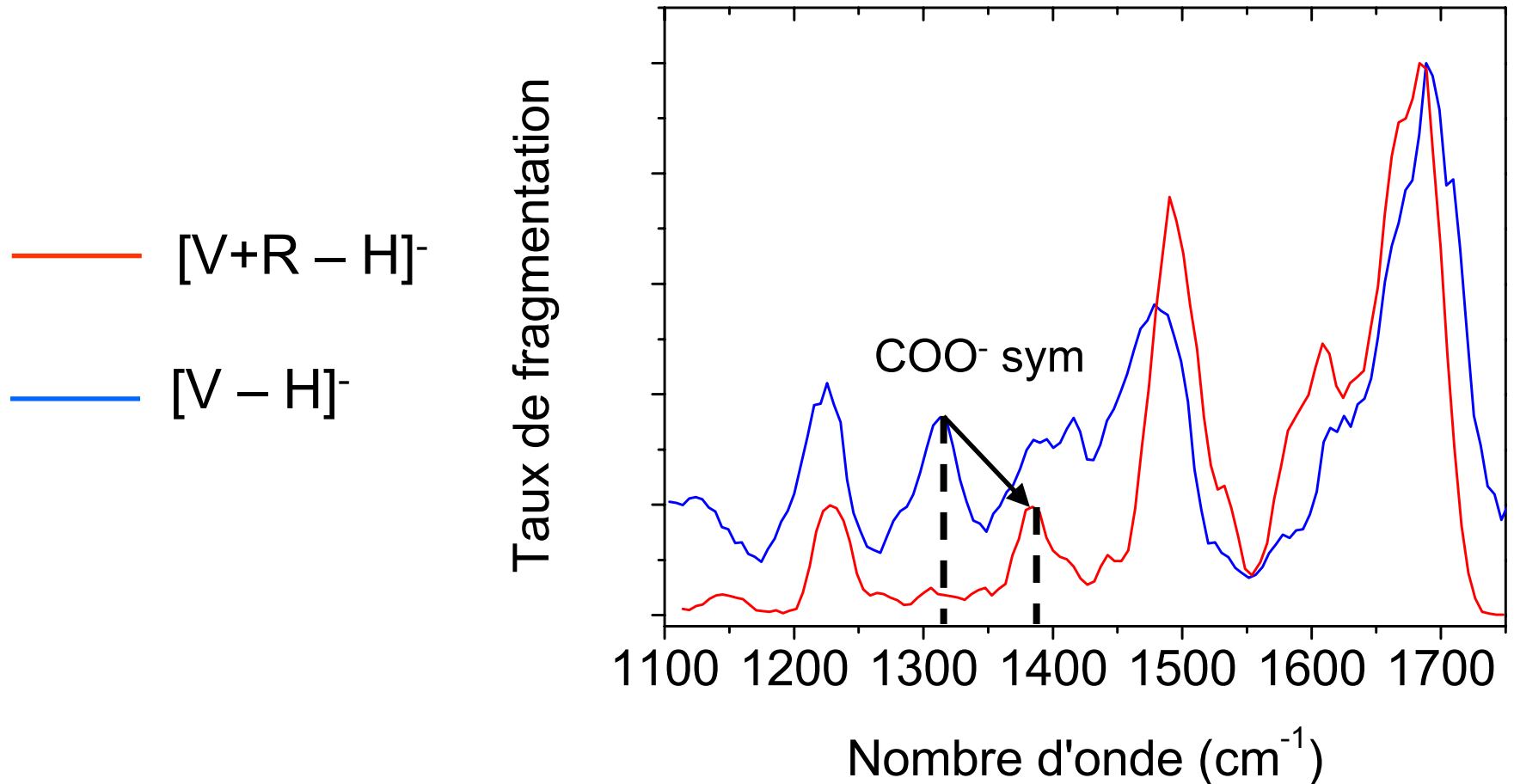
**COO<sup>-</sup> libre :**

Symétrique = 1313 cm<sup>-1</sup>

Antisymétrique = 1630 cm<sup>-1</sup>



