



**HAL**  
open science

# Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de protéines d'intérêt thérapeutique et de complexes multiprotéiques

Thomas Botzanowski

## ► To cite this version:

Thomas Botzanowski. Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de protéines d'intérêt thérapeutique et de complexes multiprotéiques. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT: 2019STRAF010 . tel-03270831

**HAL Id: tel-03270831**

**<https://theses.hal.science/tel-03270831v1>**

Submitted on 25 Jun 2021

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**UMR 7178**

**THÈSE** présentée par :

**Thomas BOTZANOWSKI**

soutenue le : 12 juin 2019

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Nouvelles méthodologies en spectrométrie  
de masse native et mobilité ionique pour la  
caractérisation structurale de protéines  
d'intérêt thérapeutique et de complexes  
multiprotéiques.**

**THÈSE** dirigée par :

**Dr. CIANFERANI Sarah**

Directrice de Recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. ROGNIAUX Hélène**

Chargée de Recherche, Université de Nantes

**Pr. VAN DER REST Guillaume**

Professeur, Université Paris-Sud

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Dr. LEIZE-WAGNER Emmanuelle**

Directrice de Recherche, Université de Strasbourg

---

**MEMBRE INVITÉ :**

**Dr. NONY Emmanuel**

Chef du Département Science des Protéines, Laboratoires Servier

**À mes parents,**

**À Mone et Rob',**

**À toute ma famille,**



## Remerciements

En premier lieu, je souhaite exprimer ma gratitude au Dr. Emmanuelle LEIZE-WAGNER pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie aussi vivement les rapporteurs et membres du jury, le Dr. Hélène ROGNIAUX, le Pr. Guillaume VAN DER REST et le Dr. Emmanuel NONY pour avoir évalué ce travail.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique rattaché à l'UMR 7178 sur le campus de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien à Strasbourg sous la direction du Dr. Sarah CIANFERANI. Je la remercie pour m'avoir donné l'opportunité de participer à mon échelle à différents projets de recherche, d'avoir pu participer à des congrès nationaux et internationaux et pour son encadrement pendant presque quatre ans.

J'adresse mes remerciements sincères aux Drs. Jean Boutin, Gilles Ferry et Mathias Antoine pour le suivi scientifique de cette thèse.

Je remercie chaleureusement Lucie Hartmann et le Dr. Renaud Wagner pour leurs aides précieuses et les échanges bénéfiques que nous avons eu concernant la caractérisation de vos terrifiantes protéines membranaires.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des collaborateurs dont les noms sont dispensés au fil du manuscrit.

Je tiens évidemment à remercier chaleureusement toutes les personnes qui font parties ou ont fait partie du laboratoire pour les moments partagés.

J'adresse un remerciement particulier à Guillaume, Johann, Maxime, Stéphane, Anthony, Oscar, Steve et Evolène pour leur aide et leur soutien. Je remercie aussi vivement Jean-Marc pour sa passion et sa grande disponibilité. Un jour vous verrez la photo d'un magnifique *pike* et alors vous saurez !

Merci au Dr. Yannis François pour les bons moments partagés en TP et pour tes conseils. Cette expérience a vraiment été enrichissante pour moi.

Merci à Hugo pour ton soutien ! Je t'enverrai des photos des terres sauvages mais pas des monuments !

Un grand merci à Charlotte pour ton soutien, ta présence et toutes les attentions de ces derniers mois, tu as toujours cru en moi. Il nous reste tant de choses à découvrir et à partager !

Je remercie mes parents et ma fratrie pour leur soutien inestimable depuis maintenant presque trente années, des centaines de pages ne seraient pas suffisantes pour vous remercier correctement, un immense MERCI. Le retour me tarde !

Je ne peux terminer ces remerciements sans penser à mes grands-parents Monique et Robert, vous avez été et serez toujours une source d'inspiration pour moi.

## Liste des principales abréviations

|  |  |
|--|--|
| <b>AA2A</b> : récepteur à l'adénosine A2A                                  | <b>ME</b> : Microscopie Électronique   |
| <b>Aβ42</b> : peptide Amyloïde β 1-42                                      | <b>MS</b> : Spectrométrie de Masse   |
| <b>ABHD</b> : <i>Alpha Beta Hydrolase Domain</i>                           | <b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b> : bicarbonate d'ammonium                                  |
| <b>AcONH<sub>4</sub></b> : Acétate d'ammonium                              | <b>PA</b> : <i>Projection Approximation</i>  |
| <b>ADC</b> : <i>Antibody Drug Conjugate</i>                                | <b>Pi</b> : Pression en source   |
| <b>Apo</b> : protéine libre (sans interaction avec une petite molécule)    | <b>PM</b> : Protéine Membranaire   |
| <b>ATD</b> : <i>Arrival Time Distribution</i>                              | <b>PTM</b> : <i>Post-Translational Modification</i>  |
| <b>CCS</b> : <i>Collision Cross Section</i>                                | <b>Q</b> : Quadripôle  |
| <b>CE</b> : Énergie de collision en cellule HCD sur l'EMR                  | <b>Q<sub>He</sub></b> : débit d'hélium appliqué dans la cellule IM                             |
| <b>CID</b> : Énergie de collision en source sur l'EMR                      | <b>Q<sub>N2</sub></b> : débit d'azote appliqué dans la cellule IM                              |
| <b>CIU</b> : <i>Collision Induced Unfolding</i>                            | <b>RCPG</b> : Récepteur Couplé aux Protéines G   |
| <b>CMC</b> : Concentration Micellaire Critique                             | <b>RMN</b> : Résonance Magnétique Nucléaire  |
| <b>DAR<sub>av</sub></b> : Nombre moyen de drogues fixées par anticorps     | <b>Rs</b> : Résolution   |
| <b>DDM</b> : DoDécylMaltoside  | <b>SEC</b> : Chromatographie d'Exclusion Stérique  |
| <b>DMSO</b> : DiMéthylSulfOxyde  | <b>td</b> : temps de dérive / temps de passage d'un ion dans la cellule IM                     |
| <b>Dn</b> : Anticorps conjugué à n drogues                                 | <b>TM</b> : <i>Trajectory Method</i>   |
| <b>DRX</b> : Diffraction des Rayons X                                      | <b>TOF</b> : <i>Time-Of-Flight</i>   |
| <b>DTIMS</b> : <i>Drift Tube Ion Mobility Spectrometry</i>                 | <b>Transfer CV</b> : Tension appliquée à l'entrée de la cellule de transfert du Synapt G2 HDMS |
| <b>ESI</b> : Ionisation par ElectroSpray                                   | <b>Trap CV</b> : Tension appliquée à l'entrée de la cellule de collision du Synapt G2 HDMS     |
| <b>HCD</b> : <i>High energy Collision Dissociation</i>                     | <b>Trap gas</b> : débit d'argon appliqué dans la cellule de collision                          |
| <b>Holo</b> : Protéine interagissant avec une petite molécule              | <b>TWIMS</b> : Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry                                       |
| <b>HDX</b> : échange hydrogène-deutérium                                   | <b>Vc</b> : Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage                                    |
| <b>IM</b> : Mobilité Ionique   | <b>ω<sub>1/2</sub></b> : largeur d'un pic à mi-hauteur   |
| <b>IM-MS</b> : couplage de la mobilité ionique à la spectrométrie de masse | <b>WH</b> : <i>Wave Height</i>   |
| <b>IgG</b> : Immunoglobine de type G                                       | <b>WT</b> : <i>Wild Type</i>   |
| <b>Kd</b> : constante de dissociation                                      | <b>VH</b> : <i>Wave Velocity</i>   |
| <b>LC</b> : <i>Liquid Chromatography</i>                                   | <b>XL</b> : pontage chimique   |
| <b>m/z</b> : rapport masse sur charge                                      |  |
| <b>mAb</b> : <i>monoclonal Antibody</i>                                    |  |

# PLAN GÉNÉRAL

|   |            |
|---|------------|
| <b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>   | <b>6</b>   |
| CHAPITRE 1 : LES INTERACTIONS NON-COVALENTES ET LEUR ÉTUDE EN BIOLOGIE STRUCTURALE.....   | 8          |
| CHAPITRE 2 : LES TECHNIQUES DE MS STRUCTURALE POUR LA CARACTÉRISATION DE COMPLEXES NON-COVALENTS..  | 16         |
| CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....   | 36         |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....  | 37         |
| <b>PARTIE 2 : DÉVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES DE MS STRUCTURALE POUR LA CARACTERISATION DE PROTÉINES MEMBRANAIRES EN MILIEU DÉTERGENT.....</b>   | <b>43</b>  |
| CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART DE LA CARACTÉRISATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES PAR MS STRUCTURALE.....   | 46         |
| CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉINE MEMBRANAIRE À UN DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE PAR MS NATIVE ET HDX-MS : CAS DE LA LIPASE ABHD.....  | 59         |
| CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉINE MEMBRANAIRE À SEPT DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES PAR MS NATIVE: CAS DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE.....  | 81         |
| CHAPITRE 4 : BÉNÉFICES DE LA SEC-MS/IM-MS NATIVE POUR LA CARACTÉRISATION DU PEPTIDE AMYLOÏDE AB 42 EN MILIEU DÉTERGENT.....   | 90         |
| CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....   | 105        |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....  | 107        |
| <b>PARTIE 3 : ÉVALUATION DE L'APPORT DES EXPÉRIENCES DE MOBILITÉ IONIQUE DE TYPE « COLLISION INDUCED UNFOLDING » POUR LA CARACTÉRISATION CONFORMATIONNELLE D'ANTICORPS MONOCLONAUX.....</b> | <b>113</b> |
| INTRODUCTION : ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIFS.....  | 116        |
| CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES EN CIU.....   | 122        |
| CHAPITRE 2: ÉTUDE DU VHH ANTI-HER2 PAR LC-MS, IM-MS NATIVE ET CIU.....  | 135        |
| CHAPITRE 3 : APPLICATION DE LA CIU À LA CARACTÉRISATION D'UN ANTICORPS IMMUNOCONJUGUÉ SITE SPÉCIFIQUE.....  | 142        |
| CHAPITRE 4 : APPLICATION DE LA CIU À UN ANTICORPS MONOCLONAL THÉRAPEUTIQUE HYBRIDE : ECULIZUMAB..   | 149        |
| CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....   | 159        |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....  | 160        |
| <b>PARTIE 4 : COMBINAISON D'APPROCHES DE MS NATIVE À D'AUTRES TECHNIQUES BIOPHYSIQUES POUR LA CARACTÉRISATION DE COMPLEXES MULTIPROTÉIQUES.....</b>   | <b>164</b> |
| CHAPITRE 1 : LA PROTÉINE MNT, UNE PROTÉINE PH SENSEUR ?.....  | 167        |
| CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION PAR MS NATIVE ET IM—MS NATIVE D'UN COMPLEXE DE HAUTS POIDS MOLÉCULAIRE : LE COMPLEXE NIUAF.....  | 177        |
| CHAPITRE 3 : APPORT DU COUPLAGE SEC MS/IM-MS NATIVE POUR LA CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION GACS/RETS.....   | 184        |
| CONCLUSION DE CETTE PARTIE.....   | 198        |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....  | 199        |
| <b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>   | <b>203</b> |
| <b>PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</b>  | <b>207</b> |
| <b>ANNEXES.....</b>   | <b>215</b> |

# PLAN DÉTAILLÉ

|  |          |
|--|----------|
| INTRODUCTION GÉNÉRALE .....  | 1        |
| <b>PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>  | <b>6</b> |
| CHAPITRE 1 : LES INTERACTIONS NON-COVALENTES ET LEUR ÉTUDE EN BIOLOGIE STRUCTURALE .....               | 8        |
| 1. Généralités sur les interactions non-covalentes.....  | 8        |
| 1.1. Les interactions de Van der Waals.....  | 9        |
| 1.2. La liaison hydrogène.....   | 9        |
| 1.3. L'interaction ionique.....  | 10       |
| 1.4. L'effet hydrophobe.....   | 10       |
| 1.5. L'équilibre des forces d'attraction et de répulsion.....  | 10       |
| 2. Les techniques biophysiques au service de la caractérisation d'édifices biologiques.....            | 10       |
| 2.1. Les techniques à basse résolution.....  | 11       |
| 2.1.1. La chromatographie d'exclusion stérique.....  | 11       |
| 2.1.2. La diffusion des rayons X aux petits angles.....  | 11       |
| 2.1.3. La résonance plasmonique de surface.....  | 12       |
| 2.1.4. La titration calorimétrique isotherme.....  | 13       |
| 2.1.5. Les techniques de fluorescence.....   | 13       |
| 2.2. Les techniques à haute résolution.....  | 14       |
| 2.2.1. La cristallographie aux rayons X.....   | 14       |
| 2.2.2. La résonance magnétique nucléaire.....  | 14       |
| 2.2.3. La cryo-microscopie électronique.....   | 15       |
| 3. Conclusions.....  | 15       |
| CHAPITRE 2 : LES TECHNIQUES DE MS STRUCTURALE POUR LA CARACTÉRISATION DE COMPLEXES NON-COVALENTS ..... | 16       |
| 1. La spectrométrie de masse native (MS native).....   | 17       |
| 1.1. Principe et historique.....   | 17       |
| 1.2. Développements.....   | 17       |
| 1.3. Paramètres instrumentaux.....   | 19       |
| 2. La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IM-MS).....                                | 22       |
| 2.1. Historique et principe.....   | 22       |
| 2.2. Les sections efficaces de collision et l'étalonnage.....  | 23       |
| 2.2.1. En DTIMS.....   | 24       |
| 2.2.2. En TWIMS.....   | 24       |
| 2.2.3. Algorithmes utilisés pour le calcul de CCS théoriques.....                                      | 26       |
| 2.3. Séparation et résolution en IM.....   | 27       |
| 2.3.1. La séparation.....  | 27       |
| 2.3.2. La résolution.....  | 28       |
| 2.4. Les applications en biologie structurale.....   | 29       |
| 2.5. Les expériences CIU.....  | 29       |
| 2.6. Technologie utilisée.....   | 30       |
| 3. L'échange hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS).....                      | 31       |
| 4. Les autres techniques de MS structurale.....  | 34       |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 4.1. Le pontage chimique .....     | 34 |
| 4.2. La protéolyse ménagée.....    | 34 |
| 4.3. Le marquage radicalaire ..... | 35 |
| CONCLUSION DE CETTE PARTIE .....   | 36 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....   | 37 |

**PARTIE 2 : DÉVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES DE MS STRUCTURALE POUR LA CARACTERISATION DE PROTÉINES MEMBRANAIRES EN MILIEU DÉTERGENT. .... 43**

|   |    |
|---|----|
| CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART DE LA CARACTÉRISATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES PAR MS STRUCTURALE.....   | 46 |
| 1. Les protéines membranaires (PMs) : description et intérêt thérapeutique.....   | 46 |
| 1.1. Généralités sur les protéines membranaires.....  | 46 |
| 1.2. Cas des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).....  | 47 |
| 2. Les stratégies de solubilisation et leur compatibilité avec les techniques de MS structurale.....  | 48 |
| 2.1. L'utilisation de détergents pour la caractérisation de PMs.....  | 48 |
| 2.1.1. Les détergents.....  | 48 |
| 2.1.2. Les détergents non-ioniques pour la caractérisation de PMs par MS native et IM-MS.....   | 49 |
| 2.1.3. Les détergents non-ioniques pour la caractérisation de PMs par HDX-MS.....   | 52 |
| 2.1.4. Les amphipols et la MS structurale.....  | 54 |
| 2.1.5. Les nanodisques et la MS structurale.....  | 55 |
| 3. Conclusions.....   | 58 |
| 4. Objectifs des travaux.....   | 58 |
| CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉINE MEMBRANAIRE À UN DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE PAR MS NATIVE ET HDX-MS : CAS DE LA LIPASE ABHD.....    | 59 |
| 1. Contexte de l'étude.....   | 59 |
| 2. Objectifs de l'étude.....  | 61 |
| 3. Résultats.....   | 61 |
| 3.1. Mise au point du protocole de caractérisation par MS native.....   | 61 |
| 3.1.1. Optimisation des conditions de préparation de l'échantillon.....   | 61 |
| 3.1.2. Importance de la pureté du détergent pour l'analyse en MS native.....  | 63 |
| 3.1.3. Optimisation des conditions MS.....  | 64 |
| 3.1.4. Comparaison de trois lots de purification par MS native.....   | 64 |
| 3.1.5. Caractérisation de la protéine ABHD par MS dénaturante.....  | 66 |
| 3.1.6. Apport de la mobilité ionique pour simplifier les spectres en milieu détergent.....  | 67 |
| 3.1.7. Analyse d'ABHD sur différents spectromètres de masse.....  | 68 |
| 3.1.8. Conclusions.....   | 69 |
| 3.2. Criblage avec les ligands par MS native et MS dénaturante.....   | 69 |
| 3.3. Étude structurale par HDX-MS d'ABHD.....   | 73 |
| 3.3.1. Influence du débit de trapping sur la couverture de séquence d'ABHD.....   | 73 |
| 3.3.2. Comparaison des profils de deutération.....  | 74 |
| 4. Conclusions.....   | 79 |
| CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉINE MEMBRANAIRE À SEPT DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES PAR MS NATIVE: CAS DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE ..... | 81 |
| 1. Contexte de l'étude.....   | 81 |
| 2. Objectifs de l'étude.....  | 82 |

|   |   |            |
|---|---|------------|
| 3.  | Résultats .....   | 83         |
| 3.1.  | Analyse du récepteur AA2A WT par MS native et de son ligand ZM241385. ....                              | 83         |
| 3.2.  | Analyse du construit AA2A Rant21 par MS native .....  | 85         |
| 3.3.  | Analyse du récepteur AA2A WT par HDX-MS. ....   | 87         |
| 4.  | Conclusions.....  | 89         |
| <b>CHAPITRE 4 : BÉNÉFICES DE LA SEC-MS/IM-MS NATIVE POUR LA CARACTÉRISATION DU PEPTIDE AMYLOÏDE AB 42 EN MILIEU DÉTERGENT.....</b>  |   | <b>90</b>  |
| 1.  | Contexte de l'étude. ....   | 90         |
| 2.  | Objectifs de l'étude. ....  | 92         |
| 3.  | Résultats. ....   | 92         |
| 3.1.  | Caractérisation par MS native en infusion directe.....  | 92         |
| 3.2.  | SEC-MS native. ....   | 96         |
| 3.3.  | SEC-IM-MS native .....  | 97         |
| 3.4.  | Transmission de l'octamère et dissociation du tétramère en phase gazeuse. ....                          | 100        |
| 3.5.  | Influence de la concentration en peptide A $\beta$ 42 sur l'équilibre octamère-tétramère. ....          | 102        |
| 4.  | Conclusions.....  | 103        |
| 5.  | Valorisation.....   | 104        |
| <b>CONCLUSION DE CETTE PARTIE .....</b>   |   | <b>105</b> |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   |   | <b>107</b> |
| <br>  |   |            |
| <b>PARTIE 3 : ÉVALUATION DE L'APPORT DES EXPÉRIENCES DE MOBILITÉ IONIQUE DE TYPE « COLLISION INDUCED UNFOLDING » POUR LA CARACTÉRISATION CONFORMATIONNELLE D'ANTICORPS MONOCLONAUX.....</b> |   | <b>113</b> |
| <b>INTRODUCTION : ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIFS.....</b>   |   | <b>116</b> |
| 1.  | Les anticorps monoclonaux. ....   | 116        |
| 2.  | Description structurale des anticorps monoclonaux. ....   | 117        |
| 3.  | Les anticorps monoclonaux conjugués.....  | 118        |
| 4.  | La spectrométrie de masse comme outil privilégié de caractérisation des mAbs et produits associés. .... | 119        |
| 5.  | Objectifs généraux des travaux. ....  | 121        |
| <b>CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES EN CIU.....</b>  |   | <b>122</b> |
| 1.  | Optimisations instrumentales. ....  | 122        |
| 1.1.  | Choix de l'état de charge.....  | 122        |
| 1.2.  | Influence de la sélection de l'ion dans le quadripôle.....  | 123        |
| 1.3.  | Influence de l'amplitude des pas de la tension trap CV sur la carte CIU.....                            | 124        |
| 1.4.  | Influence de la tension en source sur le déploiement protéique. ....                                    | 125        |
| 2.  | Évaluation de l'approche CIU. ....  | 126        |
| 2.1.  | Répétabilité. ....  | 127        |
| 2.2.  | Reproductibilité .....  | 127        |
| 3.  | Traitement de données. ....   | 128        |
| 3.1.  | Les logiciels de mobilité ionique propriétaires. ....   | 128        |
| 3.2.  | Description des logiciels dédiés aux traitements des données CIU.....                                   | 129        |
| 4.  | Conclusions.....  | 133        |
| 5.  | Valorisation.....   | 133        |
| <b>CHAPITRE 2: ÉTUDE DU VHH ANTI-HER2 PAR LC-MS, IM-MS NATIVE ET CIU.....</b>   |   | <b>135</b> |
| 1.  | Contexte de l'étude. ....   | 135        |

|  |   |     |
|--|---|-----|
| 2.   | Objectifs de l'étude. ....  | 136 |
| 3.   | Résumé des résultats.....   | 136 |
| 4.   | Conclusions.....  | 141 |
| 5.   | Valorisation.....   | 141 |
| <b>CHAPITRE 3 : APPLICATION DE LA CIU À LA CARACTÉRISATION D'UN ANTICORPS IMMUNOCONJUGUÉ SITE SPÉCIFIQUE... 142</b>  |   |     |
| 1.   | Contexte de l'étude. ....   | 142 |
| 2.   | Objectifs de l'étude. ....  | 142 |
| 3.   | Résumé des résultats.....   | 143 |
| 3.1.   | Caractérisation d'un ADC site spécifique et son mAb parent par MS native. ....  | 143 |
| 3.2.   | Capacité de caractérisation et de quantification des espèces Dn associées à un ADC site spécifique par native IM-MS. .... | 144 |
| 3.3.   | Apport de la CIU pour la caractérisation conformationnelle d'un ADC site spécifique et de son mAb parent.....             | 146 |
| 4.   | Conclusions.....  | 147 |
| 5.   | Valorisation.....   | 147 |
| <b>CHAPITRE 4 : APPLICATION DE LA CIU À UN ANTICORPS MONOCLONAL THÉRAPEUTIQUE HYBRIDE : ECULIZUMAB. .... 149</b>   |   |     |
| 1.   | Contexte de l'étude. ....   | 149 |
| 2.   | Objectifs de l'étude. ....  | 150 |
| 3.   | Résumé des résultats.....   | 150 |
| 3.1.   | Évaluation de l'approche CIU à l'échelle intacte pour la différenciation de l'isotype d'anticorps.....                    | 150 |
| 3.2.   | Évaluation de l'approche CIU à l'échelle middle pour la différenciation de l'isotype d'anticorps.....                     | 152 |
| 3.3.   | Application de la méthodologie à un anticorps hybride : l'eculizumab. ....  | 156 |
| 4.   | Conclusions.....  | 158 |
| 5.   | Valorisation.....   | 158 |
| <b>CONCLUSION DE CETTE PARTIE ..... 159</b>  |   |     |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 160</b>  |   |     |
| <br><b>PARTIE 4 : COMBINAISON D'APPROCHES DE MS NATIVE À D'AUTRES TECHNIQUES BIOPHYSIQUES POUR LA CARACTÉRISATION DE COMPLEXES MULTIPROTÉIQUES. .... 164</b> |   |     |
| <b>CHAPITRE 1 : LA PROTÉINE MNT, UNE PROTÉINE PH SENSEUR ? ..... 167</b>   |   |     |
| 1.   | Contexte de l'étude. ....   | 167 |
| 2.   | Objectifs de l'étude et données préliminaires.....  | 168 |
| 3.   | Résultats. ....   | 169 |
| 3.1.   | Caractérisation de mNT par MS dénaturante et MS native. ....  | 169 |
| 3.2.   | Étude de l'état d'oligomérisation et du centre Fe-S en fonction du pH. ....   | 170 |
| 3.3.   | Suivi du transfert potentiel du centre Fe-S de mNT l'apo ferredoxine par MS native. ....                                  | 172 |
| 3.4.   | Stabilisation du centre Fe-S par mutation de l'histidine 87. ....   | 173 |
| 4.   | Conclusions.....  | 176 |
| 5.   | Valorisation.....   | 176 |
| <b>CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION PAR MS NATIVE ET IM—MS NATIVE D'UN COMPLEXE DE HAUTS POIDS MOLÉCULAIRE : LE COMPLEXE NIUAF..... 177</b>                      |   |     |
| 1.   | Contexte de l'étude. ....   | 177 |
| 2.   | Objectifs de l'étude. ....  | 178 |
| 3.   | Résultats. ....   | 178 |
| 3.1.   | Caractérisation de l'état de la protéine ISCU.....  | 178 |

|  |   |            |
|--|---|------------|
| 3.2.   | Caractérisation du complexe NIUAF par MS dénaturante, MS native et IM-MS native. .... | 179        |
| 3.2.1.   | Caractérisation du complexe NIUAF par MS dénaturante. ....                            | 179        |
| 3.2.2.   | Caractérisation du complexe NIUAF par MS native. ....                                 | 180        |
| 3.2.3.   | Caractérisation du complexe (NIUAF) <sub>2</sub> par IM-MS native. ....               | 181        |
| 4.   | Conclusions. ....   | 183        |
| 5.   | Valorisation. ....  | 183        |
| <b>CHAPITRE 3 : APPORT DU COUPLAGE SEC MS/IM-MS NATIVE POUR LA CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION GACS/RETS.</b> |   | <b>184</b> |
| 1.   | Contexte de l'étude. ....   | 184        |
| 2.   | Objectifs de l'étude. ....  | 185        |
| 3.   | Résultats. ....   | 185        |
| 3.1.   | Caractérisation des protéines par MS dénaturante. ....                                | 185        |
| 3.2.   | Caractérisation des protéines par MS native et IM-MS native. ....                     | 186        |
| 3.2.1.   | Analyses en MS native (introduction directe). ....                                    | 186        |
| 3.2.2.   | Analyses en SEC-MS native. ....   | 188        |
| 3.2.3.   | Analyses en SEC-IM-MS native. ....  | 190        |
| 3.2.4.   | Criblage de construits GacS par SEC- MS native. ....                                  | 192        |
| 4.   | Conclusions. ....   | 196        |
| <b>CONCLUSION DE CETTE PARTIE.</b> ....  |   | <b>198</b> |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.</b> ....   |   | <b>199</b> |
| <b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....   |   | <b>203</b> |
| <b>PARTIE EXPÉRIMENTALE</b> .....  |   | <b>207</b> |
| <b>ANNEXES</b> .....   |   | <b>215</b> |
| <b>ANNEXE 1 : CARACTÉRISATION D'UN SYSTÈME PROTÉINE-LIGAND PAR MS NATIVE.</b> ....                             |   | <b>216</b> |
| <b>ANNEXE 2 : CARACTÉRISATION D'UN SYSTÈME PEPTIDE-LIGAND PAR MS NATIVE.</b> ....                              |   | <b>217</b> |
| <b>ANNEXE 3 : LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.</b> ....   |   | <b>218</b> |

# *INTRODUCTION GÉNÉRALE*

## *INTRODUCTION GÉNÉRALE*

Les mécanismes physiologiques du vivant sont basés sur une régulation vaste, fine et organisée des fonctions cellulaires qui est elle-même régie par la présence d'interactions non covalentes entre de nombreuses biomolécules de taille, complexité et nature diverses. Dans certains cas, la perturbation d'une ou plusieurs interactions peut engendrer un dérèglement de la fonction cellulaire et conduire à terme au développement d'une pathologie. Le décryptage de ces réseaux d'interactions devient alors indispensable afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces pathologies et ainsi de pouvoir rétablir l'équilibre. Dans cette optique, de nombreuses techniques biophysiques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction des rayons X (DRX) et la microscopie électronique (ME) permettent de caractériser les déterminants de l'interaction et l'organisation spatiale de ces édifices à l'échelle atomique et/ou macromoléculaire en fonction de la résolution propre à chaque technique. De ces informations structurales tridimensionnelles, il est également possible de déterminer la stœchiométrie, la spécificité, et dans certains cas, l'affinité et la dynamique entre des petites molécules (ligands endogènes/potentiels médicaments) et des protéines. Décrite pour la première fois en 1991<sup>1-2</sup>, la spectrométrie de masse (MS) native<sup>3</sup>, qui permet l'étude des complexes non-covalents d'origine biologique par MS, s'avère être une technique complémentaire aux techniques biophysiques classiques. En effet, elle permet d'accéder à certaines informations comme la stœchiométrie, l'affinité et la dynamique d'interaction entre les partenaires constituant le complexe. Elle permet grâce à l'ionisation électrospray (ESI), qui est un mode d'ionisation dit « doux », de conserver la conformation initiale dite « native » des complexes lors du passage de la solution vers la phase gazeuse. Cette technique est aujourd'hui largement appliquée pour la caractérisation de nombreux systèmes protéiques solubles et notamment dans le cadre de criblage protéines/ligands<sup>4</sup>, mais aussi pour la caractérisation des anticorps monoclonaux (mAbs) dans l'industrie pharmaceutique<sup>5</sup> ou encore de complexes multiprotéiques de hautes masses<sup>6</sup>. Depuis une dizaine d'années<sup>7</sup>, une nouvelle dimension de séparation en phase gazeuse a été couplée à certains spectromètres de masse utilisés pour la MS native : la mobilité ionique (IM-MS) qui permet une séparation des ions en fonction de leur charge et leur conformation. Les temps de dérive (td) des ions au sein de la cellule de mobilité ionique sont convertis en sections efficaces rotationnelles de collision<sup>8</sup> (*Collision Cross Section, CCS*) qui reflètent la structure tridimensionnelle de l'ion en phase gazeuse. Cette information de surface permet notamment de déterminer la conformation globale de complexes divers ou de suivre le changement conformationnel (compaction/extension) induit par la fixation d'une

petite molécule ou d'un autre partenaire protéique. La résolution des cellules d'IM actuellement commercialisées est limitée et ne permet pas toujours de détecter des changements conformationnels fins, notamment lorsque les changements n'impactent que peu la conformation globale de la protéine. Plus récemment, une nouvelle approche IM-MS nommée *Collision Induced Unfolding* (CIU, qui pourrait être traduit par « déploiement induit par collisions ») a été décrite<sup>9</sup>. Cette approche permet de différencier le comportement conformationnel des biomolécules en phase gazeuse après activation énergétique par collisions lorsque l'IM-MS classique ne le permet pas.

Outre la stœchiométrie d'interaction et la conformation globale d'un complexe, caractériser les zones d'interaction entre deux partenaires peut être primordial pour le développement de nouvelles molécules plus spécifiques ou pour la compréhension des interactions constitutives des complexes. Là encore, des approches de MS telles que l'échange hydrogène/deutérium suivie par MS (*Hydrogen Deuterium Exchange Mass-Spectrometry*, HDX-MS) ou les approches de pontage chimique peuvent être utilisées. La technique HDX-MS<sup>10</sup> permet d'observer à l'échelle peptidique des différences d'incorporation en deutérium au sein des différentes régions de la protéine d'intérêt seule ou en complexe<sup>11</sup>. L'ensemble des techniques de MS native, IM-MS, HDX-MS, pontage chimique a pour objectif de fournir des informations structurales sur les complexes/biomolécules étudiés à partir de données de MS : on parle de « MS structurale »<sup>12</sup>.

Les approches de MS structurale sont aujourd'hui largement appliquées à la caractérisation de complexes multiprotéiques solubles<sup>13</sup> mais présentent un certain nombre de limites pour l'analyse de protéines membranaires (PMs). Ces dernières représentent 2/3 des cibles thérapeutiques actuellement en développement et nécessitent la présence d'agents de solubilisation (détergents, micelles, liposomes, nanodisques) souvent non compatibles avec les techniques de MS mais également avec la plupart des techniques biophysiques de caractérisation (DRX, RMN et ME). À ceci s'ajoutent les difficultés expérimentales de production qui découlent de la nature chimique complexe des PMs, et la méconnaissance de la relation entre leur activité et leur environnement physiologique. L'utilisation de la MS native pour la caractérisation des PMs est relativement récente<sup>14</sup> et reste l'expertise de quelques rares équipes dans le monde. Quelques articles relatent l'étude par MS native de transporteurs ABC, tonneaux beta et de leurs interactions avec des (phospho)lipides<sup>15</sup>. Mais la caractérisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) n'est que peu référencée dans la littérature<sup>16</sup> et le criblage de molécules ciblant ces PMs dans l'industrie pharmaceutique reste un véritable défi.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse s'articulent autour de développements méthodologiques principalement en MS native et IM-MS, mais aussi en HDX-MS, soit pour la caractérisation de systèmes biologiques impliquant des protéines thérapeutiques (PMs ou mAbs), soit

des complexes multiprotéiques qui posent problème en biologie structurale. Mon travail de thèse s'articule ainsi autour de trois axes.

1. **Le développement de méthodes de MS native et HDX-MS pour l'analyse de protéines membranaires.** Mon travail a tout d'abord consisté à optimiser les conditions de préparation des échantillons et les conditions d'analyses MS afin de d'obtenir des spectres de masse de qualité suffisante pour la caractérisation de protéines membranaires en présence de détergent à l'aide de différents spectromètres de masse disponibles au laboratoire. Puis, ces développements ont été appliqués aux criblages de ligands covalents et non-covalents sur des PMs de complexités variables mais aussi pour la détermination de l'état oligomérique d'un peptide hydrophobe.

2. **Le développement d'approches de mobilité ionique de type CIU pour la caractérisation conformationnelle d'une famille de protéines thérapeutiques particulières, les mabs.** J'ai ainsi optimisé l'ensemble des étapes de l'expérience CIU, de l'acquisition des données à la génération des résultats et leur interprétation puis appliqué cette approche à différents formats d'anticorps.

3. **La combinaison d'approches de MS native et d'IM-MS à d'autres techniques biophysiques pour la caractérisation de complexes multiprotéiques.** Le développement de méthodes adaptées à la question de biologie structurale posée a permis d'apporter des informations nouvelles sur la composition et la conformation de plusieurs complexes protéiques solubles en combinant la MS native et l'IM-MS. Ces différents projets ont permis de montrer la complémentarité de ces deux techniques avec les techniques de biophysiques classiques.

## Références bibliographiques

1. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D., Detection of Noncovalent Receptor Ligand Complexes by Mass-Spectrometry. *J Am Chem Soc* **1991**, *113* (16), 6294-6296.
2. Katta, V.; Chait, B. T., Observation of the Heme Globin Complex in Native Myoglobin by Electrospray-Ionization Mass-Spectrometry. *J Am Chem Soc* **1991**, *113* (22), 8534-8535.
3. Heck, A. J.; Van Den Heuvel, R. H., Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2004**, *23* (5), 368-89.
4. Zhang, S.; Van Pelt, C. K.; Wilson, D. B., Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem* **2003**, *75* (13), 3010-8.
5. Terral, G.; Beck, A.; Cianferani, S., Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2016**, *1032*, 79-90.
6. Snijder, J.; Rose, R. J.; Veesler, D.; Johnson, J. E.; Heck, A. J., Studying 18 MDa virus assemblies with native mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52* (14), 4020-3.
7. Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D., Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry. *Anal Chem* **2008**, *80* (24), 9689-99.
8. Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T., Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Anal Chem* **2010**, *82* (22), 9557-65.
9. Eschweiler, J. D.; Rabuck-Gibbons, J. N.; Tian, Y.; Ruotolo, B. T., CIUSuite: A Quantitative Analysis Package for Collision Induced Unfolding Measurements of Gas-Phase Protein Ions. *Anal Chem* **2015**, *87* (22), 11516-22.
10. Zhang, Z.; Smith, D. L., Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci* **1993**, *2* (4), 522-31.
11. Terral, G.; Champion, T.; Debaene, F.; Colas, O.; Bourguet, M.; Wagner-Rousset, E.; Corvaia, N.; Beck, A.; Cianferani, S., Epitope characterization of anti-JAM-A antibodies using orthogonal mass spectrometry and surface plasmon resonance approaches. *MAbs* **2017**, *9* (8), 1317-1326.
12. Politis, A.; Stengel, F.; Hall, Z.; Hernandez, H.; Leitner, A.; Walzthoeni, T.; Robinson, C. V.; Aebersold, R., A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes. *Nat Methods* **2014**, *11* (4), 403-+.
13. Marcoux, J.; Cianferani, S., Towards integrative structural mass spectrometry: Benefits from hybrid approaches. *Methods* **2015**, *89*, 4-12.
14. Barrera, N. P.; Di Bartolo, N.; Booth, P. J.; Robinson, C. V., Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum. *Science* **2008**, *321* (5886), 243-6.
15. Calabrese, A. N.; Radford, S. E., Mass spectrometry-enabled structural biology of membrane proteins. *Methods* **2018**, *147*, 187-205.
16. Yen, H. Y.; Hopper, J. T. S.; Liko, I.; Allison, T. M.; Zhu, Y.; Wang, D.; Stegmann, M.; Mohammed, S.; Wu, B.; Robinson, C. V., Ligand binding to a G protein-coupled receptor captured in a mass spectrometer. *Sci Adv* **2017**, *3* (6), e1701016.

***PARTIE 1 : INTRODUCTION***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

# ***PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE***

Dans cette première partie, une description succincte des interactions non-covalentes et des techniques biophysiques utilisées pour la caractérisation structurale de complexes protéiques régis par ces interactions est proposée en chapitre 1. Le chapitre 2 est dédié à une description plus approfondie des techniques de MS structurale et des principes associés.

**Chapitre 1 : Les complexes non-covalents et leur caractérisation structurale par les techniques de biophysique.**

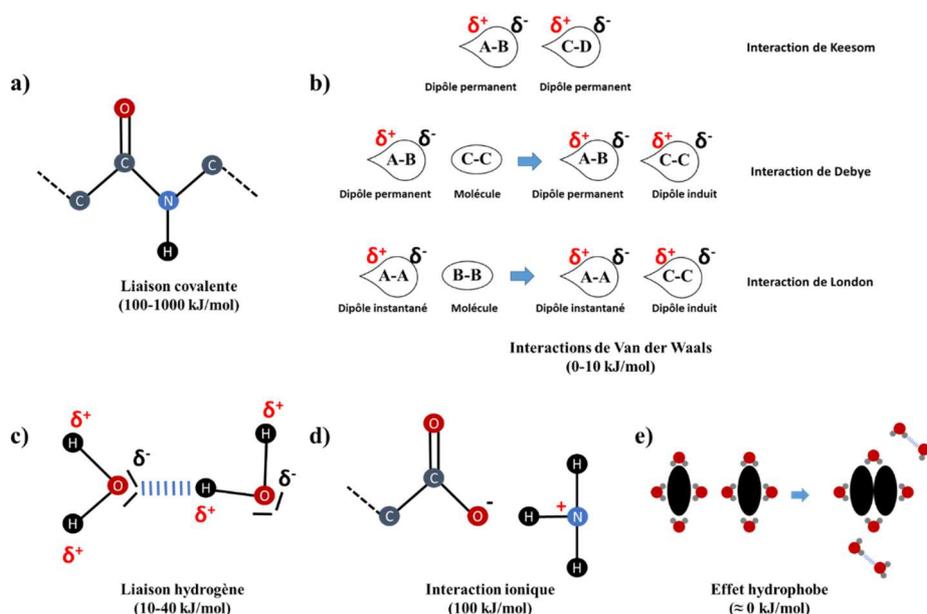
**Chapitre 2 : Les techniques de MS structurale pour la caractérisation de complexes non-covalents.**

# CHAPITRE 1 : LES INTERACTIONS NON-COVALENTES ET LEUR ÉTUDE EN BIOLOGIE STRUCTURALE

Ce chapitre est dédié à un rappel sur les interactions non-covalentes qui régissent la formation de complexes biologiques et leur étude par les techniques biophysiques de basse et haute résolution. Les principes des différentes techniques sont détaillés et les informations obtenues sont comparées.

## 1. Généralités sur les interactions non-covalentes.

L'étude des mécanismes cellulaires nécessite une compréhension fine et détaillée du rôle de chaque biomolécule (les protéines, les acides nucléiques, les lipides, etc.) et de son association à un partenaire à travers la formation d'un complexe<sup>1</sup>. Un complexe biologique est le résultat de la reconnaissance et de l'interaction d'au moins deux partenaires. D'une part, la reconnaissance ne peut avoir lieu que si les zones des partenaires présentent une complémentarité stérique (système clef-serrure) et d'autre part l'interaction ne peut être maintenue que si les forces d'attraction sont supérieures aux forces de répulsion<sup>2</sup>. Cette « interaction » entre deux partenaires est en réalité le fruit de plusieurs contributions locales d'origine diverses dont les énergies sont variables<sup>3</sup>. Ces interactions non-covalentes dites faibles (0-100 kJ/mol) en comparaison avec les liaisons covalentes (100-1000 kJ/mol) sont décrites ci-après (figure 1).



**Figure 1.** Représentation schématique des interactions covalentes et non-covalentes, adaptée de<sup>4</sup>. Les interactions non-covalentes peuvent être distinguées en deux classes : les interactions de type électrostatique (Van der Waals, hydrogène et ionique) et l'effet hydrophobe.

### 1.1. Les interactions de Van der Waals.

Les liaisons de Van der Waals sont les interactions non-covalentes les plus faibles (0-10 kJ/mol) en comparaison avec la liaison hydrogène et l'interaction ionique décrites ci-après. Trois types de contribution peuvent être distingués<sup>5</sup> (figure 1b) :

- Les interactions de Keesom : elles opèrent entre des molécules polaires à travers une interaction de type dipôle permanent-dipôle permanent. Le dipôle permanent de chaque molécule provient d'une asymétrie de son propre nuage électronique générée par la différence d'électronégativité  $\chi$  des deux atomes liés de manière covalente.
  
- Les interactions de Debye : ces interactions résultent de la polarisation du nuage électronique d'une molécule apolaire par une molécule polaire engendrant ainsi une interaction dite dipôle permanent-dipôle induit.
  
- Les interactions de London : elles opèrent entre des molécules apolaires. La répartition inégale de la densité électronique d'une molécule apolaire à un instant  $t$  engendre la formation d'un dipôle instantané qui provoque une déformation du nuage électronique de la seconde molécule apolaire voisine engendrant ainsi une interaction dite dipôle instantané-dipôle induit.

Ces interactions sont hautement dépendantes de la distance entre les dipôles. En effet, plus ces derniers sont proches plus l'énergie d'interaction est élevée.

$$E \propto 1/r^6$$

Relation de proportionnalité entre la distance  $r$  entre les dipôles et l'énergie des interactions de Van der Waals  $E$ .

### 1.2. La liaison hydrogène.

La liaison hydrogène est majoritairement d'origine électrostatique et est présente lorsqu'un atome d'hydrogène est porté par un atome de grande électronégativité comme l'oxygène (figure 1c), le soufre, l'azote ou le fluor<sup>5</sup>. Ainsi l'hydrogène est chargé positivement et peut interagir avec un atome portant un double non liant soit de manière intramoléculaire soit de manière intermoléculaire (avec une seconde molécule). L'énergie d'une telle interaction est de l'ordre de 10 à 40 kJ/mol, supérieure aux énergies mises en jeu dans les interactions de Van der Waals. Les liaisons hydrogènes sont notamment responsables de la stabilisation des doubles brins de l'ADN (3 liaisons hydrogènes entre la guanine et la cytosine, 2 liaisons hydrogènes entre l'adénine et la thymine).

### **1.3. L'interaction ionique.**

Cette interaction subsiste entre deux atomes ionisés de charges opposées (une charge positive et une charge négative, figure 1d). L'énergie d'une telle interaction est régie d'une part par la permittivité électrique relative du milieu  $\epsilon$  et d'autre part par la distance entre les deux atomes. Ce type d'interaction est renforcé du passage de la phase aqueuse ( $\epsilon=80$ ) vers la phase gazeuse ( $\epsilon=1$ ) avec une énergie de l'ordre de  $100 \text{ kJ/mol}^5$ , gamme d'énergie du même ordre de grandeur qu'une liaison covalente, pour une distance interatomique d'environ  $3\text{\AA}$ .

### **1.4. L'effet hydrophobe.**

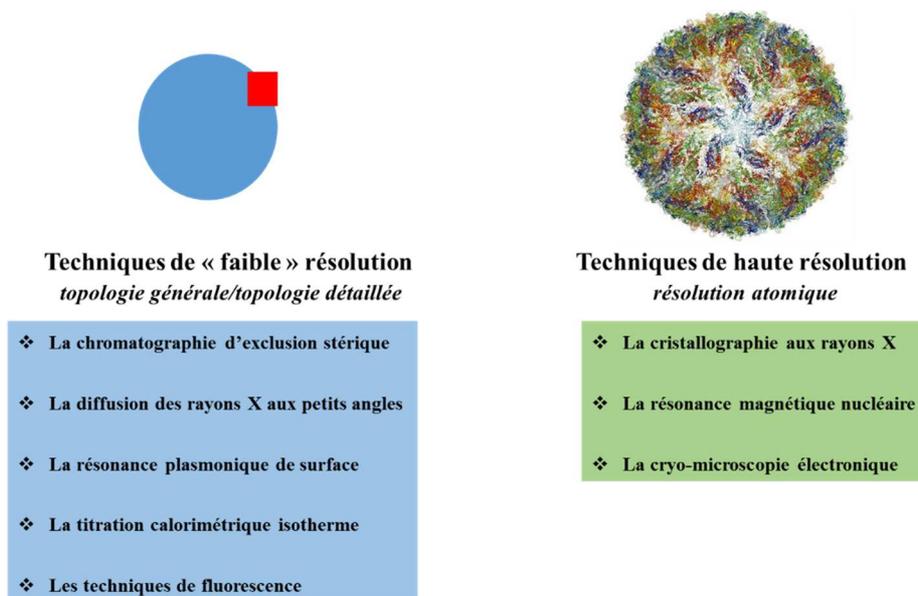
L'effet hydrophobe<sup>6</sup> résulte d'une interaction impossible entre des molécules apolaires et un solvant polaire comme l'eau et engendre une réorganisation spatiale de ces molécules (figure 1e). Celles-ci sont contraintes à interagir entre elles afin de minimiser leur surface exposée au solvant polaire<sup>5</sup>. En l'absence de solvant polaire, comme lors du transfert en phase gazeuse, cet effet est considérablement réduit<sup>7</sup>.

### **1.5. L'équilibre des forces d'attraction et de répulsion.**

Les différentes interactions non-covalentes décrites précédemment contribuent ainsi à un rapprochement des molécules jusqu'à une distance minimale qui ne peut être dépassée à cause des forces de répulsion des nuages électroniques permettant alors l'obtention d'un équilibre entre forces attractives et répulsives.

## **2. Les techniques biophysiques au service de la caractérisation d'édifices biologiques.**

L'étude d'édifices biologiques peut être réalisée au moyen de diverses techniques biophysiques complémentaires en termes d'informations apportées, de résolution, de quantités de matériel nécessaires et de temps d'analyses. Les principes de ces techniques sont succinctement rapportés ci-après.



**Figure 2.** Présentation des techniques biophysiques utilisées pour la caractérisation de biomolécules.

## 2.1. Les techniques à basse résolution.

### 2.1.1. La chromatographie d'exclusion stérique.

La chromatographie d'exclusion stérique ou *size exclusion chromatography* (SEC) est une technique séparative en solution permettant la différenciation des molécules en fonction de leur volume hydrodynamique<sup>8-9</sup>. Les composés d'intérêt sont successivement élués à l'aide d'une phase mobile sur une colonne chromatographique dont la phase stationnaire est inerte et dont la porosité est maîtrisée et connue. Les composés ayant les plus faibles rayons hydrodynamiques auront des temps de parcours moyens supérieurs aux composés possédant des rayons hydrodynamiques plus élevés ainsi l'éluion des composés est inversement proportionnelle à leur taille. Cette technique est généralement utilisée pour évaluer la masse d'une biomolécule à l'aide de protéines étalons<sup>9</sup> ou encore pour déterminer son état oligomérique<sup>10</sup>. La chromatographie d'exclusion stérique est également appliquée pour déterminer la stœchiométrie d'interaction entre différents partenaires protéiques mais sa résolution limitée ne lui permet pas d'évaluer la stœchiométrie d'interaction sur des systèmes protéines-ligands. Outre son utilisation comme technique de caractérisation, elle est également largement utilisée comme technique préparative afin par exemple d'éliminer les sels non volatils présents dans les tampons de purification des protéines.

**Informations apportées :** *état d'oligomérisation, estimation de la masse.*

### 2.1.2. La diffusion des rayons X aux petits angles.

La technique de diffusion des rayons aux petits angles ou *small angle X-ray scattering* (SAXS) est basée sur une mesure en solution de l'intensité des rayons X diffusés par la biomolécule en fonction

de l'angle du faisceau incident. Cet angle est inférieur à  $10^\circ$  d'où le nom de diffusion aux petits angles. Cette technique permet de déterminer la taille d'une biomolécule, son état oligomérique<sup>11</sup> et les différents domaines qui la composent pour la proposition de modèles structuraux de basse résolution (10-15 Å)<sup>12</sup>. Contrairement à la cristallographie aux rayons X, elle ne nécessite pas l'obtention de cristaux et est donc particulièrement adaptée à l'étude de complexes hétérogènes. En revanche sa résolution plus limitée rend délicat l'étude de petites molécules par exemple dans le cas d'un criblage de ligands nécessitant ainsi l'utilisation de techniques complémentaires et la présence de modèles structuraux<sup>13</sup>.

***Informations apportées : estimation de la taille, état d'oligomérisation, proposition de modèles structuraux.***

### **2.1.3. La résonance plasmonique de surface.**

La résonance plasmonique de surface ou *surface plasmon resonance* (SPR) est basée sur l'interaction entre une biomolécule, appelée ici ligand, immobilisée sur un support recouvert d'une fine couche métallique (comme l'or, l'argent ou l'aluminium) fonctionnalisée pour son greffage et son ligand partenaire libre (une seconde biomolécule) en solution appelé analyte<sup>14-15</sup>. Cette interaction est suivie à l'aide d'un faisceau quasi-monochromatique dont les photons vont interagir à l'interface métal/solution et provoquer la résonance des plasmons de surface selon un angle bien déterminé engendrant une perte d'intensité lumineuse du faisceau réfléchi. Cet angle dépend notamment de la quantité de molécules adsorbées sur la couche métallique et permet ainsi de suivre l'association et la dissociation du complexe ligand/analyte respectivement lors la présence ou l'absence du ligand dans la solution circulante. Ainsi la technique de SPR permet de déterminer respectivement la constante cinétique d'association ( $k_{on}$ ) et la constante cinétique de dissociation ( $k_{off}$ ) mais également la stœchiométrie d'interaction. Ces informations permettent alors d'évaluer la constante d'affinité ( $K_a$ ) entre les deux partenaires<sup>16</sup>. Bien que cette technique optique soit particulièrement intéressante pour le criblage haut débit grâce à des temps d'analyses très courts (plusieurs secondes), le greffage de la biomolécule ligand peut engendrer des biais dans les constantes ainsi déterminées. En effet, la biomolécule ligand greffée ne représente pas toujours fidèlement la biomolécule en solution notamment si le greffage a lieu à proximité du site d'interaction ou si le greffage modifie la flexibilité propre de la biomolécule nécessaire à l'interaction avec la protéine partenaire.

***Informations apportées : stœchiométrie d'interaction, estimation de constante d'affinité.***

#### 2.1.4. La titration calorimétrique isotherme.

Outre une modification des propriétés optiques, la formation d'un complexe non-covalent peut aussi induire des échanges thermiques mesurables. La titration calorimétrique isotherme ou *isothermal titration calorimetry* (ITC) est aujourd'hui la technique de référence pour caractériser les variations des paramètres thermodynamiques (enthalpie, enthalpie libre et entropie) lors de la formation d'un complexe protéine-protéine ou protéine-ligand<sup>17-18</sup>. Ces paramètres sont nécessaires pour le calcul de la constante d'affinité ( $K_a$ ) qui est évaluée à l'aide d'expériences de titrages mettant en œuvre un récepteur et son ligand (protéine ou petite molécule). Cette approche bien que sensible et reproductible ne permet pas un débit analytique très élevé avec quelques dizaines d'analyses réalisables en une journée<sup>19</sup>.

**Informations apportées : détermination de la constante d'affinité, stœchiométrie d'interaction.**

#### 2.1.5. Les techniques de fluorescence.

Suite à l'excitation d'une molécule occasionnée par l'absorption d'un photon, une émission spontanée d'un second photon de longueur d'onde supérieure au premier a lieu afin de permettre un retour à l'état fondamental : c'est le phénomène de fluorescence. Diverses techniques basées sur ce phénomène existent dont deux sont largement utilisées notamment pour la caractérisation de complexes protéine-ligand:

- L'anisotropie de fluorescence<sup>20</sup> : la vitesse de rotation de ligands fluorescents en solution est telle que le phénomène de fluorescence ne suit pas une direction préférentielle : c'est l'isotropie. En revanche, lorsque ces ligands sont complexés avec une biomolécule leur vitesse de rotation décroît et l'émission des photons suit alors une direction préférentielle, c'est l'anisotropie. Cette mesure permet d'une part de valider l'existence d'une interaction entre les deux partenaires et d'autre part de la quantifier à l'aide d'un titrage afin de calculer la constante d'affinité ( $K_a$ )<sup>21</sup>. Cette technique rapide et sensible est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour cribler des banques de petites molécules contre une biomolécule d'intérêt thérapeutique et ainsi sélectionner de potentiels candidats pour des études plus approfondies.
- Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou *fluorescence resonance energy transfer* (FRET): Le principe du FRET<sup>22</sup> est de choisir deux groupements fluorophores (sondes) et de les fixer sur les partenaires potentiels étudiés (protéine/protéine ou protéine/ligand) en respectant la condition suivante : le groupement fluorophore donneur doit libérer un photon dont la longueur d'onde est identique à la longueur d'onde nécessaire pour

l'excitation du groupement fluorophore accepteur. Cette seconde excitation ne peut avoir lieu que si les deux groupements sont proches l'un de l'autre. Ainsi le FRET permet, outre la validation d'une interaction entre deux partenaires<sup>23</sup>, de sonder un changement conformationnel de la protéine étudiée *in vitro* mais aussi *in vivo*<sup>24</sup> en plaçant les sondes fluorescentes sur des domaines se rapprochant suite à l'interaction avec un partenaire.

- **Informations apportées : présence d'une interaction, détermination de la constante d'affinité, changement conformationnel.**

## 2.2. Les techniques à haute résolution.

### 2.2.1. La cristallographie aux rayons X.

La cristallographie aux rayons X ou *X-ray diffraction* (DRX) est la technique la plus utilisée pour l'obtention des structures 3D des biomolécules libres ou en complexe à l'échelle de l'atome. Basée sur la diffraction des rayons X, elle permet la description extensive des réseaux d'interactions non-covalentes présents au sein de la biomolécule et entre les éventuels partenaires à l'état de cristaux<sup>25</sup>. Elle permet donc de déterminer précisément les zones d'interaction entre les partenaires et la structure de chacun d'entre eux. L'obtention d'une structure à résolution atomique permet de visualiser directement les interactions présentes et ainsi de développer des stratégies<sup>26-27</sup> pour les stabiliser ou les déstabiliser en fonction de l'effet recherché, par exemple en synthétisant des petites molécules capables d'interagir à ces interfaces<sup>28</sup>. Les principaux écueils de cette technique sont la quantité d'échantillon nécessaire<sup>29</sup> (une dizaine de milligrammes), un débit analytique limité (cet écueil tend à disparaître avec l'émergence de nouvelles plateformes robotisées) et les difficultés à cristalliser certaines protéines comme les protéines membranaires.

**Information apportée : structure atomique.**

### 2.2.2. La résonance magnétique nucléaire.

La résonance magnétique nucléaire ou *nuclear magnetic resonance* (NMR) permet d'étudier les modifications d'aimantation des noyaux atomiques présents dans un échantillon exposé à deux champs magnétiques : un champ magnétique statique intense  $\vec{B}_0$  et un champ électromagnétique de type radiofréquence  $\vec{B}_1$ . Cette technique est basée sur une propriété quantique des noyaux atomiques : le spin. Seuls les atomes possédant un spin non nul peuvent être étudiés en NMR<sup>30</sup>. En biologie structurale, cette technique est utilisée pour la détermination de structure 3D de protéines en solution (contrairement à la cristallographie aux rayons X). De plus les mesures des temps de relaxation par cette technique permettent de décrire la dynamique des biomolécules étudiées<sup>31</sup>. Cette technique est

aujourd'hui appliquée pour la résolution de structures protéiques inférieures à 25 kDa<sup>32</sup> mais reste difficilement utilisable en routine pour la caractérisation de protéines de masses supérieures à cause d'un nombre trop élevé de signaux. De plus, la caractérisation de protéines membranaires par cette approche est relativement difficile à cause des faibles quantités disponibles (la NMR nécessite des quantités d'échantillon dans la gamme du mg) et l'instabilité de ces protéines en solution n'est que peu compatible avec des temps d'acquisition relativement longs (jusqu'à plusieurs jours en fonction de la puissance de l'aimant utilisé). Les progrès de la NMR du solide<sup>33</sup> permettent de surmonter une partie de ces écueils : la caractérisation des protéines membranaires peut être réalisée en environnement membranaire solide dans lequel leur stabilité est accrue et la quantité d'échantillon nécessaire est réduite grâce à l'utilisation de rotors de diamètres très fins (1,3 mm) permettant une vitesse de rotation plus élevée améliorant ainsi la sensibilité de l'analyse<sup>34</sup>.

***Information apportée : structure atomique.***

### **2.2.3. La cryo-microscopie électronique.**

La cryo-microscopie électronique<sup>35</sup> ou *cryo-electronic microscopy* (cryo-EM) est fondée sur la microscopie électronique à transmission mais nécessite une préparation d'échantillon différente. En effet, la biomolécule étudiée est refroidie dans de l'éthane liquide à une température de -180°C afin de ralentir les mouvements moléculaires et ainsi améliorer la résolution des clichés 2D. Les clichés 2D sont enregistrés sous différents angles puis assemblés pour reconstituer la structure 3D de la biomolécule étudiée. Historiquement adaptée à la caractérisation de grands édifices biologiques (contrairement à la NMR), l'essor des progrès instrumentaux et logiciels récents ont rendu possible la résolution de structures atomiques pour des protéines inférieures à 100 kDa<sup>36</sup>.

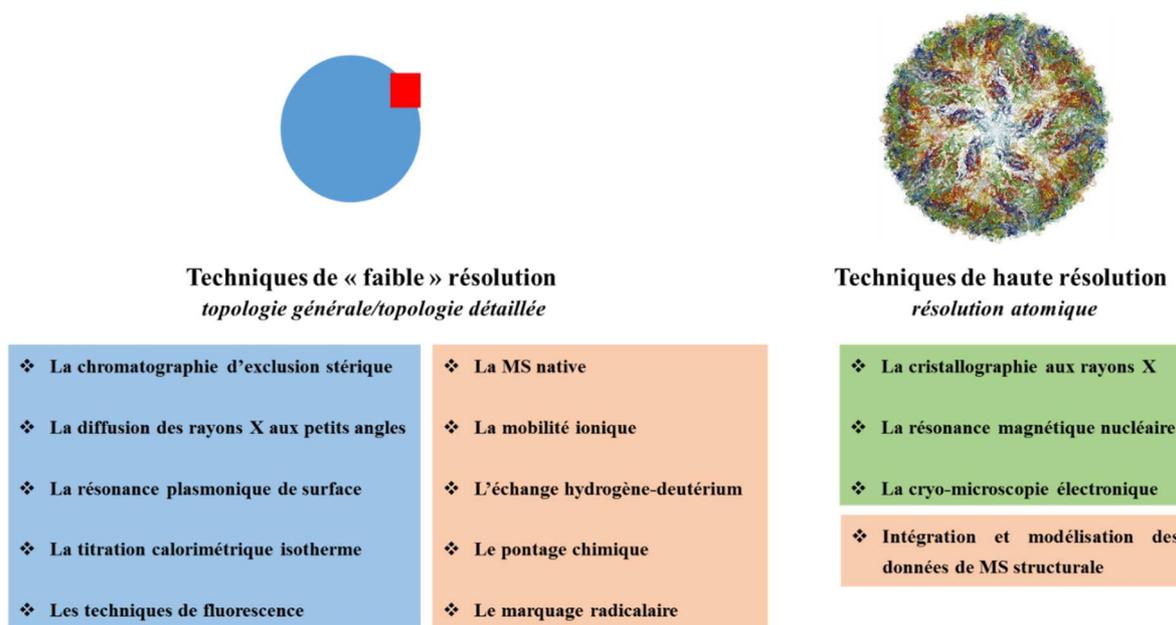
***Information apportée : structure atomique.***

## **3. Conclusions.**

Les différentes techniques biophysiques permettent d'accéder à des informations complémentaires et essentielles pour la caractérisation structurale de complexes biologiques régis par des interactions non-covalentes. Chaque technique possède des écueils (résolution, tailles de biomolécule caractérisable, quantité de matériel) qui lui sont propres et qui nécessitent la combinaison avec d'autres approches biophysiques dont la spectrométrie de masse (MS) structurale fait partie.

## **CHAPITRE 2 : LES TECHNIQUES DE MS STRUCTURALE POUR LA CARACTÉRISATION DE COMPLEXES NON- COVALENTS**

Historiquement la spectrométrie de masse appliquée à l'étude des biomolécules a émergé comme une technique permettant de déterminer la séquence en acides aminés d'une protéine c'est-à-dire sa structure primaire. Elle est depuis maintenant 25 ans largement appliquée et développée pour caractériser les structures secondaires (repliement local de plusieurs acides aminés sous forme d'hélices, de feuillets, ou de coudes, etc), tertiaires (agencement stable de l'ensemble des différentes structures secondaires) et quaternaires (agencement des multimères d'une protéine) de ces biomolécules. Les techniques de MS permettant de caractériser ces niveaux structuraux sont regroupées sous le terme de spectrométrie de masse structurale (MS structurale, figure 3). Ce chapitre porte sur une description des techniques principales de MS structurale et des instruments utilisés durant ce travail de thèse. Les développements liés à la caractérisation des protéines membranaires et des anticorps sont respectivement détaillés en partie 2 et en partie 3 du manuscrit.



**Figure 3.** Intégration des techniques de MS structurale au sein des techniques biophysiques utilisées pour la caractérisation de biomolécules.

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

### 1.1. Principe et historique.

La MS native consiste à étudier des complexes biologiques non-covalents purifiés par MS grâce à la mesure des masses intactes. Ces mesures, couplées à des mesures de masses en conditions dénaturantes, permettent de déterminer la stœchiométrie d'interaction entre les différents partenaires protéiques d'un complexe mais aussi de cribler des ligands sur une cible thérapeutique. Ces mesures sont réalisées dans des conditions dites natives, c'est à dire sans étape de marquage et sans agent pontant. La MS ne supporte pas la présence de sels non-volatils (NaCl, HEPES, Tris) qui constituent les tampons de purification des protéines et nécessite une étape d'échange de tampon. Les sels non-volatils sont généralement remplacés par un tampon volatil comme l'acétate d'ammonium (AcONH<sub>4</sub>) dont la force ionique et le pH sont optimisés pour chaque biomolécule<sup>37</sup>. Cette technique a été décrite pour la première fois en 1991 par les équipes du Dr. Chait et du Dr. Henion qui ont démontré la possibilité de maintenir des interactions non covalentes de la solution vers la phase gazeuse au sein d'un spectromètre de masse en utilisant l'ionisation par électrospray<sup>38-39</sup> (ESI), technique d'ionisation douce décrite pour la première fois en 1989 par le Dr. Fenn<sup>40</sup> (Prix Nobel 2002). Elle permet la génération d'ions multichargés grâce à l'application d'une différence de potentiel entre le capillaire utilisé lors de l'infusion de l'échantillon et l'entrée du spectromètre de masse. La technique d'ionisation MALDI permet également l'analyse de biomolécules<sup>41</sup> mais contrairement à l'ESI son couplage aux techniques chromatographiques classiques est plus délicat et le maintien des interactions non-covalentes est plus difficile sans agent pontant. Aujourd'hui, le MALDI est développé pour réaliser des analyses d'imagerie directement sur des tissus et son utilisation pour le diagnostic *in vivo* et la chirurgie guidée est en développement<sup>42-43</sup>. Ces deux techniques d'ionisation sont généralement couplées à des spectromètres de masse de type temps de vol qui ont l'avantage de permettre l'analyse des ions sur une large gamme de m/z. Dans ce cadre, l'ESI est particulièrement intéressante pour l'analyse d'édifices biologiques de hauts poids moléculaires.

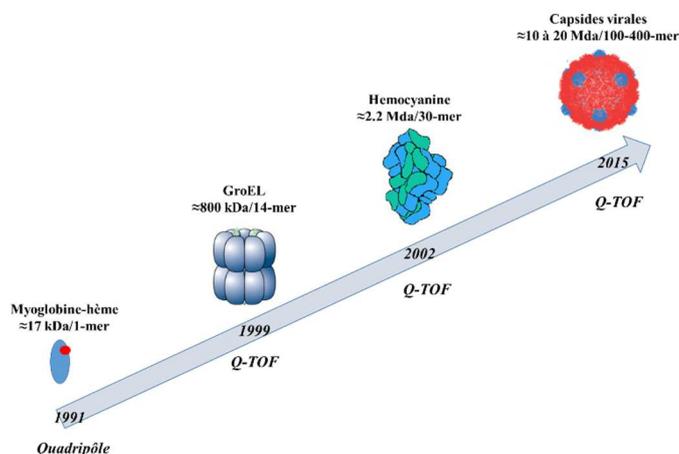
### 1.2. Développements.

Depuis 30 ans, différents développements instrumentaux ont permis l'essor de la MS native et les principaux sont rappelés ci-dessous :

- **1991 : Point de départ** de la MS native avec les travaux de Chait et Henion<sup>38-39</sup>.
- **1996 : Source nanospray** décrite par Mann<sup>44</sup> permettant de réduire la quantité d'échantillon nécessaire pour réaliser une analyse par MS native.

- **2000** : Création d'un système nanoESI sur puce microfluidique qui permettra ensuite l'élaboration d'un **injecteur automatique** d'échantillons<sup>45-46</sup> (Nanomate 100®, système aujourd'hui amélioré sous le nom de TriVersa NanoMate®<sup>47</sup>, Advion Biosciences). C'est ce système nanoESI qui a été utilisé pendant ma thèse pour la caractérisation de biomolécules seules ou en complexe par MS native.
- **2000-2009** : **Optimisations instrumentales** réalisées sur des instruments de type **Q-TOF** favorisant la transmission d'ions de hauts rapports m/z (diminution de la radiofréquence du quadripôle<sup>48</sup>, augmentation de la pression en source<sup>49</sup>, fréquence du pusher).
- **2012** : Utilisation de l'**Orbitrap** (développé en 2000 par Makarov<sup>50</sup>) pour la caractérisation de complexes protéiques par **MS native**<sup>51</sup> **haute résolution**.
- **2015** : Utilisation d'un **Q-Orbitrap** avec un quadripôle permettant la transmission de hauts rapports m/z pour la caractérisation par **MS native tandem** ou *Top Down native MS* d'anticorps ou de complexes anticorps-antigène<sup>52</sup>.

Ces développements instrumentaux ont permis l'étude par MS native de complexes protéiques de tailles et d'hétérogénéité croissantes (figure 4) : la myoglobine<sup>39</sup>, le complexe GroEL<sup>53</sup>, l'hémocyanine<sup>54</sup> et l'assemblage de capsides virales<sup>55</sup>.



**Figure 4.** Représentation schématique de l'augmentation en taille des complexes biologiques caractérisés par MS native depuis 30 ans.

Outre la caractérisation de complexes protéiques, la MS native permet également d'étudier les complexes protéine-ligand en évaluant les constantes d'affinité ( $K_a$ ) et de dissociation ( $K_d$ ) dans la gamme de la centaine de nM au mM<sup>56-59</sup>. La conservation des interactions protéine-ligand permet de cribler différents ligands sur une cible thérapeutique. Outre le criblage de ligands, la MS native peut aussi être utilisée pour comparer la stabilité de ces complexes au moyen d'expériences de Vc50<sup>60-61</sup>.

Ces expériences permettent d'évaluer la stabilité en phase gazeuse d'un complexe formé entre une protéine et un ligand : la tension  $V_{c50}$  correspond à la tension nécessaire pour déstabiliser 50% de ce complexe en source et dépend de la nature et de la contribution des interactions non-covalentes mises en jeu (présentées en chapitre 1).

Différentes technologies d'analyseurs peuvent ainsi être utilisées en MS native :

- Les spectromètres de masse temps de vol (*Time-of Flight*, TOF),
- Les spectromètres de masse hybrides composés d'un quadripôle (Q) couplés à un temps de vol (Q-TOF),
- Les spectromètres de masse Orbitrap ou Q-Orbitrap lorsqu'ils sont couplés avec un quadripôle.

Le choix de l'instrument à utiliser dépend de plusieurs paramètres dont :

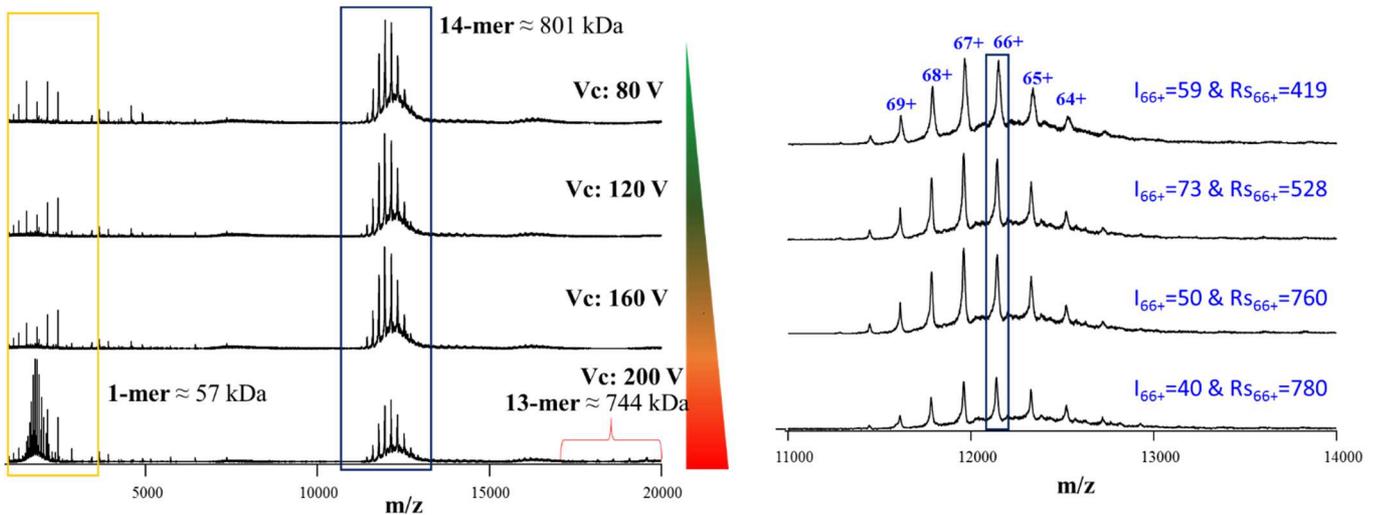
- Sa capacité à préserver les complexes non-covalents,
- Sa gamme de transmission,
- Sa sensibilité,
- Sa résolution.

La résolution en spectrométrie de masse est définie comme la capacité à séparer deux ions et est calculée en se basant sur la largeur à mi-hauteur  $\delta$  d'un ion d'un rapport  $m/z$  donné<sup>62 63</sup> (équation 1).

$$R_{50\%} = \frac{\frac{m}{z}}{\frac{\delta m}{z}} \quad (1)$$

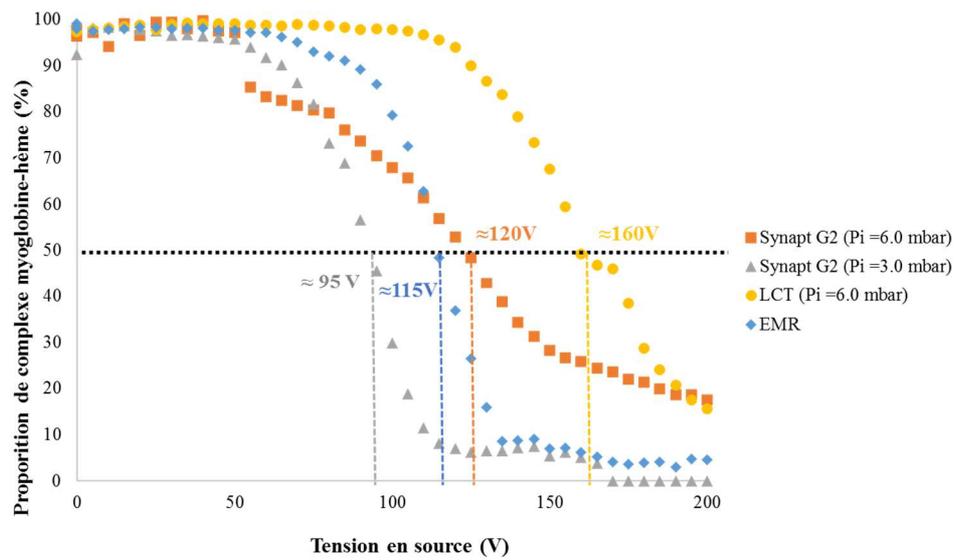
### 1.3. Paramètres instrumentaux.

Pour maintenir les interactions non-covalentes, une attention particulière doit être portée à l'optimisation de deux paramètres instrumentaux : la tension d'accélération en source ou tension de cône d'échantillonnage notée  $V_c$  et la pression de l'interface notée  $P_i$ . L'objectif est d'obtenir des pics désolvatés afin d'accéder à des résolutions expérimentales supérieures sans toutefois dissocier le complexe étudié en optimisant les valeurs de ces deux paramètres. L'effet de la tension en source  $V_c$  sur la résolution expérimentale et le maintien d'un complexe est illustré sur la caractérisation du complexe GroEL (14-mer, 801 kDa) en figure 5. L'augmentation progressive de la tension d'échantillonnage améliore la désolvatation de ions ( $V_c : 80 \text{ V} \rightarrow V_c : 160 \text{ V}$ ) et permet ainsi d'accéder à une meilleure résolution expérimentale (pour l'état de charge  $66+$  du 14-mer,  $R_s : 419$  à  $80 \text{ V}$  contre  $R_s : 760$  à  $160 \text{ V}$ ). À  $200 \text{ V}$ , le 14-mer est partiellement dissocié en 13-mer et monomère. Ainsi la tension de cône d'échantillonnage optimale est ici de  $160 \text{ V}$ .



**Figure 5.** Influence de la tension  $V_c$  sur le maintien du complexe GroEL à  $10 \mu\text{M}$  ( $\text{AcONH}_4$   $150 \text{ mM}$   $\text{pH } 7,0$ ) en phase gazeuse et sur la résolution expérimentale. Expériences réalisées sur le LCT avec une pression de l'interface fixée à  $6 \text{ mbar}$ .

Durant cette thèse, la majorité des expériences ont été réalisées sur un spectromètre de type Q-TOF : le Synapt G2 HDMS (Waters). Cependant, son interface ne permet pas toujours le maintien de certains complexes non-covalents, les expériences de MS native sont alors réalisées sur un simple TOF (LCT, Waters) dont l'interface permet une meilleure conservation des complexes non-covalents. Un instrument de type Orbitrap, l'Exactive Plus EMR (ThermoScientific) a également été utilisé pour accéder à des résolutions expérimentales plus élevées que les instruments précédemment cités. L'influence de la tension appliquée en source sur le maintien du complexe myoglobine-hème est illustrée en figure 6 pour chaque instrument. Avec une pression d'interface identique, la source du LCT est moins « dissociante » que la source du Synapt G2 avec une tension  $V_c$   $50$  de  $\approx 160 \text{ V}$  contre  $\approx 120 \text{ V}$  pour le Synapt G2 HDMS. La tension déterminée sur l'EMR est notée CID  $50$  car l'EMR ne possède pas de cône d'échantillonnage mais son caractère dissociant semble intermédiaire entre les deux sources précédemment citées avec  $\approx 115 \text{ V}$ . Sur le Synapt G2, l'augmentation de la pression en source permet un meilleur maintien de l'interaction myoglobine-hème avec une tension  $V_c$   $50$  de  $\approx 120 \text{ V}$  à  $6 \text{ mbar}$  contre  $\approx 95 \text{ V}$  à  $3 \text{ mbar}$ .



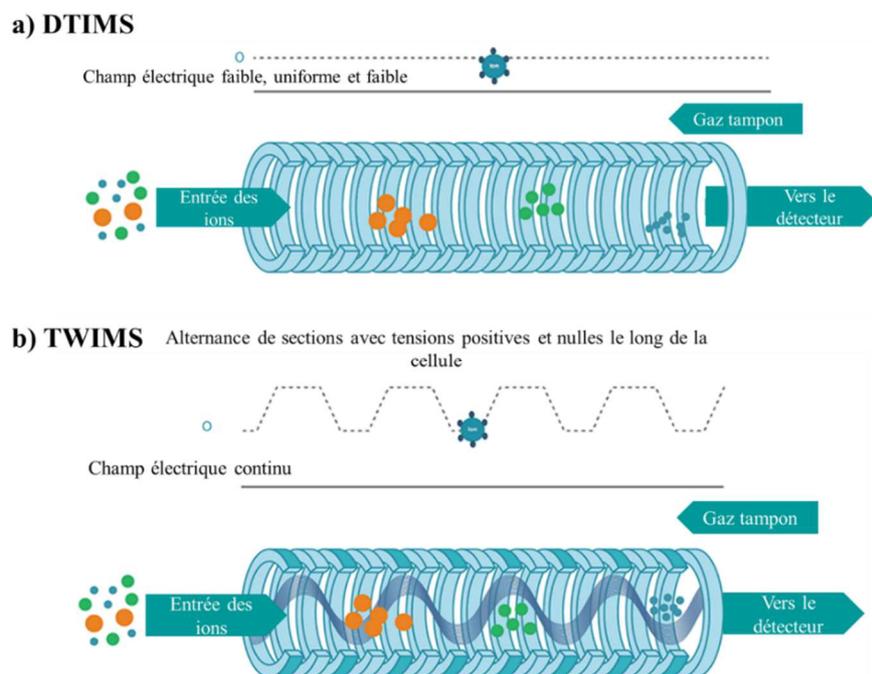
**Figure 6.** Influence de la tension appliquée en source sur le LCT et le Synapt G2 et dans la cellule de collision sur l'EMR sur la dissociation du complexe myoglobine-hème en conditions natives. Le complexe myoglobine est infusé à 10  $\mu$ M dans un tampon AcONH<sub>4</sub> 150 mM pH 7,0.

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

### 2.1. Historique et principe.

L'appellation spectrométrie de mobilité ionique (*Ion-Mobility*), selon Eiceman<sup>64</sup>, peut être associée à l'ensemble des principes, méthodes et instrumentations permettant la caractérisation de substances grâce à la vitesse des ions gazeux traversant une atmosphère remplie de gaz et soumis à un champ électrique. Les méthodes de mobilité ionique sont nombreuses<sup>65-69</sup> et dans le cadre de cette thèse, seules les méthodes de mobilité ionique permettant la caractérisation conformationnelle de biomolécules seront abordées. Aujourd'hui deux techniques principales de mobilité ionique couplées à la spectrométrie de masse sont utilisées pour caractériser des protéines entières ou des complexes protéine-protéine ou protéine-ligand: la spectrométrie de mobilité ionique basée sur une cellule de type « Drift Tube » (DTIMS) et la spectrométrie de mobilité ionique basée sur une cellule de type « Travelling Wave » (TWIMS). Une présentation des deux types de cellule est proposée en figure 7. Ces deux cellules sont chacune soumises à un champ électrique dit faible en comparaison avec les tensions appliquées sur les cellules des autres technologies de mobilité ionique qui sont principalement utilisées comme techniques de séparation. L'utilisation de ce champ électrique faible permet aux ions d'être accélérés afin de traverser les molécules de gaz présentes au sein de la cellule tout en permettant une conservation de la conformation native de la protéine seule ou en complexe. Pour ces deux cellules, le temps de passage de l'ion dans la cellule, appelé temps de dérive  $t_D$  ou *drift time*, dépend de deux paramètres intrinsèques à l'ion : son état de charge et sa conformation mais aussi des paramètres instrumentaux de la cellule. Ce temps de passage dans la cellule est le reflet de la mobilité de l'ion analysé et est variable d'une technologie à l'autre. En effet les principes de fonctionnement de ces deux cellules sont différents. La cellule DTIMS est relativement grande (jusqu'à plusieurs mètres) et dispose d'un champ électrique linéaire dans le temps et dans l'espace (*i.e.* tout le long de la cellule) qui permet de relier directement la mesure du temps de dérive de l'ion à sa section efficace de collision (la notion de section efficace de collision ou Collision Cross Section, CCS est définie au §2.2.). C'est cette cellule, remplie d'hélium ou d'azote comme gaz tampon, qui a été utilisée comme technique de référence pour la détermination des premières surfaces efficaces de collision<sup>70</sup>. La cellule TWIMS, plus petite ( $\approx 20$  cm) est elle soumise à un champ électrique variable dans le temps et l'espace dont l'intensité du potentiel varie sous la forme caractéristique de vagues (« *Travelling Waves* »). Dans ce cas, la détermination des CCSs de protéines inconnues doit être réalisée grâce à l'utilisation de protéines dites étalons dont les CCSs ont été préalablement mesurées dans une cellule DTIMS<sup>70</sup> : les CCS mesurées en TWIMS (avec comme gaz tampon l'azote) calculées à partir de données DTIMS (He ou N<sub>2</sub>) doivent être notées  $^{TW}CCS_{N_2 \rightarrow He \text{ ou } N_2}$  depuis les recommandations proposées en 2019 par

Gabelica et al.<sup>71</sup> Toutes les CCSs déterminées durant cette thèse ont été étalonnées à partir de protéines solubles dont les CCSs ont été préalablement mesurées en DTIMS (N<sub>2</sub>) par d'autres équipes<sup>70</sup>.



**Figure 7.** Représentation schématique des technologies (a) DTIMS et (b) TWIMS, adaptée de<sup>72</sup>.

Actuellement, pour ce type d'applications, deux gammes principales d'instruments de spectromètre de masse couplés à la spectrométrie de mobilité ionique ont été commercialisées :

- L'instrument Q-TOF 6560 de la marque Agilent Technologies qui possède une cellule DTIMS<sup>73</sup>, commercialisé en 2014.
- La gamme Synapt (G1,G2, G2S et G2SI) de la marque Waters qui possèdent des cellules TWIMS de résolution variable en fonction de la gamme<sup>74-75</sup>.

La durée d'une séparation en mobilité ionique (plusieurs dizaines de ms) est largement supérieure à l'échelle de temps nécessaire à la durée d'un cycle TOF (de 30 à 200  $\mu$ s selon la gamme de m/z) pour acquérir un spectre de masse et permet donc son couplage à la MS<sup>62, 76</sup>. L'instrument qui a été utilisé durant cette thèse est le Synapt G2 HDMS (Q-TOF) doté d'une cellule TWIMS.

## 2.2. Les sections efficaces de collision et l'étalonnage.

La section efficace de collision, *Collision Cross Section* (CCS) est une dimension de surface généralement exprimée en nm<sup>2</sup> ou Å<sup>2</sup> dans le cas des protéines. Elle représente la surface moyenne de la protéine dans toutes les directions de l'espace suite aux chocs répétés avec les molécules de gaz.

### 2.2.1. En DTIMS.

Dans une cellule de type *Drift Tube*, la mobilité d'un ion K (en  $\text{m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) est directement dépendante de sa vitesse  $v_D$  (en  $\text{m}.\text{s}^{-1}$ ) et du champ électrique E appliqué au sein de la cellule (en  $\text{V}.\text{m}^{-1}$ ). La vitesse de l'ion est calculée à partir du temps de dérive mesuré noté  $t_{d'}$  (en s) et la longueur de la cellule DT notée L (en m).

$$K = \frac{v_D}{E} \text{ avec } v_D = \frac{L}{t_{d'}} \text{ soit } K = \frac{L}{E \times t_{d'}} \quad (2)$$

La mobilité de l'ion K est dépendante de la pression  $P_{\text{exp}}$  (en Torr) et de la température  $T_{\text{exp}}$  (en Kelvin) au sein de la cellule lors de l'expérience et doit être normalisée afin de comparer les mobilités déterminées sur différents instruments et/ou dans différentes conditions. La normalisation de la mobilité par les conditions normales de température (273,15 K) et pression (760 Torr) permet de déterminer la mobilité réduite  $K_0$ .

$$K_0 = K \times \frac{P_{\text{exp}}}{P_0} \times \frac{T_0}{T_{\text{exp}}} = K \times \frac{P_{\text{exp}}}{760} \times \frac{273.15}{T_{\text{exp}}} \quad (3)$$

Soit après combinaison des équations (2) et (3) :

$$K_0 = \frac{L}{E \times t_{d'}} \times \frac{P_{\text{exp}}}{760} \times \frac{273.15}{T_{\text{exp}}} \quad (4)$$

Cette mobilité réduite  $K_0$  est ensuite utilisée afin de déterminer la section efficace  $\Omega$  (en  $\text{m}^2$ ) à l'aide de l'équation de Mason-Schamp. La section efficace et la mobilité réduite sont reliées par différentes grandeurs : la charge élémentaire de l'électron e (en C), la charge z et la masse de l'ion  $M_{\text{ion}}$  (en  $\text{kg}.\text{mol}^{-1}$ ), la constante de Boltzmann  $k_b$  (en  $\text{J}.\text{K}^{-1}$ ), la température de la cellule IM  $T_{\text{exp}}$  (en K), la densité de nombre du gaz N (en  $\text{m}^{-3}$ ) et sa masse molaire  $M_{\text{gaz}}$  (en  $\text{kg}.\text{mol}^{-1}$ ).

$$K_0 = \frac{3 \times e \times z}{16N} \times \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T_{\text{exp}}} \times \left( \frac{1}{M_{\text{gaz}}} + \frac{1}{M_{\text{ion}}} \right)} \times \frac{1}{\Omega} \quad (5)$$

Soit après combinaison des équations (4) et (5) :

$$\Omega = \frac{3e}{16N_{\text{gaz}}} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P_{\text{exp}}} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T_{\text{exp}}}} \times \sqrt{\left( \frac{1}{M_{\text{gaz}}} + \frac{1}{M_{\text{ion}}} \right)} \times \frac{z \times t_{d'} \times E}{L} \quad (6)$$

L'équation (6) permet ainsi d'exprimer le temps de dérive de l'ion  $t_{d'}$  mesuré à sa section efficace de collision  $\Omega$ . Cette relation n'est valable qu'en DTIMS car le champ électrique E est linéaire et uniforme.

### 2.2.2. En TWIMS.

Dans une cellule TWIMS, le champ électrique n'est pas linéaire et uniforme et la détermination des CCSs est réalisée à l'aide d'un étalonnage. Pour cela, des protéines dites étalons<sup>70</sup> dont les CCSs ont été préalablement déterminées en DTIMS sont analysées en TWIMS dans des conditions de mobilité

ionique (WV, WH et débit de gaz) strictement identiques aux protéines d'intérêt. L'utilisation d'une droite d'étalonnage est ensuite réalisée afin de déterminer les CCSs des protéines d'intérêt. Ainsi la détermination des CCSs en TWIMS est réalisée en deux étapes :

- ❖ L'établissement d'une relation mathématique entre les temps de dérive  $t_D'$  des ions étalons mesurés en TWIMS ( $N_2$ ) et les CCSs préalablement déterminées en DTIMS (He ou  $N_2$ ).
- ❖ L'application de cette relation aux temps de dérive  $t_D'$  des ions d'intérêt mesurés en TWIMS ( $N_2$ ) permet d'évaluer leurs CCSs.

Ainsi en TWIMS, la détermination des CCS des ions d'intérêt mesurés ( $N_2$ ) est réalisée à partir de CCS des ions étalons mesurées en DTIMS<sup>70</sup>(He ou  $N_2$ ). L'équation de Mason-Schamp est exprimée à partir de la section efficace corrigée des ions étalons notée  $\Omega'$  (DTIMS) comme une fonction du temps de dérive  $t_D'$  mesuré en TWIMS.

$$\Omega' = \frac{\Omega}{z \times \sqrt{\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}}} = A \times \frac{t_{D'} \times E}{L} \quad (7)$$

Où la constante A est définie ci-après :

$$A = \frac{3e}{16N} \times \frac{T}{273.15} \times \frac{760}{P} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \quad (8)$$

L'équation (7) peut être ajustée par une fonction puissance, permettant de relier le temps de dérive des ions étalons et les CCS corrigées.

$$\Omega' = a \times t_{D'}^b \quad (9)$$

Qui peut être linéarisée au moyen du logarithme népérien :

$$\ln(\Omega') = \ln(a) + b \times \ln(t_{D'}) \quad (10)$$

Cette linéarisation de l'équation permet de déterminer graphiquement les constantes a et b correspondant respectivement au facteur correctif de la température et au facteur correctif de la non linéarité de la cellule TWIMS.

L'injection de l'équation (9) dans l'équation (7) permet alors d'établir une relation directe entre  $t_D'$  et  $\Omega$  (équation 11) où a et b sont déterminés suite à l'étalonnage,  $M_{gaz}$  est connu, et l'état de charge, la masse et le temps de dérive de l'ion sont mesurés. La CCS est alors calculée.

$$\Omega = a \times t_{D'}^b \times z \times \sqrt{\left(\frac{1}{M_{gaz}} + \frac{1}{M_{ion}}\right)} \quad (11)$$

Le choix des étalons est primordial et peut être limitant pour la détermination fidèle de CCS de certains systèmes comme les protéines membranaires. Généralement, les étalons sont choisis en fonction de la masse et de la charge des protéines d'intérêt.

### 2.2.3. Algorithmes utilisés pour le calcul de CCS théoriques.

Les CCSs expérimentales sont dans la mesure du possible comparées à des CCSs calculées à partir de structures résolues par les techniques à résolution atomique à l'aide de différents algorithmes.

- ❖ L'algorithme *Projection Approximation* (PA) est l'algorithme le plus simple qui identifie la biomolécule comme une sphère et les atomes qui la composent comme des sphères dures. Cette approximation permet de déterminer rapidement la section efficace  $\Omega$  de la biomolécule suite à la projection de son aire évaluée dans diverses orientations de l'espace sur un plan<sup>77</sup>. Cette méthode ne tient pas compte des collisions entre les atomes et a été décrite comme sous-estimant en général les CCS des protéines<sup>78</sup>. Cependant, les protéines ne sont pas des molécules planes et une nouvelle version de cet algorithme *Projection Super Approximation* (PSA) a été proposée en tenant compte d'un facteur de concavité<sup>79-80</sup>.
- ❖ L'algorithme *Exact Hard Sphere Scattering* (EHSS), comme la méthode PA, assimile les atomes à des sphères dures mais tient également compte des collisions entre les atomes via la simulation de trajectoires<sup>81</sup>. Cependant, les CCS ainsi simulées ne considèrent pas l'effet des dipôles induits lors des interactions entre les atomes de la biomolécule et les atomes de gaz.
- ❖ L'algorithme *Trajectory Method* (TM) est l'algorithme actuellement considéré comme l'algorithme de référence pour la simulation fiable des CCS d'une biomolécule car il tient compte de l'effet de ces dipôles induits grâce à la considération du potentiel de Lennard-Jones<sup>82</sup>. En revanche, son temps de calcul est largement supérieur aux deux autres méthodes citées précédemment à cause de sa complexité.

En 2015, Marklund et al.<sup>83</sup> ont développé le logiciel IMPACT qui permet d'évaluer rapidement les CCS d'une biomolécule en utilisant une équation reliant les CCS déterminées par la méthode PSA avec les CCS déterminées via la méthode TM avec le logiciel Mobcal utilisé historiquement<sup>82</sup>. De cette manière, les temps de calculs ont été divisés par un facteur  $10^6$  par rapport à l'utilisation de l'algorithme TM implémenté dans Mobcal. Les CCS déterminées sur IMPACT ont été évaluées sur 442 structures de biomolécules et sont similaires aux CCS déterminées par Mobcal ( $\approx 1\%$  de différence). Durant cette thèse, en présence de structures 3D, les CCS ont été évaluées à l'aide de ce logiciel afin de réduire les temps de calculs et les valeurs obtenues avec la méthode PA et la méthode assimilable à TM ont été comparées.