# Signature spectroscopique expérimentale de la complexation

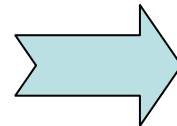
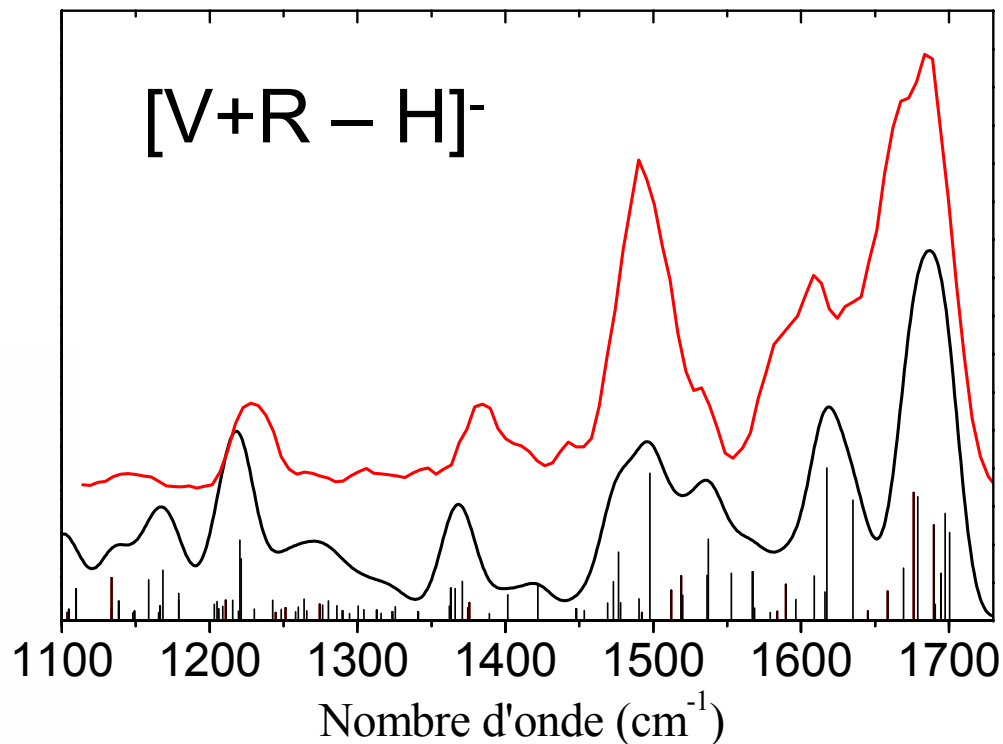
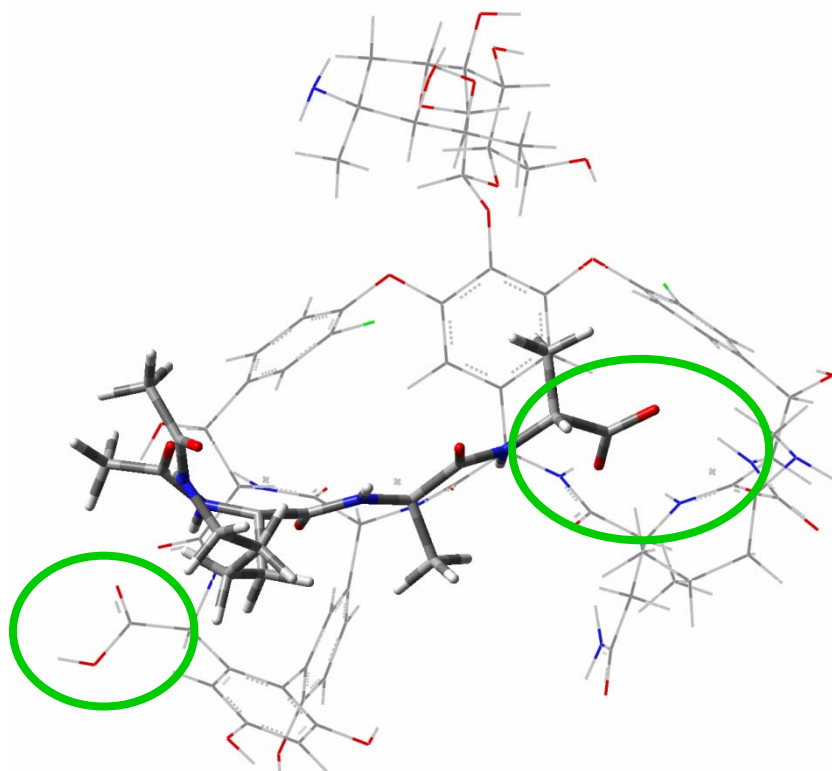