D'autre part, le Dr. Ruotolo a montré en 2008<sup>84</sup>, qu'il était possible d'estimer la CCS d'une protéine à partir de sa masse  $M$  selon la relation suivante :

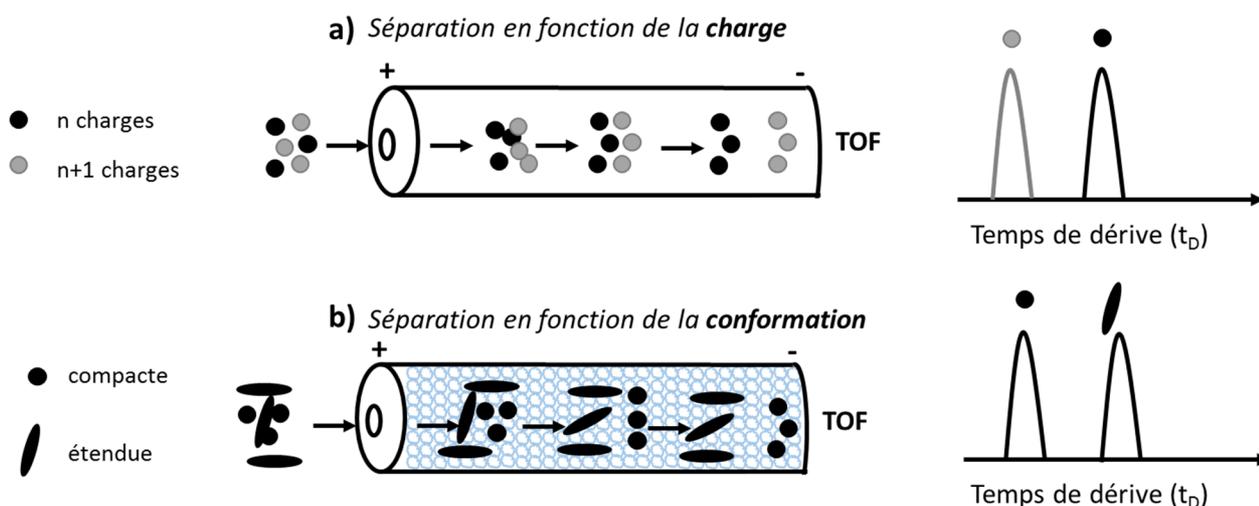
$$\Omega = 2,435 \times M^{2/3} \quad (12)$$

Cependant cette estimation n'est fiable que pour des protéines sphériques et est peu applicable par exemple aux protéines membranaires ou à des protéines intrinsèquement déstructurées.

## 2.3. Séparation et résolution en IM.

### 2.3.1. La séparation.

En TWIMS, la séparation des ions a lieu sous l'effet des chocs entre ces derniers et les molécules de gaz tampons. Elle dépend de deux paramètres intrinsèques à l'ion : son état de charge et sa conformation. A conformations identiques (Fig. 8a), un ion possédant  $n+1$  charges aura un temps de dérive plus court qu'un ion possédant uniquement  $n$  charges. A état de charge identique (Fig. 8b), la séparation des deux ions sera régie uniquement par leur différence de conformation : l'ion possédant la structure la plus compacte rentrera en collision avec moins de molécules de gaz que l'ion possédant une structure plus étendue et aura ainsi un temps de dérive plus court au sein de la cellule.



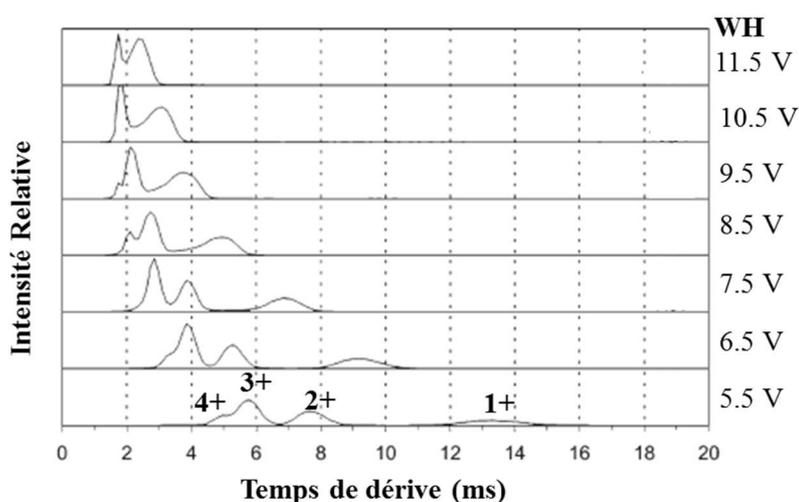
**Figure 8.** Représentation schématique de l'effet de la charge (a) et de la conformation (b) sur la séparation de deux ions en mobilité ionique. En bleu, sont représentées les molécules de gaz (ici l'azote).

D'autres paramètres, instrumentaux cette fois-ci, permettent d'améliorer la séparation entre deux espèces en favorisant ou non les chocs avec les molécules de gaz. Ces paramètres sont :

- La vitesse de vague notée *Wave Velocity* en m/s (WV). Elle peut être optimisée pour favoriser le temps passé par les ions dans la cellule de mobilité et ainsi améliorer la séparation. Attention, l'augmentation exagérée du temps de passage des ions dans la cellule favorise la diffusion des ions et peut donc au contraire nuire à leur séparation : un compromis est alors nécessaire.

- La hauteur de vague notée *Wave Height* en V (WH) doit aussi être optimisée selon les mêmes considérations.
- Le débit de gaz présent au sein de la cellule en mL/min. L'augmentation du débit de gaz permet d'augmenter la densité de molécules de gaz et ainsi de favoriser les chocs avec les ions. Là encore, un compromis est nécessaire car l'augmentation exagérée du débit de gaz peut conduire à une diminution de la sensibilité de l'expérience.

Un exemple illustrant l'optimisation de la hauteur de vague pour améliorer la séparation en mobilité ionique est proposé en figure 9. La diminution de la hauteur de vague permet de séparer les différents multimères de la bradykinine.



**Figure 9.** Influence de la hauteur de vague sur la séparation des ions de la bradykinine à 1021 m/z. À WH=11,5V, deux espèces sont séparées. La diminution de la hauteur de vague (de haut en bas) permet de ralentir les ions et de favoriser leur séparation au sein de la cellule de mobilité ionique jusqu'à la séparation de 4 espèces à une WH de 5,5 V. Les 4 espèces séparées correspondent à 4 multimères de la bradykinine, respectivement le tétramère 4+, le trimère 3+, le dimère 2+ et monomère 1+. Figure adaptée de <sup>74</sup>.

### 2.3.2. La résolution.

Afin de faciliter l'optimisation des méthodes de mobilité ionique et de quantifier la séparation entre deux espèces, la résolution a été définie comme suit. La résolution  $R_s$  est le pouvoir séparateur observé entre deux espèces. Il dépend d'une part de la différence entre l'apex des temps de dérive des deux espèces et d'autre part de leurs largeurs à mi-hauteurs (Équation 13).

$$R_s = 2 * \frac{td_2 - td_1}{\Delta td_1 + \Delta td_2} \text{ avec } td_2 > td_1 \quad (13)$$

Équation de la résolution en mobilité ionique.  $td_2$  et  $td_1$  représentent respectivement les temps de dérive de l'espèce 1 et de l'espèce 2 mesurés à l'apex.  $\Delta td_1$  et  $\Delta td_2$  correspondent respectivement aux largeurs à mi-hauteur de l'espèce 1 et de l'espèce 2.

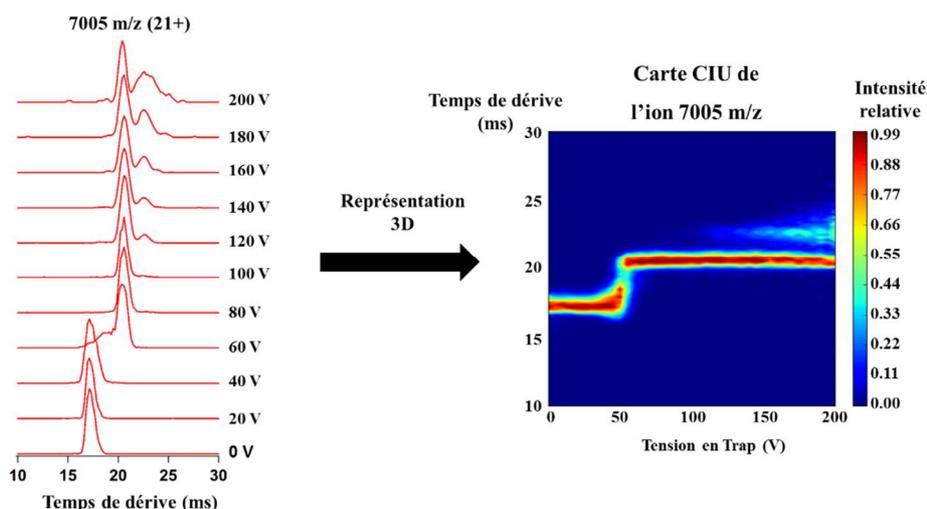
Le pouvoir de résolution est supérieur en DTIMS (50-100) comparé à la technologie TWIMS ( $\approx$ 20-40). Cette meilleure résolution se fait cependant au dépend d'une moins bonne sensibilité<sup>85</sup>. La séparation en mobilité ionique est de l'ordre d'une à plusieurs dizaines de millisecondes.

#### **2.4. Les applications en biologie structurale.**

La technologie TWIMS est depuis 10 ans maintenant largement appliquée en biologie structurale<sup>86-88</sup>. Elle a permis, par exemple, de mettre en lumière la présence d'un équilibre conformationnel entre la forme compacte et la forme étendue d'une réductase<sup>89</sup> ou la présence de plusieurs conformères chez la protéine prion<sup>90</sup>. Elle a également permis la caractérisation de systèmes protéiques de hauts poids moléculaire comme les capsides virales<sup>91</sup> mais aussi de distinguer des changements conformationnels très fins induits ( $\Delta$ CCS $<$ 5%) par la fixation de ligands sur différentes protéines<sup>60, 92</sup>.

#### **2.5. Les expériences CIU.**

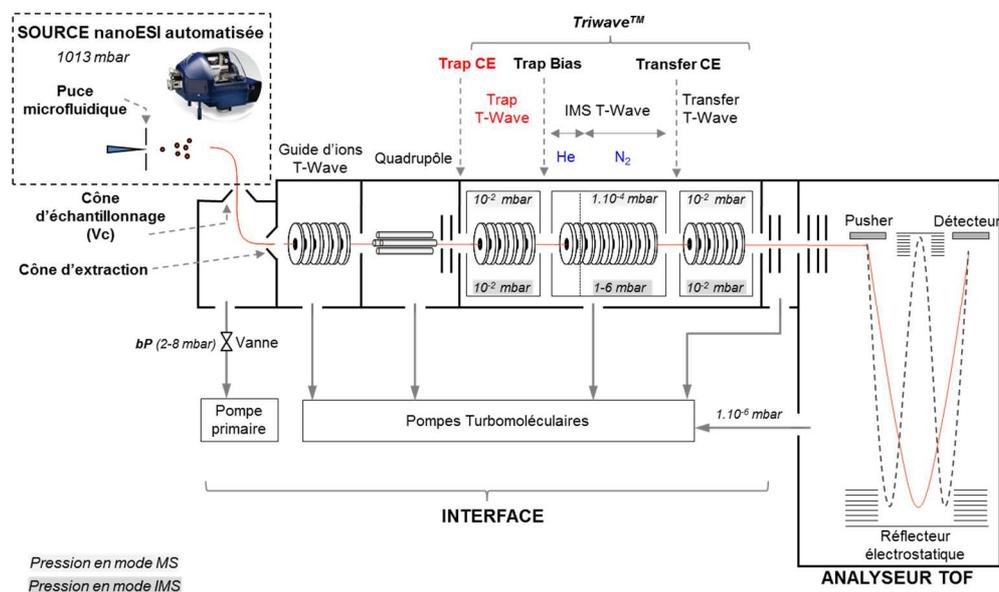
L'approche CIU, *Collision Induced Unfolding*, consiste à étudier la déstructuration de l'ion d'intérêt en phase gazeuse. Pour cela, l'ion est accéléré progressivement par des pas définis dans une cellule appelée trap (cellule de collision) qui précède la cellule de mobilité ionique. L'influence de cette accélération progressive dans la cellule trap peut induire des changements conformationnels qui sont séparés en mobilité ionique. La compilation des temps de dérive mesurés à chaque tension de trap permet de reconstruire une carte 3 dimensions appelée carte CIU (Figure 10). Elle représente l'évolution du temps de dérive (axe des ordonnées) de l'ion en fonction de la tension appliquée en trap (axe des abscisses), la troisième dimension est l'intensité relative de l'ATD (code couleur : rouge pour le maximum 1.0 et bleu pour le minimum 0). Un changement discret de l'ATD, appelé transition, est observé à environ 50 V et marque le déploiement de l'ion en phase gazeuse suite à son accélération contre les molécules de gaz au sein de la cellule trap. La première étude rapportant l'utilisation de la CIU a été publiée en 2009<sup>93</sup> : la stabilité conformationnelle de plusieurs protéines solubles en absence ou présence de ligands a notamment été décrite en utilisant cette approche. En 2013, un lien entre le nombre de transitions visibles en CIU et le nombre de domaines structuraux des protéines étudiées a été proposé par le Dr. Ruotolo<sup>94</sup>. Les potentialités de cette approche pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux seront décrites en Partie 3.



**Figure 10.** Représentation schématique de la construction d'une carte CIU d'un anticorps (ion 7005 m/z chargé 21+) à partir des temps de dérive mesurés pour 10 tensions de trap (pas de 20V de 0 à 200 V).

## 2.6. Technologie utilisée.

L'intégralité des expériences de native IM-MS et CIU a été réalisée sur un instrument de type Q-IM-TOF : le Synapt G2 HDMS (Waters) (figure 11). La cellule de mobilité ionique utilisée est de technologie TWIMS.



**Figure 11.** Schéma du spectromètre de masse Synapt G2 HDMS (Q-IM-TOF, Waters) adapté de<sup>4</sup>. En bleu, la nature des gaz remplissant la cellule de mobilité ionique est représentée. La tension variable appliquée dans la cellule trap T-Wave qui précède la cellule de mobilité ionique, souvent abrégée trap CE, trap CV ou *Collision Energy* est notée ici en rouge.

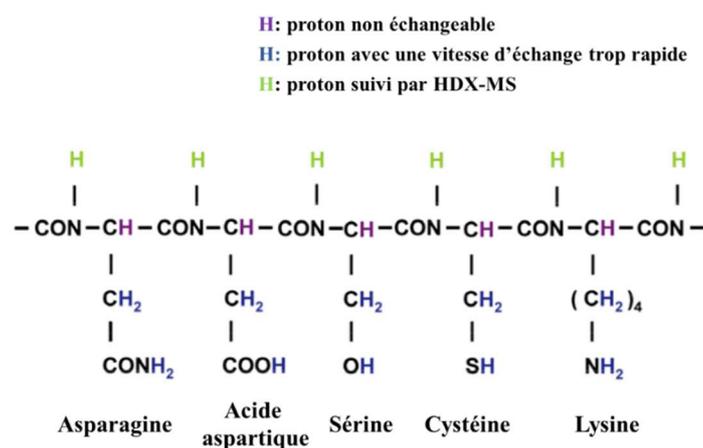
En résumé, pour caractériser des protéines par IM-MS, deux modes de fonctionnement complémentaires peuvent être distingués sur cet instrument :

- Les expériences IM-MS native: elles permettent d'obtenir des *Collision Cross Sections* après une optimisation fine des paramètres de la cellule de mobilité afin de maximiser la séparation des ions<sup>4</sup>. La tension trap est, dans ce cas, minimale (4V).
- Les expériences CIU : elles permettent d'obtenir les cartes CIU. L'ensemble des paramètres de mobilité ionique est identique aux expériences native IM-MS excepté la tension appliquée dans la cellule trap qui augmente progressivement au cours de l'expérience.

### 3. L'échange hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS).

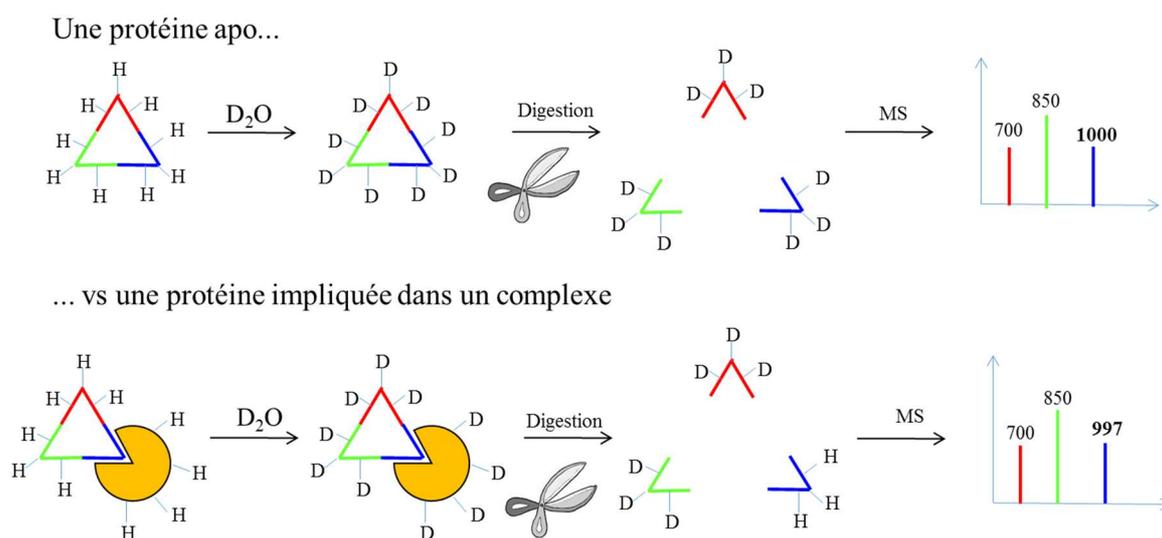
Les hydrogènes présents sur les acides aminés des protéines peuvent être discriminés en trois catégories en fonction de leur vitesse d'échange avec les atomes de deutérium<sup>95</sup>:

- Les protons portés par les carbones  $\alpha$  qui ne s'échangent pas (figure 12, violet).
- Les protons portés par les chaînes latérales des acides aminés dont le rééchange  $D \rightarrow H$  est trop rapide pour être conservé durant la durée d'une analyse HDX-MS (figure 12, bleu).
- Les protons portés par les liaisons peptidiques qui s'échangent avec des atomes de deutérium avec une vitesse d'échange variable de quelques secondes à plusieurs heures (figure 12, vert).



**Figure 12.** Représentation schématique des protons présents sur la structure primaire d'une chaîne polypeptidique, adaptée de<sup>96</sup>. Les protons amidiques échangeables suivis par HDX-MS sont représentés en vert, les protons non échangeables sont représentés en violet et les protons dont la vitesse de rééchange est trop rapide pour être suivie par HDX-MS sont représentés en bleu.

La vitesse d'échange de ces protons par des atomes de deutérium dépend intimement de la structure secondaire de la protéine, dont les régions sont plus ou moins exposées au solvant deutéré ( $D_2O$ ). L'échange de ces protons par des atomes de deutérium à différents temps d'incubation est suivi par MS après digestion de la protéine en peptides. Ces peptides sont séparés en chromatographie liquide puis analysés par MS afin de mesurer les incréments de masse au cours du temps pour chaque peptide, liés à l'échange des hydrogènes par les atomes de deutérium. L'HDX-MS<sup>97</sup> permet ainsi d'évaluer la dynamique conformationnelle d'une protéine<sup>98</sup>, son repliement, son agrégation<sup>99</sup> mais aussi ses zones d'interaction avec un partenaire éventuel<sup>100</sup> (protéine, ADN ou ligand). Dans le cas d'un complexe protéique, comme dans le cas d'un complexe anticorps/antigène<sup>101</sup> (épitope mapping) les zones d'interaction seront protégées par la protéine partenaire et incorporeront ainsi moins vite les atomes de deutérium (figure 13).



**Figure 13.** Représentation schématique d'une expérience HDX-MS pour la détermination des zones d'interaction entre deux protéines. Le peptide bleu incorpore 3 atomes de deutérium de moins en complexe que la protéine seule montrant ainsi une protection de cette région : ce peptide peut alors être proposé comme impliqué dans l'interaction avec la protéine partenaire.

Lors d'une expérience HDX-MS, le phénomène d'échange inverse ( $D \rightarrow H$ ) a lieu. Les protons présents dans le milieu (humidité, phase mobile lors de l'analyse LC) remplacent progressivement les atomes de deutérium portés par les peptides, ce phénomène est, comme l'échange  $H \rightarrow D$ , dépendant de deux paramètres : le pH et la température. La vitesse d'échange est hautement dépendante du pH et est minimale dans la gamme de pH 2,5-3,0<sup>102</sup>. De plus, l'abaissement de la température permet aussi de diminuer cette vitesse d'échange et permet ainsi de limiter le phénomène d'échange inverse<sup>103 104</sup>. La diminution brusque du pH et l'abaissement de la température constituent l'étape de *quench* qui permet de limiter l'échange inverse.

Une expérience HDX-MS est composée de six étapes sur le système utilisé durant cette thèse:

1°) L'étape de marquage au deutérium qui permet l'échange des atomes de protons par des atomes de deutérium.

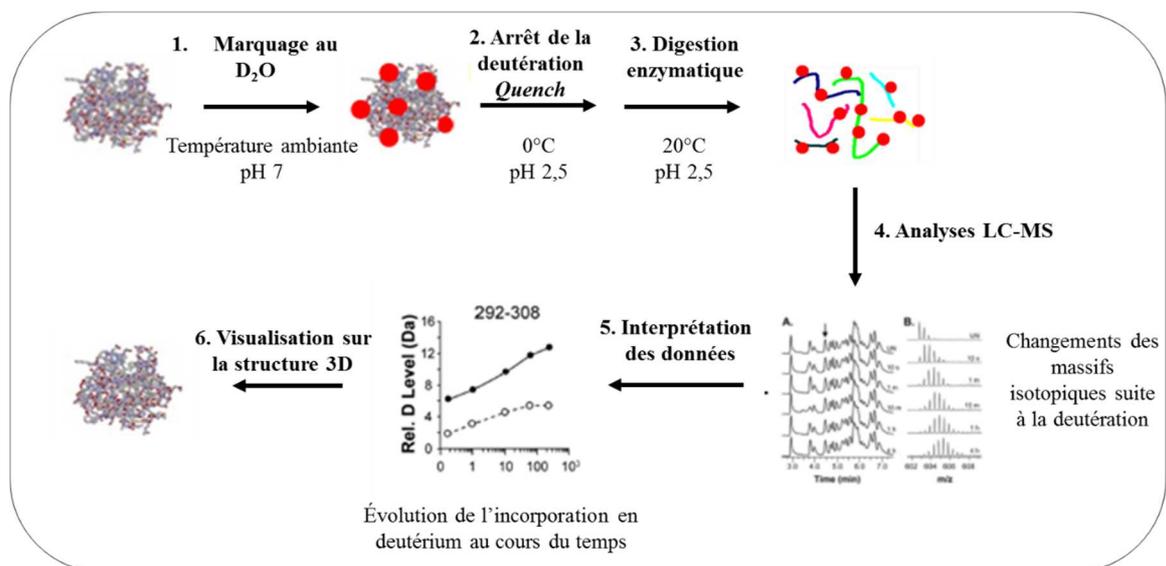
2°) L'arrêt du marquage (*étape de quench*) par une diminution brusque de la température et du pH.

3°) La digestion enzymatique à l'aide d'une cartouche greffée avec l'enzyme de digestion.

4°) Un système LC-MS pour la séparation et la détection des peptides.

5°) La comparaison de l'incorporation en deutérium de chaque peptide entre l'état apo et l'état holo de la protéine étudiée au cours du temps. Une validation statistique est ensuite réalisée afin de confirmer les différences visibles. Ce point sera discuté en Partie 2.

6°) La visualisation des zones flexibles ou impactées par la présence du partenaire de la biomolécule.



**Figure 14.** Représentation du *workflow* utilisé pendant la thèse pour les expériences HDX-MS. Le système utilisé est détaillé en Partie expérimentale.

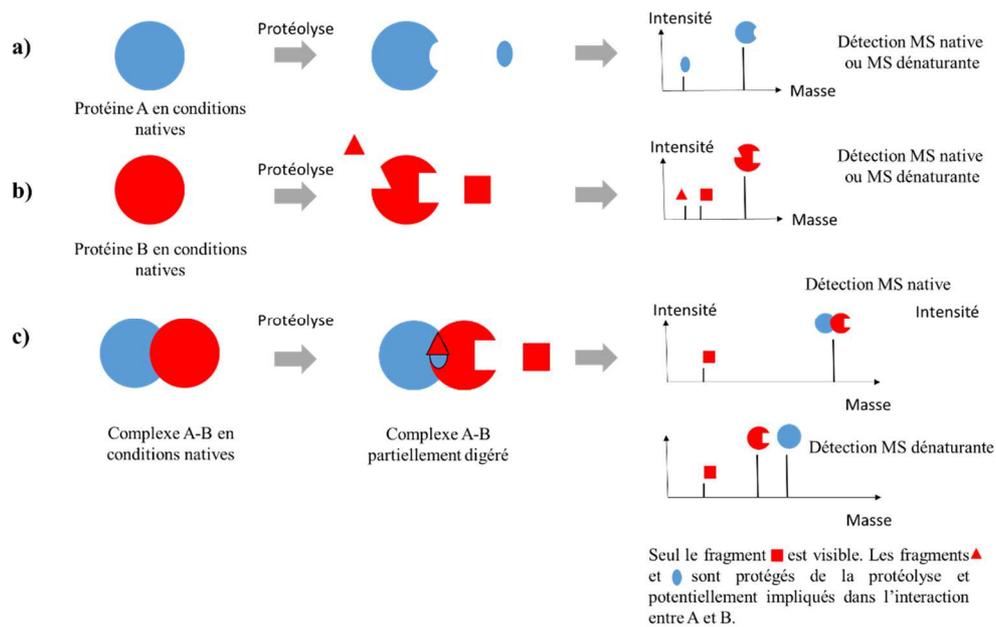
## 4. Les autres techniques de MS structurale.

### 4.1. Le pontage chimique.

Le pontage covalent d'un complexe (*Cross-Linking*) est réalisé à l'aide d'agents dits pontants (appelés « cross-linker ») qui possèdent deux groupements fonctionnels réagissant avec des acides aminés spécifiques<sup>105</sup>. Ces groupements sont séparés par un bras espaceur de longueur définie permettant ainsi d'évaluer la distance entre les deux acides aminés pontés. Suite à cette réaction, les protéines sont dénaturées, digérées à l'aide d'une enzyme acide et analysées par LC-MS/MS afin d'identifier les peptides pontés et ainsi localiser les domaines d'interaction ou spatialement proches entre les deux partenaires du complexe étudié. L'obstacle majeur de cette technique réside dans l'interprétation des données car retrouver les peptides pontés parmi tous les peptides détectés reste délicat. Afin de faciliter l'identification et la validation de ces peptides d'intérêt, le groupe du Dr. Andrea Sinz a récemment développé des agents pontants clivables<sup>106-107</sup> lors de la fragmentation CID qui permettent d'obtenir un doublet caractéristique, facilement repérable, sur les spectres MS/MS. Cette technique a également été utilisée *in vivo* pour la caractérisation d'interactions protéine-protéine sur un tissu biologique provenant d'un cœur de souris<sup>108</sup>.

### 4.2. La protéolyse ménagée.

La protéolyse ménagée est basée sur le principe que les informations structurales d'un complexe protéique peuvent être déterminées à partir de sa faculté à se protéger contre la digestion d'une protéase<sup>109 110</sup> (trypsine, chymotrypsine, Asp-N, protéinase K, Glu-C, Lys-C). En effet, par exemple, les régions de contact entre les différents partenaires protéiques<sup>111</sup> sont protégées de la protéolyse (figure 15) contrairement aux zones exposées au solvant ou à des zones flexibles qui sont préférentiellement digérées. La digestion du complexe peut ainsi être suivie au cours du temps afin de déterminer les régions essentielles au maintien de l'interaction entre les deux partenaires. Il est également possible d'observer des régions non digérées lorsque les protéines sont exposées seules à la protéase mais digérées lorsque les protéines sont en complexe : cela peut être le cas lors de changements conformationnels induits par la fixation d'un partenaire protéique<sup>112</sup>. Les écueils principaux de cette technique sont le retraitement des données qui est manuel et l'optimisation du temps de protéolyse nécessaire pour observer des différences de digestion entre la protéine seule ou en complexe. De plus, la comparaison de l'état apo et de l'état holo nécessite la disponibilité des protéines apo, ce n'est pas toujours possible car certaines protéines ne sont stables qu'en complexe.



**Figure 15.** Représentation schématique d'une expérience de protéolyse ménagée pour la caractérisation de la zone d'interaction entre une protéine A complexée avec une protéine B.

### 4.3. Le marquage radicalaire.

Outre l'HDX-MS, d'autres approches de marquage de surface sont utilisées en MS structurale comme le marquage radicalaire appelé *Hydroxyl Radical Footprinting* ou *Fast Photochemical Oxidation of Proteins*<sup>113</sup>. Le principe de ces techniques<sup>114</sup> repose sur la formation de radicaux HO<sup>•</sup> par photolyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou radiolyse de l'eau qui vont permettre l'oxydation des chaînes latérales de la protéine ou du complexe d'intérêt. Cette oxydation est réalisée en conditions natives et permet d'évaluer l'accessibilité au solvant des domaines étudiés en complexe ou non. Ces approches sont, comme l'HDX-MS, des approches comparatives.

## ***CONCLUSION DE CETTE PARTIE***

Lors de cette première partie introductive, la nature et l'importance des interactions non-covalentes régissant les complexes protéiques ont été rappelées. Les informations accessibles et les principes des techniques biophysiques majeures pour la caractérisation de ces édifices supramoléculaires ont été détaillés dans le premier chapitre. Le chapitre 2 a été dédié à une présentation des techniques de MS structurale et des avancées majeures historiques réalisées dans le domaine de la MS native et de l'IM-MS en amont de ce travail de thèse.

Aujourd'hui, les techniques de MS structurale sont appliquées pour la caractérisation de complexes protéiques de tailles très hétérogènes de la dizaine de kDa au MDa. Ces complexes sont solubles dans des tampons aqueux et analysables par MS native et/ou IM-MS après une étape d'échange de tampon afin par exemple de déterminer leur état d'oligomérisation ou évaluer leur conformation. En revanche, les protéines hydrophobes comme les protéines membranaires sont peu solubles dans de tels tampons et nécessitent l'emploi d'agents de solubilisation pour être étudiés par les techniques biophysiques. Ces agents de solubilisation peuvent entraver leur caractérisation et nécessitent des précautions particulières. Les précautions nécessaires sont présentées dans la Partie 2 du manuscrit.

L'IM-MS native permet d'évaluer la conformation des protéines en phase gazeuse, cependant elle souffre d'une faible résolution notamment la technologie TWIMS. Une approche complémentaire nommée *Collision Induced Unfolding* a été décrite comme permettant la différenciation d'isotypes d'anticorps grâce à une comparaison des profils de déstructuration. Les potentialités de cette approche ont été étudiées dans ce travail de thèse et sont présentées en Partie 3 du manuscrit.

Enfin, la MS native et l'IM-MS ont été appliquées pour la caractérisation de complexes protéiques solubles divers en Partie 4 du manuscrit.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Frieden, E., Non-covalent interactions. Key to biological flexibility and specificity. *J Chem Educ* **1975**, 52 (12), 754-6.
2. Lehn, J. M., Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices. *Angew Chem Int Edit* **1988**, 27 (1), 89-112.
3. Naray-Szabo, G., Analysis of molecular recognition: steric electrostatic and hydrophobic complementarity. *J Mol Recognit* **1993**, 6 (4), 205-10.
4. Stojko, J. Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macromolécules et de leurs complexes associés. 2016.
5. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. 2nd Edition ed.; 1992.
6. Kronberg, B., The hydrophobic effect. *Curr Opin Colloid In* **2016**, 22, 14-22.
7. Bich, C.; Baer, S.; Jecklin, M. C.; Zenobi, R., Probing the hydrophobic effect of noncovalent complexes by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, 21 (2), 286-9.
8. Fekete, S.; Beck, A.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D., Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, 101, 161-73.
9. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S., Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **2012**, 35 (20), 2923-2950.
10. Folta-Stogniew, E., Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors. *Methods Mol Biol* **2006**, 328, 97-112.
11. Korasick, D. A.; Tanner, J. J., Determination of protein oligomeric structure from small-angle X-ray scattering. *Protein Sci* **2018**, 27 (4), 814-824.
12. Mertens, H. D. T.; Svergun, D. I., Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol* **2010**, 172 (1), 128-141.
13. Tuukkanen, A. T.; Svergun, D. I., Weak protein-ligand interactions studied by small-angle X-ray scattering. *Febs J* **2014**, 281 (8), 1974-1987.
14. Douzi, B., Protein-Protein Interactions: Surface Plasmon Resonance. *Methods Mol Biol* **2017**, 1615, 257-275.
15. Drescher, D. G.; Ramakrishnan, N. A.; Drescher, M. J., Surface plasmon resonance (SPR) analysis of binding interactions of proteins in inner-ear sensory epithelia. *Methods Mol Biol* **2009**, 493, 323-43.
16. Torrerri, P.; Ceccarini, M.; Macioce, P.; Petrucci, T. C., Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann Ist Super Sanita* **2005**, 41 (4), 437-41.
17. Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T., Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **1999**, 19 (2), 213-21.
18. Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S. A.; Freire, E., Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol* **2015**, 1278, 183-204.
19. Yennawar, N. H.; Fecko, J. A.; Showalter, S. A.; Bevilacqua, P. C., A High-Throughput Biological Calorimetry Core: Steps to Startup, Run, and Maintain a Multiuser Facility. *Methods Enzymol* **2016**, 567, 435-60.
20. Jameson, D. M.; Seifried, S. E., Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods* **1999**, 19 (2), 222-33.
21. Rossi, A. M.; Taylor, C. W., Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nat Protoc* **2011**, 6 (3), 365-87.
22. Yan, Y. L.; Marriott, G., Analysis of protein interactions using fluorescence technologies. *Drug Discovery Today* **2004**, 9 (2), S27-S31.
23. Banerjee, P.; Ghosh, S.; Sarkar, A.; Bhattacharya, S. C., Fluorescence resonance energy transfer A promising tool for investigation of the interaction between 1-anthracene sulphonate and serum albumins. *J Lumin* **2011**, 131 (2), 316-321.
24. Truong, K.; Ikura, M., The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struc Biol* **2001**, 11 (5), 573-578.
25. Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M., Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *Febs J* **2008**, 275 (1), 1-21.

26. Ennifar, E., X-ray Crystallography as a Tool for Mechanism-of-Action Studies and Drug Discovery. *Curr Pharm Biotechno* **2013**, *14* (5), 537-550.
27. Jacobson, K. A.; Costanzi, S., New Insights for Drug Design from the X-Ray Crystallographic Structures of G-Protein-Coupled Receptors. *Mol Pharmacol* **2012**, *82* (3), 361-371.
28. Ehrmann, F. R.; Stojko, J.; Metz, A.; Debaene, F.; Barandun, L. J.; Heine, A.; Diederich, F.; Cianferani, S.; Reuter, K.; Klebe, G., Soaking suggests " alternative facts " : Only cocrystallization discloses major ligand-induced interface rearrangements of a homodimeric tRNA-binding protein indicating a novel mode-of-inhibition. *Plos One* **2017**, *12* (4).
29. Chruszcz, M.; Wlodawer, A.; Minor, W., Determination of protein structures - A series of fortunate events. *Biophys J* **2008**, *95* (1), 1-9.
30. Canet, D., *LA RMN. Concepts et méthodes*. 1991.
31. Kleckner, I. R.; Foster, M. P., An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1814* (8), 942-68.
32. Sugiki, T.; Kobayashi, N.; Fujiwara, T., Modern Technologies of Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Three-dimensional Structure Determination of Proteins Open Avenues for Life Scientists. *Comput Struct Biotechnol J* **2017**, *15*, 328-339.
33. Zhao, X., Protein structure determination by solid-state NMR. *Top Curr Chem* **2012**, *326*, 187-213.
34. Baker, L. A.; Sinnige, T.; Schellenberger, P.; de Keyzer, J.; Siebert, C. A.; Driessen, A. J. M.; Baldus, M.; Grunewald, K., Combined (1)H-Detected Solid-State NMR Spectroscopy and Electron Cryotomography to Study Membrane Proteins across Resolutions in Native Environments. *Structure* **2018**, *26* (1), 161-170 e3.
35. Murata, K.; Wolf, M., Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2018**, *1862* (2), 324-334.
36. Khoshouei, M.; Radjainia, M.; Baumeister, W.; Danev, R., Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 angstrom determined with the Volta phase plate. *Nat Commun* **2017**, *8*.
37. Leney, A. C.; Heck, A. J. R., Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J Am Soc Mass Spectr* **2017**, *28* (1), 5-13.
38. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D., Detection of Noncovalent Receptor Ligand Complexes by Mass-Spectrometry. *J Am Chem Soc* **1991**, *113* (16), 6294-6296.
39. Katta, V.; Chait, B. T., Observation of the Heme Globin Complex in Native Myoglobin by Electrospray-Ionization Mass-Spectrometry. *J Am Chem Soc* **1991**, *113* (22), 8534-8535.
40. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246* (4926), 64-71.
41. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**, *60* (20), 2299-301.
42. Saudemont, P.; Quanico, J.; Robin, Y. M.; Baud, A.; Balog, J.; Fatou, B.; Tierny, D.; Pascal, Q.; Minier, K.; Pottier, M.; Focsa, C.; Ziskind, M.; Takats, Z.; Salzet, M.; Fournier, I., Real-Time Molecular Diagnosis of Tumors Using Water-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Technology. *Cancer Cell* **2018**, *34* (5), 840-+.
43. Fatou, B.; Saudemont, P.; Leblanc, E.; Vinatier, D.; Mesdag, V.; Wisztorski, M.; Focsa, C.; Salzet, M.; Ziskind, M.; Fournier, I., In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application. *Sci Rep* **2016**, *6*, 25919.
44. Wilm, M.; Mann, M., Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry* **1996**, *68* (1), 1-8.
45. Schultz, G. A.; Corso, T. N.; Prosser, S. J.; Zhang, S., A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry. *Anal Chem* **2000**, *72* (17), 4058-63.
46. Van Pelt, C. K.; Zhang, S.; Henion, J. D., Characterization of a fully automated nanoelectrospray system with mass spectrometric detection for proteomic analyses. *J Biomol Tech* **2002**, *13* (2), 72-84.
47. <https://advion.com/products/triversa-nanomate/> (accessed 03 avril 2019).
48. Sobott, F.; Hernandez, H.; McCammon, M. G.; Tito, M. A.; Robinson, C. V., A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Anal Chem* **2002**, *74* (6), 1402-7.
49. Tahallah, N.; Pinkse, M.; Maier, C. S.; Heck, A. J., The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2001**, *15* (8), 596-601.

50. Makarov, A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* **2000**, 72 (6), 1156-1162.
51. Rose, R. J.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Heck, A. J., High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies. *Nat Methods* **2012**, 9 (11), 1084-6.
52. Dyachenko, A.; Wang, G.; Belov, M.; Makarov, A.; de Jong, R. N.; van den Bremer, E. T.; Parren, P. W.; Heck, A. J., Tandem Native Mass-Spectrometry on Antibody-Drug Conjugates and Submillion Da Antibody-Antigen Protein Assemblies on an Orbitrap EMR Equipped with a High-Mass Quadrupole Mass Selector. *Anal Chem* **2015**, 87 (12), 6095-102.
53. Rostom, A. A.; Robinson, C. V., Detection of the intact GroEL chaperonin assembly by mass spectrometry. *J Am Chem Soc* **1999**, 121 (19), 4718-4719.
54. Sanglier, S.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Zal, F., Comparative ESI-MS study of approximately 2.2 MDa native hemocyanins from deep-sea and shore crabs: from protein oligomeric state to biotope. *J Am Soc Mass Spectrom* **2003**, 14 (5), 419-29.
55. Snijder, J.; Rose, R. J.; Veessler, D.; Johnson, J. E.; Heck, A. J., Studying 18 MDa virus assemblies with native mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52 (14), 4020-3.
56. El-Hawiet, A.; Kitova, E. N.; Klassen, J. S., Quantifying Carbohydrate-Protein Interactions by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis. *Biochemistry* **2012**, 51 (21), 4244-4253.
57. Gabelica, V.; Galic, N.; Rosu, F.; Houssier, C.; De Pauw, E., Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2003**, 38 (5), 491-501.
58. Loo, R. R. O.; Goodlett, D. R.; Smith, R. D.; Loo, J. A., Observation of a Noncovalent Ribonuclease S-Protein S-Peptide Complex by Electrospray Ionization Mass-Spectrometry. *J Am Chem Soc* **1993**, 115 (10), 4391-4392.
59. Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A., Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5 (7), 585-95.
60. Stojko, J.; Fioulaine, S.; Petiot-Becard, S.; Van Dorsselaer, A.; Meinel, T.; Giglione, C.; Cianferani, S., Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *Analyst* **2015**, 140 (21), 7234-45.
61. El-Kabbani, O.; Rogniaux, H.; Barth, P.; Chung, R. P.; Fletcher, E. V.; Van Dorsselaer, A.; Podjarny, A., Aldose and aldehyde reductases: correlation of molecular modeling and mass spectrometric studies on the binding of inhibitors to the active site. *Proteins* **2000**, 41 (3), 407-14.
62. Atmanene, C. Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire. 2009.
63. Urban, J.; Afseth, N. K.; Stys, D., Fundamental definitions and confusions in mass spectrometry about mass assignment, centroiding and resolution. *Trac-Trend Anal Chem* **2014**, 53, 126-136.
64. Eiceman, G. A. K., Z.; Hill, H.H., *Ion mobility spectrometry*. 2014.
65. Fernandez-Lima, F., Trapped Ion Mobility Spectrometry: past, present and future trends. *Int J Ion Mobil Spec* **2016**, 19 (2-3), 65-67.
66. Garabedian, A.; Benigni, P.; Ramirez, C. E.; Baker, E. S.; Liu, T.; Smith, R. D.; Fernandez-Lima, F., Towards Discovery and Targeted Peptide Biomarker Detection Using nanoESI-TIMS-TOF MS. *J Am Soc Mass Spectr* **2018**, 29 (5), 817-826.
67. Meier, F.; Brunner, A. D.; Koch, S.; Koch, H.; Lubeck, M.; Krause, M.; Goedecke, N.; Decker, J.; Kosinski, T.; Park, M. A.; Bache, N.; Hoerning, O.; Cox, J.; Rather, O.; Mann, M., Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **2018**, 17 (12), 2534-2545.
68. Michelmann, K.; Silveira, J. A.; Ridgeway, M. E.; Park, M. A., Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2015**, 26 (1), 14-24.
69. Cooper, H. J., To What Extent is FAIMS Beneficial in the Analysis of Proteins? *J Am Soc Mass Spectr* **2016**, 27 (4), 566-577.
70. Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T., Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Anal Chem* **2010**, 82 (22), 9557-65.
71. Gabelica, V.; Shvartsburg, A. A.; Afonso, C.; Barran, P.; Benesch, J. L. P.; Bleiholder, C.; Bowers, M. T.; Bilbao, A.; Bush, M. F.; Campbell, J. L.; Campuzano, I. D. G.; Causon, T.; Clowers, B. H.; Creaser, C. S.; De Pauw, E.; Far, J.; Fernandez-Lima, F.; Fjeldsted, J. C.; Giles, K.; Groessl, M.; Hogan, C. J., Jr.; Hann, S.;

- Kim, H. I.; Kurulugama, R. T.; May, J. C.; McLean, J. A.; Pagel, K.; Richardson, K.; Ridgeway, M. E.; Rosu, F.; Sobott, F.; Thalassinou, K.; Valentine, S. J.; Wytenbach, T., Recommendations for reporting ion mobility Mass Spectrometry measurements. *Mass Spectrom Rev* **2019**.
72. . 3 Types of IMS: An At-a-Glance Guide 2017. (accessed 06 février 2019).
73. May, J. C.; Goodwin, C. R.; Lareau, N. M.; Leaptrot, K. L.; Morris, C. B.; Kurulugama, R. T.; Mordehai, A.; Klein, C.; Barry, W.; Darland, E.; Overney, G.; Imatani, K.; Stafford, G. C.; Fjeldsted, J. C.; McLean, J. A., Conformational ordering of biomolecules in the gas phase: nitrogen collision cross sections measured on a prototype high resolution drift tube ion mobility-mass spectrometer. *Anal Chem* **2014**, *86* (4), 2107-16.
74. Giles, K.; Pringle, S. D.; Worthington, K. R.; Little, D.; Wildgoose, J. L.; Bateman, R. H., Applications of a travelling wave-based radio-frequency only stacked ring ion guide. *Rapid Commun Mass Sp* **2004**, *18* (20), 2401-2414.
75. Giles, K.; Williams, J. P.; Campuzano, I., Enhancements in travelling wave ion mobility resolution. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2011**, *25* (11), 1559-66.
76. May, J. C.; McLean, J. A., Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation. *Anal Chem* **2015**, *87* (3), 1422-36.
77. Von Helden, G.; Hsu, M. T.; Gotts, N.; Bowers, M. T., Carbon Cluster Cations with up to 84 Atoms - Structures, Formation Mechanism, and Reactivity. *J Phys Chem-Us* **1993**, *97* (31), 8182-8192.
78. Jarrold, M. F., Unfolding, refolding, and hydration of proteins in the gas phase. *Accounts of Chemical Research* **1999**, *32* (4), 360-367.
79. Wytenbach, T.; Bleiholder, C.; Anderson, S. E.; Bowers, M. T., A new algorithm to characterise the degree of concaveness of a molecular surface relevant in ion mobility spectrometry. *Mol Phys* **2015**, *113* (15-16), 2344-2349.
80. Bleiholder, C.; Contreras, S.; Bowers, M. T., A novel projection approximation algorithm for the fast and accurate computation of molecular collision cross sections (IV). Application to polypeptides. *Int J Mass Spectrom* **2013**, *354*, 275-280.
81. Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F., An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions. *Chem Phys Lett* **1996**, *261* (1-2), 86-91.
82. Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F., Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential. *J Phys Chem-Us* **1996**, *100* (40), 16082-16086.
83. Marklund, E. G.; Degiacomi, M. T.; Robinson, C. V.; Baldwin, A. J.; Benesch, J. L., Collision cross sections for structural proteomics. *Structure* **2015**, *23* (4), 791-9.
84. Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L.; Sandercock, A. M.; Hyung, S. J.; Robinson, C. V., Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat Protoc* **2008**, *3* (7), 1139-52.
85. Gray, C. J.; Thomas, B.; Upton, R.; Migas, L. G.; Eyers, C. E.; Barran, P. E.; Flitsch, S. L., Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1860* (8), 1688-709.
86. Scarff, C. A.; Patel, V. J.; Thalassinou, K.; Scrivens, J. H., Probing Hemoglobin Structure by Means of Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr* **2009**, *20* (4), 625-631.
87. Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D., Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry. *Anal Chem* **2008**, *80* (24), 9689-99.
88. Uetrecht, C.; Rose, R. J.; van Duijn, E.; Lorenzen, K.; Heck, A. J., Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (5), 1633-55.
89. Jenner, M.; Ellis, J.; Huang, W. C.; Lloyd Raven, E.; Roberts, G. C.; Oldham, N. J., Detection of a protein conformational equilibrium by electrospray ionisation-ion mobility-mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50* (36), 8291-4.
90. Van der Rest, G.; Rezaei, H.; Halgand, F., Monitoring Conformational Landscape of Ovine Prion Protein Monomer Using Ion Mobility Coupled to Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2017**, *28* (2), 303-314.
91. Uetrecht, C.; Barbu, I. M.; Shoemaker, G. K.; van Duijn, E.; Heck, A. J., Interrogating viral capsid assembly with ion mobility-mass spectrometry. *Nat Chem* **2011**, *3* (2), 126-32.
92. Atmanene, C.; Petiot-Becard, S.; Zeyer, D.; Van Dorsseleer, A.; Vivat Hannah, V.; Sanglier-Cianferani, S., Exploring key parameters to detect subtle ligand-induced protein conformational changes using traveling wave ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (11), 4703-10.

93. Hopper, J. T.; Oldham, N. J., Collision induced unfolding of protein ions in the gas phase studied by ion mobility-mass spectrometry: the effect of ligand binding on conformational stability. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20* (10), 1851-8.
94. Zhong, Y.; Han, L.; Ruotolo, B. T., Collisional and Coulombic unfolding of gas-phase proteins: high correlation to their domain structures in solution. *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53* (35), 9209-12.
95. Engen, J. R., Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Anal Chem* **2009**, *81* (19), 7870-5.
96. Clemençon, B. Etude conformationnelle de protéines membranaires mitochondriales modèles chez *Saccharomyces cerevisiae* : Analyses des relations structure/fonction du transporteur d'ADP/ATP et de l'accessibilité au solvant de la porine VDAC. 2011.
97. Houde, D.; Arndt, J.; Domeier, W.; Berkowitz, S.; Engen, J. R., Characterization of IgG1 conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* **2009**, *81* (7), 2644-51.
98. Hvidt, A.; Linderstrom-Lang, K., Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions. *Biochim Biophys Acta* **1954**, *14* (4), 574-5.
99. Huang, R. Y.; Iacob, R. E.; Krystek, S. R.; Jin, M.; Wei, H.; Tao, L.; Das, T. K.; Tymiak, A. A.; Engen, J. R.; Chen, G., Characterization of Aggregation Propensity of a Human Fc-Fusion Protein Therapeutic by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2017**, *28* (5), 795-802.
100. Pirrone, G. F.; Iacob, R. E.; Engen, J. R., Applications of hydrogen/deuterium exchange MS from 2012 to 2014. *Anal Chem* **2015**, *87* (1), 99-118.
101. Brier, S.; Le Mignon, M.; Jain, K.; Lebrun, C.; Peurois, F.; Kellenberger, C.; Bordas-Le Floch, V.; Mascarell, L.; Nony, E.; Moingeon, P., Characterization of epitope specificities of reference antibodies used for the quantification of the birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy* **2018**, *73* (5), 1032-1040.
102. Bai, Y.; Milne, J. S.; Mayne, L.; Englander, S. W., Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **1993**, *17* (1), 75-86.
103. Wales, T. E.; Fadgen, K. E.; Eggertson, M. J.; Engen, J. R., Subzero Celsius separations in three-zone temperature controlled hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2017**, *1523*, 275-282.
104. Venable, J. D.; Okach, L.; Agarwalla, S.; Brock, A., Subzero temperature chromatography for reduced back-exchange and improved dynamic range in amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (21), 9601-8.
105. Sinz, A., Cross-Linking/Mass Spectrometry for Studying Protein Structures and Protein-Protein Interactions: Where Are We Now and Where Should We Go from Here? *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57* (22), 6390-6396.
106. Arlt, C.; Gotze, M.; Ihling, C. H.; Hage, C.; Schafer, M.; Sinz, A., Integrated Workflow for Structural Proteomics Studies Based on Cross-Linking/Mass Spectrometry with an MS/MS Cleavable Cross-Linker. *Anal Chem* **2016**, *88* (16), 7930-7.
107. Iacobucci, C.; Gotze, M.; Ihling, C. H.; Piotrowski, C.; Arlt, C.; Schafer, M.; Hage, C.; Schmidt, R.; Sinz, A., A cross-linking/mass spectrometry workflow based on MS-cleavable cross-linkers and the MeroX software for studying protein structures and protein-protein interactions. *Nat Protoc* **2018**, *13* (12), 2864-2889.
108. Chavez, J. D.; Lee, C. F.; Caudal, A.; Keller, A.; Tian, R.; Bruce, J. E., Chemical Crosslinking Mass Spectrometry Analysis of Protein Conformations and Supercomplexes in Heart Tissue. *Cell Syst* **2018**, *6* (1), 136-141 e5.
109. Spolaore, B.; Bermejo, R.; Zambonin, M.; Fontana, A., Protein interactions leading to conformational changes monitored by limited proteolysis: apo form and fragments of horse cytochrome c. *Biochemistry* **2001**, *40* (32), 9460-8.
110. Polverino de Laureto, P.; Frare, E.; Gottardo, R.; Van Dael, H.; Fontana, A., Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: a comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Sci* **2002**, *11* (12), 2932-46.
111. Shields, S. J.; Oyeyemi, O.; Lightstone, F. C.; Balhorn, R., Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. *J Am Soc Mass Spectrom* **2003**, *14* (5), 460-70.
112. Ramasamy, V.; Ramakrishnan, B.; Boeggeman, E.; Qasba, P. K., The role of tryptophan 314 in the conformational changes of beta1,4-galactosyltransferase-I. *J Mol Biol* **2003**, *331* (5), 1065-76.

113. Li, K. S.; Shi, L.; Gross, M. L., Mass Spectrometry-Based Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) for Higher Order Structure Characterization. *Acc Chem Res* **2018**, *51* (3), 736-744.
114. Kiselar, J.; Chance, M. R., High-Resolution Hydroxyl Radical Protein Footprinting: Biophysics Tool for Drug Discovery. *Annu Rev Biophys* **2018**.

***PARTIE 2 : DÉVELOPPEMENT DE  
METHODOLOGIES DE MS STRUCTURALE  
POUR LA CARACTERISATION DE PROTÉINES  
MEMBRANAIRES EN MILIEU DÉTERGENT.***



## ***PARTIE 2 : DÉVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES DE MS STRUCTURALE POUR LA CARACTERISATION DE PROTÉINES MEMBRANAIRES EN MILIEU DÉTERGENT.***

Cette partie est dédiée à la caractérisation de protéines membranaires en milieu détergent principalement par MS native et HDX-MS. Après une introduction sur les protéines membranaires, les difficultés liées à leur caractérisation par les techniques de MS structurales utilisées lors de ce travail de thèse sont détaillées. La préparation d'échantillon et l'optimisation instrumentale nécessaires pour la caractérisation de ces protéines en milieu détergent sont les points discutés dans cette partie au travers de trois exemples d'application.

**Chapitre 1 : État de l'art de la caractérisation des protéines membranaires par MS structurale.**

**Chapitre 2 : Caractérisation d'une protéine membranaire à un domaine transmembranaire par MS native et HDX-MS : cas de la lipase ABHD.**

**Chapitre 3 : Caractérisation d'une protéine membranaire à sept domaines transmembranaires par MS native : cas du récepteur à l'adénosine.**

**Chapitre 4 : Bénéfices de la SEC-MS/IM-MS native pour la caractérisation du peptide amyloïde A $\beta$ 42 en milieu détergent.**

# ***CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART DE LA CARACTÉRISATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES PAR MS STRUCTURALE.***

## **1. Les protéines membranaires (PMs) : description et intérêt thérapeutique.**

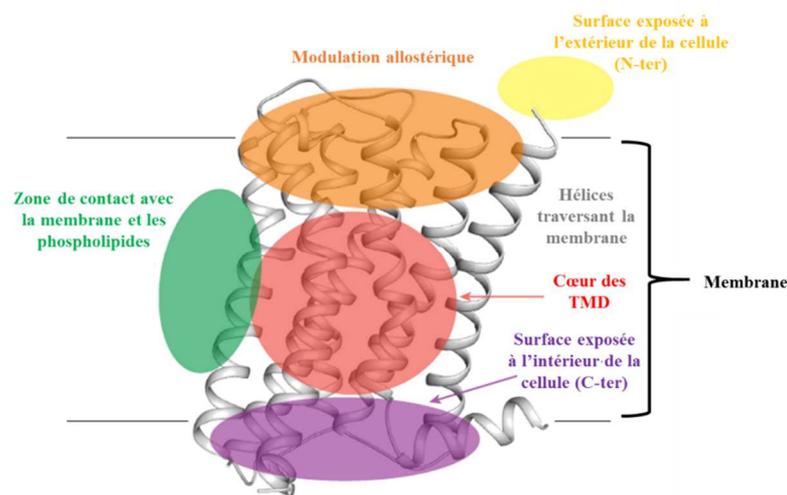
### **1.1. Généralités sur les protéines membranaires.**

Les protéines membranaires représentent les cibles de plus de 50% des drogues développées aujourd'hui<sup>1-3</sup>. Elles sont, en effet, les portes d'entrée cellulaires pour les substrats et les médicaments et sont à ce titre une classe importante de cibles thérapeutiques. Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions comme la transduction du signal, la reconnaissance intercellulaire mais aussi indispensables aux phénomènes de transport passif ou actif de molécules comme l'ATP ou les sels à travers la membrane. Elles agissent par des interactions avec de nombreuses entités comme d'autres protéines, des métabolites ou encore des petites molécules avec leur surface<sup>4</sup>. Il est possible de les distinguer en fonction de leur structure et leur mode d'action. Trois types majeurs de PMs peuvent ainsi être différenciés<sup>5</sup> : les récepteurs à activité enzymatique (lipases, kinases, etc.), les canaux ioniques (canaux à sodium, calcium, etc.) et les récepteurs couplés aux protéines G. Les PMs sont des protéines également très diverses en termes de polarité et structure. Elles peuvent être classées en deux grandes familles :

- Les protéines intégralement enchâssées dans la membrane aussi appelées ***integral membrane proteins*** (IMPs) : elles traversent la membrane cellulaire et lui sont attachées de manière permanente. Le cœur d'une IMP est souvent polaire contrairement à sa périphérie qui est composée d'acides aminés non polaires en interaction avec les phospholipides qui composent la bicouche lipidique de la membrane. Les IMPs peuvent adopter deux structures secondaires typiques :
  - Sous la forme d'une hélice ou plusieurs hélices alpha comme dans le cas de nombreuses enzymes, transporteurs et récepteurs.
  - Sous la forme de tonneaux beta (*beta barrel*), forme souvent retrouvée dans les PMs servant de canaux ioniques.
- Les protéines périphériques à la membrane appelées ***peripheral proteins*** sont des protéines qui sont en interaction non-covalentes avec la membrane de manière transitoire comme les GTPases<sup>6</sup>.

## 1.2. Cas des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).

Au niveau de leur structure, les RCPGs sont des protéines classées comme intégralement enchâssées dans la membrane et partagent une architecture commune comprenant sept hélices alpha transmembranaires hydrophobes reliées par trois boucles extracellulaires (*extracellular loops*) et trois boucles intracellulaires (*intracellular loops*). Les extrémités N- et C- terminales sont respectivement situées à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule et leurs longueurs sont très variables<sup>7</sup>. La fixation d'une molécule sur la zone extracellulaire exposée entraîne un changement conformationnel du RCPG à l'échelle entière et est à l'origine soit de son activation ou au contraire de son inhibition (figure 1).



**Figure 1.** Représentation schématique d'un RCPG, modifiée de<sup>8</sup>. Les zones exposées à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule sont respectivement représentées en orange (zone du changement conformationnel induit par la fixation de partenaires), jaune (surface exposée à l'extérieur de la cellule correspondant à l'extrémité N-terminale) et violet (surface exposée à l'intérieur de la cellule correspondant à l'extrémité C-terminale). Les domaines transmembranaires (TMDs) du RCPG sont des hélices traversant intégralement la membrane (rouge) en contact les phospholipides qui la composent (vert).

L'activation ou l'inhibition de nombreux RCPGs par des partenaires protéiques ou des ligands est encore peu ou mal connue à cause notamment des difficultés de caractérisation liées à leur nature hydrophobe<sup>9</sup>.

## 2. Les stratégies de solubilisation et leur compatibilité avec les techniques de MS structurale.

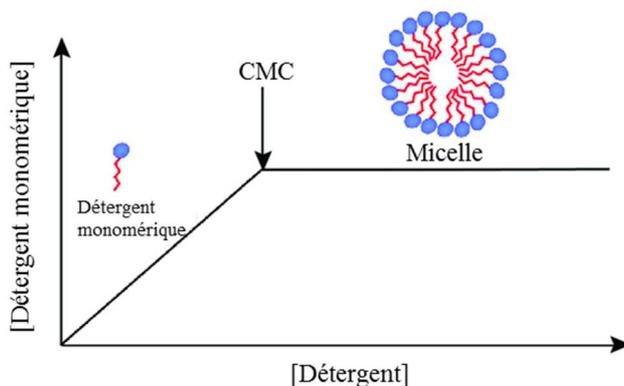
L'étude des protéines membranaires est plus difficile que l'étude de protéines solubles à cause notamment des faibles quantités produites par les systèmes d'expressions adaptés mais surtout de leur nature hydrophobe qui nécessite l'utilisation d'agents de solubilisation.

De nombreuses stratégies de solubilisation adaptées aux PMs existent dans la littérature. Les principales stratégies mettent en jeu l'utilisation d'un ou plusieurs agents de solubilisation dont la capacité à mimer l'environnement membranaire est largement discutée par la communauté scientifique et peut être protéine dépendant<sup>10</sup>. Chaque système et sa compatibilité avec les techniques de MS structurale est discuté ci-après.

### 2.1. L'utilisation de détergents pour la caractérisation de PMs.

#### 2.1.1. Les détergents.

De manière historique, les détergents sont les premières molécules à avoir été utilisées pour l'extraction et la solubilisation des PMs de leur membrane<sup>11-12</sup>. Les détergents sont des molécules dites amphiphiles<sup>13</sup> : elles sont constituées d'une tête hydrophile (polaire) et d'une queue hydrophobe (apolaire). Cette propriété leur permet de s'insérer dans la membrane et de rompre les interactions entre les lipides de la membrane et la PM pour ensuite former des complexes PM/détergent. La concentration en détergent doit atteindre une valeur dite critique pour la formation de micelles qui sont des autoassemblages sphériques de détergent: il s'agit de la concentration micellaire critique (CMC) qui dépend de la nature du détergent et de la force ionique de la solution<sup>14</sup>. En dessous de la CMC, les détergents sont sous forme monomérique (figure 2).



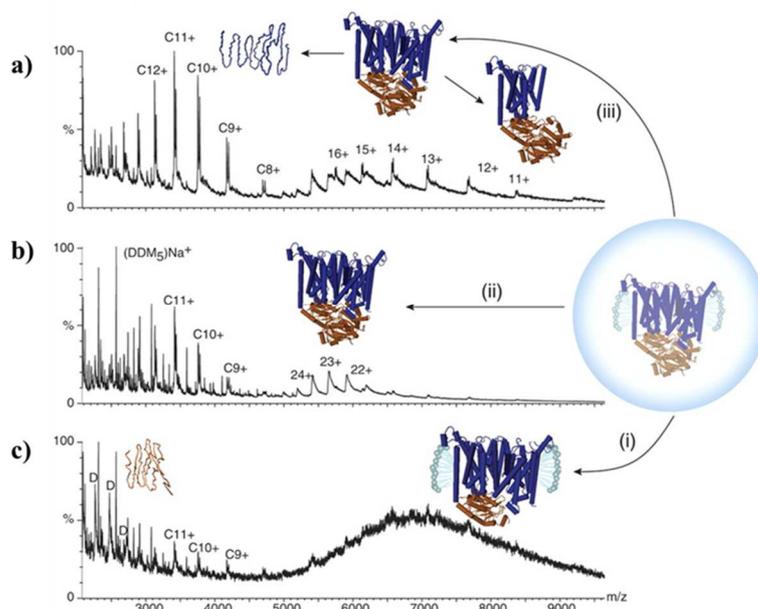
**Figure 2.** Formation d'une micelle de détergent, graphique extrait et modifié de<sup>15</sup>. La tête polaire et le corps apolaire du détergent sont respectivement représentés par un cercle bleu et un trait rouge.

Les détergents peuvent être divisés en trois catégories :

- Les détergents ioniques, comme le laurylsulfate de sodium (SDS), sont des détergents particulièrement efficaces pour l'extraction des PMs de leur membrane mais ils ne sont pas utilisés dans le cadre d'étude structurale car les interactions protéine-protéine sont rompues en leur présence et la PM ainsi extraite est dénaturée<sup>16-17</sup>. Ces détergents ne sont pas tolérés pour l'analyse de protéines par MS à cause d'une compétition à l'ionisation<sup>18-20</sup>.
- Les détergents zwitterioniques comme le CHAPS sont plus efficaces que les détergents non-ioniques pour l'extraction des PMs et moins agressifs que les détergents ioniques mais ne sont pas utilisés dans le cadre de caractérisations biophysiques<sup>17</sup>.
- Les détergents non-ioniques sont les détergents les plus doux<sup>21</sup> permettant l'extraction des PMs de leur membrane sans les dénaturer ou rompre leurs interactions non-covalentes. Le détergent non ionique le plus utilisé<sup>22-23</sup> dans le cadre d'approches biophysiques est le dodécylmaltoside (DDM).

### **2.1.2. Les détergents non-ioniques pour la caractérisation de PMs par MS native et IM-MS.**

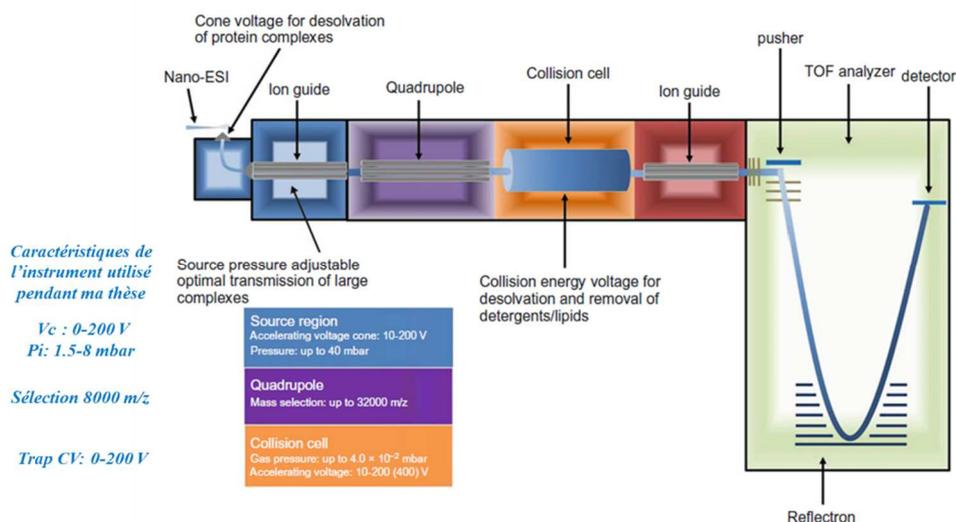
La caractérisation structurale de PMs solubilisées à l'aide des détergents non-ioniques a récemment été étendue à la spectrométrie de masse avec les travaux du Dr. Carol Robinson (Université d'Oxford). En 2008, son équipe a décrit pour la première fois<sup>24</sup> l'utilisation de la MS native pour la caractérisation d'un complexe protéique impliquant deux sous unités transmembranaires (BtuC) et deux sous unités cytoplasmiques (BtuD) solubilisées en DDM (figure 3). Les expériences réalisées sur un Q-TOF 2 modifié pour la transmission et la détection d'ions de hauts rapports  $m/z$ <sup>25</sup> ont permis de montrer la possibilité d'observer le complexe protéique BtuC<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, intact solubilisé dans un tampon 200 mM AcONH<sub>4</sub> contenant 0,10 % m/v DDM soit 10 fois la CMC de ce détergent<sup>12</sup>. Les conditions analytiques utilisées pour la caractérisation de ce complexe sont particulièrement élevées ( $V_c$  : 197 V et trap CV : 200 V) en comparaison avec les conditions habituellement utilisées pour la caractérisation de complexes protéiques solubles ( $V_c$  : 10-100 V et trap CV : 2-20 V) montrant ainsi le rôle protecteur de la micelle de détergent en phase gazeuse. Ce travail a ouvert la voie à la caractérisation des PMs par MS native en milieu détergent.



**Figure 3.** Premier exemple de caractérisation d'une PM solubilisée en DDM, figure extraite et modifiée de<sup>24</sup>. Le complexe protéique BtuC<sub>2</sub>D<sub>2</sub> (transporteur de la vitamine B12) est observé en présence d'une centaine de molécules de DDM fixées (c), l'augmentation du nombre de collisions grâce une accélération progressive du complexe permet l'observation du complexe intact, libéré des molécules de DDM (b) puis dissocié en sous-unités (a).

Suite à ce travail novateur, la préparation d'échantillon et les conditions instrumentales ont été décrites comme les deux étapes clés pour la caractérisation de ces protéines par cette approche<sup>26</sup>. La concentration de détergent minimale à utiliser est d'environ 2 fois la concentration micellaire critique du détergent utilisé, ce ratio de 2 est volontairement choisi afin de s'assurer d'être dans des conditions supérieures à la CMC et de pouvoir ainsi solubiliser la PM. La quantification exacte de détergent complexé avec les protéines membranaires est difficile et nécessite l'utilisation d'un MALDI et la réalisation de gamme d'étalonnage pour chaque détergent<sup>27</sup>.

En terme d'instrumentation, l'appareil le plus utilisé pour la caractérisation de complexes PM/détergent<sup>28</sup> est un appareil de type Q-TOF modifié pour la transmission des complexes protéiques de hautes masses (figure 4). En effet, ces caractéristiques physiques sont différentes de celles des spectromètres de masse commerciaux, comme celui utilisé durant ma thèse. En source la pression peut être augmentée jusqu'à 40 mbar (contre 8 mbar sur notre Synapt G2) pour assurer le maintien des complexes non-covalents, le quadripôle permet la sélection d'ions jusqu'à 32000 m/z (contre 8000 m/z sur notre Synapt G2) et la tension dans la cellule trap (cellule de collision) peut être augmentée jusqu'à 400 V (contre 200 V sur le Synapt G2) pour rompre les interactions PM/détergents.



**Figure 4.** Instrument Q-TOF modifié pour la caractérisation de complexes protéiques de hautes masses et de PMs solubilisées en détergent, extrait et modifié de<sup>28</sup>. Les caractéristiques instrumentales du Synapt G2 utilisé pendant ma thèse sont annotées en bleu.

Suite à cette avancée, plusieurs complexes impliquant des PMs ont pu être caractérisés par MS native. L'examen attentif de la littérature permet d'observer que la majorité des PM étudiées par cette approche sont des porines, PMs repliées sous la forme de tonneau beta<sup>29-33</sup>. La caractérisation conformationnelle de plusieurs de ces protéines<sup>34</sup> a pu être étudiée par mobilité ionique mais reste empirique et dépendante du détergent utilisé. De plus, l'étalonnage en IM-MS réalisé à l'aide de protéines étalons solubles<sup>35</sup>, permettant le calcul de CCS a été décrit comme sous estimant les CCS des PMs due à leur faible charge<sup>36</sup>. Ce constat montre le besoin d'utiliser une procédure d'étalonnage adaptée à ces protéines en utilisant des protéines étalons de préférence elles-mêmes membranaires, non disponibles de manière commerciale. En effet, la nature du détergent induit des interactions plus ou moins fortes avec la PM affectant ainsi les énergies nécessaires à leur dissociation en phase gazeuse<sup>37-38</sup>. L'objectif est de réussir à libérer la PM de sa micelle sans la déstructurer en phase gazeuse en optimisant finement la tension appliquée en cellule trap. Pour cela des détergents non-ioniques plus facilement dissociables des PMs comme le lauryldiméthylamine N-oxide (LDAO) ou le n-octyl-β-D-glucoside (β-OG) ont été utilisés avec succès et présentent des énergies de dissociation inférieures à celles du DDM classiquement utilisé. Outre une dissociation facilitée, les détergents à haute CMC comme le β-OG et le LDAO (dont les CMCs sont respectivement de 0,53% m/v et de 0,023 % m/v) sont connus pour générer des spectres de masse de meilleure qualité<sup>26</sup> que les détergents de plus faibles CMC comme le DDM (0,087% m/v). Le choix du détergent reste cependant souvent conditionné lors d'une étude de biologie structurale par sa capacité à extraire la PM et non dicté par son caractère MS compatible et peut ainsi être un paramètre limitant pour le succès d'une analyse par les approches de

MS native et IM-MS. Cette contradiction a probablement été l'une des raisons pour lesquelles l'essor de la MS native n'a pas eu lieu de manière plus précoce.

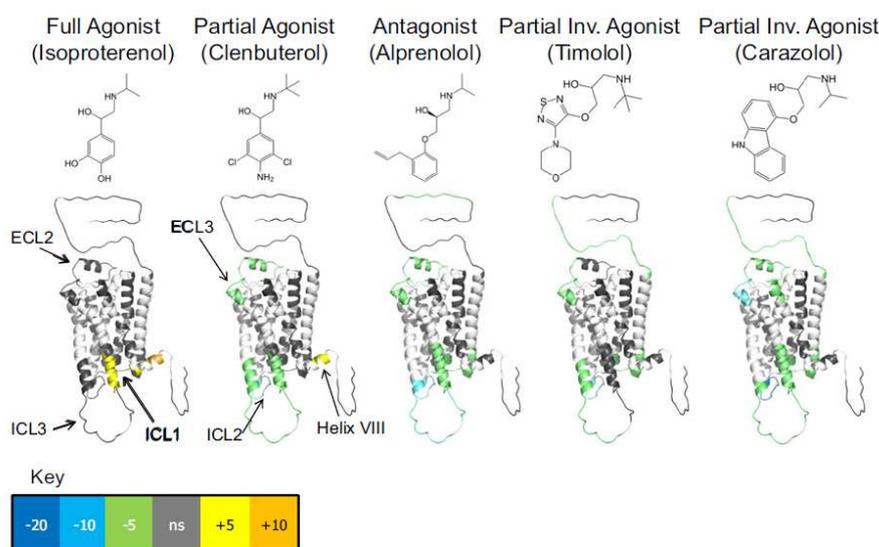
Une stratégie analytique alternative sans détergent consistant à analyser les PMs directement en environnement lipidique a récemment été décrite par le groupe du Dr. Robinson<sup>39</sup>. Les vésicules enrichies en PMs sont soniquées dans un tampon acétate d'ammonium et l'interaction lipides/PMs est rompue sur un instrument Q-Orbitrap modifié également pour la transmission de hauts rapports m/z<sup>40</sup>.

Concernant les RCPGs, protéines composées de sept hélices transmembranaires, elles restent aujourd'hui la famille la plus difficile à caractériser par ces approches probablement en raison d'un plus grand nombre de domaines enchâssés dans la membrane engendrant ainsi une plus forte interaction avec les molécules de détergent en phase gazeuse. À ce jour, un nombre très limité d'études rapportent la caractérisation de ces RCPGs en milieu détergent par MS native, seules ou avec des ligands<sup>41-42</sup> mais aussi en présence d'un nanobody stabilisant sa structure<sup>43</sup>.

### **2.1.3. Les détergents non-ioniques pour la caractérisation de PMs par HDX-MS.**

L'étude des PMs solubilisées en détergents non-ioniques par HDX-MS a permis de suivre les changements conformationnels induits par la fixation de ligands<sup>44</sup> (figure 5) ou de partenaires protéiques<sup>45</sup> dans des conditions d'analyses relativement similaires à celles des protéines solubles. En effet, la protéine étant digérée en peptides à l'aide d'une enzyme, il n'est pas nécessaire d'appliquer de hautes tensions pour rompre l'interaction PM/détergent en phase gazeuse. Plusieurs différences importantes avec l'étude de protéines solubles sont tout de même à noter. Le tampon de deutération doit contenir une concentration de détergent supérieure à la CMC afin de préserver la solubilité de la PM lors de cette étape. La présence de détergents et/ou de lipides résiduels peut engendrer des interférences lors de l'élution des peptides en chromatographie et entraver leur détection par spectrométrie de masse<sup>46</sup>. Les PMs et en particulier les RCPGs, ont été décrites comme difficiles à digérer et nécessitent des temps de deutération plus longs à cause de leur nature hydrophobe<sup>47</sup>. Atteindre un recouvrement de séquence de 100% de la protéine est l'objectif ultime mais est en pratique souvent difficile. Afin d'augmenter le recouvrement de séquence et ainsi suivre les changements conformationnels sur la plus grande partie possible de la protéine, plusieurs stratégies peuvent être utilisées :

- augmenter la température de digestion pour favoriser l'efficacité de l'enzyme. Cette approche est efficace mais favorise l'échange inverse.
- favoriser la dénaturation de la PM en utilisant de fortes concentrations d'agents dénaturants (jusqu'à 8 M de guanidine<sup>48</sup>) pour faciliter sa digestion par la ou les enzyme(s) utilisée(s).
- utiliser des enzymes de digestion<sup>49-50</sup> avec des sites de coupure préférentiels complémentaires à ceux de l'enzyme la plus utilisée : la pepsine.



**Figure 5.** Exemple de caractérisation conformationnelle d'un RCPG solubilisé en DDM par HDX-MS. Les changements conformationnels du récepteur beta 2 adrénergique induits par la fixation de 5 ligands ont été caractérisés par HDX-MS<sup>51</sup>. Ces résultats ont permis de décrire les zones impactées (majoritairement des boucles extracellulaires et intracellulaires) par la fixation des ligands et notamment les boucles intracellulaires, lieux de l'activation par les protéines G. Les tampons utilisés pour la deutération et l'étape de *quench* contiennent respectivement 0,05 % m/v et 0,01 % m/v de DDM afin d'éviter la précipitation du récepteur.

Les PMs ne sont plus seulement caractérisées en milieu détergent mais également en milieu dit *free detergent*<sup>52-53</sup> pour des raisons pratiques mais aussi plus fondamentales :

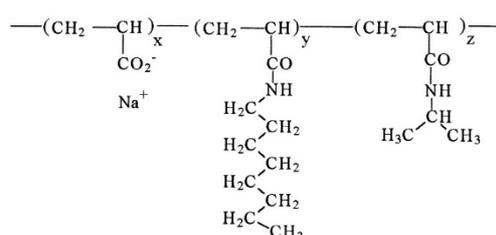
- le criblage de détergents pour la solubilisation d'une PM est protéine dépendant, et donc cette étape peut être coûteuse et longue,
- les détergents rendent la caractérisation des PMs plus difficiles pour de nombreuses techniques biophysiques dont la MS (ce point sera illustré dans les chapitres suivants),
- plusieurs PMs ont été décrites comme partiellement déstructurées en présence de fortes quantités de détergents<sup>54-55</sup>,
- l'environnement membranaire de la PM a été décrit comme spécifique et primordial pour assurer sa fonction<sup>56-57</sup>,

- l'état d'oligomérisation d'une protéine peut également être altéré par la présence de détergent. Par exemple, la protéine DgKa est une protéine connue pour être trimérique<sup>58</sup> mais est observée sous forme monomérique en présence de DDM<sup>59</sup>.

Malgré ces écueils, la stratégie de solubilisation en détergent reste aujourd'hui la stratégie la plus largement utilisée en spectrométrie de masse et c'est cette stratégie qui a été utilisée pour la solubilisation et la préparation des protéines étudiées dans cette thèse.

#### 2.1.4. Les amphipols et la MS structurale.

Les amphipols, *amphiphatic polymers*, sont des polymères amphiphiles permettant la solubilisation et la stabilisation de PMs en solution aqueuse<sup>60</sup>. Ils ont été développés par l'équipe de Jean-Luc Popot (Laboratoire de biologie physico-chimique des protéines membranaires, Paris) et ont été la première alternative reconnue à l'utilisation de détergents non-ioniques pour la caractérisation des PMs. En effet, ils ont une haute affinité avec les PMs et peuvent ainsi se substituer aux détergents utilisés suite à l'étape d'extraction<sup>61</sup>. L'avantage des amphipols est que leur haute affinité avec les PMs évite d'avoir des polymères libres en solution contrairement aux détergents où il faut travailler dans des conditions supérieures à la CMC (régime des micelles libres). L'amphipol le plus utilisé pour l'étude de PMs par MS est l'amphipol A8-35 (figure 6). Cette appellation est due à la masse de son monomère ( $\approx 8$  kDa) et au pourcentage de chaîne non greffée (35%). Ces amphipols ont été décrites comme plus protectrices en comparaison avec les détergents non ioniques comme le DDM lors d'une étude par IM-MS<sup>62</sup> et, comme les détergents non-ioniques, les amphipols peuvent être dissociés des PMs en phase gazeuse<sup>63</sup>.



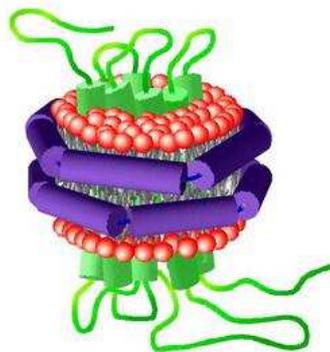
| Name    | <MW> (kDa)<br>(DP) | Molar ratio of monomers in mol %<br>(mean number of monomers per molecule) |            |             |
|---------|--------------------|--|------------|-------------|
|         |                    | ungrafted  | octyl      | isopropyl   |
| A 8-75  | ~ 8 (~70)          | ~75% (~52)   | ~25% (~18) | 0%          |
| A 8-35  | ~ 8 (~70)          | ~35% (~24)   | ~25% (~18) | ~40% (~28)  |
| A 34-75 | ~34 (~280)         | ~75% (~210)  | ~25% (~70) | 0%          |
| A 34-35 | ~34 (~280)         | ~35% (~98)   | ~25% (~70) | ~40% (~112) |

Figure 6. Représentation d'un monomère amphipol extraite de<sup>61</sup>.

Bien que cette approche ait été utilisée en MS native avec succès pour la caractérisation de systèmes protéiques impliquant des PMs, ces objets ne permettent pas toujours de traduire la conformation ou même la stœchiométrie de la protéine enchâssée dans son environnement membranaire natif<sup>59</sup>. D'autres approches utilisant des lipides ont alors été développées comme les liposomes. Ce sont de grands édifices constitués d'une bicouche composée de lipides amphiphiles (phospholipides) qui permettent de mieux mimer l'effet de la membrane sur la PM. Cependant leur dispersité et leur hétérogénéité sont difficiles à maîtriser et surtout leur grande taille (diamètre de 0,025 µm à 2,5 µm<sup>64</sup>) ne permet pas d'envisager une analyse prochaine en MS native : à ce jour aucun article ne décrit l'obtention d'un spectre de masse de qualité satisfaisante pour la détermination d'une masse de PM intacte en conditions natives. En revanche, la caractérisation conformationnelle de PMs enchâssées dans de tels édifices est possible par HDX-MS en supprimant les phospholipides après l'étape de digestion au moyen de billes de zirconium afin de conserver des performances chromatographiques optimales et une détection par MS satisfaisante des peptides<sup>65</sup>.

#### 2.1.5. Les nanodisques et la MS structurale.

Contrairement aux liposomes, les nanodisques<sup>66</sup> sont des assemblages non-covalents de phospholipides d'environ 10 nm de diamètre<sup>67</sup>. Ils sont constitués d'une bicouche lipidique mimant l'environnement membranaire et d'une protéine MSP (*membrane scaffold protein*), protéine permettant l'intégrité de l'assemblage souvent fixée avec deux copies (figure 7). La composition en lipides et l'hétérogénéité de ces édifices sont maîtrisées et ont permis, dans un premier temps, leur caractérisation sans PM enchâssée par spectrométrie de masse avec des spectromètres de masse de haute résolution et des algorithmes de déconvolution dédiés<sup>68-69</sup>. La taille de la MSP est une contrainte permettant de contrôler le nombre de phospholipides lors de l'assemblage avec la PM et ainsi d'obtenir des populations de complexes PM/nanodisques de tailles homogènes<sup>70</sup>. Par exemple, la MSP1D1 permet d'obtenir des disques d'un diamètre de 9,7 nm contre 12,8 nm pour le construit MSP1E3D1<sup>71</sup>.

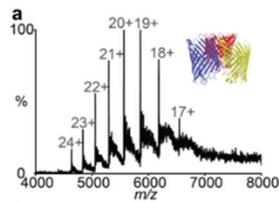


**Figure 7.** Représentation schématique d'un RCPG (en vert) solubilisé en nanodisques, d'après<sup>72</sup>. Les lipides sont représentés en rouge et les deux anneaux violets représentent la MSP qui permet d'assurer l'intégrité physique de l'assemblage en 2 copies, elle joue le rôle d'une « double ceinture ».

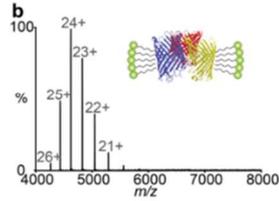
Ces nanodisques ont permis la caractérisation de PMs par RMN<sup>73-74</sup> et microscopies<sup>75</sup> mais aussi par MS selon certaines modalités. En effet, la caractérisation par MS native des complexes PM/nanodisques peut s'avérer difficile car le nombre de lipides et l'hétérogénéité des MSP s'ajoutent à l'hétérogénéité potentielle de la protéine générant autant d'espèces qui induisent des spectres de masse hautement complexes en ESI nécessitant l'utilisation de spectromètres de masse de haute résolution<sup>76</sup>.

Deux techniques d'ionisation alternatives à l'ESI nommées LILBID-MS pour *laser-induced liquid bead ion desorption* et DESI-MS pour *desorption electrospray ionization* ont été décrites pour la caractérisation de PMs en nanodisques ou en détergents respectivement par les groupes du Dr. Nina Morgner<sup>77-79</sup> et du Dr. Carol Robinson<sup>80</sup>. L'intérêt de ces approches est de rompre l'interaction PM/nanodisque ou PM/détergent avant l'entrée dans le spectromètre de masse afin d'éviter l'utilisation de hautes tensions pouvant interférer dans le repliement et les interactions protéine-protéine ou protéine-lipide. Dans le cas du LILBID, la dissociation du complexe PM/nanodisque a lieu, suite à l'ionisation, par un laser infrarouge dont l'intensité peut être modulée pour éventuellement dissocier les partenaires protéiques des complexes impliquant les PMs. La technique DESI consiste à déposer sur une plaque la PM dans un tampon AcONH<sub>4</sub> avec le détergent utilisé lors de son extraction de la membrane puis de désorber la protéine membranaire à l'aide d'un spray généré par une plume électrospray contenant ce même tampon. Ainsi uniquement la PM seule ou en complexe avec un partenaire protéique est introduite dans le spectromètre de masse permettant son analyse dans des conditions énergétiques douces. Cette technique est particulièrement intéressante de par sa possibilité à cribler différents détergents en optimisant le tampon sprayé par la plume électrospray pour la désorption sans changer directement la nature du détergent initial dans lequel est solubilisé la PM (figure 8). Cette approche pourrait permettre le criblage de ligands sur des PMs en introduisant directement les ligands dans le tampon de désorption.

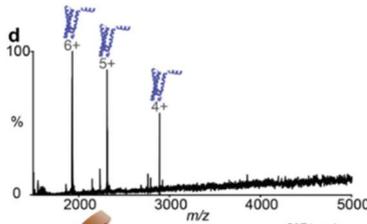
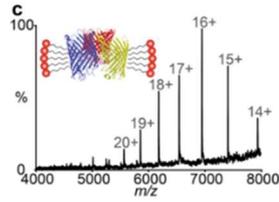
Protéine OmpF trimérique solubilisée en OG dont l'état de charge est centré sur 20+. Aucun détergent n'est ajouté dans la plume électrospray, le spectre de masse ainsi obtenu est de mauvaise qualité.



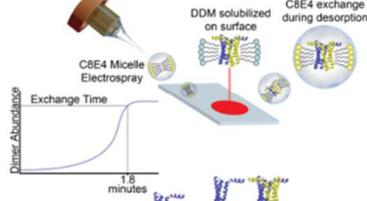
Ajout du détergent OG dans la plume électrospray permettant une claire amélioration de la qualité spectrale.



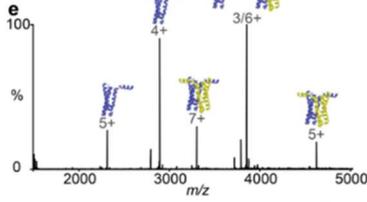
L'OG présent dans le tampon sprayé par la plume ES est remplacé par le détergent LDAO. L'état de charge de la protéine OmpF trimérique est ainsi réduit.



Protéine SemiSWEET solubilisée et désorbée avec du DDM. Le spectre de masse indique la présence d'une protéine monomérique.



Remplacement du DDM par un autre détergent C8E4 dans le tampon de désorption.



L'échange de détergent permet la conservation de la protéine SemiSWEET sous forme dimérique.

**Figure 8.** Illustration de l'intérêt de la DESI-MS pour la caractérisation de PMs. (a-c) L'absence ou le changement de détergent dans le tampon de désorption sur la qualité spectrale et la distribution d'états de charge sont illustrés avec l'exemple de la protéine OmpF trimérique. (d-e) La protéine SemiSWEET solubilisée en DDM est observée sous forme dimérique et monomérique suite à l'échange de détergent réalisé lors de la désorption.

Aujourd'hui, la caractérisation par MS native des PMs par ces deux techniques prometteuses reste cependant marginale et cantonnée aux groupes académiques hautement spécialisés et possédant ces sources.

### **3. Conclusions.**

Ce travail bibliographique a permis d'identifier les différentes stratégies de solubilisation de PMs compatibles avec les approches de MS native et HDX-MS. Concernant la MS native, l'étape de préparation d'échantillon et les conditions énergétiques appliquées semblent être les étapes clés pour la réussite d'une analyse de PM. La technique d'HDX-MS est moins soumise à une préparation fine de la PM pour sa caractérisation mais nécessite une optimisation fine des conditions de digestion notamment dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G. Malgré le dénombrement d'un nombre certain de publications relayant la caractérisation de PMs par ces approches, leur étude est actuellement toujours réservée à des groupes académiques très spécialisés et reste particulièrement difficile.

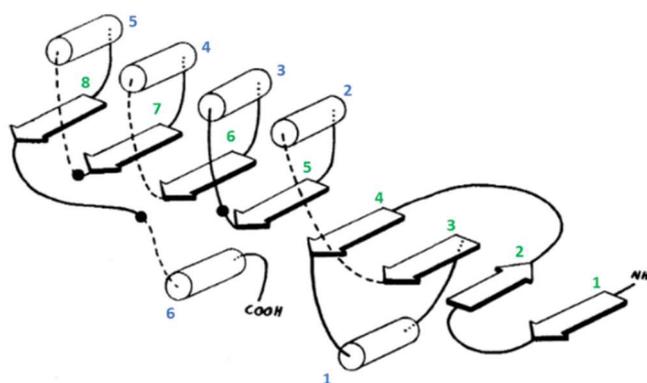
### **4. Objectifs des travaux.**

Dans ce contexte, l'objectif de cette partie de mon travail de thèse a été de mettre en place et développer des méthodes MS native et HDX-MS pour la caractérisation de PMs en milieu détergent au laboratoire. Les chapitres suivants relatent les succès et les difficultés rencontrés lors de l'étude de trois protéines membranaires en milieu détergent : la lipase ABHD, le récepteur AA2A et le peptide A $\beta$  42.

## CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉINE MEMBRANAIRE À UN DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE PAR MS NATIVE ET HDX-MS : CAS DE LA LIPASE ABHD.

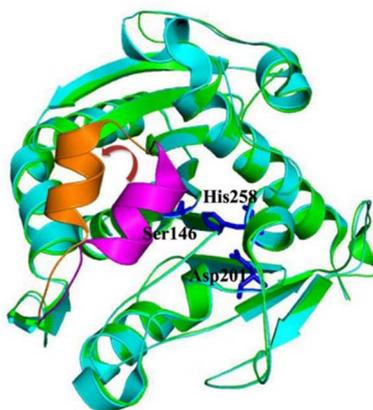
### 1. Contexte de l'étude.

Parmi les cibles thérapeutiques d'intérêt, les enzymes responsables de la dégradation des lipides ou lipases sont des biomolécules impliquées dans plusieurs maladies comme le diabète, l'obésité ou encore le cancer<sup>81</sup>. La réaction d'hydrolyse des triglycérides est catalysée par les lipases et permet la production du glycérol et d'acides gras libres correspondants aux triglycérides initiaux. Les mécanismes réactionnels exacts sont mal connus et les substrats divers<sup>82</sup> cependant l'hydrolyse des lipides semble avoir toujours lieu au niveau d'une triade catalytique mettant en jeu une sérine, une histidine et un acide aspartique. Ces enzymes présentent un repliement structural singulier : le repliement dit  $\alpha/\beta$  (figure 9), qui est composé de 8 huit brins  $\beta$  reliés par 6 hélices  $\alpha$ .



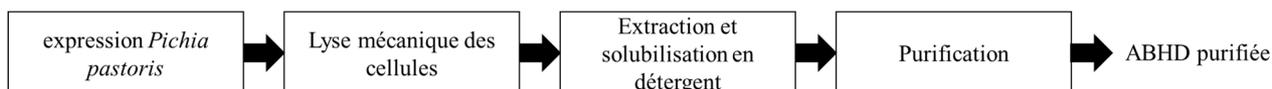
**Figure 9.** Représentation schématique du repliement  $\alpha/\beta$  conservé chez les lipases, modifiée de<sup>83</sup>. Les 8 brins  $\beta$  et les 6 hélices alpha sont respectivement annotés en vert et bleu. Les points noirs représentent les positions des acides aminés impliqués dans la triade catalytique, du côté N-ter vers le côté C-ter : la sérine, l'acide aspartique et l'histidine.

Un autre domaine important sur ces protéines est le domaine « couvercle/chapeau » (*lid/cap*) qui recouvre le site actif de la protéine (figure 10). Ce domaine est décrit comme flexible, permettant ou non l'accès des substrats au site actif<sup>84</sup>.



**Figure 10.** Représentation schématique du changement de conformation possible du domaine chapeau sur la lipase *Thermomyces lanuginosus*. Le domaine chapeau est représenté en orange dans sa conformation ouverte et en rose dans sa conformation fermée, empêchant ainsi l'accès au site actif (acides aminés représentés en bleu), extrait de<sup>84</sup>.