*Engagement du COO<sup>-</sup> dans des liaisons hydrogènes*

# Complexe déprotoné

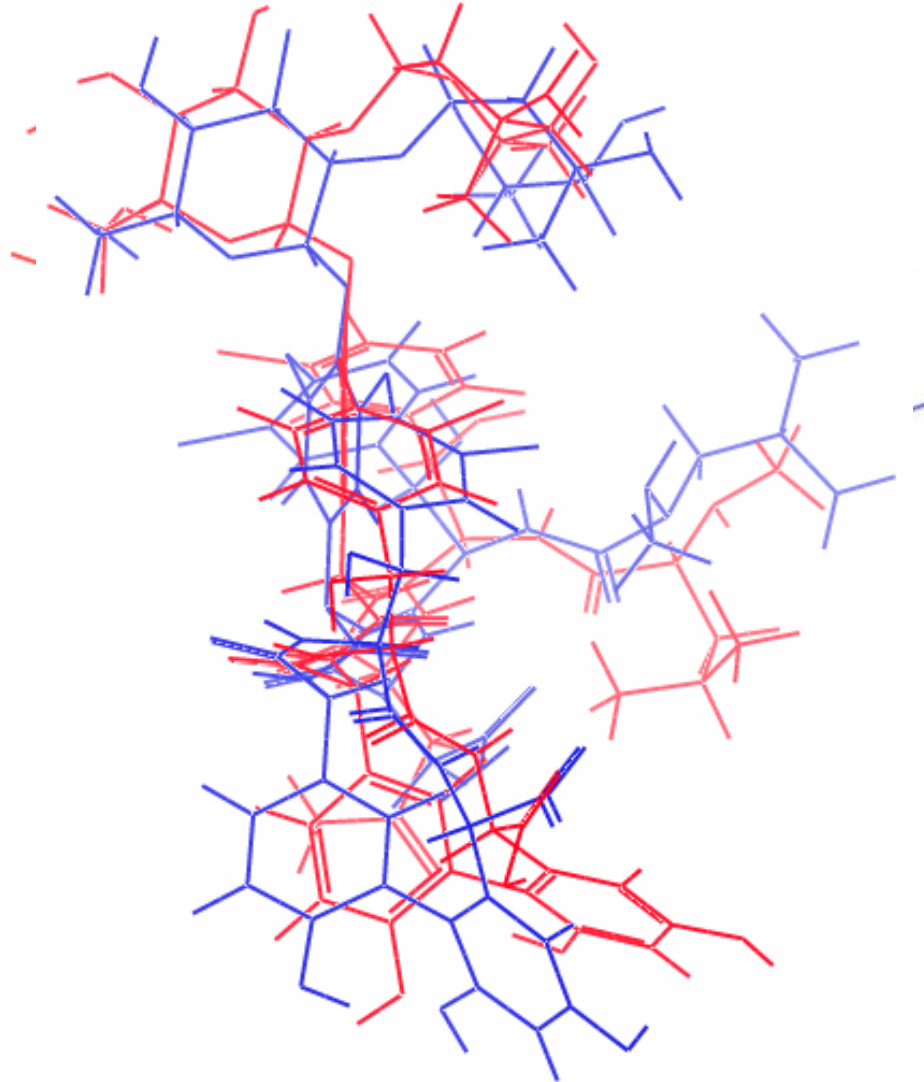
— Expérience IRMPD

— Simulation QM/SE  
du conformère PDB



**Structure native  
préservée en  
phase gazeuse**

# Ajustement induit mesuré en phase gazeuse

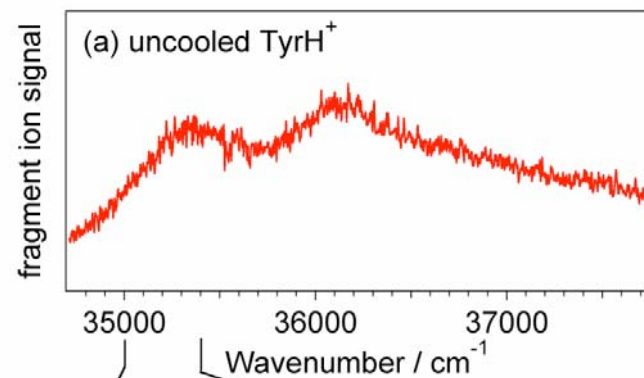


# Conclusions

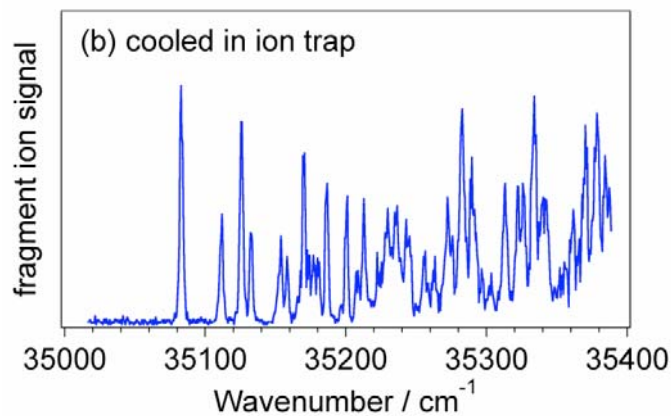
- Approche et résultats très différents selon l'état de charge des ions
- Site de complexation non-spécifique en mode positif
- Structure native conservée en mode négatif
- Efficacité des techniques expérimentales complémentaires utilisées
- Test positif de la méthode QM/SE