Dans ce travail de thèse, la lipase étudiée est la protéine ABHD qui possède un repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase avec une triade catalytique et un domaine chapeau comme décrit ci-dessus. Ce travail est réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Renaud Wagner (Plateforme IMPRESS, UMR 7242, Illkirch) et l'Institut de Recherches Servier. C'est une protéine de 358 acides aminés avec une masse théorique de 40715,1 Da (séquence non donnée pour des raisons de confidentialité). Elle possède un seul domaine transmembranaire de 21 acides aminés, un grand domaine cytosolique, qui représente  $\approx 90\%$  de sa séquence (329 acides aminés) et un court domaine extracellulaire (8 acides aminés). Malgré son faible ancrage dans la membrane, l'utilisation de détergent est nécessaire à son extraction et à sa solubilisation. La figure 11 résume le protocole utilisé pour l'expression et la purification de cette protéine. La protéine ABHD est exprimée dans la levure *Pichia pastoris* (les cellules de cette levure se développent rapidement dans des milieux simples et peu chers avec des rendements d'expression qui ont permis la caractérisation de nombreuses PMs). Une lyse mécanique des cellules est ensuite opérée avant l'extraction et la solubilisation de la protéine ABHD avec 1% m/v de DDM. Une chromatographie d'affinité et une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sont ensuite réalisées pour isoler ABHD des contaminants éventuels. La protéine ABHD est alors purifiée dans le tampon suivant : 50 mM Tris pH 7,4; 300 mM NaCl; 0,1 % m/v DDM avec une concentration de l'ordre de 30  $\mu$ M et observée en SEC sous forme monomérique. Les protocoles d'expression et de purification ont été optimisés par l'équipe du Dr. Renaud Wagner.



**Figure 11.** Représentation schématique du protocole d'expression et de purification de la protéine ABHD.

## 2. Objectifs de l'étude.

Dans ce contexte détergent, les objectifs de mon travail ont été :

- Mettre au point un protocole pour la caractérisation de la protéine ABHD par MS native et MS dénaturante en présence de DDM.
- Réaliser un criblage de ligands, potentiels inhibiteurs, sur cette protéine.
- Étudier l'effet de la fixation d'un ligand sur la conformation de la protéine, et en particulier sur le domaine chapeau et les acides aminés impliqués dans la triade catalytique, par HDX-MS.

## 3. Résultats

### 3.1. Mise au point du protocole de caractérisation par MS native.

La première étape est d'optimiser la préparation de l'échantillon pour l'analyse par MS native. En effet, cette étape a été décrite comme primordiale pour le succès de l'analyse par cette technique<sup>26</sup>.

#### 3.1.1. Optimisation des conditions de préparation de l'échantillon.

Pour cela, la protéine ABHD a subi une étape d'échange de tampon à l'aide de deux mini colonnes de gel filtration (*Zeba™ Spin Desalting Columns*) avec un seuil de coupure de 7 kDa et un volume total de 0,5 mL. L'utilisation de l'ultrafiltration concentre également les micelles de détergent et doit à ce titre être évitée<sup>27</sup>. Le tampon initial (50 mM Tris pH 7,4; 300 mM NaCl; 0,1 % m/v DDM) a été remplacé par différentes compositions de tampons MS compatibles. Deux paramètres ont été optimisés pour la préparation d'ABHD : la concentration en acétate d'ammonium et la concentration en DDM (figure 12).

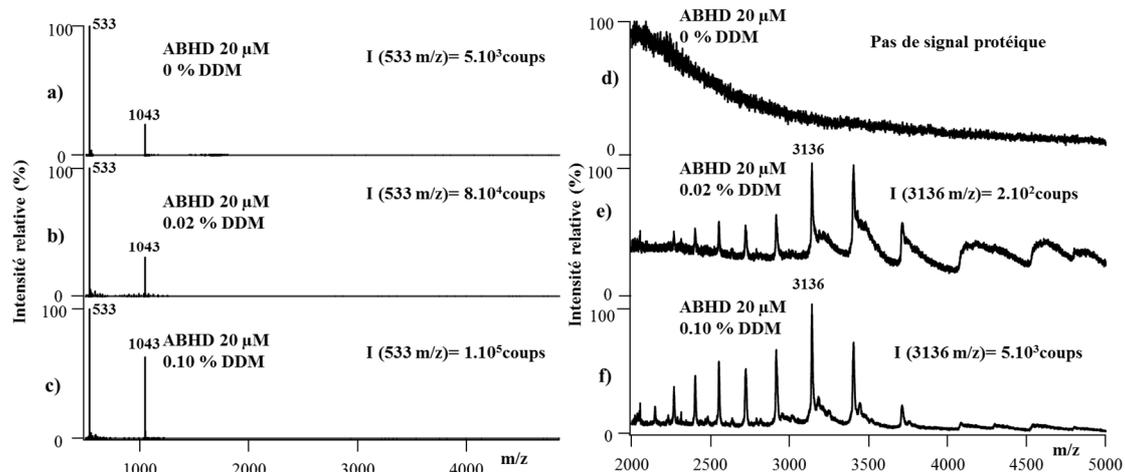
pH fixé à 7.4  
[ABHD] fixée à 20 μM

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
| AcONH <sub>4</sub> 50 mM +<br><b>0% DDM</b>    | AcONH <sub>4</sub> 150 mM +<br><b>0% DDM</b>    | AcONH <sub>4</sub> 300 mM +<br><b>0% DDM</b>    |  |
| AcONH <sub>4</sub> 50 mM +<br><b>0.02% DDM</b> | AcONH <sub>4</sub> 150 mM +<br><b>0.02% DDM</b> | AcONH <sub>4</sub> 300 mM +<br><b>0.02% DDM</b> |  |
| AcONH <sub>4</sub> 50 mM +<br><b>0.10% DDM</b> | AcONH <sub>4</sub> 150 mM +<br><b>0.10% DDM</b> | AcONH <sub>4</sub> 300 mM +<br><b>0.10% DDM</b> |  |

**Force Ionique**

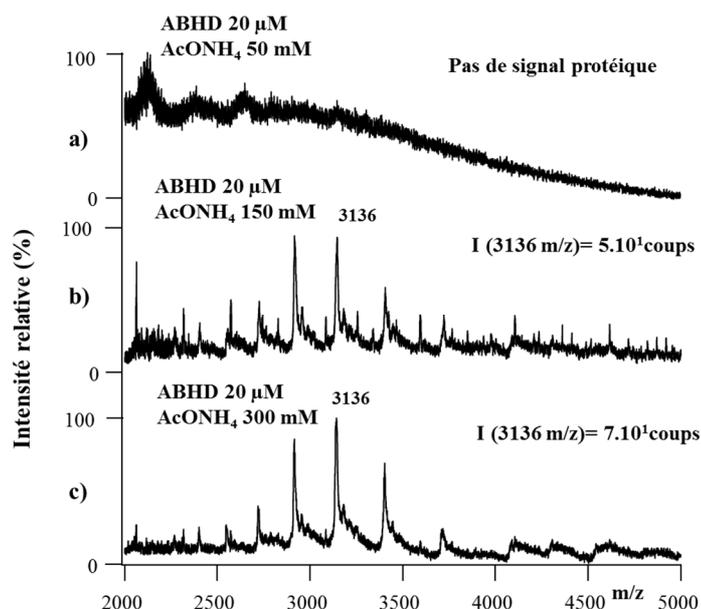
**Figure 12.** Compositions des tampons testés pour la caractérisation d'ABHD par MS native.

Les spectres de masses présentés en figure 13 montrent l'influence du % de DDM sur la qualité du signal MS obtenu pour ABHD avec une concentration en AcONH<sub>4</sub> de 300 mM (concentration optimale dont l'optimisation sera présentée ultérieurement) et un pH de 7,4. Les spectres de masse sur la région 500-5000 m/z (figure 13a-c) permettent difficilement d'observer un signal protéique dû à la présence de signaux intenses correspondant à des molécules de DDM libres en solution, l'ion 533 m/z correspond à un ion monochargé d'une molécule de DDM (510 Da) associée à un ion sodium et l'ion 1043 m/z correspond à un ion [2DDM+Na]<sup>+</sup>. Il est à noter que malgré l'échange de tampon réalisé sans DDM (figure 13a), du DDM provenant du tampon de purification est encore présent. Sur la région 2000-5000 m/z (figures 13e-f), le signal protéique d'ABHD est observé avec un état de charge principal 13+ (ion à 3136 m/z) et nous pouvons remarquer que l'intensité du signal protéique d'ABHD croît avec la concentration en DDM. À 0% m/v DDM, aucun signal protéique n'est observé (d), à 0,02 % m/v DDM, l'intensité de l'état de charge 13+ (3136 m/z) est de 2.10<sup>2</sup> coups (e) contre 5.10<sup>3</sup> coups pour 0,10% m/v DDM (f). Les conditions de préparation d'ABHD retenues pour l'analyse MS native sont AcONH<sub>4</sub> 300 mM pH 7,4 avec 0,1% DDM m/v. La stabilité et l'activité de cette protéine dans ce tampon ont été vérifiées par l'équipe du Dr. Renaud Wagner.



**Figure 13.** Influence du % de DDM sur le spectre de masse natif de la protéine ABHD, la concentration en AcONH<sub>4</sub> utilisée est de 300 mM à pH 7,4. Les conditions MS sont ici identiques et l'optimisation de la tension trap CV est discutée au §3.1.3.

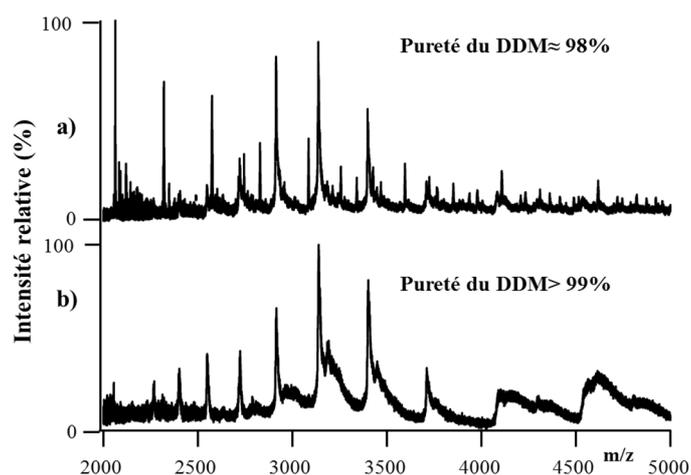
L'influence de la force ionique sur la stabilité de la protéine et donc sur la qualité spectrale a également été observée (figure 14). Sur les trois concentrations en AcONH<sub>4</sub> testées, le signal MS le plus intense est observé à une concentration de 300 mM (70 coups pour l'état de charge 13+ contre 50 coups à 150 mM) alors qu'à une concentration de 50 mM la protéine ABHD ne semble pas stable (aucun signal protéique n'est observé).



**Figure 14.** Influence de la concentration en AcONH<sub>4</sub> sur le spectre de masse natif de la protéine ABHD, la concentration en DDM utilisée est de 0,1 % m/v et le pH fixé à pH 7,4. Les conditions MS sont ici identiques et l'optimisation de la tension trap CV est discutée au §3.1.3.

### 3.1.2. Importance de la pureté du détergent pour l'analyse en MS native.

Ici nous avons utilisé un détergent de haute pureté (>99%, marque Anatrace, grade Analytique) qui a permis l'obtention d'un spectre de masse relativement facile à interpréter, en revanche nous avons pu observer des spectres de masse contaminés en utilisant des détergents de pureté inférieure (98%, Sigma Aldrich, GC grade) (figure 15).



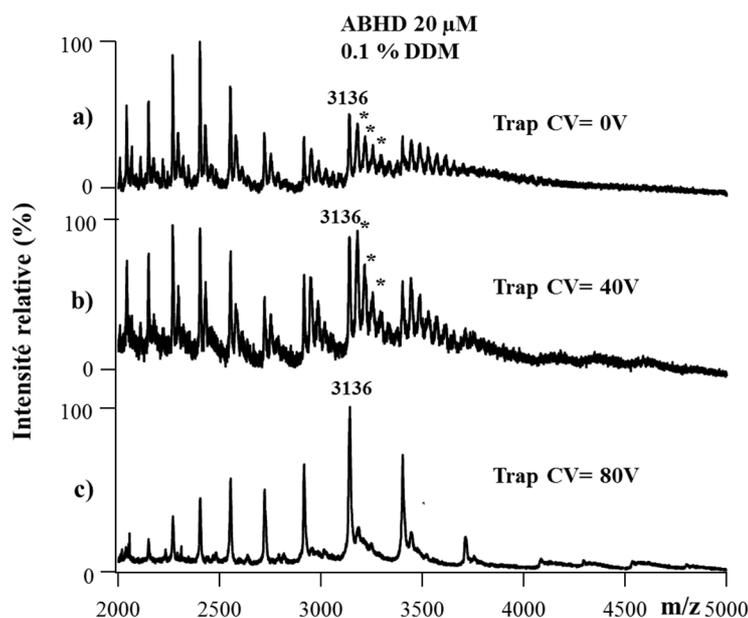
**Figure 15.** Influence de la pureté du détergent sur la qualité spectrale pour l'analyse en MS native.

D'autre part, afin d'éviter les problèmes liés à la concentration éventuelle du DDM lors de l'échange de tampon et suite aux optimisations présentées, nous avons choisi avec le Dr. Renaud Wagner de réaliser l'étape de chromatographie d'exclusion stérique directement en tampon AcONH<sub>4</sub> 300 mM

0,1% m/v DDM pH 7,4 afin de pouvoir analyser la protéine en conditions natives sans étape d'échange de tampon manuelle.

### 3.1.3. Optimisation des conditions MS.

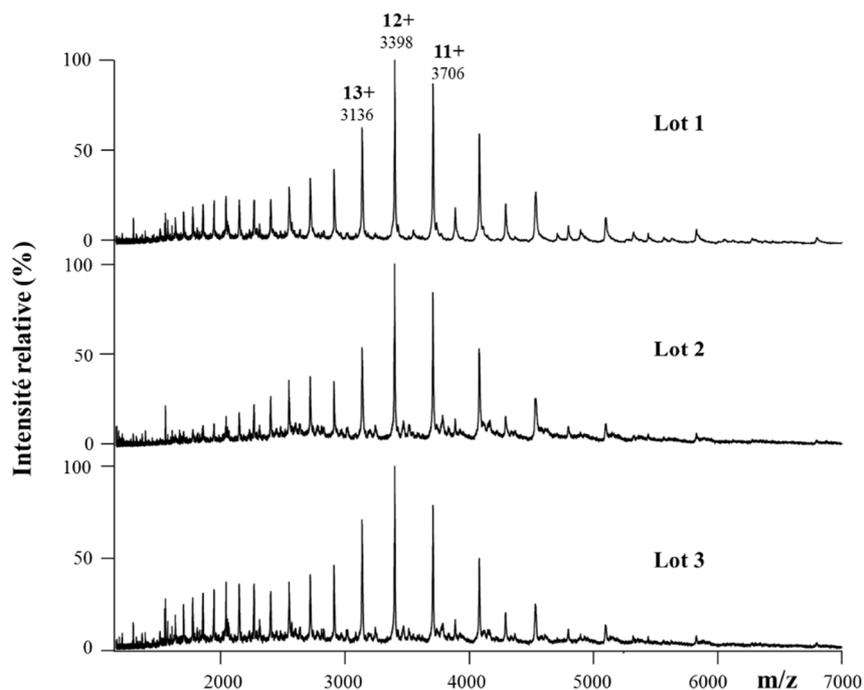
La deuxième étape essentielle pour l'obtention d'un spectre de masse de qualité est l'optimisation de la tension trap CV (tension appliquée dans la cellule de collision aussi appelée trap). La tension doit être suffisamment forte pour casser l'interaction non covalente détergent/PM et permettre la libération de la PM pour sa détection sans toutefois la dénaturer. L'optimisation de ce paramètre essentiel est présentée en figure 16. Les molécules de DDM (\*) liées de manière non-covalentes à ABHD sont progressivement dissociées à hautes tensions en trap CV favorisant les collisions avec les molécules de gaz présentes au sein de la cellule trap, et totalement supprimées à 80 V, les autres paramètres MS sont maintenus constants lors de l'expérience. Les conditions MS retenues pour l'analyse MS native de la protéine ABHD solubilisée en DDM sont Vc : 80-120 V, trap gas : 5 mL/min, trap CV : 80-120 V, Pi : 6 mbar.



**Figure 16.** Influence de la tension trap CV sur la dissociation du complexe ABHD/DDM. Les astérisques représentent les molécules de DDM liées.

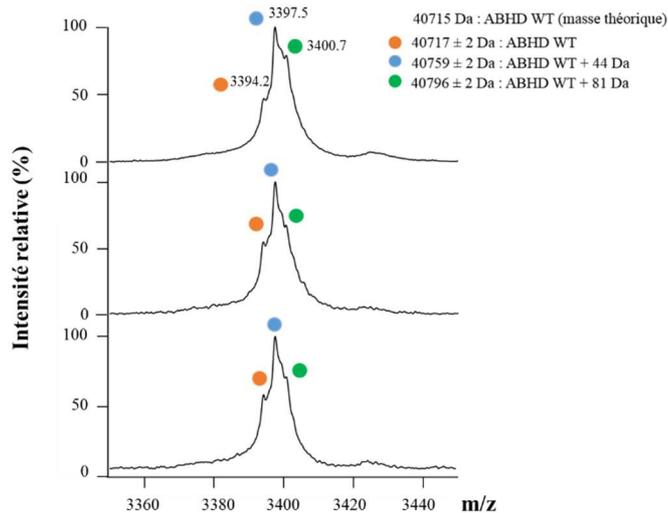
### 3.1.4. Comparaison de trois lots de purification par MS native.

Avec ce protocole, les spectres de MS native acquis sur 3 lots de purification dans les mêmes conditions MS sont présentés en figure 17.



**Figure 17.** Spectres de masse en conditions natives d'ABHD sur trois lots de purification.

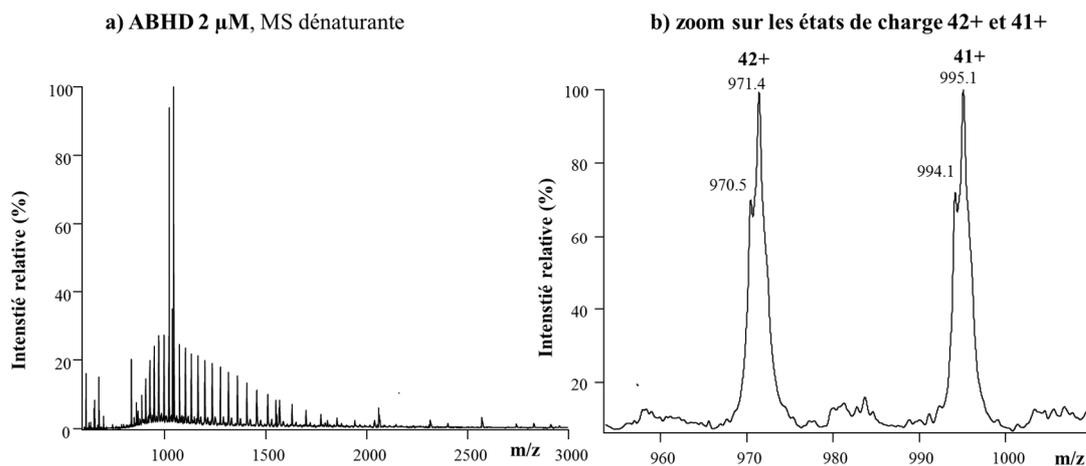
La distribution des états de charge est centrée sur l'état de charge 12+ et la protéine est observée à l'état monomérique pour les trois lots de purification. Une deuxième distribution d'états de charge, minoritaire est observée sur la gamme 1500-2500 m/z laissant supposer une protéine partiellement dénaturée. Un zoom sur l'état de charge principal est proposé ci-dessous en figure 18. La protéine ABHD est relativement homogène. Trois espèces majoritaires sont observées : la première avec une masse de  $40717 \pm 2$  Da correspond à la masse de la protéine WT (masse théorique de 40715 Da). Les deux autres espèces observées à  $40759 \pm 2$  Da (+44 Da) et  $40796 \pm 2$  Da (+81 Da) pourraient être attribuées respectivement à une acétylation et une phosphorylation, modifications post-traductionnelles décrites chez *Pichia pastoris*<sup>85</sup>. Afin de s'assurer du caractère covalent de ces deux espèces, la protéine ABHD a été caractérisée par MS dénaturante.



**Figure 18.** Zoom sur l'état de charge 12+ d'ABHD sur trois lots de purification et calculs des masses entières.

### 3.1.5. Caractérisation de la protéine ABHD par MS dénaturante.

La protéine est diluée à 2  $\mu\text{M}$  dans un tampon ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH, 50/50/1, v/v/v et analysée en conditions dénaturantes ( $V_c$  : 40 V, trap CV : 4V et  $P_i$  : 1,7 mbar, figure 19a). Le doublet de pics visible à  $\approx 1000$  m/z est attribué à des molécules de DDM libres. Un zoom sur deux états de charge est présenté figure 19b, deux espèces peuvent être identifiées : la première correspond à une masse  $40717 \pm 3$  Da (ABHD WT) et la seconde à une masse de  $40758 \pm 4$  Da (ABHD + acétylation). La troisième espèce observée en conditions natives n'est pas observée ici due à une résolution probablement insuffisante.



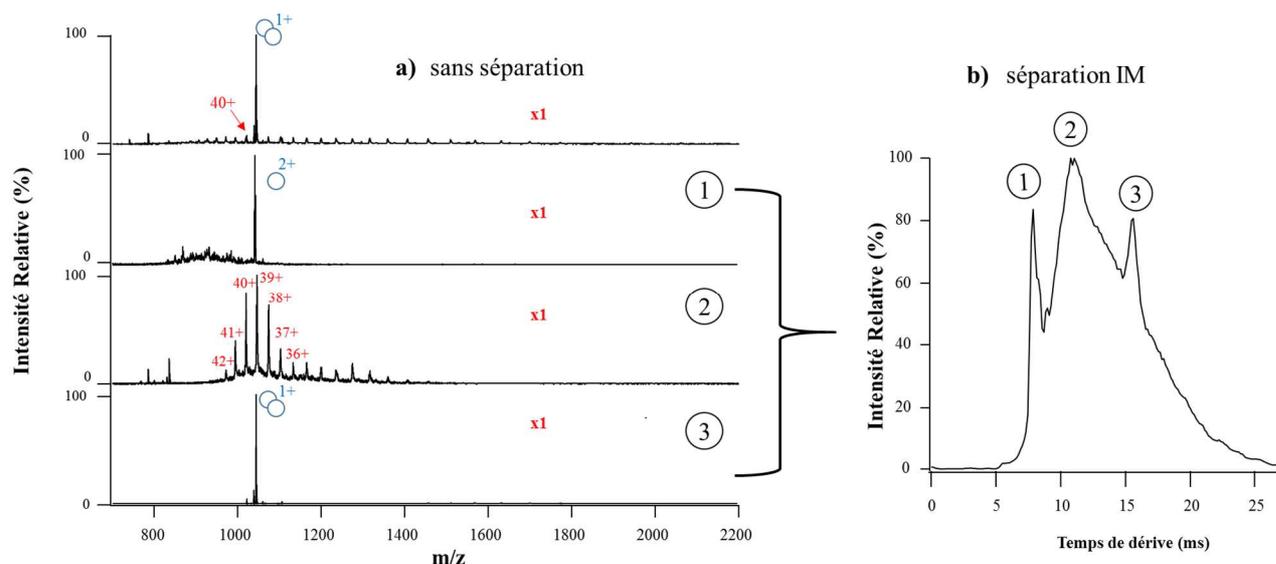
**Figure 19.** Caractérisation de la protéine ABHD en conditions dénaturantes.

### 3.1.6. Apport de la mobilité ionique pour simplifier les spectres en milieu détergent.

Face à la contamination des spectres de masse obtenus en conditions dénaturantes et en conditions natives par les molécules de DDM libres, nous avons évalué l'apport de la mobilité ionique comme technique de séparation. En effet, cette technique a déjà été utilisée pour « nettoyer » les spectres de masse de contaminants comme les polymères pour la caractérisation MS de protéines solubles<sup>86</sup>.

#### ❖ En conditions dénaturantes.

Le spectre de masse d'ABHD obtenu en MS dénaturante sans séparation par mobilité ionique est présenté en figure 20 (spectre du haut). Le signal protéique est fortement écrasé par l'intensité des molécules libres de DDM. La séparation par IM permet d'observer trois espèces majoritaires sur le mobilogramme (figure 20b) qui correspondent à une molécule de DDM chargée 2+ (spectre de masse 1), au signal de la protéine ABHD (spectre de masse 2) et au spectre de masse de deux molécules de DDM chargé 1+ (spectre de masse 3). Le spectre de masse de la protéine ABHD est alors plus facilement interprétable, ce qui montre l'efficacité du « nettoyage » des spectres de masse par IM.



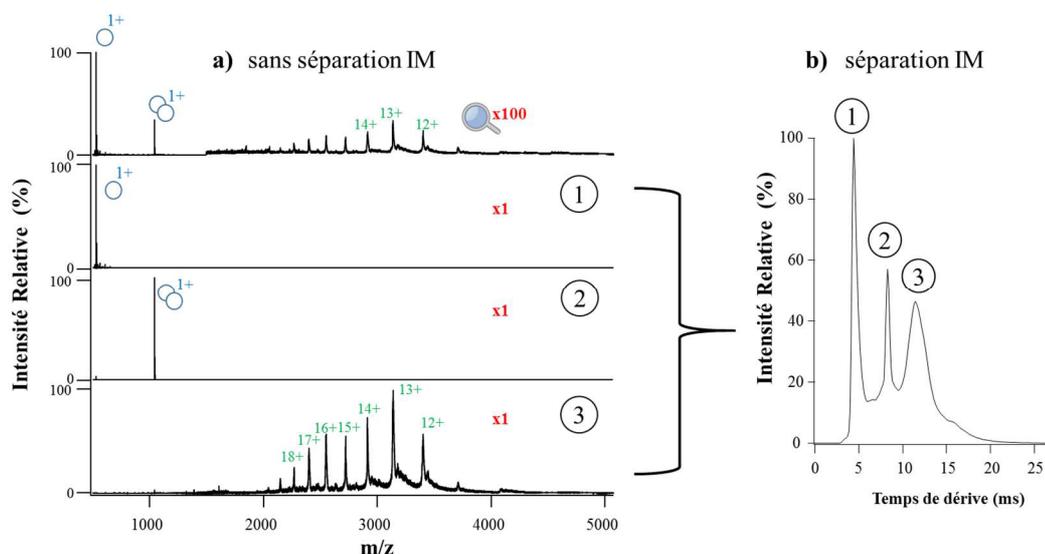
**Figure 20.** Utilisation de l'IM-MS en conditions dénaturantes pour la séparation des détergents libres et de ABHD. (Vc : 40 V, Pi : 2 mbar, Trap et Transfer CV : 4 et 2 V, trap gas : 5 mL/min, QHe/QN<sub>2</sub> : 180/90 mL/min, WH : 40 V, WH : 800 m/s).

La même approche a été utilisée en conditions natives.

#### ❖ En conditions natives.

Sans séparation IM, le signal protéique doit être amplifié 100 fois à l'aide du logiciel de retraitement pour être visualisé correctement (figure 21, spectre du haut). Après séparation par mobilité ionique,

les signaux d'une et deux molécules de DDM (spectres 1 et 2) sont séparés des signaux protéiques d'ABHD (spectre 3).

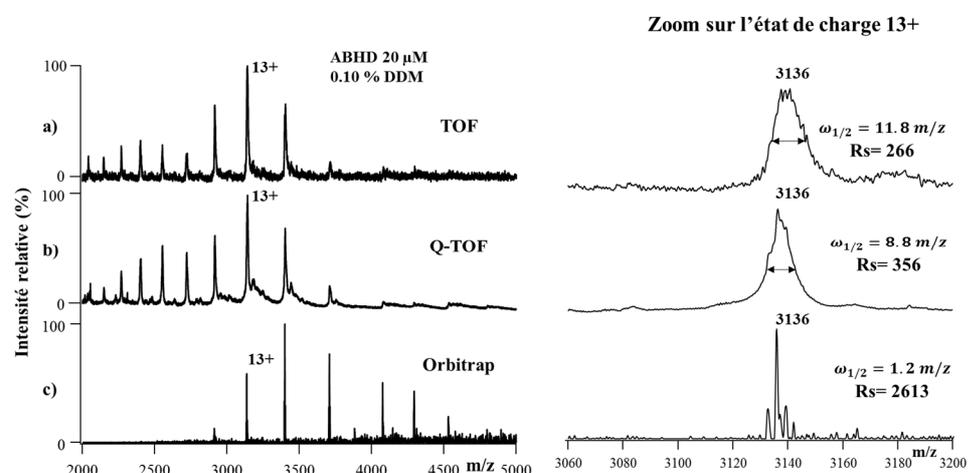


**Figure 21.** Utilisation de l'IM-MS en conditions natives pour la séparation des détergents libres et de ABHD. (Vc : 80 V, Pi : 6 mbar, Trap et Transfer CV : 80 et 2 V, trap gas : 5 mL/min, QHe/QN<sub>2</sub> : 120/60 mL/min, WH : 40 V, WH : 800 m/s).

### 3.1.7. Analyse d'ABHD sur différents spectromètres de masse.

Plusieurs Q-TOF modifiés (quadripôle haute masse, tension plus forte en trap CV et pression plus élevée en source) ont été décrits dans la littérature comme étant indispensables pour la détection de PM en conditions natives, permettant la transmission et la dissociation de complexes PM/détergent<sup>25</sup>. Nous avons voulu vérifier cette capacité sur nos deux autres instruments commerciaux : un TOF (LCT upgradé par l'entreprise MS vision avec une tension maximale de cône de 400 V) et un Orbitrap (Exactive Plus EMR). Les spectres de masse obtenus sur ces deux instruments en conditions natives sont présentés en figure 22 et comparés à celui acquis sur le Synapt G2 (Q-TOF). Il a été possible d'observer le signal protéique d'ABHD sur chaque instrument : les distributions des états de charge sont similaires entre TOF, et Q-TOF. De manière intéressante, nous pouvons voir ici que le complexe PM/détergent est dissocié en source à des tensions dans la gamme 200-300 V sur le LCT (figure 22a) au lieu d'être réalisé en cellule trap (non présente sur cet instrument) sur le Synapt G2. Concernant le spectre de MS native obtenu sur l'instrument de type Orbitrap, l'interaction PM/détergent a également pu être dissociée dans le compartiment source (CID : 200 eV). Nous pouvons noter que la distribution des états de charges est légèrement déplacée vers de plus faibles états de charge (dû à un mauvais réglage des paramètres instrumentaux ou à une différence au niveau de la source d'ionisation) et que la sensibilité est moins bonne en comparaison avec les données obtenues sur le Q-TOF. En revanche,

la désolvatation et l'élimination des molécules de DDM semblent plus efficaces sur cet instrument et permettent d'accéder à une meilleure résolution expérimentale ( $\approx 2600$  sur le pic à 3136 m/z). Cela peut être intéressant dans le cadre de la caractérisation avec des ligands de faibles masses.



**Figure 22.** Caractérisation de la protéine ABHD en conditions natives sur différents instruments : TOF (LCT upgradé MS vision, Waters), Q-TOF (Synapt G2 HDMS, Waters), Orbitrap (Exactive Plus EMR, Thermo).

### 3.1.8. Conclusions.

Ce travail a permis de mettre en lumière l'importance de la préparation d'échantillon pour la caractérisation par MS native d'une PM en milieu détergent. Les conditions de préparation propres à la protéine ABHD ont pu être mises au point ( $\approx 20 \mu\text{M}$  dans un tampon  $\text{AcONH}_4$  300 mM pH 7,4 + 0,02-0,1 % m/v DDM sans étape de concentration) et ont permis sa caractérisation sur trois instruments différents par MS native suite aux optimisations instrumentales réalisées. Ces optimisations ont permis l'obtention de spectres de masse de qualité permettant d'observer une protéine monomérique et relativement homogène.

De manière intéressante, la mobilité ionique utilisée comme technique de séparation pour simplifier les spectres de masse dans le contexte détergent s'est révélée relativement efficace et pourrait être utilisée pour la caractérisation d'autres PMs afin d'observer « facilement » un premier signal protéique.

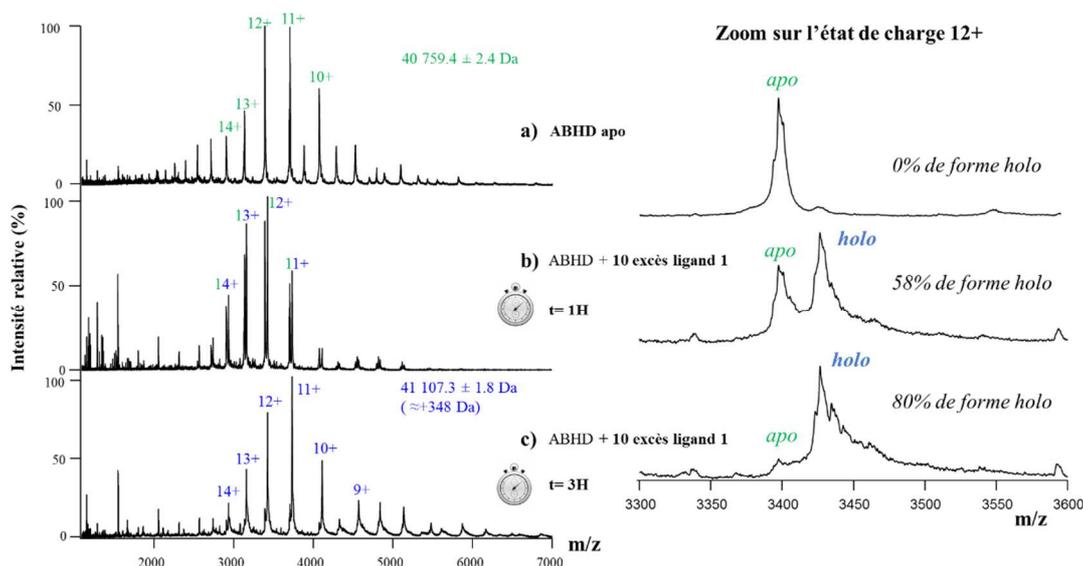
### 3.2. Criblage avec les ligands par MS native et MS dénaturante.

Le deuxième objectif de l'étude était de caractériser l'interaction de 6 inhibiteurs potentiels de ABHD. Les structures et les noms des inhibiteurs ne sont pas décrits pour des raisons de confidentialité. Le tableau 1 présente leurs masses et l'ajout de masse attendu suite à la réaction supposée avec ABHD. Ces potentiels inhibiteurs sont supposés réagir avec la sérine catalytique d'ABHD, seuls les ligands 5 et 6 ont été confirmés comme inhibiteurs (source Laboratoires Servier).

| Nom du ligand | Masse du ligand (Da) | Ajout de masse attendu sur la protéine ABHD (Da) pour la réaction d'une molécule |
|---------------|----------------------|--|
| 1             | 462,3                | +347,2   |
| 2             | 520,5                | +381,4   |
| 3             | 455,4                | +360,3   |
| 4             | 456,5                | +362,3   |
| 5             | 308,4                | +97,1  |
| 6             | 307,3                | +71,1  |

**Tableau 1.** Ligands utilisés pour le criblage et masses attendues. La pureté des ligands est d'environ 95 % et ils sont solubilisés dans des solutions de DMSO à 10 mM.

Afin d'évaluer le temps nécessaire à la réaction totale des ligands sur ABHD, un suivi cinétique par MS native a été réalisé avec le ligand 1 (L1) dans les mêmes conditions instrumentales et expérimentales que décrites précédemment en §3.1. Le tampon utilisé était AcONH<sub>4</sub> 300 mM pH 7,4 0,1% m/v DDM [ABHD] :20 μM et [L1] :200 μM, 2% v/v DMSO (figure 23). La réaction entre ABHD et le ligand L1 est observée en temps réel avec l'augmentation progressive de l'intensité d'une espèce correspondant à une masse  $41107,3 \pm 1,8$  Da (représentée en bleu) en bonne corrélation avec la masse attendue suite à la réaction avec L1 (41104 Da). Après 3 heures d'incubation la réaction n'est pas encore totale à température ambiante.



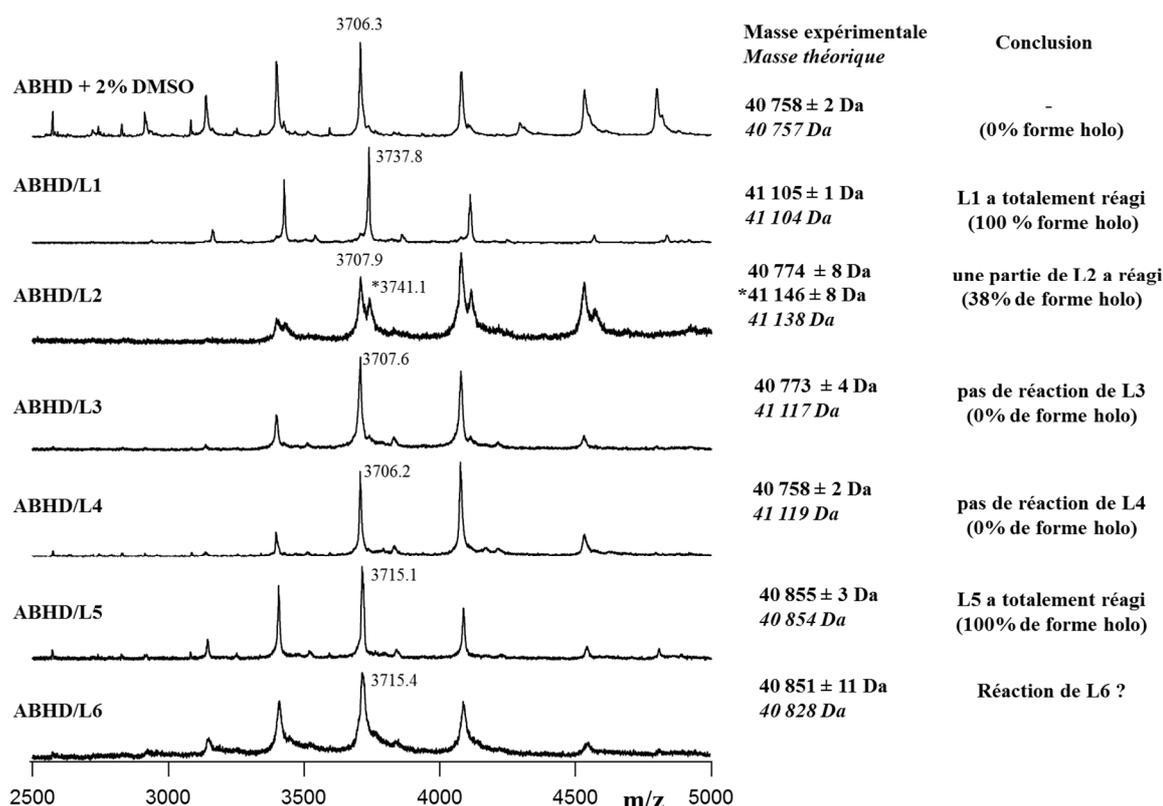
**Figure 23.** Suivi de la réaction de L1 sur ABHD en conditions natives au cours du temps.

Chaque ligand a alors été incubé pendant 12 h à température ambiante en excès (10 excès molaires) afin de favoriser la réaction avec la protéine ABHD (20 μM) dans le tampon AcONH<sub>4</sub> 300 mM pH 7,4

0,1 % m/v DDM. Les différentes solutions ABHD/L1, ABHD/L2, ABHD/L3, ABHD/L4, ABHD/L5, ABHD/L6 contenant les six ligands ont ensuite été analysées par MS native sur le Synapt G2 avec la méthode instrumentale optimisée sur la protéine ABHDapo.

Les spectres de masse obtenus en conditions natives sur le Synapt G2 sont présentés figure 24. Une analyse contrôle a été réalisée : 2% v/v de DMSO ont été ajoutés à la protéine ABHDapo afin de mimer l'effet du DMSO sur la protéine induisant un décalage de la distribution des états de charge<sup>87</sup>. Concernant la réaction des ligands avec ABHD, dans les conditions d'incubation testées, plusieurs cas peuvent être distingués :

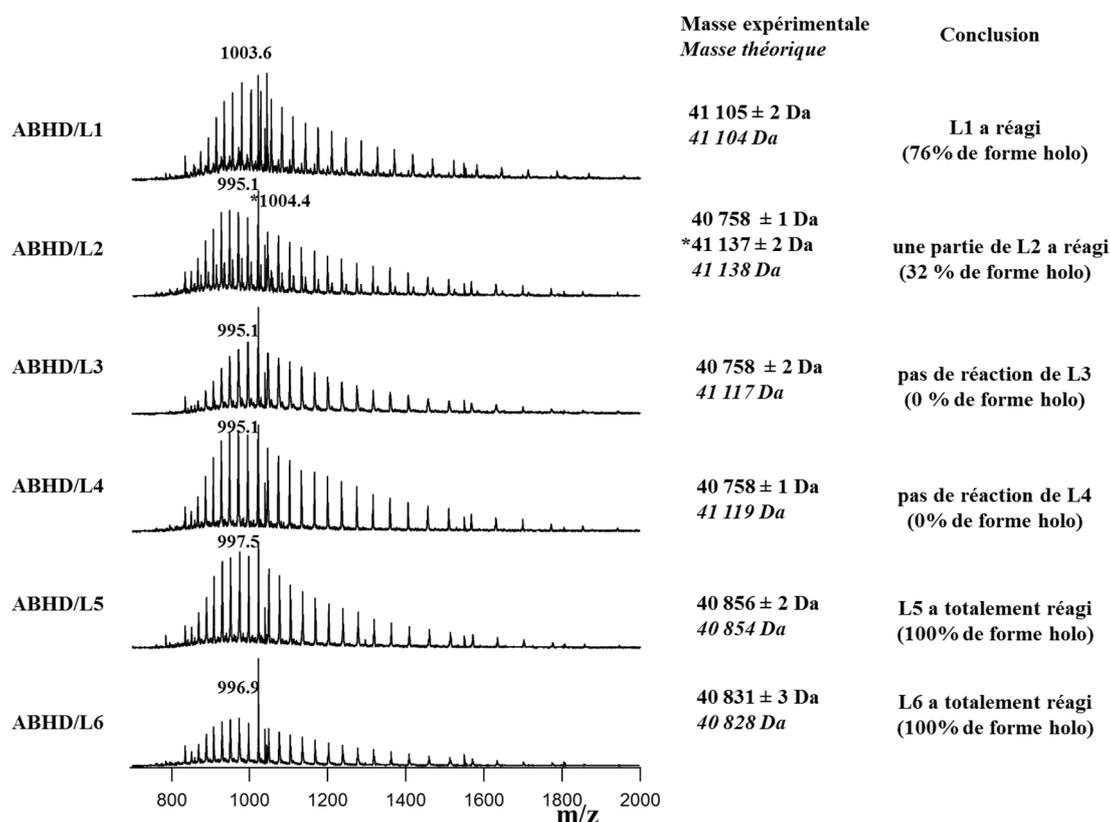
- une réaction totale de L1 et L5 est observée.
- une réaction partielle de L2 est observée (38 % de forme holo est observé)
- la résolution expérimentale ne permet pas de déterminer clairement si L6 a réagi.
- les ligands L3 et L4 ne semblent pas réagir.



**Figure 24.** Criblage des 6 ligands covalents sur ABHD en conditions natives sur le Synapt G2. Le rapport m/z de l'état de charge 11+ est annoté sur chaque spectre.

Afin de confirmer ces conclusions et valider le caractère covalent de l'interaction, les mélanges ABHD/L1-6 ont été dilués à 2  $\mu$ M dans une solution dénaturante (ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH, 50/50/1, v/v/v/) et analysés selon la méthode utilisée pour la protéine apo. Les résultats obtenus sont présentés en figure

25. À nouveau, L3 et L4 ne semblent pas réagir dans ces conditions d'incubation avec ABHD. L1, L5 et L6 ont réagi avec ABHD et le caractère covalent est validé. Il est tout de même à noter qu'ABHD est observé en présence de L1 à 76 % sous forme holo en conditions dénaturantes contre 100 % en conditions natives : ce résultat pourrait être dû à une réversibilité de la fixation en conditions acides. D'autre part, L2 réagit toujours partiellement avec ABHD (32 % de forme holo est observé).



**Figure 25.** Criblage des 6 ligands covalents sur ABHD en conditions dénaturantes sur le Synapt G2. Le rapport m/z de l'état de charge 41+ est annoté sur chaque spectre.

En conclusion, 4 potentiels inhibiteurs sur 6 ont été identifiés comme réagissant avec la sérine catalytique d'ABHD dont 2 totalement dans les conditions testées (L5 et L6). Les deux ligands L3 et L4, qui n'ont pas montré de réaction au bout de 12h d'incubation, ont été décrits comme réversibles contrairement aux 4 autres (communication Laboratoires Servier).

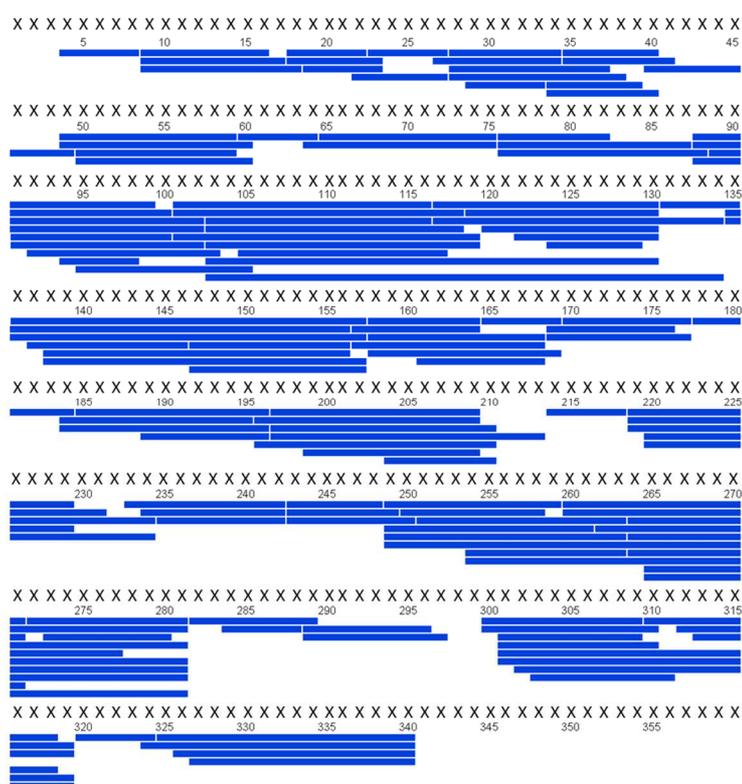
### 3.3. Étude structurale par HDX-MS d'ABHD.

Après avoir identifié les inhibiteurs réagissant avec ABHD, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur sur la conformation d'ABHD par HDX-MS : L1 a été choisi comme exemple.

La première étape pour une étude d'HDX-MS est d'optimiser les conditions de digestion afin de maximiser le recouvrement de séquence de la protéine et la redondance des peptides. Ces expériences ont été réalisées sur le système HDX-MS présenté en Partie 1.

#### 3.3.1. Influence du débit de trapping sur la couverture de séquence d'ABHD.

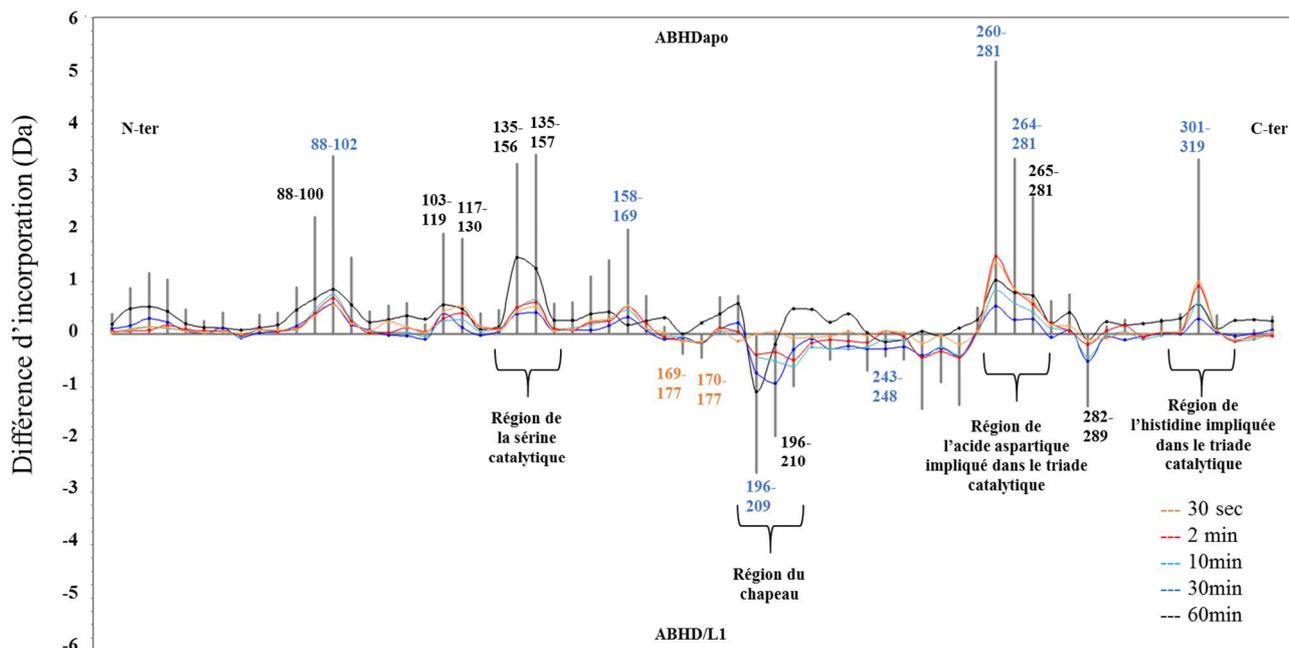
Deux valeurs de débit de trapping ont été testées lors de la digestion de la protéine ABHD par la pepsine : 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  et 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . À 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , le recouvrement de séquence est de 90,2% et la redondance est de 4,45 (avec 135 peptides détectés) contre 93,6 % de recouvrement de séquence et une redondance de 4,69 (avec 134 peptides détectés) à 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Les acides aminés non détectés sont les trois premiers acides aminés côté N-ter et les huit derniers acides aminés ainsi que le tag 10 histidines côté C-ter. Ces tests ont été réalisés en triplicata analytiques. L'augmentation du débit de trapping a permis d'obtenir un meilleur recouvrement de séquence de la protéine présenté en figure 26.



**Figure 26.** Recouvrement de séquence d'ABHD à 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Le recouvrement de séquence est de 93,6% et la redondance est de 4,69 (134 peptides détectés). Les peptides sont représentés par des barres bleues horizontales.

### 3.3.2. Comparaison des profils de deutération.

Les échantillons apo (contenant 2% v/v de DMSO) et holo ont été incubés 12h en conditions natives avant les expériences HDX-MS suite au suivi cinétique réalisé par MS native. Les expériences HDX-MS permettent d'observer plusieurs changements conformationnels lorsque L1 réagit avec ABHD (figure 27). Les régions impliquant les trois acides aminés de la triade catalytique (sérine, acide aspartique et histidine) et la région chapeau semblent impactées. L'interprétation de ces données nécessite une validation statistique en amont, décrite ci-après.

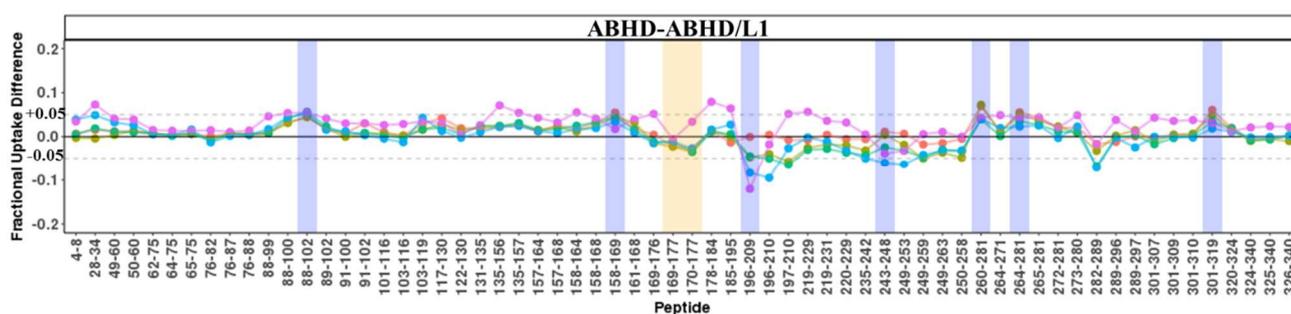


**Figure 27.** Différences d'incorporation en deutérium entre l'état libre ABHD et l'état réagi ABHD/L1. Les barres verticales grises représentent la somme des différences d'incorporation en deutérium entre les deux états de chaque peptide pour les cinq temps de marquage (30 sec, 2 min, 10 min, 30 min et 60 min). Les peptides dont la différence a été évaluée comme significative au moyen du logiciel MEMHDX<sup>88</sup> ont été annotés en bleu (seuil de 5%) et orange (seuil de 2%), les autres peptides sont annotés en noir.

#### Validation statistique.

La validation statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel MEMHDX. Ce logiciel permet de valider la présence d'une différence significative d'incorporation en deutérium entre les deux états (apo et holo) de chaque peptide à l'aide d'un test de Wald mais également de valider son amplitude à l'aide d'un second test de Wald. Les paramètres nécessaires à la réalisation de ces tests sont : un pourcentage d'incorporation en deutérium, fixé ici à 95% (pourcentage défini par nos conditions expérimentales), une significativité statistique de 1% et un seuil de 5% (ce seuil est défini arbitrairement et sera discuté ci-après). Suite à ce test, une représentation appelée *Fractional Uptake*

*Difference plot* est générée par le logiciel (figure 28), cette différence correspond à la soustraction de l'incorporation en deutérium moyenne observée à l'état apo par l'incorporation en deutérium moyenne observée à l'état holo à chaque temps de cinétique pour chaque peptide. Les peptides surlignés en bleu présentent une différence d'incorporation relative en deutérium (normalisée à 1, 1 étant la différence d'incorporation relative maximale observable sur le peptide considéré) supérieure au seuil fixé (5%, représenté par des pointillés horizontaux bleus). Ces peptides seront donc interprétés en vérifiant manuellement les différences d'incorporation relatives en deutérium (figure 29, peptides annotés en bleu). Les peptides surlignés en orange sont considérés comme significativement différents entre les états apo et holo pour un seuil de 2%. Cependant après avoir vérifié manuellement les profils d'incorporation de ces deux peptides (figure 29, peptides annotés en orange), ils ont été exclus de l'interprétation car les profils d'incorporation en deutérium sont superposables entre l'état apo et l'état holo. Enfin, les peptides non détectés comme présentant une différence d'incorporation relative supérieure à 2% sont totalement exclus de l'interprétation.



**Figure 28.** Représentation *Fractional Uptake Difference* générée par MEMHDX pour déterminer les peptides présentant une différence d'incorporation relative en deutérium entre les états apo et holo pour chaque temps de cinétique (orange : 30s, jaune : 2 min, vert : 10 min, bleu : 30 min et rose : 60 min) supérieure au seuil fixé.

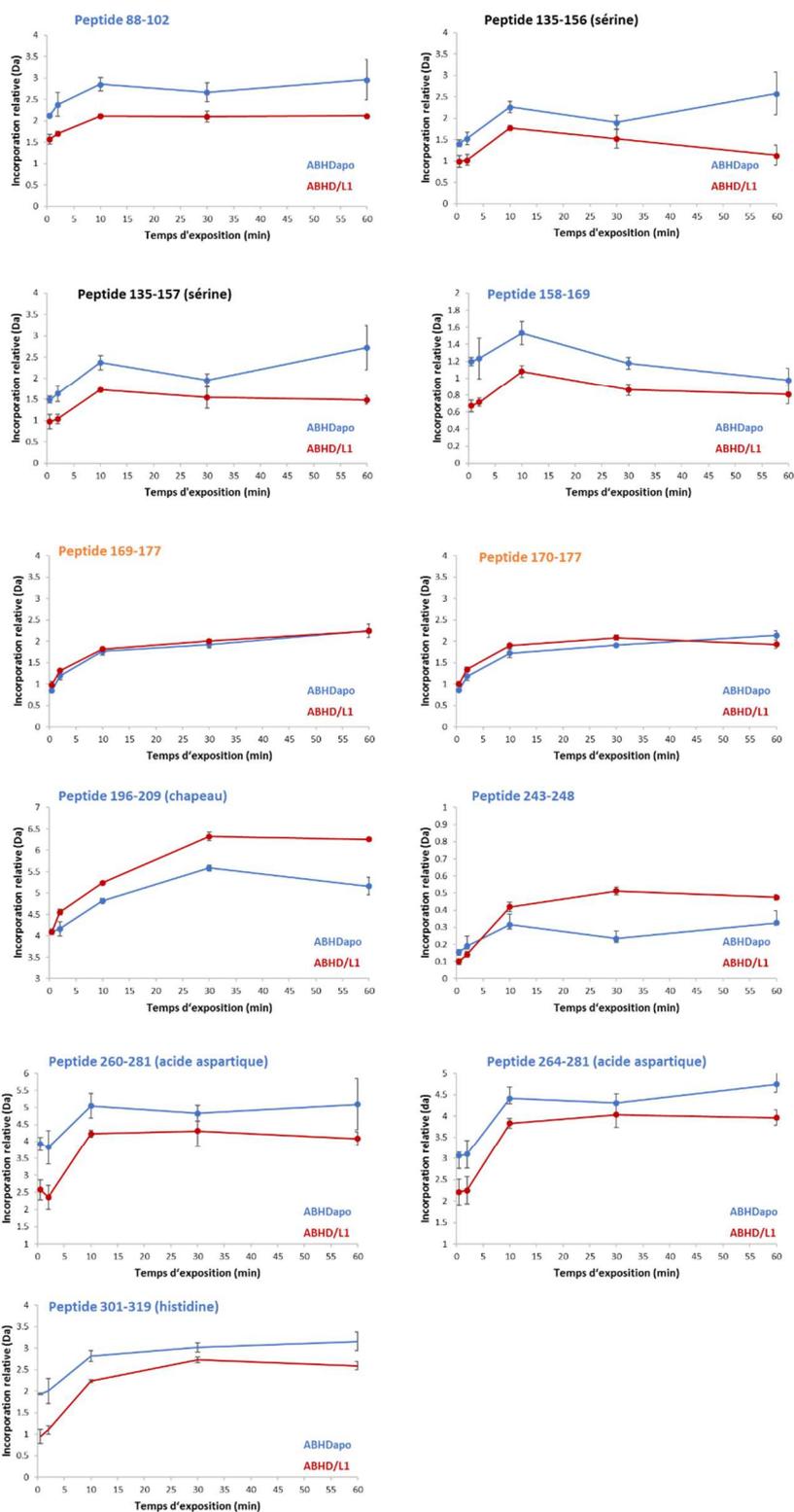
### Interprétation des peptides validés au seuil de 5%.

Les régions contenant l'acide aspartique et l'histidine impliqués dans la réaction du ligand sont protégées avec des différences d'incorporation positives. La région concernant l'acide aspartique impliqué dans la triade catalytique est protégée en présence de L1 avec une différence d'incorporation de +5 Da et +3 Da respectivement pour les peptides 260-281 et 264-281. Le peptide 301-319 contenant l'histidine impliquée dans la triade catalytique présente aussi un phénomène de protection avec une différence d'incorporation de +3 Da validée statistiquement. Ainsi ces régions semblent moins exposées au solvant deutéré suite à la réaction du ligand. Ces résultats sont en accord avec un phénomène de protection qui a déjà été observé par HDX-MS dans la littérature sur une autre lipase<sup>89</sup>. Outre ce changement conformationnel, des changements de conformation induits par la fixation de L1 sont aussi observés sur d'autres régions de ABHD. Côté C-terminal, les peptides 88-102 et 158-169

présentent une moins bonne accessibilité au solvant en présence de L1 avec des différences d'incorporation respectives de +3 Da et +2 Da. Le peptide 243-248 a également été validé par le logiciel MEMHDX bien que sa différence d'incorporation soit relativement faible avec -1 Da. De manière intéressante, la région couvercle d'ABHD devient plus accessible au solvant deutéré avec une différence d'incorporation de -3 Da (peptide 196-209 validé statistiquement) laissant supposer une plus grande flexibilité suite au changement conformationnel induit lors la fixation de L1.

### **Commentaire sur les peptides 135-156 et 135-157 (peptides de la sérine catalytique).**

Pour la région concernant la sérine catalytique, les peptides 135-156 et 135-157 présentent des différences d'incorporation importantes de +3 Da, cependant ces peptides correspondent à la forme apo d'ABHD et ne devraient pas être détectés suite à la réaction avec L1. Face à ce résultat, j'ai réalisé un appel d'ion correspondant au rapport m/z théorique du peptide réagi avec L1 et ce peptide n'est pas observé. Afin d'élucider cette absence, un peptide mapping est actuellement réalisé. De plus, cette différence n'a pas été considérée comme significative selon le logiciel MEMHDX. En effet, l'observation attentive des profils d'incorporation permet de proposer que les peptides 135-156 et 135-157 (figure 29, annotés en noir) contenant la sérine catalytique n'ont pas été détectés comme significativement différents malgré des différences d'incorporation supérieures aux réplicats analytiques entre les états apo et holo car le point à 30 min ne suit pas la tendance à l'augmentation de l'incorporation supposée par l'ensemble des autres points de cinétique sur ces peptides. En effet, le profil typique attendu lors d'une incorporation progressive en deutérium correspond par exemple au profil observé sur le peptide 301-319.



**Figure 29.** Profils d'incorporation relative en deutérium des peptides validés statistiquement par MEMHDX (annotés en bleu) et des peptides contenant la sérine catalytique (annotés en noir). Les courbes bleues et rouges représentent l'incorporation relative en deutérium au cours du temps respectivement de l'état apo et de l'état holo.

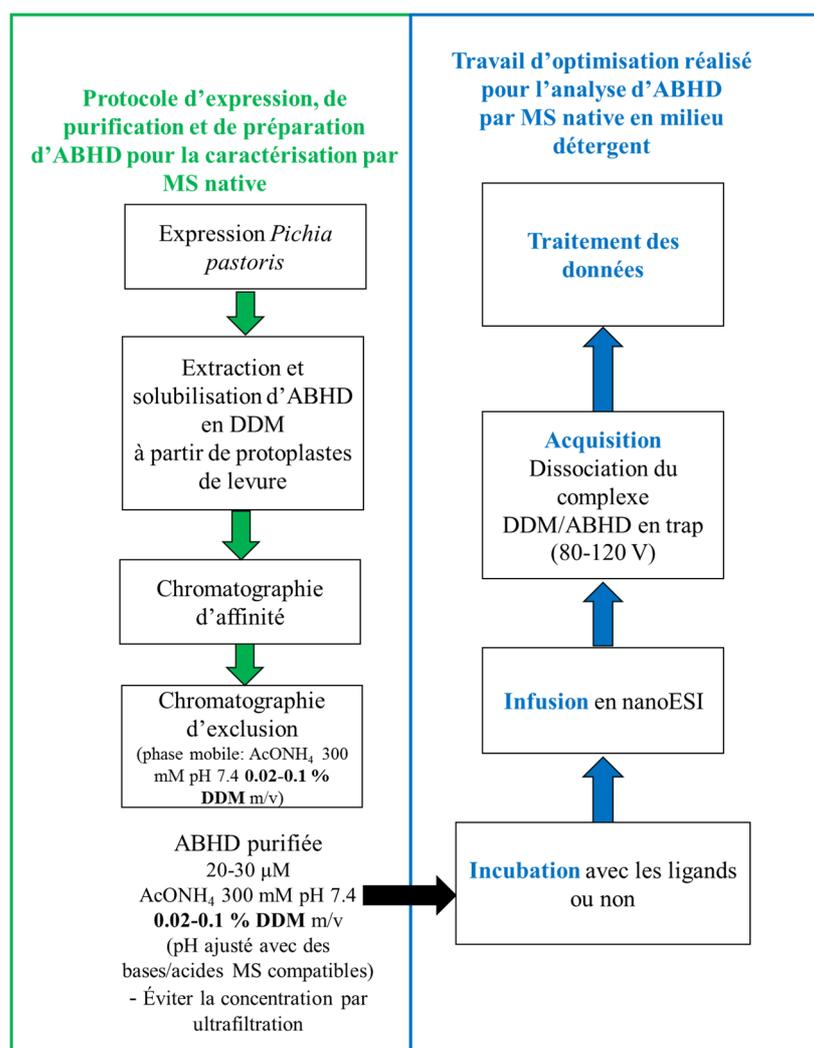
Ces résultats montrent que la reproductibilité des expériences reste encore aujourd'hui un axe d'amélioration prioritaire. De plus, la validation des données nécessite l'utilisation de tests statistiques dont les paramètres ne sont pas harmonisés par la communauté scientifique.

Afin de renforcer ces premières conclusions, plusieurs perspectives pourraient être envisagées :

- Une caractérisation conformationnelle de ABHD par HDX-MS en présence des autres inhibiteurs identifiés par MS native afin de comparer les régions impactées et de sonder à nouveau les peptides contenant la sérine catalytique.
- Une étude de peptide mapping pour vérifier l'implication de la sérine catalytique dans la réaction.
- La mutation de la sérine impliquée dans la réaction afin de contrôler que seul cet acide aminé peut réagir avec les inhibiteurs potentiels.

## 4. Conclusions.

Les conditions de MS native et MS dénaturante ont été mises au point afin de permettre la caractérisation d'une protéine de 41 kDa possédant un domaine transmembranaire solubilisée en milieu détergent DDM 0,02-0,1% m/v. La préparation d'échantillon et l'optimisation des paramètres instrumentaux ont été identifiées comme les étapes clés pour la réussite d'une analyse en MS native et ont nécessité une mise au point conséquente. Le protocole retenu est résumé figure 30.



**Figure 30.** Représentation schématique du protocole final utilisé pour la caractérisation par MS native d'ABHD et de 6 potentiels inhibiteurs.

Après avoir validé la réaction de 4 inhibiteurs potentiels sur ABHD (L1, L2, L5 et L6) par MS dénaturante et MS native et déterminé quelle était la cinétique de réaction et le ratio ABHD/L1 nécessaires pour que la réaction de L1 sur ABHD soit totale, nous avons pu caractériser les changements de conformation induits par la fixation de L1 sur ABHD par HDX-MS. Suite aux expériences de deutération, plusieurs régions ont été observées comme soumises à des changements conformationnels induits et notamment les régions impliquant les acides aminés impliqués dans la

triade catalytique soumises à un phénomène de protection et la zone chapeau potentiellement plus flexible en présence de L1.

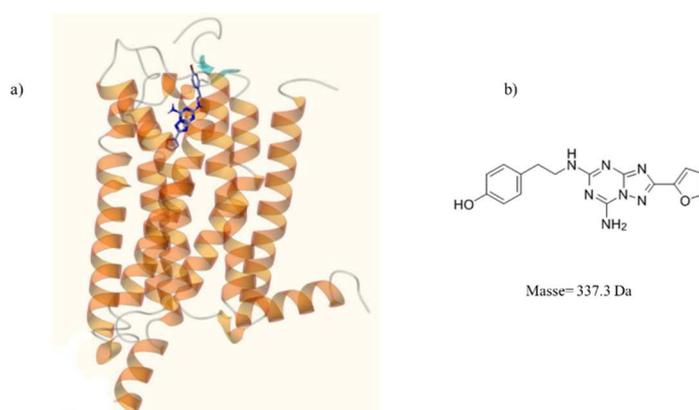
L'ensemble du travail réalisé a permis de mettre au point des conditions expérimentales et instrumentales adaptées à la caractérisation d'une PM par MS native et HDX-MS pour la première fois dans notre laboratoire.

L'expérience acquise et le protocole mis en place lors de cette étude ont été utilisés pour la caractérisation d'une deuxième protéine plus largement enchâssée dans la membrane : le récepteur à l'adénosine AA2A.

# CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉINE MEMBRANAIRE À SEPT DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES PAR MS NATIVE: CAS DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE

## 1. Contexte de l'étude.

Les récepteurs couplés aux protéines G sont classés en plusieurs familles en fonction de leur homologie de séquence avec différentes protéines historiques et leurs fonctions associées. Le récepteur d'intérêt ici est le récepteur à l'adénosine AA2A qui fait partie des RCPG de classe A car sa séquence en acides aminés possède une homologie certaine avec la rhodopsine<sup>90</sup>. Son ligand endogène est l'adénosine, métabolite qui joue un rôle majeur dans le transfert d'énergie et la transduction du signal. Ce récepteur est impliqué dans les maladies cardiovasculaires, les problèmes du système nerveux et l'inflammation mais il est aussi potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme la maladie de Parkinson<sup>91-92</sup> ou Alzheimer<sup>93</sup>. Ce RCPG est donc une cible thérapeutique de choix<sup>94</sup>. Sa structure cristallographique a été résolue en 2008<sup>95</sup> par l'équipe du Dr. Stevens à l'aide d'un construit stabilisé par sa fusion avec un lysozyme<sup>96</sup>. Ce construit a été muté sur plusieurs acides aminés afin d'améliorer son affinité avec un ligand antagoniste de haute affinité ( $K_d$  de l'ordre du nM<sup>97</sup>) : le ZM241385, avec lequel il a été cocrystallisé. La structure du récepteur AA2A et de son ligand antagoniste sont représentés en figure 31.



**Figure 31.** Représentation schématique du récepteur AA2A muté cocrystallisé avec le ZM241385 (représenté en bleu) (a) et structure du ligand antagoniste ZM241385 (b), adaptée de<sup>98</sup>.

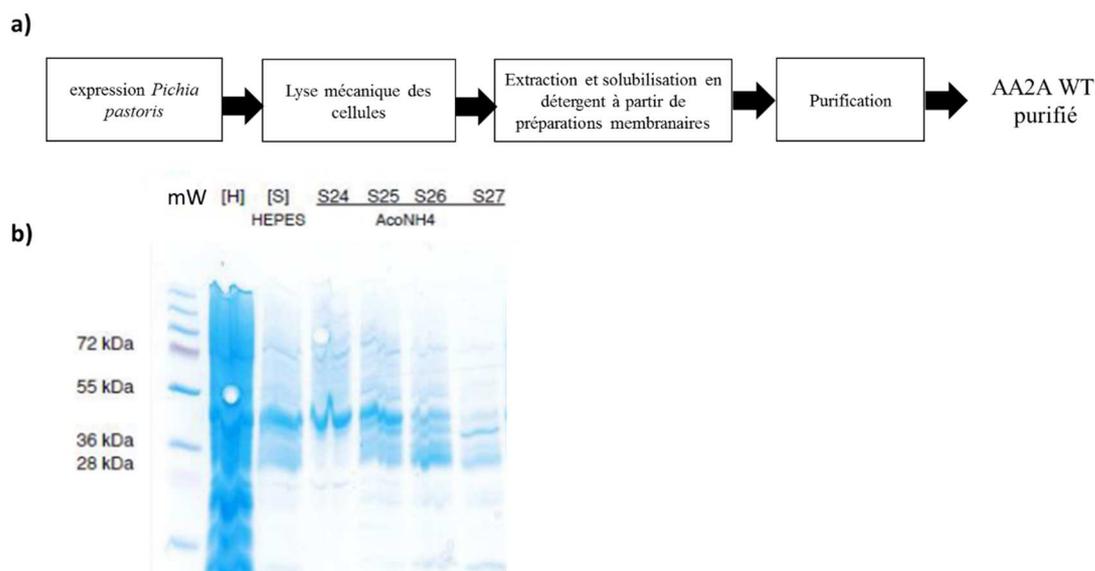
Cette étude a montré que le ZM241385 se fixait au niveau des boucles extracellulaires du récepteur AA2A. En 2011, l'équipe du Dr. Tate<sup>99</sup> a confirmé ce résultat et a démontré l'importance de 9 acides

aminés du récepteur à l'adénosine pour la fixation avec le ZM241385. Ces acides aminés seront spécifiés dans le chapitre.

## 2. Objectifs de l'étude.

Dans le cadre de ma thèse, ce récepteur a été utilisé comme RCPG de référence afin d'identifier les conditions optimales de préparation d'échantillon et d'analyses pour la caractérisation par MS native de la protéine *apo* et évaluer la possibilité de cribler des ligands non-covalents comme le ZM241385 sur un RCPG en milieu détergent.

Le protocole d'expression, de solubilisation et de purification pour l'analyse par MS native est relativement similaire à celui présenté pour la protéine ABHD (figure 32a). Brièvement, après une lyse mécanique des cellules, AA2A WT a été solubilisé et purifié avec 1% m/v de DDM à partir de préparations membranaires puis purifié par chromatographie d'affinité et chromatographie d'exclusion stérique. La phase mobile utilisée pour la SEC est AcONH<sub>4</sub> 150 mM pH 7,5 + 0,02-0,1 % m/v DDM. Les fractions SEC correspondant à la protéine AA2A WT, S24, S25 et S26 sont récupérées et déposées sur un gel SDS-PAGE afin d'évaluer l'hétérogénéité de l'échantillon. Plusieurs bandes sont observées (figure 32b) et laissent supposer un échantillon hétérogène d'environ 45 kDa. La fraction S25 a été utilisée pour la caractérisation par MS native.

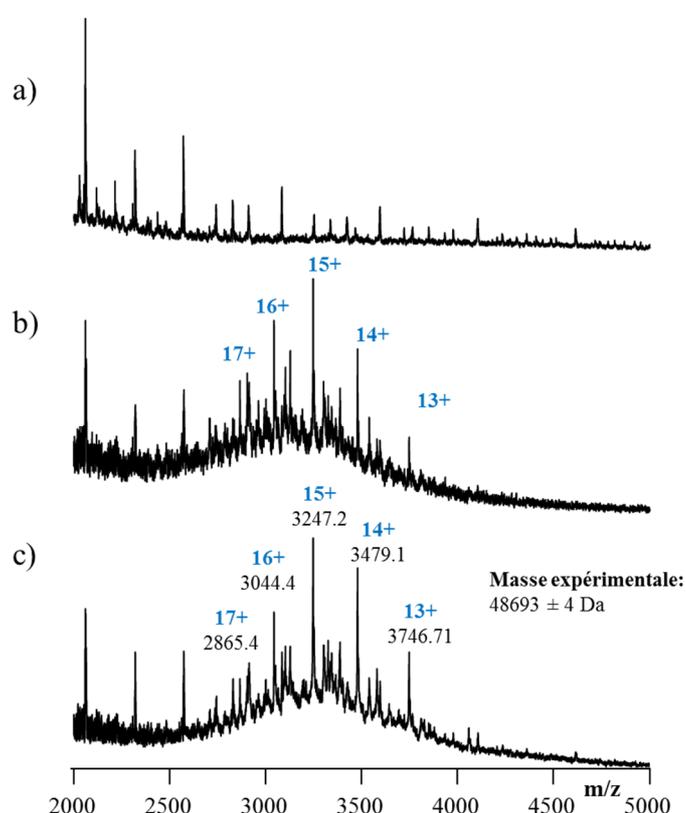


**Figure 32.** Représentation schématique du protocole d'expression et de purification du récepteur AA2A WT (a) et de son hétérogénéité visible sur gel SDS-PAGE (b).

### 3. Résultats.

#### 3.1. Analyse du récepteur AA2A WT par MS native et de son ligand ZM241385.

Le récepteur AA2A WT a été analysé par MS native et l'optimisation des conditions de préparation a été réalisée avec les mêmes précautions que pour la protéine ABHD. L'effet de la tension en trap CV sur la qualité du spectre de masse est illustré figure 33. Les tensions de trap CV nécessaires à l'obtention d'une qualité spectrale suffisante pour calculer la masse de la protéine sont élevées ( $\approx 100$ - $150$  V). À ces tensions, les molécules de DDM liées au récepteur sont dissociées, le signal protéique majoritaire observé est attribué à une espèce de  $48693 \pm 4$  Da. A des tensions inférieures (figure 33a) aucun signal protéique n'est visible, seules des molécules libres de DDM sont observées. De nombreux autres signaux protéiques sont visibles avec des tensions élevées en trap CV (figure 33b-c), montrant ainsi l'hétérogénéité de l'échantillon (comme attendu d'après le gel SDS-PAGE). La masse mesurée ( $48693 \pm 4$  Da) ne correspond pas à la masse attendue pour le récepteur purifié (44705 Da). Cette différence de masse supplémentaire d'environ 4000 Da pourrait provenir d'acides aminés non clivés lors de la purification (figure 34) ou de modifications post traductionnelles mais, à ce jour, n'a pu être élucidée.



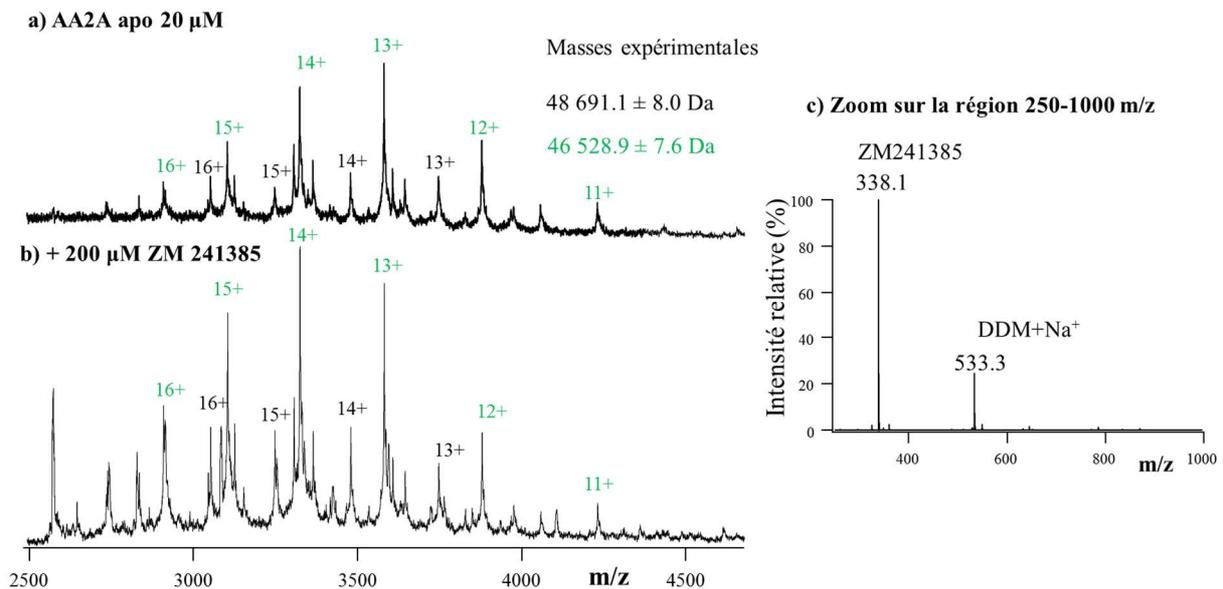
**Figure 33.** Caractérisation par MS native du récepteur AA2A WT à 20  $\mu$ M : l'effet de la tension trap CV est illustrée. (a) trap CV : 50 V, (b) trap CV : 100 V et (c) trap CV : 150 V.

**MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLL**  
**FINTTASIAAAKEEGVSLEKRDYKDDDDKDH HHHHHHHHHHGDRENLYFQGGSMPI MGSSVYI**  
 TVELAI AVLAILGNVLCWAVWLN SNLQNV TN YFVVS LAAADIAVGV LAIPFAITISTG FCAACH  
 GCLFIACFVLVLTQSSIFSL LAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIACWVLSFAIGLTPMLGWN  
 NCGQPKEGKNHSQGC GEGQVACL FEDVVP MN YMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYL RIFLAARR  
 QLKQMESQPLPGERARSTLQKEVHAAKSLAII VGLFALCW LPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWLMY  
 LAIVLSHTNSV VNPFIYAYRIR EFRQTRFKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLA AHGSDGEQVSLR  
 LNGHPPGVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSAQESQGN TGLPDVELLSHELKGVCP EPPGLD  
 DPLAQDGAGVSTSEFENLYFQQQFGGGTGGAPAPAAGGAGAGKAGEGEIPAPLAGTVSKILVKE  
 GDTVKAGQTVLVLEAMKMETEINAPTDGKVEKVLVKERDAVQGGQGLIKIG\*

En **noir**: séquence théorique d'AA2A WT après purification (44 705 Da)  
 En **rouge**: séquence correspondant au facteur de sécrétion, cette partie est  
 normalement clivée de manière endogène par la cellule (+8 921 Da)  
 En **vert**: fragment C-terminal clivé lors de la purification (+14 191 Da)

**Figure 34.** Séquence d'AA2A WT et les causes probables de l'ajout de masse observé en MS native.

La caractérisation par MS native d'un deuxième lot d'AA2A WT a été réalisée dans les mêmes conditions MS (figure 35a). Contrairement au premier lot purifié, l'espèce majoritaire observée est mesurée avec une masse de  $46529 \pm 8$  Da (représentée en vert), l'espèce à 48693 Da précédemment observée est ici présente en plus faible proportion (représentée en noir) avec une masse de  $48691 \pm 8$  Da. L'incubation avec le ligand ZM241385 (10 excès molaires, soit 200  $\mu$ M, pendant 30 minutes à température ambiante) (figure 35b) ne permet pas d'observer de fixation du ligand sur l'espèce protéique majoritaire, la masse attendue est de 46866 Da (soit +337 Da correspondant à une molécule de ZM 241385) malgré sa présence dans l'échantillon (figure 35c).



**Figure 35.** Comparaison des spectres de MS native obtenus pour AA2A WT apo à 20  $\mu$ M (a) et AA2A WT incubé avec 10 excès molaire de ZM241385 (200  $\mu$ M) (b), zoom sur la région 250-1000 m/z permettant de visualiser la présence du ligand dans l'échantillon. Les conditions d'analyses sont strictement identiques.

Ces résultats ont été obtenus en fin de thèse : l'obtention du premier signal protéique a été difficile et a nécessité de nombreux essais (étalés sur plusieurs années) au niveau de la préparation d'échantillon et de l'optimisation des paramètres MS.

De nouveaux essais sont actuellement réalisés d'une part afin d'optimiser les conditions d'incubation qui doivent normalement permettre l'interaction ( $K_d$  de l'ordre du nM) et d'autre part pour vérifier que les conditions instrumentales ne dissocient pas en phase gazeuse la fixation du ligand sur le récepteur.

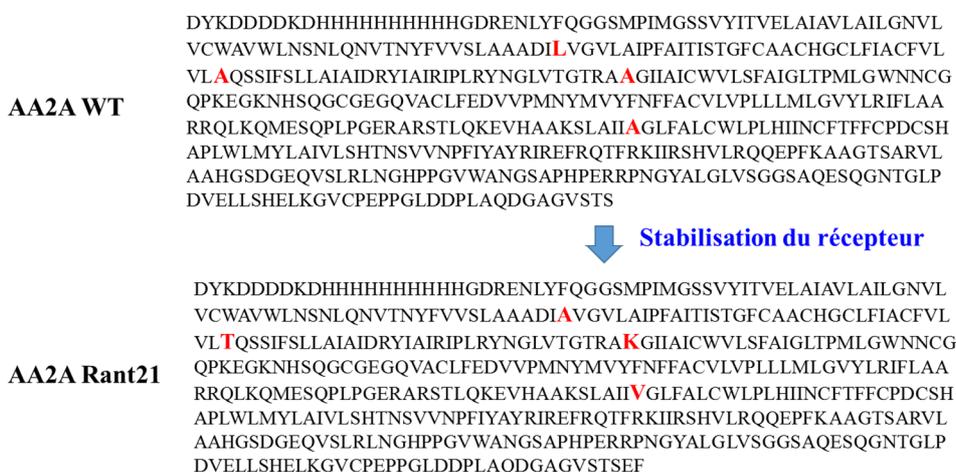
De manière complémentaire à ces essais, deux stratégies ont été amorcées et sont aussi en cours de réalisation :

- La première consiste à favoriser l'interaction ZM241385/récepteur AA2A en utilisant une version mutée d'AA2A stabilisée dans une conformation inactive, favorable à la fixation des antagonistes comme le ZM241385.
- La seconde consiste à caractériser par HDX-MS les changements conformationnels induits sur le récepteur AA2A WT.

Les premiers résultats obtenus sur ces deux approches sont succinctement présentés.

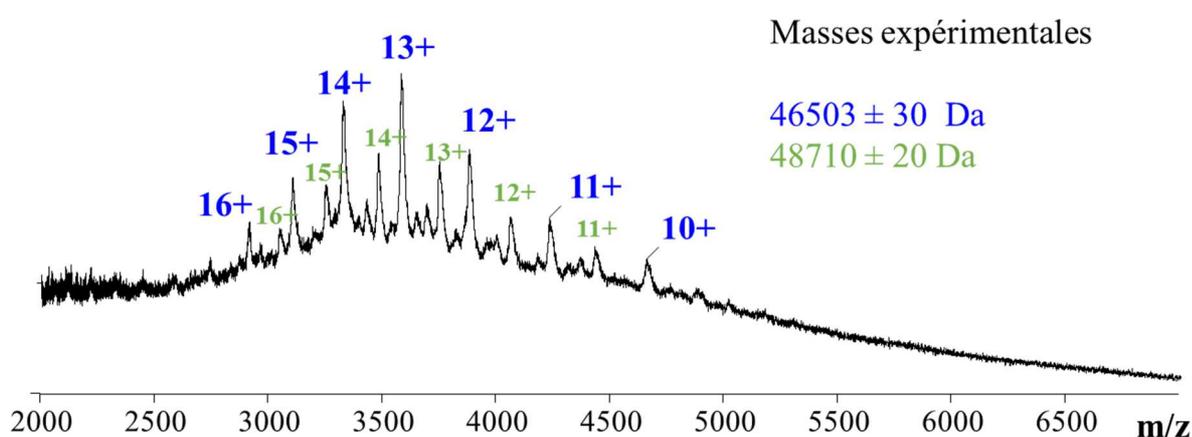
### 3.2. Analyse du construit AA2A Rant21 par MS native.

En 2008, l'équipe du Dr. Tate a montré que la mutation de 4 acides aminés (L85A, A119T, A153K et A270V) a permis une « forte » thermostabilisation du récepteur AA2A dans une conformation inactive avec une variation du  $T_m$ , température à laquelle 50% des récepteurs sont capables de fixer le ZM241385, de 25°C à 39°C<sup>100</sup> suite à des expériences de mutagenèse aléatoire. Ce construit d'AA2A appelé Rant21 a été exprimé et purifié par l'équipe du Dr. Renaud Wagner avec le même protocole que la version WT. Les 4 acides aminés modifiés sont présentés figure 36.



**Figure 36.** Différences entre la séquence du récepteur AA2A WT et le construit stabilisé AA2A Rant21. Les acides aminés modifiés sont notés en rouge.

Ce mutant a été analysé par MS native dans les mêmes conditions que le construit WT. Le spectre obtenu est présenté en figure 37. À nouveau, l'hétérogénéité de l'échantillon est importante. Les deux espèces majoritaires observées de  $46503 \pm 30$  Da et  $48710 \pm 20$  Da ne peuvent être attribuées à l'aide de la séquence en acides aminés. Des tests de fixation avec le ZM241385 sont actuellement en cours. Cependant ce construit stabilisé présente un intérêt pour la caractérisation par MS native car il est possible de réaliser de nombreuses analyses successives du récepteur sans observer de précipitation contrairement au construit WT.

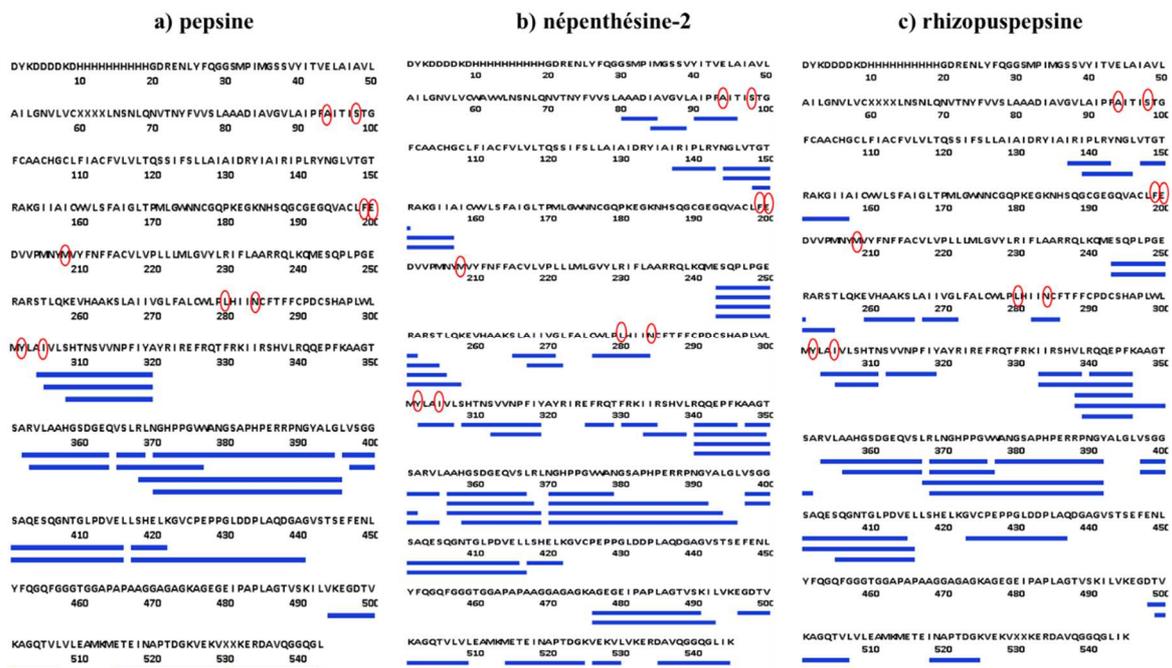


**Figure 37.** Spectre de masse natif d'AA2A Rant21 à 20  $\mu$ M solubilisé à 0,1% m/v DDM.

Suite aux difficultés rencontrées lors de la caractérisation du récepteur AA2A WT et de son ligand non-covalent par MS native, nous avons essayé d'étudier les changements conformationnels induits par HDX-MS.

### 3.3. Analyse du récepteur AA2A WT par HDX-MS.

La première étape lors d'expériences HDX-MS consiste à maximiser le recouvrement de séquence de la protéine et notamment les zones d'intérêt. L'objectif ici est de recouvrir les acides aminés impliqués directement dans l'interaction avec le ZM241385<sup>99</sup> (entourés en rouge sur la figure 38) mais aussi de recouvrir au maximum la séquence du récepteur afin de caractériser d'éventuels changements de conformations induits par la fixation de l'antagoniste. Pour cela, nous avons utilisé trois enzymes de digestion non spécifiques fonctionnant à pH acide pour la digestion en ligne du récepteur AA2A WT puis nous avons comparé les résultats sur un triplicata analytique. Les recouvrements de séquence ainsi obtenus sont représentés en figure 38. Concernant les recouvrements de séquence, la pepsine a le plus faible taux de recouvrement (26%) en comparaison avec la népenthésine 2 (46%) et la rhizopuspepsine (40%). Les redondances peptidiques sont légèrement supérieures pour la pepsine (2,27) et la népenthésine 2 (2,22) en comparaison avec la redondance peptidique observée sur la rhizopuspepsine (2,00). La népenthésine 2 est donc l'enzyme qui permet d'obtenir le plus haut recouvrement de séquence l'AA2A WT et une redondance peptidique de 2,22. De plus, 5 acides aminés sur 9 interagissant avec le ZM241385 sont recouverts avec cette enzyme contre seulement 1 et 2 pour la pepsine et la rhizopuspepsine.



**Figure 38.** Recouvrement de séquence d'AA2A WT suite à une digestion enzymatique avec la pepsine, 26% (a), la népenthésine 2, 46% (b) et la rhizopuspepsine, 40% (c). Les acides aminés impliqués directement dans l'interaction avec le ZM241385 sont entourés en rouge.