# Perspectives : refroidissement des ions

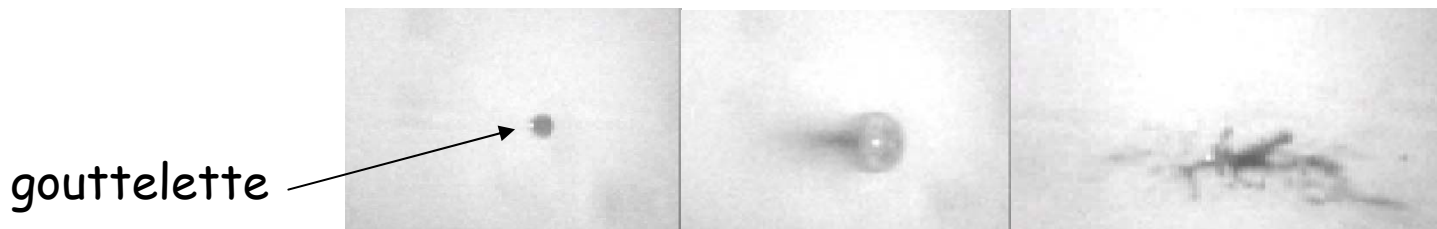
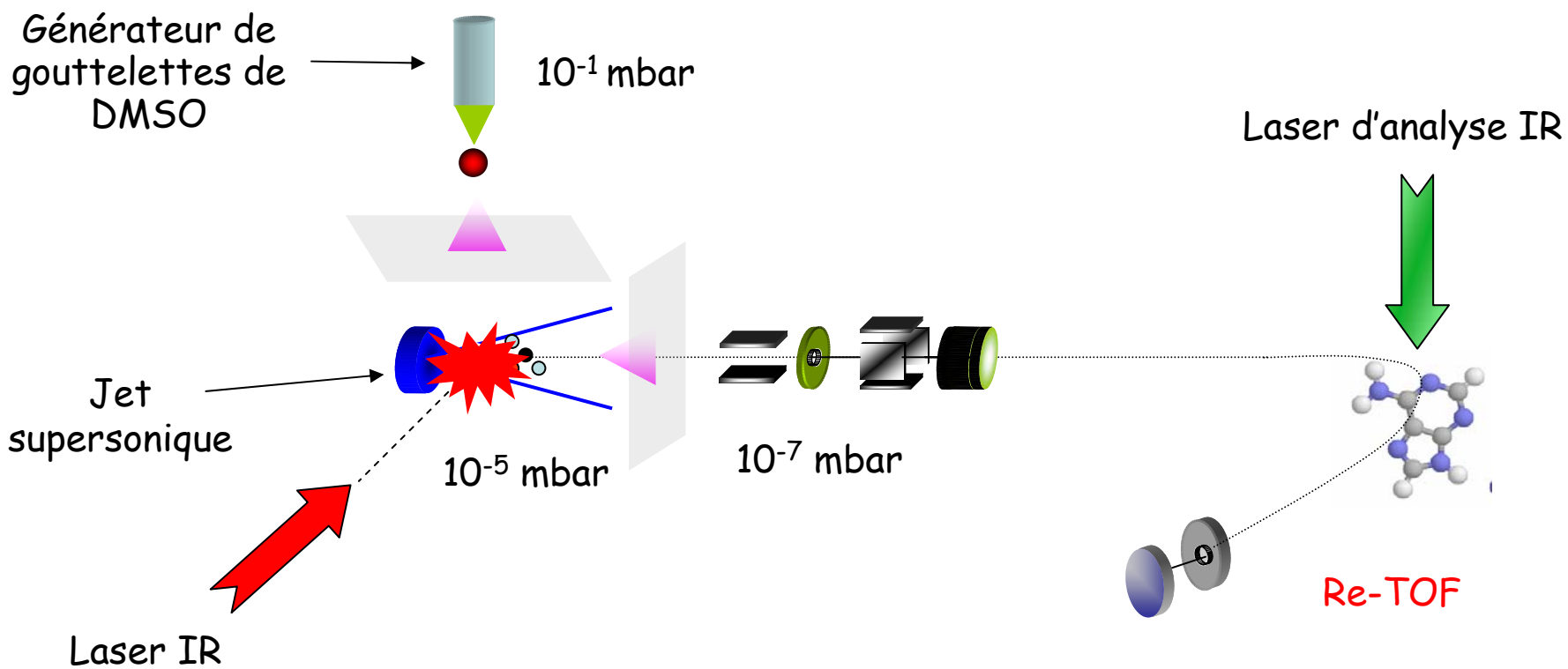
Température ambiante  
(300 K)