Face à ces résultats (recouvrement de séquence d'environ 46 % dont 5 acides aminés d'intérêts détectés sur 9, figure 39), l'optimisation des conditions de digestion doit être poursuivie sur ce récepteur à travers un travail d'optimisation plus conséquent en essayant par exemple d'augmenter la concentration en agent dénaturant à 8 M mais surtout en vérifiant l'exactitude de la séquence fournie et en caractérisant les éventuelles glycosylations et les autres modifications post traductionnelles<sup>101</sup> qui peuvent entraver la reconnaissance des peptides par le logiciel. L'objectif, selon moi, est d'atteindre un recouvrement de séquence minimum de 70 % car dans ces conditions des RCPGs comme le récepteur adrénergique  $\beta 2$  ont pu être caractérisés avec un recouvrement de séquence proche de 90%<sup>102</sup>.

|                              | Enzyme de digestion utilisée |                |                 |
|------------------------------|------------------------------|----------------|-----------------|
|                              | Pepsine                      | Népenthésine 2 | Rhizopuspepsine |
| Recouvrement de séquence (%) | 26                           | <b>45.5</b>    | 40.1            |
| Redondance                   | 2.27                         | <b>2.22</b>    | 2.00            |

**Figure 39.** Choix de l'enzyme de digestion pour la caractérisation d'AA2A WT par HDX-MS.

## 4. Conclusions.

La caractérisation du récepteur AA2A WT par MS native et HDX-MS en milieu détergent est délicate pour plusieurs raisons :

- Le récepteur est relativement hétérogène, cette hétérogénéité diminue la qualité des spectres natifs à cause de la compétition à l'ionisation.
- Toujours en MS native, la dissociation du complexe DDM/récepteur nécessite l'application de hautes tensions dans la cellule trap (trap CV $\approx$ 150 V). Ces hautes tensions peuvent engendrer, outre la dissociation du complexe DDM/récepteur nécessaire à l'observation du signal protéique, une rupture des interactions non covalentes entre le ZM241385 et le récepteur AA2A WT. Les efforts mis en œuvre pour la caractérisation de cette interaction par MS native doivent être, à mon avis, poursuivis car la fixation de quelques ligands non covalents endogènes ou exogènes a été récemment observée sur des RCPGs avec cette technique par l'équipe du Dr. Robinson<sup>41</sup>. Néanmoins, la caractérisation d'un RCPG par MS native est peu référencée dans la littérature et constitue une avancée au moins à l'échelle du laboratoire.
- Concernant la caractérisation par HDX-MS, la digestion enzymatique du récepteur (possédant 7 domaines transmembranaires) est difficile (uniquement 46% de recouvrement de séquence) en comparaison avec une protéine moins hydrophobe comme la protéine ABHD (seulement un domaine transmembranaire et un recouvrement de séquence de 94%). Ces difficultés de digestion propres aux RCPGs sont connues et nécessitent une optimisation des conditions de digestion importantes et une connaissance approfondie des modifications post-traductionnelles<sup>51</sup>. De plus, la nature hydrophobe de ces protéines nécessite l'utilisation de « blancs » entre les analyses afin de pallier au phénomène de *carry over*. En effet, la forte rétention de ces peptides sur la colonne peut fausser l'interprétation soit par une augmentation de l'échange inverse soit par une élution de certains peptides dans l'analyse suivante et ainsi engendrer des biais dans les informations déduites.

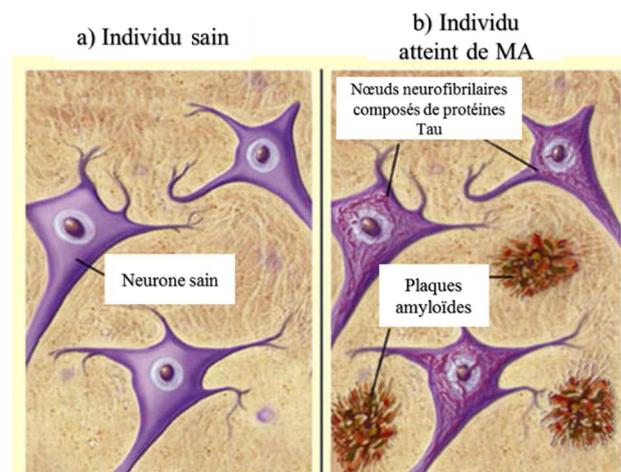
L'ensemble de ces résultats illustre les difficultés à caractériser cette famille de PM par des approches de MS structurale aujourd'hui. Les RCPGs restent actuellement les protéines les plus difficiles à caractériser par ces approches.

# CHAPITRE 4 : BÉNÉFICES DE LA SEC-MS/IM-MS NATIVE POUR LA CARACTÉRISATION DU PEPTIDE AMYLOÏDE AB 42 EN MILIEU DÉTERGENT.

## 1. Contexte de l'étude.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la principale cause de démence chez les personnes âgées avec plus de 225000 personnes atteintes chaque année en Europe (source, *vaincrealzheimer.org*). Les traitements actuels ne permettent qu'une amélioration modeste des symptômes car les causes de la maladie sont encore mal connues<sup>103-104</sup>. Son diagnostic est actuellement basé sur l'observation de deux types de lésions<sup>105</sup> :

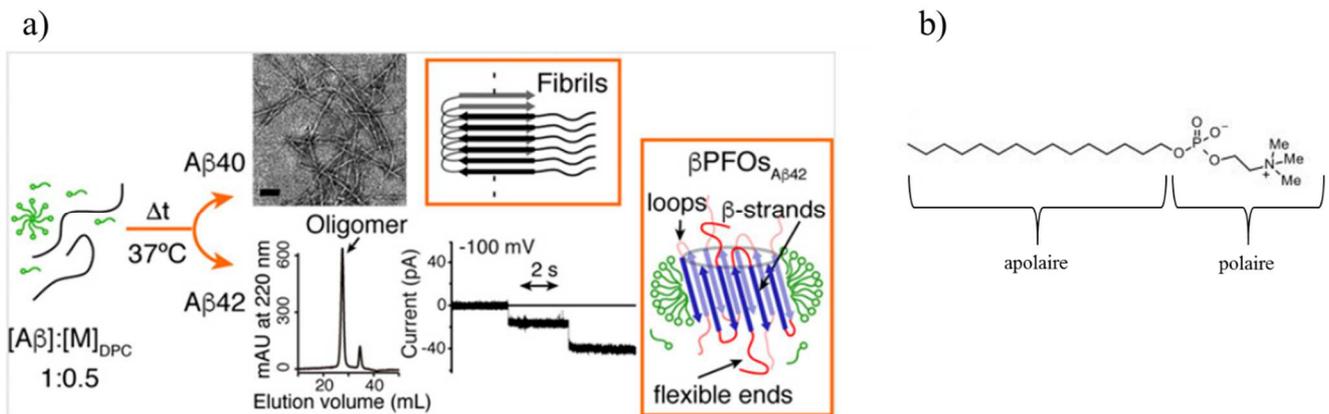
- La présence de filaments composés de protéines Tau anormalement désagrégées et hyperphosphorylées<sup>106</sup> au sein des neurones (figure 40).
- L'accumulation anormale de peptides amyloïde beta ( $A\beta$ ) sous forme de plaques (figure 40) entre les neurones, chez les personnes atteintes de la MA<sup>107-108</sup>. Les peptides amyloïde beta sont des peptides de 39 à 43 acides aminés qui proviennent d'un clivage anormal de la protéine APP (*amyloid Protein Precursor*) par des sécrétases. Ces peptides sont insolubles et leur accumulation dans le milieu extracellulaire est décrite comme responsable d'une entrée anarchique et massive du calcium ou d'autres ions dans les cellules neuronales provoquant ainsi leur apoptose. Ainsi, les plaques de peptides amyloïdes beta sont décrites comme responsables de la MA pour une large communauté de chercheurs cette hypothèse est nommée « *amyloid hypothesis* »<sup>109</sup>.



**Figure 40.** Représentation des lésions provoquées par la MA au niveau du cerveau (b) et comparaison avec un individu sain (a), adaptée de *the brain.mcgill.ca*, consulté le 02/03/19.

Plus récemment, des travaux ont montré que la MA pourrait être causée non pas par la présence de ces plaques à l'extérieur de la membrane des cellules mais par certains oligomères toxiques du peptide amyloïde beta formant un pore de forme tonneau beta dans la membrane : cette hypothèse est nommée « *amyloid pore hypothesis* ». Ce serait la formation de ce pore de type canal ionique qui permettrait l'entrée irrégulière d'ions calcium, potassium ou sodium.

Pour étudier ces oligomères en environnement membranaire<sup>110</sup> et mieux comprendre leur assemblage sous forme d'un tonneau beta, différentes stratégies de solubilisation ont été criblées sur deux variants principaux du peptide amyloïde beta : les variants A $\beta$  40 et A $\beta$  42 par l'équipe du Dr. Natalia Carulla<sup>111-112</sup>. Parmi les travaux menés<sup>113</sup>, le Dr. Natalia Carulla a mis au point en 2016 un protocole pour former des oligomères dans un « environnement mimant la membrane » en utilisant notamment des bicelles de dodécylphosphocholine (DPC). La caractérisation des deux variants principaux du peptide A $\beta$  a permis d'établir les conclusions suivantes : le variant A $\beta$  40 s'agrège sous forme de fibrilles et le variant A $\beta$  42 s'assemble *a priori* sous la forme d'un tonneau beta (figure 41) dont l'état oligomérique n'est pas totalement élucidé mais est supposé octamérique grâce à des analyses SEC.



**Figure 41.** Représentation des réarrangements structuraux des variants A $\beta$  40 et A $\beta$  42 solubilisés en DPC, adaptée de<sup>111</sup> (a), représentation de la formule chimique du dodécylphosphocholine et de son caractère amphiphile (b).

Des études précédentes menées par l'équipe du Dr. Bowers<sup>114</sup> ont montré l'intérêt de la mobilité ionique pour caractériser l'état oligomérique de ce peptide, observé sous forme hexamérique et dodécamérique<sup>115</sup>. Il est important de noter que ce mécanisme d'assemblage a été proposé en étudiant le peptide A $\beta$ 42 sans détergent dans un tampon acétate d'ammonium et que les expériences réalisées ont été faites dans un laps de temps court pour éviter sa précipitation.

## 2. Objectifs de l'étude.

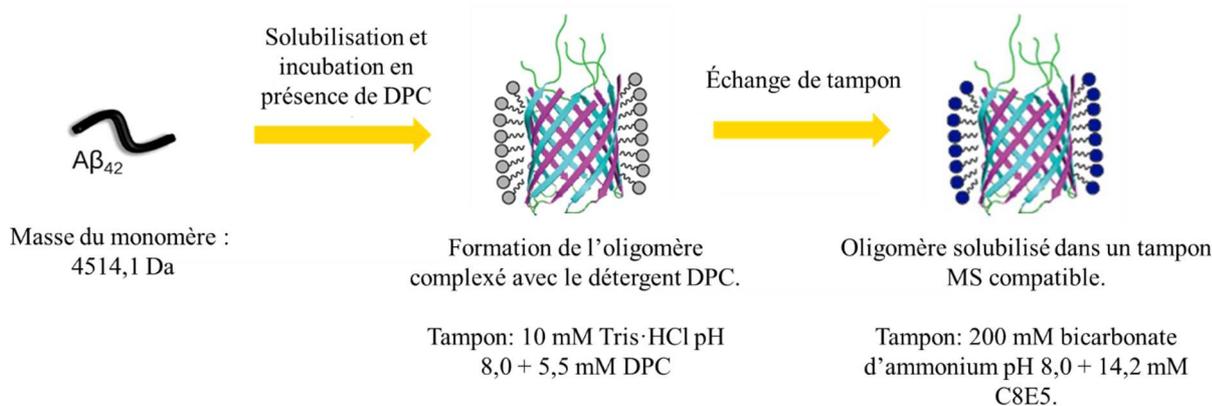
Dans ce contexte, j'ai développé des méthodes de MS native et de mobilité ionique pour approfondir la caractérisation structurale de l'assemblage du variant A $\beta$  42 en milieu détergent en collaboration avec l'équipe du Dr. Natalia Carulla (IECB, France). Les analyses avaient pour objectifs :

- de caractériser l'état d'oligomérisation du peptide A $\beta$  42 en conditions micellaires de DPC.
- d'évaluer l'influence de la concentration en A $\beta$  42 sur son oligomérisation.

## 3. Résultats.

### 3.1. Caractérisation par MS native en infusion directe.

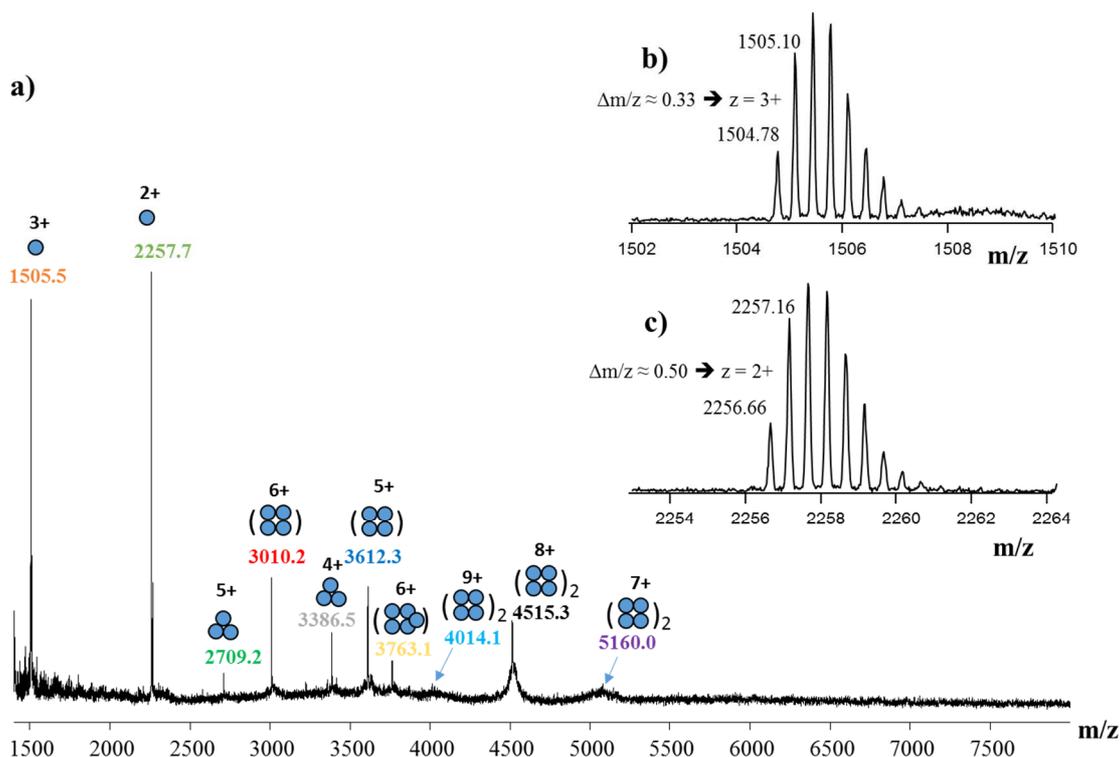
Le peptide A $\beta$  42 est solubilisé et incubé dans un tampon 10 mM Tris HCl pH 8,0 avec 5,5 mM de DPC (dont la CMC est de 1,5 mM, source *anatrace.com*) pour permettre la formation de l'oligomère<sup>111</sup>(figure 42). Le DPC n'est cependant pas compatible<sup>20, 26</sup> avec une analyse MS et a été remplacé par un autre détergent le C8E5, pentaéthylène glycol mono-octyl éther, à l'aide de deux mini colonnes de gel filtration (Zeba™ Spin Desalting Columns) avec un seuil de coupure de 7 kDa et un volume total de 0,5 mL. Ainsi le tampon utilisé pour l'analyse par MS native est 200 mM bicarbonate d'ammonium pH 8,0 + 14,2 mM C8E5 (soit 2 fois sa CMC, source *anatrace.com*).



**Figure 42.** Protocole de préparation du peptide A $\beta$  42 pour sa caractérisation par MS native.

L'échantillon a été infusé à 150  $\mu$ M sur le Synapt G2 en mode ESI<sup>+</sup> et l'optimisation de la tension de la cellule trap a été réalisée comme dans les chapitres précédents afin de rompre les interactions détergent/peptide sans rompre les interactions peptide/peptide. Le spectre de masse natif ainsi obtenu est présenté en figure 43a. La résolution isotopique accessible sur les ions m/z 1505,5 et m/z 2257,7 permet de supposer que ces ions sont majoritairement attribués au peptide sous forme de monomère. En revanche, la résolution expérimentale accessible sur les autres ions ne permet pas de les attribuer

sans ambiguïté à un état oligomérique unique mais seulement de faire des hypothèses. L'attribution des états de charge et de l'état d'oligomérisation peut être ambiguë pour plusieurs rapports  $m/z$ . Le tableau 2 illustre les attributions théoriques probables de ces signaux et les hypothèses proposées. Par exemple, l'ion observé à 4515,3  $m/z$  peut être attribué (en noir dans le tableau 2 et sur la figure 43), en théorie, à de nombreuses combinaisons d'états de charge et d'holo-oligomères mais est attribué à un octamère chargé 8+ car les états de charges successifs impairs 7+ et 9+ de cet oligomère sont observés.



**Figure 43.** Spectre de masse natif (1500-8000  $m/z$ ; a) du peptide A $\beta$  42 à 150  $\mu$ M sur le Synapt G2 en infusion nanoESI et zooms sur les pics 1505  $m/z$  (b) et 2257  $m/z$  (c) permettant de les attribuer au peptide A $\beta$ 42 sous forme de monomère.  $V_c$  : 180 V, trap CV : 100 V et trap gas : 5 mL/min,  $P_i$  : 6 mbar.

a)

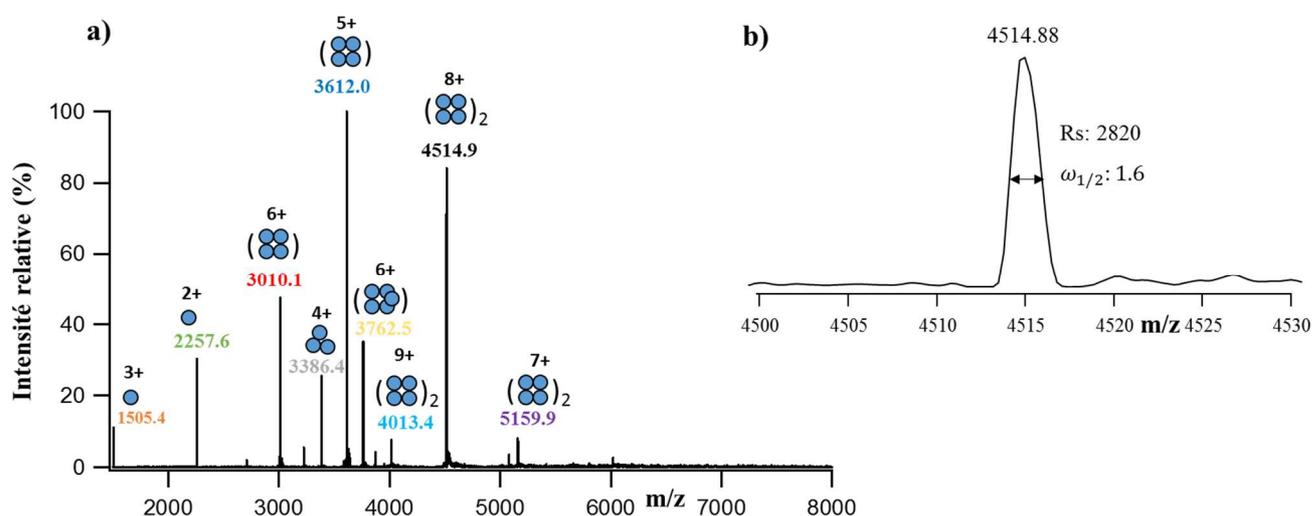
| État d'oligomérisation | Masse (Da) | rapports m/z théoriques |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |
|------------------------|------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                        |            | 12                      | 11     | 10     | 9      | 8      | 7      | 6      | 5       | 4       | 3       | 2       | 1       |
| 1-mer                  | 4514.1     | 377.2                   | 411.4  | 452.4  | 502.6  | 565.3  | 645.9  | 753.4  | 903.8   | 1129.5  | 1505.7  | 2258.1  | 4515.1  |
| 2-mer                  | 9028.2     | 753.4                   | 821.7  | 903.8  | 1004.1 | 1129.5 | 1290.7 | 1505.7 | 1806.6  | 2258.1  | 3010.4  | 4515.1  | 9029.2  |
| 3-mer                  | 13542.3    | 1129.5                  | 1232.1 | 1355.2 | 1505.7 | 1693.8 | 1935.6 | 2258.1 | 2709.5  | 3386.6  | 4515.1  | 6772.2  | 13543.3 |
| 4-mer                  | 18056.4    | 1505.7                  | 1642.5 | 1806.6 | 2007.3 | 2258.1 | 2580.5 | 3010.4 | 3612.3  | 4515.1  | 6019.8  | 9029.2  | 18057.4 |
| 5-mer                  | 22570.5    | 1881.9                  | 2052.9 | 2258.1 | 2508.8 | 2822.3 | 3225.4 | 3762.8 | 4515.1  | 5643.6  | 7524.5  | 11286.3 | 22571.5 |
| 6-mer                  | 27084.6    | 2258.1                  | 2463.2 | 2709.5 | 3010.4 | 3386.6 | 3870.2 | 4515.1 | 5417.9  | 6772.2  | 9029.2  | 13543.3 | 27085.6 |
| 7-mer                  | 31598.7    | 2634.2                  | 2873.6 | 3160.9 | 3512.0 | 3950.8 | 4515.1 | 5267.5 | 6320.7  | 7900.7  | 10533.9 | 15800.4 | 31599.7 |
| 8-mer                  | 36112.8    | 3010.4                  | 3284.0 | 3612.3 | 4013.5 | 4515.1 | 5160.0 | 6019.8 | 7223.6  | 9029.2  | 12038.6 | 18057.4 | 36113.8 |
| 9-mer                  | 40626.9    | 3386.6                  | 3694.4 | 4063.7 | 4515.1 | 5079.4 | 5804.8 | 6772.2 | 8126.4  | 10157.7 | 13543.3 | 20314.5 | 40627.9 |
| 10-mer                 | 45141      | 3762.8                  | 4104.7 | 4515.1 | 5016.7 | 5643.6 | 6449.7 | 7524.5 | 9029.2  | 11286.3 | 15048.0 | 22571.5 | 45142.0 |
| 11-mer                 | 49655.1    | 4138.9                  | 4515.1 | 4966.5 | 5518.2 | 6207.9 | 7094.6 | 8276.9 | 9932.0  | 12414.8 | 16552.7 | 24828.6 | 49656.1 |
| 12-mer                 | 54169.2    | 4515.1                  | 4925.5 | 5417.9 | 6019.8 | 6772.2 | 7739.5 | 9029.2 | 10834.8 | 13543.3 | 18057.4 | 27085.6 | 54170.2 |

b)

| Rapport m/z expérimental | Couples oligomère/état de charge possibles                   | Conclusions/hypothèses  |
|--------------------------|--|---|
| 1505.5                   | 1-mer/3+; 2-mer/6+; 3-mer/9+; 4-mer/12+                      | Attribution: 1-mer/3+ (résolution isotopique)   |
| 2257.7                   | 1-mer/2+; 2-mer/4+; 3-mer/6+; 4-mer/8+; 5-mer/10+; 6-mer/12+ | Attribution: 1-mer/2+ (résolution isotopique)   |
| 2709.2                   | 3-mer/5+; 6-mer/10+  | Attribution ambiguë: mais le couple 3-mer/5+ est proposé car un ion successif du 3-mer est observé à 3386.5 m/z (4+). |
| 3010.2                   | 2-mer/3+; 4-mer/6+; 6-mer/9+; 8-mer/12+                      | Attribution ambiguë: mais le couple 4-mer/6+ est proposé car un ion successif du 4-mer est observé à 3612.3 m/z (5+). |
| 3386.5                   | 3-mer/4+; 6-mer/8+; 9-mer/12+                                | Attribution ambiguë: mais le couple 3-mer/4+ est proposé car un ion successif du 3-mer est observé à 2709.2 m/z (5+). |
| 3612.3                   | 4-mer/5+; 8-mer/10+  | Attribution ambiguë: mais le couple 4-mer/5+ est proposé car un ion successif du 4-mer est observé à 3010.2 m/z (6+). |
| 3763.1                   | 5-mer/6+; 10-mer/12+   | Attribution ambiguë: mais le couple 5-mer/6+ est proposé car aucun oligomère supérieure au 8-mer n'est observé.       |
| 4014.1                   | 8-mer/9+   | Attribution: 8-mer/9+ (unique possibilité)  |
| 4515.3                   | 12 possibilités  | Attribution ambiguë: le couple 8-mer/8+ est proposé car les ions successifs 9+ et 7+ du 8-mer sont observés.          |
| 5160.0                   | 8-mer/7+   | Attribution: 8-mer/7+ (unique possibilité)  |

**Tableau 2.** Les masses et les rapports m/z théoriques des différents états oligomères possibles du peptide Aβ 42 sont présentés en (a). Les rapports m/z expérimentaux et l'attribution proposée sont illustrés en (b). Un code couleur pour chaque ion est proposé afin de faciliter le repérage des différentes possibilités d'attributions.

Afin d'améliorer la transmission et la résolution instrumentale des ions de hauts rapports  $m/z$ , l'échantillon a été analysé sur l'Exactive Plus EMR (expérience réalisée par Stéphane Erb). L'optimisation instrumentale des paramètres CE et CID (une représentation schématique de l'instrumentation est proposée en partie expérimentale) a été réalisée afin de permettre la dissociation du complexe C8E5/A $\beta$ 42 en évitant autant que possible la dissociation de l'octamère (CID : 25 eV, CE : 100 eV, pression : 7 mbar, résolution : 17 500). Ainsi la transmission des états de charge 9+ à 7+ est améliorée (figure 44a) avec une intensité relative supérieure à 80% contre moins de 20 % sur le Synapt G2 (figure 43). Cependant, dans ces conditions instrumentales, la résolution instrumentale (figure 44b) ne permet pas d'attribuer exclusivement l'ion  $m/z$  4515 à l'état de charge 8+ de l'octamère en l'absence de résolution isotopique.

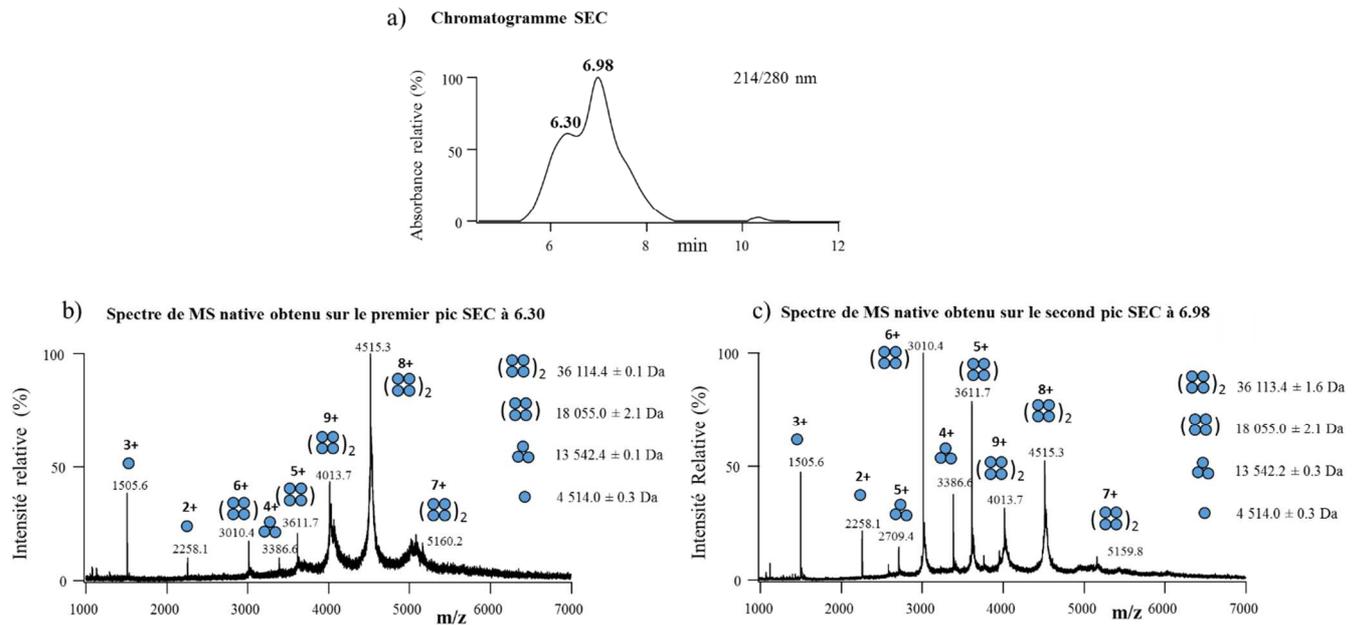


**Figure 44.** Spectre de masse natif (1500-8000  $m/z$ ; a) du peptide A $\beta$  42 à 150  $\mu$ M sur l'Exactive Plus EMR en infusion nanoESI et zoom sur le pic 4515  $m/z$  (b).

Afin de séparer en solution le mélange d'holo-oligomères d'A $\beta$  42 et ainsi décomplexifier les spectres natifs, nous avons évalué l'apport de la SEC couplée en ligne à la MS native pour cette étude. Ce couplage a été mis en place et évalué pour la caractérisation d'anticorps par Anthony Ehkirch durant son stage Master et sa thèse<sup>116-117</sup>. Ces travaux ont notamment permis de montrer l'intérêt de ce couplage avec une meilleure désolvatation des ions induisant ainsi une résolution spectrale accrue dans un tampon acétate d'ammonium en comparaison avec une infusion directe. Ici l'objectif est d'évaluer l'apport de la SEC en présence de détergents.

### 3.2. SEC-MS native.

Le mélange oligomérique d'Aβ 42 solubilisé en tampon HEPES et DPC est directement infusé à 450 μM sur le système SEC-MS native utilisé durant cette thèse (une photographie du couplage est proposée en partie expérimentale). La phase mobile utilisée est un tampon bicarbonate d'ammonium 200 mM pH 8,0 + 14,2 mM C8E5. Les conditions MS pour rompre l'interaction détergent/peptide sont similaires à celles utilisées en nanoESI sur le Synapt G2. Le chromatogramme associé à cette analyse et les spectres de masse correspondant aux pics observés sont représentés en figure 45a. Le premier épaulement observé à 6,3 min en SEC permet l'observation d'un signal protéique centré sur l'ion 4515 m/z (b) laissant supposer la présence de l'octamère ( $36\ 114,4 \pm 0,1$  Da) en comparaison avec le spectre de masse natif observé sur le second épaulement à 7,0 min (c) : l'intensité relative de l'ion 4515 m/z est ici plus faible et le signal protéique est centré sur l'ion 3010 m/z correspondant au peptide sous forme de tétramère chargé 6+ ( $18\ 055,0 \pm 2,1$  Da). Une identification des états oligomériques minoritaires présents dans l'échantillon et les masses associées est proposée selon les hypothèses faites précédemment mais une superposition d'homo-oligomères reste probable.



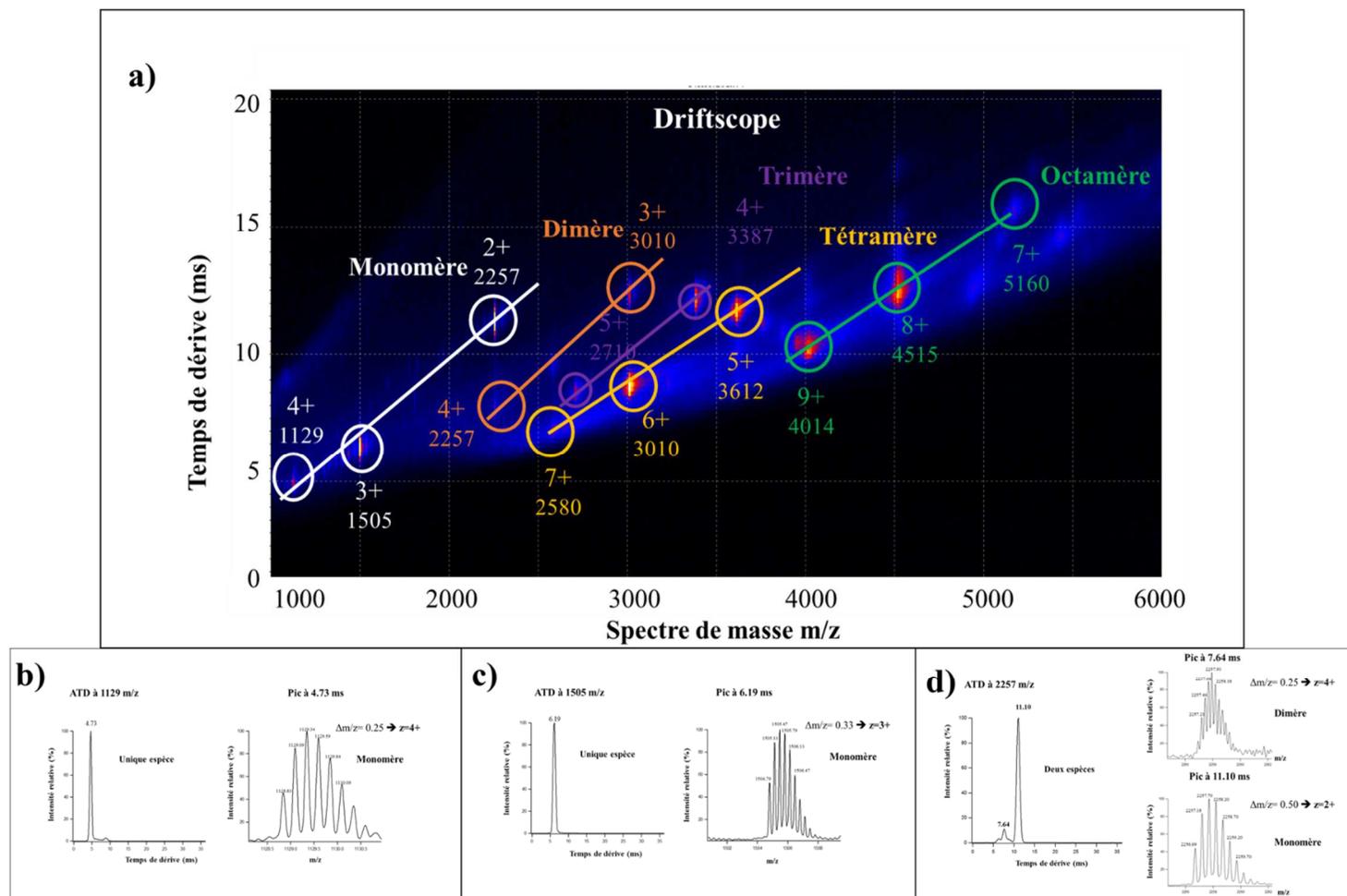
**Figure 45.** Séparation SEC partielle de l'octamère et du tétramère présents dans l'échantillon Aβ 42 (a) et spectres de masse natifs correspondants (b,c). Le système SEC est un système UPLC H-Class (Waters, Manchester, UK) composé d'un détecteur UV 214/280 nm, d'une colonne SEC BEH (4,6 x 150 mm, 1,7 μm, 200 Å) de la marque Waters. La phase mobile utilisée est NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 200 mM pH 8.0 + 14,2 mM C8E5 avec un débit de 0,25 mL/min avant et après l'élution des espèces étudiées et diminué à 0,10 mL/min lors de l'élution de l'octamère et du tétramère pour augmenter le temps MS d'acquisition.

### 3.3. SEC-IM-MS native

Afin de séparer les signaux MS des différents homo-oligomères en présence, nous avons décidé d'ajouter une dimension de séparation supplémentaire à ce couplage : la mobilité ionique. En effet, cette technique permet de séparer des homo-oligomères en phase gazeuse et ce potentiel a déjà été appliqué dans le cadre de l'étude du peptide amyloïde beta avec les travaux du Dr. Bowers<sup>115</sup>.

Les paramètres de mobilité ionique ont été optimisés afin d'améliorer la séparation des différents états oligomériques du peptide A $\beta$  42. Les paramètres retenus sont décrits ci-après. Les ions sont thermalisés dans la cellule hélium (180 mL/min) puis séparés avec un débit constant de 90 mL/min en azote. La vitesse et la hauteur des vagues sont respectivement fixées à 800 m/s et 40 V, la tension de transfert est maintenue à 15 V pour favoriser l'extraction des ions de la cellule IM et les transférer jusqu'à l'analyseur temps de vol.

L'attribution des couples oligomères/ions a été réalisée à l'aide d'une représentation bidimensionnelle du temps de dérive en fonction de la gamme de m/z, appelée *driftscope* (figure 46a) en se focalisant sur le premier pic SEC (6,30 min, figure 45a). L'ATD de chaque ion a été extraite afin de visualiser le nombre d'oligomères présent sous un ion de même rapport m/z. Pour l'ion à m/z 1129 (figure 46b), une seule gaussienne est observée sur l'ATD, l'extraction du spectre de masse de cette gaussienne permet d'observer un ion 4 fois chargé permettant d'identifier ce pic comme l'état de charge 4+ du monomère. De la même manière, l'ion à m/z 1505 (figure 46c), a été identifié comme l'état de charge 3+ du peptide A $\beta$  42 sous forme monomérique. L'ATD de l'ion à 2257 m/z permet d'observer deux espèces : une première minoritaire à 7,64 ms correspondant à l'état de charge 4+ du dimère et la seconde majoritaire à 11,10 ms correspondant à l'état de charge 2+ du monomère. L'attribution de chaque ion m/z à un état d'oligomérisation a été réalisé de cette manière pour l'ensemble des ions jusqu'à l'ion m/z 3387 (la résolution isotopique permettant d'attribuer chaque espèce observée sur les ATDs). La distribution des charges de chaque oligomère suit une diagonale (figure 46a) et les ions de rapport m/z supérieurs à m/z 3387 ont été attribués à l'aide de ces diagonales et en vérifiant la présence d'ions consécutifs, attendus en ESI.



**Figure 46.** Représentation *driftscope* du mélange oligomérique séparé par mobilité ionique (a). Les ions du monomère, dimère, trimère, tétramère et octamère sont respectivement annotés en blanc, orange, violet, jaune et vert. Les rapports m/z et les états de charge de chaque espèce sont annotés avec ce code couleur. Trois exemples permettant l'attribution des états de charge et l'identification de l'état oligomérique sont représentés : l'ATD de l'ion m/z 1129 (b) ; l'ATD de l'ion m/z 1505 (c) et l'ATD de l'ion m/z 2257 (d).

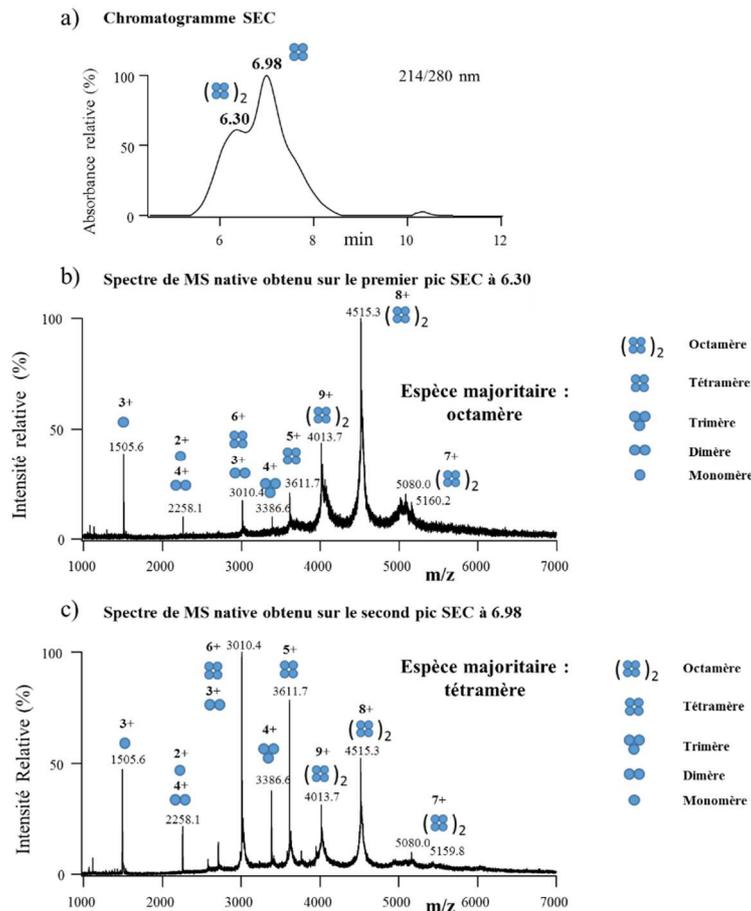
L'état d'oligomérisation des espèces observées a été reporté sur chaque spectre de masse en figure 47. Les pics SEC détectés à 6,30 min et à 6,98 min représentent donc respectivement une séparation partielle de l'octamère et du tétramère du peptide A $\beta$  42 qui sont les espèces principales observées sur les spectres de masse en conditions natives. La séparation étant sans retour à la ligne de base, l'octamère est également visible sur le second pic et inversement le tétramère est visible sur le premier pic SEC. De plus, des états oligomériques plus faibles sont observés en moindre proportion : monomère, dimère et trimère. Plusieurs hypothèses peuvent alors être formulées :

- les fortes tensions appliquées dans la cellule trap et en source pour la dissociation et la transmission respectives du complexe détergent/peptide A $\beta$  42 engendrent une dissociation partielle de l'octamère en tétramère et du tétramère en trimère, dimère et monomère.

- il s'agit d'un équilibre en solution entre les oligomères et les conditions SEC utilisées ne permettent pas leur séparation.

Afin de répondre à ces hypothèses, deux stratégies ont été mises en œuvre :

- L'influence de différentes conditions énergétiques a été évaluée sur la proportion d'octamère dans le premier pic SEC et sur la proportion de tétramère dans le second pic SEC (§3.4.)
- La concentration en peptide a été diminuée afin de défavoriser la formation de l'octamère en solution (§3.5.)

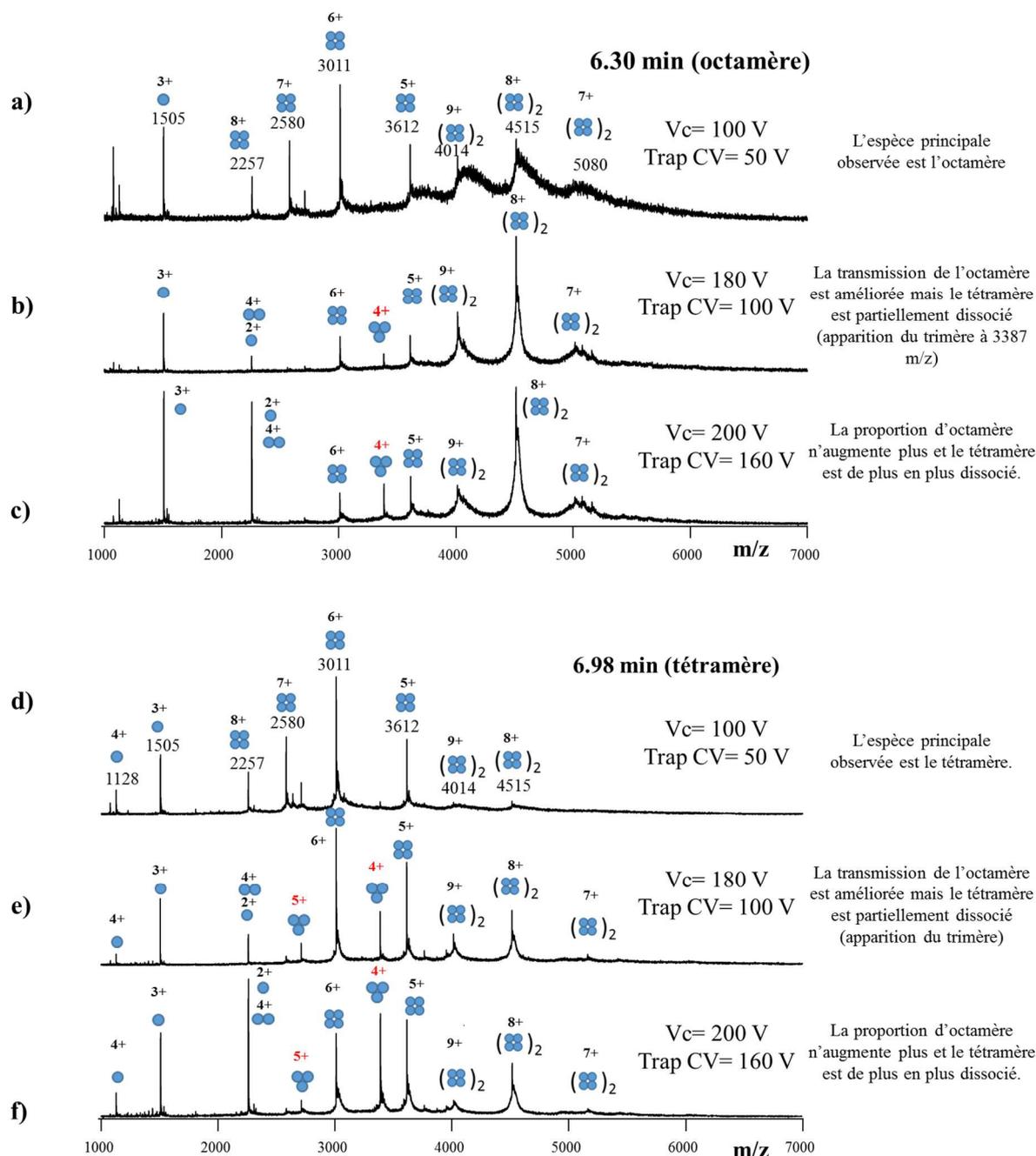


**Figure 47.** Séparation SEC de l’octamère et du tétramère présents dans l’échantillon Aβ 42 (a) et des spectres de masse natifs correspondants (b,c).

### 3.4. Transmission de l’octamère et dissociation du tétramère en phase gazeuse.

Afin d’élucider la présence d’oligomères de taille inférieure au tétramère sur les spectres de masse, différentes conditions énergétiques ont été testées. Sur le premier pic (6,30 min), contenant principalement l’octamère, en conditions « douces » (spectre a, figure 48), la transmission de l’octamère n’est pas optimale : les pics sont larges et peu intenses. L’augmentation des tensions de trap CV et de cône Vc permet de favoriser sa transmission et l’élimination d’adduits et de molécules de C8E5 encore fixées mais génère la dissociation d’un tétramère en trimère (annoté en rouge) et monomère (spectres b et c). Les mêmes observations ont été réalisées sur le second pic (6,98 min) contenant principalement le tétramère. Il faut noter qu’à aucun moment, nous n’avons pu observer des signaux protéiques attribuables à la présence d’hexamère ou heptamère laissant suggérer la dissociation progressive de monomères directement à partir de l’octamère. L’application de conditions énergétiques fortes sur le tétramère et l’octamère a permis de sonder la force des interactions non-covalentes régissant la formation de l’octamère du peptide Aβ 42 et de montrer que la présence d’états

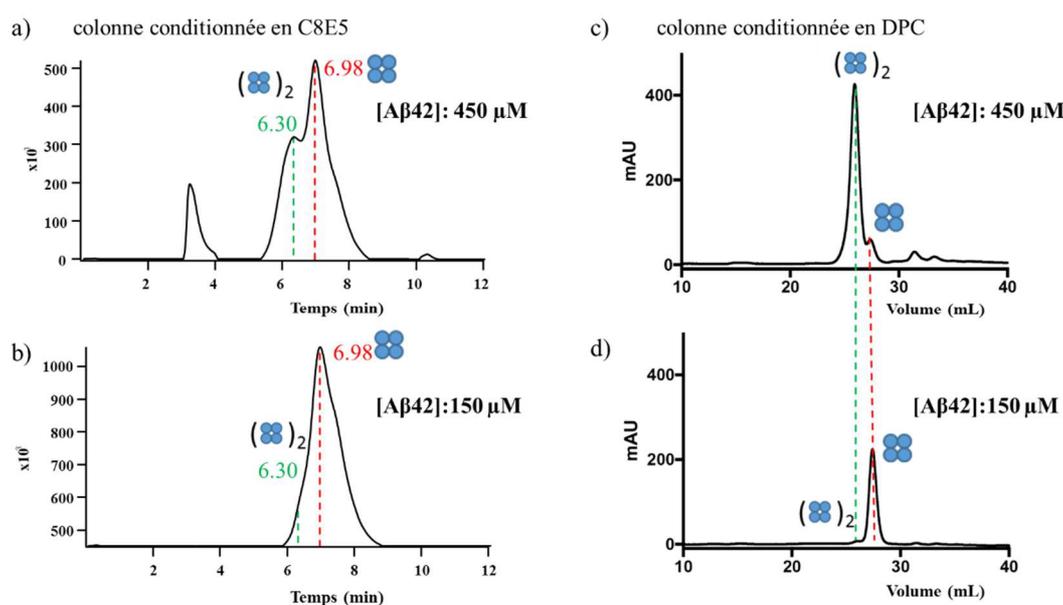
oligomériques plus faibles comme le trimère, le dimère et le monomère est induite par les hautes tensions appliquées. Face à ces résultats, la compréhension du mécanisme de dissociation pourrait être envisagée en réalisant des expériences de Top down afin de déterminer si la présence de ces plus faibles états d'oligomérisation provient du tétramère ou directement de l'octamère.



**Figure 48.** Influence des conditions énergétiques sur l'état d'oligomérisation détecté en MS sur les espèces présentes dans le pic SEC à 6,30 min : l'octamère (a-c) et dans le pic SEC à 6,98 min : le tétramère (d-f).

### 3.5. Influence de la concentration en peptide A $\beta$ 42 sur l'équilibre octamère-tétramère.

Afin de sonder l'équilibre octamère-tétramère en phase liquide, nous avons caractérisé une solution A $\beta$  42 avec une concentration divisée par 3 (150  $\mu$ M) par rapport à la concentration initialement étudiée (450  $\mu$ M). Cette solution a été injectée sur le système SEC-MS native : le chromatogramme obtenu est présenté figure 49b. La proportion relative d'octamère est alors fortement diminuée montrant ainsi la présence d'un équilibre octamère-tétramère en solution. De plus, cette déstabilisation de l'octamère à une plus faible concentration en peptide est également observée lors d'une analyse SEC avec deux colonnes positionnées en tandem conditionnées avec un tampon HEPES, NaCl et DPC (sans couplage MS, expérience réalisée par Eduard Puig, figure 49d). La comparaison des profils SEC permet de conclure que le tampon bicarbonate d'ammonium/C8E5 ne permet pas de stabiliser la forme octamérique de manière aussi marquée que lorsque celle-ci est solubilisée en tampon HEPES, NaCl et DPC.



**Figure 49.** Séparation SEC de l'octamère et du tétramère présents dans l'échantillon A $\beta$  42 sur le système SEC-MS native avec un tampon ammonium bicarbonate/C8E5 à pH 8,0 (a-b) et sur un système couplant en tandem deux colonnes Superdex 200 (15 x 300 mm, 13  $\mu$ m) conditionnées avec 10 mM Tris, 100 mM NaCl et 3 mM DPC à pH 8,0 (c-d).

## 4. Conclusions.

L'objectif initial de cette étude était de caractériser l'état d'oligomérisation du peptide A $\beta$  42 en milieu détergent. Une étude RMN réalisée en parallèle a permis de résoudre la structure de la forme tétramérique du peptide A $\beta$  42 mais n'a pas permis de résoudre la structure des états oligomériques supérieurs observés sur gel natif. Dans ce cadre et face à l'échec de la caractérisation par HR-MS native, le couplage SEC-IM-MS native s'est avéré particulièrement utile.

- Le couplage SEC a permis de séparer partiellement (sans retour à la ligne de base) deux états oligomériques distincts : l'octamère et le tétramère, permettant ainsi de décomplexifier les spectres de masse natifs et de limiter la compétition à l'ionisation entre les oligomères.
- La mobilité ionique s'est révélée particulièrement utile et a permis une attribution non ambiguë des états oligomériques observés pour des ions de même rapport m/z.
- Les conditions MS ont été optimisées afin de dissocier le complexe C8E5/A $\beta$  42 en limitant la dissociation de l'octamère et du tétramère. De manière intéressante, dans ces conditions, aucune espèce intermédiaire entre le tétramère et l'octamère n'a été détectée laissant supposer un assemblage successif de deux tétramères distincts pour la formation de l'octamère. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de XL-MS (en collaboration avec le Dr. Stéphane Chaignepain, CMBN, Bordeaux).

Afin d'approfondir l'étude du mécanisme d'assemblage du peptide A $\beta$  42 en canal ionique octamérique, plusieurs approches impliquant la MS pourraient être utilisées :

- réaliser des expériences de Top down sur le tétramère et l'octamère après séparation SEC.
- mélanger un tétramère marqué  $^{15}\text{N}$  et un tétramère non marqué et suivre leur cinétique d'assemblage en octamère en utilisant le couplage SEC-IM-MS.

## 5. Valorisation.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet des communications suivantes :

### **Communication orale:**

Botzanowski, T., Puig, E., Carulla, N., Cianferani, S. (2018) "Unravelling  $\beta$ -barrel pore oligomer formation by online SEC- native ion mobility-mass spectrometry" Journée des Doctorants, École Doctorale des Sciences Chimiques, 23 novembre, Strasbourg, France.

### **Communication par affiche:**

Ciudad, S., Puig, E., Mayzel, M. ; Botzanowski, T., Serra-Batiste, M. Cianferani, S., Orekhov, V., Carulla, N. (2018) "Toward the three-dimensional structure of pore-forming amyloid- $\beta$  oligomers by solution NMR" European Magnetic Resonance Meeting, 1-5 juillet, Nantes, France.

## ***CONCLUSION DE CETTE PARTIE***

Les travaux réalisés dans cette partie se sont articulés autour du développement de méthodes de MS structurale (principalement par MS native et HDX-MS) pour la caractérisation en milieu détergent de protéines membranaires impliquées dans des pathologies. De manière générale, l'importance de la préparation d'échantillon et l'influence des conditions MS ont largement été illustrées sur trois systèmes de difficultés variables : une protéine monomérique composée d'un domaine transmembranaire (ABHD), un récepteur couplé aux protéines G monomérique fortement enchâssé dans la membrane à travers sept domaines (AA2A) et un peptide hydrophobe octamérique (A $\beta$ 42).

- La première étude a permis la mise au point d'un protocole permettant le criblage par MS native d'inhibiteurs covalents sur ABHD. Parmi les 6 inhibiteurs criblés, 4 ont réagi avec ABHD dans les conditions d'incubation testées. L'effet sur la conformation d'ABHD a également pu être étudié par HDX-MS en présence d'un ligand mettant en évidence la présence de changements conformationnels notamment au niveau de la triade catalytique impliquée dans la réaction. Ces résultats montrent la possibilité de cribler des ligands covalents sur des PMs par ces approches pour la première fois au laboratoire.
- La seconde étude visait à évaluer la possibilité de cribler des ligands non-covalents sur un RCPG en milieu détergent par ces approches. L'hétérogénéité de l'échantillon et la difficulté à le digérer ont rendu la caractérisation par MS native et HDX-MS difficile. Ces efforts seront poursuivis ultérieurement car plusieurs exemples récents ont montré la possibilité de cribler de ligands non-covalents sur des RCPGs, notamment en présence de phospholipides<sup>32, 118</sup>.
- La dernière étude avait pour objectif de déterminer l'état d'oligomérisation d'un peptide hydrophobe en milieu détergent. Le couplage SEC a permis de séparer deux états oligomériques présents en solution : l'octamère et le tétramère. L'utilisation de la mobilité ionique comme dimension de séparation supplémentaire a permis une identification non ambiguë des oligomères présents lorsque la HR-MS native ne l'a pu.

Ces travaux illustrent seulement une partie des progrès réalisés dans le domaine de la spectrométrie de masse structurale pour la caractérisation des protéines membranaires. Ces dernières années de nombreuses avancées instrumentales et méthodologiques ont été réalisées par des groupes

académiques spécialisés pour permettre la caractérisation de ces protéines de grand intérêt thérapeutique par la combinaison d'approches de MS structurale<sup>37</sup>. En effet, La tendance est actuellement de développer des méthodes de MS structurales pour caractériser directement les protéines membranaires dans leur environnement d'origine sans utiliser les détergents<sup>119</sup>. L'utilisation du LILBID, source alternative à l'ESI<sup>79, 120</sup>, a été avec succès décrite comme une approche permettant la caractérisation de PMs directement à partir de nanodisques<sup>77-78</sup>. Dans le cas particulier des RCPGs, l'utilisation de nanobody pour stabiliser les protéines membranaires et permettre leur caractérisation en MS native est actuellement développée et peut être une stratégie à envisager dans le futur pour la caractérisation du récepteur AA2A<sup>42</sup>.

Un des axes de recherche consiste à minimiser, voire supprimer l'étape critique de préparation de la PM pour l'analyse par MS native. De récentes études ont montré la possibilité d'analyser par MS native des complexes protéiques directement à partir de tampons non volatils permettant leur analyse, sans étape de changement de tampon, de leur milieu d'origine : intracellulaire<sup>121</sup> ou extracellulaire<sup>122</sup> à l'aide de micro aiguilles. Ce système a été décrit comme adapté à la caractérisation de protéines membranaires solubilisés dans des détergents non ioniques et ioniques<sup>123</sup>. Un travail particulièrement innovant réalisé par l'équipe du Dr. Carol Robinson a également montré la possibilité de caractériser des PMs directement extraites et analysées à partir des cellules sans étape de purification<sup>39</sup>.

Concernant la caractérisation par HDX-MS, l'augmentation de la résolution spatiale des informations obtenues de l'échelle peptidique à l'échelle de l'acide aminé grâce à son couplage à des techniques de fragmentation comme l'ETD ou l'ECD<sup>124</sup> est en cours de développement<sup>125</sup> et devrait permettre d'accroître son utilisation dans le futur.

De plus, l'HDX-MS semble être une technique de choix pour la caractérisation de complexes impliquant des PMs<sup>126</sup> mais aussi des protéines non ancrées dans la membrane mais qui interagissent directement avec elle<sup>127-128</sup>. En effet, cette technique permet la caractérisation de PMs en milieu lipidique/à l'intérieur de liposomes pour mimer au mieux l'effet de la membrane sur la structure de la PM *in vivo*. Cela semble possible d'après les études déjà publiées et nous sommes actuellement en train de réaliser une étude sur l'activation d'une GTPase par de l'AMPcyclique solubilisée en liposomes en collaboration avec l'équipe du Dr. Jacqueline Cherfils.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. More than 50% of drugs target membrane proteins. <https://www.irbbarcelona.org/en/news/more-than-50-of-drugs-target-membrane-proteins> (accessed 18/03/2019).
2. Carpenter, E. P.; Beis, K.; Cameron, A. D.; Iwata, S., Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* **2008**, *18* (5), 581-6.
3. Yin, H.; Flynn, A. D., Drugging Membrane Protein Interactions. *Annu Rev Biomed Eng* **2016**, *18*, 51-76.
4. Cho, W.; Stahelin, R. V., Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2005**, *34*, 119-51.
5. Klein, P.; Kanehisa, M.; DeLisi, C., The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim Biophys Acta* **1985**, *815* (3), 468-76.
6. Peurois, F. Activation des petites GTPases à la périphérie des membranes. 2018.
7. Kobilka, B. K., G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768* (4), 794-807.
8. Thal, D. M.; Glukhova, A.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A., Structural insights into G-protein-coupled receptor allostery. *Nature* **2018**, *559* (7712), 45-53.
9. Tang, X. L.; Wang, Y.; Li, D. L.; Luo, J.; Liu, M. Y., Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin* **2012**, *33* (3), 363-71.
10. Shen, H. H.; Lithgow, T.; Martin, L. L., Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (1), 1589-1607.
11. Coleman, R.; Holdsworth, G., Effects of detergents on erythrocyte membranes: different patterns of solubilization of the membrane proteins by dihydroxy and trihydroxy bile salts. *Biochem Soc Trans* **1975**, *3* (5), 747-8.
12. le Maire, M.; Champeil, P.; Moller, J. V., Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1508* (1-2), 86-111.
13. Garavito, R. M.; Ferguson-Miller, S., Detergents as tools in membrane biochemistry. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (35), 32403-32406.
14. Chattopadhyay, A.; Harikumar, K. G., Dependence of critical micelle concentration of a zwitterionic detergent on ionic strength: implications in receptor solubilization. *FEBS Lett* **1996**, *391* (1-2), 199-202.
15. Hardy, D.; Mandon, E. D.; Rothnie, A. J.; Jawhari, A., The yin and yang of solubilization and stabilization for wild-type and full-length membrane protein. *Methods* **2018**, *147*, 118-125.
16. Hjerten, S.; Sparrman, M.; Liao, J., Purification of membrane proteins in SDS and subsequent renaturation. *Biochim Biophys Acta* **1988**, *939* (3), 476-84.
17. Speers, A. E.; Wu, C. C., Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chem Rev* **2007**, *107* (8), 3687-714.
18. Zhang, N.; Li, L., Effects of common surfactants on protein digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of the digested peptides using two-layer sample preparation. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, *18* (8), 889-96.
19. Loo, R. R.; Dales, N.; Andrews, P. C., Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry. *Protein Sci* **1994**, *3* (11), 1975-83.
20. Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W., Mechanism of signal suppression by anionic surfactants in capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **1996**, *68* (19), 3493-7.
21. Galka, J. J.; Baturin, S. J.; Manley, D. M.; Kehler, A. J.; O'Neil, J. D., Stability of the glycerol facilitator in detergent solutions. *Biochemistry* **2008**, *47* (11), 3513-24.
22. Stetsenko, A.; Guskov, A., An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals* **2017**, *7* (7).
23. Newstead, S.; Ferrandon, S.; Iwata, S., Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization. *Protein Sci* **2008**, *17* (3), 466-72.
24. Barrera, N. P.; Di Bartolo, N.; Booth, P. J.; Robinson, C. V., Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum. *Science* **2008**, *321* (5886), 243-246.

25. Sobott, F.; Hernandez, H.; McCammon, M. G.; Tito, M. A.; Robinson, C. V., A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Anal Chem* **2002**, *74* (6), 1402-7.
26. Laganowsky, A.; Reading, E.; Hopper, J. T. S.; Robinson, C. V., Mass spectrometry of intact membrane protein complexes. *Nature Protocols* **2013**, *8* (4), 639-651.
27. Chaptal, V.; Delolme, F.; Kilburg, A.; Magnard, S.; Montigny, C.; Picard, M.; Prier, C.; Monticelli, L.; Bornert, O.; Agez, M.; Ravaud, S.; Orelle, C.; Wagner, R.; Jawhari, A.; Broutin, I.; Pebay-Peyroula, E.; Jault, J. M.; Kaback, H. R.; le Maire, M.; Falson, P., Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins. *Sci Rep* **2017**, *7*, 41751.
28. van Dyck, J. F.; Konijnenberg, A.; Sobott, F., Native Mass Spectrometry for the Characterization of Structure and Interactions of Membrane Proteins. *Methods Mol Biol* **2017**, *1635*, 205-232.
29. Housden, N. G.; Hopper, J. T. S.; Lukyanova, N.; Rodriguez-Larrea, D.; Wojdyla, J. A.; Klein, A.; Kaminska, R.; Bayley, H.; Saibil, H. R.; Robinson, C. V.; Kleanthous, C., Intrinsically Disordered Protein Threads Through the Bacterial Outer-Membrane Porin OmpF. *Science* **2013**, *340* (6140), 1570-1574.
30. Marcoux, J.; Wang, S. C.; Politis, A.; Reading, E.; Ma, J.; Biggin, P. C.; Zhou, M.; Tao, H.; Zhang, Q.; Chang, G.; Morgner, N.; Robinson, C. V., Mass spectrometry reveals synergistic effects of nucleotides, lipids, and drugs binding to a multidrug resistance efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (24), 9704-9.
31. Marcoux, J.; Politis, A.; Rinehart, D.; Marshall, D. P.; Wallace, M. I.; Tamm, L. K.; Robinson, C. V., Mass Spectrometry Defines the C-Terminal Dimerization Domain and Enables Modeling of the Structure of Full-Length OmpA. *Structure* **2014**, *22* (5), 781-790.
32. Laganowsky, A.; Reading, E.; Allison, T. M.; Ulmschneider, M. B.; Degiacomi, M. T.; Baldwin, A. J.; Robinson, C. V., Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature* **2014**, *510* (7503), 172-175.
33. Mehmood, S.; Marcoux, J.; Hopper, J. T.; Allison, T. M.; Liko, I.; Borysik, A. J.; Robinson, C. V., Charge reduction stabilizes intact membrane protein complexes for mass spectrometry. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (49), 17010-2.
34. Reading, E.; Walton, T. A.; Liko, I.; Marty, M. T.; Laganowsky, A.; Rees, D. C.; Robinson, C. V., The Effect of Detergent, Temperature, and Lipid on the Oligomeric State of MscL Constructs: Insights from Mass Spectrometry. *Chem Biol* **2015**, *22* (5), 593-603.
35. Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T., Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Anal Chem* **2010**, *82* (22), 9557-65.
36. Allison, T. M.; Landreh, M.; Benesch, J. L. P.; Robinson, C. V., Low Charge and Reduced Mobility of Membrane Protein Complexes Has Implications for Calibration of Collision Cross Section Measurements. *Anal Chem* **2016**, *88* (11), 5879-5884.
37. Calabrese, A. N.; Radford, S. E., Mass spectrometry-enabled structural biology of membrane proteins. *Methods* **2018**, *147*, 187-205.
38. Konijnenberg, A.; Yilmaz, D.; Ingolfsson, H. I.; Dimitrova, A.; Marrink, S. J.; Li, Z.; Venien-Bryan, C.; Sobott, F.; Kocer, A., Global structural changes of an ion channel during its gating are followed by ion mobility mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (48), 17170-5.
39. Chorev, D. S.; Baker, L. A.; Wu, D.; Beilsten-Edmands, V.; Rouse, S. L.; Zeev-Ben-Mordehai, T.; Jiko, C.; Samsudin, F.; Gerle, C.; Khalid, S.; Stewart, A. G.; Matthews, S. J.; Grunewald, K.; Robinson, C. V., Protein assemblies ejected directly from native membranes yield complexes for mass spectrometry. *Science* **2018**, *362* (6416), 829-834.
40. Rose, R. J.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Heck, A. J., High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies. *Nat Methods* **2012**, *9* (11), 1084-6.
41. Yen, H. Y.; Hopper, J. T. S.; Liko, I.; Allison, T. M.; Zhu, Y.; Wang, D.; Stegmann, M.; Mohammed, S.; Wu, B.; Robinson, C. V., Ligand binding to a G protein-coupled receptor captured in a mass spectrometer. *Sci Adv* **2017**, *3* (6), e1701016.
42. Yen, H. Y.; Hoi, K. K.; Liko, I.; Hedger, G.; Horrell, M. R.; Song, W.; Wu, D.; Heine, P.; Warne, T.; Lee, Y.; Carpenter, B.; Pluckthun, A.; Tate, C. G.; Sansom, M. S. P.; Robinson, C. V., PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> stabilizes active states of GPCRs and enhances selectivity of G-protein coupling. *Nature* **2018**, *559* (7714), 423-427.
43. Gavriilidou AFM, H. H. M. D. V. Z., Veprintsev DB, Zenobi R, Insights into the Basal Activity and Activation Mechanism of the  $\beta$ 1 Adrenergic Receptor Using Native Mass Spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* **2019**, *30* (3), 529-537.

44. Eisinger, M. L.; Dorrbaum, A. R.; Michel, H.; Padan, E.; Langer, J. D., Ligand-induced conformational dynamics of the Escherichia coli Na(+)/H(+) antiporter NhaA revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (44), 11691-11696.
45. Pirrone, G. F.; Jacob, R. E.; Engen, J. R., Applications of hydrogen/deuterium exchange MS from 2012 to 2014. *Anal Chem* **2015**, *87* (1), 99-118.
46. Pan, Y.; Konermann, L., Membrane protein structural insights from chemical labeling and mass spectrometry. *Analyst* **2010**, *135* (6), 1191-200.
47. Forest, E.; Man, P., Conformational Dynamics and Interactions of Membrane Proteins by Hydrogen/Deuterium Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* **2016**, *1432*, 269-79.
48. Mehmood, S.; Domene, C.; Forest, E.; Jault, J. M., Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (27), 10832-6.
49. Kadek, A.; Mrazek, H.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P., Aspartic protease nepenthesin-1 as a tool for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* **2014**, *86* (9), 4287-94.
50. Zhang, H. M.; Kazazic, S.; Schaub, T. M.; Tipton, J. D.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G., Enhanced digestion efficiency, peptide ionization efficiency, and sequence resolution for protein hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* **2008**, *80* (23), 9034-41.
51. West, G. M.; Chien, E. Y.; Katritch, V.; Gatchalian, J.; Chalmers, M. J.; Stevens, R. C.; Griffin, P. R., Ligand-dependent perturbation of the conformational ensemble for the GPCR beta2 adrenergic receptor revealed by HDX. *Structure* **2011**, *19* (10), 1424-32.
52. Marty, M. T.; Hoi, K. K.; Robinson, C. V., Interfacing Membrane Mimetics with Mass Spectrometry. *Acc Chem Res* **2016**, *49* (11), 2459-2467.
53. Lee, S. C.; Knowles, T. J.; Postis, V. L.; Jamshad, M.; Parslow, R. A.; Lin, Y. P.; Goldman, A.; Sridhar, P.; Overduin, M.; Muench, S. P.; Dafforn, T. R., A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat Protoc* **2016**, *11* (7), 1149-62.
54. Fisher, L. E.; Engelman, D. M.; Sturgis, J. N., Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycophorin A transmembrane domain. *J Mol Biol* **1999**, *293* (3), 639-51.
55. Fisher, L. E.; Engelman, D. M.; Sturgis, J. N., Effect of detergents on the association of the glycophorin a transmembrane helix. *Biophys J* **2003**, *85* (5), 3097-105.
56. Gulbis, J. M.; Doyle, D. A., Potassium channel structures: do they conform? *Curr Opin Struc Biol* **2004**, *14* (4), 440-446.
57. Mazor, Y.; Borovikova, A.; Caspy, I.; Nelson, N., Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nat Plants* **2017**, *3*, 17014.
58. Bohnenberger, E.; Sandermann, H., Jr., Lipid dependence of diacylglycerol kinase from Escherichia coli. *Eur J Biochem* **1983**, *132* (3), 645-50.
59. Hopper, J. T.; Yu, Y. T.; Li, D.; Raymond, A.; Bostock, M.; Liko, I.; Mikhailov, V.; Laganowsky, A.; Benesch, J. L.; Caffrey, M.; Nietlispach, D.; Robinson, C. V., Detergent-free mass spectrometry of membrane protein complexes. *Nat Methods* **2013**, *10* (12), 1206-8.
60. Popot, J. L.; Althoff, T.; Bagnard, D.; Baneres, J. L.; Bazzacco, P.; Billon-Denis, E.; Catoire, L. J.; Champeil, P.; Charvolin, D.; Cocco, M. J.; Cremel, G.; Dahmane, T.; de la Maza, L. M.; Ebel, C.; Gabel, F.; Giusti, F.; Gohon, Y.; Goormaghtigh, E.; Guittet, E.; Kleinschmidt, J. H.; Kuhlbrandt, W.; Le Bon, C.; Martinez, K. L.; Picard, M.; Pucci, B.; Sachs, J. N.; Tribet, C.; van Heijenoort, C.; Wien, F.; Zito, F.; Zoonens, M., Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys* **2011**, *40*, 379-408.
61. Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J. L., Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (26), 15047-50.
62. Calabrese, A. N.; Watkinson, T. G.; Henderson, P. J.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E., Amphipols outperform dodecylmaltoside micelles in stabilizing membrane protein structure in the gas phase. *Anal Chem* **2015**, *87* (2), 1118-26.
63. Watkinson, T. G.; Calabrese, A. N.; Giusti, F.; Zoonens, M.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E., Systematic analysis of the use of amphipathic polymers for studies of outer membrane proteins using mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* **2015**, *391*, 54-61.
64. Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K., Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* **2013**, *8* (1), 102.

65. Anderson, K. W.; Gallagher, E. S.; Hudgens, J. W., Automated Removal of Phospholipids from Membrane Proteins for H/D Exchange Mass Spectrometry Workflows. *Anal Chem* **2018**, *90* (11), 6409-6412.
66. Bayburt, T. H.; Sligar, S. G., Membrane protein assembly into Nanodiscs. *Febs Lett* **2010**, *584* (9), 1721-1727.
67. Hagn, F.; Nasr, M. L.; Wagner, G., Assembly of phospholipid nanodiscs of controlled size for structural studies of membrane proteins by NMR. *Nat Protoc* **2018**, *13* (1), 79-98.
68. Marty, M. T.; Zhang, H.; Cui, W. D.; Blankenship, R. E.; Gross, M. L.; Sligar, S. G., Native Mass Spectrometry Characterization of Intact Nanodisc Lipoprotein Complexes. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (21), 8957-8960.
69. Marty, M. T.; Baldwin, A. J.; Marklund, E. G.; Hochberg, G. K.; Benesch, J. L.; Robinson, C. V., Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Anal Chem* **2015**, *87* (8), 4370-6.
70. Schuler, M. A.; Denisov, I. G.; Sligar, S. G., Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions. *Methods Mol Biol* **2013**, *974*, 415-33.
71. Denisov, I. G.; Grinkova, Y. V.; Lazarides, A. A.; Sligar, S. G., Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (11), 3477-87.
72. Denisov, I. G.; Sligar, S. G., Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* **2016**, *23* (6), 481-6.
73. Hagn, F.; Etzkorn, M.; Raschle, T.; Wagner, G., Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (5), 1919-25.
74. Morgado, L.; Zeth, K.; Burmann, B. M.; Maier, T.; Hiller, S., Characterization of the insertase BamA in three different membrane mimetics by solution NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* **2015**, *61* (3-4), 333-45.
75. Efremov, R. G.; Leitner, A.; Aebersold, R.; Raunser, S., Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* **2015**, *517* (7532), 39-43.
76. Marty, M. T.; Hoi, K. K.; Gault, J.; Robinson, C. V., Probing the Lipid Annular Belt by Gas-Phase Dissociation of Membrane Proteins in Nanodiscs. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55* (2), 550-4.
77. Hellwig, N.; Peetz, O.; Ahdash, Z.; Tascon, I.; Booth, P. J.; Mikusevic, V.; Diskowski, M.; Politis, A.; Hellmich, Y.; Hanelt, I.; Reading, E.; Morgner, N., Native mass spectrometry goes more native: investigation of membrane protein complexes directly from SMALPs. *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54* (97), 13702-13705.
78. Henrich, E.; Peetz, O.; Hein, C.; Laguerre, A.; Hoffmann, B.; Hoffmann, J.; Dotsch, V.; Bernhard, F.; Morgner, N., Analyzing native membrane protein assembly in nanodiscs by combined non-covalent mass spectrometry and synthetic biology. *Elife* **2017**, *6*.
79. Morgner, N.; Kleinschroth, T.; Barth, H. D.; Ludwig, B.; Brutschy, B., A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18* (8), 1429-38.
80. Ambrose, S.; Housden, N. G.; Gupta, K.; Fan, J.; White, P.; Yen, H. Y.; Marcoux, J.; Kleanthous, C.; Hopper, J. T. S.; Robinson, C. V., Native Desorption Electrospray Ionization Liberates Soluble and Membrane Protein Complexes from Surfaces. *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, *56* (46), 14463-14468.
81. Lord, C. C.; Thomas, G.; Brown, J. M., Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Bba-Mol Cell Biol L* **2013**, *1831* (4), 792-802.
82. Rauwerdink, A.; Kazlauskas, R. J., How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of alpha/beta-Hydrolase Fold Enzymes. *Acs Catal* **2015**, *5* (10), 6153-6176.
83. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; et al., The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **1992**, *5* (3), 197-211.
84. Khan, F. I.; Lan, D.; Durrani, R.; Huan, W.; Zhao, Z.; Wang, Y., The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front Bioeng Biotechnol* **2017**, *5*, 16.
85. Eckart, M. R.; Bussineau, C. M., Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol* **1996**, *7* (5), 525-30.
86. Atmanene, C. Nouvelles perspectives pour l'analyse et la caractérisation structurale de complexes biologiques par spectrométrie de masse supramoléculaire. 2009.
87. Tjernberg, A.; Markova, N.; Griffiths, W. J.; Hallen, D., DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen* **2006**, *11* (2), 131-137.

88. Hourdel, V.; Volant, S.; O'Brien, D. P.; Chenal, A.; Chamot-Rooke, J.; Dillies, M. A.; Brier, S., MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics* **2016**, *32* (22), 3413-3419.
89. Karageorgos, I.; Wales, T. E.; Janero, D. R.; Zvonok, N.; Vemuri, V. K.; Engen, J. R.; Makriyannis, A., Active-site inhibitors modulate the dynamic properties of human monoacylglycerol lipase: a hydrogen exchange mass spectrometry study. *Biochemistry* **2013**, *52* (29), 5016-26.
90. Attwood, T. K.; Findlay, J. B., Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* **1994**, *7* (2), 195-203.
91. Kalda, A.; Yu, L.; Oztas, E.; Chen, J. F., Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **2006**, *248* (1-2), 9-15.
92. Calon, F.; Dridi, M.; Hornykiewicz, O.; Bedard, P. J.; Rajput, A. H.; Di Paolo, T., Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* **2004**, *127* (Pt 5), 1075-84.
93. Canas, P. M.; Porciuncula, L. O.; Cunha, G. M.; Silva, C. G.; Machado, N. J.; Oliveira, J. M.; Oliveira, C. R.; Cunha, R. A., Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* **2009**, *29* (47), 14741-51.
94. Chen, J. F.; Eltzhig, H. K.; Fredholm, B. B., Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12* (4), 265-286.
95. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C., The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, *322* (5905), 1211-7.
96. Chun, E.; Thompson, A. A.; Liu, W.; Roth, C. B.; Griffith, M. T.; Katritch, V.; Kunken, J.; Xu, F.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Stevens, R. C., Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure* **2012**, *20* (6), 967-76.
97. Uustare, A.; Vonk, A.; Terasmaa, A.; Fuxe, K.; Rincken, A., Kinetic and functional properties of [3H]ZM241385, a high affinity antagonist for adenosine A2A receptors. *Life Sci* **2005**, *76* (13), 1513-26.
98. Heloïre, V. M. Conception, synthèse et évaluation de nouveaux ligands antagonistes de récepteurs A2a. 2016.
99. Dore, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F.; Tate, C. G.; Weir, M.; Marshall, F. H., Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **2011**, *19* (9), 1283-93.
100. Magnani, F.; Shibata, Y.; Serrano-Vega, M. J.; Tate, C. G., Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (31), 10744-9.
101. Alfonso-Mendez, M. A.; Alcantara-Hernandez, R.; Garcia-Sainz, J. A., Novel Structural Approaches to Study GPCR Regulation. *Int J Mol Sci* **2016**, *18* (1).
102. Zhang, X.; Chien, E. Y. T.; Chalmers, M. J.; Pascal, B. D.; Gatchalian, J.; Stevens, R. C.; Griffin, P. R., Dynamics of the beta(2)-Adrenergic G-Protein Coupled Receptor Revealed by Hydrogen-Deuterium Exchange. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (3), 1100-1108.
103. Wang, J.; Gu, B. J.; Masters, C. L.; Wang, Y. J., A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol* **2017**, *13* (10), 612-623.
104. Berk, C.; Paul, G.; Sabbagh, M., Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress. *Expert Opin Investig Drugs* **2014**, *23* (6), 837-46.
105. Crews, L.; Masliah, E., Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **2010**, *19* (R1), R12-20.
106. Vieira, M. N.; Forny-Germano, L.; Saraiva, L. M.; Sebollela, A.; Martinez, A. M.; Houzel, J. C.; De Felice, F. G.; Ferreira, S. T., Soluble oligomers from a non-disease related protein mimic Abeta-induced tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *J Neurochem* **2007**, *103* (2), 736-48.
107. Roher, A. E.; Esh, C. L.; Kokjohn, T. A.; Castano, E. M.; Van Vickle, G. D.; Kalback, W. M.; Patton, R. L.; Luehrs, D. C.; Daus, I. D.; Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Soares, H.; Quinn, J. F.; Kaye, J.; Connor, D. J.; Silverberg, N. B.; Adler, C. H.; Seward, J. D.; Beach, T. G.; Sabbagh, M. N., Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **2009**, *5* (1), 18-29.
108. Eisele, Y. S.; Obermuller, U.; Heilbronner, G.; Baumann, F.; Kaeser, S. A.; Wolburg, H.; Walker, L. C.; Staufenbiel, M.; Heikenwalder, M.; Jucker, M., Peripherally Applied A beta-Containing Inoculates Induce Cerebral beta-Amyloidosis. *Science* **2010**, *330* (6006), 980-982.

109. Haass, C.; Selkoe, D. J., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (2), 101-12.
110. Butterfield, S. M.; Lashuel, H. A., Amyloidogenic Protein Membrane Interactions: Mechanistic Insight from Model Systems. *Angew Chem Int Edit* **2010**, *49* (33), 5628-5654.
111. Serra-Batiste, M.; Ninot-Pedrosa, M.; Bayoumi, M.; Gairi, M.; Maglia, G.; Carulla, N., A beta 42 assembles into specific beta-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *P Natl Acad Sci USA* **2016**, *113* (39), 10866-10871.
112. Serra-Batiste, M.; Tolchard, J.; Giusti, F.; Zoonens, M.; Carulla, N., Stabilization of a Membrane-Associated Amyloid-beta Oligomer for Its Validation in Alzheimer's Disease. *Front Mol Biosci* **2018**, *5*, 38.
113. Bode, D. C.; Baker, M. D.; Viles, J. H., Ion Channel Formation by Amyloid-beta(42) Oligomers but Not Amyloid-beta(40) in Cellular Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292* (4), 1404-1413.
114. Bleiholder, C.; Bowers, M. T., The Solution Assembly of Biological Molecules Using Ion Mobility Methods: From Amino Acids to Amyloid beta-Protein. *Annu Rev Anal Chem* **2017**, *10*, 365-386.
115. Bernstein, S. L.; Dupuis, N. F.; Lazo, N. D.; Wyttenbach, T.; Condron, M. M.; Bitan, G.; Teplow, D. B.; Shea, J. E.; Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V.; Bowers, M. T., Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* **2009**, *1* (4), 326-31.
116. Botzanowski, T.; Erb, S.; Hernandez-Alba, O.; Ehkirch, A.; Colas, O.; Wagner-Rousset, E.; Rabuka, D.; Beck, A.; Drake, P. M.; Cianferani, S., Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *MAbs* **2017**, *9* (5), 801-811.
117. Ehkirch, A.; Hernandez-Alba, O.; Colas, O.; Beck, A.; Guillarme, D.; Cianferani, S., Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2018**, *1086*, 176-183.
118. Barrera, N. P.; Robinson, C. V., Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: from individual proteins to intact complexes. *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 247-71.
119. Reading, E., Structural Mass Spectrometry of Membrane Proteins within Their Native Lipid Environments. *Chemistry* **2018**, *24* (51), 13391-13398.
120. Peetz, O.; Hellwig, N.; Henrich, E.; Mezhyrova, J.; Dotsch, V.; Bernhard, F.; Morgner, N., LILBID and nESI: Different Native Mass Spectrometry Techniques as Tools in Structural Biology. *J Am Soc Mass Spectrom* **2019**, *30* (1), 181-191.
121. Susa, A. C.; Xia, Z. J.; Williams, E. R., Small Emitter Tips for Native Mass Spectrometry of Proteins and Protein Complexes from Nonvolatile Buffers That Mimic the Intracellular Environment. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (5), 3116-3122.
122. Susa, A. C.; Xia, Z. J.; Williams, E. R., Native Mass Spectrometry from Common Buffers with Salts That Mimic the Extracellular Environment. *Angew Chem Int Edit* **2017**, *56* (27), 7912-7915.
123. Susa, A. C.; Lippens, J. L.; Xia, Z.; Loo, J. A.; Campuzano, I. D. G.; Williams, E. R., Submicrometer Emitter ESI Tips for Native Mass Spectrometry of Membrane Proteins in Ionic and Nonionic Detergents. *J Am Soc Mass Spectrom* **2018**, *29* (1), 203-206.
124. Pan, J.; Heath, B. L.; Jockusch, R. A.; Konermann, L., Structural interrogation of electrosprayed peptide ions by gas-phase H/D exchange and electron capture dissociation mass spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (1), 373-8.
125. Iacob, R. E.; Krystek, S. R.; Huang, R. Y.; Wei, H.; Tao, L.; Lin, Z.; Morin, P. E.; Doyle, M. L.; Tymiak, A. A.; Engen, J. R.; Chen, G., Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry applied to IL-23 interaction characteristics: potential impact for therapeutics. *Expert Rev Proteomics* **2015**, *12* (2), 159-69.
126. Harrison, R. A.; Engen, J. R., Conformational insight into multi-protein signaling assemblies by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. *Curr Opin Struc Biol* **2016**, *41*, 187-193.
127. Pirrone, G. F.; Emert-Sedlak, L. A.; Wales, T. E.; Smithgall, T. E.; Kent, M. S.; Engen, J. R., Membrane-Associated Conformation of HIV-1 Nef Investigated with Hydrogen Exchange Mass Spectrometry at a Langmuir Monolayer. *Anal Chem* **2015**, *87* (14), 7030-5.
128. Pirrone, G. F.; Vernon, B. C.; Kent, M. S.; Engen, J. R., Hydrogen Exchange Mass Spectrometry of Proteins at Langmuir Monolayers. *Anal Chem* **2015**, *87* (14), 7022-9.

***PARTIE 3 : ÉVALUATION DE L'APPORT DES  
EXPÉRIENCES DE MOBILITÉ IONIQUE DE  
TYPE « COLLISION INDUCED UNFOLDING »  
POUR LA CARACTÉRISATION  
CONFORMATIONNELLE D'ANTICORPS  
MONOCLONAUX.***



# ***PARTIE 3 : ÉVALUATION DE L'APPORT DES EXPÉRIENCES DE MOBILITÉ IONIQUE DE TYPE « COLLISION INDUCED UNFOLDING » POUR LA CARACTÉRISATION CONFORMATIONNELLE D'ANTICORPS MONOCLONAUX.***

Cette partie est dédiée à la caractérisation de protéines thérapeutiques par IM-MS native et CIU. Après une présentation de ce domaine d'étude et des techniques utilisées, les objectifs et les résultats des travaux sont détaillés. Les développements méthodologiques réalisés ont permis la caractérisation conformationnelle, pour diverses applications, de plusieurs formats d'anticorps : du *nanobody* à l'anticorps immunoconjugué.

**Introduction : État de l'art et objectifs.**

**Chapitre 1 : Développements méthodologiques en CIU.**

**Chapitre 2: Étude du VHH anti-HER2 par LC-MS, IM-MS native et CIU.**

**Chapitre 3 : Application de la CIU à un anticorps immunoconjugué site spécifique.**

**Chapitre 4: Application de la CIU à un anticorps monoclonal thérapeutique hybride : eculizumab.**

# **INTRODUCTION : ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIFS.**

## **1. Les anticorps monoclonaux.**

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont des immunoglobulines (IgGs) produites par les lymphocytes B du système immunitaire afin de cibler et neutraliser un agent pathogène aussi appelé antigène (Ag). La reconnaissance du paratope d'un anticorps est spécifique de l'épitope de l'Ag. Elle permet la formation d'un complexe anticorps-antigène (mAb/Ag) qui est ensuite éliminé par l'organisme, par exemple par phagocytose<sup>1</sup> ou par précipitation<sup>2</sup>. Les anticorps recombinants sont généralement produits en cellules mammifères (HEK ou CHO). Leur haute spécificité<sup>3</sup> et leur rendement de production<sup>4</sup> permettent aux mAbs d'être considérés comme une des classes de médicaments les plus importantes pour le traitement de nombreuses maladies<sup>5</sup> comme les cancers<sup>6</sup>, la sclérose en plaques<sup>7</sup> ou les maladies inflammatoires chroniques<sup>8</sup>. Le développement de ces molécules comme agents thérapeutiques est actuellement en plein essor. Parmi les 57 mAbs et dérivés autorisés par la *Food and Drug Administration* (U.S. FDA) dans le cadre de thérapies, plus de la moitié a été mis sur le marché depuis 2013 dont 13 uniquement en 2017<sup>9</sup> (Tableau 1).

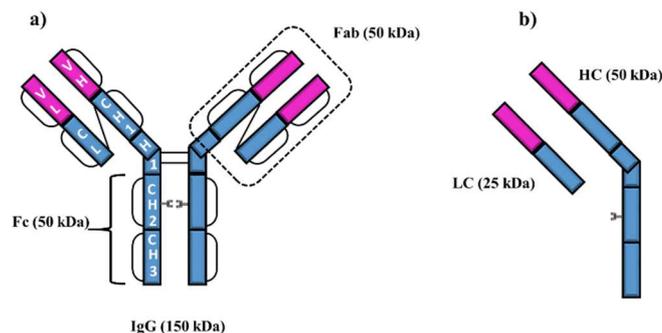
| <b>Nomenclature commerciale (entreprise)</b> | <b>Nomenclature internationale</b> | <b>Date d'approbation par la FDA</b> | <b>Pathologie(s) ciblée(s)</b>   |
|--|------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Bavencio (Pfizer/Merck Serono)               | avelumab                           | 2017                                 | Carcinome à cellules de Merkel (cancer de la peau)                                 |
| Cyltezo (Boehringer)                         | adalimumab                         | 2017                                 | Hydrosadénite (maladie de la peau)   |
| Dupixent (Sanofi)                            | dupilumab                          | 2017                                 | Dermatite atopique (maladie de la peau)  |
| Fasenra (AstraZeneca)                        | benralizumab                       | 2017                                 | Asthme sévère  |
| Renflexis (MSD)                              | infliximab                         | 2017                                 | Maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde, psoriasis, rectocolite hémorragique     |
| Ixifi (Pfizer)                               | infliximab                         | 2017                                 | Identiques à Renflexis   |
| Hemlibra (Genentech)                         | emicizumab                         | 2017                                 | Diminution de la fréquence des épisodes hémorragiques chez les patients hémophiles |
| Imfinzi (AstraZeneca)                        | durvalumab                         | 2017                                 | Cancer de la vessie, cancer bronchique non à petites cellules (cancer du poumon)   |
| Kevzara (Sanofi)                             | sarilumab                          | 2017                                 | Arthrite rhumatoïde  |
| Mvasi (Amgen)                                | bevacizumab                        | 2017                                 | Cancer colorectal  |
| Ocrevus (Genentech/roche)                    | ocrelizumab                        | 2017                                 | Sclérose en plaques  |
| Ogivri (Mylan)                               | trastuzumab                        | 2017                                 | Cancer du sein, cancer gastrique   |
| Ontruzant (MS)                               | trastuzumab                        | 2017                                 | Cancer du sein, cancer gastrique   |

**Tableau 1.** Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA en 2017, tableau adapté à partir de<sup>9</sup>.

## 2. Description structurale des anticorps monoclonaux.

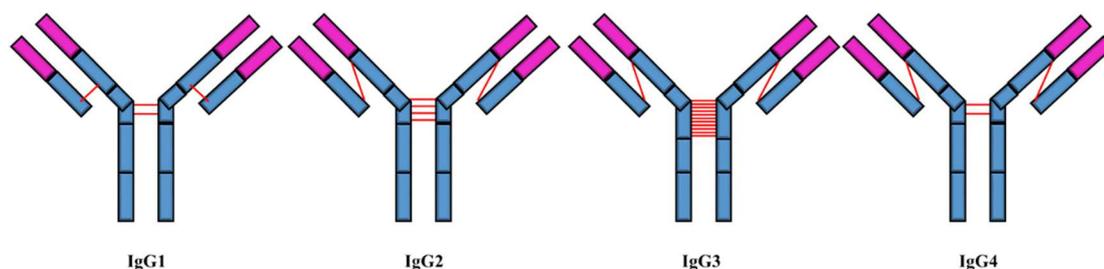
Un mAb est une biomolécule de 150 kDa divisée en 4 sous-unités : 2 chaînes légères (*Light Chain*, LC) de ~25 kDa et 2 chaînes lourdes (*Heavy Chain*, HC) de ~50 kDa (figure 1). La LC est composée de deux domaines : un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL) et la chaîne lourde est composée d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3). La structure du mAb en forme caractéristique de Y est régie par des interactions non-covalentes et par la présence de ponts disulfures inter chaînes entre les deux chaînes lourdes (au niveau de la région charnière nommée *hinge*, région flexible qui assure la jonction entre les domaines constants CH1 et CH2) et entre les chaînes légères et les chaînes lourdes (entre les domaines CL et CH1).

La partie responsable de la reconnaissance du mAb à l'Ag est le fragment Fab (*antigen-binding fragment*) composé de la LC entière et de la partie supérieure de la HC (VH et CH1). Les domaines CH2 et CH3 de la chaîne lourde constituent le fragment Fc qui est porteur des fonctions effectrices des anticorps (activation du complément, reconnaissance par les macrophages, catabolisme) et des glycosylations.



**Figure 1.** Architecture d'une IgG4 (a) et de ses chaînes lourdes et légères (b). En rose, les domaines variables VH et VL sont représentés, il s'agit des domaines contenant les *Complementary Determining Regions* (CDRs) qui sont des domaines hypervariables d'un mAb à l'autre, essentiels à la reconnaissance de l'antigène. Le fragment Fab est entouré sur le schéma.

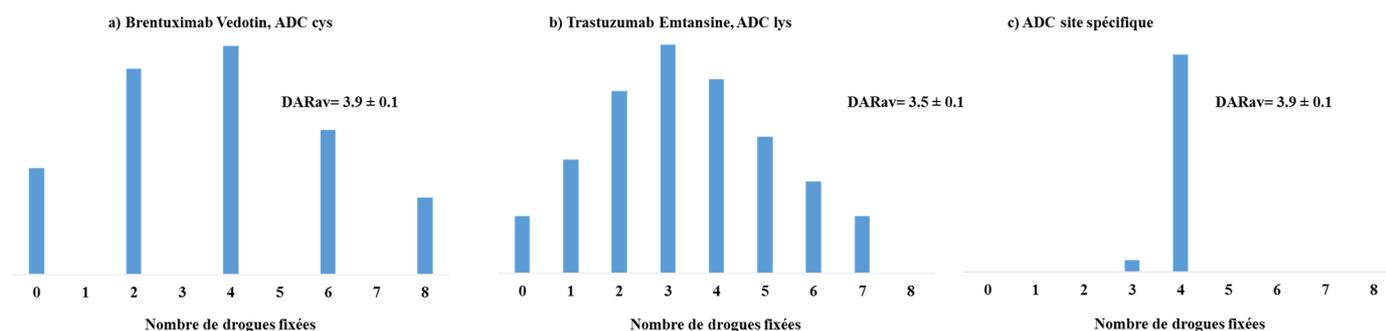
Le nombre et la localisation des ponts disulfures inter chaînes permettent de distinguer quatre isotypes d'anticorps (figure 2). Les IgG1 et les IgG4 possèdent 2 ponts disulfures au niveau de la région charnière mais leur appariement des chaînes légères et lourdes est différent. Les IgG3 possèdent une région charnière plus grande que les autres isotypes, avec 11 ponts disulfures inter chaînes contre 4 pour les IgG2 et 2 pour les IgG1 et les IgG4.



**Figure 2.** Représentation schématique des 4 isotypes d'IgGs.

### 3. Les anticorps monoclonaux conjugués.

Le greffage covalent de petites molécules cytotoxiques sur des mAbs a permis de mettre au point des immunoconjugués appelés *Antibody Drug Conjugates*<sup>10</sup> (ADCs). Ces dérivés de mAbs ont l'avantage d'allier à la fois la spécificité de reconnaissance du mAb et la haute efficacité des drogues (souvent trop toxiques pour être administrées seules). Les ADCs sont constitués d'un mAb relié covalamment à des petites molécules appelées drogues à l'aide d'un agent de liaison appelé *linker*. Le mAb sert de vecteur : l'internalisation de l'ADC à l'intérieur de la cellule est suivie de la libération de la molécule cytotoxique permettant à terme l'apoptose des cellules malades ciblées. Les principales stratégies de conjugaison développées jusqu'en 2016 visaient à cibler les cystéines (exemple du brentuximab vedotin) ou les lysines (trastuzumab emtansine) du mAb. Bien que ces stratégies de conjugaison soient efficaces, elles ne permettent pas de maîtriser le nombre moyen de drogues fixées par anticorps, encore appelé *average Drug to Antibody Ratio* (DARav), ou de contrôler la distribution des drogues greffées (appelée *drug load distribution*, DLD). En effet, une distribution de 0 à 8 molécules cytotoxiques par mAb était observée<sup>11-12</sup> (figure 3a-b).



**Figure 3.** Représentation schématique de l'hétérogénéité des ADCs cystéine, lysine et site spécifique, adaptée à partir de<sup>11-13</sup>.

Cette hétérogénéité ne permet pas d'évaluer précisément la quantité de drogue dispensée lors d'un traitement. Afin de maîtriser cette hétérogénéité, et d'élargir la fenêtre thérapeutique<sup>14</sup>, de nouvelles stratégies de conjugaison, basées sur la conjugaison d'acides aminés non naturels<sup>15</sup> ou de cystéines modifiées<sup>16</sup>, ont permis l'obtention d'ADCs dits site spécifiques avec des distributions d'espèces Dn

plus étroites (figure 3c). Pour les ADCs, l'hétérogénéité du squelette mAb (glycosylations, modifications post traductionnelles, ponts S-S, etc.) est encore augmentée par le nombre de drogues. La caractérisation analytique de ces ADCs constitue donc un véritable défi qui doit être relevé pour l'amélioration continue des stratégies de couplage, du contrôle des lots et la production de médicaments plus efficaces et moins nocifs<sup>10</sup>.

#### 4. La spectrométrie de masse comme outil privilégié de caractérisation des mAbs et produits associés.

La caractérisation des mAbs et des ADCs peut être réalisée à l'aide de différents couplages entre des techniques séparatives et principalement la spectrophotométrie d'absorption UV ou la MS (tableau 2). Ces techniques permettent d'apporter des informations complémentaires pour la caractérisation des mAbs et des ADCs comme, par exemple, l'identification des PTMs et des glycosylations d'un mAb à l'échelle *bottom* mais aussi de calculer le DARav d'un ADC à l'échelle intacte (*top level*) ou à l'échelle *middle*.

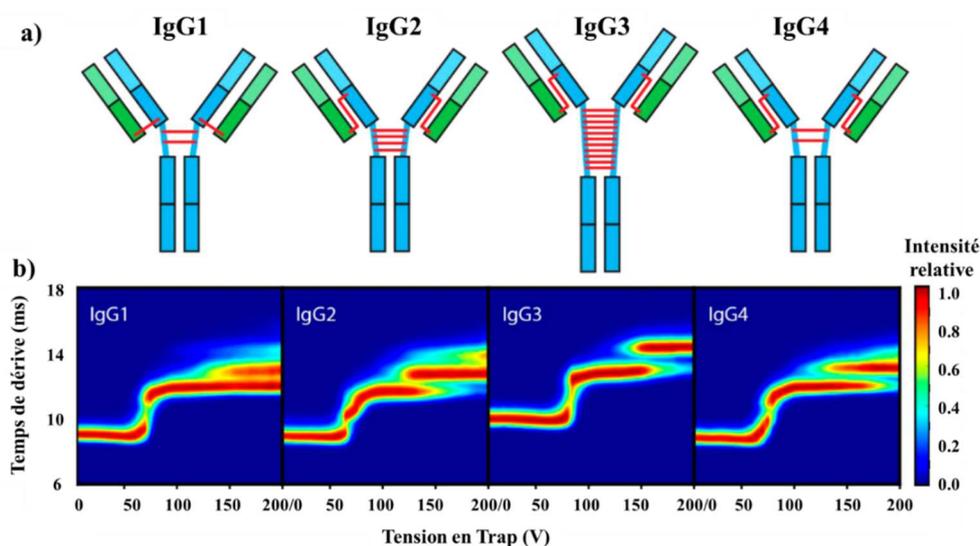
| Technique séparative (abréviation) - principe de séparation            | Détecteur              | Informations  | Caractère dénaturant/natif (phase mobile, tampon, agent dénaturant)  |
|--|------------------------|---|--|
| Chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) - hydrophobicité       | UV et/ou MS            | Homogénéité de l'échantillon, mesure de masses entières, calcul du DARav pour les ADCs cystéines et site spécifiques. | dénaturant (ACN ou MeOH)   |
|  |                        | Recouvrement de séquence, quantification des PTMs et identification des peptides conjugués                            |  |
| Chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC)- hydrophobicité         | UV et/ou MS            | Calcul du DARav pour les ADCs cystéines et site spécifiques. Évaluation de la DLD.                                    | natif (sulfate d'ammonium)   |
| Chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC)- hydrophilicité       | UV et/ou MS            | Détermination des profils de glycosylation.   | dénaturant (ACN)   |
| Chromatographie à échange d'ions (IEX)-point isoélectrique             | UV et/ou MS            | Identification des variants de charge   | natif (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl pour un couplage UV, AcONH <sub>4</sub> pour un couplage MS) |
| Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)- volume hydrodynamique      | UV et/ou MS            | Quantification des espèces de haut et faible poids moléculaire  | natif (phosphate/NaCl/KCl pour un couplage UV, AcONH <sub>4</sub> pour un couplage MS)                     |
| Électrophorèse capillaire sur gel (CE-SDS)-taille                      | UV/fluorescence        | Homogénéité de l'échantillon (PTMs)   | dénaturant (SDS)   |
| Focalisation isoélectrique capillaire (cIEF)-point isoélectrique       | UV ou MS               | Identification des variants de charge   | dénaturant   |
| Électrophorèse capillaire de zone (CZE)-charge et rayon hydrodynamique | UV, fluorescence ou MS | Recouvrement de séquence, quantification des PTMs et identification des peptides conjugués                            | dénaturant   |

**Tableau 2.** Principales techniques séparatives utilisées pour la caractérisation de mAbs et ADCs, tableau adapté à partir de<sup>17</sup>.

Parmi les techniques décrites pour la caractérisation des mAbs et ADCs, les approches basées sur la MS permettent d'accéder à de nombreuses informations comme par exemple la détermination de son DARav, ou encore la distribution des espèces Dn (DLD) par MS native<sup>18</sup>. Les possibilités de couplage de la MS, liées à son court temps d'acquisition, avec de nombreuses techniques séparatives ont récemment été exploitées et ont permis de d'étendre son champ d'application pour la caractérisation de mAbs et d'ADCs par exemple pour la détection d'espèces de hauts poids moléculaires par SEC-native MS<sup>17, 19</sup>, le contrôle des profils de glycosylation par HILIC-MS<sup>20</sup>, ou encore la caractérisation structurale d'ADCs par CE-MS<sup>21-22</sup>. Les couplages entre la chromatographie liquide non dénaturante et la MS impliquent l'utilisation de phases mobiles compatibles avec le mode ESI, diminuant les performances séparatives. Afin de pallier à ce problème, une méthodologie bidimensionnelle a été développée afin de conserver les capacités de séparation de la première dimension (phase mobile avec des sels non-volatils) et une étape de dessalage en ligne en seconde dimension (phase mobile avec des sels volatils). De cette manière, le couplage HICxSEC-MS a permis la détermination du DARav et de la DLD par HIC avec une identification de chaque pic par MS<sup>23</sup>. Selon la même méthodologie, la caractérisation des variants de tailles de mAbs a pu être réalisée à travers le couplage SECxSEC-MS<sup>24</sup>. Les zones de contact entre le mAb et l'Ag sont également des informations qui peuvent être connues grâce à la MS en couplage avec la technique d'échange hydrogène deutérium au moyen d'expériences d'épitope mapping<sup>25</sup>. La technique IM-MS est une technique qui permet, elle, la caractérisation des ions en phase gazeuse et l'apport d'informations complémentaires, dites conformationnelles, aux techniques citées précédemment. L'utilisation de la mobilité ionique a été étendue à la caractérisation de mAbs et d'ADCs<sup>26</sup>. Cette technique a été décrite comme capable de séparer des anticorps de conformations différentes en conditions dénaturantes<sup>27</sup>. De plus, la capacité du TWIMS à séparer et à quantifier de manière relative les espèces Dn en conditions natives a été démontrée sur deux ADCs : le brentuximab vedotin<sup>11</sup> et le trastuzumab emtansine<sup>12</sup>. Dans ces études, l'effet de l'ajout de drogues sur la conformation du mAb a été étudié et a permis de montrer une augmentation de la CCS en fonction du nombre de drogues fixées sur l'anticorps. Ces expériences dites native IM-MS sont réalisées dans des conditions énergétiques « basses » afin d'éviter la déstructuration des mAbs en phase gazeuse lors de la mesure des CCS.

Ce n'est pas le cas de la nouvelle approche évaluée et développée dans le cadre de cette thèse : l'approche CIU (présentée en Partie 1). L'approche CIU, *Collision Induced Unfolding*, consiste à étudier la déstructuration de l'ion d'intérêt en phase gazeuse. Pour cela, l'ion est accéléré progressivement par des pas de tension définis (trap CV) dans une cellule appelée trap qui précède la cellule de mobilité ionique. L'influence de cette accélération progressive dans la cellule trap peut induire des transitions conformationnelles dont les ATDs sont séparées en mobilité ionique. Le nombre

d'études utilisant cette technique est resté relativement faible<sup>28-29</sup> jusqu'en 2015, année durant laquelle une étude sur les anticorps monoclonaux a permis de montrer une partie du potentiel de cette nouvelle technique<sup>30</sup>. Ce travail novateur a notamment permis de montrer les potentialités de l'approche CIU pour la classification des isotypes de mAbs, grâce à des cartes CIU décrites comme des empreintes spécifiques de l'isotype d'une IgG (figure 4). Cette preuve de concept a été réalisée sur des IgG-k « modèles » purifiées à partir du myélome humain. La différenciation des IgGs a été décrite comme non ambiguë à l'aide d'une analyse statistique réalisée sur les ATDs extraites à trap CV : 200 V. De plus, les profils CIU des IgG1 et IgG4 présentent de hautes similarités selon les auteurs mais restent différenciables. Dans cette étude, l'effet de la glycosylation sur la stabilité conformationnelle des ions en phase gazeuse a également été décrit et propose une stabilisation de la conformation du mAb grâce aux sucres.



**Figure 4.** Représentation des différents isotypes d'IgG (a) et de leurs empreintes CIU associées (b). Cette figure a été extraite de Tian et al.<sup>30</sup> puis adaptée.

## 5. Objectifs généraux des travaux.

L'approche CIU ayant été décrite quelques mois avant le début de ma thèse (octobre 2015), un travail de mise en place, d'évaluation (répétabilité, reproductibilité, etc.) et d'optimisation a été réalisé et constitue le cœur du premier chapitre de cette partie. Ensuite, les potentialités de son application ont été explorées à travers l'étude de différents formats de mAbs de tailles et de complexités croissantes dans les trois chapitres suivants.

# CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES EN CIU.

La réalisation d'une expérience CIU nécessite trois étapes : la préparation de l'échantillon, l'acquisition et le traitement des données (figure 5).



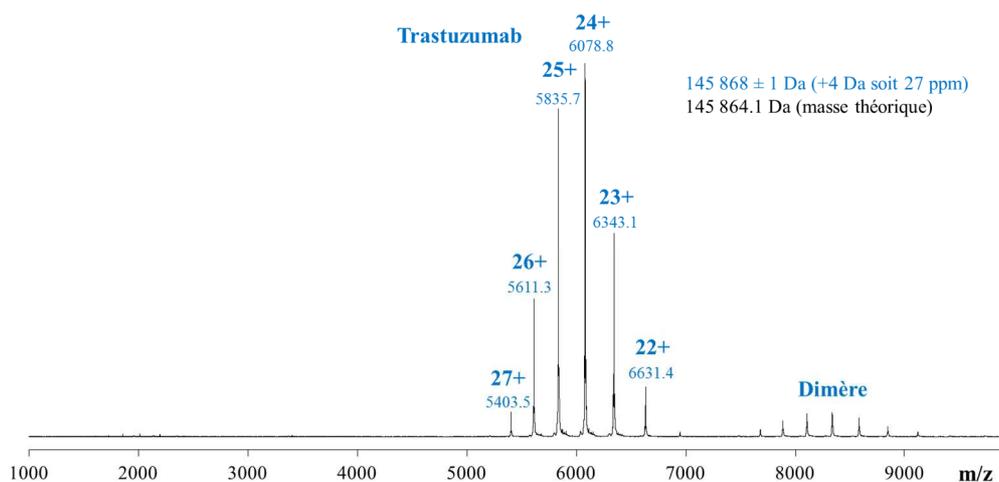
**Figure 5.** Représentation schématique des trois étapes nécessaires pour la réalisation d'une expérience CIU.

Durant mon travail de thèse, les anticorps ont été déglycosylés à l'aide de l'enzyme IgG0 et dessalés avec un tampon  $\text{AcONH}_4$  150 mM pH 6,9 à l'aide de vivaspin 10 kDa (8 cycles de 8 min à 4°C) puis infusés manuellement à l'aide du nanomate. La déglycosylation a été réalisée afin de simplifier l'interprétation des données. Les expériences CIU ont été menées sur le Synapt G2 HDMS présenté en Partie 1. L'acquisition des données a été optimisée et les résultats obtenus sont présentés ci-après.

## 1. Optimisations instrumentales.

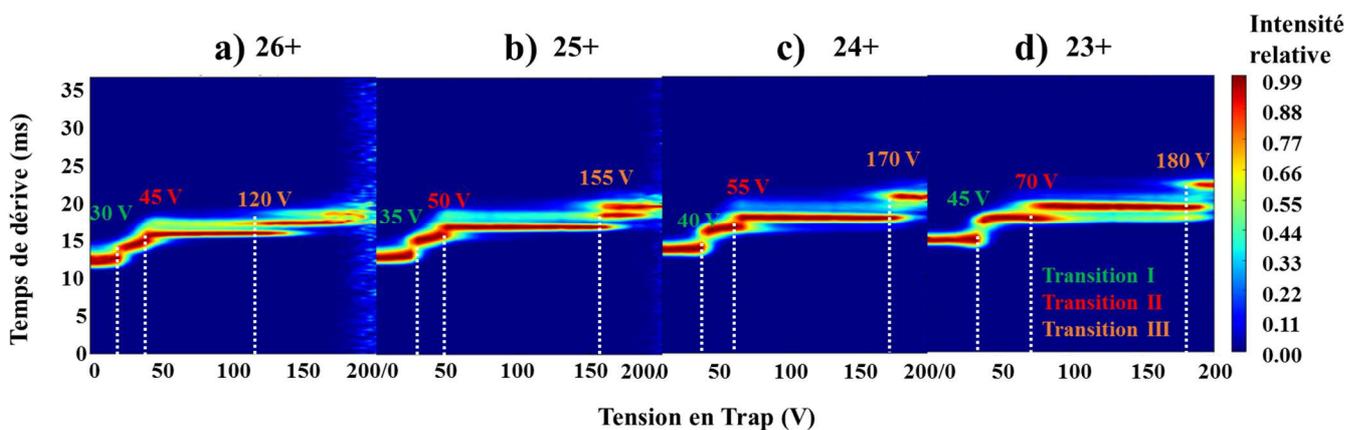
### 1.1. Choix de l'état de charge.

L'influence de l'état de charge sur le profil CIU a été étudiée, en utilisant comme mAb modèle le trastuzumab (IgG1). Le contrôle par MS native de l'échantillon permet de contrôler son homogénéité et d'observer sa distribution de charges, ici de 27+ à 22+ (figure 6). La masse expérimentale mesurée est  $145\,868 \pm 1$  Da en bonne corrélation avec la masse théorique calculée à partir de la séquence (145 864,1 Da).



**Figure 6.** Spectre de masse du trastuzumab déglycosylé obtenu sur le Synapt G2 en conditions natives.

Les 4 états de charge principaux (26+, 25+, 24+ et 23+) ont été utilisés pour générer les cartes CIU correspondantes (figure 7a-d). Sur chaque carte CIU, trois transitions sont observées. Les tensions de trap correspondant à ces transitions sont manuellement annotées en vert, rouge et orange respectivement pour la première, deuxième et troisième transition. Lorsque l'état de charge diminue, l'énergie nécessaire pour observer une transition est plus importante. En effet, la première transition est observée à environ 30 V sur le 26+ contre 45 V sur le 23+ et la troisième transition est observée à 120 V (26+) contre 180 V (23+). Cette observation peut être directement reliée au repliement de la protéine décrit comme plus structuré/natif pour de faibles états de charge<sup>31</sup> : plus la protéine est repliée plus l'énergie nécessaire pour la déplier est grande. Le choix de l'état de charge est donc un paramètre crucial en CIU et doit être identique lors de la comparaison des transitions de deux anticorps notamment.

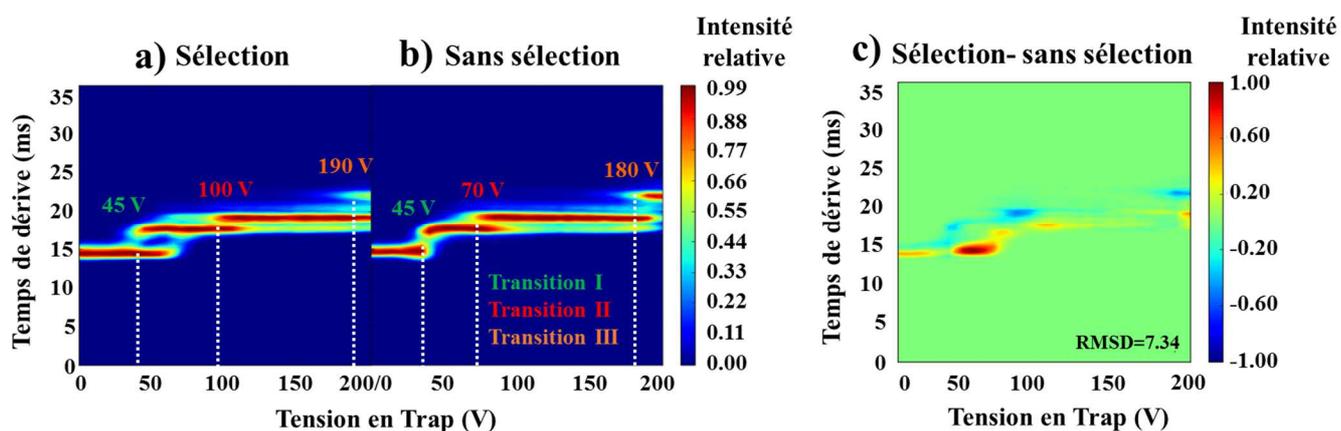


**Figure 7.** Influence de l'état de charge sur la carte CIU du trastuzumab déglycosylé. Les cartes CIU présentées ci-dessus représentent les cartes moyennes obtenues à partir de trois répliquats analytiques sur les états de charge 26+(a), 25+(b), 24+(c) et 23+(d).

## 1.2. Influence de la sélection de l'ion dans le quadripôle.

L'influence de la pré-sélection de l'ion  $m/z$  dans le quadripôle sur la carte CIU a aussi été étudiée. En effet, dans Tian et al.<sup>30</sup>, seuls les résultats avec sélection sont présentés sur les mAbs. Les cartes CIU présentées ci-dessous (figure 8) correspondent aux cartes moyennes obtenues pour un même état de charge (ici le 23+) avec ou sans sélection de l'ion dans le quadripôle. Dans les deux cas, le même nombre de transitions est observé (trois) mais l'état initial (correspondant à la protéine totalement repliée) de l'ion 'survit' à de plus hautes tensions (45 V, 100 V et 190 V) lorsqu'il est sélectionné par le quadripôle en comparaison avec l'expérience réalisée sans sélection (45 V, 70 V et 180 V). Cette observation peut être expliquée par une plus forte répulsion coulombienne en présence des autres états de charge engendrant une déstructuration précoce de l'ion. Ainsi il semble qu'avec sélection, les écarts de transition soient plus grands (45 à 100 V vs 45 à 70 V) et donc il semblerait que la « résolution »

d'une carte CIU (définie ici comme l'écart de tensions entre deux transitions) soit meilleure avec la sélection préalable de l'ion dans le quadripôle. D'autre part, la sélection induit une survie de l'ion plus longue et peut ainsi décaler les transitions vers des tensions supérieures à 200 V (non atteignables sur notre instrument). C'est pour cette raison et afin d'éviter des expériences trop longues que nous avons choisi de ne pas sélectionner nos ions avec le quadripôle pour la caractérisation des mAbs. Les mêmes observations ont été faites sur les états de charge 24+, 25+ et 26+ (données non montrées).

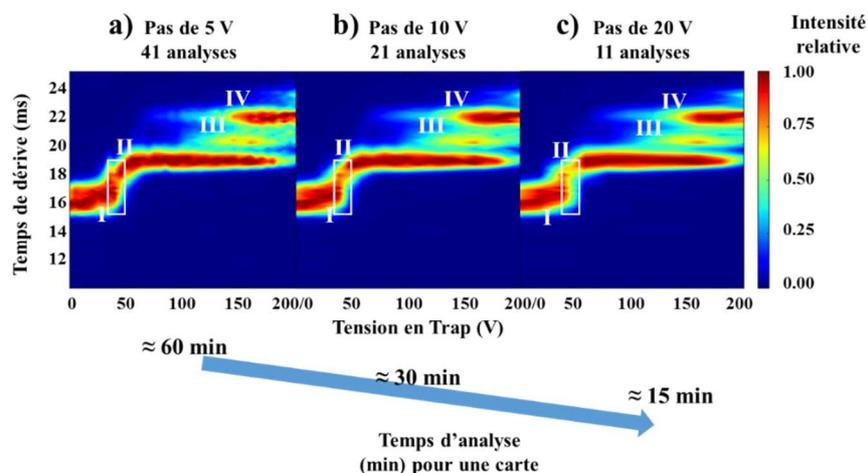


**Figure 8.** Influence de la sélection de l'état de charge 23+ dans le quadripôle sur le profil CIU de l'anticorps trastuzumab déglycosylé. (a) avec sélection dans le quadripôle, (b) sans sélection et (c) carte différentielle entre les deux conditions. Le coefficient de variation RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre les deux expériences est noté en % sur la carte différentielle.

### 1.3. Influence de l'amplitude des pas de la tension trap CV sur la carte CIU.

Le nombre d'analyses permettant de générer une carte CIU est un paramètre important à prendre en considération car il définit la durée de l'expérience et donc la quantité de matériel nécessaire. Différents pas de tensions ont été testés afin d'évaluer l'effet sur la qualité de la carte CIU obtenue (figure 9). Pour chaque condition, le nombre de transitions observées est similaire (trois transitions reliant 4 états conformationnels distincts) mais les transitions sont mieux définies lorsque les pas sont faibles (5 V, encadré blanc). Nous avons choisi de ne pas utiliser des pas inférieurs à 5 V pour éviter d'augmenter la durée d'acquisition d'une carte CIU (environ 1h pour une carte CIU de 41 analyses soit trois heures environ lorsque les cartes sont réalisées en triplicata). Les cartes CIU présentées dans cette thèse résultent de la moyenne de trois cartes individuelles (réplicats analytiques). Cependant, réaliser une carte CIU avec des pas de 20 V peut constituer un point de départ intéressant pour caractériser une première fois la stabilité conformationnelle d'une protéine, notamment lorsque la quantité purifiée disponible est insuffisante pour réaliser la totalité des expériences. Généralement, à l'aide du nanomate, l'acquisition d'une carte CIU avec des pas de 5 V nécessite 20  $\mu$ L d'anticorps à

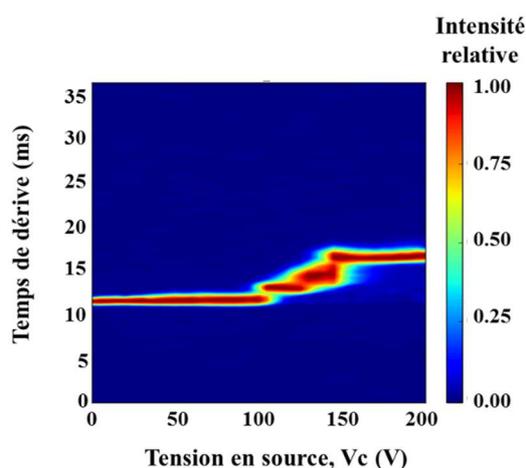
une concentration de 10  $\mu\text{M}$ , le volume nécessaire peut être supérieur lorsque le spray généré par le nanomate n'est pas stable.



**Figure 9.** Évaluation de l'effet de la taille du pas sur la qualité de la carte CIU de l'anticorps eculizumab déglycosylé (22+) (a), 41 analyses avec un pas de 5 V, (b) 21 analyses avec un pas de 10 V et (c) 11 analyses avec un pas de 20 V.

#### 1.4. Influence de la tension en source sur le déploiement protéique.

L'influence de la tension appliquée en source ( $V_c$ ) sur le déploiement protéique observé en MS native<sup>32</sup> et IM-MS<sup>33-34</sup> est connue et largement reportée : cette tension est toujours optimisée de manière à obtenir une sensibilité maximale en accélérant les ions sans les déstructurer en source notamment pour le calcul de CCS. Par exemple (figure 10), la concanavaline A (protéine utilisée comme étalon en IM-MS) est progressivement déstructurée lors de son accélération en source à partir de 100 V, les expériences de native IM-MS doivent être réalisées avec une tension inférieure à cette valeur afin d'éviter une surestimation de la CCS.



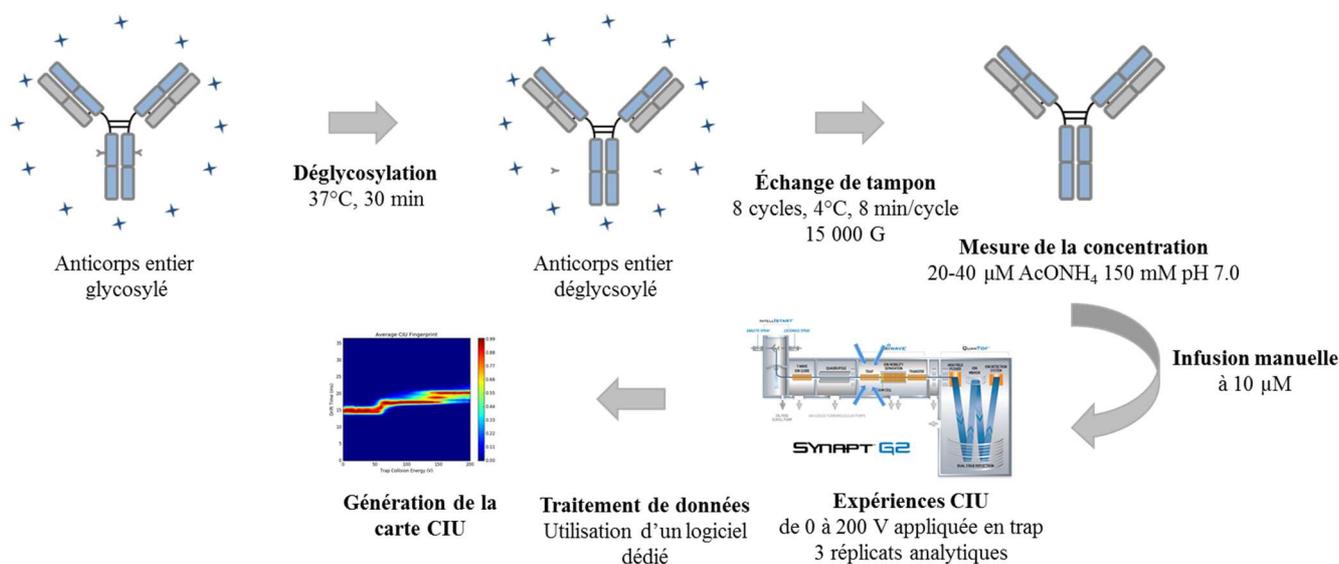
**Figure 10.** Exemple de l'influence de la tension en source sur la déstructuration de la concanavaline A. La carte présentée ici n'est pas une expérience CIU mais utilise le même mode de représentation : il s'agit d'une carte 3D qui représente l'évolution du temps de dérive de l'ion 21+ de la concanavaline A en fonction de la tension

appliquée en source (Vc). La troisième dimension représente l'intensité relative de la distribution du temps de dérive.

Lors d'une expérience CIU, cette tension doit être fixe et préalablement optimisée de la même manière pour éviter que la protéine accélérée dans la cellule trap soit déjà déstructurée en source. Cela déforme l'information générée en CIU et ne permet pas de caractériser l'intégralité des transitions observables dans des conditions de plus faibles énergies en source.

## 2. Évaluation de l'approche CIU.

Après avoir déterminé quels sont les paramètres instrumentaux importants en CIU, la répétabilité et la reproductibilité des expériences ont été évaluées à l'aide d'un mAb modèle : le reslizumab (IgG4). Le protocole utilisé est représenté en figure 11. Afin de limiter l'hétérogénéité du mAb, nous avons fait, comme précédemment, le choix de retirer les sucres de la partie Fc en utilisant l'enzyme IgG0 (Genovis) dans des conditions classiques (30 min à 37°C). Après échange de tampon (8 cycles dessalage avec vivaspin 10 kDa) et mesure UV de la concentration, le reslizumab est infusé à 10 µM dans un tampon AcONH<sub>4</sub> 150 mM pH 7,0 pour la réalisation des expériences CIU.

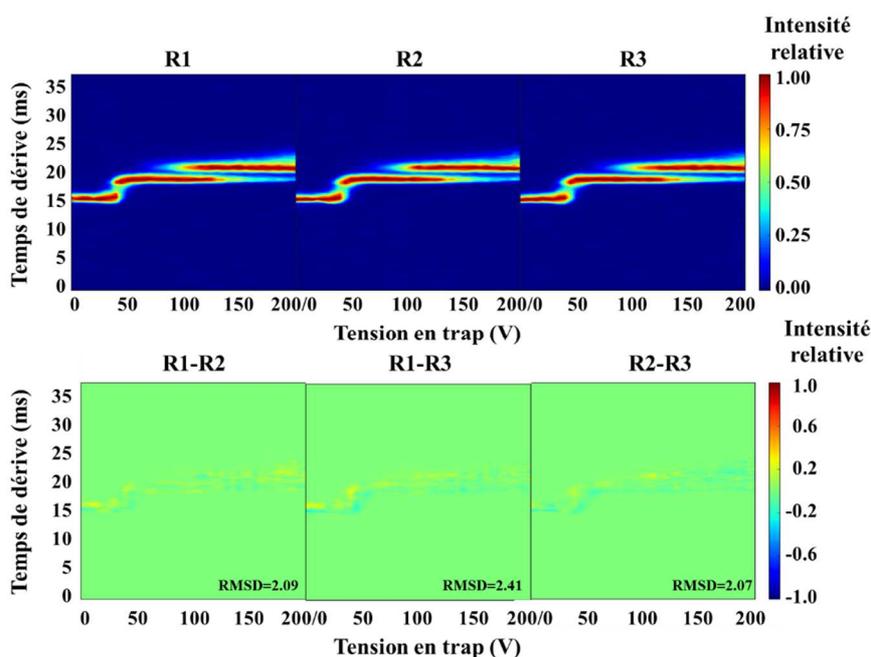


**Figure 11.** Représentation du *workflow* utilisé pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité de l'approche CIU.

Nous montrons ci-dessous les résultats obtenus sur l'état de charge 22+ de reslizumab sans sélection préalable dans le quadripôle, avec une extraction des ATDs réalisée sur une largeur de 5 m/z et des mesures réalisées chaque 5 V de 0 à 200 V au niveau de la cellule trap.

## 2.1. Répétabilité.

Ici, la répétabilité est définie comme la part de variabilité générée par le système de mesure, c'est-à-dire le couplage IM-MS dans notre cas. Pour évaluer cette part de variabilité, nous avons réalisé trois répliquats analytiques de l'analyse CIU du reslizumab dans les mêmes conditions instrumentales, le même jour avec un même opérateur (figure 12).

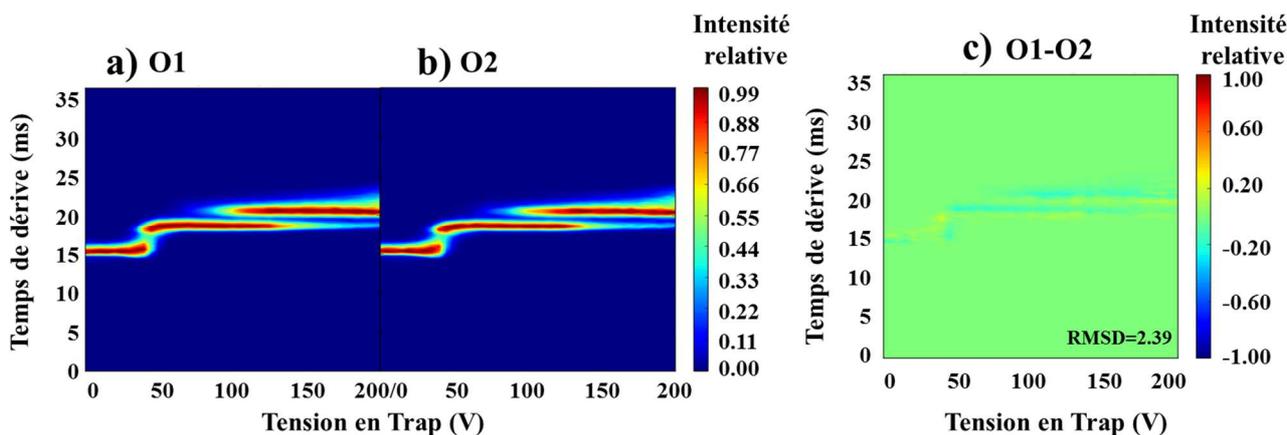


**Figure 12.** Cartes CIU obtenues sur le reslizumab intact : répliquat 1 (R1), répliquat 2 (R2), répliquat 3 (R3) et les cartes différentielles associées R1-R2, R1-R3 et R2-R3. Le coefficient de variation (CV) noté RMSD est noté sur chaque carte différentielle.

L'analyse CIU du reslizumab montre la présence de deux transitions conformationnelles, la première à  $\approx 50$  V et la seconde à  $\approx 100$  V. Le coefficient de variation (CV) variation des temps de dérive induite par ces trois répliquats est inférieur à 3 % montrant ainsi une bonne répétabilité des expériences.

## 2.2. Reproductibilité.

La reproductibilité est définie ici comme la part de variabilité induite lors de la préparation d'échantillon et lors de l'analyse de deux lots d'anticorps préparés et analysés par un opérateur différent. Nous avons réalisé l'analyse CIU, également en triplicats analytiques, de deux lots de reslizumab, sur des jours différents, avec deux opérateurs différents en suivant le même protocole de préparation d'échantillon, d'analyse et de traitement des données. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (figure 13).



**Figure 13.** Chaque carte représente ici la moyenne de trois analyses CIU : (a) Carte CIU moyenne réalisée par l'opérateur 1 (O1), (b) carte CIU moyenne réalisée par l'opérateur 2 (O2) et (c) carte CIU différentielle O1-O2. Le coefficient de variation RMSD est noté sur la carte différentielle.

La variation des temps de dérive induite par le changement d'opérateur est inférieure à 3% permettant de conclure que la reproductibilité de ces expériences est satisfaisante au regard des exigences de la U.S. FDA qui recommande comme acceptable des variations inférieures à 15 %<sup>35-36</sup>.

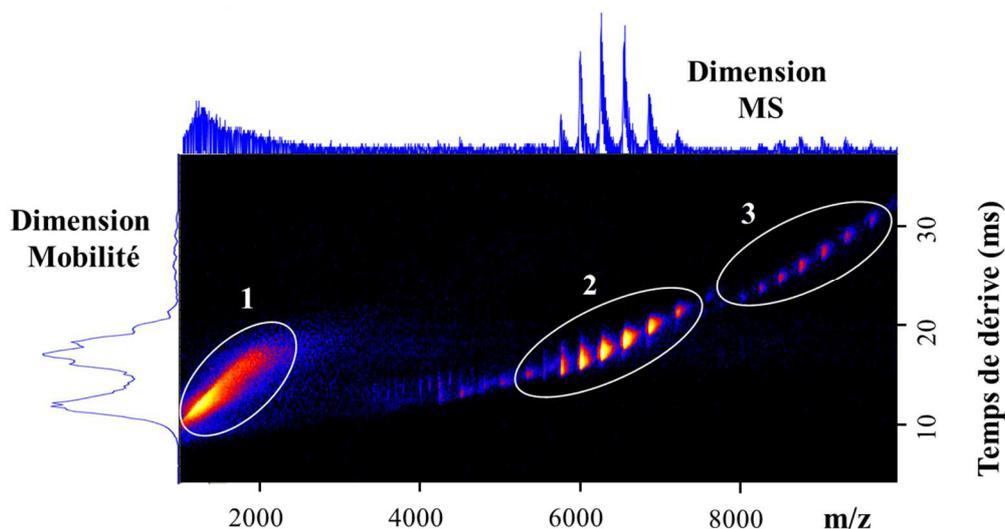
### 3. Traitement de données.

Les données d'IM-MS générées par notre instrument peuvent être traitées par des logiciels propriétaires et *open source*.

#### 3.1. Les logiciels de mobilité ionique propriétaires.

Deux logiciels commercialisés par Waters peuvent être utilisés pour traiter les données de mobilité ionique :

- Le logiciel MassLynx<sup>TM</sup> : permet l'extraction des ATDs pour chaque espèce m/z et inversement, il permet d'extraire le spectre de masse à partir d'une ATD. C'est ce logiciel qui a été utilisé pour extraire l'ensemble des temps de dérive utilisés pour le calcul de CCS durant cette thèse (la version utilisée est la version 4.1.)
- Le logiciel Driftscope<sup>TM</sup> : il possède les mêmes fonctionnalités que MassLynx au niveau de l'extraction des données mais permet aussi la représentation d'une carte 3D appelée *Driftscope* permettant de visualiser directement le temps de dérive de chaque ion m/z. La troisième dimension représente l'intensité relative du temps de dérive (figure 14).



**Figure 14.** Exemple de la représentation *driftscope* d'un anticorps monoclonal. Trois régions principales sont entourées représentant respectivement, les signaux d'impuretés contenus dans le tampon (1), le signal de l'anticorps monomère (2) et le signal de l'anticorps dimère (3).

Cette représentation est particulièrement utile lorsque l'on souhaite « nettoyer » les spectres de masse en utilisant la mobilité ionique comme une technique de séparation (Partie 2 Chapitre ABHD) ou identifier des oligomères possédant des ions  $m/z$  communs (Partie 2 Chapitre Peptide A $\beta$ 42). La représentation *driftscope* permet aussi de donner une image simple pour décrire l'homogénéité/hétérogénéité conformationnelle d'un échantillon<sup>27</sup>.

### 3.2. Description des logiciels dédiés aux traitements des données CIU.

Trois logiciels majeurs dédiés aux traitements des données CIU ont été développés durant ces quatre années : la suite logicielle CIUSuite<sup>37</sup>, son extension CIUSuite 2<sup>38</sup> et le logiciel Origami<sup>39</sup>. Ces trois logiciels peuvent être utilisés pour traiter des données CIU enregistrées avec les spectromètres de masse de la gamme Synapt (Waters). Les possibilités offertes sont détaillées ci-dessous.

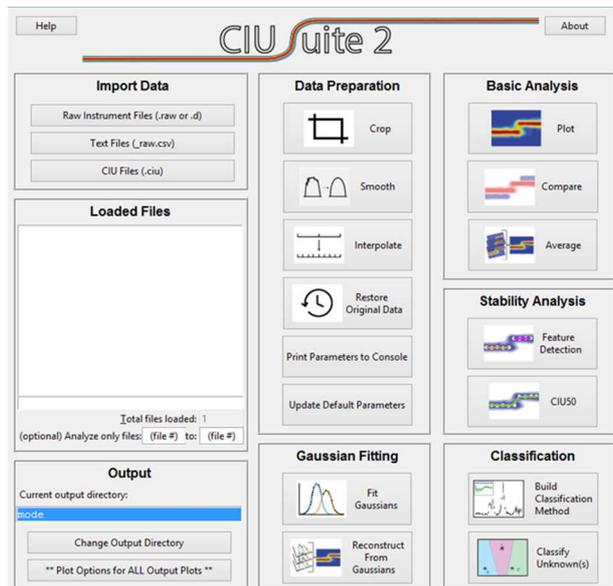
#### - La suite logicielle CIUsuite<sup>37</sup>.

Cette suite logicielle est la première à avoir été développée pour le traitement spécifique de données CIU. Il s'agit un logiciel *open source*, écrit en langage informatique Python, développé en 2015 par l'équipe du Dr. Ruotolo<sup>37</sup>. Brièvement l'extraction des ATDs est réalisée à l'aide d'un fichier .txt et d'une interface permettant de sélectionner les données brutes. Le fichier .txt contient les informations essentielles à l'extraction des ATDs : le rapport  $m/z$  de l'ion, le temps d'analyse, la gamme de temps de dérive considérée. Ces informations doivent être fournies manuellement par l'utilisateur puis

l'interface extrait de manière automatisée les ATDs de l'ion considéré pour chaque analyse (c'est-à-dire pour chaque valeur de tension trap). La compilation des ATDs extraites et la génération des cartes CIU sont des opérations qui sont réalisées en utilisant les modules de la suite logicielle à l'aide de lignes de commande. L'utilisation de ces lignes de commande nécessite une prise en main importante (pour un non initié en informatique) afin de maîtriser les différents modules et peut constituer un point limitant de son utilisation. Parmi les modules proposés, nous avons principalement utilisé les modules CIUSuiteplot et CIUSuitecompare permettant la génération de cartes CIU, de cartes CIU moyennes (à partir des triplicats analytiques) et de cartes CIU différentielles (« soustraction » de deux cartes).

### -La suite logicielle CIUSuite2<sup>38</sup>.

Il s'agit de l'extension de la suite logicielle CIUSuite, publiée en 2019<sup>38</sup> pendant la rédaction de ma thèse. L'avantage majeur pour l'utilisateur est l'absence totale de lignes de commande grâce à la présence d'une interface (figure 15) qui permet l'extraction automatisée des ATDs, la génération des cartes CIU et fournit une aide à l'interprétation. De plus de nouvelles fonctionnalités complètent la suite logicielle comme le classement des cartes CIU par groupe ou encore la détection automatisée des tensions de transitions (CIU50).

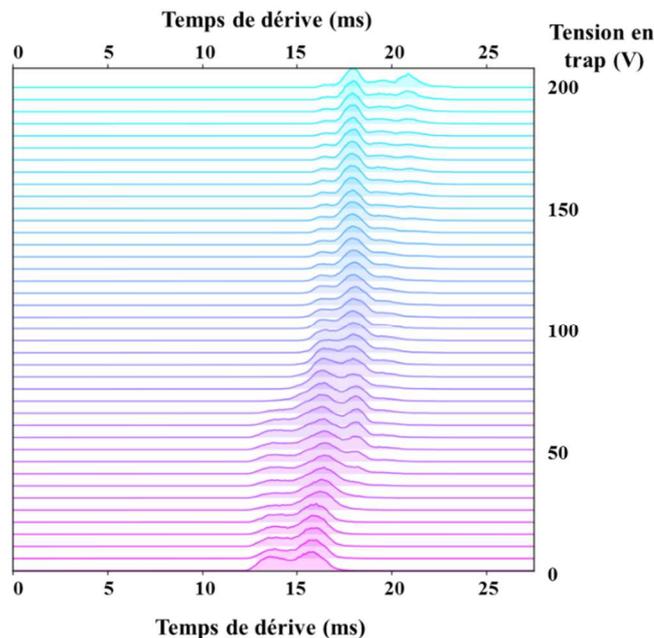


**Figure 15.** Représentation de l'interface CIUSuite2. La partie gauche est dédiée à l'extraction des ATDs, la partie centrale aux réglages des paramètres logiciels et la partie droite à la génération des résultats.

- **La suite logicielle Origami<sup>39</sup>.**

Il s'agit d'une suite logicielle *open-source* développée par le groupe du Dr. Perdita Barran<sup>39</sup> utilisant aussi le langage informatique Python. Son utilisation est facilitée grâce à la présence d'une interface graphique. Cette suite se divise en deux parties : la première, *ORIGAMI<sup>MS</sup>* permet l'acquisition automatique des sets d'expériences IM-MS à différentes tensions dans la cellule trap. Cette partie du logiciel permet de contrôler directement les paramètres d'acquisition et doit être installée sur le PC de l'instrument Synapt. Le choix du pas de la tension trap est un des paramètres modifiables et permet d'augmenter la résolution des résultats pour un temps d'analyse inférieur ( $\approx 23$  min pour des pas de 2 V) à une expérience CIU manuelle (1 heure environ pour des pas de 5V).

La seconde partie de la suite, *ORIGAMI<sup>ANALYSE</sup>* est dédiée au traitement des données CIU et ses possibilités sont relativement similaires à celles de la suite logicielle CIUSuite. Un mode de représentation 3D des données, appelé Waterfall (Figure 16), a été intégré dans ce logiciel et permet de visualiser en détails l'évolution du temps de dérive d'une espèce au cours de l'expérience CIU. Ce mode de représentation peut être utile pour rapidement observer l'absence ou la présence de transitions au cours d'une espèce analysée pour la première fois en CIU.



**Figure 16.** Mode de représentation *Waterfall* disponible sur Origami. De bas en haut, la tension trap est augmentée par pas de 5 V de 0 à 200 V permettant d'observer le dépliement progressif du trastuzumab déglycosylé.

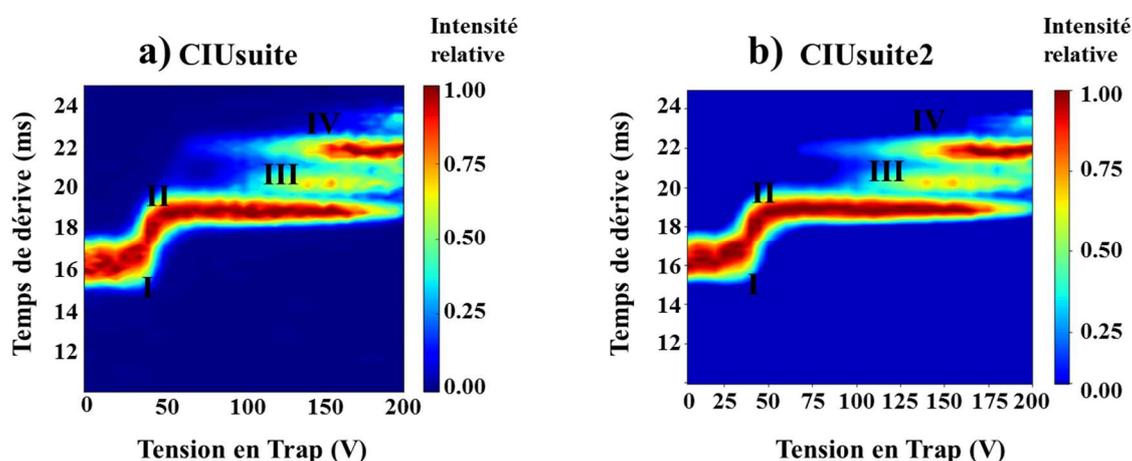
Une comparaison de ces trois logiciels est proposée en Tableau 3.

|                                 | CIUSuite | CIUSuite2 | Origami |
|---------------------------------|----------|-----------|---------|
| Automatisation de l'acquisition | -        | -         | +++     |
| Fonctionnalités                 | ++       | +++       | ++      |
| Facilité d'utilisation          | +        | +++       | ++      |

**Tableau 3.** Comparaison des logiciels dédiés à l'approche CIU basée sur l'expérience acquise durant ma thèse.

Bien que logiciel Origami ait été peu utilisé pendant ma thèse, l'automatisation de l'acquisition constitue un avantage important par rapport aux suites logicielles CIUSuite et CIUSuite2. De mon point de vue, les fonctionnalités de CIUSuite2 sont cependant supérieures pour le retraitement des données. C'est ce dernier outil logiciel et sa version antérieure qui ont majoritairement été utilisés durant ces travaux de thèse pour le traitement des données CIU.

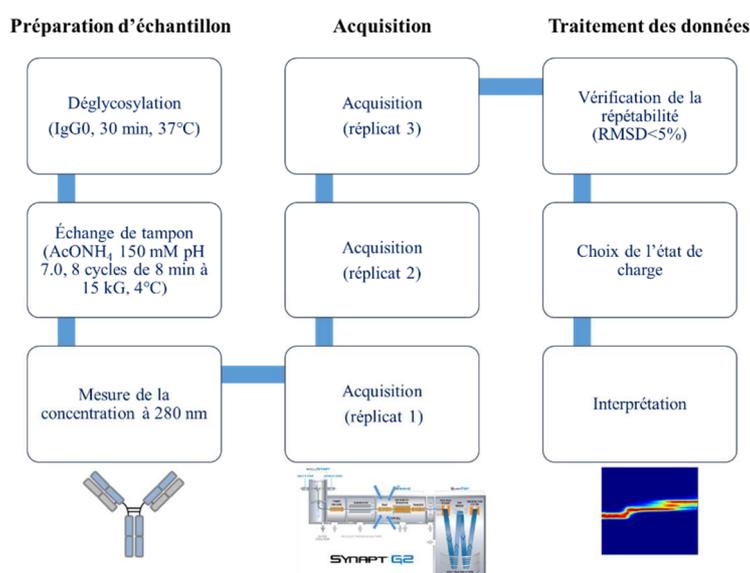
Un des avantages annoncés dans l'article décrivant la suite logicielle CIUSuite2<sup>38</sup> est la suppression d'une partie du bruit chimique. Afin d'observer cette amélioration, les mêmes données brutes ont été traitées en utilisant des paramètres de lissage identiques entre les deux logiciels (figure 17). Aucune différence majeure n'est observable entre les deux logiciels par l'utilisateur. Les conclusions tirées ne sont pas différentes (même nombre d'états conformationnels, largeur des temps de dérive identiques).



**Figure 17.** Comparaison de mêmes données brutes obtenues sur un anticorps entier déglycosylé (22+) sur les deux versions du logiciel CIU Suite : (a) CIUSuite et (b) CIUSuite2.

## 4. Conclusions

L'ensemble des résultats présentés ici permet de conclure que les expériences de CIU sont répétables et reproductibles (coefficient de variation <5%). L'optimisation et l'évaluation de nombreux paramètres instrumentaux comme l'état de charge, la sélection, la taille des pas et la tension appliquée en source ont permis de mettre en place au laboratoire un *workflow* pour la caractérisation CIU des anticorps monoclonaux (figure 18).



**Figure 18.** *Workflow* mis au point durant la thèse pour la caractérisation des mAbs par CIU.

Les logiciels dédiés aux retraitements de ces données spécifiques ont été installés et évalués. La majeure partie des données CIU de ce travail de thèse a été retraitée avec la suite logicielle CUISuite (disponible en 2015) qui a été intégrée sous la forme d'une interface (Galaxy, <https://iphc-galaxy.u-strasbg.fr>) pour un usage interne au laboratoire à destination des personnes débutantes en CIU et/ou en informatique. Les données du chapitre 4 ont été traitées à l'aide du logiciel CIUSuite2 lors de sa sortie en janvier 2019.

## 5. Valorisation

La mise en place de l'approche CIU et l'optimisation des paramètres associés ont été présentées lors de deux conférences.

### Communication orale:

Botzanowski, T., Hernandez-Alba, O., Cianférani, S. (2016) "Collision Induced Unfolding experiments for the characterization of mAbs" École Thématique CNRS, 17-20 octobre, Cabourg.

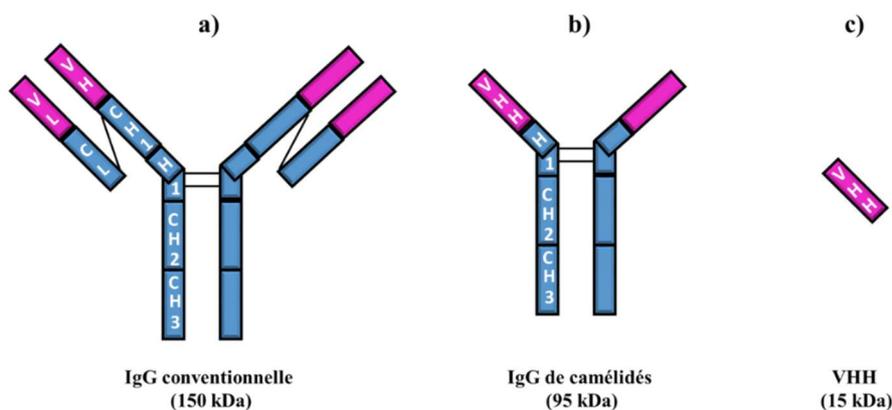
**Communication par affiche:**

Botzanowski T, Hernandez-Alba, O, Cianfèrani, S. (2018) “Assessment of collision induced unfolding experiments for protein characterization: the case of monoclonal antibodies” European Mass Spectrometry Conference, 11-15 mars, Saarbrücken (Allemagne).

## CHAPITRE 2: ÉTUDE DU VHH ANTI-HER2 PAR LC-MS, IM-MS NATIVE ET CIU.

### 1. Contexte de l'étude.

Les IgG conventionnelles (humaines, de souris, du lapin...) sont constituées de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères mais ce n'est pas le cas de tous les organismes<sup>40</sup>. Chez les camélidés<sup>41</sup>, les chaînes légères de certaines classes d'IgG sont absentes, les anticorps sont ainsi de plus petites tailles (environ 95 kDa) et composés uniquement de chaînes lourdes (HC). L'extrémité N-terminale des HC de l'anticorps, responsable de la fixation sélective de l'anticorps sur l'antigène, est appelée anticorps à domaine unique, VHH ou encore *nanobody*. C'est une petite entité d'environ 15 kDa (figure 19), récemment décrite comme une classe émergente de protéines thérapeutiques<sup>42</sup>. Le premier VHH commercialisé comme molécule thérapeutique, le caplacizumab (Ablynx), a été approuvé en 2018 par l'*European Medicines Agency* (EMA) pour le traitement d'une maladie rare<sup>43</sup>.



**Figure 19.** Représentation schématique d'une IgG conventionnelle (a), d'une IgG de camélidés (b) et d'un VHH (c).

Outre son utilisation potentielle comme protéine thérapeutique, ce type d'objet est aussi utilisé comme outil pour la purification et l'étude fonctionnelle de protéines cibles<sup>44</sup> et peut être particulièrement intéressant pour stabiliser des protéines instables comme les protéines membranaires<sup>45</sup>. Les avantages de ce morceau d'anticorps sont multiples : ils sont moins immunogènes, pénètrent mieux dans les tumeurs ciblées grâce à leurs petites tailles et sont moins chers à produire que les anticorps traditionnels<sup>46</sup> grâce à des rendements de production plus élevés. En effet, ils peuvent être exprimés chez les bactéries contrairement aux IgGs qui sont classiquement exprimées dans des cellules de mammifères pour lesquelles le rendement est techniquement limité. Parmi les systèmes de production

des VHHs, la levure *P. pastoris* a relativement peu été utilisée jusqu'à ce jour<sup>47-49</sup> mais a été récemment décrite comme un système intéressant pour la production de VHHs. Un rendement jusqu'à 6 fois plus élevé que celui obtenu chez *E. coli* a été rapporté pour la production d'un VHH dirigé contre la protéine neurotoxique AAhI présente chez le scorpion<sup>50</sup>. Outre la surexpression de VHHs, la synthèse chimique est un moyen alternatif de produire un *nanobody*<sup>51</sup> mais son utilisation pour des applications thérapeutiques ou d'imagerie est actuellement limitée à cause des faibles rendements de cette approche<sup>52</sup>.

Dans ce contexte, la comparaison des VHHs produits par ces différents systèmes paraît aujourd'hui indispensable et nécessite le développement d'outils analytiques innovants.

Les travaux présentés ici visent à caractériser des VHHs dirigés contre la protéine HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) qui est une protéine transmembranaire de 185 kDa impliquée dans le cancer du sein<sup>53</sup> et donc une cible de choix pour les laboratoires pharmaceutiques. Ces VHHs ont été produits à partir de trois sources différentes : par synthèse chimique, par surexpression chez *E. coli* et chez *P. pastoris*.

## 2. Objectifs de l'étude.

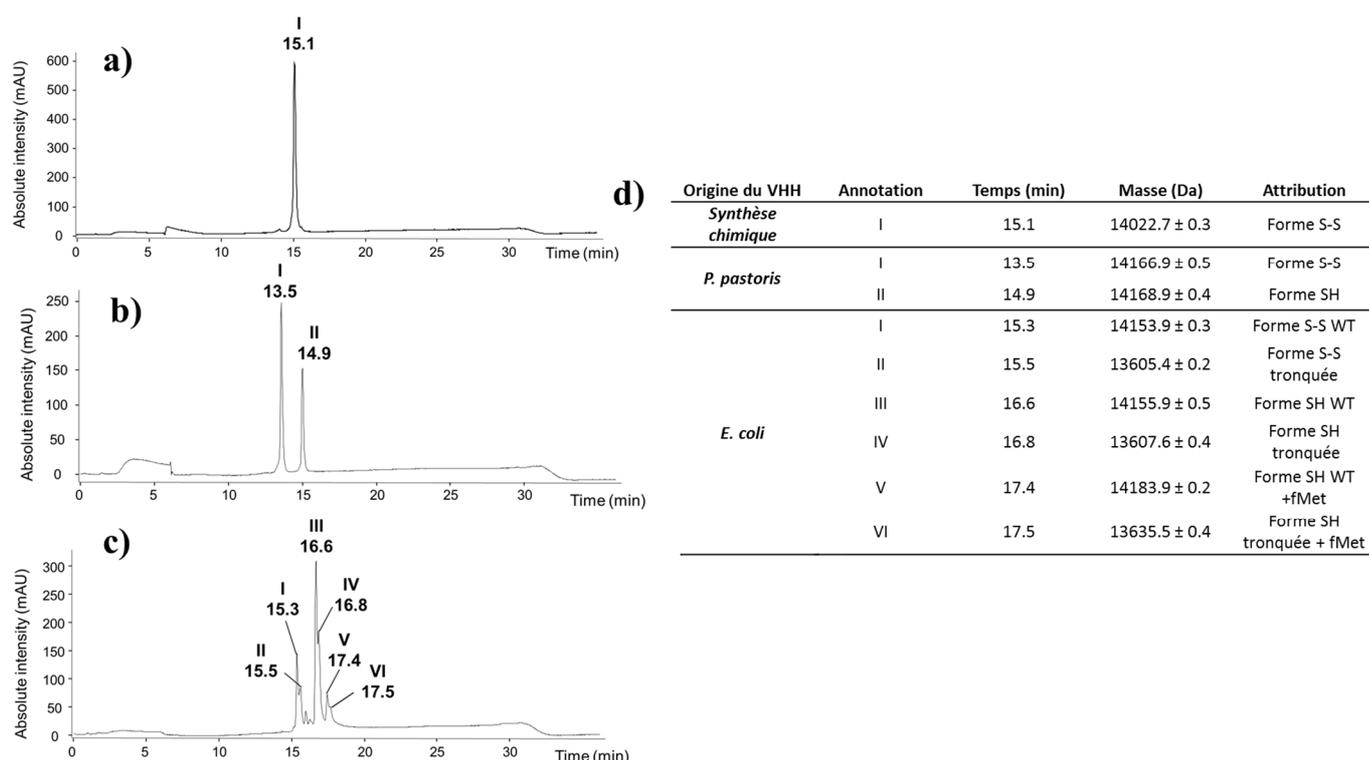
L'objectif des travaux présentés ici est de caractériser l'hétérogénéité/l'homogénéité moléculaire et conformationnelle de ces VHHs anti-HER2 par une combinaison d'approches basées sur la MS et l'IM-MS.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Renaud Wagner (IMPRESS, UMR 7242, Illkirch), l'entreprise Genepep et l'Institut de Recherches Servier.

## 3. Résumé des résultats.

L'hétérogénéité moléculaire des VHHs a été évaluée par LC-MS (figure 20). Ces résultats permettent de conclure que le VHH produit par synthèse chimique est homogène avec 100 % de pont S-S formé (seules 2 cystéines sont présentes sur la séquence, Tableau 4) avec un unique pic chromatographique (figure 20a, 15,1 min) dont la masse mesurée de l'espèce est de  $14022,7 \pm 0,3$  Da, en accord avec la masse attendue (14022,6 Da). Chez *P. pastoris*, le VHH est observé sous forme S-S (62%, figure 20b, 13,5 min) et sous forme SH (38%, figure 20b, 14,9 min) avec des masses respectives de  $14166,9 \pm 0,5$  Da (14166,7 Da) et  $14168,9 \pm 0,4$  (14168,7 Da). Le VHH anti-HER2 surexprimé chez *E. coli* est le VHH le plus hétérogène avec un minimum de six espèces détectées correspondant à des combinaisons de formes tronquées et formylées. Les deux premiers pics chromatographiques à 15,3 min et 15,5 min sont attribués respectivement à la forme S-S WT ( $14153,9 \pm 0,3$  Da vs 14153,8 Da) et à la forme S-S

tronquée côté C-terminal ( $13605,4 \pm 0,2$  Da vs  $13605,2$  Da pour la perte de 4 histidines). Les espèces correspondantes réduites sont observées à 16,6 min et 16,8 min avec des masses respectives de  $14155,9 \pm 0,5$  Da (vs  $14155,8$  Da) et  $13607,6 \pm 0,4$  Da (vs  $13607,2$  Da). De plus, ces espèces sont observées avec un ajout de masse de +28 Da à 17,4 min ( $14183,9 \pm 0,2$  Da vs  $14183,9$  Da) et 17,5 min ( $13635,5 \pm 0,4$  Da vs  $13635,2$  Da) pouvant correspondre à une formylation de la méthionine N-terminale. En effet, cette modification post-traductionnelle a déjà été décrite lors de la synthèse protéique chez les systèmes bactériens<sup>54</sup>. À partir des données LC-UV, le ratio de forme S-S chez *E.coli* est évalué à 32% contre 68 % pour la forme SH.

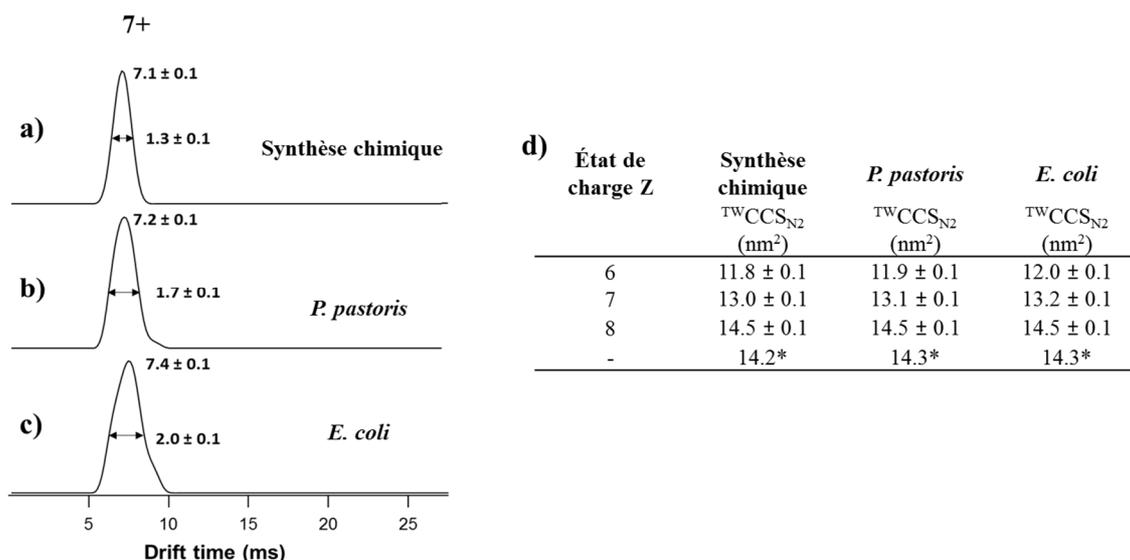


**Figure 20.** Évaluation de l'hétérogénéité moléculaire des VHH par LC-UV-MS (a, synthèse chimique, b, *P. pastoris* et c, *E. coli*). Les masses mesurées pour les différents pics chromatographiques (absorbance mesurée à 214 nm) sont présentées dans le tableau d. Les expériences ont été réalisées sur un système chromatographique Alliance 2695 (Waters, MA, USA) couplé au micrOTOF-Q (Bruker, Billerica, MA, USA). Un volume équivalent à 15 µg a été injecté sur une colonne C4 Xbridge BEH300, 2,1 x 150 mm, 3,5 µm thermostatée à 60°C. Conditions chromatographiques : 1°) gradient : augmentation de la proportion d'ACN de 20 à 60 % en 20 min, 2°) lavage de la colonne : 2 min à 90 % d'ACN, 3°) rééquilibration à 20% en ACN pendant 15 min. Les conditions chromatographiques ont été mises au point par le Dr. Jean-Marc Strub.

| Origine du VHH     | Séquence  | Taille | Masse théorique (Da) |
|--------------------|---|--------|----------------------|
| <i>E. coli</i>     | MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALG<br>WYRQSPGKQREMVASINSGGTTNYADSVKGRFTISR<br>DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFID<br>NNYWGGGTQVTVSSHHHHHH  | 127 AA | 14155.8 Da           |
| <i>P. pastoris</i> | GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALG<br>WYRQSPGKQREMVASINSGGTTNYADSVKGRFTISR<br>DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFID<br>NNYWGGGTQVTVSSHHHHHH | 128 AA | 14168.7 Da           |
| Synthèse chimique  | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGW<br>YRQSPGKQREMVASINSGGTTNYADSVKGRFTISR<br>NAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDN<br>NYWGQGTQVTVSSHHHHHH    | 126 AA | 14024.6 Da           |

**Tableau 4.** Séquence en acide aminés et masse théorique associée de chaque VHH anti-HER2. Les cystéines sont annotées en gras sur les séquences.

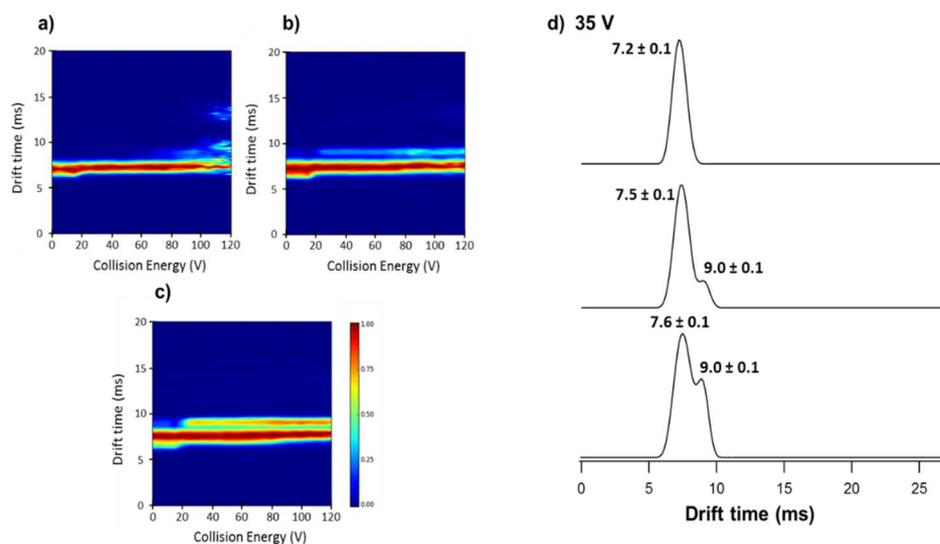
Afin de caractériser l'hétérogénéité conformationnelle de chaque VHH, j'ai réalisé des expériences de mobilité ionique en conditions natives (sans séparation chromatographique). En effet, cette technique a déjà été utilisée par le passé pour évaluer l'homogénéité/l'hétérogénéité conformationnelle de protéines<sup>26-27, 55-56</sup>. Pour cela, j'ai remplacé le tampon de stockage de chaque protéine par un tampon AcONH<sub>4</sub> 150 mM pH 7,4 à l'aide de deux mini colonnes de gel filtration (*Zeba™ Spin Desalting Columns*) avec un seuil de coupure de 7 kDa et un volume total de 0,5 mL. Les ATDs mesurées pour l'état de charge 7+ de chaque VHH présentent des largeurs à mi-hauteur significativement différentes (figure 21a-c). Concernant le VHH produit par synthèse chimique, l'ATD observée est gaussienne avec une largeur à mi-hauteur de  $1,3 \pm 0,1$  ms contre  $1,7 \pm 0,1$  ms et  $2,0 \pm 0,1$  ms respectivement pour les VHHs *P. pastoris* et *E. coli* suggérant une plus grande hétérogénéité conformationnelle pour ces deux derniers. Les CCS calculées dans ces conditions permettent de conclure que la conformation globale du VHH est similaire quelle que soit son origine. En effet, aucune différence significative n'est observée entre ces trois VHHs (figure 21d) :  $13,0 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> (synthèse chimique),  $13,1 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> (*P. pastoris*) et  $13,2 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> (*E. coli*). De manière intéressante, les CCS des états de charges 8+ sont en bonne corrélation ( $14,5 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> pour chaque VHH) avec les CCS prédites à partir de la masse ( $14,2$ - $14,3$  nm<sup>2</sup>) suggérant une conformation globale assimilable à une protéine globulaire du VHH anti-HER2.



**Figure 21.** Caractérisation conformationnelle des VHHs à 10  $\mu$ M en conditions natives. Les distributions de temps d'arrivés (ATDs) des VHHs (7+, formes S-S et S-H) sont présentées (a, synthèse chimique ; b, *P.pastoris* et c, *E.coli*) avec la valeur moyenne (triplicata analytique) du temps de dérive mesuré et la largeur à mi-hauteur associée. Les paramètres instrumentaux MS sont Vc : 20 V, trap gas : 5 mL/min, trap CV : 4V et Pi : 6 mbar afin de minimiser l'activation et favoriser la transmission des ions. Les paramètres IM-MS utilisés sont QHe/QN2 : 120/30 (mL/min), WH : 30 V et WV : 1000 m/s. Les <sup>TW</sup>CCS<sub>N<sub>2</sub></sub> calculées en utilisant la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\approx$ 18 kDa) comme étalon<sup>34</sup> sont résumées dans le tableau d pour chaque état de charge. Les valeurs de CCS estimées à partir de la masse des VHHs sont annotées avec une astérisque et ont été calculées à partir de l'équation  $CCS = 2,435 \times (M)^{(2/3)}$ <sup>57</sup>.

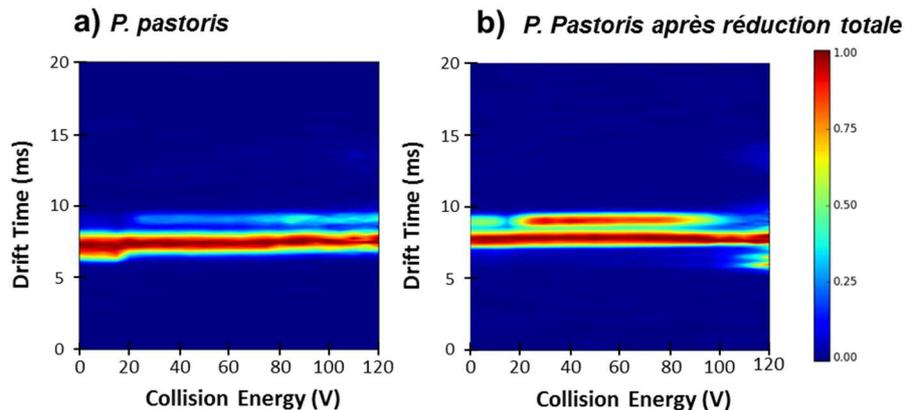
Afin d'élucider la présence d'états conformationnels distincts, j'ai ensuite réalisé des expériences de CIU sur chaque VHH par pas de 5 V de 0 à 120 V d'une durée d'une minute (au-delà de 120 V, l'intensité du signal était trop faible) en utilisant la méthode IM décrite précédemment (figure 21). Les cartes CIU de l'état de charge 7+ ont ensuite été traitées avec le logiciel CIUsuite<sup>37</sup> décrit en chapitre 1. Le VHH anti-HER2 produit par synthèse chimique, 100 % sous forme S-S d'après les données LC-MS, présente une seule espèce conformationnelle sur la gamme de trap CV étudiée (figure 22a). À l'inverse, les deux autres VHHs, présentant un mélange S-S et S-H d'après les données LC-MS, présentent une espèce conformationnelle supplémentaire plus étendue (avec un temps de dérive de 9,0 ms, figure 22d) que la première lors de leur activation en phase gazeuse (figure 22b, *P. Pastoris* et figure 22c, *E.coli*). Chez *P.pastoris* cette seconde conformation correspond à une CCS de  $14,9 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> (contre  $15,0 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> chez *E.coli*) soit une augmentation de 11,4% par rapport à l'état initial et est attribuée à la présence de la forme S-H (non présente dans le VHH synthèse chimique). Pour appuyer cette hypothèse, j'ai comparé les ratios des formes S-S et S-H obtenues en LC-UV et les ratios 1<sup>ère</sup> espèce/2<sup>nde</sup> espèce obtenus en CIU. Pour l'échantillon synthèse chimique, la forme S-H n'est pas

observée en LC-UV (0%) et la conformation étendue n'est pas observée en CIU (0%). Concernant le VHH *P.pastoris*, 38% de forme S-H est observé en LC-UV et le pourcentage de seconde espèce en CIU est évalué à 17%. Pour le VHH surexprimé chez *E. coli*, le pourcentage de forme S-H observé en LC-UV est 68% alors que le pourcentage de seconde espèce évalué par CIU est de 39%. Bien que ces ratios soient de manière absolue différents entre les deux approches, on peut clairement observer une tendance à l'augmentation de la seconde conformation observée en CIU en fonction de l'augmentation de la proportion de forme S-H observée en LC-UV.



**Figure 22.** Expériences CIU réalisées sur l'état de charge 7+ des VHHs (a, synthèse chimique ; b, *P.pastoris* et c, *E.coli*). Les distributions de temps d'arrivés à trap CV : 35 V sont représentées en d (haut, synthèse chimique, milieu, *P.pastoris*, bas, *E. coli*).

Afin de confirmer l'origine de cette seconde conformation, le VHH anti-HER2 surexprimé chez *P. pastoris* a été réduit entièrement (100 mM TCEP à 57°C pendant 60 min) puis l'expérience CIU a été reproduite dans les mêmes conditions (figure 23). Après réduction totale du pont S-S, la seconde espèce est plus intense prouvant ainsi que cette seconde conformation est due à l'absence du pont S-S. Nous pouvons remarquer que la première conformation correspondant à l'état initial est également présente montrant ainsi la présence d'un équilibre conformationnel. Cet équilibre peut expliquer la sous-estimation de la proportion absolue de forme S-H en CIU. Outre la possibilité de différencier en conditions natives la présence d'une forme S-S et d'une forme SH, la CIU a permis de mettre en lumière le rôle stabilisateur du pont S-S en phase gazeuse.



**Figure 23.** Expériences CIU réalisées sur l'état de charge 7+ du VHH anti-HER2 *P. pastoris* avant (a) et après réduction totale (b).

#### 4. Conclusions.

Ce travail a permis de mettre en évidence :

- L'expression du VHH dans *E. coli* génère un VHH hétérogène, à l'inverse de la synthèse chimique qui a permis d'obtenir un VHH très homogène avec un pont S-S formé à 100%. *P. pastoris* a permis d'exprimer un VHH d'hétérogénéité intermédiaire entre ces deux systèmes et peut être considéré comme un système viable pour l'expression de tels objets car bien que son rendement soit inférieur à celui de *E. coli* son coût reste très en deçà du coût de production du même VHH par synthèse chimique.
- Les expériences de résonance plasmonique de surface (réalisées par Lucie Hartmann chez IMPRESS, UMR7242, Illkirch) ont montré que la fixation de ce VHH sur l'antigène de HER2 était identique ( $K_D \approx 2$  nM) quel que ce soit le système de production utilisé.
- Au niveau de la caractérisation par IM-MS, l'utilisation de la CIU a permis de montrer clairement le rôle stabilisateur du pont disulfure sur la conformation du VHH. Cette approche permet de différencier la présence ou l'absence d'un pont S-S en conditions natives et peut être utilisée comme une technique complémentaire à la LC-MS.

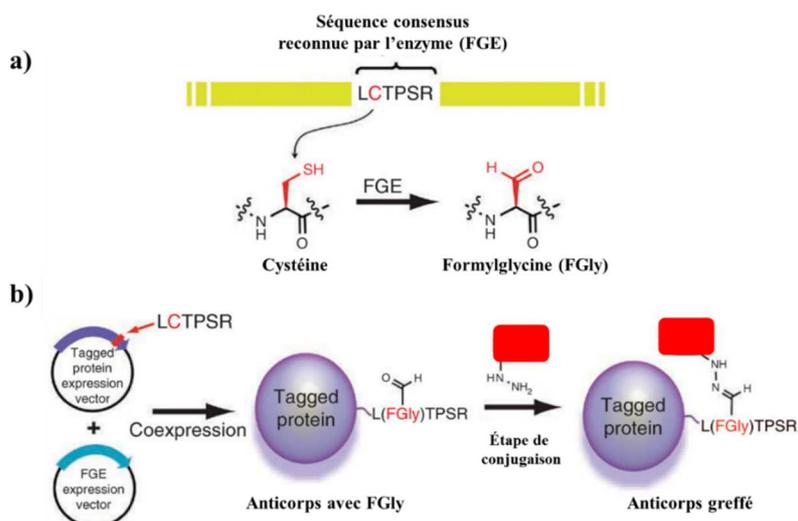
#### 5. Valorisation.

L'étude présentée dans ce chapitre est actuellement en cours de rédaction.

# CHAPITRE 3 : APPLICATION DE LA CIU À LA CARACTÉRISATION D'UN ANTICORPS IMMUNOCONJUGUÉ SITE SPÉCIFIQUE.

## 1. Contexte de l'étude.

Récemment, l'avènement de nouvelles stratégies de chimie de couplage comme l'insertion d'acides aminés non naturels dans la séquence du mAb<sup>15</sup> ou l'utilisation d'enzymes spécifiques<sup>16</sup> a permis le développement d'ADCs appelés site spécifiques. Le nombre et la localisation des drogues sont ainsi mieux maîtrisés<sup>58</sup> en comparaison avec les ADCs de première génération<sup>11-12, 25, 59</sup>. L'utilisation d'une enzyme, coexprimée avec l'anticorps à greffer, reconnaissant spécifiquement une séquence consensus de 5 acides aminés contenant une cystéine, a été décrite comme une méthode appropriée pour la conjugaison dirigée de cystéines sur la séquence d'un anticorps préalablement modifiée<sup>60</sup>. Cette enzyme permet de transformer uniquement la cystéine présente sur le motif consensus en formylglycine sans réduction des ponts disulfures inter-chaînes (figure 24).

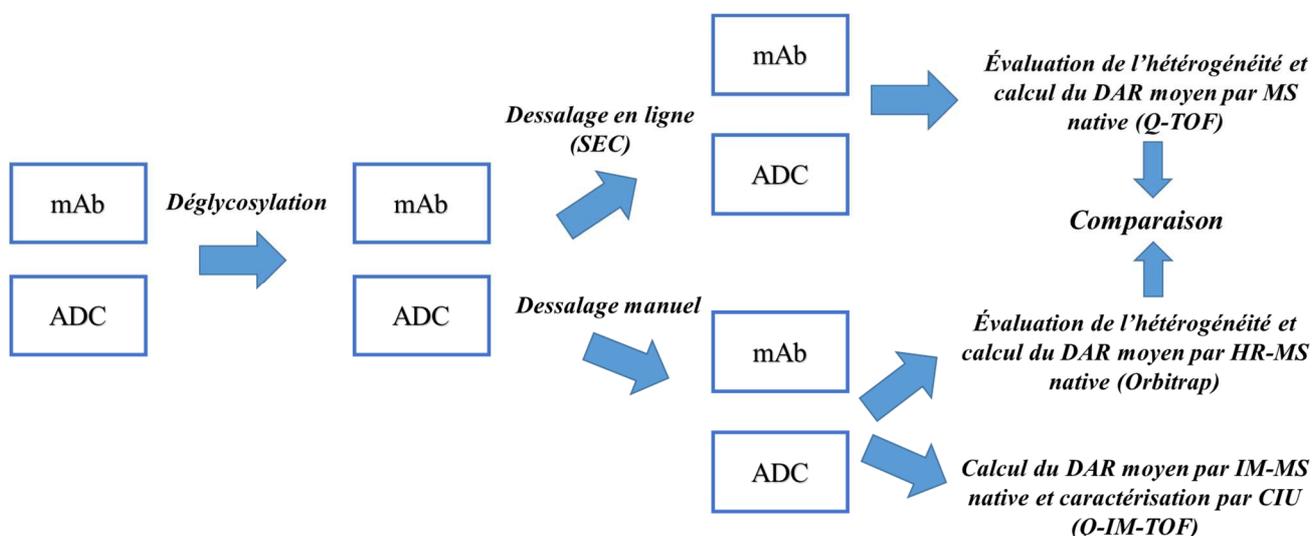


**Figure 24.** Représentation schématique de la reconnaissance de la séquence consensus par l'enzyme (FGE : *FormylGlycine Enzyme*) pour la conversion de la cystéine en formylglycine (a) puis le greffage de la drogue en utilisant la fonction aldéhyde apportée (b), modifiée de<sup>60</sup>.

## 2. Objectifs de l'étude.

C'est dans ce contexte, que nous avons caractérisé l'homogénéité/hétérogénéité d'un ADC site spécifique, le CBW-03-106 et son mAb parent par des approches de MS native et IM-MS.

Ce travail de caractérisation, a été initié avec l'équipe du Dr. Penelope Drake (Catalent Biologics, États-Unis) et l'équipe du Dr. Alain Beck (Centre d'Immunologie Pierre-Fabre, France).



**Figure 25.** Description du *workflow* analytique mis en œuvre.

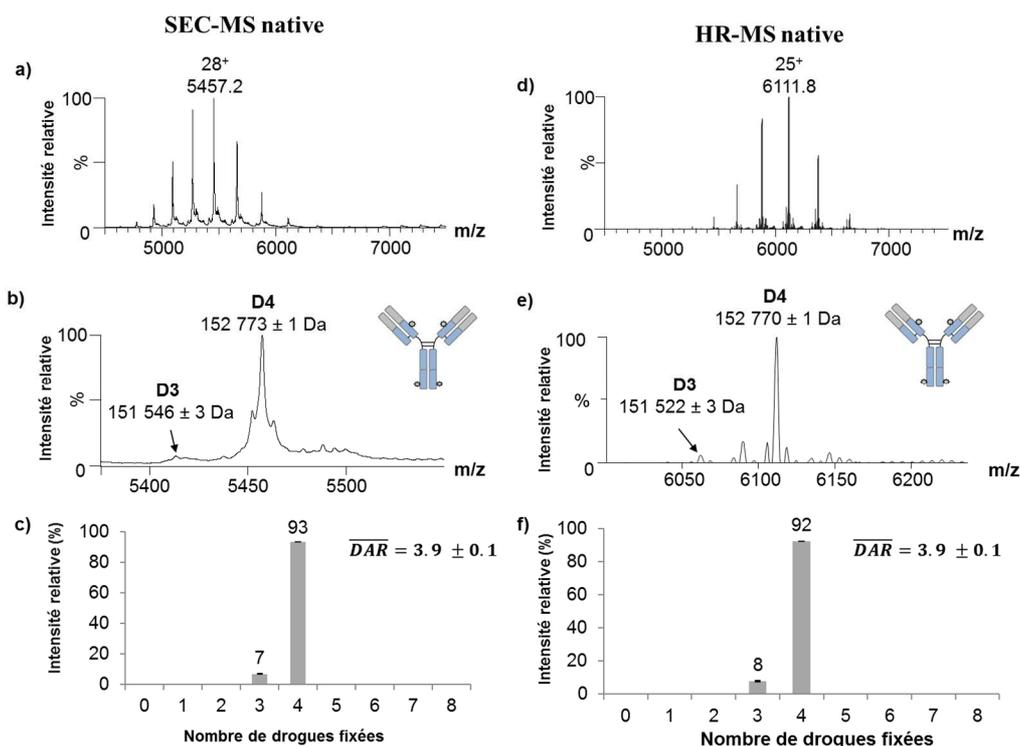
### 3. Résumé des résultats.

#### 3.1. Caractérisation d'un ADC site spécifique et son mAb parent par MS native.

L'ADC site spécifique a été caractérisé par SEC-MS native (Synapt G2, Q-TOF) et HR-MS native (Exactive Plus EMR, Orbitrap) afin d'évaluer son hétérogénéité (figure 26). Les spectres de masse obtenus permettent de mettre en évidence la haute homogénéité de l'ADC avec une proportion de D4 (mAb greffé avec 4 drogues) supérieure à 90 % (masses expérimentales :  $152\,773 \pm 1$  Da en SEC-MS native et  $152\,770 \pm 1$  Da en HR-MS native vs masse théorique : 152 771 Da) et une proportion de D3 inférieure à 10 % (masses expérimentales  $151\,546 \pm 3$  Da en SEC-MS native et  $151\,552 \pm 3$  Da vs masse théorique : 151 553 Da). Les intensités mesurées sur les différents états de charge observés ont permis le calcul du  $DAR_{av}$  selon l'équation suivante :

$$DAR_{av} = \frac{\sum_{k=0}^8 k * intensity\ DAR_k}{\sum_{k=0}^8 intensity\ DAR_k}$$

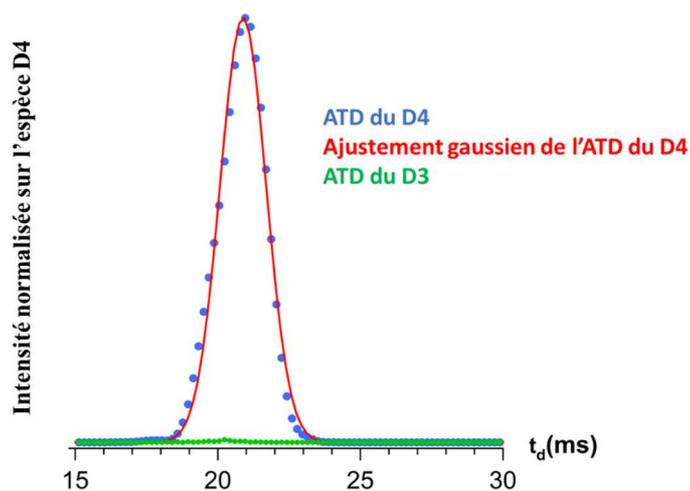
avec k, le nombre de drogues fixées. Les  $DAR_{av}$  ainsi calculés sont identiques par les deux approches  $3,9 \pm 0,1$  (SEC-MS native) et  $3,9 \pm 0,1$  (HR-MS native).



**Figure 26.** Caractérisation de l'ADC site spécifique par SEC-MS native (a, spectres de masse obtenus en conditions natives ; b, zoom sur l'état de charge 28+ ; c, histogramme représentant la proportion de drogue fixée) et HR-MS native (d, spectres de masse obtenus en conditions natives ; e, zoom sur l'état de charge 25+ ; f, histogramme représentant la proportion de drogue fixée). L'ADC site spécifique et l'anticorps parent ont été déglycosylés avant l'analyse.

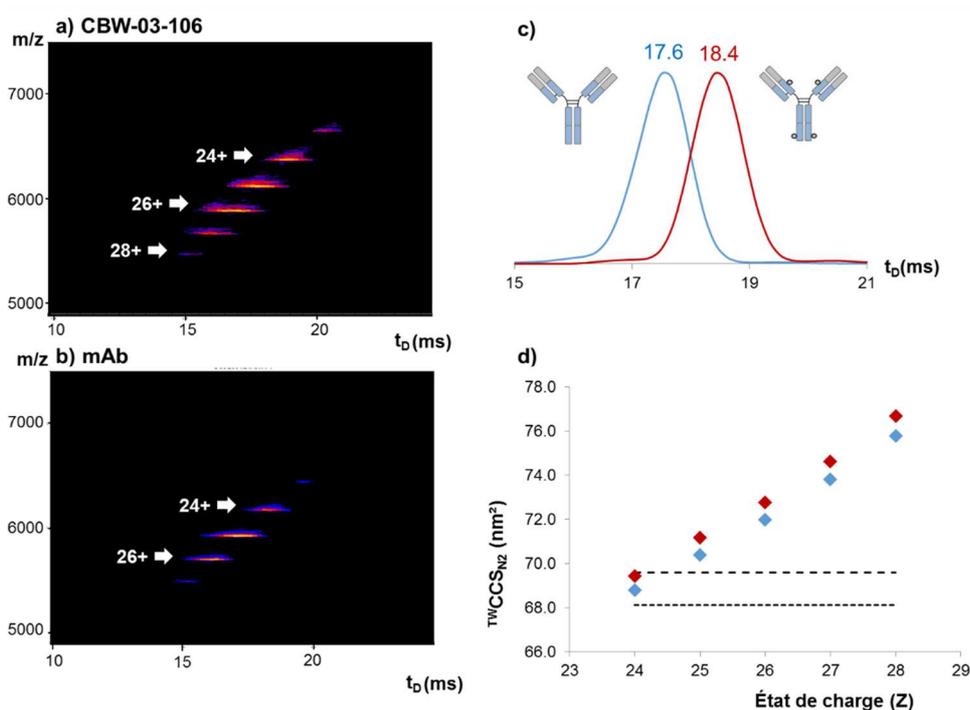
### 3.2. Capacité de caractérisation et de quantification des espèces Dn associées à un ADC site spécifique par native IM-MS.

Les travaux précédents du laboratoire<sup>11-12</sup> ont montré la possibilité de calculer également le nombre moyen de drogues par IM-MS native en se basant sur les intensités des ATDs mesurées pour les espèces Dn. J'ai alors réalisé la même approche sur l'ADC site-spécifique (figure 27). L'ATD de l'état de charge 24+ D4 est détectée avec une intensité de 1000 coups environ alors que l'ATD du même état de charge de l'espèce D3 n'est pas observée (c'est également le cas pour les autres états de charge, données non montrées). Le DARav ainsi calculé est donc de 4,0. Cette perte de sensibilité entre MS native et IM-MS native a déjà été décrite par le passé<sup>61</sup> et peut être imputée à la présence des gaz nécessaires pour la séparation IM-MS.



**Figure 27.** Évaluation du DARav par IM-MS native. Les ATDs des espèces D4 et D3 (25+) sont respectivement représentées en bleu et vert. L'ajustement gaussien réalisé sur l'ATD du D4 est représenté en rouge.

Ensuite, j'ai vérifié la séparation de l'espèce D4 de l'ADC site spécifique avec son mAb parent par IM-MS (figure 28). Ainsi, une différence de 0,8 ms est observée sur l'état de charge 24+ entre l'ADC site spécifique CBW-03-106 et son anticorps parent soit 0,2 ms pour chaque drogue fixée correspondant à une augmentation en CCS de 0,15 nm<sup>2</sup>.