Refroidi avec  
He liquide (10 K)



# Nouveau montage expérimental

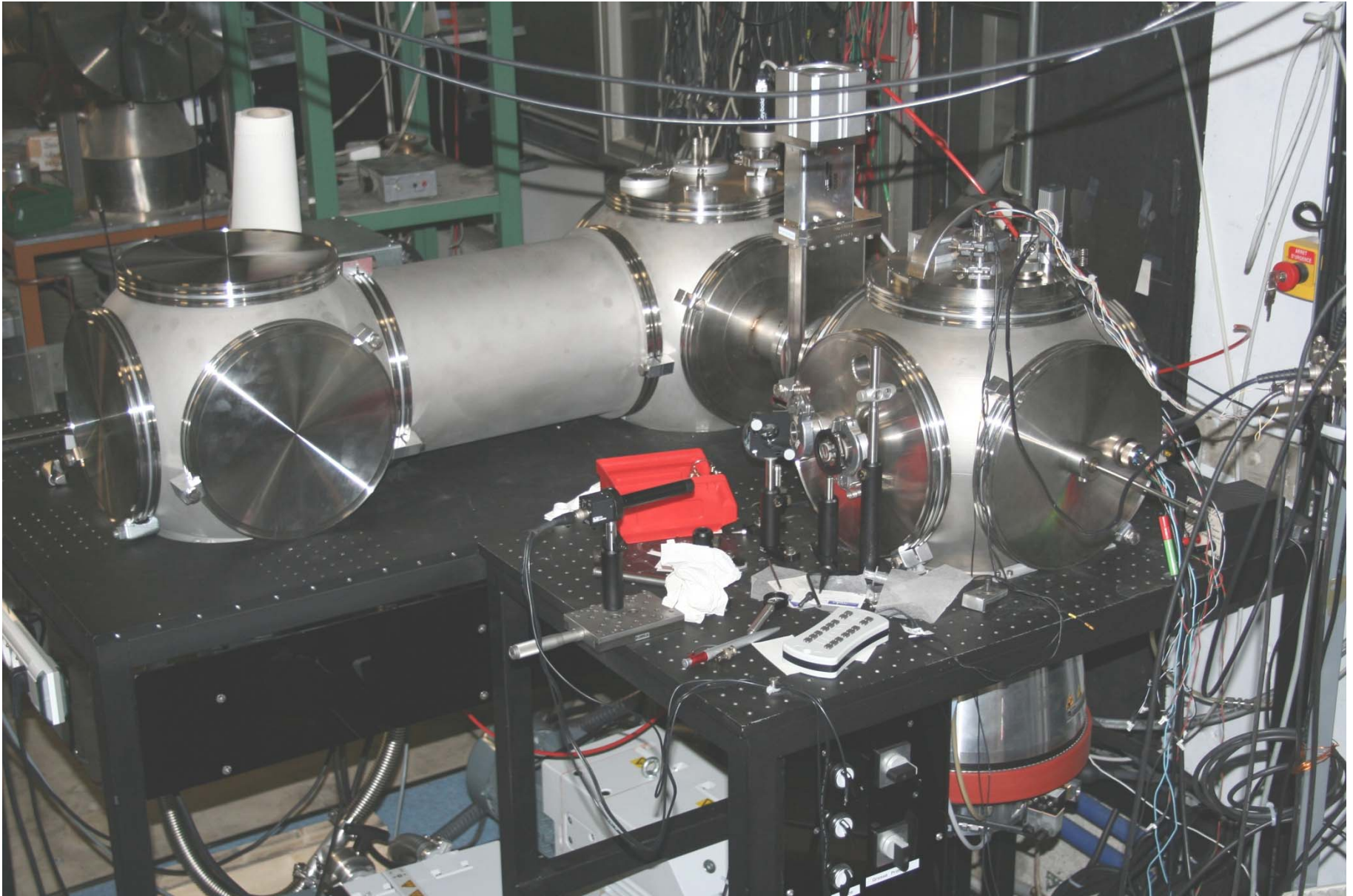


→ temps



# Avantages par rapport à l'électrospray

- Désorption laser sous vide
- Couplage avec un jet supersonique
- Spectroscopie IR de meilleure résolution
- Étude d'ions et de neutres possible
- Meilleure préservation de la structure native