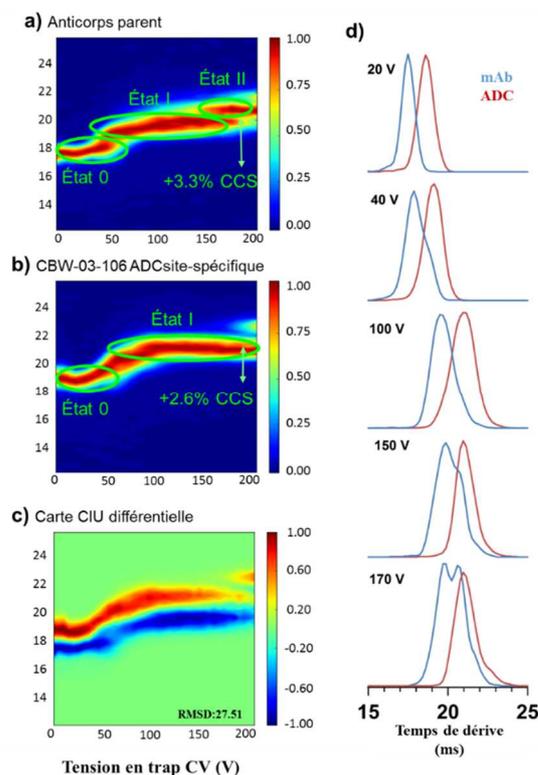


**Figure 28.** Caractérisation conformationnelle de l'ADC site spécifique CBW-03-106 et de son mAb parent. L'homogénéité des échantillons est visible sur la représentation *driftscope* (a, ADC site spécifique CBW-03-106 en rouge; b, mAb parent en bleu). Séparation des ATDs du mAb parent et de son ADC site spécifique (c). Évolution des CCS des deux espèces en fonction de l'état de charge Z, en rouge les CCS de l'ADC et en bleu les CCS du mAb. Les valeurs de CCS estimées à partir de la masse des deux espèces sont représentés par des

lignes (ligne supérieure : ADC, ligne inférieure mAb) et ont été calculées à partir de l'équation  $CCS = 2,435 \times (M)^{(2/3)^{57}}$  (d).

### **3.3. Apport de la CIU pour la caractérisation conformationnelle d'un ADC site spécifique et de son mAb parent.**

Afin de caractériser le déploiement protéique de ces deux espèces, des expériences CIU ont été réalisées selon le même protocole présenté en chapitre 1. Les cartes CIU ainsi obtenues permettent d'observer une grande différence entre l'ADC site spécifique et son mAb ( $CV > 27\%$ , figure 29c). Trois états conformationnels sont observés sur l'anticorps parent (annotés état 0, état I et état II, figure 29a) contre 2 sur l'ADC site spécifique (annotés état 0 et état I, figure 29b). Concernant l'anticorps parent, la première transition de l'état 0 vers l'état I a lieu entre 40 et 75 V puis l'état I « survit » jusqu'à une tension de 100 V où son ATD commence à s'élargir jusqu'à 150 V. Sur la gamme de trap CV 150-200 V (figure 29d), un troisième état conformationnel plus étendu est observé (figure 29d), cet état correspond à une augmentation de 3,3 % de la CCS en comparaison avec l'état initial (état 0). Concernant l'ADC site spécifique, l'état initial (état 0, figure 29b) a une ATD supérieure au mAb d'environ 1 ms, cette différence peut être due à l'augmentation de masse générée par la fixation des 4 drogues. Cet état conformationnel est progressivement déstructuré jusqu'à l'état I de trap CV 40 à 100 V puis reste stable jusqu'à 190 V. La différence de CCS entre l'état I et l'état initial 0 est d'environ +2,6 %, traduisant ainsi une déstructuration moins forte de l'ADC en comparaison avec le mAb parent (3,3 %).



**Figure 29.** Comparaison de la stabilité conformationnelle de l'ADC site spécifique (b) et de son anticorps parent (a) par CIU (état de charge 24+). La carte différentielle de l'ADC par le mAb est représentée en (c), en rouge l'ADC et en bleu le mAb. Les ATDs (24+) de l'ADC site spécifique et de son mAb parent sont respectivement représentées en rouge et bleu à différentes valeurs de trap CV en d.

#### 4. Conclusions.

Ici, pour la première fois la mobilité ionique a montré ses potentialités pour la caractérisation d'un anticorps site spécifique et a permis d'évaluer l'augmentation de la CCS induite par la fixation des drogues. D'autre part, l'approche CIU a permis de montrer que l'anticorps site spécifique résiste mieux à la déstructuration en phase gazeuse en comparaison avec son anticorps monoclonal parent, montrant ainsi un effet stabilisateur de la fixation des drogues<sup>13</sup>.

#### 5. Valorisation.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet des communications suivantes :

##### Publication:

Botzanowski T\*, Erb S\*, Hernandez-Alba O, Ehkirch A, Colas O, Wagner-Rousset E, Rabuka D, Beck A, M Drake P, Sanglier-Cianferani S. Insights from native mass spectrometry approaches for top- and

middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *mAbs* (2017), 9, 801-811 (couverture). *D.O.I.: 10.1080/19420862.2017.1316914*

\*contribution équivalente de deux auteurs.

### **Communications orales:**

Botzanowski, T., Erb, S., Hernandez-Alba, O., Ehkirch, A., Colas, O., Wagner-Rousset, E., Rabuka, D., Beck, A., Drake, P., Cianferani S. (2017) “Caractérisation d’anticorps immunoconjugués site spécifiques par spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique” Club Jeune de la Société Française Spectrométrie de Masse (CJSFSM), 23 mars, Trélon.

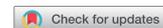
Botzanowski, T., Erb, S., Hernandez-Alba, O., Ehkirch, A., Colas, O., Wagner-Rousset, E., Rabuka, D., Beck, A., Drake, P., Cianferani S. (2017) “Characterization of site specific ADCs by Ion Mobility-Mass Spectrometry” Journée des Doctorants, École Doctorale des Sciences Chimiques, 10 novembre, Strasbourg.

### **Communications par affiche:**

Botzanowski T, Erb S, Hernandez-Alba O, Ehkrich A, Colas O, Rabuka D, Beck A, Drake P, Cianférani, S. (2017) “Insights from native mass spectrometry approaches for top and middle characterization of site-specific antibody-drug conjugates” American Society Mass Spectrometry Conference, 04-08 juin, Indianapolis (États-Unis).

Botzanowski T, Erb S, Hernandez-Alba O, Ehkrich A, Colas O, Rabuka D, Beck A, Drake P, Cianférani, S. (2017) “Insights from native mass spectrometry approaches for top and middle characterization of site-specific antibody-drug conjugates”, Société de Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique Conférence, 02-05 octobre, Paris (France).

REPORT



## Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates

Thomas Botzanowski<sup>a,\*</sup>, Stéphane Erb<sup>a,\*</sup>, Oscar Hernandez-Alba<sup>a</sup>, Anthony Etkirch<sup>a</sup>, Olivier Colas<sup>b</sup>, Elsa Wagner-Rousset<sup>b</sup>, David Rabuka<sup>c</sup>, Alain Beck<sup>b</sup>, Penelope M. Drake<sup>c</sup>, and Sarah Cianféroni<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, Strasbourg, France; <sup>b</sup>Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF), Saint-Julien-en-Genevois, France; <sup>c</sup>Catalent Biologics West, Emeryville, CA, USA

### ABSTRACT

Antibody-drug conjugates (ADCs) have emerged as a family of compounds with promise as efficient immunotherapies. First-generation ADCs were generated mostly via reactions on either lysine side-chain amines or cysteine thiol groups after reduction of the interchain disulfide bonds, resulting in heterogeneous populations with a variable number of drug loads per antibody. To control the position and the number of drug loads, new conjugation strategies aiming at the generation of more homogeneous site-specific conjugates have been developed. We report here the first multi-level characterization of a site-specific ADC by state-of-the-art mass spectrometry (MS) methods, including native MS and its hyphenation to ion mobility (IM-MS). We demonstrate the versatility of native MS methodologies for site-specific ADC analysis, with the unique ability to provide several critical quality attributes within one single run, along with a direct snapshot of ADC homogeneity/heterogeneity without extensive data interpretation. The capabilities of native IM-MS to directly access site-specific ADC conformational information are also highlighted. Finally, the potential of these techniques for assessing an ADC's heterogeneity/homogeneity is illustrated by comparing the analytical characterization of a site-specific DAR4 ADC to that of first-generation ADCs. Altogether, our results highlight the compatibility, versatility, and benefits of native MS approaches for the analytical characterization of all types of ADCs, including site-specific conjugates. Thus, we envision integrating native MS and IM-MS approaches, even in their latest state-of-the-art forms, into workflows that benchmark bioconjugation strategies.

**Abbreviations:** mAb, monoclonal antibody; ADC, antibody-drug conjugate; IM-MS, ion mobility-mass spectrometry; MS, mass spectrometry; DAR, drug-to-antibody ratio; fGly, formylglycine; FGE, formylglycine-generating enzyme; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine; LC, light chain; HC, heavy chain; HPLC, high performance liquid chromatography; IdeS, immunoglobulin degrading enzyme from *Streptococcus pyogenes*; Fc, fragment crystallizable; SEC, size exclusion chromatography; Q-TOF, quadrupole-time-of-flight; ATD, arrival time distribution; CIU, collision induced unfolding; CCS, collision cross-section; IM, ion mobility; TFA, trifluoroacetic acid

### ARTICLE HISTORY

Received 3 February 2017  
Revised 24 March 2017  
Accepted 31 March 2017

### KEYWORDS

Antibody-drug conjugate (ADC); ion mobility-mass spectrometry (IM-MS); middle level; native mass spectrometry; site-specific bioconjugation; top level

## Introduction

With advances in protein engineering technologies, monoclonal antibodies (mAbs) and their derivatives have emerged as the largest drug class in human therapeutics.<sup>1,2</sup> For oncology therapy, however, first-generation mAbs are often inefficient or encounter disease resistance. To overcome these limitations, several families of armed antibodies have been developed, among which antibody-drug conjugates (ADCs)<sup>3</sup> have so far proved the most successful, with 2 drugs currently on the market (Adcetris<sup>®</sup> and Kadcyla<sup>®</sup>). Typically, ADCs are ~154 kDa tripartite molecules comprising a recombinant mAb, which specifically targets the cancer cell, attached to a highly cytotoxic drug (payload) that inhibits cancer cell growth. The payload and antibody are connected via a synthetic linker (cleavable or non-cleavable) that covalently links the drug to the mAb.

ADCs in development target a wide range of cancers.<sup>4</sup> Many of these new compounds have emerged from a better understanding of structure-function relationships, which have been achieved in large part thanks to state-of-the-art mass spectrometry (MS) methods,<sup>5</sup> as well as lessons learned from pharmaceutical and clinical developments.<sup>6</sup>

ADC development directly benefits from the intense exploration of new conjugation techniques.<sup>7</sup> For first-generation ADCs, drug conjugation is most frequently achieved *via* reactions on either lysine side-chain amines or cysteine thiol groups after reduction of the interchain disulfide bonds.<sup>8</sup> These approaches result in heterogeneous mixtures containing average drug-to-antibody ratios (DARs) ranging from zero to 8, as illustrated by the 2 marketed ADCs (Adcetris<sup>®</sup> and

**CONTACT** Sarah Cianféroni  [sarah.cianferani@unistra.fr](mailto:sarah.cianferani@unistra.fr)  LSMBO, Institut Pluridisciplinaire Hubert CURIEN (IPHC), ECPM Batiment R5-0, 25, Rue Becquerel, Strasbourg, Alsace 67087, France.

\*These authors equally contributed to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#).

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

Kadcyla<sup>®</sup>, cysteine- and lysine-conjugates, respectively). One main concern with these first-generation ADCs stems from the complexity of the randomly-conjugated product, because each DAR species has the potential to exhibit different toxicities and properties relating to the absorption, distribution, metabolism, and excretion of the molecules.<sup>9</sup> Thus, second-generation technologies have moved toward producing more homogeneous and monodisperse ADCs by using site-specific conjugation. A number of site-specific bioconjugation strategies have been reported.<sup>10,11</sup> These include the addition of engineered cysteine residues at specific sites without disruption of the interchain disulfide bonds,<sup>12</sup> the addition of engineered peptide tags recognized by microbial transglutaminases to specifically transamidate amine-containing drug linkers attached to glutamine residues,<sup>13,14</sup> the insertion of unnatural amino acids into the primary sequence of mAbs to provide a chemical handle for bioconjugation,<sup>15,16</sup> and the development of new heterobifunctional reagents that facilitate the production of more stable ADCs.<sup>17,18</sup> To our knowledge, 8 of these next-generation ADCs have reached the stage of clinical trials (phase 1 to 3)<sup>19</sup> and have shown an improved therapeutic index in preclinical toxicology studies.<sup>20</sup> Such site-specific conjugation technologies are also used for antibody antibiotic conjugates,<sup>21</sup> bispecific ADCs<sup>22</sup> and antibody dual drug conjugates.<sup>23</sup>

Here, we report the analytical characterization, using native mass spectrometry approaches, of a site-specific DAR4 ADC generated through aldehyde-specific bioconjugation (Fig. 1).<sup>24–26</sup> Briefly, the formylglycine (fGly) amino acid residue is produced through the highly selective oxidation of a cysteine residue found within a specific pentapeptide consensus sequence by formylglycine-generating enzyme (FGE).<sup>27,28</sup> The fGly-containing protein is then further modified using aldehyde-specific chemistries.<sup>25,29</sup> ADCs generated using these methods possess increased therapeutic indices and increased therapeutic activities.<sup>11,30,39,40</sup>

The development and optimization of ADCs rely on improving their analytical and bioanalytical characterization by assessing several critical quality attributes, namely the distribution and position of the drug, the amount of naked antibody, the average DAR, and the residual drug-linker and related product proportions. A large number of orthogonal analytical and bioanalytical methods, often based on state-of-the-art chromatographic, electrophoretic, and mass spectrometric techniques, are needed for the characterization of ADCs at multiple levels (intact, middle and top).<sup>5</sup>

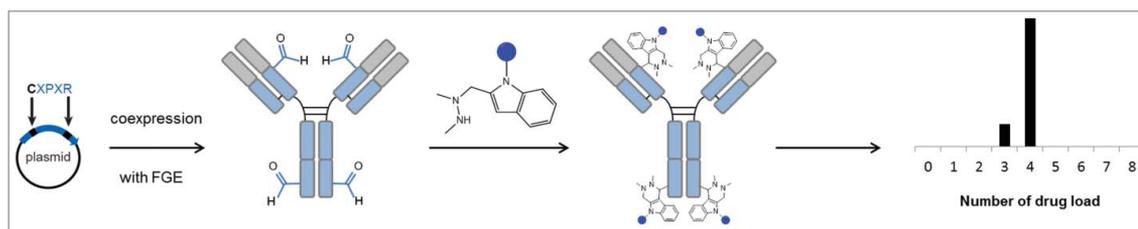
Although theoretically more homogeneous and thus amenable to standard techniques for their analytical characterization,

we perform here a thorough characterization of a site-specific ADC and highlight the benefits of these still emergent approaches for the direct assessment of their increased homogeneity. This represents the first report describing a straightforward middle-up analysis of a DAR4 site-specific ADC (CBW-03–106) using tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) reduction. Next, we applied native MS and ion mobility MS for full characterization of the ADC at the intact level under non-denaturing conditions. Finally, the potential to highlight an ADC's heterogeneity/homogeneity was illustrated by comparing the analytical characterization of a site-specific DAR4 ADC to that of first-generation ADCs. Results obtained for the site-specific ADC revealed a far more homogeneous sample as compared with Adcetris<sup>®</sup> and Kadcyla<sup>®</sup>. Altogether, our results highlight the compatibility, versatility, and benefits of native MS approaches for the analytical characterization of all types of ADCs, including site-specific conjugates.

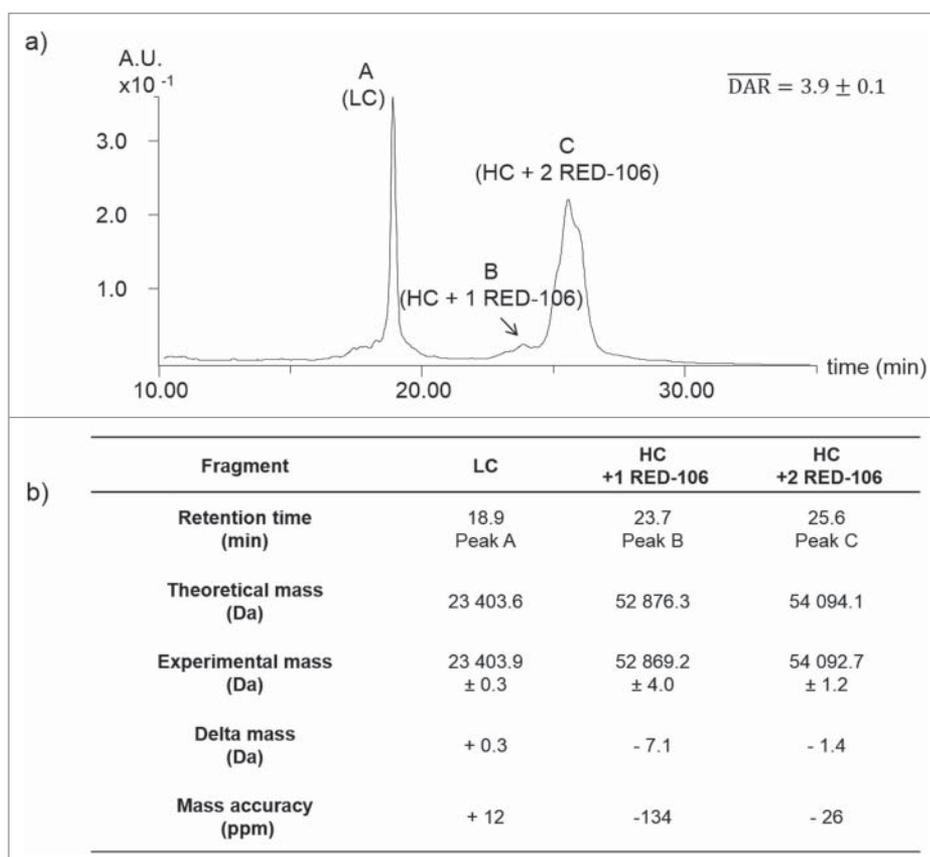
## Results

### Middle-up LC-MS analysis of the DAR4 site-specific ADC, CBW-03–106

As middle level analysis consisting of the analysis of large ADC fragments (25–50 kDa) obtained by either reduction or enzymatic cleavage are amenable to routine HPLC-MS analysis, this approach is often used as first line for ADC characterization in our laboratory. We thus performed a middle level characterization of intact CBW-03–106 using a classical tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) reduction procedure (Fig. 2). Three peaks were observed corresponding to light chain (LC) and heavy chain (HC) fragments. Peak A ( $23403.9 \pm 0.3$  Da) corresponds to the theoretical mass of the LC, while peak C could be unambiguously attributed to the HC + 2 RED-106 linker/payload molecules ( $54092.7 \pm 1.2$  Da). A minor peak (Peak B) corresponding to HC + one RED-106 ( $52869.2 \pm 4.0$  Da) was also detected. No signals corresponding to HC without any ligated RED-106 could be detected from extracted ion chromatograms. Middle-up analysis thus confirmed that the bioconjugation was located on the HC and that no unconjugated HC was detected. Middle-up analysis of CBW-03–106 after TCEP reduction allowed the estimation of an average DAR of  $3.9 \pm 0.1$ . Of note, middle-up analysis of CBW-03–106 after immunoglobulin degrading enzyme from *Streptococcus pyogenes* (IdeS) enzymatic digestion followed by TCEP reduction was also performed in parallel (Fig. S1) and enabled the precise localization of each RED-106 molecule, one being



**Figure 1.** Schematic overview of the bioconjugation strategy. A formylglycine (fGly) amino acid residue is produced through the highly selective oxidation of a cysteine residue found within a specific pentapeptide consensus sequence by formylglycine-generating enzyme (FGE). The fGly-containing protein is then further modified using aldehyde specific chemistries.



**Figure 2.** Middle-up analysis of CBW-03-106. (a) UV chromatogram of TCEP-reduced CBW-03-106. LC without drug load and HC fragments with one or 2 RED-106 bound molecules were observed. Theoretical and experimental masses of the GOF glycoform obtained by middle-up analyses of CBW-03-106 (b).

linked to the Fc/2 fragment and the other bound to the Fd fragment, as expected according to the placement of the aldehyde tags within the heavy chain antibody sequence. However, coelution of Fc/2 and LC precluded facile data interpretation from IdeS digestion for the studied ADC.

Altogether, middle-up analysis of the CBW-03-106 site-specific ADC revealed a highly homogeneous sample, with mostly 2 RED-106 molecules bound per HC. No signal corresponding to unbound HC was detected, leading to an average DAR of  $3.9 \pm 0.1$  in good agreement with HIC data (Fig. S2).

### Intact top level MS characterization

As middle-up analysis always leads to indirect average DAR determination that can be biased by peak integration, we next aimed at performing a top-level characterization of the CBW-03-106 site-specific ADC using denaturing and native MS.

### Denaturing MS analysis of CBW-03-106

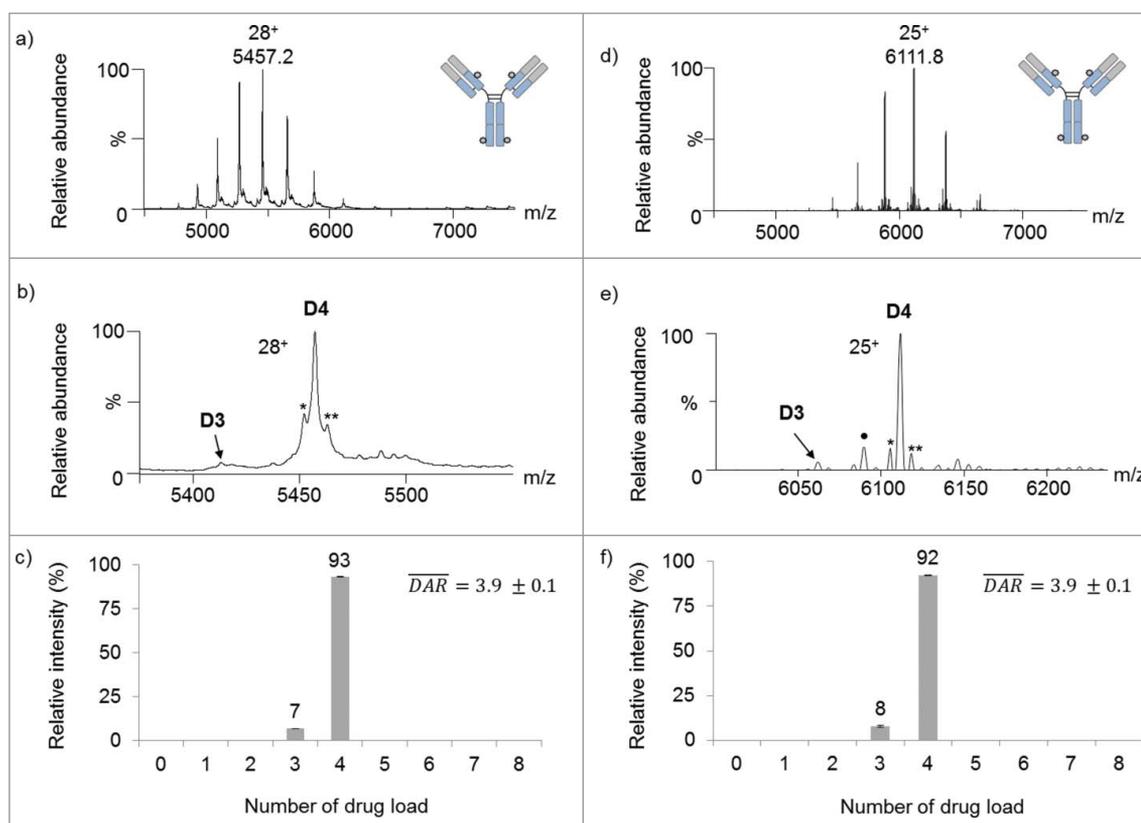
As covalent modifications are involved in CBW-03-106 formation, we first performed a classical HPLC-MS analysis in denaturing conditions.

In classical denaturing conditions (without previous reduction step, see Experimental Section), the most intense charge envelope between  $m/z$  1500 and 3500 (Fig. S3) corresponds to intact CBW-03-106 ADC bearing 4 RED-106 molecules ( $152\,767 \pm 1$  Da). No additional minor ion series corresponding to D0-D3 species could be detected. However, as already reported for ADCs, MS data interpretation is not straightforward and is

hampered by the superimposition of the 2 broad charge state distributions of DAR4 and DAR3 species. An average DAR of 4.0 could be deduced from the intact HPLC-MS analysis in denaturing conditions.

### Native MS analysis of CBW-03-106

We evaluated the versatility of native MS analysis for site-specific ADC characterization, drug load profile determination, and average DAR assessment. First, we analyzed intact deglycosylated CBW-03-106 by online size exclusion chromatography (SEC) hyphenated to native MS on a quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) instrument (Fig. 3a). A main ion series with charge states ranging from 25+ to 32+ with a measured mass of  $152\,773 \pm 1$  Da was observed, in agreement with the expected mass of the mAb with 4 conjugated drugs (expected mass 152 771 Da). A minor ion series (less than 10% of total ion signals) corresponding to the binding of 3 drugs was also detected ( $151\,546 \pm 3$  Da, Fig. 3b). No signals corresponding to either unconjugated mAb or mAb bearing 1 or 2 drugs were observed. Next, semi-quantitation based on peak intensities was performed, leading to an average measured DAR of  $3.9 \pm 0.1$  (Fig. 3c), which is in good agreement with values obtained previously. Then, a second native MS analysis on a high resolution orbitrap instrument was performed (Fig. 3d-f). As already described, better mass accuracies ( $-7$  ppm instead of  $+13$  ppm) were obtained on the high resolution orbitrap instrument as compared with the Q-TOF. No additional ion series except D3 and D4 could be detected with high



**Figure 3.** Native mass spectrometry analysis of deglycosylated CBW-03-106. Full scan ESI mass spectra on the  $m/z$  range [4 500 – 7 500] of deglycosylated CBW-03-106 in native conditions obtained either on a Q-TOF (a-c) or an orbitrap (d-f) instrument. Zoom on the most intense charge states showing drug load profiles (b,e). Native MS derived drug load profile and subsequent average DAR (c,f): relative intensities of each drug load as a function of the number of drugs loaded onto the mAb. \*: non-identified impurity; \*: loss of one fucose ( $-146$  Da) and \*\*: glycation ( $+162$  Da).

resolution native MS. In agreement with the data obtained on the Q-TOF instrument, the average DAR value calculated on the high resolution orbitrap instrument for deglycosylated CBW-03-106 was  $3.9 \pm 0.1$ . Native MS enables easy detection of drug binding stoichiometry and drug load homogeneity, providing an instantaneous snapshot of the drug-load distribution. In addition, CBW-03-106 was also analyzed without deglycosylation. When high resolution native MS was performed on this sample (Fig. S4), each drug load, and all glycoforms, were baseline resolved. More accurate average DAR values were thus obtained from high resolution native mass spectra.

Altogether, our results illustrate that native MS affords better resolution of superimposed glycosylation and conjugation heterogeneities of site-specific ADCs within a single run. The improved mass accuracy capabilities of high resolution native MS are of utmost importance for the characterization of all types of conjugated ADCs, including site-specific ADCs (Fig. 4).

#### Intact top level native IM-MS characterization

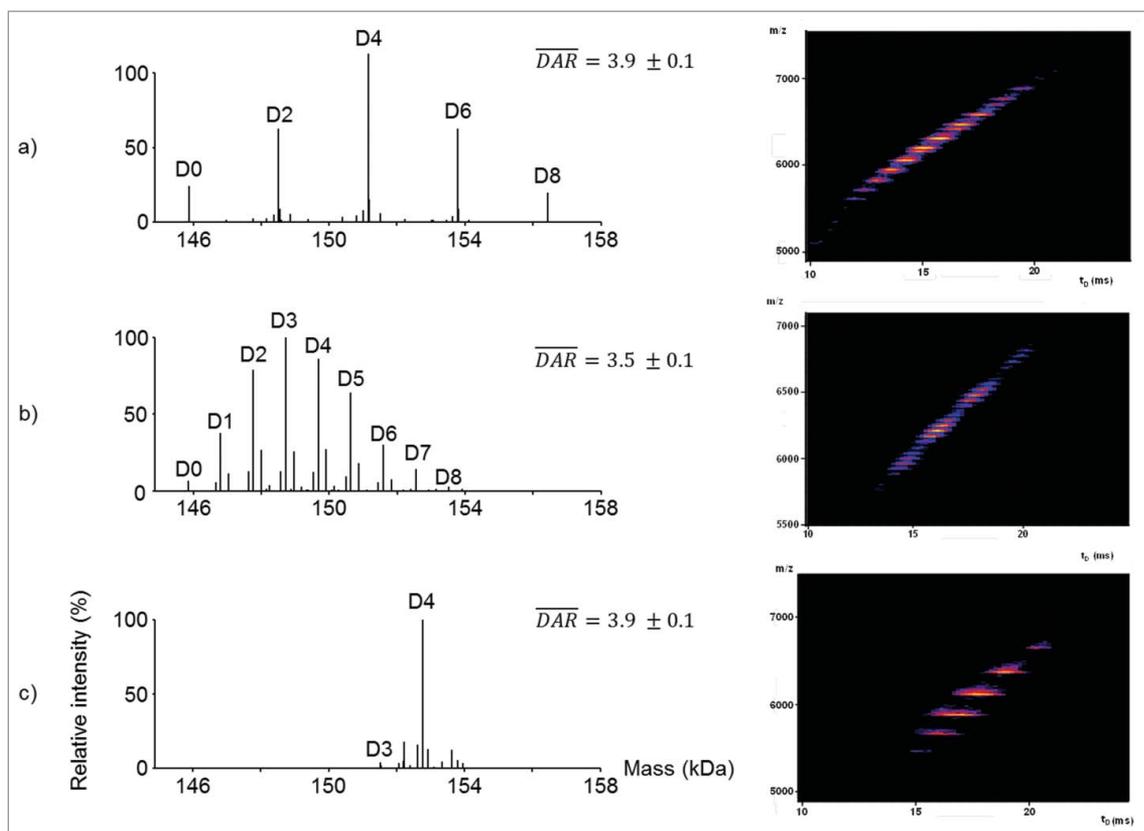
We described previously the use of emergent IM-MS for characterization of cysteine- and lysine-ADC conformational heterogeneity.<sup>31,32</sup> Here, we present a global native IM-MS conformational characterization of a deglycosylated DAR4 site-specific ADC and its unconjugated mAb counterpart.

#### Global IM-MS conformational characterization of CBW-03-106 and the parental mAb

A comparison of the IM-MS plots obtained for deglycosylated DAR4 site-specific CBW-03-106 (Fig. 5a) and unconjugated mAb (Fig. 5b) shows that IM-MS provided a direct picture of DAR4 site-specific ADC homogeneity. Unlike for cysteine- or lysine- reference conjugates (Fig. 4), one unique population, corresponding to the binding of 4 drug loads (DAR4) was clearly observed for the most intense charge states ( $24+$  to  $28+$ ; Fig. 5a).

Overlaid extracted arrival time distributions (ATDs) of the  $24+$  charge state of the deglycosylated DAR4 site-specific ADC and its corresponding unconjugated mAb are depicted in Fig. 5c. When comparing the deglycosylated DAR4 site-specific ADC and the unconjugated mAb, the ATDs are resolved at 58% of the valley for the  $24+$  charge state with the ion mobility (IM) cell resolution used here ( $\sim 18$ ). All ATDs were symmetric and significantly different IM drift times were measured for CBW-03-106 and for its unconjugated mAb (Fig. 5c, Table 1). A reproducible and constant difference in IM drift times of  $0.8 \pm 0.1$  ms was observed for the addition of 4 drugs for the  $24+$  charge state, corresponding to  $0.2 \pm 0.1$  ms per drug load of 1217 Da.

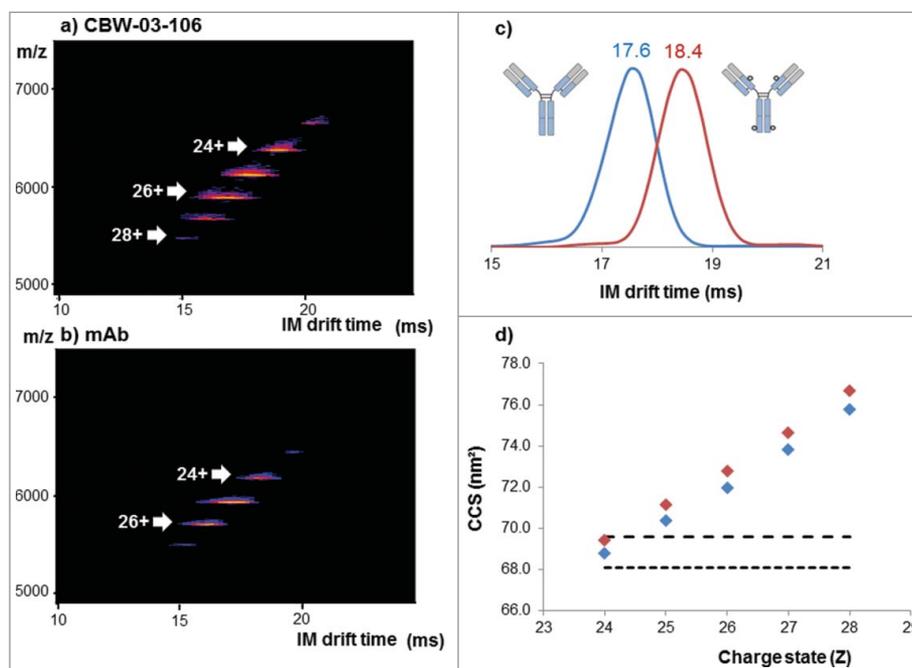
Corresponding  ${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$  values were calculated for all the charge states of the DAR4 site-specific ADC and for the unconjugated mAb (Fig. 5d and Table 1) and compared with already published ones.  ${}^{\text{TW}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$  values ranging from 68.8 to 75.8  $\text{nm}^2$  and from 69.4 to 76.7  $\text{nm}^2$  were obtained for the unconjugated



**Figure 4.** Native MS and IM-MS for benchmarking bioconjugation strategies. (a-c) Deconvoluted native mass spectra from the Orbitrap showing drug load profiles (left panels) and native IM-MS plots of  $m/z$  vs. drift time from the Q-TOF instrument for brentuximab vedotin (a), trastuzumab emtansine (b) and CBW-03-106 DAR4 site-specific ADC (c).

mAb and the DAR4 ADC, respectively. Measured  $^{TW}CCS_{N2}$  values and corresponding  $\Delta^{TW}CCS_{N2}$  were in agreement with both predicted collision cross-section (CCS) from mAbs

considered as spherical proteins<sup>33</sup> (Fig. 5d) and with already reported data on other mAbs<sup>34</sup> or ADCs.<sup>31,32</sup> Of note, the  $^{TW}CCS_{N2}$  reported for CBW-03-106 DAR4 species ( $69.4 \pm 0.1$



**Figure 5.** Native IM-MS analysis of deglycosylated CBW-03-106 and its parental mAb form. Plots of  $m/z$  vs. drift time for CBW-03-106 (a) and mAb (b). Extracted ATDs corresponding to the 24+ charge state of the parental mAb (blue) and CBW-03-106 (red) at a trap collision voltage of 4 V (c). Measured  $^{TW}CCS_{N2}$  (nm<sup>2</sup>) of the parental mAb (blue diamonds) and CBW-03-106 (red diamonds) as a function of ESI charge state (d).

**Table 1.** IM drift times and  $^{TW}CCS_{N2}$  values obtained for the 24+ charge states of deglycosylated site-specific CBW-03–106 ADC and its unconjugated mAb form.

|  | mAb                     | CBW-03-106              |
|--|-------------------------|-------------------------|
| IM drift time (ms)                                     | 17.6 ± 0.1 <sup>a</sup> | 18.4 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| $\Delta$ (IM drift time) <sup>b</sup> (ms)             | –                       | 0.8                     |
| CCS from IM-MS (nm <sup>2</sup> )                      | 68.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 69.4 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| $\Delta$ CCS <sup>b</sup> (nm <sup>2</sup> )           | –                       | 0.6                     |
| Predicted CCS <sup>c</sup> (nm <sup>2</sup> )          | 68.1                    | 69.6                    |
| Predicted $\Delta$ CCS <sup>b</sup> (nm <sup>2</sup> ) | –                       | 1.5                     |
| Average DAR from IM-MS                                 | 0                       | 4.0 <sup>a</sup>        |

<sup>a</sup>Uncertainty values represent the variability as a result of repeat injections (n = 3).

<sup>b</sup> $\Delta$ (IM drift times) and  $\Delta$ CCS values represent differences between D4 ADC and unconjugated parental mAb.

<sup>c</sup>CCS were predicted considering ADCs as spherical protein through the equation  $^{33} CCS = 2.435 \times M^{2/3}$ .

nm<sup>2</sup> for the 24+ charge state) correlated well with the one reported for the reference cysteine ADC (69.5 ± 0.1 nm<sup>2</sup> for the 24+ charge state). The agreement between mass-predicted and IM-MS-measured CCSs also strongly argues for a mass increase effect rather than slight conformational changes induced upon drug binding. Similar to IM drift time variations, the addition of 4 drugs induced a slight but constant and reproducible  $^{TW}CCS_{N2}$  variation of 0.6 nm<sup>2</sup> observed on all charge states (Table 1, Fig. 5d). Slightly larger  $\Delta^{TW}CCS_{N2}$ s between DAR0 and DAR4 species were reported for brentuximab vedotin (1.5 nm<sup>2</sup> for 4 drugs of 1317 Da each) and ado-trastuzumab emtansine (1.2 nm<sup>2</sup> for 4 drugs of 958 Da each), which could be a first hint of increased conformational heterogeneity within the preparations of those molecules.

#### Average DAR determination by IM-MS

As already performed on lysine- and cysteine conjugates,<sup>31,32</sup> we used IM-MS data for average DAR determination of CBW-03–106. The intensities of the drift peaks extracted for each charge state were plotted across the series for DAR0–DAR4 drug binding stoichiometries, and a Gaussian curve was fitted to the resulting distribution (Fig. S5). The relative intensity of these ATDs indicates the relative abundance of each species. As only ATDs for DAR4 were detected (Fig. S5), an average DAR of 4.0 could be deduced from IM-MS data (Table 1), in good agreement with the expected value obtained from other MS approaches.

#### CIU experiments of CBW-03–106 and the parental mAb

We next performed collision induced unfolding (CIU) experiments to compare the gas-phase conformational stability of CBW-03–106 and parental mAb. CIU experiments consist of gas-phase collisional activation of the ions in the trap T-Wave of the instrument before IM separation. CIU experiments have already been reported for the rapid analysis of antibody structure and chemical modifications.<sup>35</sup> Here, a comparison of the CIU patterns of CBW-03–106 ADC with those of the parental mAb allowed for an investigation into the effect of conjugation on mAb gas-phase stability.

First, we analyzed CIU data acquired for CBW-03–106 and parental mAb to highlight differences in the CIU fingerprints. As shown in Fig. 6a–b, the 24+ intact antibody ions for parental mAb and CBW-03–106 exhibited different low energy IM migration times (17.6 and 18.6 ms, respectively), and possessed

significantly different CIU fingerprints, as highlighted by the high root-mean-square deviation value shown in the CIU difference plot (Fig. 6c).

Three main CIU features were observed for the unconjugated mAb (Fig. 6a), while CBW-03–106 only displayed 2 states (Fig. 6b) over the collision voltage range 0–200 V.

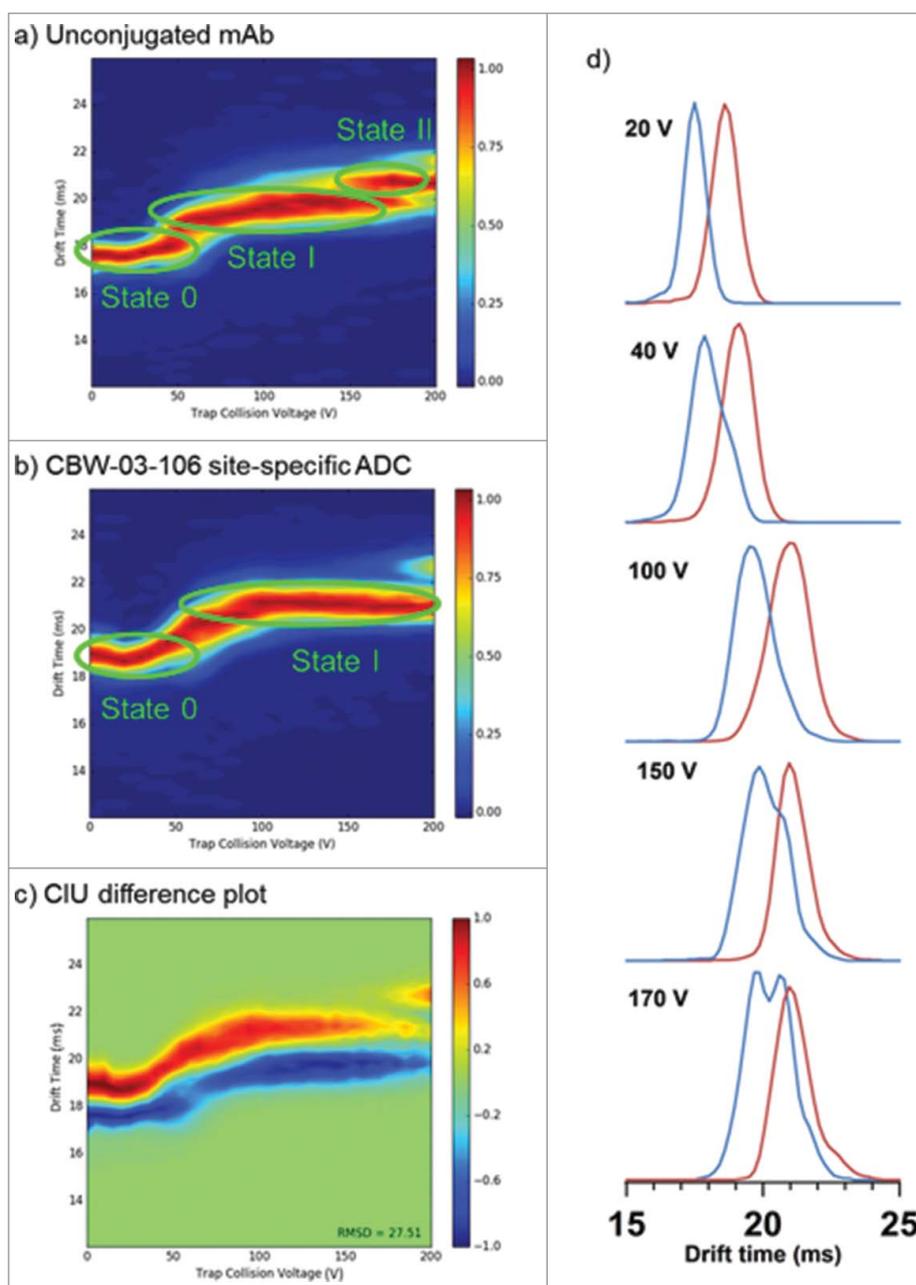
For unconjugated mAb, the first transition from the most compact initial state 0 (Fig. 6a and 6d) to the first unfolded state I happens between 40 and 75 V, the unfolded state I being then stable over the 75–100 V Trap CE range. When collision energies increased from trap CE 100 V to 140 V, ATDs became broader. At 150 V, the ATD of the 24+ charge state of parental mAb presented a double distribution corresponding to the coexistence of at least 2 conformational families (Fig. 6d) that could be observed throughout the trap CE 150–190 V range, highlighting a second transition between trap CE 140 and 150 V from unfolded state I to the final unfolded state II. The IM drift time related to the most unfolded species was 20.7 ms (Fig. 6d), which corresponded to a total CCS increase of 3.3% as compared with the initial state 0.

For CBW-03–106, the initial most compact state had an IM migration time of 18.6 ms (Fig. 6b), which is ~ 1 ms on average longer than parental mAb IM drift time (Fig. 6c). These differences could be attributed to the mass increase due to drug conjugation, as already concluded from CCS calculations. This conformational family started progressively and continuously unfolding from 40 V to 100 V, leading to the unfolded state I at 21.0 ms (Fig. 6c). By contrast to the parental mAb, the ADC unfolded state I was then stable over the 100–190 V range (Fig. 6b). The drift time variation observed during this transition implies a relative CCS variation of 2.6%.

Altogether, CIU results highlight that conjugation seems to stabilize the mAb structure for the following reasons: i) even if the DAR4 ADC begins unfolding from state 0 to state I at similar trap CE voltage (40 V), the unfolding process is distributed over a broader trap CE range (40–100V) compared with the parent mAb (40–75 V), which is favor of a global stabilization effect of the mAb conformation upon conjugation; and ii) the site-specific ADC is less prone to unfolding events (fewer unfolding intermediates) than its unconjugated counterpart mAb. Taken together and noting the high structural and sequence identity (same number of interchain disulfide bonds and same amino acid sequence) between the CBW-03–106 and parental mAb, the data presented here strongly support the hypothesis that drug conjugation stabilizes mAb conformation.

## Discussion

We report here the first multi-level characterization of a new generation of site-specific antibodies by state-of-the-art MS methods. A combination of HPLC-MS methods and non-denaturing MS approaches were used to provide a comprehensive characterization of a site-specific ADC at both intact and middle levels. Middle level analysis, which is now the first line strategy used in most laboratories for mAb and ADC analytical characterization, revealed a highly homogeneous sample in terms of drug load, with mainly DAR4 detected and low amounts of DAR3. Of note, for this type of ADC, the classical reduction strategy that



**Figure 6.** CIU experiments performed on deglycosylated CBW-03-106 site-specific ADC and its unconjugated mAb form. CIU fingerprints of the 24+ charge state for the unconjugated mAb (a) and the site-specific ADC, CBW-03-106 (b). CIU difference plot between CBW-03-106 and unconjugated mAb (c). Extracted arrival time distributions (ATD) of the unconjugated mAb (blue) and CBW-03-106 (red) at different trap collision voltages (d).

results in LC and HC fragments was more appropriate than the IdeS strategy, which led to the coelution of LC and Fc fragments. Native MS was next applied to site-specific ADC characterization leading to a direct observation of the drug load profile compared with the middle-up indirect approach. Native MS is now easily amenable to high throughput through its hyphenation to SEC chromatography for rapid and efficient buffer exchange. Thus, we believe that SEC-native MS will more and more challenge classical HPLC-MS techniques. Finally, extensive conformational characterization by IM-MS of our site-specific ADC enabled detection of different drift times for unconjugated and conjugated ADC. Again, average DAR values along with drug load distributions could be achieved.

We demonstrate here the capabilities of native IM-MS to directly access site-specific ADC conformational information through the measurement of IM drift times, CCS calculations and CIU fingerprints. However, as the site-specific ADC and its unconjugated mAb version exhibited similar intact CCS, it was hard to distinguish between a mass effect and a real conformational change induced upon drug conjugation. We demonstrate here for the first time the capabilities of CIU in the context of intact ADC analysis. CIU allows one to circumvent the lack of IM resolution through the establishment of unfolding patterns. We demonstrate here the ability of CIU to differentiate a site-specific ADC from its parental unconjugated mAb along with increase in ADC stability toward unfolding as compared with the unconjugated mAb. This could be concluded from the CIU

landscapes of the ADC presenting fewer numbers of unfolding states than the unconjugated mAb, along with broader unfolding transitions for the ADC than for its mAb counterpart. Thus, we envision the use of CIU protocols to optimize conjugation strategies for next-generation ADC development, accompanied by a fast assessment of ADC gas phase stability.

Our group has already reported the in-depth characterization of first-generation heterogeneous lysine- or cysteine-conjugated ADCs.<sup>5,31,32,36</sup> Here, we demonstrate the versatility of native MS methodologies (native MS and IM-MS) for site-specific ADC analysis. These methodologies present the advantages of providing a direct snapshot of ADC homogeneity/heterogeneity without extensive data interpretation. As an illustration, Fig. 4 shows native MS and IM-MS data obtained for brentuximab vedotin (Adcetris<sup>®</sup>, the reference cysteine conjugate), ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla<sup>®</sup>, the reference lysine-ADC), and the CBW-03-106 site-specific ADC. At a glance, the increased homogeneity of the site-specific ADC is obvious from either native mass spectra or IM-MS plots. Some of the most important quality attributes, including the presence/amount of unconjugated mAb, the drug load profile, the average DAR, and even payload degradation/modification can be assessed within a few minutes from one single SEC-native MS run. Thus, we believe that native MS and its hyphenation to ion mobility are ready to serve for the benchmarking of conjugation strategies, for the evaluation of drug binding heterogeneity, and for the fast conformational characterization of ADCs. We envision integrating native MS and IM-MS approaches even in their latest state-of-the-art forms (like CIU, or SEC-native IM-MS) to evaluate bioconjugation strategies.

## Materials and methods

### Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich: ammonium acetate (A1542), cesium iodide (21004), 2-propanol (I9516), sodium phosphate dibasic (S7907), sodium chloride (S7653), guanidine hydrochloride (G4505), TCEP hydrochloride (C4706), trifluoroacetic acid (TFA; 74564) and HPLC-grade acetonitrile (34851). IgGZERO (A0-IZ1-010) and IdeS (A0-FR1-008) enzymes were obtained from Genovis. All the aqueous solutions were prepared using an ultra-pure water system (Sartorius, Göttingen, Germany).

### Middle level UHPLC-MS analysis

#### Middle level analysis

**CBW-03-106 ADC reduction.** Thirty  $\mu\text{g}$  of ADC in 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 150 mM NaCl at pH 6.6 were denatured by the addition of 5 M guanidine hydrochloride. The reduction was then performed using 56 mM of TCEP-HCl for 60 minutes at 57 °C. Finally, the reaction was quenched by adding 1% TFA.

**Liquid chromatography coupled to mass spectrometry.** UHPLC-MS analysis was performed using an Acquity H-class (Waters, Manchester, UK) coupled to the Synapt G2 high definition (HD) MS (Waters, Manchester, UK). A volume

equivalent to 9  $\mu\text{g}$  of mAb in sample preparation was injected on a PLRP-S column ( $2.1 \times 150$  mm, 8  $\mu\text{m}$ , 1000 Å from Agilent, Waldbronn, Germany) set at 80 °C. The gradient was generated at a flow rate of 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  using water containing 0.1% TFA for mobile phase A and acetonitrile containing 0.08% TFA for mobile phase B. The latter was raised from 10 to 30% over 8 minutes, 30 to 34% over 12 minutes, and 34 to 50% over 20 minutes, followed by a 3 minute washing step at 90% B and a 12 minute re-equilibration period. The Synapt G2 HDMS was operated in positive mode with a capillary voltage of 3.2 kV. Acquisitions were performed in the mass range of 500–5000 m/z with a 1-s scan time. Signal acquisition was realized by UV absorbance measurement at 214 nm. Calibration was performed using the singly charged ions produced by a tuning mix. MS data interpretations were performed using Mass Lynx V4.1 (Waters, Manchester, UK).

### Intact mass analysis

**Deglycosylation.** The deglycosylation was performed by incubating for 30 min at 37 °C one unit of IgGZERO per microgram of mAb and ADC.

**Buffer exchange.** Prior to native MS and IM-MS experiments, mAb and ADC were desalted against a 150 mM ammonium acetate solution at pH 6.9 using 6 cycles of concentration/dilution using a microconcentrator (Vivaspin, 10-k<sub>D</sub> cutoff, Sartorius, Göttingen, Germany). Protein concentration was determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, France).

**Native MS analysis.** High resolution native MS (native-HRMS) of intact mAb and ADC were performed on an Orbitrap Exactive Plus EMR (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) mass spectrometer coupled to an automated chip-based nanoelectrospray device (Triversa Nanomate, Advion Bioscience, Ithaca, USA) operating in the positive ion mode. The capillary voltage was set at 1.86 kV and nitrogen nanoflow at 0.15 psi for the Orbitrap. The in-source collision-induced dissociation and the higher-energy collisional dissociation cells were set to 200 eV and 50 eV, respectively. The trapping gas pressure was set to 3 a.u. (which corresponds to an Ultra High Vacuum of  $\sim 4.10^{-10}$  mbar). To improve the transmission of the high mass species, the voltages on the injection-, inter-, and bent- flatapoles were fixed to 8, 7, and 6 V, respectively. Samples were diluted in 150 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  at pH 6.9 and infused at 10  $\mu\text{M}$ . External calibration was performed using singly charged ions produced by a 2 g/L solution of cesium iodide in 2-propanol/water (50/50 v/v). Orbitrap MS data interpretation was performed using Protein Deconvolution 4.0 available on BioPharmaFinder 1.0 SP1 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The parameters of the software were optimized for each spectrum.

**Size exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry.** An ACQUITY UPLC H-class system (Waters, Manchester, UK) comprising a quaternary solvent manager, a sample manager operating at 10 °C, a column oven maintained at 50 °C and a TUV detector operating at 280 nm and 214 nm

hyphenated to a Synapt G2 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) was used for the online buffer exchange and intact mass measurement. 51  $\mu\text{g}$  of glycosylated CBW-03-106 and 45  $\mu\text{g}$  of its deglycosylated version were loaded on the ACQUITY UPLC Protein BEH SEC column (2.1  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  particle size, 200  $\text{\AA}$  pore size from Waters, Manchester, UK) using an isocratic elution of 100 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 6.8) at a flow rate of 0.25 mL/min over 4.1 min. Then, the flow rate was decreased to 0.10 mL/min over 5.5 min and finally increased by 0.25 mL/min over 2.4 min. The Synapt G2 HDMS was operated in positive mode with a capillary voltage of 3.0 kV. Acquisitions were performed in the  $m/z$  range of 1000–8000 with a 1.5 s scan time. External calibration was performed using singly charged ions produced by a 2 g/L solution of cesium iodide in 2-propanol/water (50/50 v/v). MS data interpretations were performed using Mass Lynx V4.1 (Waters, Manchester, UK).

### Average DAR calculation

Average DAR values were calculated by using Equation 1. For native MS, these results were derived from the relative peak intensities measured from deconvoluted mass spectra. For middle level analysis, these results were based on the area of each peak corresponding to the drug loaded fragments obtained on the UV chromatogram.

$$\text{DAR} = \frac{\left( \sum_{k=0}^8 k^* \text{intensity DAR}k \right)}{\sum_{k=0}^8 \text{intensity DAR}k} \quad (1)$$

### Ion mobility mass spectrometry

Ion mobility experiments were performed on a TWIMS-MS Synapt G2 instrument (Waters, Manchester, UK). The instrument was carefully tuned to achieve a good trade-off between ion separation and TWIMS resolution. Low accelerating voltages were used, especially before IM separation, to guide the ions through the mobility cell to the TOF analyzer without ion activation. The backing pressure of the Z-spray source was 6.0 mbar, and the sampling cone was operated at 80 V. The argon flow rate in the traveling-wave-based ion trap was 5 mL/min, and the trap collision energy was set at 4 V. Prior to IM separation, ions were thermalized in the helium cell (130 mL/min). Ion separation was performed in the pressurized ion mobility cell using a constant  $\text{N}_2$  flow rate of 45 mL/min. The IM wave height and velocity were 40 V and 923 m/s, respectively. Transfer collision energy was fixed to 2 V to extract the ions from the IM cell to the TOF analyzer. IM data were calibrated to perform CCS calculations using the most intense charge states of 3 external calibrants (concanavaline A, pyruvate kinase, and alcohol dehydrogenase) in non-denaturing conditions as described elsewhere.<sup>31,32,37</sup> IM-MS experiments were performed in triplicate under identical conditions.

Drug-to-antibody ratio calculations were also performed from ion mobility data. ATDs corresponding to each charge state were fitted on a Gaussian profile. The delimited areas

were quantified and used to calculate average DAR from Equation 1.

### Collision induced unfolding experiments

ATDs were recorded by progressively increasing the trap collision energy in the traveling-wave-based ion trap before the IM cell. All the ions were accelerated into the ion trap without any previous selection; however, only ion mobility data corresponding to the 24+ charge state were compiled to create the CIU fingerprint. The trap collision energy was ramped from 0 to 200 V using an energy interval of 5 V. This voltage interval corresponds to the best trade-off between CIU fingerprint resolution and acquisition time.

### CIU fingerprint data

2D CIU fingerprint plots were analyzed using the open source CIUSuite software, especially the CIUSuite\_stats and CIUSuite\_compare modules.<sup>38</sup> Briefly, these modules allow for drift time data extraction at each trap CE collision voltage. Ion intensities were normalized to a maximum value of 1 and the ATDs were smoothed using a Savitzky-Golay filter with a window length of 3 and polynomial order of 2. The individual IM data were gathered to create the CIU data shown. Drift time (ms) is shown in the size axis versus trap collision energy (V) in the  $x$ -axis. The relative intensities of the ATD distributions are denoted by a color-coded axis. CIU fingerprint plots and standard deviations were generated for multiple replicates using CIUSuite\_stats function to quantify the reproducibility of the experiment. Comparison of 2 different CIU fingerprint plots was achieved using the CIUSuite\_compare module.

### Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Funding

This work was supported by the several sponsors (Région Alsace, Communauté Urbaine de Strasbourg, CNRS, and the Université de Strasbourg), by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INBS-08-03). We thank GIS IBiSA and Région Alsace for financial support in purchasing a Synapt G2 HDMS instrument and an Exactive Plus EMR Orbitrap spectrometer, respectively. T. Botzanowski and A. Ehkirch acknowledge Institut de Recherche Servier and Syndivia for funding of their PhD fellowships, respectively.

### References

1. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:345-52; PMID:20414207; <https://doi.org/10.1038/nri2747>
2. Reichert JM. Antibodies to watch in 2017. *MAbs* 2017; 9:167-81; PMID:27960628; <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1269580>
3. Beck A, Reichert JM. Antibody-drug conjugates: Present and future. *MAbs* 2014; 6:15-7; PMID:24423577; <https://doi.org/10.4161/mabs.27436>
4. Junutula JR, Gerber HP. Next-Generation antibody-drug conjugates (ADCs) for cancer therapy. *ACS Med Chem Lett* 2016; 7:972-3; PMID:27882192; <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00421>

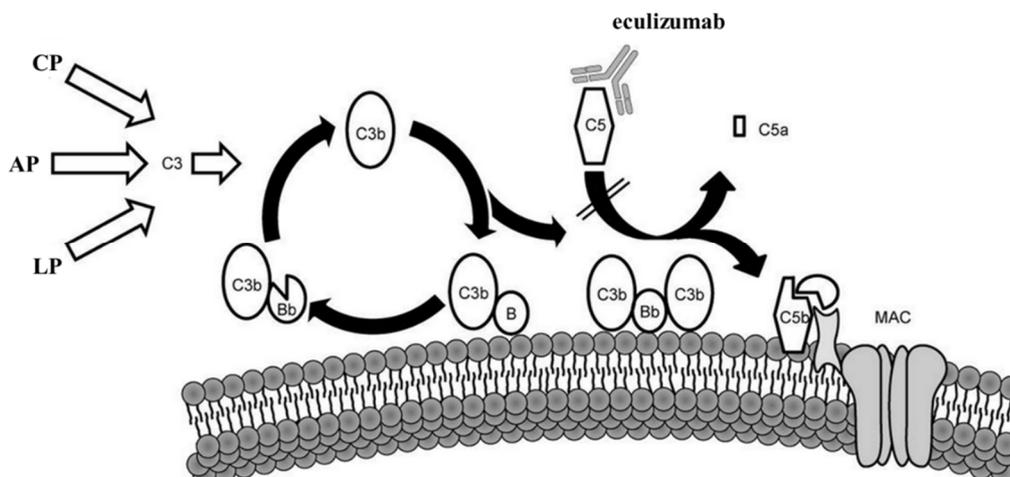
5. Beck A, Terral G, Debaene F, Wagner-Rousset E, Marcoux J, Janin-Bussat MC, Colas O, Van Dorsselaer A, Cianféroni S. Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates. *Expert Rev Proteomics* 2016; 13:157-83; PMID:26653789; <https://doi.org/10.1586/14789450.2016.1132167>
6. Loganzo F, Sung M, Gerber HP. Mechanisms of resistance to antibody-drug conjugates. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:2825-34; PMID:27780876; <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0408>
7. Dennler P, Fischer E, Schibli R. Antibody conjugates: From heterogeneous populations to defined reagents. *Antibodies* 2015; 4:197-224; <https://doi.org/10.3390/antib4030197>
8. Beck A, Lambert J, Sun M, Lin K. Fourth world antibody-drug conjugate summit: February 29-March 1, 2012, Frankfurt, Germany. *MAbs* 2012; 4:637-47; PMID:22909934; <https://doi.org/10.4161/mabs.21697>
9. Roberts SA, Andrews PA, Blanset D, Flagella KM, Gorovits B, Lynch CM, Martin PL, Kramer-Stickland K, Thibault S, Warner G. Considerations for the nonclinical safety evaluation of antibody drug conjugates for oncology. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013; 67:382-91; PMID:24012707; <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.08.017>
10. Gordon MR, Canakci M, Li L, Zhuang J, Osborne B, Thayumanavan S. Field guide to challenges and opportunities in antibody-drug conjugates for chemists. *Bioconjug Chem* 2015; 26:2198-215; PMID:26308881; <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00399>
11. Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol* 2008; 26:925-32; PMID:18641636; <https://doi.org/10.1038/nbt.1480>
12. Panowski S, Bhakta S, Raab H, Polakis P, Junutula JR. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs* 2014; 6:34-45; PMID:24423619; <https://doi.org/10.4161/mabs.27022>
13. Dennler P, Chiotellis A, Fischer E, Bregeon D, Belmant C, Gauthier L, Lhospace F, Romagne F, Schibli R. Transglutaminase-based chemoenzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem* 2014; 25:569-78; PMID:24483299; <https://doi.org/10.1021/bc400574z>
14. Farias SE, Strop P, Delaria K, Galindo Casas M, Dorywalska M, Shelton DL, Pons J, Rajpal A. Mass spectrometric characterization of transglutaminase based site-specific antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem* 2014; 25:240-50; PMID:24359082; <https://doi.org/10.1021/bc4003794>
15. Axup JY, Bajjuri KM, Ritland M, Hutchins BM, Kim CH, Kazane SA, Halder R, Forsyth JS, Santidrian AF, Stafin K, et al. Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *P Natl Acad Sci USA* 2012; 109:16101-6; PMID:22988081; <https://doi.org/10.1073/pnas.1211023109>
16. Smith EL, Giddens JP, Iavarone AT, Godula K, Wang LX, Bertozzi CR. Chemoenzymatic Fc glycosylation via engineered aldehyde tags. *Bioconjug Chem* 2014; 25:788-95; PMID:24702330; <https://doi.org/10.1021/bc500061s>
17. Kolodych S, Koniev O, Baatarkhuu Z, Bonnefoy JY, Debaene F, Cianféroni S, Van Dorsselaer A, Wagner A. CBTF: New amine-to-thiol coupling reagent for preparation of antibody conjugates with increased plasma stability. *Bioconjug Chem* 2015; 26:197-200; PMID:25614935; <https://doi.org/10.1021/bc500610g>
18. Koniev O, Kolodych S, Baatarkhuu Z, Stojko J, Eberova J, Bonnefoy JY, Cianféroni S, Van Dorsselaer A, Wagner A. MAPN: First-in-Class reagent for kinetically resolved thiol-to-thiol conjugation. *Bioconjug Chem* 2015; 26:1863-7; PMID:26335849; <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00440>
19. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* 2017; in press; PMID:28303026; <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
20. Strop P, Tran TT, Dorywalska M, Delaria K, Dushin R, Wong OK, Ho WH, Zhou D, Wu A, Kraynov E, et al. RN927C, a site-specific trop-2 antibody-drug conjugate (ADC) with enhanced stability, is highly efficacious in preclinical solid tumor models. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:2698-708; PMID:27582525; <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0431>
21. Zhou C, Lehar S, Gutierrez J, Rosenberger CM, Ljumanovic N, Dinoso J, Koppada N, Hong K, Baruch A, Carrasco-Triguero M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of DSTA4637A: A novel THIO-MAB antibody antibiotic conjugate against *Staphylococcus aureus* in mice. *MAbs* 2016; 8:1612-9; PMID:27653831; <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1229722>
22. de Goeij BE, Vink T, Ten Napel H, Breij EC, Satijn D, Wubbolts R, Miao D, Parren PW. Efficient payload delivery by a bispecific antibody-drug conjugate targeting HER2 and CD63. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:2688-97; PMID:27559142; <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0364>
23. Levengood MR, Zhang X, Hunter JH, Emmerton KK, Miyamoto JB, Lewis TS, Senter PD. Orthogonal cysteine protection enables homogeneous multi-drug antibody-drug conjugates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017; 56:733-7; PMID:27966822; <https://doi.org/10.1002/anie.201608292>
24. Rabuka D, Rush JS, deHart GW, Wu P, Bertozzi CR. Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nat Protoc* 2012; 7:1052-67; PMID:22576105; <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.045>
25. Agarwal P, Kudirka R, Albers AE, Barfield RM, de Hart GW, Drake PM, Jones LC, Rabuka D. Hydrazino-pictet-spengler ligation as a bio-compatible method for the generation of stable protein conjugates. *Bioconjug Chem* 2013; 24:846-51; PMID:23731037; <https://doi.org/10.1021/bc400042a>
26. Kudirka R, Barfield RM, McFarland J, Albers AE, de Hart GW, Drake PM, Holder PG, Banas S, Jones LC, Garofalo AW, et al. Generating site-specifically modified proteins via a versatile and stable nucleophilic carbon ligation. *Chem Biol* 2015; 22:293-8; PMID:25619935; <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.11.019>
27. York D, Baker J, Holder PG, Jones LC, Drake PM, Barfield RM, Bleck GT, Rabuka D. Generating aldehyde-tagged antibodies with high titers and high formylglycine yields by supplementing culture media with copper(II). *BMC Biotechnol* 2016; 16:23; PMID:26911368; <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0254-0>
28. Holder PG, Jones LC, Drake PM, Barfield RM, Banas S, de Hart GW, Baker J, Rabuka D. Reconstitution of formylglycine-generating enzyme with copper(II) for aldehyde tag conversion. *J Biol Chem* 2015; 290:15730-45; PMID:25931126; <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652669>
29. Kudirka RA, Barfield RM, McFarland JM, Drake PM, Carlson A, Banas S, Zmolek W, Garofalo AW, Rabuka D. Site-specific tandem Knoevenagel condensation-michael addition to generate antibody-drug conjugates. *ACS Med Chem Lett* 2016; 7:994-8; PMID:27882197; <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00253>
30. Pillow TH, Tien J, Parsons-Reponce KL, Bhakta S, Li H, Staben LR, Li G, Chuh J, Fourie-O'Donohue A, Darwish M, et al. Site-specific trastuzumab maytansinoid antibody-drug conjugates with improved therapeutic activity through linker and antibody engineering. *J Med Chem* 2014; 57:7890-9; PMID:25191794; <https://doi.org/10.1021/jm500552c>
31. Marcoux J, Champion T, Colas O, Wagner-Rousset E, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Cianféroni S. Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate. *Protein Sci* 2015; 24:1210-23; PMID:25694334; <https://doi.org/10.1002/pro.2666>
32. Debaene F, Boeuf A, Wagner-Rousset E, Colas O, Ayoub D, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Beck A, Cianféroni S. Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: High resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment. *Anal Chem* 2014; 86:10674-83; PMID:25270580; <https://doi.org/10.1021/ac502593n>
33. Ruotolo BT, Benesch JL, Sandercock AM, Hyung SJ, Robinson CV. Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat Protoc* 2008; 3:1139-52; PMID:18600219; <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.78>
34. Pacholarz KJ, Porrini M, Garlish RA, Burnley RJ, Taylor RJ, Henry AJ, Barran PE. Dynamics of intact immunoglobulin G explored by drift-

- tube ion-mobility mass spectrometry and molecular modeling. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53:7765-9; PMID:24916519; <https://doi.org/10.1002/anie.201402863>
35. Tian Y, Han L, Buckner AC, Ruotolo BT. Collision induced unfolding of intact antibodies: Rapid characterization of disulfide bonding patterns, glycosylation, and structures. *Anal Chem* 2015; 87:11509-15; PMID:26471104; <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03291>
  36. Terral G, Beck A, Cianferani S. Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016; 1032:79-90; PMID:27108304; <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.044>
  37. Bush MF, Hall Z, Giles K, Hoyes J, Robinson CV, Ruotolo BT. Collision cross sections of proteins and their complexes: A calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Anal Chem* 2010; 82:9557-65; PMID:20979392; <https://doi.org/10.1021/ac1022953>
  38. Eschweiler JD, Rabuck-Gibbons JN, Tian Y, Ruotolo BT. CIU-Suite: A quantitative analysis package for collision induced unfolding measurements of gas-phase protein ions. *Anal Chem* 2015; 87:11516-22; PMID:26489593; <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03292>
  39. Albers AE, Garofalo AW, Drake PM, Kudirka R, de Hart GW, Barfield RM, Baker J, Banas S, Rabuka D. Exploring the effects of linker composition on site-specifically modified antibody-drug conjugates. *Eur J Med Chem* 2014; 88:3-9; PMID:25176286; <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.062>
  40. Drake PM, Albers AE, Baker J, Banas S, Barfield RM, Bhat AS, de Hart GW, Garofalo AW, Holder P, Jones LC, et al. Aldehyde tag coupled with HIPS chemistry enables the production of ADCs conjugated site-specifically to different antibody regions with distinct in vivo efficacy and PK outcomes. *Bioconjug Chem* 2014; 25:1331-41; PMID:24924618; <https://doi.org/10.1021/bc500189z>

# CHAPITRE 4 : APPLICATION DE LA CIU À UN ANTICORPS MONOCLONAL THÉRAPEUTIQUE HYBRIDE : ECULIZUMAB.

## 1. Contexte de l'étude.

L'isotype d'un anticorps monoclonal est une caractéristique structurale importante à identifier lors des phases de développement. En effet, l'isotype peut moduler la spécificité, l'affinité, la fonction et la pharmacocinétique du mAb<sup>62-63</sup> : par exemple, les IgG1 sont connues pour posséder une haute affinité avec leur cible et les IgG3 sont peu utilisées comme agents thérapeutiques à cause d'un temps de demi vie plus court comparé aux autres isotypes<sup>64</sup>. Afin d'allier les avantages de deux isotypes, des anticorps monoclonaux hybrides ont été développés. L'eculizumab figure parmi ces anticorps hybrides car il est composé d'une architecture provenant d'une IgG2 (avec une région charnière composée de 4 ponts disulfures) et d'une région Fc avec des acides aminés similaires à une IgG4. Il cible la protéine du complément C5 qui est une protéine impliquée dans le système immunitaire<sup>65</sup>. Cet anticorps monoclonal thérapeutique a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) de la *U.S. Food and Drug Administration* en 2007 pour le traitement des patients atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)<sup>66</sup>. Son utilisation a ensuite été étendue au traitement du syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa)<sup>67</sup> en 2011 sous le nom commercial Soliris®. Il permet de lutter contre la suractivation de la protéine du complément responsable du syndrome SHUa<sup>68</sup>.



**Figure 30.** Représentation schématique du mécanisme d'action d'eculizumab. Eculizumab se fixe sur la protéine du complément C5 empêchant sa conversion par le complexe C3bBbC3b en protéines C5a et C5b. La protéine C5b fait partie intégrante du complexe d'attaque membranaire (MAC) et peut engendrer en cas de surexpression, comme dans le cas du SHUa, une lyse de la cellule par le MAC, adaptée de<sup>69</sup>.

## 2. Objectifs de l'étude.

Suite à la description récente (2015)<sup>30</sup> de la possibilité de déterminer l'isotype d'un anticorps monoclonal à partir d'empreintes CIU, nous avons souhaité évaluer cette approche sur l'eculizumab. En effet, cet anticorps monoclonal thérapeutique est décrit comme hybride entre IgG2 et IgG4 et constitue un cas d'étude idéal pour mettre à l'épreuve cette approche. Dans un premier temps, trois IgG références utilisées comme agents thérapeutiques ont été soumises aux expériences CIU pour vérifier la différenciation de l'isotype par cette approche : l'adalimumab (IgG1), le panitumumab (IgG2) et le natalizumab (IgG4). La référence IgG1, adalimumab (Humira®, AbbVie) est une protéine dirigée contre de la protéine TNF $\alpha$ , surexprimée chez les personnes atteintes de la maladie de Crohn<sup>70</sup>. Panitumumab a été autorisé par la FDA en 2007 pour le traitement du cancer colorectal<sup>71</sup> sous le nom de Vectibix® et natalizumab a été autorisé en 2004 pour le traitement de la sclérose en plaques<sup>72</sup> et la maladie de Crohn<sup>73</sup> sous le nom commercial de Tysabri®.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Alain Beck (IRPF, Saint-Julien en Genevois).

Les objectifs de ce travail ont été :

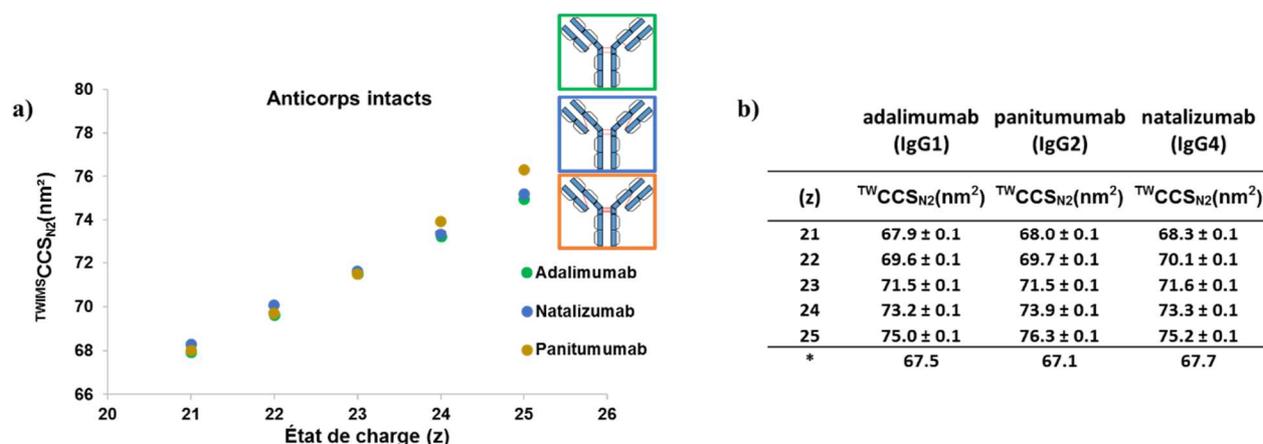
- d'évaluer la capacité de différenciation de l'isotype d'un anticorps par IM-MS native et CIU à l'échelle intacte.
- d'évaluer la capacité de différenciation de l'isotype d'un anticorps par IM-MS native et CIU à l'échelle middle.
- d'appliquer cette méthodologie à l'anticorps hybride eculizumab.

## 3. Résumé des résultats.

### 3.1. Évaluation de l'approche CIU à l'échelle intacte pour la différenciation de l'isotype d'anticorps.

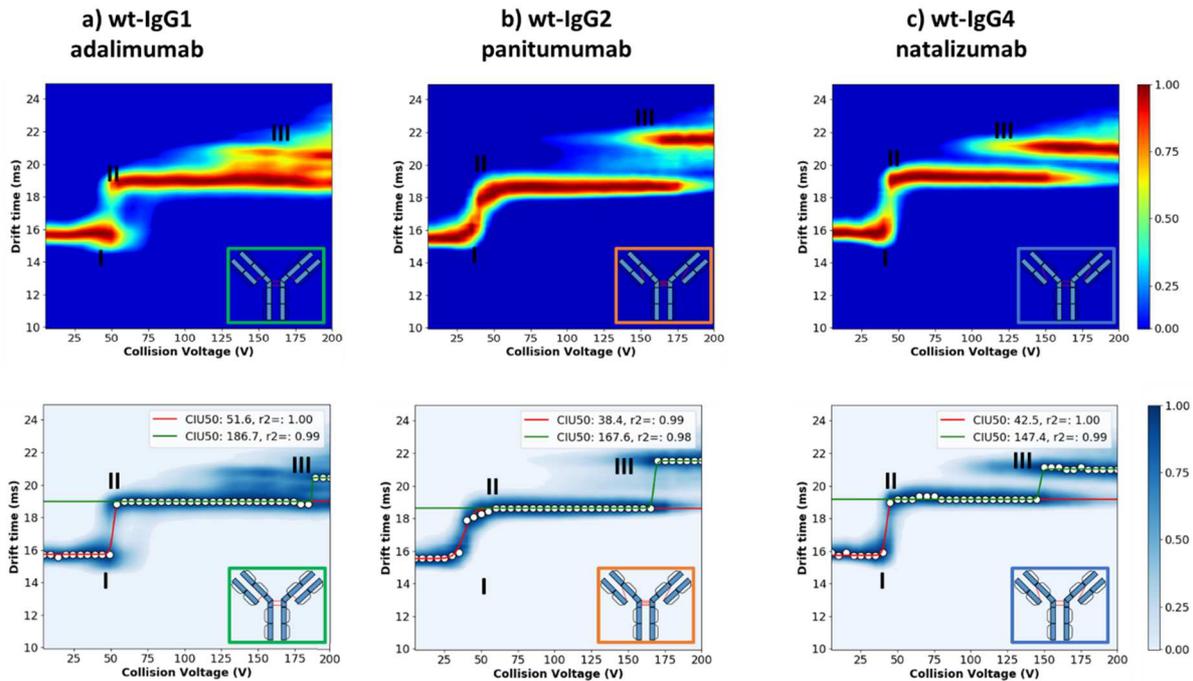
À l'échelle intacte, les CCS des trois anticorps de référence sont relativement proches ( $<0,5 \text{ nm}^2$ ) pour de faibles états de charge (figure 31). Pour l'état de charge 21+, adalimumab, panitumumab et natalizumab présentent respectivement une CCS de  $67,9 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ ,  $68,0 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et  $68,3 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ . En revanche pour des états de charge plus élevés, comme l'état de charge 25+, deux groupes peuvent être distingués : un premier groupe composé d'adalimumab et natalizumab respectivement IgG1 et IgG4 avec une CCS de  $75,0 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et  $75,2 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et un second groupe composé de la référence IgG2, panitumumab, avec une CCS de  $76,3 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ . Ainsi les CCS de l'IgG1 et de l'IgG4 sont peu différentes ( $<0,5 \text{ nm}^2$ ) quel que soit l'état de charge, en revanche les CCS de l'IgG2 diffèrent ( $>0,5$

nm<sup>2</sup>) des autres IgGs pour les états de charge 24+ et 25+. Ces résultats obtenus en IM-MS native ne permettent pas de différencier les trois types d'IgGs et sont en accord les travaux du Dr. Ruotolo<sup>30</sup>.



**Figure 31.** Caractérisation conformationnelle des anticorps intacts par IM-MS native. Les mesures  $^{TW}CCS_{N_2}$  des différents anticorps références sont présentées en fonction de l'état de charge (a). Les CCS expérimentales d'adalimumab (référence IgG1), panitumumab (référence IgG2) et natalizumab (référence IgG4) sont respectivement représentées en vert, orange et bleu. La valeur moyenne et l'écart-type des mesures sont présentés en b. Les valeurs de CCS estimées à partir de la masse des anticorps sont annotées avec une astérisque et ont été calculées à partir de l'équation  $CCS = 2.435 \times (M)^{(2/3)}$ <sup>57</sup>.

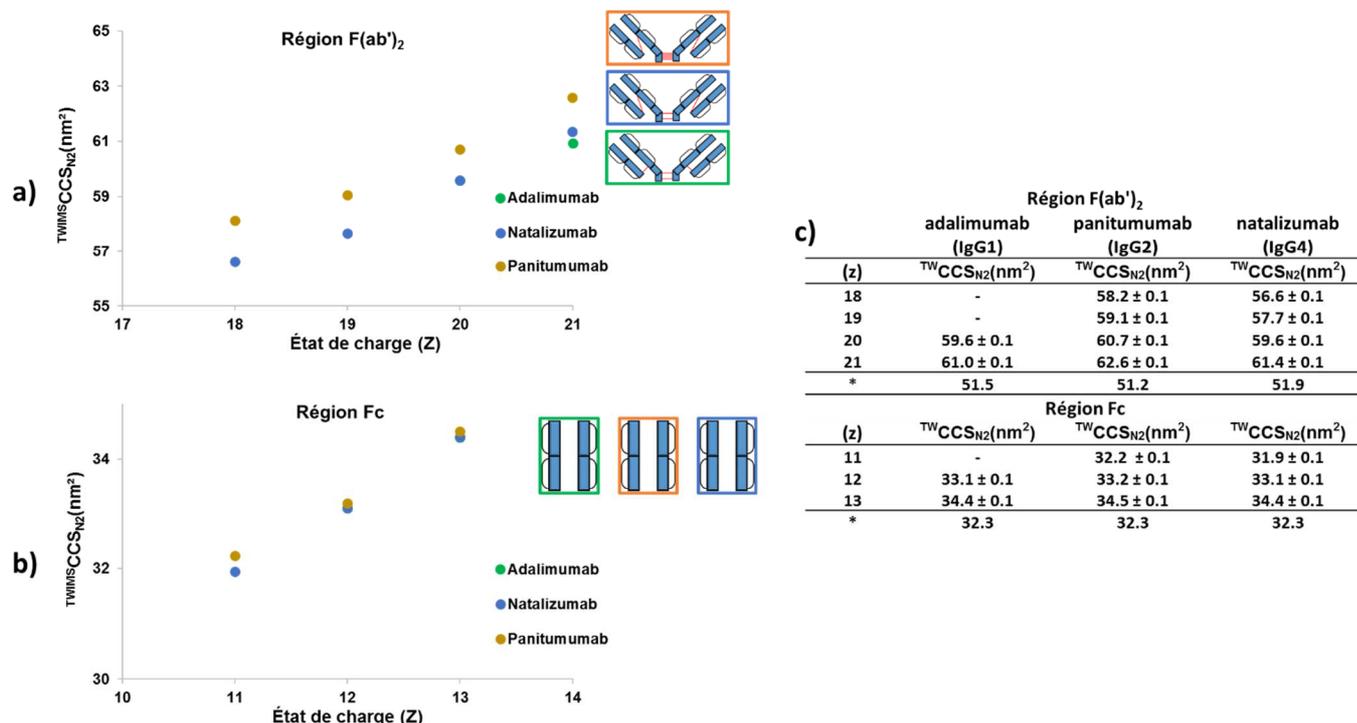
J'ai ensuite réalisé la caractérisation CIU de ces anticorps (figure 32). Chaque carte CIU présente un nombre de transitions identiques (deux dont les espèces conformationnelles ont été annotées I, II et III de l'état initial vers l'état le plus déplié) contrairement au travail cité précédemment<sup>30</sup> (travail réalisé sur des IgGs modèles). Cependant les énergies nécessaires à ces transitions semblent différentes pour chaque IgG. Les deux transitions ont respectivement lieu à 52 V, 38 V et 43 V (première transition, I-II) et 187 V, 168 V et 147 V (seconde transition, II-III) pour l'IgG1, l'IgG2 et l'IgG4.



**Figure 32.** Caractérisation des anticorps intacts par CIU (état de charge 22+). Les cartes CIU représentées (haut, cartes à fond bleu) correspondent à la carte CIU moyenne obtenue pour chaque anticorps à partir de triplicata analytiques de 0 à 200 V par pas de 5 V générées avec CIUsuite 2. Les cartes CIU à fond gris appelées cartes de stabilité sont générées à partir des cartes CIU moyennes afin de déterminer la tension nécessaire pour observer 50% du second état conformationnel de chaque transition appelée CIU50.

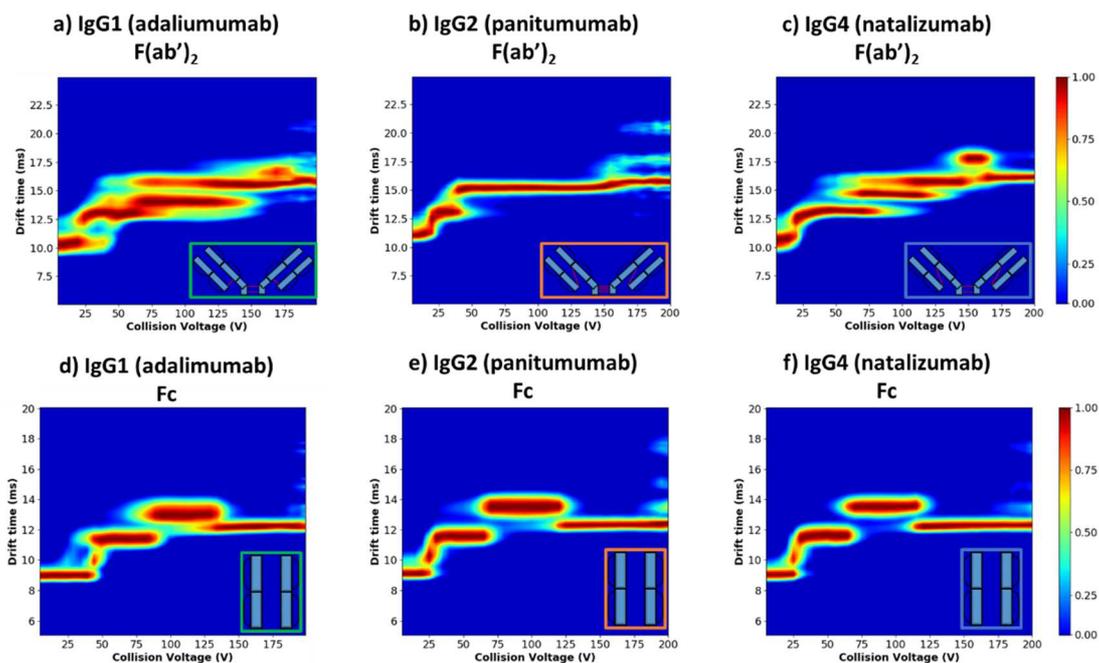
### 3.2. Évaluation de l'approche CIU à l'échelle middle pour la différenciation de l'isotype d'anticorps.

Afin d'améliorer potentiellement la différenciation des IgGs grâce aux mesures de CCS, j'ai réalisé une digestion IdeS<sup>74</sup> (*immunoglobulin-degrading enzyme of Streptococcus pyogenes*) des anticorps afin de séparer la région F(ab')<sub>2</sub> et la région Fc. Pour l'état de charge 20+ (figure 33), les CCS mesurées sur les régions F(ab')<sub>2</sub> sont respectivement de  $59,6 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ ,  $60,7 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et  $59,6 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  pour les références IgG1, IgG2 et IgG4. À nouveau, la CCS de la référence IgG2 semble plus étendue que celles des deux autres d'IgGs. La similarité observée entre IgG1 et IgG4 peut être due à leur même nombre de ponts disulfures sur la région charnière incluse dans la région (Fab')<sub>2</sub>. Concernant la région Fc, les CCS observées pour l'état de charge 12+ sont identiques quel que soit l'isotype de l'anticorps avec respectivement  $33,1 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ ,  $33,2 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  and  $33,1 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  pour les références IgG1, IgG2 et IgG4. Ces résultats permettent de mettre en évidence que les régions Fc ont des conformations identiques en IM-MS native quel que soit l'isotype de l'anticorps et qu'ainsi elles ne permettent pas leur différenciation.



**Figure 33.** Caractérisation conformationnelle des régions F(ab')<sub>2</sub> et des régions Fc par IM-MS native. Les mesures  $^{TW}CCS_{N_2}$  des différents anticorps références sont présentées en fonction de l'état de charge pour la région F(ab')<sub>2</sub> (a) et la région Fc (b). Les CCS expérimentales d'adalimumab (référence IgG1), panitumumab (référence IgG2) et natalizumab (référence IgG4) sont respectivement représentées en vert, orange et bleu. La valeur moyenne et l'écart-type des mesures sont présentés en c. Les valeurs de CCS estimées à partir de la masse des deux régions sont annotées avec une astérisque et ont été calculées à partir de l'équation  $CCS = 2,435 \times (M)^{(2/3)^{57}}$ .

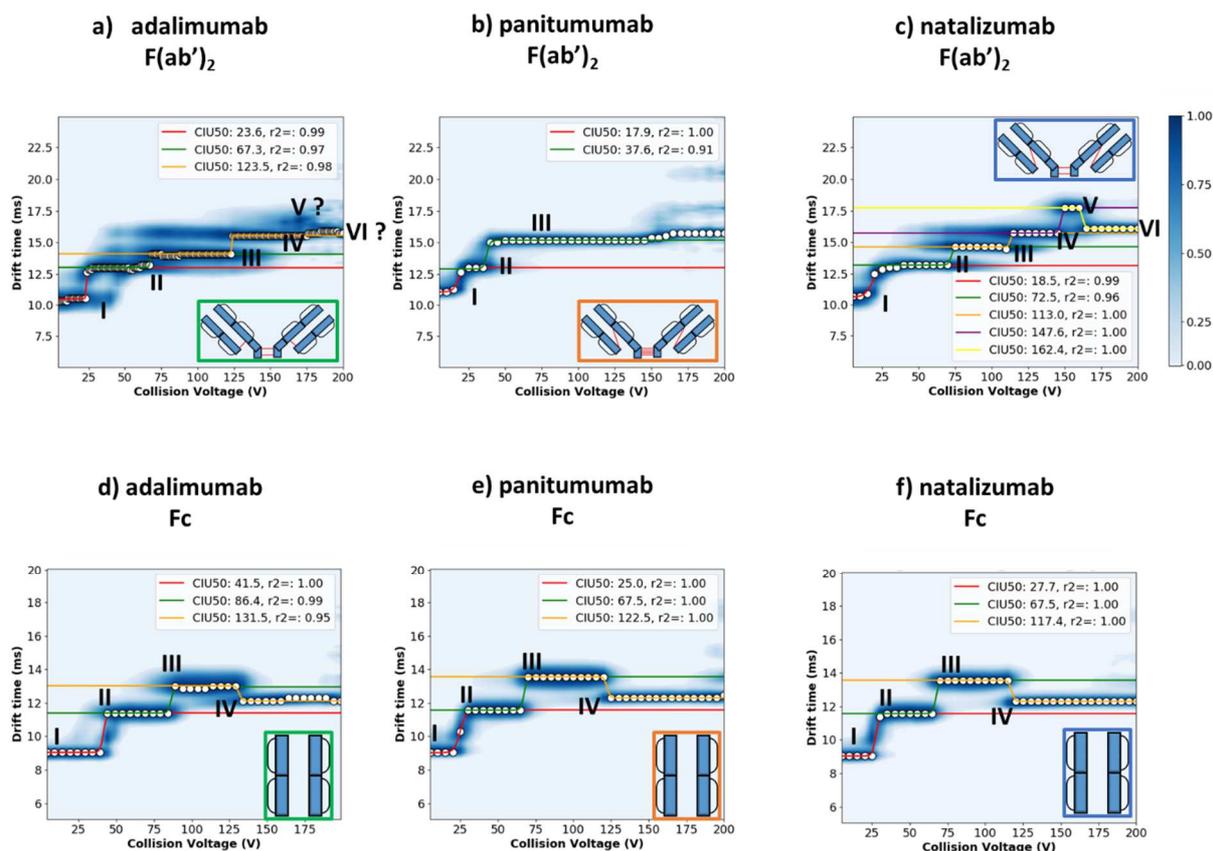
J'ai ensuite réalisé la caractérisation CIU des régions F(ab')<sub>2</sub> et des régions Fc afin d'évaluer la capacité de différenciation de cette approche à l'échelle middle. Pour la région (Fab')<sub>2</sub>, les cartes CIU sont très différentes (figure 34a-c) contrairement à l'échelle intacte. Un plus grand nombre de transitions est observé pour les références IgG1 et IgG4 en comparaison avec la référence IgG2. Cette forte stabilisation de l'IgG2 en phase gazeuse peut provenir de la présence de deux ponts disulfures additionnels sur la région charnière. Pour la région Fc, les cartes CIU sont hautement similaires quel que soit l'isotype de l'anticorps.



**Figure 34.** Caractérisation CIU des régions (Fab')<sub>2</sub> (état de charge 21+) et des régions Fc (état de charge 12+). Les cartes CIU représentées correspondent à la carte CIU moyenne obtenue pour chaque région et chaque anticorps. Ces cartes ont été obtenues à partir de triplicata analytiques de 0 à 200 V par pas de 5 V générées avec CIUsuite 2<sup>38</sup>.

Afin de finement décrire les transitions observées, j'ai utilisé le logiciel CIUsuite<sup>238</sup> afin d'extraire les valeurs de tensions nécessaires pour la transition de chaque état conformationnel pour les régions F(ab')<sub>2</sub> (figure 35a-c) et pour les régions Fc (figure 35d-f). Les valeurs CIU50 des transitions peuvent ainsi être déterminées. Concernant les régions F(ab')<sub>2</sub>, pour l'IgG4 (natalizumab), les 5 transitions reliant les 6 états conformationnels observés sont détectées. En revanche, les transitions de l'IgG1 sont mal détectées par le logiciel. En effet, seules 3 transitions à 24 V, 67 V et 124 V reliant respectivement les états conformationnels I-II, II-III et III-IV sont détectées contre 6 états visualisés (les états V et VI étant probablement trop faibles pour être détectés comme deux espèces conformationnelles différentes). Concernant l'IgG2 les trois états conformationnels présents sont bien détectés avec des tensions CIU50 de 18 V (I-II) et 38 V (II-III).