# Remerciements



## EQUIPE AMIBES



Mécanique



Électronique



Optique



Informatique



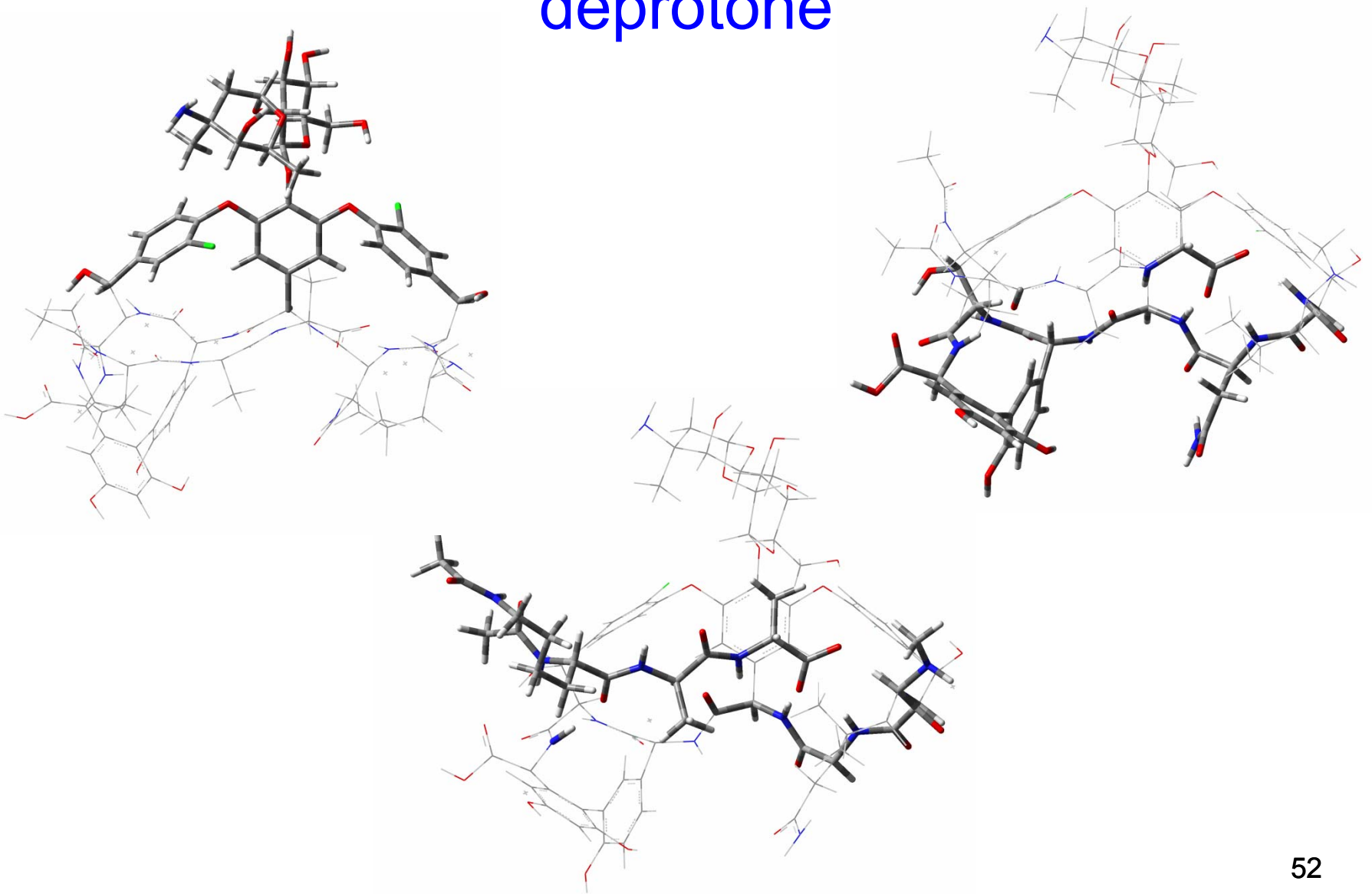
Administration

Expériences avec le laser CLIO : J. LEMAIRE et P. MAITRE (Université Paris Sud)