Concernant les régions Fc, les 4 états conformationnels présents sur chaque carte sont détectés par le logiciel. Les valeurs de CIU50 ainsi déterminées permettent de mettre en évidence de fines différences entre les trois isotypes (tableau 5).



**Figure 35.** Cartes de stabilité des régions F(ab')<sub>2</sub> et des régions Fc pour chaque anticorps, générées à l'aide du logiciel CIUsuite2.

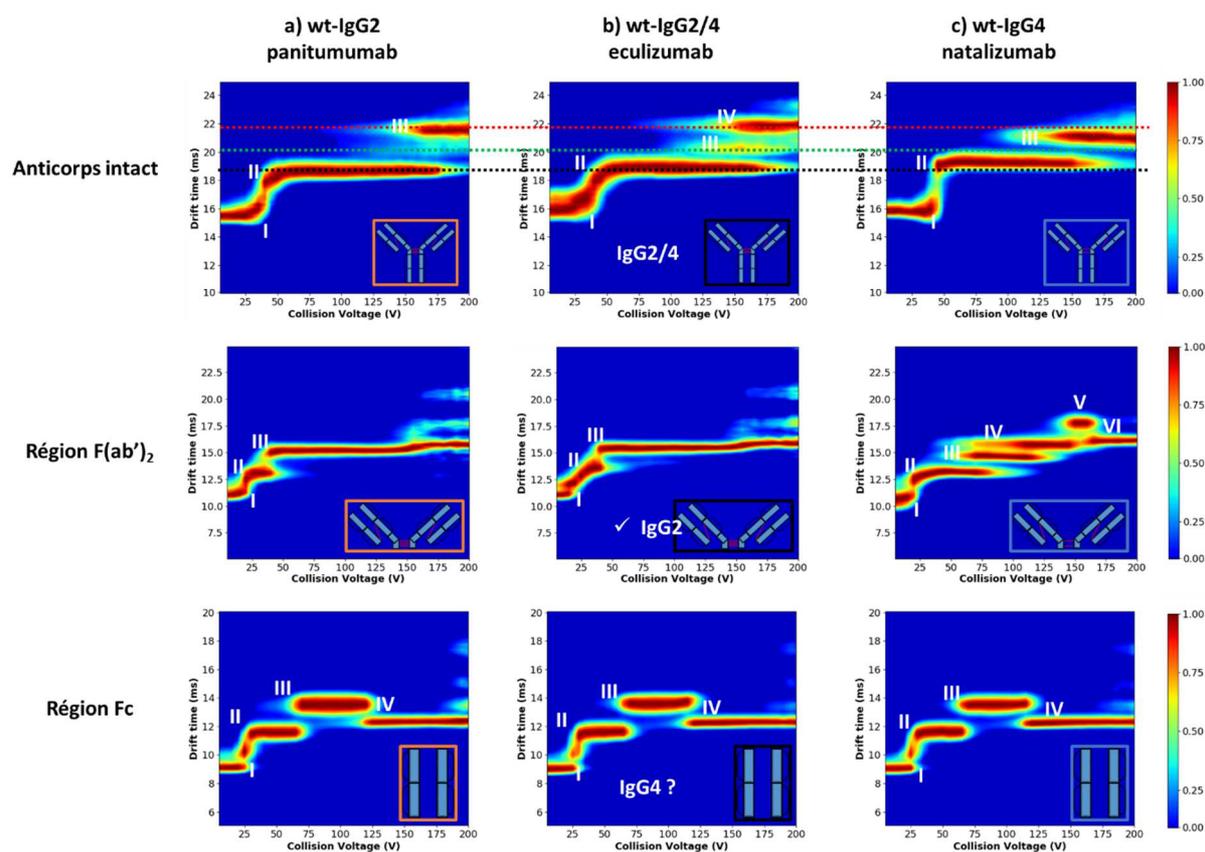
| Transition  | IgG1<br>(adalimumab) | IgG2<br>(panitumumab) | IgG4<br>(natalizumab) |
|---|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Tensions CIU 50 des régions F(ab') <sub>2</sub> (V) |                      |                       |                       |
| I-II  | 24                   | 18                    | 19                    |
| II-III  | 67                   | 38                    | 73                    |
| III-IV  | 124                  | -                     | 113                   |
| IV-V  | non détectée         | -                     | 148                   |
| V-VI  | non détectée         | -                     | 162                   |
| Tensions CIU 50 des régions Fc (V)                  |                      |                       |                       |
| I-II  | 42                   | 25                    | 28                    |
| II-III  | 86                   | 68                    | 68                    |
| III-IV  | 132                  | 123                   | 117                   |

**Tableau 5.** Comparaison des tensions CIU50 déterminées par CIUsuite2 à l'échelle *middle* pour les régions (Fab')<sub>2</sub> et les régions Fc des trois anticorps de référence.

### 3.3. Application de la méthodologie à un anticorps hybride : l'eculizumab.

Afin de mettre à l'épreuve les cartes CIU des isotopes de référence précédemment acquises, j'ai caractérisé l'eculizumab IgG2/4 à l'échelle intacte et à l'échelle *middle* puis comparé les résultats obtenus avec les anticorps de référence IgG2 et IgG4 (figure 36).

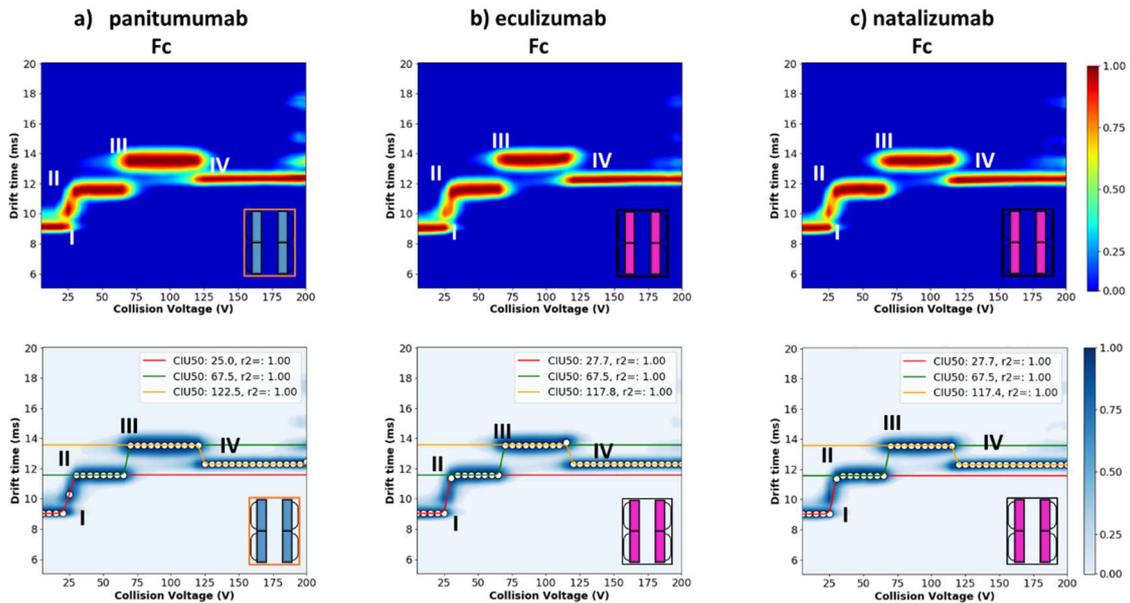
À l'échelle intacte, eculizumab présente des états conformationnels dont les temps de dérive sont similaires (II, IV) à ceux observés sur la référence IgG2 (II, III) mais aussi un état conformationnel supplémentaire aux deux IgGs de référence (III). Son temps de dérive est intermédiaire entre les états II et III des deux isotopes de référence et ne permet pas une détermination non ambiguë de son isotype. En revanche, à l'échelle *middle*, la région F(ab')<sub>2</sub> d'eculizumab présente 3 états conformationnels et est clairement similaire à la région de F(ab')<sub>2</sub> de l'isotype de référence IgG2 (3 états conformationnels) et différente de la région F(ab')<sub>2</sub> de l'IgG4 (6 états conformationnels). Les différences plus fines de la région Fc ont nécessité la détermination des tensions de transition CIU50.



**Figure 36.** Caractérisation de l'eculizumab par CIU à l'échelle intacte et à l'échelle *middle* et comparaison aux anticorps de référence IgG2 et IgG4.

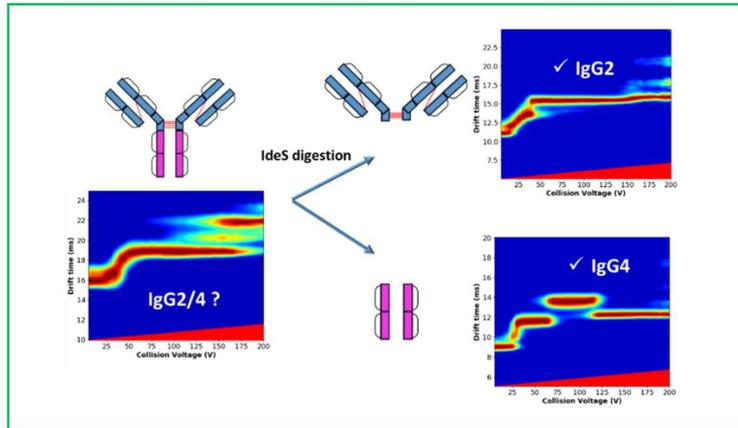
Les tensions CIU50 observées sur l'eculizumab (figure 37) (28 V, 68 V et 118 V) sont presque toutes identiques à celles détectées sur l'IgG4 (28, 68 V et 117 V) et légèrement différentes de celles de

l'IgG2 (25 V, 68 V et 123 V) permettant ainsi de proposer cette région d'eculizumab comme *IgG4 like*.



**Figure 37.** Détermination de l'isotype de la région Fc de l'eculizumab par CIU à l'aide des tensions CIU50.

La détermination de l'isotype d'un anticorps monoclonal thérapeutique hybride à l'aide d'empreintes CIU d'isotypes de référence a ici été démontrée et permet de montrer une application concrète de cette approche pour l'industrie pharmaceutique. En particulier, le caractère hybride de l'anticorps a été observé en CIU à l'échelle intacte avec une transition similaire à celle de notre IgG2 de référence (panitumumab) et une transition supplémentaire entre IgG2 et IgG4. Suite à une digestion enzymatique *IdeS* permettant de générer les fragments  $F(ab')_2$  et Fc de l'eculizumab, nous avons pu identifier que la région charnière (située sur le fragment  $F(ab')_2$ ) est similaire à celle d'une IgG2. Nous avons également observé que les profils de déploiement CIU sont très différents entre IgG2 et IgG4 à l'échelle du fragment  $F(ab')_2$  confirmant ainsi le pouvoir stabilisateur des ponts disulfures de la région charnière sur la conformation du mAb. La distinction entre IgG2 et IgG4 sur la région Fc est, elle, plus difficile à établir mais nous avons pu observer une différence subtile entre les profils CIU de déploiement et proposer la région Fc comme similaire à une IgG4 (figure 38). L'utilisation du module CIU50 proposé uniquement dans CIUSuite2 s'est avérée particulièrement intéressante pour la détection fine de différences entre deux cartes CIU.



**Figure 38.** Résumé des résultats obtenus par CIU pour la caractérisation de l'isotype de l'eculizumab.

#### 4. Conclusions.

L'approche CIU a permis de différencier les isotypes d'anticorps thérapeutiques utilisés comme références dans cette étude alors que les expériences d'IM-MS native ne le permettent pas. L'intérêt de l'approche *middle* a été soulignée dans cette optique pour la première fois : les résultats obtenus montrent que les régions (Fab')<sub>2</sub> sont les régions les plus informatives et que les régions Fc sont hautement similaires. Cette étude pourrait être directement transposée pour la caractérisation d'autres anticorps hybrides, de biosimilaires ou de *biobetters*.

#### 5. Valorisation.

L'étude présentée dans ce chapitre est actuellement en cours de rédaction.

## CONCLUSION DE CETTE PARTIE

Au cours de ce travail de thèse, l'approche CIU a été évaluée et mise en place au laboratoire. Suite aux optimisations instrumentales réalisées, un *workflow* permettant la caractérisation de plusieurs formats d'anticorps est maintenant utilisé pour de nombreux projets de recherche. En effet, la répétabilité et la reproductibilité (CV<5%) de cette technique permettent de tirer des conclusions précises et d'interpréter finement les résultats. Lors de ce travail, nous avons pu démontrer que cette approche est hautement informative et applicable à un grand nombre de formats de mAbs. Nous avons ici montré son application pour la différenciation de la forme oxydée et de la forme réduite d'un VHH (chapitre 2), l'étude de l'effet de la fixation de drogues sur un anticorps site spécifique (chapitre 3) et l'identification de l'isotype d'un anticorps monoclonal hybride (chapitre 4). Ces exemples montrent que dans certains cas la CIU permet de pallier le manque actuel de résolution de la cellule TWIMS dans les expériences d'IM-MS dites natives. De plus, la détermination de l'isotype d'un anticorps a été possible à l'échelle *middle* quand les résultats obtenus à l'échelle intacte n'ont pas permis sa détermination non ambiguë, les résultats obtenus ont permis de montrer que la région F(ab')<sub>2</sub> est la plus informative pour cette approche.

Sa progressive automatisation<sup>39</sup> et le développement de nouveaux logiciels<sup>38</sup> permettront probablement, dans quelques années, la démocratisation de la CIU au sein des laboratoires pharmaceutiques<sup>75</sup> et académiques comme une technique de caractérisation essentielle par exemple dans l'étude de biosimilaires<sup>76</sup> et de *biobetters*. Selon la *Food and Drug Administration*, le caractère comparatif de l'approche peut également être intéressant pour la différenciation de lots<sup>36</sup>. Le développement de nouvelles cellules de mobilité ionique TWIMS de haute résolution et la possibilité de réaliser des expériences de CIU<sup>n</sup> (c'est-à-dire la possibilité de réaliser une expérience CIU sur une espèce conformationnelle obtenue après une première expérience CIU) permettront une meilleure compréhension des processus de *unfolding* et contribueront à l'essor de cette technique<sup>77</sup>. De plus, les récents efforts réalisés en modélisation concernant le comportement structural des IgGs en fonction de leur séquence primaire<sup>78</sup> pourraient être croisés avec les données CIU afin d'intégrer définitivement cette approche parmi les outils de MS structurale.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mantovani, B.; Rabinovitch, M.; Nussenzweig, V., Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). *J Exp Med* **1972**, *135* (4), 780-92.
2. Sternberger, L. A.; Hardy, P. H., Jr.; Cuculis, J. J.; Meyer, H. G., The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **1970**, *18* (5), 315-33.
3. Peng, H. P.; Lee, K. H.; Jian, J. W.; Yang, A. S., Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (26), E2656-65.
4. Kohler, G.; Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495-7.
5. Beck, A.; Wurch, T.; Bailly, C.; Corvaia, N., Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10* (5), 345-52.
6. Sliwkowski, M. X.; Mellman, I., Antibody therapeutics in cancer. *Science* **2013**, *341* (6151), 1192-8.
7. Mulero, P.; Midaglia, L.; Montalban, X., Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord* **2018**, *11*, 1756286418773025.
8. Colombel, J. F.; Sandborn, W. J.; Reinisch, W.; Mantzaris, G. J.; Kornbluth, A.; Rachmilewitz, D.; Lichtiger, S.; D'Haens, G.; Diamond, R. H.; Broussard, D. L.; Tang, K. L.; van der Woude, C. J.; Rutgeerts, P.; Group, S. S., Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* **2010**, *362* (15), 1383-95.
9. Grilo, A. L.; Mantalaris, A., The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends Biotechnol* **2019**, *37* (1), 9-16.
10. Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N., Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (5), 315-337.
11. Debaene, F.; Boeuf, A.; Wagner-Rousset, E.; Colas, O.; Ayoub, D.; Corvaia, N.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A.; Cianferani, S., Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: High resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment. *Anal Chem* **2014**, *86* (21), 10674-83.
12. Marcoux, J.; Champion, T.; Colas, O.; Wagner-Rousset, E.; Corvaia, N.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A.; Cianferani, S., Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate. *Protein Sci* **2015**, *24* (8), 1210-23.
13. Botzanowski, T.; Erb, S.; Hernandez-Alba, O.; Ehkirch, A.; Colas, O.; Wagner-Rousset, E.; Rabuka, D.; Beck, A.; Drake, P. M.; Cianferani, S., Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *MAbs* **2017**, *9* (5), 801-811.
14. Panowski, S.; Bhakta, S.; Raab, H.; Polakis, P.; Junutula, J. R., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs* **2014**, *6* (1), 34-45.
15. Axup, J. Y.; Bajjuri, K. M.; Ritland, M.; Hutchins, B. M.; Kim, C. H.; Kazane, S. A.; Halder, R.; Forsyth, J. S.; Santidrian, A. F.; Stafin, K.; Lu, Y.; Tran, H.; Seller, A. J.; Biroc, S. L.; Szydlak, A.; Pinkstaff, J. K.; Tian, F.; Sinha, S. C.; Felding-Habermann, B.; Smider, V. V.; Schultz, P. G., Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (40), 16101-6.
16. Holder, P. G.; Jones, L. C.; Drake, P. M.; Barfield, R. M.; Banas, S.; de Hart, G. W.; Baker, J.; Rabuka, D., Reconstitution of Formylglycine-generating Enzyme with Copper(II) for Aldehyde Tag Conversion. *J Biol Chem* **2015**, *290* (25), 15730-45.
17. Beck, A.; D'Atri, V.; Ehkirch, A.; Fekete, S.; Hernandez-Alba, O.; Gahoual, R.; Leize-Wagner, E.; Francois, Y.; Guillarme, D.; Cianferani, S., Cutting-edge multi-level analytical and structural characterization of antibody-drug conjugates: present and future. *Expert Rev Proteomics* **2019**.
18. Valliere-Douglass, J. F.; McFee, W. A.; Salas-Solano, O., Native intact mass determination of antibodies conjugated with monomethyl Auristatin E and F at interchain cysteine residues. *Anal Chem* **2012**, *84* (6), 2843-9.
19. Ehkirch, A.; Hernandez-Alba, O.; Colas, O.; Beck, A.; Guillarme, D.; Cianferani, S., Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of

- therapeutic antibodies and related products. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2018**, *1086*, 176-183.
20. D'Atri, V.; Fekete, S.; Beck, A.; Lauber, M.; Guillarme, D., Hydrophilic Interaction Chromatography Hyphenated with Mass Spectrometry: A Powerful Analytical Tool for the Comparison of Originator and Biosimilar Therapeutic Monoclonal Antibodies at the Middle-up Level of Analysis. *Anal Chem* **2017**, *89* (3), 2086-2092.
  21. Gahoual, R.; Leize-Wagner, E.; Houze, P.; Francois, Y. N., Revealing the potential of capillary electrophoresis/mass spectrometry: the tipping point. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2018**.
  22. Said, N.; Gahoual, R.; Kuhn, L.; Beck, A.; Francois, Y. N.; Leize-Wagner, E., Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis - Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method. *Anal Chim Acta* **2016**, *918*, 50-9.
  23. Ehkirch, A.; D'Atri, V.; Rouviere, F.; Hernandez-Alba, O.; Goyon, A.; Colas, O.; Sarrut, M.; Beck, A.; Guillarme, D.; Heinisch, S.; Cianferani, S., An Online Four-Dimensional HICxSEC-IMxMS Methodology for Proof-of-Concept Characterization of Antibody Drug Conjugates. *Anal Chem* **2018**, *90* (3), 1578-1586.
  24. Ehkirch, A.; Goyon, A.; Hernandez-Alba, O.; Rouviere, F.; D'Atri, V.; Dreyfus, C.; Haeuw, J. F.; Diemer, H.; Beck, A.; Heinisch, S.; Guillarme, D.; Cianferani, S., A Novel Online Four-Dimensional SECxSEC-IMxMS Methodology for Characterization of Monoclonal Antibody Size Variants. *Anal Chem* **2018**.
  25. Terral, G.; Champion, T.; Debaene, F.; Colas, O.; Bourguet, M.; Wagner-Rousset, E.; Corvaia, N.; Beck, A.; Cianferani, S., Epitope characterization of anti-JAM-A antibodies using orthogonal mass spectrometry and surface plasmon resonance approaches. *MAbs* **2017**, *9* (8), 1317-1326.
  26. Terral, G.; Beck, A.; Cianferani, S., Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2016**, *1032*, 79-90.
  27. Atmanene, C.; Wagner-Rousset, E.; Malissard, M.; Chol, B.; Robert, A.; Corvaia, N.; Van Dorsselaer, A.; Beck, A.; Sanglier-Cianferani, S., Extending mass spectrometry contribution to therapeutic monoclonal antibody lead optimization: characterization of immune complexes using noncovalent ESI-MS. *Anal Chem* **2009**, *81* (15), 6364-73.
  28. Rabuck, J. N.; Hyung, S. J.; Ko, K. S.; Fox, C. C.; Soellner, M. B.; Ruotolo, B. T., Activation state-selective kinase inhibitor assay based on ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* **2013**, *85* (15), 6995-7002.
  29. Zhong, Y.; Han, L.; Ruotolo, B. T., Collisional and Coulombic unfolding of gas-phase proteins: high correlation to their domain structures in solution. *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53* (35), 9209-12.
  30. Tian, Y.; Han, L.; Buckner, A. C.; Ruotolo, B. T., Collision Induced Unfolding of Intact Antibodies: Rapid Characterization of Disulfide Bonding Patterns, Glycosylation, and Structures. *Anal Chem* **2015**, *87* (22), 11509-15.
  31. Loo, J. A.; Loo, R. R.; Udseth, H. R.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D., Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1991**, *5* (3), 101-5.
  32. El-Kabbani, O.; Rogniaux, H.; Barth, P.; Chung, R. P.; Fletcher, E. V.; Van Dorsselaer, A.; Podjarny, A., Aldose and aldehyde reductases: correlation of molecular modeling and mass spectrometric studies on the binding of inhibitors to the active site. *Proteins* **2000**, *41* (3), 407-14.
  33. Stojko, J.; Fieulaine, S.; Petiot-Becard, S.; Van Dorsselaer, A.; Meinel, T.; Giglione, C.; Cianferani, S., Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *Analyst* **2015**, *140* (21), 7234-45.
  34. Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T., Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Anal Chem* **2010**, *82* (22), 9557-65.
  35. FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CVM. 2013.
  36. Ferguson, C. N.; Gucinski-Ruth, A. C., Evaluation of Ion Mobility-Mass Spectrometry for Comparative Analysis of Monoclonal Antibodies. *J Am Soc Mass Spectrom* **2016**, *27* (5), 822-33.
  37. Eschweiler, J. D.; Rabuck-Gibbons, J. N.; Tian, Y.; Ruotolo, B. T., CIUSuite: A Quantitative Analysis Package for Collision Induced Unfolding Measurements of Gas-Phase Protein Ions. *Anal Chem* **2015**, *87* (22), 11516-22.

38. Polasky, D. A.; Dixit, S. M.; Fantin, S. M.; Ruotolo, B. T., CIUSuite 2: Next-Generation Software for the Analysis of Gas-phase Protein Unfolding Data. *Anal Chem* **2019**.
39. Migas, L. G.; France, A. P.; Bellina, B.; Barrann, P. E., &ITORIGAMI&IT: A software suite for activated ion mobility mass spectrometry (aIM-MS) applied to multimeric protein assemblies. *Int J Mass Spectrom* **2018**, *427*, 20-28.
40. Goldman, E. R.; Liu, J. L.; Zabetakis, D.; Anderson, G. P., Enhancing Stability of Camelid and Shark Single Domain Antibodies: An Overview. *Front Immunol* **2017**, *8*, 865.
41. Harmsen, M. M.; De Haard, H. J., Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *77* (1), 13-22.
42. Muyldermans, S., Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* **2013**, *82*, 775-97.
43. Agency, E. M., Cabliivi. 2018.
44. Rothbauer, U.; Zolghadr, K.; Muyldermans, S.; Schepers, A.; Cardoso, M. C.; Leonhardt, H., A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics* **2008**, *7* (2), 282-9.
45. Conrath, K.; Pereira, A. S.; Martins, C. E.; Timoteo, C. G.; Tavares, P.; Spinelli, S.; Kinne, J.; Flaudrops, C.; Cambillau, C.; Muyldermans, S.; Moura, I.; Moura, J. J.; Tegoni, M.; Desmyter, A., Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase. *Protein Sci* **2009**, *18* (3), 619-28.
46. Huston, J. S.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; McCartney, J.; Warren, F.; Haber, E.; Oppermann, H., Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol* **1991**, *203*, 46-88.
47. De Meyer, T.; Laukens, B.; Nolf, J.; Van Lerberge, E.; De Rycke, R.; De Beuckelaer, A.; De Buck, S.; Callewaert, N.; Depicker, A., Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*. *Plant Biotechnol J* **2015**, *13* (7), 938-47.
48. Liu, Y.; Huang, H., Expression of single-domain antibody in different systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **2018**, *102* (2), 539-551.
49. Rahbarzadeh, F.; Rasae, M. J.; Forouzandeh, M.; Allameh, A. A., Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Immunol* **2006**, *43* (5), 426-35.
50. Ezzine, A.; el Adab, S. M.; Bouhaouala-Zahar, B.; Hmila, I.; Baciou, L.; Marzouki, M. N., Efficient expression of the anti-AahI' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnol Appl Bioc* **2012**, *59* (1), 15-21.
51. Kent, S. B. H., Novel protein science enabled by total chemical synthesis. *Protein Sci* **2019**, *28* (2), 313-328.
52. Schumacher, D.; Helma, J.; Schneider, A. F. L.; Leonhardt, H.; Hackenberger, C. P. R., Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57* (9), 2314-2333.
53. Yu, D.; Hung, M. C., Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* **2000**, *19* (53), 6115-21.
54. Kozak, M., Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* **1983**, *47* (1), 1-45.
55. Pritchard, C.; O'Connor, G.; Ashcroft, A. E., The Role of Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry in the Analysis of Protein Reference Standards. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (15), 7205-7212.
56. Shepherd, D. A.; Holmes, K.; Rowlands, D. J.; Stonehouse, N. J.; Ashcroft, A. E., Using Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry to Decipher the Conformational and Assembly Characteristics of the Hepatitis B Capsid Protein. *Biophys J* **2013**, *105* (5), 1258-1267.
57. Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L.; Sandercock, A. M.; Hyung, S. J.; Robinson, C. V., Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat Protoc* **2008**, *3* (7), 1139-52.
58. Farias, S. E.; Strop, P.; Delaria, K.; Galindo Casas, M.; Dorywalska, M.; Shelton, D. L.; Pons, J.; Rajpal, A., Mass spectrometric characterization of transglutaminase based site-specific antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem* **2014**, *25* (2), 240-50.
59. Beck, A.; Terral, G.; Debaene, F.; Wagner-Rousset, E.; Marcoux, J.; Janin-Bussat, M. C.; Colas, O.; Van Dorsselaer, A.; Cianferani, S., Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates. *Expert Rev Proteomics* **2016**, *13* (2), 157-83.
60. Rabuka, D.; Rush, J. S.; deHart, G. W.; Wu, P.; Bertozzi, C. R., Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nature Protocols* **2012**, *7* (6), 1052-1067.
61. Stojko, J. Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macrobiomolécules et de leurs complexes associés. 2016.

62. Kretschmer, A.; Schwanbeck, R.; Valerius, T.; Rosner, T., Antibody Isotypes for Tumor Immunotherapy. *Transfus Med Hemother* **2017**, *44* (5), 320-326.
63. Casadevall, A.; Janda, A., Immunoglobulin isotype influences affinity and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (31), 12272-3.
64. Braster, R.; Grewal, S.; Visser, R.; Einarsdottir, H. K.; van Egmond, M.; Vidarsson, G.; Bogels, M., Human IgG3 with extended half-life does not improve Fc-gamma receptor-mediated cancer antibody therapies in mice. *Plos One* **2017**, *12* (5).
65. Schatz-Jakobsen, J. A.; Zhang, Y.; Johnson, K.; Neill, A.; Sheridan, D.; Andersen, G. R., Structural Basis for Eculizumab-Mediated Inhibition of the Complement Terminal Pathway. *J Immunol* **2016**, *197* (1), 337-44.
66. Hillmen, P.; Young, N. S.; Schubert, J.; Brodsky, R. A.; Socie, G.; Muus, P.; Roth, A.; Szer, J.; Elebute, M. O.; Nakamura, R.; Browne, P.; Risitano, A. M.; Hill, A.; Schrezenmeier, H.; Fu, C. L.; Maciejewski, J.; Rollins, S. A.; Mojciak, C. F.; Rother, R. P.; Luzzatto, L., The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* **2006**, *355* (12), 1233-43.
67. Wong, E. K.; Kavanagh, D., Anticomplement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Transl Res* **2015**, *165* (2), 306-20.
68. Kavanagh, D.; Richards, A.; Atkinson, J., Complement regulatory genes and hemolytic uremic syndromes. *Annu Rev Med* **2008**, *59*, 293-309.
69. Wong, E. K.; Goodship, T. H.; Kavanagh, D., Complement therapy in atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS). *Mol Immunol* **2013**, *56* (3), 199-212.
70. Cassinotti, A.; Ardizzone, S.; Porro, G. B., Adalimumab for the treatment of Crohn's disease. *Biologics* **2008**, *2* (4), 763-77.
71. Wu, M.; Rivkin, A.; Pham, T., Panitumumab: human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Ther* **2008**, *30* (1), 14-30.
72. Helliwell, C. L.; Coles, A. J., Monoclonal antibodies in multiple sclerosis treatment: current and future steps. *Ther Adv Neurol Disord* **2009**, *2* (4), 195-203.
73. Guagnozzi, D.; Caprilli, R., Natalizumab in the treatment of Crohn's disease. *Biologics* **2008**, *2* (2), 275-84.
74. Chevreux, G.; Tilly, N.; Bihoreau, N., Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* **2011**, *415* (2), 212-214.
75. Dixit, S. M.; Polasky, D. A.; Ruotolo, B. T., Collision induced unfolding of isolated proteins in the gas phase: past, present, and future. *Curr Opin Chem Biol* **2018**, *42*, 93-100.
76. Pisupati, K.; Tian, Y.; Okbazghi, S.; Benet, A.; Ackermann, R.; Ford, M.; Saveliev, S.; Hosfield, C. M.; Urh, M.; Carlson, E.; Becker, C.; Tolbert, T. J.; Schwendeman, S. P.; Ruotolo, B. T.; Schwendeman, A., A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima. *Anal Chem* **2017**, *89* (9), 4838-4846.
77. Eldrid, C.; Ujma, J.; Kalfas, S.; Tomczyk, N.; Giles, K.; Morris, M.; Thalassinou, K., Gas Phase Stability of Protein Ions in a Cyclic Ion Mobility Spectrometry Travelling Wave Device. 2018.
78. Hansen, K.; Lau, A. M.; Giles, K.; McDonnell, J. M.; Struwe, W. B.; Sutton, B. J.; Politis, A., A Mass-Spectrometry-Based Modelling Workflow for Accurate Prediction of IgG Antibody Conformations in the Gas Phase. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57* (52), 17194-17199.

***PARTIE 4 : COMBINAISON D'APPROCHES DE  
MS NATIVE À D'AUTRES TECHNIQUES  
BIOPHYSIQUES POUR LA CARACTÉRISATION  
DE COMPLEXES MULTIPROTÉIQUES.***



# ***PARTIE 4 : COMBINAISON D'APPROCHES DE MS NATIVE À D'AUTRES TECHNIQUES BIOPHYSIQUES POUR LA CARACTÉRISATION DE COMPLEXES MULTIPROTÉIQUES.***

L'objectif de cette partie de ma thèse était d'appliquer des méthodes de MS native et IM-MS native pour la caractérisation de complexes multiprotéiques solubles divers : le suivi de la stabilité d'un centre Fe-S présent dans la protéine homodimérique mitoNEET (chapitre 1), l'association du complexe multiprotéique (NIUAF)<sub>2</sub> constituée de nombreuses sous-unités hétérogènes (chapitre 2) et la caractérisation d'un hétérodimère de taille variable qui ne cristallise pas : le système GacS/RetS (chapitre 3). Dans ces études, la MS a été combinée à plusieurs techniques biophysiques complémentaires, en collaboration avec différentes équipes académiques, afin de répondre à des questions de biologie structurale.

## **Chapitre 1 : La protéine mNT, une protéine pH senseur ?**

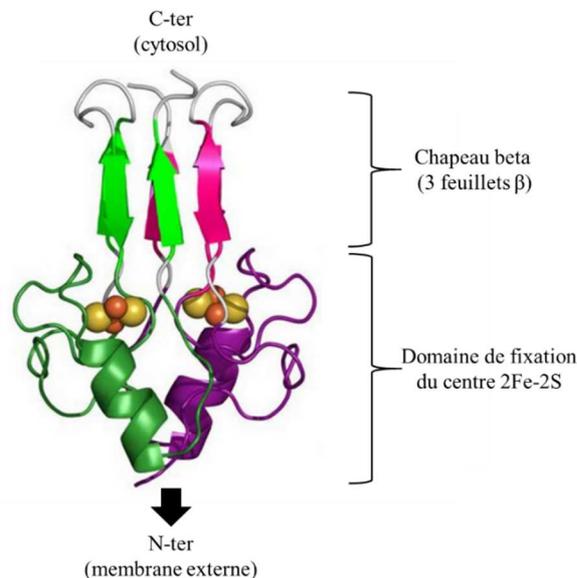
**Chapitre 2 : Caractérisation par MS native et IM-MS native d'un complexe de hauts poids moléculaire : le complexe (NIUAF)<sub>2</sub>.**

**Chapitre 3 : Apport du couplage SEC MS/IM-MS native pour la caractérisation de l'interaction GacS/RetS.**

# CHAPITRE 1 : LA PROTÉINE MNT, UNE PROTÉINE PH SENSEUR ?

## 1. Contexte de l'étude.

La protéine mitoNEET (mNT) est une protéine mitochondriale homodimérique ancrée dans la membrane externe<sup>1-3</sup>. Chaque monomère de 108 acides aminés est divisé en deux domaines : un domaine N-terminal de 32 acides aminés inséré dans la membrane et un domaine cytosolique de 76 acides aminés. Son domaine cytosolique inclut 3 cystéines (C72, C74 et C83) et 1 histidine (H87<sup>4</sup>) permettant la coordination d'un centre 2Fe-2S mis en évidence lors de la détermination de sa structure en 2007<sup>5</sup> (figure 1).



**Figure 1.** Représentation de la structure de mNT, extraite et modifiée de<sup>5</sup>. Les deux monomères sont représentés en vert et en violet. Les atomes de fer et de soufre sont respectivement représentés en orange et jaune.

Cette protéine est nommée mito de par sa localisation et NEET car historiquement elle a été découverte en 2004<sup>6</sup> à l'aide de la pioglitazone et un agent de pontage ciblant une séquence NEET sur les protéines contenues dans les mitochondries. Elle a par la suite été identifiée comme une potentielle cible thérapeutique dans plusieurs maladies comme le cancer du sein<sup>7</sup> mais aussi le diabète suite à sa capacité à fixer la pioglitazone<sup>5</sup>, un antidiabétique utilisé en France jusqu'en 2011<sup>8</sup>. Sa fonction au sein de la cellule est aujourd'hui mal connue et fait débat parmi les spécialistes<sup>9</sup>. En 2014, l'équipe du Dr. Marie Pierre Golinelli (ICSN, UPR 2301, Paris-Sud) a mis en évidence la capacité de mitoNEET à transférer son centre Fe-S à une autre protéine à centre Fe-S : la protéine IRP1<sup>10</sup>. IRP1 est impliquée dans l'homéostasie du fer des cellules mitochondriales et peut perdre son centre Fe-S suite à un stress

oxydatif<sup>10</sup>. La capacité de mNT à réaliser ce transfert et à réparer IRP1 en remplaçant son centre Fe-S vacant a été décrite comme hautement dépendante de son état d'oxydation : l'état oxydé de mNT permettant ce transfert alors que l'état réduit ne le permet pas. Cet état réduit est considéré comme un état dormant de mNT<sup>11-12</sup>. Suite à ces premiers résultats, une caractérisation fine de ce transfert Fe-S a été entreprise afin de répondre à plusieurs questions en suspens:

- Le transfert du centre Fe-S est-il direct entre mNT et une protéine réceptrice ?
- Dans des conditions oxydantes, quelle est la stabilité de mNT aux variations de pH ?
- Quel est le mécanisme d'assemblage du centre Fe-S chez mNT ?

## **2. Objectifs de l'étude et données préliminaires.**

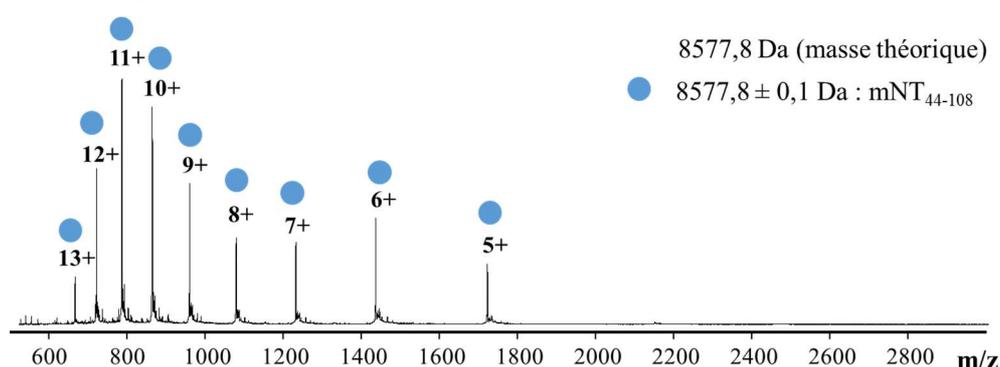
Dans ce contexte, en collaboration avec l'équipe du Dr. Marie-Pierre Golinelli (ICSN, UPR 2301, Paris-Sud), différentes expériences mettant en œuvre la MS native ont été réalisées avec les objectifs suivants :

- la caractérisation de l'état d'oligomérisation et du maintien du centre Fe-S de mNT en conditions oxydantes par MS native sous l'influence du pH.
- l'étude du transfert du centre Fe-S vers une protéine réceptrice modèle l'apoferrédoxine (apoFDX). Des expériences préliminaires réalisées sur gel natif (Dr. Cécile Mons, ICSN, UPR 2301, Paris-Sud) ont montré que le transfert de centre Fe-S de mNT vers l'apoFDX ne peut avoir lieu que si mNT est sous forme holo : le transfert du centre Fe-S semble donc être direct. En effet, la FDX ne capte pas de centre Fe-S après une déstabilisation du centre Fe-S de mNT (données présentées dans l'article joint en fin de chapitre). Face à ces données préliminaires, nous nous sommes demandés si le transfert avait lieu suite à un complexe entre les deux protéines.
- la compréhension du mécanisme d'assemblage du centre Fe-S de mNT en évaluant la stabilité du centre Fe-S après mutation de l'histidine 87.

### 3. Résultats.

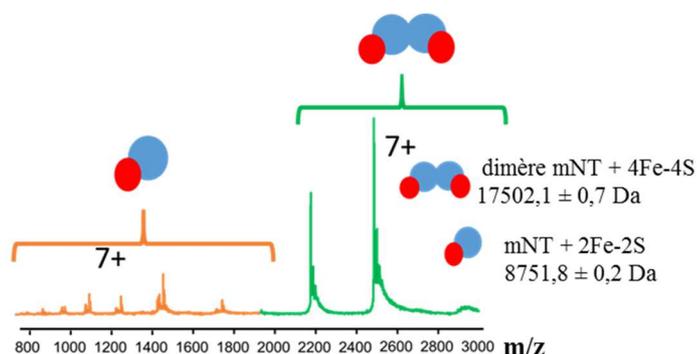
#### 3.1. Caractérisation de mNT par MS dénaturante et MS native.

L'homogénéité de mNT a été vérifiée par MS dénaturante. Une espèce majoritaire est observée avec une masse de  $8577,8 \pm 0,1$  Da avec une distribution des états de charge comprise entre 5+ et 13+. Cette masse correspond à la masse de la protéine mNTapo (sans centre Fe-S) sous forme monomérique (figure 2, masse théorique 8577,8 Da). Dans notre cas, la protéine mNT a été étudiée avec la partie N-terminale tronquée (mNT 44-108), partie enchâssée dans la membrane externe. Ce construit est par la suite noté mNT bien que tronqué de sa partie N-terminale.



**Figure 2.** Analyse MS de mNT à 2  $\mu$ M en conditions dénaturantes (ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH, 50/50/1, v/v/v). mNT sous forme monomérique et sans centre Fe-S est représentée par un rond bleu. Vc : 40 V, Pi : 2 mbar, expérience réalisée sur le LCT.

L'analyse par MS native de mNT (figure 3) permet d'observer une protéine majoritairement dimérique (vert) en présence de 2Fe-2S par monomère avec une masse expérimentale de  $17\,502,1 \pm 0,7$  Da en bonne corrélation avec la masse théorique 17 506,8 Da Une forme minoritaire monomérique est aussi observée (orange), majoritairement en présence d'un centre 2Fe-2S avec une masse de  $8751,8 \pm 0,2$  Da (masse théorique : 8753,4 Da).

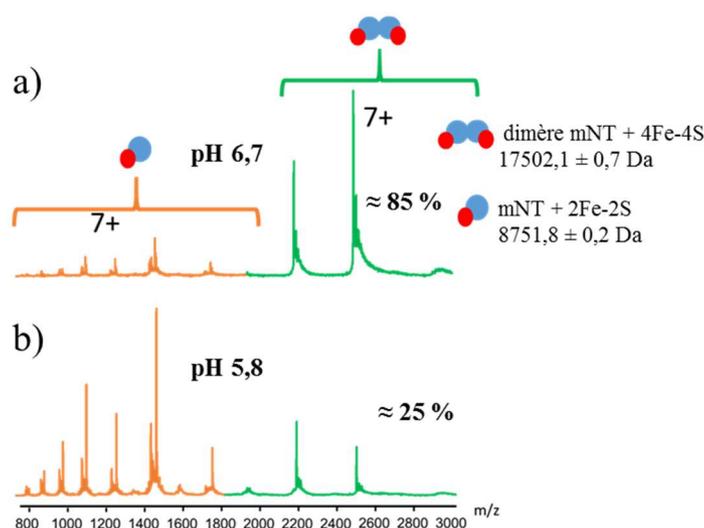


**Figure 3.** Analyse MS de mNT à 20  $\mu$ M en conditions natives à pH 6,7. Vc : 20 V, Pi : 6 mbar, expérience réalisée sur le LCT. Les signaux attribués à la protéine dimérique et monomérique sont respectivement notés en vert et en orange. L'échange de tampon a été réalisé à l'aide de mini colonnes de gel filtration Zeba™ Spin

(ThermoFisher Scientific) avec un seuil de coupure de 7 kDa et un volume total de 0,5 mL. Le tampon initial était composé de 100 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl pH 7,0 et le tampon utilisé en MS native était AcONH<sub>4</sub> 50 mM pH 6,7. La stabilité du centre Fe-S est similaire dans les deux tampons (expérience réalisée par le Dr. Cécile Mons, données non montrées).

### 3.2. Étude de l'état d'oligomérisation et du centre Fe-S en fonction du pH.

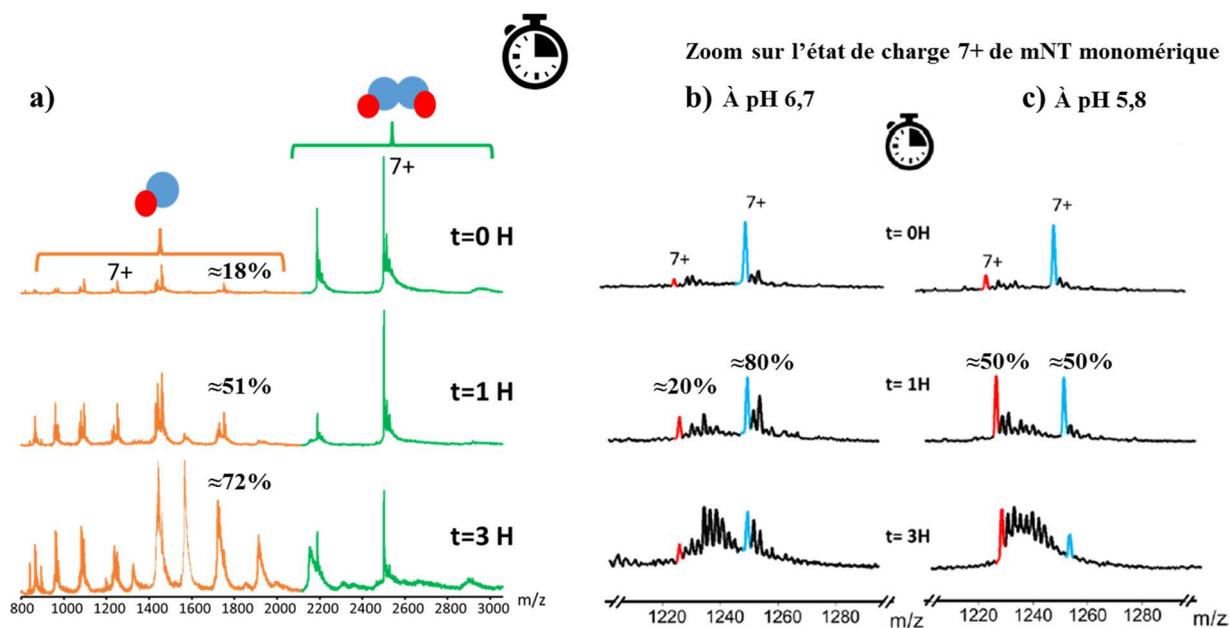
L'influence du pH sur l'état d'oligomérisation de mNT et sa capacité à maintenir le centre Fe-S a ensuite été étudiée. La figure 4 illustre la déstabilisation du dimère en monomère observée par MS native lors d'une diminution du pH. La proportion de forme dimérique (représentée en vert) est fortement diminuée à pH 5,8 (≈25%) en comparaison avec la proportion observée à pH 6,7 (≈85%).



**Figure 4.** Analyse MS de mNT à 20  $\mu$ M en conditions natives à pH 6,7 (a) et à pH 5,8 (b). Vc : 20 V, Pi : 6 mbar, expériences réalisées sur le LCT. Les signaux attribués à la protéine dimérique et monomérique sont respectivement notés en vert et en orange.

Un suivi cinétique a ensuite été réalisé à ces deux pHs afin d'étudier la stabilité de la protéine dans ces conditions (figure 5). La proportion de monomère augmente au cours du temps à pH 6,7 : de 18% juste après l'échange de tampon à 72% après 3 heures d'incubation à température ambiante (figure 5a, orange). De plus la distribution des états de charge du monomère est impactée laissant suggérer une dénaturation progressive du monomère. De manière concomitante, la proportion de monomère apo augmente montrant ainsi une perte de centre Fe-S (figure 5b). À pH 5,8, la perte de centre Fe-S est fortement accélérée (figure 5c) avec ≈ 50% de forme apo contre seulement 20% à pH 6,7 après une heure d'incubation. Ces résultats montrent qu'à pH acide le dimère et le centre Fe-S sont déstabilisés et que la forme monomérique de mNT n'est pas stable et perd sa capacité à maintenir le centre Fe-S. De manière intéressante, le dimère n'est jamais observé sous forme apo, ce résultat laisse suggérer

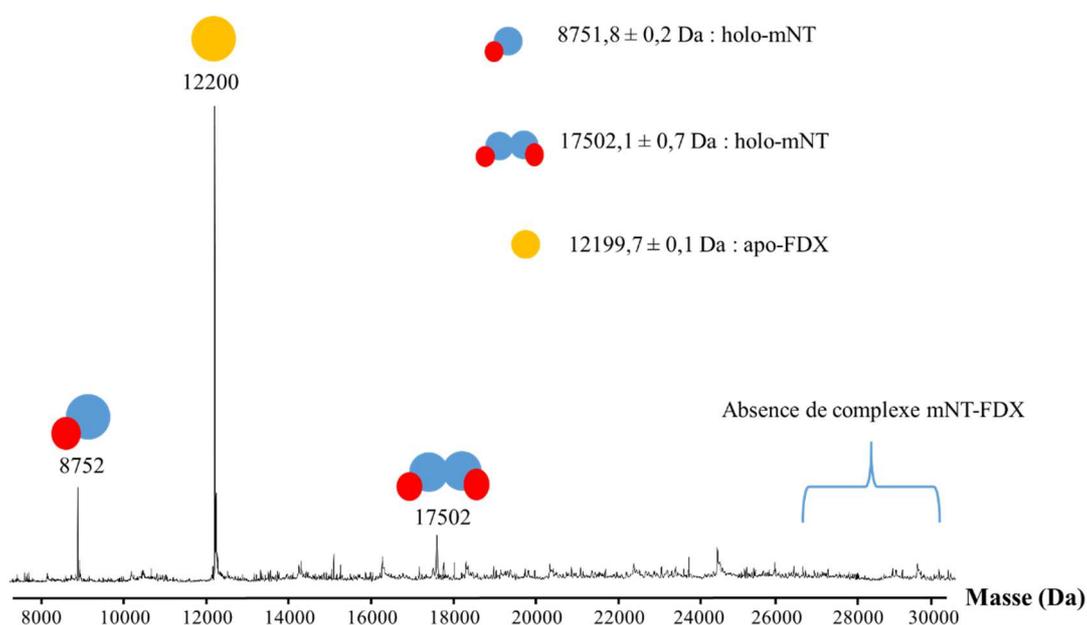
(sans le prouver) que la perte de centre Fe-S pourrait avoir lieu après la déstabilisation du dimère en monomère.



**Figure 5.** Suivi cinétique de l'état d'oligomérisation et du centre Fe-S de mNT à pH 6,7 et à pH 5,8.  $V_c$  : 20 V,  $P_i$  : 6 mbar, expériences réalisées sur le LCT. La déstabilisation du dimère en monomère au cours du temps à pH 6,7 est illustrée en (a). Les signaux attribués à la protéine dimérique et monomérique sont respectivement notés en vert et en orange. La perte progressive du centre Fe-S est illustrée à pH 6,7 (b) et à pH 5,8 (c). Les pics bleus et rouges sont respectivement attribués aux états de charge 7+ de mNT monomériques holo et apo. Les pics non annotés correspondent à la présence d'adduits soufre non spécifiques présents en excès dans le milieu de culture. Le dimère est observé sous forme holo quel que soit le temps d'incubation avec une masse de  $17502,1 \pm 0,7$  Da (vert), les formes monomériques sont observées sous forme apo (pic rouge) et holo (pic bleu) respectivement avec des masses de  $8577,8 \pm 0,4$  Da et  $8751,8 \pm 0,2$  Da.

### 3.3. Suivi du transfert potentiel du centre Fe-S de mNT l'apo ferredoxine par MS native.

mNT a ensuite été incubée en présence d'apoFDX en conditions stoechiométriques 1 : 1 à température ambiante afin d'étudier le transfert de son centre Fe-S<sup>13</sup>. Dans ces conditions expérimentales, aucun hétéro-complexe entre mNT et l'apoFDX n'a été observé par MS native (figure 6). Les expériences RMN réalisées par le Dr. Ewen Lescop n'ont également pas permis la détection d'un tel complexe (aucun changement n'est observé sur le spectre RMN de mNT en présence de l'apoFDX). Cependant, le transfert de centre Fe-S entre holomNT et apoFDX a pu être suivi sur gel natif (Dr. Cécile Mons) et a permis de montrer le transfert d'un centre 2Fe-2S de mNT vers l'apoFDX. Ces résultats sont présentés dans l'article joint en fin chapitre et indiquent que le transfert de centre Fe-S pourrait être régi par la formation d'un complexe transitoire.

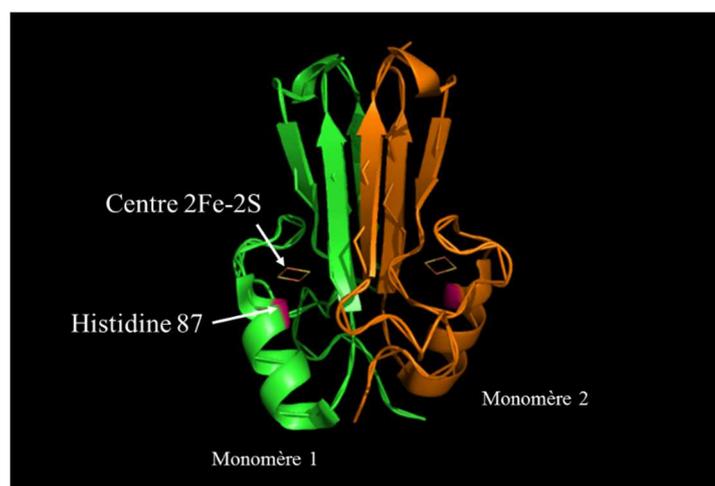


**Figure 6.** Spectre de masse déconvolué enregistré après incubation de mNT et apoFDX en stoechiométrie 1 : 1 (20  $\mu$ M) en conditions natives à pH 6,7 à température ambiante pendant 1 heure. Vc : 20 V, Pi : 6 mbar, expérience réalisée sur le LCT.

De plus, la stabilité du centre Fe-S de mNT à différents pHs a été étudiée en conditions anaérobiques (absence de dioxygène) par spectroscopie UV-Visible. Les résultats obtenus par le Dr. Cécile Mons ont montré une grande stabilité du centre Fe-S dans ces conditions (données montrées dans l'article joint). Par MS, une telle étude n'a pas été possible dans mon cas car les expériences ne sont pas réalisées dans une atmosphère contrôlée.

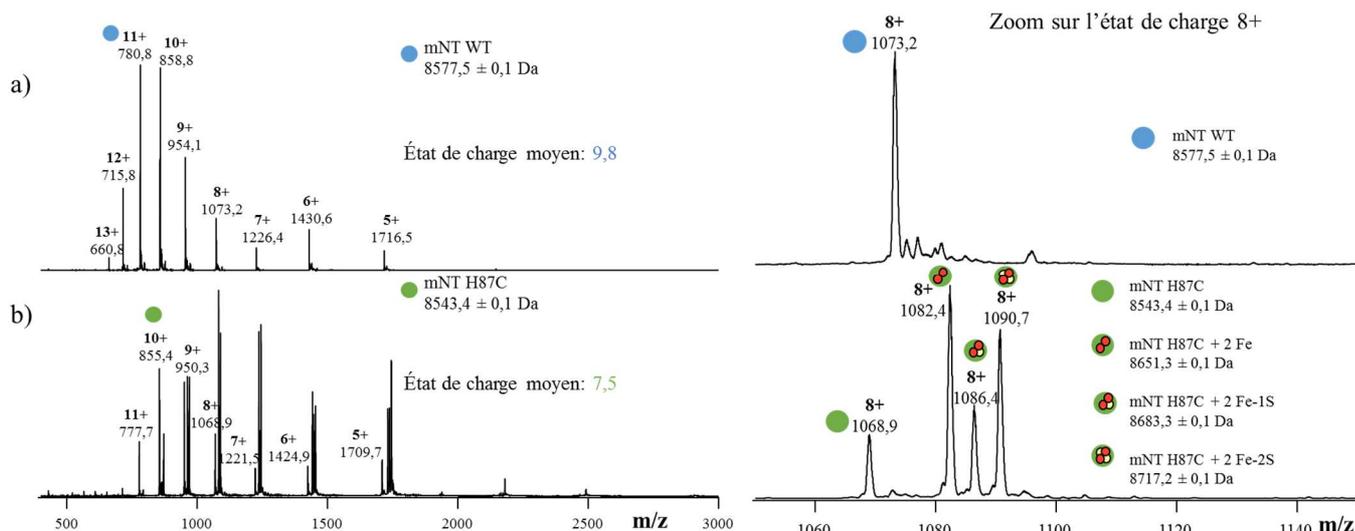
### 3.4. Stabilisation du centre Fe-S par mutation de l'histidine 87.

Afin de comprendre les déterminants moléculaires en lien avec la fixation du centre 2Fe-2S au sein de mNT nous avons caractérisé le mutant H87C par MS dénaturante, MS native et IM-MS native sur le Synapt G2 puis comparé les résultats obtenus avec le construit WT. En effet, la substitution de l'histidine 87 par une cystéine est connue pour stabiliser le centre Fe-S à travers un réseau de liaisons hydrogène<sup>4, 14</sup>. La position de l'histidine mutée est représentée en figure 7 sur la structure PDB 2QH7<sup>5</sup>.



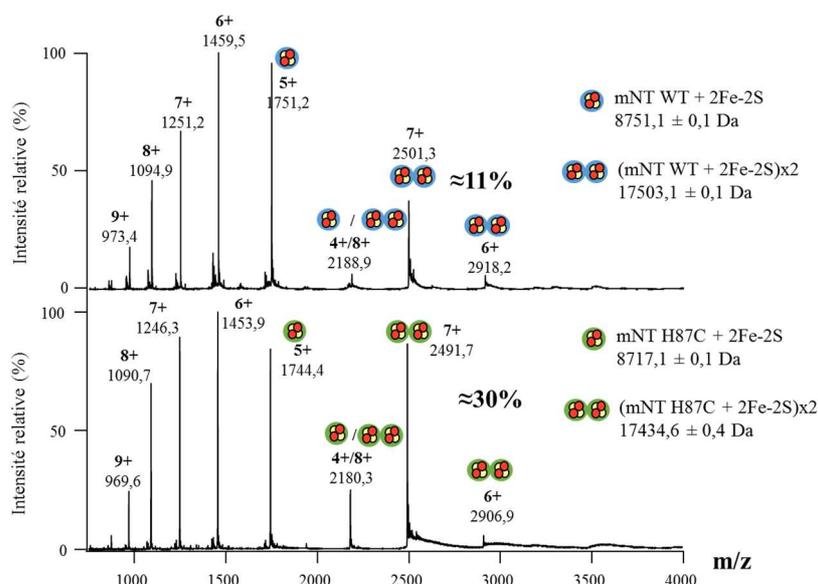
**Figure 7.** Représentation de la structure du dimère de mNT (PDB 2QH7)<sup>5</sup> en utilisant le logiciel Pymol. Le centre Fe-S est représenté par un losange et l'histidine 87 est représentée en rose. Les deux monomères de mNT sont représentés en orange et vert.

En MS dénaturante (figure 8), de manière surprenante environ 50% du centre Fe-S (évaluation basée sur la somme des intensités des états de charge) est encore maintenu sur mNT H87C contrairement au construit WT observé uniquement sous forme apo traduisant ainsi une stabilisation du centre Fe-S grâce à la mutation. De plus, mNT H87C est globalement moins chargée (z moyen : 7,5) en comparaison avec le construit WT (z moyen : 9,8). Ces résultats laissent supposer que la mutation de l'histidine par une cystéine engendre une forte stabilisation de la structure de la protéine car celle-ci capte moins de charges. Les deux espèces principales observées sur ce mutant sont la protéine monomérique avec le centre Fe-S complet (2Fe-2S) et la protéine monomérique avec le centre Fe-S avec uniquement 2 Fe. Une espèce correspondant à un centre avec 2Fe et 1 S est aussi observable en moindre proportion. L'espèce en plus faible proportion est le mutant monomérique apo. De manière intéressante, aucune espèce ne possédant que du S n'est observée et génère les questions suivantes : la présence du Fe est-elle indispensable pour que le soufre puisse venir se fixer ? La formation du centre Fe-S se fait elle en deux temps : 2 Fe puis 2S ?



**Figure 8.** Stabilisation du centre Fe-S lors de la mutation H87C caractérisée par MS dénaturante. mNT WT (a) et mNT H87C (b) ont subi exactement la même préparation d'échantillon, ont été analysés le même jour et les paramètres MS utilisés étaient strictement identiques. Vc : 40 V, Pi : 2 mbar, expériences réalisées sur le Synapt G2).

En MS native (figure 9), la proportion de dimère observée est supérieure sur le mutant H87C ( $\approx 30\%$ ) en comparaison avec le construit WT (11%) permettant de montrer que la mutation favorise également la stabilité de l'interface dimérique et pas uniquement le maintien du centre Fe-S. De plus la distribution des états de charge du monomère permet de suggérer que la protéine mNT ne possède pas un repliement 3D stable contrairement à la forme dimérique.

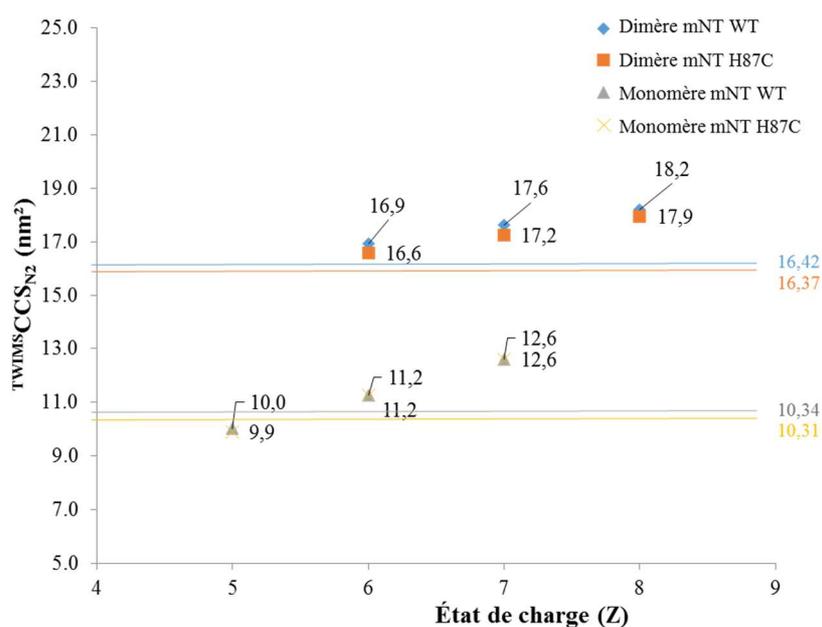


**Figure 9.** Stabilisation du centre Fe-S lors de la mutation H87C caractérisée par MS native à pH 5,8. mNT WT et mNT H87C ont subi exactement la même préparation d'échantillon, ont été analysés le même jour et les

paramètres MS utilisés étaient strictement identiques ( $V_c$  : 40 V,  $P_i$  : 6 mbar, expériences réalisées sur le Synapt G2).

Les analyses par MS dénaturante et par MS native de mNT WT et mNT H87C ont permis d'observer la forte stabilisation du centre Fe-S et un meilleur maintien du dimère sur la forme mutée. Afin de caractériser la conformation de ces deux construits et détecter d'éventuels changements induits par la mutation, nous avons réalisé des expériences de mobilité ionique (figure 10).

Les CCS mesurées sur les deux construits sont très proches : les CCS du dimère muté H87C sont légèrement inférieures d'environ 2% (respectivement  $16,6 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ ,  $17,2 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et  $17,9 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  pour les états de charge 6, 7 et 8+) à celles du dimère WT (respectivement  $16,9 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ ,  $17,6 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et  $18,2 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  pour les états de charge 6, 7 et 8+) mais aucun changement conformationnel global majeur lié à la mutation n'a été observé. Cette fine différence de CCS peut être imputée à la différence de masse provenant de la mutation (-34 Da). D'autre part, les CCS mesurées permettent de conclure que la protéine mNT WT et la protéine mNT H87C sont toutes les deux globulaires car les CCS expérimentales (points) sont proches des CCS calculées à partir de leur masse<sup>15</sup> (lignes).



**Figure 10.** CCS expérimentales mesurées sur les construits WT et H87C. Les étalons utilisés sont la beta lactoglobuline et le cytochrome C<sup>16</sup>. Les expériences ont été réalisées en triplicata analytiques sur le Synapt G2 le même jour.  $V_c$  : 40V,  $P_i$  : 6 mbar, QHe/N<sub>2</sub> : 150/25 mL/min, Trap CV : 4 V, trap gas : 5 mL/min, WV : 1250 m/s and VH : 30 V.

Face à ces résultats, deux hypothèses peuvent être dressées :

- aucun changement conformationnel global de mNT n'est induit par la mutation de l'histidine : seules les interactions centre Fe-S/mNT et mNT/mNT sont renforcées.
- un faible changement conformationnel global de mNT est induit par la mutation mais la technologie TWIMS ne permet pas de l'observer.

#### **4. Conclusions.**

Au cours de cette étude nous avons pu caractériser finement l'influence du pH sur l'état oligomérique et le maintien du centre Fe-S de la protéine mNT. La déstabilisation du dimère et la perte du centre Fe-S ont pu être observées de manière concomitante en diminuant le pH. Ces résultats ont permis de mettre en évidence le caractère pH senseur de mNT. La capacité de la MS native à analyser en temps réel ces changements a été illustrée et peut constituer un atout pour la caractérisation d'autres systèmes protéiques. De plus, la stabilisation du centre Fe-S par la mutation de l'histidine 87 a été clairement démontrée sur mNT. Des expériences de Vc50<sup>17</sup> pourraient être envisagées afin de sonder en phase gazeuse la stabilité du centre 2Fe-2S sur le mutant et le construit WT.

Cette étude illustre la combinaison d'approches de MS native avec la technique RMN et des techniques biochimiques. En effet, la MS a été la seule technique à pouvoir déterminer la stoechiométrie de mitoNEET et à observer directement la déstabilisation du dimère en monomère au cours du temps à différents pHs.

#### **5. Valorisation.**

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre de thèse a été intégrée dans un article publié dans *Biochemistry*<sup>18</sup> (joint ci-après).

Mons, C.; Botzanowski, T.; Nikolaev, A.; Hellwig, P.; Cianferani, S.; Lescop, E.; Bouton, C.; Golinelli-Cohen, M. P., "The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistant Fe-S Redox Switch MitoNEET Acts as a pH Sensor To Repair Stress-Damaged Fe-S Protein". *Biochemistry* (2018), 57 (38), 5616-5628.

# The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistant Fe–S Redox Switch MitoNEET Acts as a pH Sensor To Repair Stress-Damaged Fe–S Protein

Cécile Mons,<sup>†</sup> Thomas Botzanowski,<sup>‡</sup> Anton Nikolaev,<sup>§</sup> Petra Hellwig,<sup>§</sup> Sarah Cianfèrari,<sup>‡,†</sup> Ewen Lescop,<sup>†</sup> Cécile Bouton,<sup>†</sup> and Marie-Pierre Golinelli-Cohen<sup>\*,†,§</sup>

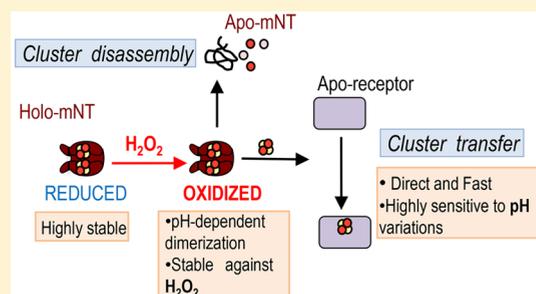
<sup>†</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

<sup>‡</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France

<sup>§</sup>Laboratoire de Bioélectrochimie et Spectroscopie, UMR 7140, Chimie de la Matière Complexe, Université de Strasbourg-CNRS, 1 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Human mitoNEET (mNT) is the first identified Fe–S protein of the mammalian outer mitochondrial membrane. Recently, we demonstrated the involvement of mNT in a specific cytosolic pathway dedicated to the reactivation of oxidatively damaged cytosolic aconitase by cluster transfer. *In vitro* studies using apo-ferredoxin (FDX) reveal that mNT uses an Fe-based redox switch mechanism to regulate the transfer of its cluster. Using the “gold standard” cluster recipient protein, FDX, we show that this transfer is direct and that only one of the two mNT clusters is transferred when the second one is decomposed. Combining complementary biophysical and biochemical approaches, we show that pH affects both the sensitivity of the cluster to O<sub>2</sub> and dimer stability. Around physiological cytosolic pH, the ability of mNT to transfer its cluster is tightly regulated by the pH. Finally, mNT is extremely resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to ISCU and SufB, two other Fe–S cluster transfer proteins, which is consistent with its involvement in a repair pathway of stress-damaged Fe–S proteins. Taken together, our results suggest that the ability of mNT to transfer its cluster to recipient proteins is not only controlled by the redox state of its cluster but also tightly modulated by the pH of the cytosol. We propose that when pathophysiological conditions such as cancer and neurodegenerative diseases dysregulate cellular pH homeostasis, this pH-dependent regulation of mNT is lost, as is the regulation of cellular pathways under the control of mNT.



Iron–sulfur (Fe–S) clusters are evolutionarily ancient and highly conserved prosthetic cofactors. Composed of only iron and sulfur, they are involved in many essential biological processes.<sup>1,2</sup> MitoNEET (mNT), also known as CISD1, is the first identified Fe–S protein of the mammalian outer mitochondrial membrane (OMM).<sup>3,4</sup> This is a small homodimeric protein (13 kDa for each monomer) anchored to the OMM by its 32-amino acid N-terminus with the major part of the protein, including the C-terminal Fe–S binding domain, located in the cytosol.<sup>4</sup> Each monomer accommodates one [2Fe-2S] cluster coordinated by three cysteines (C72, C74, and C83) and one histidine (H87) in a CDGSH domain<sup>5–8</sup> as other members of the NEET protein family,<sup>9</sup> which also includes Miner1 (or CISD2) and Miner2 (or CISD3) in mammals.<sup>10</sup> Although the biological activity of mNT is still debated,<sup>11</sup> studies have shown that it is involved in the regulation of iron/reactive oxygen species homeostasis,<sup>12–14</sup> in the regulation of lipid and glucose metabolism,<sup>13,15</sup> and in cell proliferation in breast cancer.<sup>16</sup>

*In vitro* studies revealed that holo-mNT (the form of the protein with the cluster) is able to transfer its Fe–S cluster to

very diverse apoprotein (an Fe–S protein, which has lost its cluster) recipients assembling either a [2Fe-2S] cluster as ferredoxin from various organisms,<sup>17,18</sup> human anamorsin<sup>19</sup> and CISD2,<sup>20</sup> or a [4Fe-4S] cluster as mammalian iron regulatory protein-1 (IRP-1)/cytosolic aconitase (c-aconitase).<sup>14</sup> On the basis of *in cellulo* experiments, we showed that mNT is able to repair the oxidatively damaged Fe–S cluster of human IRP-1/c-aconitase by transferring its cluster to the damaged protein.<sup>14</sup>

Recently, we started to investigate in depth the *in vitro* cluster transfer reaction, focusing on the transfer from holo-mNT to [2Fe-2S] recipient protein. We unambiguously demonstrated that oxidized mNT ([2Fe-2S]<sup>2+</sup>) triggers cluster transfer, whereas reduction of its cluster abrogates this transfer. Moreover, while O<sub>2</sub> significantly affects the lability of the oxidized mNT cluster, it does not interfere with the cluster

Received: July 20, 2018

Revised: August 22, 2018

transfer reaction. Thus, in contrast to the strict anoxia required for other Fe–S cluster transfer proteins such as ISCU, mNT is able to transfer its cluster even under aerobic conditions. The reduced form of mNT is extremely stable compared to the oxidized form, even though no major change in overall protein folding was found by NMR studies between these two redox states of the protein.<sup>17</sup> Thus, when reduced, mNT is in a dormant physiological state, while oxidative insults oxidize its cluster and switch it to an active state ready to initiate Fe–S transfer. Then, we proposed that mNT belongs to the new family of Fe–S proteins acting as a redox switch to control the adaptive cellular response after oxidative stress insult.<sup>21</sup> Recently, it was proposed that anamorsin might act as a regulator of mNT by transferring an electron to oxidized mNT and switching it to the reduced dormant state when oxidant stress is no longer present.<sup>22</sup>

In the study presented here, we pursue the *in vitro* characterization of the mNT cluster transfer reaction to a [2Fe–2S] recipient protein, apo-FDX, which is the “gold standard” used in various laboratories to study [2Fe–2S] cluster transfer processes.<sup>17,18,23–30</sup> We show that this transfer is a direct process and mNT transfers only one of its clusters to apo-FDX when the second one is decomposed. Combining different complementary biophysical and biochemical approaches, we show that pH affects both cluster coordination and vicinity and dimer stability, and maybe more importantly, it induces a tight regulation of the cluster transfer reaction around physiological values. Finally, we show that mNT is extremely resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to other Fe–S cluster transfer proteins such as IscU and SufB, in agreement with our proposed involvement of mNT in cluster repair after stress.

## MATERIALS AND METHODS

**Purifications of Holo-mNT<sub>44–108</sub> and Apo-FDX.** As described previously,<sup>14</sup> a construct missing the 43 N-terminal amino acids (mNT<sub>44–108</sub>) was expressed in fusion with a His tag at the C-terminal end of pET22b. Consequently, the purified mNT<sub>44–108</sub> form contains eight additional C-terminal residues derived from the His tag (LEHHHHHH) and will be named mNT herein. Holo-FDX was expressed from the pET21b plasmid (gift from S. Ollagnier de Choudens, Grenoble, France). Holo-mNT<sub>44–108</sub> and holo-FDX were expressed and purified as described previously.<sup>23</sup> The protein purity was assessed to be >99% using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). For the WT form of holo-mNT, the optical A<sub>280</sub>/A<sub>458</sub> ratio was near 2.3. Apo-FDX was prepared by heat cluster disassembly of purified holo-FDX in the presence of 10 mM dithiothreitol (DTT) and 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) followed by purification on a NAP-5 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris–HCl (pH 7.0) and 100 mM NaCl.<sup>23</sup>

For NMR analyses, expression of <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-labeled mNT<sub>44–108</sub> was performed on a 1 L scale in M9 minimal medium (containing 0.001% thiamine–HCl and 10 μM FeCl<sub>3</sub>), supplemented with 1.0 g of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl and 4.0 g of [<sup>13</sup>C]-D-glucose as the sole nitrogen and carbon sources, respectively.

Protein concentrations were measured using Bradford's assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard<sup>31</sup> or the absorbance at 280 nm of guanidine-denatured protein using values of 7115 and 7365 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (ProtParam) as extinction coefficients for mNT<sub>44–108</sub> and FDX, respectively. All protein concentrations were calculated on the basis of monomer equivalents.

## *In Vitro* mNT Cluster Loss and Transfer Reactions.

Except for native mass spectrometry, reaction buffers were all composed of 100 mM NaCl and 50 mM MES (pH 4.6 and 5.4), Bis-Tris (pH 5.8, 6.2, and 6.7), or Tris–HCl (pH >7.0). Native mass spectrometry studies were performed in 50 mM AcONH<sub>4</sub> (pH 5.8 or 6.7).

For cluster transfer reactions, apo-FDX was preincubated with 5 mM DTT for 30 min at room temperature under anaerobic conditions to ensure cysteine reduction. When specified, DTT was removed and buffer was exchanged to cluster transfer reaction buffer using a Micro Bio-Spin Size Exclusion column (Bio-Rad). Disassembled mNT (apo-mNT) was prepared by incubation of the protein in pH 6.2 reaction buffer at 65 °C for 10 min. Chemical Fe–S cluster reconstitution in FDX was performed in 50 mM Bis-Tris (pH 6.2), 100 mM NaCl, with 100 μM Na<sub>2</sub>S and ammonium iron(II) sulfate (Mohr's salt) or iron chloride (FeCl<sub>3</sub>) for 2 h at 25 °C under aerobic conditions. Reactions were followed by native mass spectrometry, ultraviolet–visible (UV–vis) absorption and NMR spectroscopies, or migration of aliquots taken at specific times (1 mM DTT was added to the samples before migration) on a 16% native PAGE gel colored with colloidal Coomassie staining as described in ref 23. T<sub>1/2</sub> is defined as the time required for half of the reaction to proceed. When necessary, protein gels were quantified using an Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences) and the percentage of holo-FDX was calculated as the ratio of the intensity of the holo-FDX band to the sum of the intensities of apo- and holo-FDX bands.

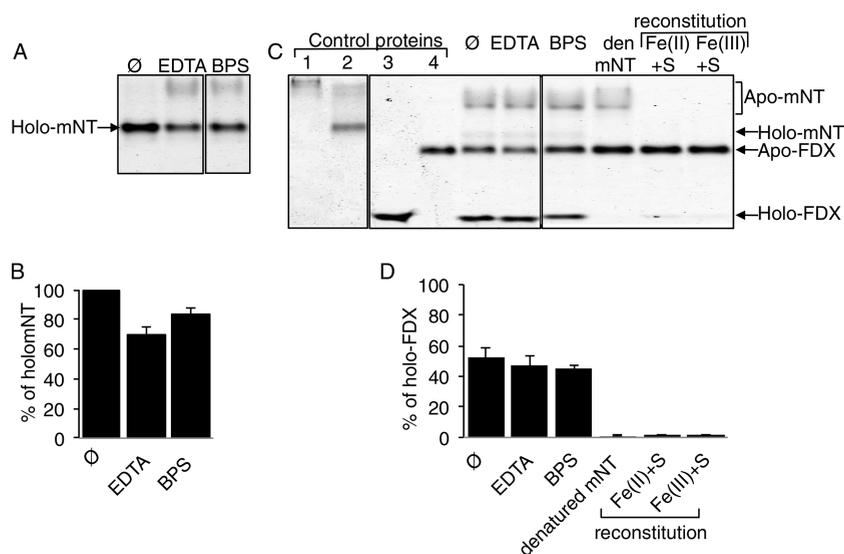
## UV–Vis Absorption and NMR Spectroscopy Studies.

UV–vis absorption spectra were recorded between 240 and 900 nm with a Cary 100 (Agilent) or Safas mc<sup>2</sup> (Monaco) spectrophotometer equipped with a temperature control apparatus set to the desired temperature. For spectra taken under anaerobic conditions, the cuvette was prepared in a glovebox and closed with a septum.

NMR experiments were performed using a Bruker Avance III 800 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Two-dimensional (2D) <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N band-selective optimized flip angle short transient heteronuclear multiple-quantum correlation (SOFAST-HMQC) spectra<sup>32</sup> were recorded using a 100 μM His-tagged <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-labeled holo-mNT<sub>44–108</sub> protein sample at 298 K in the specified buffers. UV–vis absorption and NMR spectroscopies were used as described in ref 23 to follow cluster loss and cluster transfer reactions.

**Iron Quantification.** Free and total irons were quantified using a bathophenanthroline colorimetric assay adapted from refs 33 and 34. For total iron quantification of a 100 μL protein sample, 10 μL of 54% perchloric acid was added. After 30 min at room temperature, 72 μL of 1.7 mg/mL bathophenanthroline sulfonate, 18 μL of 76 mg/mL sodium ascorbate, and 10 μL of a saturated ammonium acetate solution were added, and the reaction mixture was supplemented with water until the volume reached 350 μL. After 30 min at room temperature, the absorbance at 535 nm was measured. Free iron quantification was performed using the same protocol except that perchloric acid was not added and 250 μL of protein sample was used.

**Raman Spectroscopy.** Raman spectra were recorded on a Renishaw in Via Raman Microscope equipped with a charge-coupled device detector at 15 °C. Samples were excited with the 457 nm line of an argon laser where the output power was set to 16.5 mW. The output power was varied depending on the signal intensity. Small protein droplets of 1 μL were



**Figure 1.** mNT cluster transfer is a direct process. Cluster transfer reactions were performed with 50  $\mu\text{M}$  oxidized holo-mNT and apo-FDX in 50 mM Bis-Tris (pH 6.2) and 100 mM NaCl at 25  $^{\circ}\text{C}$  under aerobic conditions for 2 h. Reaction products were separated on a 16% reducing native gel (A and C). The histograms are the average of at least two independent experiments (B and D). (A and B) Holo-mNT was incubated at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h with 250  $\mu\text{M}$  EDTA and 100  $\mu\text{M}$  BPS or without an additive ( $\emptyset$ ). Reaction products were analyzed on a 16% reducing native gel (A), and the percentage of holo-mNT was calculated from the intensities of bands corresponding to holo- and apo-mNT (B). (C and D) Cluster transfer reactions were performed with 250  $\mu\text{M}$  EDTA and 100  $\mu\text{M}$  BPS or without an additive ( $\emptyset$ ). Lane den mNT represents a reaction mixture containing apo-FDX and disassembled mNT (den mNT) prepared as described in [Materials and Methods](#). Chemical reconstitution of the FDX cluster in the presence of 100  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>S and either 100  $\mu\text{M}$  Mohr's salt [lane Fe(II)+S] or 100  $\mu\text{M}$  iron chloride [lane Fe(III)+S] was also tried under the same conditions (pH 6.2 under aerobic conditions). Apo-mNT (lane 1), holo-mNT (lane 2), holo-FDX (lane 3), and apo-FDX (lane 4) were loaded as migration controls. Reaction products were analyzed on a 16% reducing native gel (C), and the percentage of holo-FDX was calculated from the intensities of the bands corresponding to holo-FDX and apo-FDX (D).

deposited on a polyethylene window and dried with a stream of argon. Approximately 400 accumulations were averaged with an exposure time of 10 s, for each sample.

**Electrochemically Induced FTIR Difference Spectroscopy.** The ultra-thin layer spectroelectrochemical cell was used as described previously.<sup>35</sup> To avoid irreversible protein adhesion, the gold grid working electrode was modified overnight with hexanethiol and 6-mercapto-1-hexanol and rinsed with ethanol and then with water. To accelerate the redox reactions, a mixture of 19 mediators<sup>36</sup> was added in a substoichiometric concentration of 40  $\mu\text{M}$  each to the protein solution; 7–8  $\mu\text{L}$  of the protein solution was used to fill the electrochemical cell. The cell path length was <10  $\mu\text{m}$ , as determined at the beginning of each experiment. All experiments were performed at 278 K.

FTIR spectra were recorded as a function of the applied potential using a setup combining an IR beam from the interferometer (Vertex 70, Bruker) for the 4000–1000  $\text{cm}^{-1}$  range. First, the protein was equilibrated at an initial electrode potential, and a single-beam spectrum was recorded. Then, the final potential was applied, and a single-beam spectrum was again recorded after equilibration. Equilibration generally took <4 min for the full potential step from  $-0.6$  to 0 V (Ag/AgCl). Difference spectra as presented here were calculated from two single-beam spectra, with the initial spectrum taken as a reference. Typically,  $2 \times 256$  interferograms at 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution were co-added for each single-beam spectrum and Fourier transformed using triangular apodization and a zero filling factor of 2. At least 60 difference spectra were averaged.

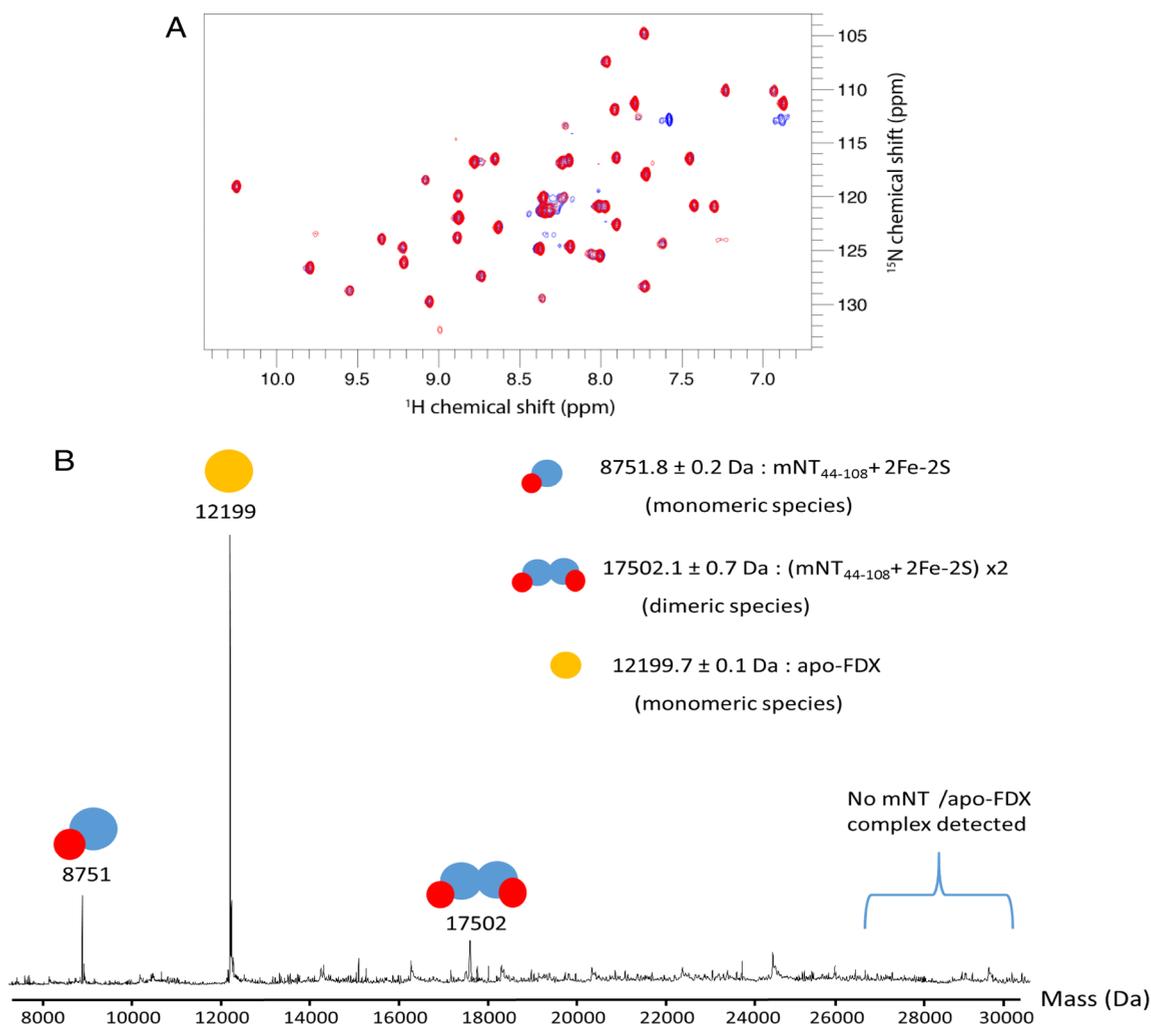
**Chemicals and Preparation of Protein Samples for Mass Spectrometry Analysis.** Chemicals were from Sigma-Aldrich: ammonium acetate (AcONH<sub>4</sub>, catalog no. A1542)

and high-performance liquid chromatography-grade acetonitrile (catalog no. 34851). Aqueous solutions were prepared using an ultrapure water system (Sartorius, Göttingen, Germany). Before native mass spectrometry experiments, mNT<sub>44–108</sub> storage buffer was exchanged with a 50 mM AcONH<sub>4</sub> solution at pH 5.8 or pH 6.7 using Zeba Spin Desalting Columns with a 7 kDa molecular weight cutoff (Thermo Fisher Scientific). The protein concentration was determined by the UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

#### Denaturing and Native Mass Spectrometry Analysis.

Native mass spectrometry measurements were performed in positive ion mode on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT, Waters, Manchester, U.K., upgraded by MS Vision) equipped with an automated chip-based nanoESI source (Triversa Nanomate, Advion). The instrument was calibrated using multiply charged ions of a 2  $\mu\text{M}$  horse heart myoglobin solution. For analysis under denaturing conditions, samples were diluted to 20  $\mu\text{M}$  for infusion in a 1/1 (v/v) water/acetonitrile mixture acidified with 0.5–1% formic acid and interface parameters were fixed to 45 V for accelerating voltage (Vc) and 2 mbar for backing pressure (bP) to obtain the best mass accuracy. Under these conditions, noncovalent interactions in WT mNT were typically disrupted allowing the measurement of the molecular weight of the apo-mNT<sub>44–108</sub> monomer with good accuracy ( $M_{\text{W Exp}} = 8577.8 \pm 0.1$  Da;  $M_{\text{W Theo}} = 8577.8$  Da for the WT form).

Analyses under native conditions were performed after careful optimization of instrumental settings to avoid dissociation of noncovalent bonds and to obtain sensitive detection of protein/iron–sulfur clusters. Vc and bP were fixed to 20 V and 6 mbar, respectively. Protein was diluted to 20  $\mu\text{M}$



**Figure 2.** Oxidized holo-mNT and apo-FDX do not form a stable complex. (A) Overlay of  $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC spectra of  $100\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -labeled oxidized holo-mNT in the absence (red) or presence (blue) of  $100\ \mu\text{M}$  apo-FDX in  $50\ \text{mM}$  Tris-HCl (pH 6.7) and  $100\ \text{mM}$  NaCl at  $298\ \text{K}$  collected under aerobiosis. All holo-mNT crosspeaks can be superimposed under both conditions, suggesting very limited or no molecular interaction between holo-mNT and apo-FDX. The additional crosspeaks visible in the presence of FDX are due to the apo-mNT form, which accumulates after cluster transfer. (B) Deconvoluted electrospray mass spectra obtained under native conditions of  $20\ \mu\text{M}$  holo-mNT in the presence of  $20\ \mu\text{M}$  apo-FDX in  $50\ \text{mM}$   $\text{AcONH}_4$  (pH 6.7) at room temperature. No complex between apo-FDX and holo-mNT was detected under our experimental conditions.

in  $\text{AcONH}_4$  (pH 5.8 or 6.7). Native MS experiments were performed in triplicate under identical conditions at 0, 0.5, 1, 2, 3, and 4 h at room temperature. Acquisitions were performed in the mass range of  $m/z$  20–5000 with a 4 s scan time. Data analysis was performed with MassLynx version 4.0 (Waters, Manchester, U.K.).

## RESULTS

**mNT Cluster Transfer Is a Direct Process.** First, we looked at the nature of the cluster transfer reaction between holo-mNT and the recipient protein. Does it occur directly or through a two-step mechanism with disassembly of the mNT cluster followed by reassembly of a cluster in FDX? Previously, we found that cluster transfer is much faster than cluster disassembly under exactly the same reaction conditions (protein concentrations, temperature, and buffer). Moreover, cluster transfer was not affected by oxygen, unlike cluster stability.<sup>17</sup> These previous results suggest that cluster transfer might be direct. To unambiguously demonstrate its nature, we looked at the effects of the addition of ferric [ethyl-

enediaminetetraacetic acid (EDTA)] or ferrous [bathophenanthroline sulfonate (BPS)] ion chelators on the products of the transfer reaction under aerobic conditions. Products were analyzed after reaction for 2 h, a sufficient time for the reaction to reach completion under our conditions (Figure 1). If the mNT cluster has to be disassembled prior to reassembly in FDX, then addition of an iron chelator would inhibit the formation of a cluster in FDX. At concentrations of chelators ( $250\ \mu\text{M}$  EDTA and  $100\ \mu\text{M}$  BPS) that do not lead to significant holo-mNT destabilization (Figure 1A,B), the amount of formed holo-FDX at the end of the reaction was not affected compared to those of reactions performed in the absence of an iron chelator (in panels C and D of Figure 1, compare lanes EDTA and BPS with lane  $\emptyset$ ). Nevertheless, a pink coloration was readily observed (data not shown) when the cluster transfer reaction was performed in the presence of BPS, indicating iron release (the complex of BPS with iron is pink) during the reaction. In contrast, when the mNT cluster was disassembled prior to the addition of apo-FDX, no cluster insertion in FDX was observed (Figure 1C,D, lane den mNT).

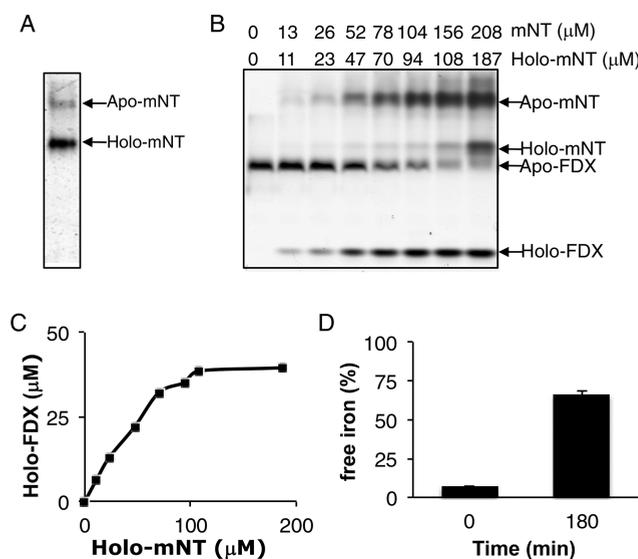
Finally, the Fe–S cluster could not be inserted in apo-FDX by simple addition of iron as ferric or ferrous ions and inorganic sulfur (chemical cluster reconstitution) under the same reaction conditions (pH, temperature, concentrations, and aerobic conditions) (Figure 1C,D, reconstitution lanes). Thus, the cluster transfer from holo-mNT to apo-FDX is unambiguously a direct process.