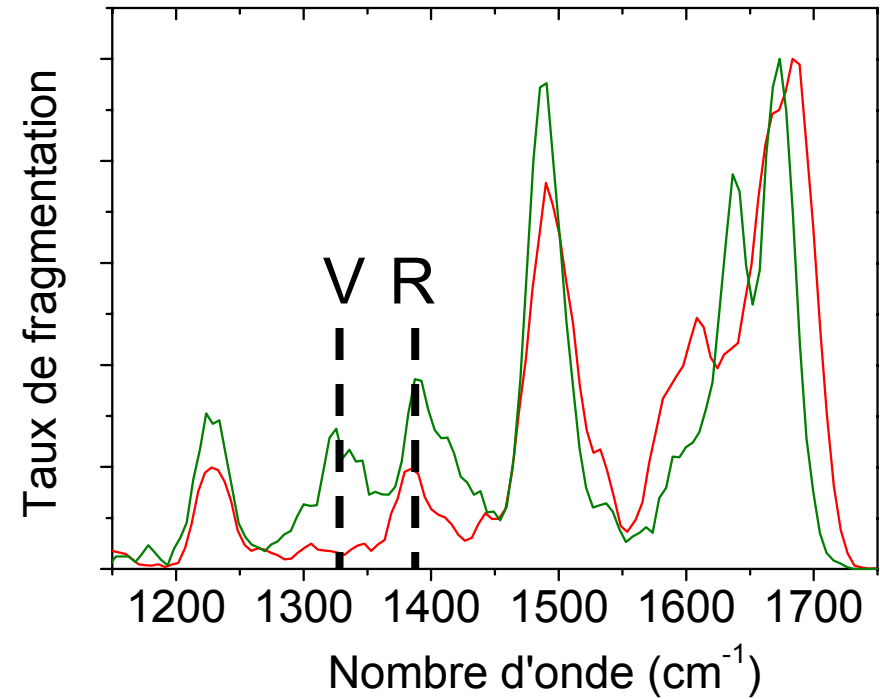
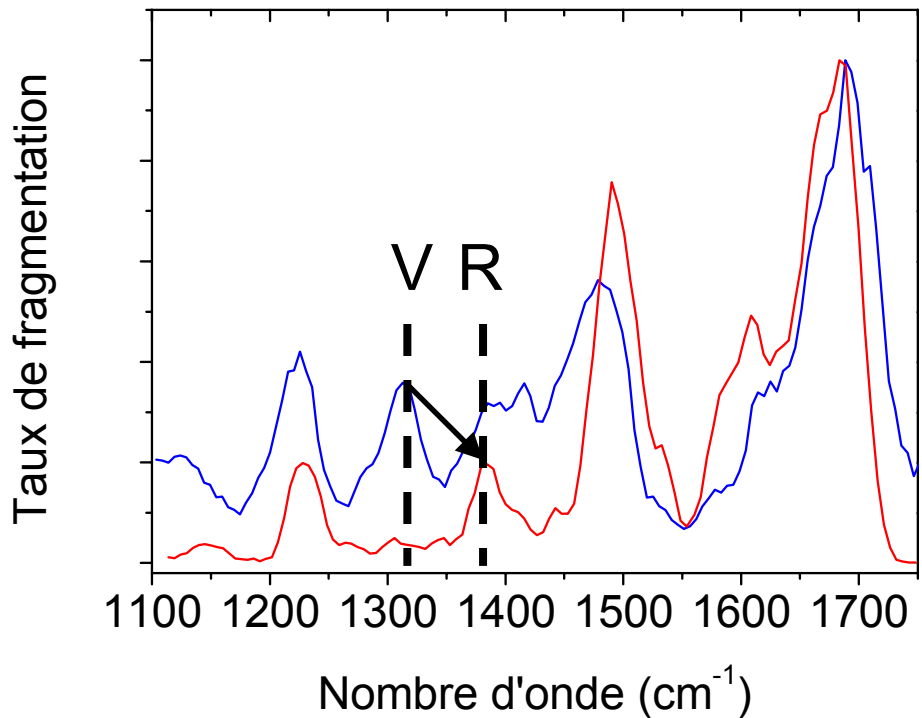
Collaboration GDR : R. BALLIVIAN, F. CALVO, F. CHIROT et P. DUGOURD  
(Université Lyon 1)

*Et merci de votre attention!*

# Simulation QM/SE pour le complexe déprotoné



# Le complexe doublement déprotoné

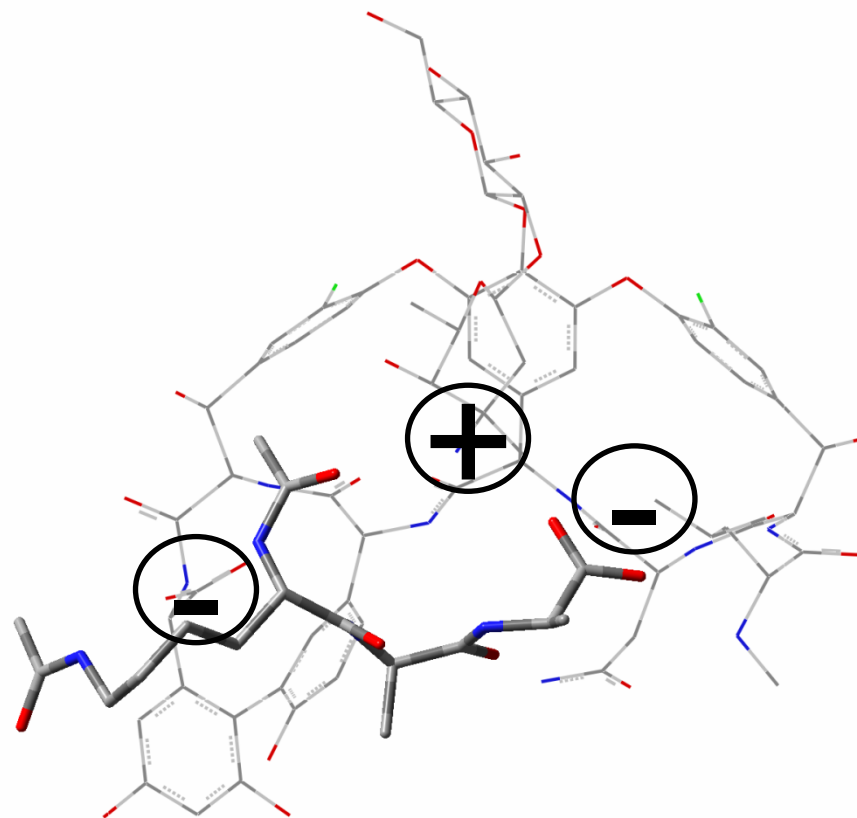
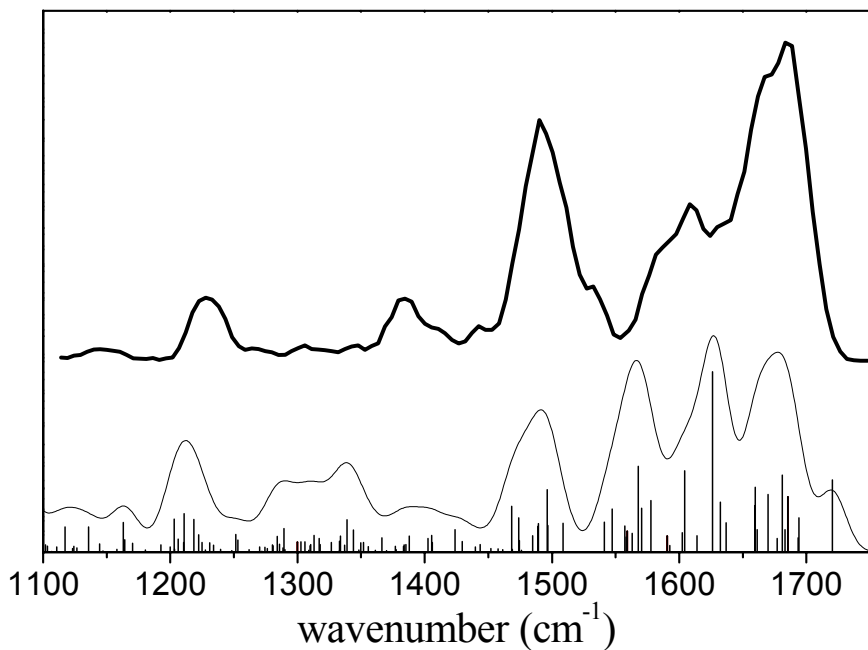


—  $[\text{V} - \text{H}]^-$

—  $[\text{V} + \text{R} - \text{H}]^-$

—  $[\text{V} + \text{R} - 2\text{H}]^{2-}$

# Conformation zwitterionique de la vancomycine dans le complexe déprotoné



# Récepteur déprotoné

Simulations au niveau  
de calcul  
B3LYP/aug-cc-pVDZ