#### mNT and FDX Did Not Form a Stable Complex.

Previous studies based on a protein–protein complex docking model and protein cross-linking had shown that CISD2 could form a complex with FDX.<sup>11</sup> First, we questioned if the formation of a stable complex between donor and acceptor proteins is required for the cluster to be transferred or if a transient complex is sufficient. Thus, we studied the potential molecular interaction by protein pull-down using purified mNT (in fusion with a His tag) and FDX in apo and holo forms. No direct interaction between these two proteins was observed using this technique (data not shown). NMR spectroscopy is another powerful technique for probing molecular interactions and was successfully used to highlight the interaction between mNT and anamorsin.<sup>22</sup> Indeed, NMR chemical shifts and peak line shapes are highly sensitive to changes in environment and mobility, and one would expect spectral perturbations of mNT NMR spectra upon addition of apo-FDX if the bimolecular complex is significantly populated in solution. Two different NMR tubes were prepared at pH 8.0 containing 100  $\mu\text{M}$  <sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C-labeled oxidized mNT with or without 100  $\mu\text{M}$  unlabeled apo-FDX, and the solutions were then solvent-exchanged to decrease the pH to 6.7 prior to NMR data collection under aerobic conditions. Under these conditions, cluster transfer occurs slowly with a  $T_{1/2}$  of >10 h. The 2D <sup>15</sup>N SOFAST-HMQC spectra collected just after the pH jump are shown in Figure 2A. In the absence of apo-FDX (red spectrum), the <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D spectrum is typical of oxidized holo-mNT.<sup>14</sup> When apo-FDX was also present (blue spectrum), the oxidized holo-mNT state dominated the spectra and had chemical shifts and a peak line shape virtually identical to those of the spectrum collected in the absence of apo-FDX. This strongly suggests little interaction between the two proteins under these conditions. The additional peaks visible in the presence of apo-FDX correspond to the apo-mNT<sup>14</sup> that starts to accumulate because of cluster transfer before the recording of the first NMR spectra (*vide infra*). Finally, binding between holo-mNT (20  $\mu\text{M}$ ) and apo-FDX (20  $\mu\text{M}$ ) was studied at pH 6.7 by native mass spectrometry (MS), a method allowing preservation of protein–protein and protein–metal ion interactions.<sup>37–39</sup> Again, no heterocomplex involving both proteins was observed under these experimental conditions, and only signals of unbound apo-FDX and holo-mNT were detected (Figure 2B). Taken together, pull-down, NMR, and native MS studies demonstrate that apo-FDX and oxidized holo-mNT do not form a high-affinity complex prior to cluster transfer but only a transient complex as observed by chemical cross-linking in the case of CISD2 with FDX.<sup>11</sup> Thus, only the formation of a transient, but not stable, complex between donor and acceptor proteins is required for cluster transfer.

**Only One Cluster of Dimeric mNT Is Transferred to Apo-FDX.** In previously published transfer reaction experiments performed with equimolar donor and acceptor proteins,<sup>17,18</sup> it was observed that roughly 50% of apo-FDX was converted to holo-FDX when all holo-mNT had lost its cluster, suggesting that only half of available clusters from holo-

mNT were transferred to the recipient protein assembling one [2Fe-2S]. Moreover, the pink coloration that showed up during the reaction performed in the presence of BPS is an indication of ferric ion release during the reaction, suggesting that some mNT cluster might be lost (i.e., not transferred to apo-FDX but disassembled). We therefore decided to address in more depth the question of the stoichiometry of the transfer, i.e., the number of [2Fe-2S] mNT clusters consumed to form one [2Fe-2S] cluster in FDX. First, using a native gel, we looked at the proportions of holo- versus apo-mNT in the purified protein we used for the subsequent transfer reactions (Figure 3A) and found that roughly 85% of mNT was in the holo form and 15% in the apo form. Then, we performed cluster transfer experiments for 2 h with a fixed concentration of apo-FDX (40  $\mu\text{M}$ ) and increasing concentrations of oxidized mNT and, consequently, increasing oxidized holo-mNT concentrations considering that 85% of mNT was



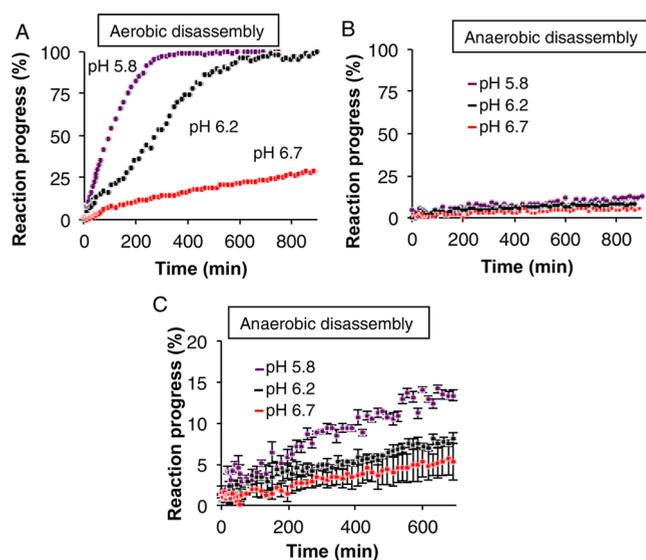
**Figure 3.** Two mNT clusters were consumed for the formation of only one FDX cluster. (A) Holo-mNT used for this study was run on a 16% reducing native gel. Quantification of the intensity of the bands corresponding to holo- and apo-mNT showed that the protein used in this experiment contained roughly 85% holo form and 15% apo form. (B) Cluster transfer reactions were performed at 25 °C for 2 h in 50 mM Bis-Tris (pH 6.2), 100 mM NaCl, and 0.7 mM DTT under anaerobic conditions with 40  $\mu\text{M}$  apo-FDX and variable concentrations of oxidized holo-mNT. Final reaction products were run on a 16% reducing native gel. Holo-mNT concentrations were estimated from the mNT concentrations (determined by the absorbance at 280 nm as described in Materials and Methods) and the apo-mNT/holo-mNT ratio determined in panel A. (C) For each reaction, concentrations of holo-FDX at the end of the reaction were calculated using the intensity of the bands of apo- and holo-FDX and plotted as a function of the concentration of holo-mNT (i.e., mNT concentration corrected by a factor of 0.85) added during each reaction. The study was performed twice. One representative result is presented. The fit of the linear part (from 0 to 60  $\mu\text{M}$  holo-mNT) indicates that one holo-mNT can form  $0.46 \pm 0.02$  FDX cluster. (D) The cluster transfer reaction was performed at 25 °C for 3 h in 50 mM Bis-Tris (pH 6.2), 100 mM NaCl, and 0.7 mM DTT under anaerobic conditions with 20  $\mu\text{M}$  holo-mNT and apo-FDX. At the beginning (0 min) and end (180 min) of the reaction, free and total irons were quantified as described in Materials and Methods and free iron was expressed as a percentage of total iron. The histogram is the average of three independent experiments.

initially in the holo form (Figure 3B). For each holo-mNT concentration, we quantified the proportion of holo- versus apo-FDX at the end of the reaction (Figure 3C). While the concentration of holo-mNT in the reaction increased, the concentration of holo-FDX at the end of the reaction increased. Even when a large excess of holo-mNT was used, roughly 10% of apo-FDX was not converted to holo-FDX at the end of the reaction, indicating that a portion of apo-FDX is not able to assemble a cluster. Using the slope of the linear part of the curve, we found that  $2.2 \pm 0.1$  holo-mNT clusters (average of two independent series of experiments) are consumed to form one holo-FDX.

In parallel, we quantified the proportion of free iron to total iron at different stages of the cluster transfer reaction. At the beginning of the reaction, we found that 10% of the total iron was free, which correlates well with the 15% of apo-mNT we observed on native gels (Figure 3A). We then performed the same quantification at the end of the cluster transfer reaction performed with equimolar holo-mNT and apo-FDX and found that 60% of the iron was free (Figure 3D). Thus, 50% of the iron bound to mNT at the beginning of the reaction was released in solution at the end of the cluster transfer process. Taken together, these results proved that even if the transfer is direct, roughly two  $[2\text{Fe-2S}]$  clusters from mNT are consumed for the formation of one  $[2\text{Fe-2S}]$  cluster in FDX.

**Oxidized mNT Is Stable in the Absence of Oxygen Even at Acidic pH.** It was previously shown that the stability of oxidized mNT clusters under aerobic conditions is highly dependent on pH, with a decrease in stability with a more acidic pH.<sup>8,40</sup> However, we have recently demonstrated that the presence of  $\text{O}_2$  is a major determinant of mNT cluster stability, with oxidized mNT being less stable under aerobic conditions than in the absence of  $\text{O}_2$ .<sup>17</sup> Thus, we decided to look at the pH dependence of mNT cluster stability under both aerobic and anaerobic conditions by following the absorbance of oxidized holo-mNT at 460 nm over time at 25 °C (Figure 4).<sup>8,23</sup> As previously observed,<sup>8,40</sup> cluster disassembly was clearly pH-dependent under aerobic conditions. We showed that the stability of the oxidized cluster decreases when the pH is more acidic (Figure 4A;  $T_{1/2}$  values of  $2050 \pm 200$ ,  $269 \pm 69$ , and  $101 \pm 6$  min at 25 °C and pH 6.7, 6.2, and 5.8, respectively). Interestingly, under anaerobic conditions, the oxidized protein remained highly stable even at acidic pH, with roughly 10% of the clusters lost after 15 h at pH 5.8 and 25 °C (Figure 4B). Nevertheless, it is worth noting that this low pH dependence remained even under anaerobic conditions ( $T_{1/2}$  values of roughly 148, 81, and 50 h at 25 °C and pH 6.7, 6.2, and 5.8, respectively), but the amplitude of the dependence is much more limited than under aerobic conditions (the decrease in the pH from 6.7 to 5.8 induces decreases in cluster stability of roughly 20- and 3-fold under aerobic and anaerobic conditions, respectively) (Figure 4A,C). The data demonstrate that under anaerobic conditions the oxidized mNT cluster is more stable than under aerobic conditions and the cluster stability in aerobiosis is highly dependent on pH (with a decrease in cluster stability at a more acidic pH), while in anaerobiosis, the pH dependency persists but is strongly reduced.

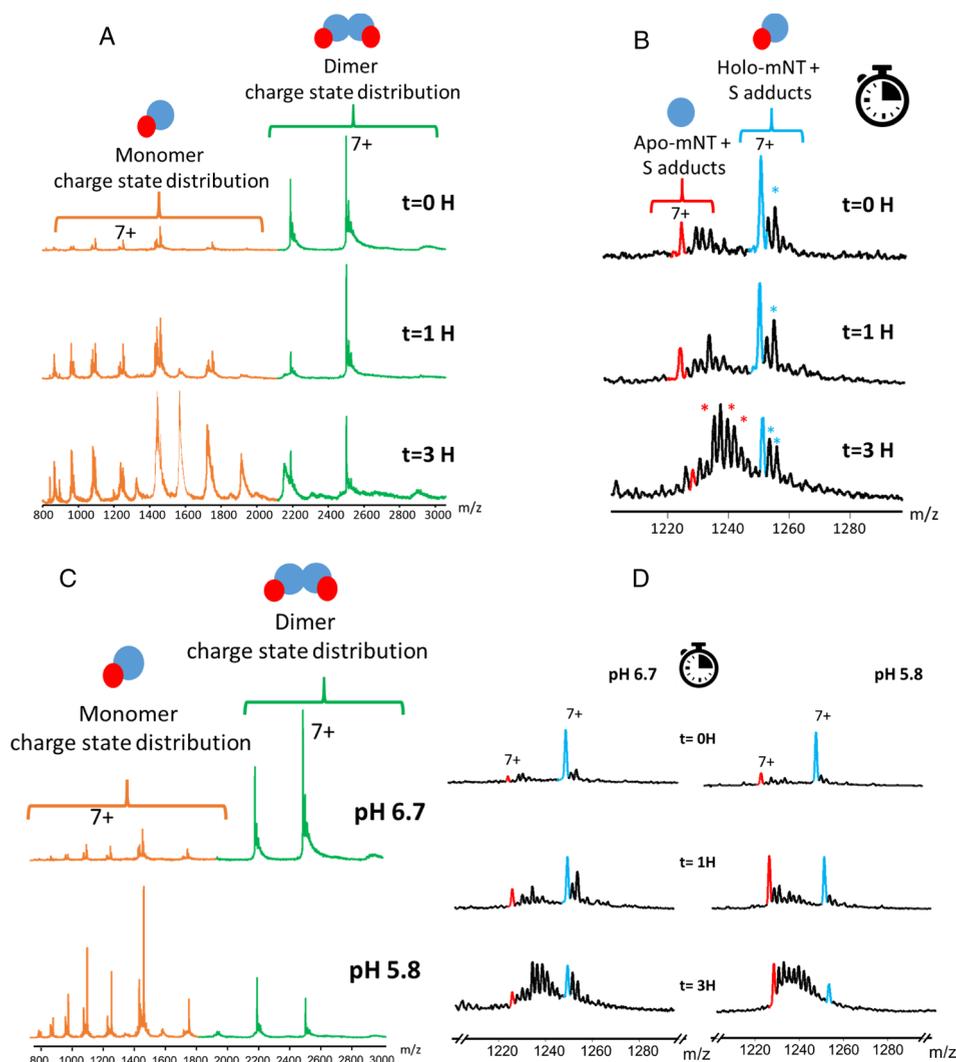
To obtain more details about the effect of pH on cluster vicinity, we used electrochemically induced FTIR difference spectra to reveal conformational changes occurring in the protein upon redox state modification. The oxidized minus reduced difference spectra obtained for different pH values



**Figure 4.** Oxidized mNT cluster is highly stable under anaerobic conditions at 25 °C even at acidic pH. Oxidized mNT cluster loss ( $20 \mu\text{M}$  protein) was studied at 25 °C under (A) aerobic or (B and C) anaerobic conditions and followed by UV–vis absorption spectroscopy. The pH of the reaction buffer (50 mM Tris-HCl or Bis-Tris with 100 mM NaCl) was 5.8 (violet), 6.2 (black), and 6.7 (red). For the sake of clarity, either representative experiments (A and B) or average curves with error bars from at least three independent experiments (C) are presented. The reaction progress for each type of reaction was calculated as previously described.<sup>23</sup>

(Figure S1A) revealed a broad differential signal signature that is very similar to those of other proteins with one or more Fe–S clusters<sup>43</sup> and includes the contributions from the  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vibration of the backbone, called the amide I signal and seen between  $1680$  and  $1630 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>44</sup> The experiments performed between pH 8.5 and 5.6 were reversible and stable for a number of redox cycles. At pH 4.8, the signal was lost and redox reaction was no longer possible. Upon comparison of the data for different pH values, the intensity of the amide I signal significantly decreased at more acidic pH values, especially the signal around  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , for the reduced and oxidized forms (see the dotted line in Figure S1A), which suggests conformational changes in the protein. At pH 5.6, the intensities of the signals were significantly reduced. This could be explained by a larger fraction of the protein without a cluster at higher proton concentrations withdrawn from the RedOx reaction.

To identify possible changes in the structure and symmetry of the Fe–S cluster, Raman spectra were recorded between pH 4.8 and 8.5 (Figure S1B). The samples were in the reduced state. At pH 8.5, the Fe–S vibrational modes were seen at  $321 \text{ cm}^{-1}$ . Between pH 5.6 and 8.5, the signature was essentially conserved. At pH 4.8, changes in the intensity ratio were seen, especially for the signal at  $309 \text{ cm}^{-1}$ , a shift occurred for the Fe–S vibrational modes from  $321$  to  $328 \text{ cm}^{-1}$ , and the signal was greatly broadened. Most likely, the symmetry of the cluster changed because of the loss of at least one ligand. A precise assignment to a specific vibrational mode is difficult, because Raman spectroscopic studies of the naturally occurring  $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{His})(\text{Cys})_3$  motif as found in mNT have been described in only one other protein, a mutant form of the Fe–S scaffold protein IscU.<sup>45</sup> In conclusion, the Raman and infrared spectra both confirm the presence of a  $[2\text{Fe-2S}]$  cluster between pH

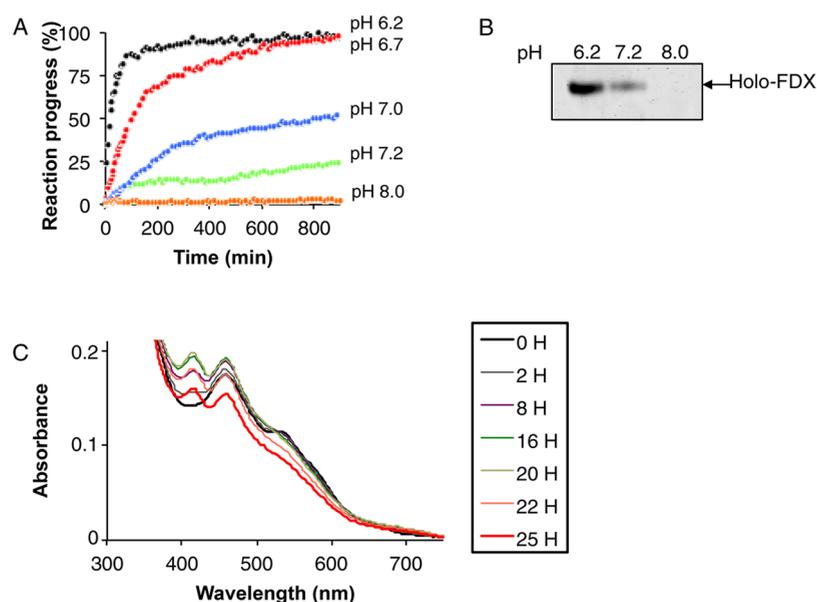


**Figure 5.** Effect of time and pH on oxidized holo-mNT as monitored by native mass spectrometry. (A and B) Effect of time on the oxidized holo-mNT oligomerization state as monitored by native mass spectrometry. (A) Full scan native mass spectra of a 20  $\mu\text{M}$  injection of oxidized holo-mNT (top) and after incubation for 1 (middle) and 3 h (bottom) at room temperature under aerobic conditions at pH 6.7. Time-dependent mNT dimer destabilization into the mNT monomer was accompanied by [2Fe-2S] cluster loss. (B) Close-up of the 7+ charge state of monomeric mNT at 0 h (top) or after incubation for 1 (middle) and 3 h (bottom). Blue peaks represent holo-mNT, while red peaks refer to apo-mNT. Species labeled with asterisks correspond to nonspecific sulfur adducts as sulfur was present in excess. (C and D) Effect of pH on mNT oligomerization. (C) Full scan native mass spectra of a 20  $\mu\text{M}$  injection of mNT at pH 6.7 (top) and 5.8 (bottom). pH-dependent mNT dimer destabilization into the mNT monomer is accompanied by [2Fe-2S] cluster loss. (D) Close-up of the 7+ charge state of monomeric mNT at 0 h (top) at pH 6.7 (left) and 5.8 (right) or after incubation for 1 (middle) and 3 h (bottom). Blue peaks represent holo-mNT, while red peaks refer to apo-mNT.

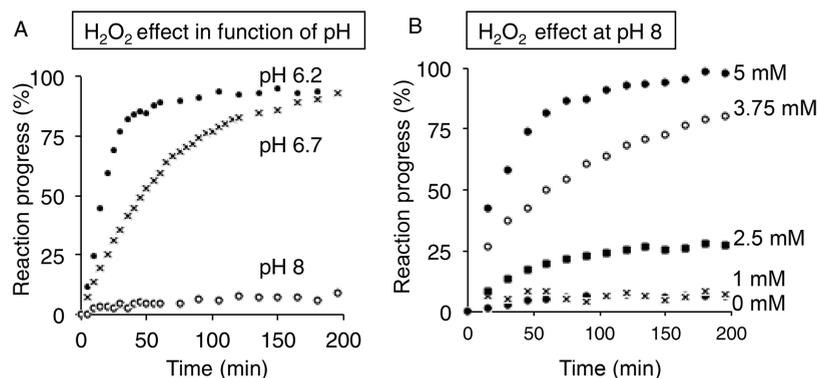
5.6 and 8.5, but with small conformational changes around the cofactor.

**The Oligomerization State and the Fe–S Cluster of mNT Are Dynamic and Sensitive to pH.** To examine the effect of pH on mNT in more depth, we next monitored the effect of time and pH on mNT oligomerization and cluster loss by native MS. We first studied the dynamics of oxidized holo-mNT (20  $\mu\text{M}$ ) at pH 6.7 under aerobic conditions and room temperature as a function of time. At time zero, mNT is mostly detected in its noncovalent dimeric form with a mass of  $17502.1 \pm 0.7$  Da, corresponding to two [2Fe-2S] clusters bound to two mNT subunits (Figure 5A, top panel). A minor ion series corresponding to monomeric holo-mNT with one [2Fe-2S] cluster ( $8751.8 \pm 0.2$  Da) is also detected in the lower- $m/z$  region (Figure 5A). Native MS experiments next revealed that the ratio of monomeric holo-mNT increases with time (Figure 5A,  $t = 0, 1,$  and 3 h). Under strictly identical

experimental and instrumental conditions, the relative amount of monomeric species compared to the amount of dimeric species was estimated from the native mass spectral intensities and was shown to increase from 18% at 0 h to 72% after incubation for 3 h at room temperature. We next focused on the monomeric region of the mass spectra to have a closer look at possible [2Fe-2S] cluster loss over time at pH 6.7 (Figure 5B). While holo-mNT is mostly detected at 0 h, signal intensities of ions corresponding to holo-mNT (blue peak in Figure 5B) strongly decrease over time. In parallel, intensities of peaks corresponding to the monomeric apo-mNT signal (red in Figure 5B) and its nonspecific sulfur adducts (labeled with asterisks in Figure 5B) strongly increased. These sulfur adducts could result from binding of released inorganic sulfur due to cluster destabilization to apoprotein, as previously described in the case of several other Fe–S proteins.<sup>41,42</sup> These native MS experiments unambiguously demonstrate that



**Figure 6.** mNT cluster transfer reaction is fast and highly dependent on pH even under anaerobic conditions. mNT cluster transfer (each protein at 20  $\mu\text{M}$ ) was performed at 25  $^{\circ}\text{C}$  under anaerobic conditions and followed by either (A) UV–vis absorption spectroscopy or (B) migration on a 16% reducing native gel. The reaction buffer (50 mM Tris-HCl or Bis-Tris with 100 mM NaCl) was at 6.2 (black), 6.7 (red), 7.0 (blue), 7.2 (green), and 8.0 (orange). For the sake of clarity, results of representative experiments are presented. Each experiment was performed at least three times. To avoid mNT cluster reduction, DTT used for apo-FDX reduction was removed with a Micro Bio-Spin column before performing the cluster transfer reaction. Reaction progress for each type of reaction was calculated as previously described.<sup>23</sup> (A and B) mNT cluster transfer under anaerobic conditions followed by UV–vis absorption spectroscopy and migration of the reaction products after reaction for 16 h on a 16% reducing native gel to follow the appearance of holo-FDX, respectively. (C) Kinetics of mNT cluster transfer to apo-FDX at pH 8.0 and 37  $^{\circ}\text{C}$  under anaerobic conditions.



**Figure 7.** mNT cluster is highly resistant to  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vitro*. Cluster loss reactions with 20  $\mu\text{M}$  protein were performed at 25  $^{\circ}\text{C}$  under anaerobic conditions and followed by UV–vis absorption spectroscopy. The reaction buffer (50 mM Tris-HCl or Bis-Tris with 100 mM NaCl) was at pH 6.2 (A, ●), 6.7 (A, ×), and 8.0 (A, ○, and B). For the sake of clarity, results of representative experiments are shown. The reaction progress was calculated as previously described.<sup>23</sup> For panel A, 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  was added to mNT at different pHs. (B) Variable concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were added to mNT at pH 8.0. Each experiment was performed at least thrice.

dimeric holo-mNT is destabilized over time into monomeric apo-mNT with progressive loss of the [2Fe-2S] cluster.

The pH dependency of the oligomerization state of mNT and its cluster disassembly was next investigated (Figure 5C). At 0 h, while mNT is mostly detected in its dimeric holo form at pH 6.7 (Figure 5C, top panel), the ratio of monomeric to dimeric species is fully inverted at pH 5.8 (Figure 5C, bottom panel), highlighting a strong destabilization of mNT dimers into monomers at more acidic pH values. In addition, cluster loss was monitored over time at pH 5.8 (Figure 5D, right panel) and pH 6.7 (Figure 5D, left panel), highlighting faster cluster loss at acidic pH. Thus, pH not only affects cluster stability but also has strong effects on the oligomerization state

of holo-mNT, with the dimer becoming less stable at more acidic pH.

**The Speed of the Cluster Transfer Reaction Is Highly Modulated by pH.** We next looked at the effect of pH on the ability of oxidized holo-mNT to transfer its cluster to apo-FDX *in vitro* using UV–vis absorption spectroscopy (Figure 6A) and migration on a native polyacrylamide gel (Figure 6B) as described previously.<sup>23</sup>  $\text{O}_2$  does not affect the speed of the cluster transfer reaction but does affect cluster stability.<sup>17</sup> For this reason, we looked at the effect of pH on the cluster transfer reaction only under anaerobic conditions, which allows us to follow slow reactions without reoxidation of reduced apo-FDX cysteines. At 25  $^{\circ}\text{C}$ , hardly any cluster transfer was observed at pH 8.0 under anaerobic conditions (Figure 6A,B).

However, the speed of mNT cluster transfer increased as the pH became more acidic (at 25 °C,  $T_{1/2}$  values of roughly 1800, 810, 100, and 16 min at pH 7.2, 7.0, 6.7, and 6.2, respectively). Thus, at any pH, the cluster transfer reaction was much faster than the cluster disassembly reaction under anaerobic conditions and even under aerobic conditions (compare Figures 4C and 6A). In conclusion, under anaerobic conditions, we showed that cluster disassembly is slow and has a weak pH dependence. In contrast, cluster transfer is faster and highly dependent on pH around physiological values with a roughly 5-fold increase in the speed of the reaction for a decrease of 0.5 pH unit.

Finally, when we increased the temperature of the reaction mixture to 37 °C, holo-FDX formation due to cluster transfer from holo-mNT was observed even at pH 8.0 (Figure 6C), but holo-FDX did not accumulate over time because of its relatively low stability (competition between formation of holo-FDX by cluster transfer from holo-mNT and holo-FDX cluster disassembly at this temperature).

#### mNT Is Highly Resistant to Hydrogen Peroxide.

Previously, we proposed that mNT uses the cluster transfer process to repair the Fe–S cluster of the IRP-1/c-aconitase protein after oxidative stress.<sup>14</sup> For such a cellular function, the mNT cluster has to be particularly resistant to oxidative stress, so we investigated the effect of addition of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on mNT cluster disassembly *in vitro* under anaerobic conditions, conditions for which mNT is stable for hours at any pH in the absence of  $H_2O_2$ . At pH 8, addition of 250  $\mu$ M  $H_2O_2$  did not significantly destabilize the cluster, but  $H_2O_2$ -induced cluster degradation was observed at pH <7 (Figure 7A). Thus, at pH 6.7, the  $T_{1/2}$  of oxidized mNT cluster stability was roughly 50 min and decreased when the pH was more acidic, with a  $T_{1/2}$  of only 15–20 min at pH 6.2. Finally, we looked at the effects of the addition of  $H_2O_2$  at different doses at pH 8 and found that it has to be added at a concentration of >1 mM to significantly destabilize the cluster (with 2.5 mM  $H_2O_2$ , roughly 25% of the cluster was lost after 200 min at 25 °C) (Figure 7B). Thus, addition of  $H_2O_2$  increases the extent of the loss of the mNT cluster, and the effects increase when the pH is more acidic. However, even at pH 6.2, high concentrations of  $H_2O_2$  (250  $\mu$ M, a >10-fold excess compared to the mNT cluster) have to be used to significantly decrease the stability of the mNT cluster.

## DISCUSSION

We have previously demonstrated that reduced holo-mNT is extremely stable and its ability to transfer its cluster is controlled by its own redox state (redox switch).<sup>17</sup> In this study, we pursued this *in vitro* study of mNT cluster transfer to a [2Fe-2S] recipient protein using the gold standard cluster recipient apo-FDX.

In this study, we provide a clear demonstration that the cluster is directly transferred from holo-mNT to the recipient apoprotein as previously observed with other cluster transfer proteins involved in Fe–S cluster biogenesis, such as bacterial SufBCD,<sup>47</sup> SufA,<sup>26</sup> IscU,<sup>48</sup> and plant GRX.<sup>28</sup> This result is compatible with the current molecular model for cluster transfer based on a thiol ligand exchange mechanism,<sup>49</sup> which also implies the formation of a complex, at least transient, between the two proteins as the first step of the reaction. The formation of such a complex has been experimentally demonstrated in several cases (bacterial IscA with FDX<sup>24</sup> or biotin synthase,<sup>50</sup> bacterial SufBCD with SufA,<sup>47</sup> bacterial

NfuA with ACNB,<sup>51</sup> GRX from various organisms with IscA<sup>52</sup> or SufA,<sup>53</sup> and human mNT with anamorsin<sup>19</sup>) or suggested by analysis of the kinetic data (IscU with FDX<sup>25</sup>). In the case of NEET proteins, the interaction between CISD2 and FDX was suggested on the basis of the protein–protein complex docking model and protein cross-linking.<sup>11</sup> Although cluster transfer is direct, we did not observe the formation of a complex between holo-mNT and apo-FDX that is stable enough to be detected by the classic biochemical (pull-down assays) and biophysical (NMR and native mass spectrometry) approaches we tried. Thus, the formation of a stable complex between the donor and acceptor proteins is not mandatory for efficient cluster transfer, and formation of only a transient complex seems to be sufficient. The variety of mNT Fe–S cluster acceptors, including a nonphysiological one, together with nonmandatory strong protein–protein interactions between mNT and the cluster recipient protein may reveal the low substrate specificity of mNT that might thus have the ability to repair a wide range of Fe–S proteins upon oxidative stress.

We found that two mNT [2Fe-2S] clusters are consumed to build one [2Fe-2S] cluster in apo-FDX. Very few similar studies were performed with other cluster transfer proteins. In the case of monothiol GRX, which carries only one cluster per protein dimer, cluster transfer to IscA was stoichiometric.<sup>28,52</sup> Conversely, a 3-fold excess of *Azotobacter vinelandii* IscU was necessary in the case of cluster transfer to AcnA.<sup>48</sup> In our case, holo-mNT is a dimer with one cluster per monomer when holo-FDX is a monomer and carries only one cluster. Our results indicate that there is no concerted cluster transfer from the two subunits of mNT under our experimental conditions. Thus, we propose that after the transfer of one cluster and destructuring of the corresponding mNT subunit polypeptide<sup>14</sup> the remaining holo subunit is cooperatively destabilized due to intermonomer interactions and quickly loses its cluster, as proposed recently by molecular dynamics simulation,<sup>54</sup> before being able to give it to another recipient protein. It might be possible that this low-efficiency cluster transfer could be just a consequence of the use of a nonphysiological cluster recipient protein. Moreover, in the case of a transfer to a [4Fe-4S] cluster recipient protein such as cytosolic aconitase or to a recipient assembling two [2Fe-2S] clusters such as anamorsin, we cannot exclude the possibility that the two clusters of dimeric holo-mNT are transferred in a concerted reaction to transfer them as [2Fe-2S] clusters (anamorsin) or use them to build up a [4Fe-4S] cluster (aconitase).

Holo-mNT is extremely resistant to hydrogen peroxide *in vitro* compared to other cluster transfer proteins. It is known that bacterial IscU, the scaffold protein involved in Fe–S cluster maturation, is less stable than SufB, a protein involved in an alternative pathway used by bacteria when stress occurs ( $T_{1/2}$  values of <5 and  $\lesssim$ 10 min, respectively, when 70 equiv of  $H_2O_2$  was added to the protein at pH 8.0 and 25 °C under anaerobic conditions).<sup>55</sup> Under exactly the same conditions, the mNT cluster was only slightly degraded by addition of  $H_2O_2$ . This high resistance of mNT to  $H_2O_2$  is compatible with its redox switch behavior and its involvement in the cellular response after oxidative stress as we proposed previously.<sup>14</sup>

mNT cluster lability is known to be pH-dependent (increased lability as the pH decreases) under aerobic conditions.<sup>8</sup> The protonation of  $N_\epsilon$  of His87 ( $pK_a$  of  $\sim$ 6.5) at low pH is at least partially responsible for this behavior by

decreasing the energy required for Fe–N<sub>δ</sub> bond cleavage.<sup>46,54,56</sup> Clearly, the conserved hydrogen-bonding network around the mNT cluster also contributed to this pH sensitivity.<sup>40</sup> Interestingly, we confirmed the strong pH sensitivity under aerobic conditions and found that mNT is much less sensitive to pH under anaerobic conditions. Thus, pH only slightly affects the inherent stability of the mNT cluster but does strongly modulate its sensitivity to O<sub>2</sub> (or to related derived species).

Our studies reveal that pH also affects the dimerization of the protein, with the dimer being less stable at acidic pH. Interestingly, structural analysis has shown that even if mNT dimerization is mainly mediated by hydrophobic interactions, the dimer interface is stabilized by interprotomer hydrogen bonds between His58 and Arg73 and the presence of two buried water molecules.<sup>5,6</sup> Thus, the mNT dimer is less stable at acidic pH. NMR studies revealed only two structural protein states involving either the dimeric folded holoprotein or the unfolded mNT resulting from cluster loss. The current NMR data<sup>14</sup> suggest that several resonances are invisible around cysteine residues in the unfolded state. Hence, it is highly probable that the unfolded state seen by NMR can be bound to iron–sulfur species or in the apo form with intermediate exchange-induced line broadening. Native MS studies suggest that mNT might exist as a dimeric holo-mNT form or as monomeric holo- or apo-mNT forms. We can conclude that mNT monomers do not exist with a stable three-dimensional fold and might rapidly unfold, while keeping or losing the ability to bind iron–sulfur species.

The cluster transfer reaction is also clearly pH-dependent under anaerobic conditions. In the cluster transfer molecular model based on thiol ligand exchanges, the first Fe–ligand<sub>donor</sub> has to be broken to form the first Fe–ligand<sub>acceptor</sub>. Thus, the Fe–N<sub>δ</sub> bond (His87) has to be attacked by a thiol group of the recipient protein to initiate cluster transfer instead of an exogenous O<sub>2</sub> molecule as for cluster stability under aerobic conditions. If this bond is extremely stable (the case of the H87C mutated form with a cluster fully coordinated by cysteines), it cannot be broken by O<sub>2</sub> or by a thiol group of the recipient protein, and this form cannot lose or transfer its cluster. For the WT form, when the pH is more acidic, the bond between Fe and N<sub>δ</sub> (His87) is more easily broken by O<sub>2</sub> or by a thiol group of the recipient protein due to protonation of the histidine but also probably due to modification of the hydrogen bond network around the cluster.<sup>40</sup> Then, at acidic pH, the cluster is less stable under aerobic conditions and more easily transferred to a recipient protein regardless of the presence of O<sub>2</sub>. In conclusion, this pH sensitivity allows mNT to regulate very finely its ability to transfer its cluster as a function of pH. This property differentiates mNT from other cluster transfer proteins such as IscU, whose conflicting coordination of its cluster by two residues (D39 and H105 in *Escherichia coli* IscU) seems to induce cluster instability.<sup>57</sup>

The cytoplasmic pH (pH<sub>i</sub>) has been implicated in the control of several vital cellular functions and cell fate. In resting cells, pH<sub>i</sub> is tightly and dynamically regulated to near neutral values (7.0–7.2) and some cellular events can affect this intracellular acid–base homeostasis.<sup>58</sup> Thus, early apoptotic events induce rapid cytosol acidification to pH 6.3–6.8 followed by cytochrome *c* release and optimal caspase activation.<sup>59</sup> Conversely, invasive tumor cells have a more alkaline baseline pH<sub>i</sub> around 7.2–7.8 that protects them from entering the apoptotic cascade.<sup>60</sup> Finally, large pathophysio-

logical acid–base disturbances have also been observed in heart diseases such as myocardial ischemia,<sup>61</sup> in the early stages of tumorigenesis, and in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's diseases.<sup>62</sup> Thus, the results of our *in vitro* studies demonstrate that the ability of mNT to transfer its cluster is very sensitive to pH below pH 7 when more alkaline pH values seriously impair it. We propose that mNT could act not only as a redox switch but also as a pH<sub>i</sub> sensor that may control some cellular pathways in response to physiological variations in cellular pH. Thus, when pathophysiological conditions such as cancer or neurodegenerative diseases would dysregulate cellular pH<sub>i</sub> homeostasis, the pH regulation of mNT would be disturbed. Finally, voltage-dependent anion channel type 1 (VDAC1), which is a crucial channel for mitochondrial metabolism regulation and is involved in the early steps of apoptosis, is also known to be sensitive to cytosolic pH<sub>i</sub> variation.<sup>63</sup> We demonstrated recently that depletion of the endoplasmic reticulum-localized NEET protein CISD2 leads to C-terminal cleavage of VDAC1,<sup>64</sup> results that established a functional link between VDAC1 and CISD2, a potential interactant of mNT.<sup>20</sup>

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

It was demonstrated before that mNT is an Fe–S protein capable of transferring its cluster to repair stress-damaged Fe–S proteins. This cluster transfer is clearly under the control of the redox state of mNT's cluster (redox switch). Here we demonstrated that mNT is a highly stable Fe–S cluster to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to other known Fe–S cluster proteins. Moreover, not only the cluster stability but also the protein dimerization and, maybe even more importantly, the ability of mNT to transfer its cluster are finely regulated by the pH around physiological pH values. We propose that mNT may act as a pH sensor to regulate cellular pathways in response to oxidative stress and cellular pH variations.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00777.

Figure S1 (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301-CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France. E-mail: [marie-pierre.golinelli@cnrs.fr](mailto:marie-pierre.golinelli@cnrs.fr). Telephone: (33) 1 69 82 30 12. Fax: (33) 1 69 07 72 47.

### ORCID

Sarah Cianferani: 0000-0003-4013-4129

Marie-Pierre Golinelli-Cohen: 0000-0002-6738-8631

### Funding

This work was supported by the CNRS, the University of Strasbourg, the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-13-BSV8-0017-01), and the French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INBS-08-03). T.B. acknowledges the Institut de Recherches Internationales Servier for funding of his Ph.D. fellowship.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the IMAGIF cloning platform (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). The authors also warmly acknowledge the networking support from the EU COST Action FeSBioNet (CA15133).

## ABBREVIATIONS

BPS, bathophenanthroline sulfonate; BSA, bovine serum albumin; c-aconitase, cytosolic aconitase; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; FDX, *E. coli* [2Fe-2S] ferredoxin; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; IRP-1, iron regulatory protein 1; mNT, mitoNEET; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; OMM, outer mitochondrial membrane; SOFAST-HMQC, band-selective optimized flip angle short transient heteronuclear multiple-quantum correlation; WT, wild type

## REFERENCES

- (1) Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *JBC, J. Biol. Inorg. Chem. S.* 2–15.
- (2) Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., and Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247–281.
- (3) Heidrich, H. G., Albracht, S. P., and Backstrom, D. (1978) Two iron-sulfur centers in mitochondrial outer membranes from beef heart as prepared by free-flow electrophoresis. *FEBS Lett.* 95, 314–318.
- (4) Wiley, S. E., Murphy, A. N., Ross, S. A., van der Geer, P., and Dixon, J. E. (2007) MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5318–5323.
- (5) Paddock, M. L., Wiley, S. E., Axelrod, H. L., Cohen, A. E., Roy, M., Abresch, E. C., Capraro, D., Murphy, A. N., Nechushtai, R., Dixon, J. E., and Jennings, P. A. (2007) MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14342–14347.
- (6) Hou, X., Liu, R., Ross, S., Smart, E. J., Zhu, H., and Gong, W. (2007) Crystallographic studies of human MitoNEET. *J. Biol. Chem.* 282, 33242–33246.
- (7) Lin, J., Zhou, T., Ye, K., and Wang, J. (2007) Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14640–14645.
- (8) Wiley, S. E., Paddock, M. L., Abresch, E. C., Gross, L., van der Geer, P., Nechushtai, R., Murphy, A. N., Jennings, P. A., and Dixon, J. E. (2007) The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. *J. Biol. Chem.* 282, 23745–23749.
- (9) Conlan, A. R., Axelrod, H. L., Cohen, A. E., Abresch, E. C., Zuris, J., Yee, D., Nechushtai, R., Jennings, P. A., and Paddock, M. L. (2009) Crystal structure of Miner1: The redox-active 2Fe-2S protein causative in Wolfram Syndrome 2. *J. Mol. Biol.* 392, 143–153.
- (10) Inupakutika, M. A., Sengupta, S., Nechushtai, R., Jennings, P. A., Onuchic, J. N., Azad, R. K., Padilla, P., and Mittler, R. (2017) Phylogenetic analysis of eukaryotic NEET proteins uncovers a link between a key gene duplication event and the evolution of vertebrates. *Sci. Rep.* 7, 42571.
- (11) Tamir, S., Paddock, M. L., Darash-Yahana-Baram, M., Holt, S. H., Sohn, Y. S., Agranat, L., Michaeli, D., Stofleth, J. T., Lipper, C. H., Morcos, F., Cabantchik, I. Z., Onuchic, J. N., Jennings, P. A., Mittler, R., and Nechushtai, R. (2015) Structure-function analysis of NEET proteins uncovers their role as key regulators of iron and ROS homeostasis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1853, 1294–1315.
- (12) Nechushtai, R., Conlan, A. R., Harir, Y., Song, L., Yogeve, O., Eisenberg-Domovich, Y., Livnah, O., Michaeli, D., Rosen, R., Ma, V., Luo, Y., Zuris, J. A., Paddock, M. L., Cabantchik, Z. I., Jennings, P. A., and Mittler, R. (2012) Characterization of Arabidopsis NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. *Plant Cell* 24, 2139–2154.
- (13) Kusminski, C. M., Holland, W. L., Sun, K., Park, J., Spurgin, S. B., Lin, Y., Askew, G. R., Simcox, J. A., McClain, D. A., Li, C., and Scherer, P. E. (2012) MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat. Med.* 18, 1539–1549.
- (14) Ferecatu, I., Gonçalves, S., Golinelli-Cohen, M.-P., Clémancey, M., Martelli, A., Riquier, S., Guittet, E., Latour, J.-M., Puccio, H., Drapier, J.-C., Lescop, E., and Bouton, C. (2014) The Diabetes Target MitoNEET Governs a Novel Trafficking Pathway to Rebuild an Fe-S Cluster into Cytosolic Aconitase/Iron Regulatory Protein 1. *J. Biol. Chem.* 289, 28070–28086.
- (15) Moreno-Navarrete, J. M., Moreno, M., Ortega, F., Sabater, M., Xifra, G., Ricart, W., and Fernandez-Real, J. M. (2016) CISD1 in association with obesity-associated dysfunctional adipogenesis in human visceral adipose tissue. *Obesity* 24, 139–147.
- (16) Sohn, Y. S., Tamir, S., Song, L., Michaeli, D., Matouk, I., Conlan, A. R., Harir, Y., Holt, S. H., Shulaev, V., Paddock, M. L., Hochberg, A., Cabanchick, I. Z., Onuchic, J. N., Jennings, P. A., Nechushtai, R., and Mittler, R. (2013) NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14676–14681.
- (17) Golinelli-Cohen, M.-P., Lescop, E., Mons, C., Gonçalves, S., Clémancey, M., Santolini, J., Guittet, E., Blondin, G., Latour, J.-M., and Bouton, C. (2016) Redox Control of the Human Iron-Sulfur Repair Protein MitoNEET Activity via its Iron-Sulfur Cluster. *J. Biol. Chem.* 291, 7583–7593.
- (18) Zuris, J. A., Harir, Y., Conlan, A. R., Shvartsman, M., Michaeli, D., Tamir, S., Paddock, M. L., Onuchic, J. N., Mittler, R., Cabantchik, Z. I., Jennings, P. A., and Nechushtai, R. (2011) Facile transfer of [2Fe-2S] clusters from the diabetes drug target mitoNEET to an apo-acceptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13047–13052.
- (19) Lipper, C. H., Paddock, M. L., Onuchic, J. N., Mittler, R., Nechushtai, R., and Jennings, P. A. (2015) Cancer-Related NEET Proteins Transfer 2Fe-2S Clusters to Anamorsin, a Protein Required for Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *PLoS One* 10, e0139699.
- (20) Karmi, O., Holt, S. H., Song, L., Tamir, S., Luo, Y., Bai, F., Adenwalla, A., Darash-Yahana, M., Sohn, Y. S., Jennings, P. A., Azad, R. K., Onuchic, J. N., Morcos, F., Nechushtai, R., and Mittler, R. (2017) Interactions between mitoNEET and NAF-1 in cells. *PLoS One* 12, e0175796.
- (21) Golinelli-Cohen, M.-P., and Bouton, C. (2017) Fe-S Proteins Acting as Redox Switch: New Key Actors of Cellular Adaptive Responses. *Curr. Chem. Biol.* 11, 70–88.
- (22) Camponeschi, F., Ciofi-Baffoni, S., and Banci, L. (2017) Anamorsin/Ndor1 Complex Reduces [2Fe-2S]-MitoNEET via a Transient Protein-Protein Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 9479–9482.
- (23) Mons, C., Ferecatu, I., Riquier, S., Lescop, E., Bouton, C., and Golinelli-Cohen, M.-P. (2017) Combined biochemical, biophysical and cellular methods to study Fe-S cluster transfer and cytosolic aconitase repair by mitoNEET. *Methods Enzymol.* 595, 83–106.
- (24) Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., and Fontecave, M. (2001) Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 276, 22604–22607.
- (25) Wu, S. P., Mansy, S. S., and Cowan, J. A. (2005) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Molecular chaperone DnaK promotes IscU-bound [2Fe-2S] cluster stability and inhibits cluster transfer activity. *Biochemistry* 44, 4284–4293.
- (26) Gupta, V., Sendra, M., Naik, S. G., Chahal, H. K., Huynh, B. H., Outten, F. W., Fontecave, M., and Ollagnier de Choudens, S. (2009) Native Escherichia coli SufA, coexpressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to Fe-S target enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6149–6153.

- (27) Chandramouli, K., and Johnson, M. K. (2006) HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* 45, 11087–11095.
- (28) Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacquot, J. P., Johnson, M. K., and Rouhier, N. (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* 27, 1122–1133.
- (29) Chahal, H. K., and Outten, F. W. (2012) Separate FeS scaffold and carrier functions for SufB(2)C(2) and SufA during in vitro maturation of [2Fe2S] Fdx. *J. Inorg. Biochem.* 116, 126–134.
- (30) Sen, S., and Cowan, J. A. (2017) Role of protein-glutathione contacts in defining glutaredoxin-3 [2Fe-2S] cluster chirality, ligand exchange and transfer chemistry. *JBC, J. Biol. Inorg. Chem.* 22, 1075–1087.
- (31) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- (32) Schanda, P., Kupce, E., and Brutscher, B. (2005) SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *J. Biomol. NMR* 33, 199–211.
- (33) Fish, W. W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* 158, 357–364.
- (34) Moulis, J. M., and Meyer, J. (1982) Characterization of the selenium-substituted 2 [4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* 21, 4762–4771.
- (35) Moss, D., Nabadryk, E., Breton, J., and Mantele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* 187, 565–572.
- (36) Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mantele, W., and Friedrich, T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain. *Biochemistry* 39, 10884–10891.
- (37) Kaltashov, I. A., Zhang, M., Eyles, S. J., and Abzalimov, R. R. (2006) Investigation of structure, dynamics and function of metalloproteins with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 472–481.
- (38) Hernandez, H., and Robinson, C. V. (2001) Dynamic protein complexes: insights from mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 276, 46685–46688.
- (39) Marcoux, J., and Cianferani, S. (2015) Towards integrative structural mass spectrometry: Benefits from hybrid approaches. *Methods* 89, 4–12.
- (40) Bak, D. W., and Elliott, S. J. (2013) Conserved hydrogen bonding networks of MitoNEET tune Fe-S cluster binding and structural stability. *Biochemistry* 52, 4687–4696.
- (41) Crack, J. C., Thomson, A. J., and Le Brun, N. E. (2017) Mass spectrometric identification of intermediates in the O<sub>2</sub>-driven [4Fe-4S] to [2Fe-2S] cluster conversion in FNR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3215–E3223.
- (42) Kennedy, M. C., and Beinert, H. (1988) The state of cluster SH and S<sub>2</sub>- of aconitase during cluster interconversions and removal. A convenient preparation of apoenzyme. *J. Biol. Chem.* 263, 8194–8198.
- (43) Friedrich, T., and Hellwig, P. (2010) Redox-induced conformational changes within the *Escherichia coli* NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I): an analysis by mutagenesis and FT-IR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1797, 659–663.
- (44) Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1767, 1073–1101.
- (45) Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2008) The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 383, 133–143.
- (46) Tirrell, T. F., Paddock, M. L., Conlan, A. R., Smoll, E. J., Jr., Nechushtai, R., Jennings, P. A., and Kim, J. E. (2009) Resonance Raman studies of the (His)(Cys)<sub>3</sub> 2Fe-2S cluster of MitoNEET: comparison to the (Cys)<sub>4</sub> mutant and implications of the effects of pH on the labile metal center. *Biochemistry* 48, 4747–4752.
- (47) Chahal, H. K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., and Outten, F. W. (2009) The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry* 48, 10644–10653.
- (48) Unciuleac, M. C., Chandramouli, K., Naik, S., Mayer, S., Huynh, B. H., Johnson, M. K., and Dean, D. R. (2007) In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* 46, 6812–6821.
- (49) Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2008) Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 226–237.
- (50) Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2004) SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. *JBC, J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 828–838.
- (51) Py, B., Gerez, C., Angelini, S., Planel, R., Vinella, D., Loiseau, L., Talla, E., Brochier-Armanet, C., Garcia Serres, R., Latour, J. M., Ollagnier-de Choudens, S., Fontecave, M., and Barras, F. (2012) Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier. *Mol. Microbiol.* 86, 155–171.
- (52) Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., and Winkelmann, J. (2014) [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6203–6208.
- (53) Mapolelo, D. T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A. N., Li, H., Couturier, J., Outten, C. E., Rouhier, N., and Johnson, M. K. (2013) Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton Trans.* 42, 3107–3115.
- (54) Pesce, L., Calandrini, V., Marjault, H. B., Lipper, C. H., Rossetti, G., Mittler, R., Jennings, P. A., Bauer, A., Nechushtai, R., and Carloni, P. (2017) Molecular Dynamics Simulations of the [2Fe-2S] Cluster-Binding Domain of NEET Proteins Reveal Key Molecular Determinants That Induce Their Cluster Transfer/Release. *J. Phys. Chem. B* 121, 10648–10656.
- (55) Blanc, B., Clemancey, M., Latour, J. M., Fontecave, M., and Ollagnier de Choudens, S. (2014) Molecular investigation of iron-sulfur cluster assembly scaffolds under stress. *Biochemistry* 53, 7867–7869.
- (56) Bak, D. W., Zuris, J. A., Paddock, M. L., Jennings, P. A., and Elliott, S. J. (2009) Redox characterization of the FeS protein MitoNEET and impact of thiazolidinedione drug binding. *Biochemistry* 48, 10193–10195.
- (57) Adrover, M., Howes, B. D., Iannuzzi, C., Smulevich, G., and Pastore, A. (2015) Anatomy of an iron-sulfur cluster scaffold protein: Understanding the determinants of [2Fe-2S] cluster stability on IscU. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1853, 1448–1456.
- (58) White, K. A., Grillo-Hill, B. K., and Barber, D. L. (2017) Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *J. Cell Sci.* 130, 663–669.
- (59) Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y., and Reed, J. C. (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2, 318–325.
- (60) Harguindey, S., Stanciu, D., Devesa, J., Alfarouk, K., Cardone, R. A., Polo Orozco, J. D., Devesa, P., Rauch, C., Orive, G., Anitua, E., Roger, S., and Reshkin, S. J. (2017) Cellular acidification as a new approach to cancer treatment and to the understanding and therapeutics of neurodegenerative diseases. *Semin. Cancer Biol.* 43, 157–179.
- (61) Vaughan-Jones, R. D., Spitzer, K. W., and Swietach, P. (2009) Intracellular pH regulation in heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 318–331.

(62) Ruffin, V. A., Salameh, A. I., Boron, W. F., and Parker, M. D. (2014) Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Front. Physiol.* 5, 43.

(63) Teijido, O., Rappaport, S. M., Chamberlin, A., Noskov, S. Y., Aguilera, V. M., Rostovtseva, T. K., and Bezrukov, S. M. (2014) Acidification asymmetrically affects voltage-dependent anion channel implicating the involvement of salt bridges. *J. Biol. Chem.* 289, 23670–23682.

(64) Ferecatu, I., Canal, F., Fabbri, L., Mazure, N., Bouton, C., and Golinelli-Cohen, M.-P. (2018) Dysfunction in the mitochondrial Fe-S assembly machinery leads to the formation of the chemoresistant truncated VDAC1 isoform without HIF1- $\alpha$  activation. *PLoS One* 13, e0194782.

## ***CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION PAR MS NATIVE ET IM—MS NATIVE D’UN COMPLEXE DE HAUTS POIDS MOLÉCULAIRE : LE COMPLEXE NIUAF.***

### **1. Contexte de l’étude.**

Chez les bactéries dans les mitochondries, la synthèse de groupements Fe-S est essentielle au maintien de nombreuses fonctions biologiques comme l’homéostasie du fer, la respiration ou la production d’énergie<sup>19-20</sup> (chapitre 1) et est dirigée par une machinerie d’assemblage appelée ISC pour *Iron-Sulfur Cluster*. Cette machinerie d’assemblage permet la synthèse et l’insertion de centres Fe-S dans des protéines réceptrices *apo*. Plusieurs protéines sont impliquées dans la machinerie ISC et forment un complexe de 5 partenaires protéiques dont la stœchiométrie et le rôle de chacun ne sont pas clairement élucidés. Parmi ces 5 partenaires, la protéine ISCU est la protéine échafaudage qui permet de capter les centres Fe-S. La protéine NFS1 est une enzyme L-cystéine désulfurase qui permet à la machinerie de s’approvisionner en soufre à partir de L-cystéine par son intermédiaire. Elle constitue le cœur du complexe d’assemblage Fe-S avec la protéine ISD11 qui stimule l’activité de NFS1<sup>21</sup> et la protéine ACP impliquée dans la synthèse d’acide gras<sup>22</sup>. La dernière protéine impliquée est la frataxine (FXN). Son rôle n’est pas clairement identifié mais elle semble indispensable au bon fonctionnement de la mitochondrie<sup>23-24</sup>. En effet, les personnes atteintes d’une tare génétique induisant une sous expression de cette protéine<sup>25</sup> sont victimes de perte d’équilibre, d’une mauvaise coordination de leur mouvement et de problèmes cardiaques dus à une affection générale des nerfs et des muscles et en particulier d’une hypertrophie du ventriculaire gauche. Cette maladie rare est nommée l’ataxie de Friedreich<sup>26</sup> et affecte 1 personne sur 50,000 en France. L’assemblage du complexe NIUAF incluant la frataxine (NFS1, ISD11, ISCU, ACP, FXN) et le rôle de chaque partenaire sont encore mal connus aujourd’hui.

## 2. Objectifs de l'étude.

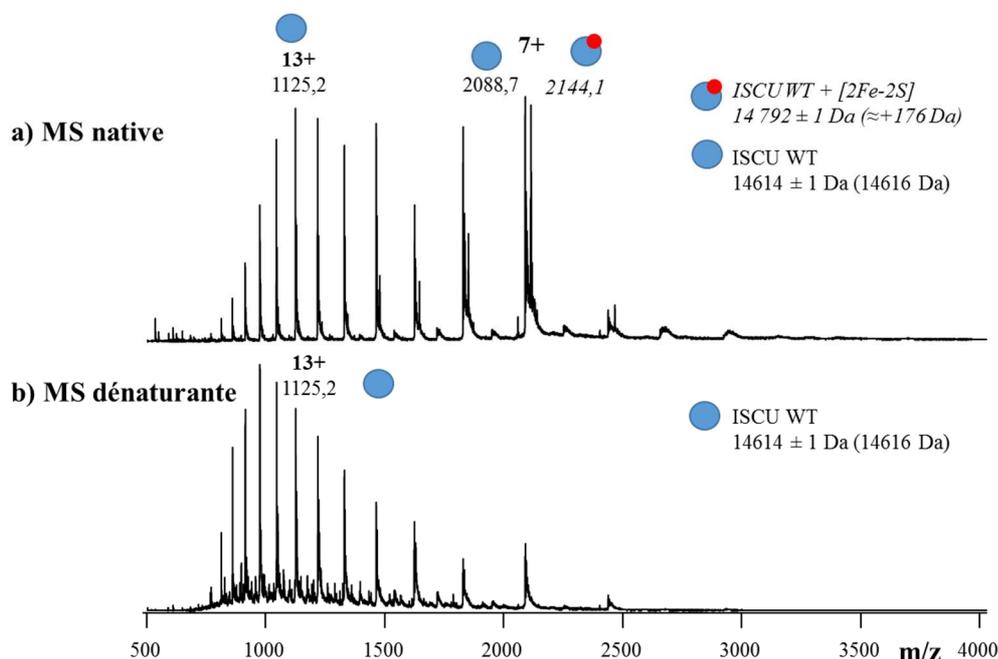
Dans ce contexte, en collaboration avec l'équipe du Dr. Benoit D'Autréaux (I2BC, UMR 9198, Paris-Sud), les objectifs de mon travail ont été :

- Identifier les masses des protéines partenaires formant le complexe NIUAF par MS dénaturante.
- Déterminer la stœchiométrie du complexe NIUAF par MS native et suivre les changements conformations au cours de son assemblage par IM-MS native.

## 3. Résultats.

### 3.1. Caractérisation de l'état de la protéine ISCU.

Avant de caractériser le complexe NIUAF entier, j'ai vérifié la fixation du centre Fe-S en conditions natives sur la protéine ISCU (figure 11). Deux distributions d'états de charge sont observées en MS native : une centrée sur l'état de charge 13+ correspondant à ISCU apo sous forme partiellement dénaturée et la seconde centrée sur l'état de charge 7+ correspondant à des proportions équivalentes de formes ISCU apo ( $14614 \pm 1$  Da, masse théorique 14616 Da) et ISCU holo ( $14792 \pm 1$  Da, masse théorique 14792 Da) structurées. Les masses mesurées permettent de mettre en évidence la fixation d'un centre 2Fe-2S sur ISCU (+176 Da).

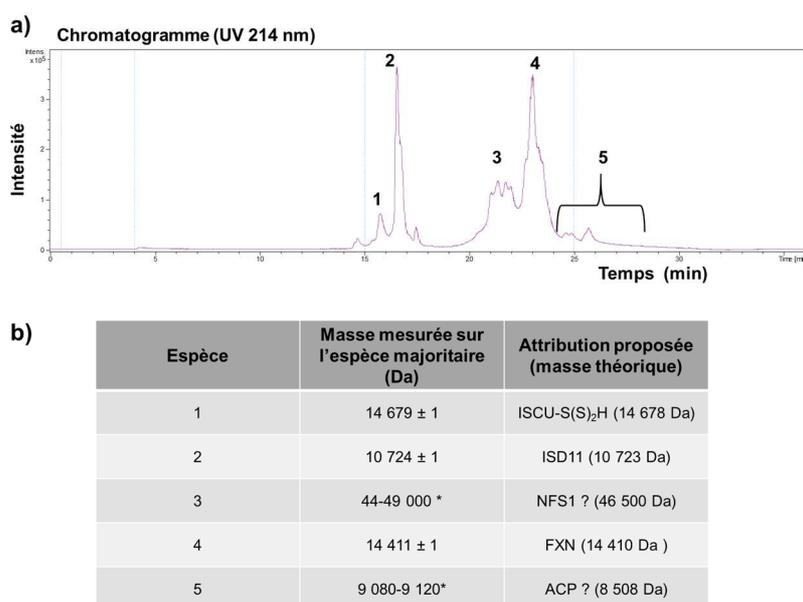


**Figure 11.** Fixation d'un centre 2Fe-2S non covalent observée en conditions natives, ISCU est infusée à 10  $\mu$ M dans un tampon  $\text{AcONH}_4$  10 mM pH 8,0.  $V_c$  : 40V,  $P_i$  : 6 mbar (a). Spectre de masse d'holoISCU en conditions dénaturantes, ISCU est infusée à 2  $\mu$ M dans un tampon  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ , 50/50/1, v/v/v.  $V_c$  : 40V,  $P_i$  : 1,7 mbar. (b). Expériences réalisées sur le Synapt G2.

## 3.2. Caractérisation du complexe NIUAF par MS dénaturante, MS native et IM-MS native.

### 3.2.1. Caractérisation du complexe NIUAF par MS dénaturante.

Les masses des différentes protéines impliquées dans le complexe ont été estimées à partir d'une expérience de LC-MS réalisée directement sur le complexe NIUAF copurifié (figure 12). De nombreux pics sont présents et sont partiellement coélués (a). La masse majoritaire de chaque espèce a été mesurée en vue de la caractérisation du complexe par MS native. La protéine ISCU (pic 1) est observée majoritairement doublement persulfurée avec une masse de  $14\,679 \pm 1$  Da. ISD11 (pic 2) et FXN (pic 4) sont observées sous une seule forme avec respectivement une masse de  $10\,724 \pm 1$  correspondant à la masse théorique  $10\,723$  Da (sans sa méthionine N-ter) et une masse de  $14\,411 \pm 1$  Da correspondant à la masse théorique de  $14\,410$  Da. Les protéines NFSF1 et ACP (pics 3 et 5) sont observées sous de multiples formes dont les masses sont difficilement mesurables en raison de la coélution des pics chromatographiques. La gamme de masse de chacune de ces deux protéines a tout de même été évaluée en mesurant la masse minimale et la masse maximale observées (12b, \*) afin d'estimer leur taille en vue de la caractérisation par MS native.

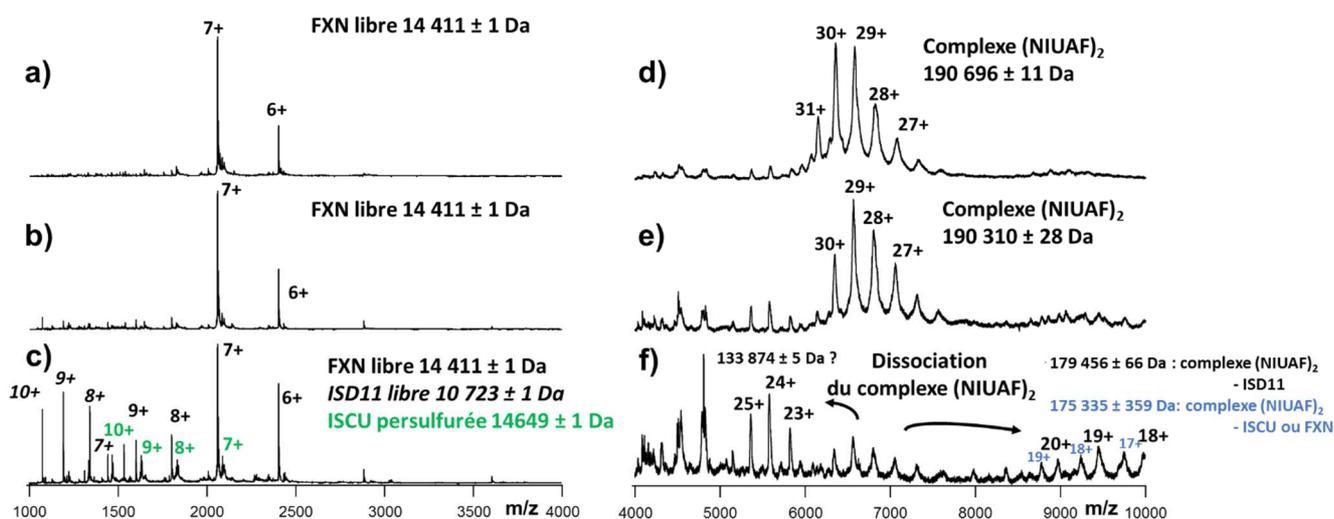


**Figure 12.** Analyse LC-MS du complexe NIUAF. Chromatogramme et tableau des masses mesurées. La séparation a été réalisée à  $60^{\circ}\text{C}$  sur une colonne XBridge BEH300, C4,  $3,5\ \mu\text{m}$ ,  $2,1 \times 150$  mm (Waters) et le spectromètre de masse utilisée était le micrOTOF-Q. Conditions chromatographiques : 1°) gradient : augmentation de la proportion d'ACN de 20 à 60 % en 20 min (gradient), 2°) lavage de la colonne : 2 min à 90 % d'ACN, 3°) rééquilibrage à 20% en ACN pendant 15 min. Les conditions chromatographiques ont été mises au point par le Dr. Jean-Marc Strub.

### 3.2.2. Caractérisation du complexe NIUAF par MS native.

**MS native :** La caractérisation par MS native du complexe NIUAF a permis d'observer deux espèces sur le spectre de masse : un complexe de  $190\,696 \pm 11$  Da (figure 13a) qui peut correspondre à une stœchiométrie d'interaction  $(\text{NIUAF})_2$  et la FXN libre (figure 13d). Cette stœchiométrie du complexe était, au commencement de notre étude, inconnue mais plusieurs articles avaient rapporté l'existence de sous-complexes : les sous complexes NIA<sup>27</sup> et NIUF<sup>28-29</sup>. Les masses mesurées en conditions dénaturantes pour les protéines NFS1, FXN, ISD11 et ACP et la masse mesurée en conditions natives pour ISCU-[2Fe-2S] permettent d'estimer la masse du complexe  $(\text{NIUAF})_2$  comprise entre 186 kDa et 196 kDa. Cette gamme est en accord avec la masse du complexe mesurée en MS native ( $\approx 191$  kDa).

**Top down MS :** À des tensions de cône Vc plus élevées, la dissociation progressive du complexe  $(\text{NIUAF})_2$  en différents sous complexes de 134 kDa, 175 kDa et 179 kDa (figure 13d-f) est observée de manière concomitante avec l'éjection d'ISD11 (figure 13a-c). Les deux signaux protéiques observés dans la région 9000-10000 m/z avec des masses de  $179\,456 \pm 66$  Da et  $175\,335 \pm 359$  Da sont respectivement attribuables au complexe  $(\text{NIUAF})_2$  ayant perdu une unité d'ISD11 ( $190\,696 - 10\,724 = 179\,972$  Da) et une unité d'ISCU ( $190\,696 - 14\,649 = 176\,047$  Da) ou une unité FXN ( $190\,696 - 14\,411 = 176\,285$  Da). Le complexe de 134 kDa observé sur la région 5000-6000 m/z pourrait correspondre à différentes combinaisons de sous-complexes et ne peut être identifié formellement. En cas de perte d'une protéine ISD11 (dissociation asymétrique), la masse attendue serait de  $179\,972$  Da environ ( $190\,696 - 10\,724$ ) or la masse mesurée est de  $133\,874$  Da soit une différence d'environ 46 kDa. Cela pourrait correspondre à l'éjection d'une protéine NFS<sup>30</sup>. La protéine NFS1 n'est cependant pas observée sur le spectre de masse.



**Figure 13.** Analyse MS native du complexe  $(\text{NIUAF})_2$  à différentes tensions de source de haut en bas Vc : 40 V, 120 V & 200 V. La pression en source est maintenue à 6 mbar et le débit de gaz en trap est fixé à 5 mL/min.

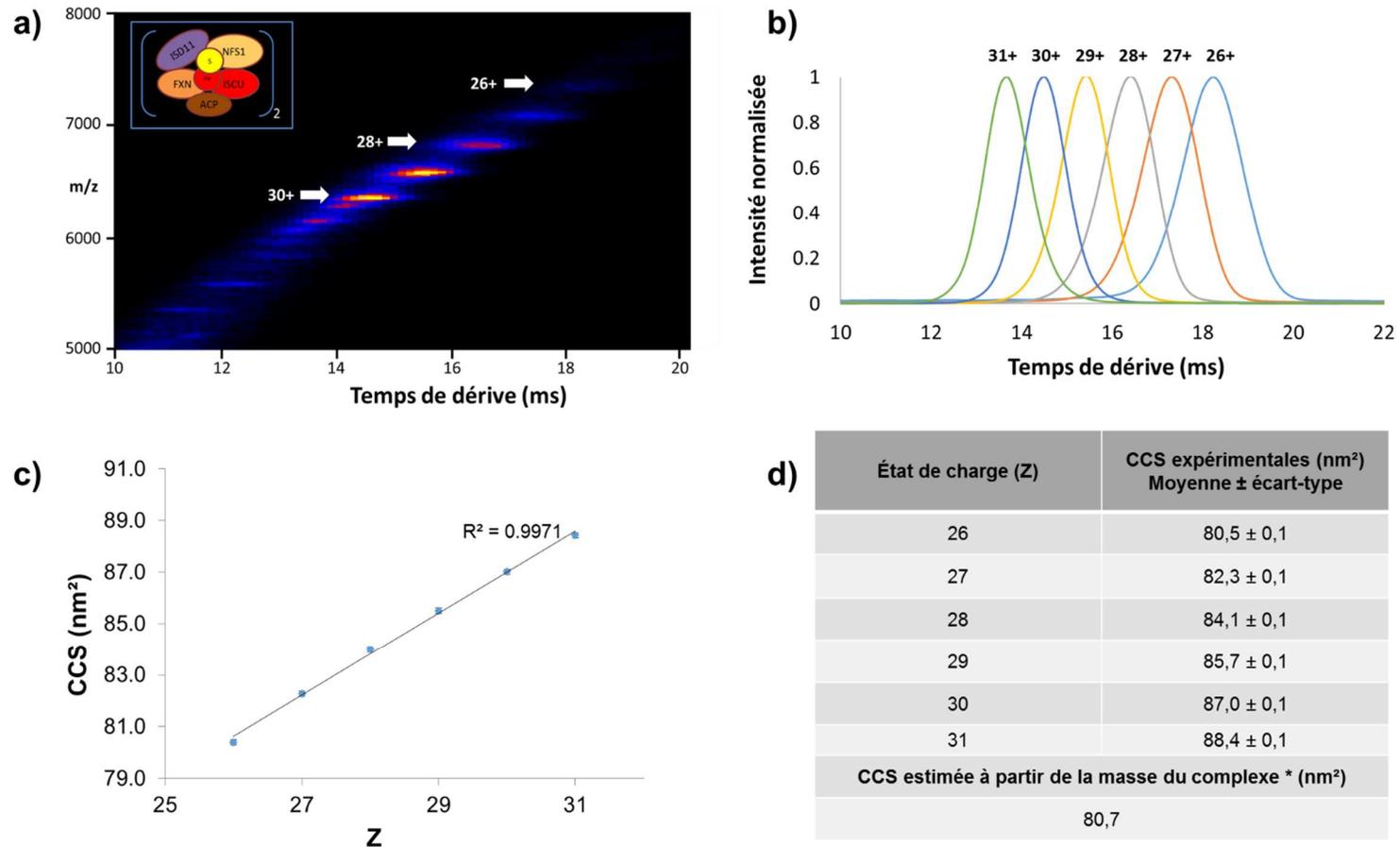
Les spectres a-c et les spectres d-f correspondent respectivement à la gamme m/z associée aux protéines monomériques libres (1000-4000 m/z) et à la gamme m/z associée au complexe (NIUAF)<sub>2</sub> (4000-10000 m/z).

Afin d'augmenter la résolution expérimentale et ainsi mieux évaluer la stœchiométrie d'interaction de ces protéines, plusieurs perspectives peuvent être explorées :

- il faudrait augmenter la pureté du complexe lors de l'étape de purification.
- il serait intéressant de pouvoir caractériser l'assemblage progressif du complexe en commençant par caractériser des sous-complexes.
- Le nouvel instrument Q-Orbitrap haute résolution actuellement développé par Thermo Fischer pourrait permettre d'accéder à des résolutions expérimentales supérieures à celles de notre instrument Q-TOF. De plus, cet appareil pourrait permettre de réaliser des expériences de Top down sur le complexe (NIUAF)<sub>2</sub> et ainsi de caractériser l'éjection successive de ses sous-unités.

### 3.2.3. Caractérisation du complexe (NIUAF)<sub>2</sub> par IM-MS native.

Afin d'évaluer la conformation de ce complexe hétérogène, nous avons réalisé des expériences de mobilité ionique (figure 14). Les ATDs mesurées ont une allure gaussienne (figure 14b) laissant supposer la présence d'une seule conformation. Ce point sera discuté ultérieurement dans la conclusion du chapitre. L'étalonnage a été réalisé en utilisant trois étalons de masse encadrant la masse du complexe (NIUAF)<sub>2</sub> : la concanavoline A ( $\approx 103$  kDa), l'alcool déshydrogénase ( $\approx 148$  kDa) et la pyruvate kinase ( $\approx 233$  kDa) selon le protocole décrit par Bush et al. (2010)<sup>16</sup>. Les expériences ont été réalisées en triplicata analytiques le même jour. Vc : 40V, Pi : 6 mbar, QHe/N2 : 120/60 mL/min, Trap CV : 4 V, trap gas : 5 mL/min, WV : 800 m/s and VH : 40 V. Les CCS expérimentales ainsi mesurées sont comprises entre  $80,5 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> pour l'état de charge 26+ (le moins chargé) et  $88,4 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup> pour l'état de charge 31+ (le plus chargé). Les CCS augmentent de manière linéaire avec l'état de charge et la CCS expérimentale de l'ion 26+ ( $80,5 \pm 0,1$  nm<sup>2</sup>), l'ion le plus natif est très proche de la CCS prédite à partir de la masse du complexe ( $80,7$  nm<sup>2</sup>). Cette similarité permet de supposer que le complexe peut adopter une conformation globulaire lors de nos expériences de mobilité ionique.



**Figure 14.** Caractérisation par IM-MS native du complexe (NIUAF)<sub>2</sub>. (a) Les temps de dérive de chaque état de charge du complexe sont mesurés. (b) La distribution du temps de dérive de chaque état de charge est extraite, chaque état de charge est associé à un temps de dérive qui lui est propre. (c) L'étalonnage réalisé permet le calcul des CCS des ions du complexe (NIUAF)<sub>2</sub>, les CCS suivent une droite linéaire en fonction de l'état de charge. (d) Tableau des CCS expérimentales moyennes mesurées sur un triplicat analytique. La CCS estimée à partir de la masse (\*) a été calculée en considérant le complexe (NIUAF)<sub>2</sub> comme sphérique selon l'équation<sup>15</sup>  $CCS=2,435 \times M^{2/3}$ .

## 4. Conclusions.

La caractérisation par MS native du complexe NIUAF a permis de suggérer la présence d'une stoechiométrie d'interaction (NIUAF)<sub>2</sub> qui a été confirmée en mars 2019 par l'obtention de la structure du complexe entier par cryo-EM (article non publié<sup>31</sup>). En MS native, la qualité spectrale observée n'est pas suffisante pour établir sans ambiguïté cette stoechiométrie ni pour observer la présence ou non du centre Fe-S sur la protéine ISCU lorsque celle-ci est en complexe. Les pistes pour améliorer la résolution sont aujourd'hui nombreuses :

- Optimiser la purification pour obtenir un échantillon plus homogène.
- Utiliser un instrument de haute résolution de type Q-Orbitrap récemment développé pour réaliser les expériences de MS native et envisager des expériences de Top Down afin de caractériser l'éjection successive ou concomitante des différentes sous unités protéiques et petites molécules impliquées (centre Fe-S, cofacteurs, etc) dans le complexe.
- Poursuivre la caractérisation de sous-complexes par MS native.
- L'utilisation de la SEC couplée à la MS native pourrait être un atout dans ce projet. En effet, elle permettrait de séparer en solution les protéines libres du complexe (NIUAF)<sub>2</sub> et sa capacité à supprimer efficacement les adduits non-covalents aspécifiques pourrait permettre d'atteindre de meilleures résolutions expérimentales sans utiliser un instrument de type Q-Orbitrap.

Concernant la caractérisation par mobilité-ionique, les CCS du complexe (NIUAF)<sub>2</sub> ont pu être déterminées et ont permis de mettre en évidence la présence d'une seule conformation. Cependant, la résolution limitée de la technologie TWIMS ne permet que rarement la distinction de changements de conformation fins (<5%)<sup>32-35</sup> qui pourraient être induits par exemple par la présence ou l'absence du centre 2Fe-2S. Le changement de CCS induit par la fixation de ce petit groupement (+176 Da) sur le complexe (NIUAF)<sub>2</sub> (190 kDa) serait de l'ordre de 0,1% et indétectable par le système utilisé. Une cellule haute résolution de mobilité ionique circulaire a récemment été développée par la société Waters<sup>36</sup> et pourrait être testée afin d'élucider cette gamme de changements conformationnels.

## 5. Valorisation.

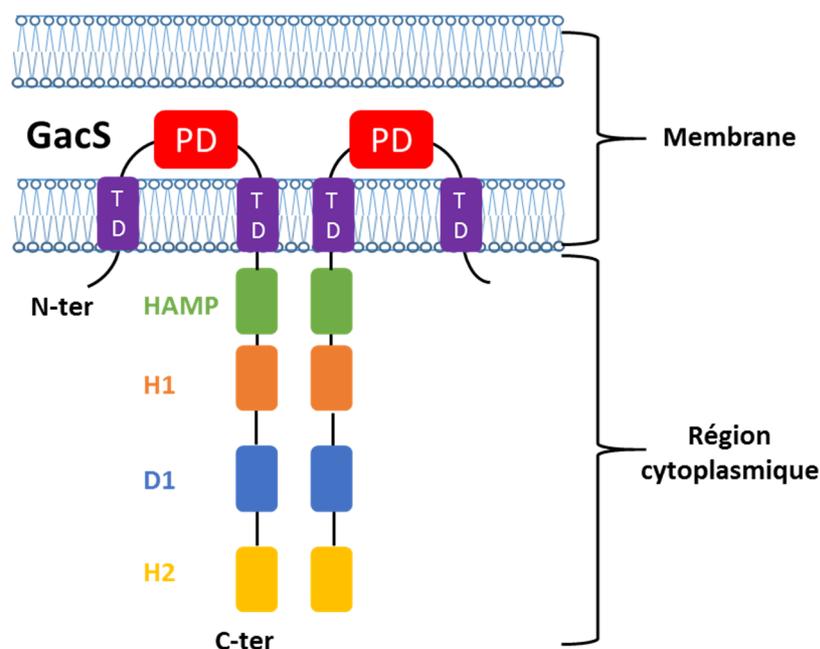
L'analyse d'ISCU et la détermination du centre Fe-S ont été intégrées dans un article en révision dans *Nature Communications*.

# CHAPITRE 3 : APPORT DU COUPLAGE SEC MS/IM-MS NATIVE POUR LA CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION GACS/RETS.

## 1. Contexte de l'étude.

La protéine GacS est une protéine impliquée dans la formation du biofilm bactérien responsable de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*<sup>37</sup>. C'est une histidine kinase (HK) qualifiée de protéine senseur dans les mécanismes de signalisation cellulaire et a à ce titre la capacité de s'autophosphoryler sur un résidu histidine suite à une interaction avec l'ATP<sup>38</sup>. GacS est enchâssée par son côté N-terminal dans la membrane interne de *P. aeruginosa* via deux hélices transmembranaires (représentées en violet, figure 15) reliées par une domaine périplasmique (noté en rouge) recevant un signal externe (concentration en nutriments, température). La région cytoplasmique de GacS est bien plus longue et peut être découpée en 4 domaines distincts :

- le domaine HAMP qui relie la seconde hélice transmembranaire aux autres domaines, domaine responsable de la transduction du signal (annoté en vert).
- les domaines phosphotransmetteur et phosphoreceveur respectivement notés H1 (annoté en orange) et D1 (annoté en bleu)
- le dernier domaine H2 est le domaine histidine phosphotransfert<sup>39</sup>.



**Figure 15.** Représentation schématique de GacS insérée dans la membrane interne de *Pseudomonas aeruginosa*.

Sa capacité à interagir spécifiquement et directement avec une autre histidine kinase la protéine RetS a récemment été décrite<sup>40</sup>. RetS pourrait réguler l'état de phosphorylation de GacS<sup>41</sup>.

Ce mécanisme exact d'interaction entre GacS et RetS est encore mal connu : deux hypothèses ont été faites dans la littérature<sup>42</sup>: ces protéines homodimériques forment soit des hétérodimères soit des oligomères de plus grandes tailles.

## **2. Objectifs de l'étude.**

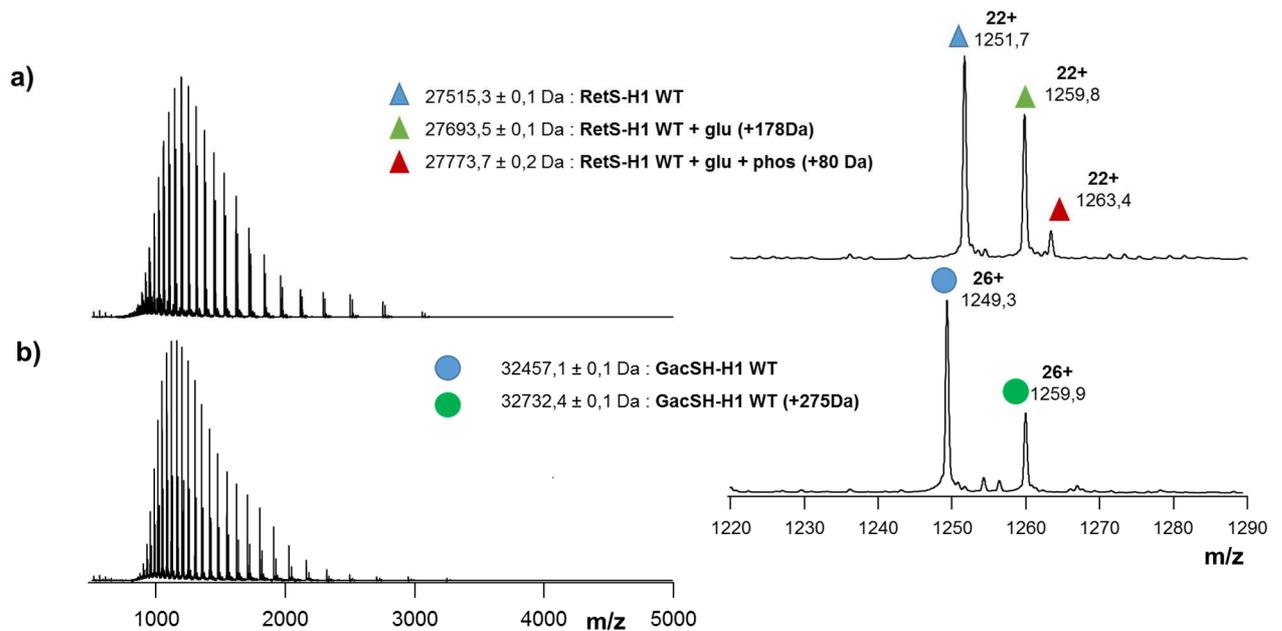
En collaboration avec l'équipe du Dr. Florence Vincent (AFMB, UMR 7257, Marseille), nous avons essayé de répondre à cette question en caractérisant par MS native différents construits de la protéine GacS soluble (sans son domaine transmembranaire et sa région périplasmique) et un construit de la protéine RetS soluble exprimées et purifiées chez *E. coli*. Nous avons fait le choix de caractériser ces protéines tronquées de leur partie N-terminale insérée dans la membrane afin de faciliter leur extraction et leur caractérisation par différentes approches biophysiques telles que la cristallographie (réalisée par le Dr. Firas Fadel) et la MS native (réalisée par moi-même).

## **3. Résultats.**

La mise au point des conditions MS a été réalisée en utilisant les construits RetSH1 et GacSH-H1 construits. Le construit GacSH-H1 est composé uniquement du domaine HAMP et du domaine H1, les domaines D1 et H2 étant tronqués.

### **3.1. Caractérisation des protéines par MS dénaturante.**

L'homogénéité des construits RetS-H1 et GacS-H-H1 a été évaluée par MS dénaturante (figure 16). La protéine RetS-H1 est majoritairement observée sous forme WT avec une masse expérimentale de  $27515,3 \pm 0,1$  Da (masse théorique 27515,3 Da). Deux autres espèces sont observées avec des ajouts de masse de +178 Da et +258 Da correspondant respectivement à une gluconoylation et à une phosphogluconoylation. Ces modifications sont bien connues chez les protéines exprimées chez *E. coli* et ont déjà été décrites<sup>43</sup>.

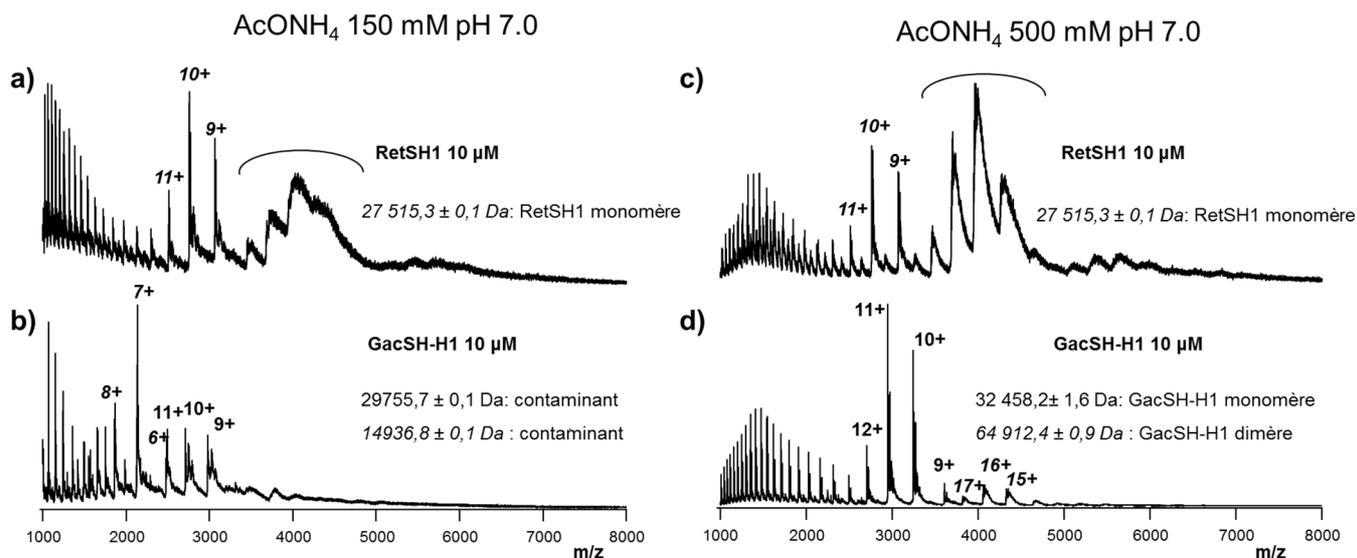


**Figure 16.** Caractérisation des protéines RetSH1 (a) et GacSH-H1 (b) par MS dénaturante. Un zoom sur un état de charge (1220-1290 m/z) est proposé afin de visualiser les différentes espèces présentes pour chaque protéine. Vc : 40 V, Pi : 2 mbar, expériences réalisées sur le Synapt G2.

### 3.2. Caractérisation des protéines par MS native et IM-MS native.

#### 3.2.1. Analyses en MS native (introduction directe).

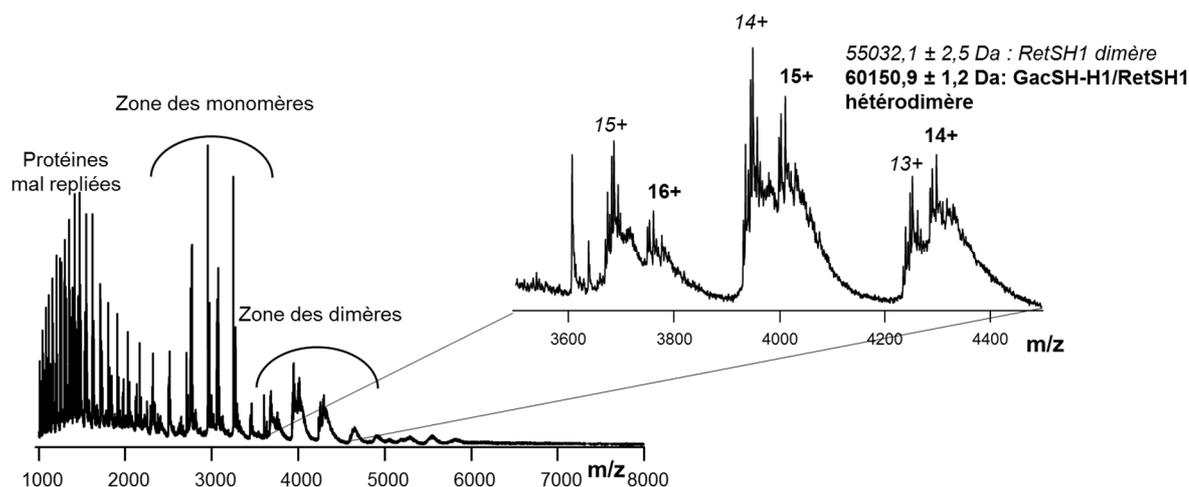
L'état d'oligomérisation de chaque protéine a ensuite été caractérisé par MS native en introduction manuelle dans deux conditions de tampon : une concentration en AcONH<sub>4</sub> de 150 mM pH 7,0 et une concentration en AcONH<sub>4</sub> de 500 mM pH 7,0. En effet, à 150 mM AcONH<sub>4</sub>, la protéine RetSH1 (figure 17a) est majoritairement observée sous forme monomérique structurée et un signal large attribuable à son dimère est observable (accolade figure 17). Dans les mêmes conditions, GacSH-H1 n'est pas observée (figure 17b), seules des protéines contaminantes d'environ 15 et 30 kDa sont détectées. Afin de favoriser la stabilité de ces protéines, nous avons décidé d'augmenter la force ionique du tampon à 500 mM. Dans les mêmes conditions MS, la forme dimérique de RetSH1 est ainsi mieux maintenue (figure 17c) et les formes monomériques et dimérique de GacSH-H1 sont observables (figure 17d) bien que la forme dimérique reste minoritaire. Outre la présence de ces signaux attribués à des protéines correctement repliées, des signaux correspondant à des protéines partiellement dénaturées sont observées sur les régions 1000-25000 m/z de chaque spectre.



**Figure 17.** Caractérisation des protéines RetSH1 et GacSH-H1 par MS native en infusion directe à deux forces ioniques différentes après un dessalage manuel à l'aide de deux mini colonnes de gel filtration avec un seuil de coupure de 7 kDa. Les spectres de masse ont été obtenus dans les conditions suivantes :  $V_c$  : 40 V,  $P_i$  : 6 mbar, trap gaz : 5 mL/min.

Les protéines ont donc été incubées dans le tampon 500 mM  $\text{AcONH}_4$  pendant une heure à température ambiante dans une stoechiométrie 1 :1 puis analysées dans les mêmes conditions MS. Un spectre de masse très complexe (figure 18) est obtenu. Trois zones peuvent être distinguées :

- la première, entre 1000 et 2500 m/z correspond aux protéines partiellement dénaturées.
- la seconde entre 2500 et 3500 m/z correspond à la zone des protéines GacSH-H1 et RetSH1 dans un état natif.
- la troisième correspond à la zone des protéines dimériques. Dans cette dernière zone, outre la présence de l'homodimère RetSH1, une espèce majoritaire correspondant à une masse de  $60150,9 \pm 1,2$  Da est observée et est attribuée à l'hétérodimère GacSH-H1/RetSH1 gluconoylé (masse théorique 60150 Da). De nombreuses autres espèces sont visibles et correspondent aux différentes possibilités d'hétérodimères entre les formes GacSH-H1 WT, GacSH-H1 WT +275 Da, RetSH1 WT, RetSH1 WT + gluconoylation et RetSH1 WT + phosphogluconoylation. Les dimères ne sont pas majoritaires sur les spectres de masse, cela est probablement dû à des facteurs d'ionisation différents entre monomères et dimères.



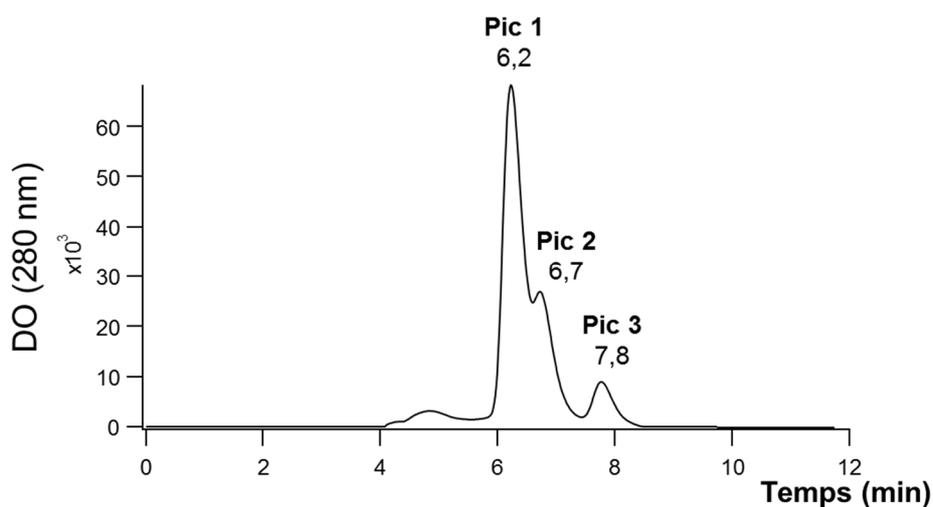
**Figure 18.** Caractérisation du mélange RetSH1 et GacSH-H1 par MS native en infusion directe à  $[\text{AcONH}_4]$  :500 mM. Les spectres de masse ont été obtenus dans les conditions suivantes :  $V_c$  :40 V,  $P_i$  : 6mbar, trap gaz : 5 mL/min. Les pics non annotés sont des combinaisons d'homodimères RetSH1 et hétérodimères GacSH-H1/RetSH1 avec les modifications détectées en conditions dénaturantes (gluconylation, phosphorylation, ainsi que la modification covalente +275 Da). De plus des adduits non-covalents de +60 Da sont observés, cet ajout de masse ne correspond pas à l'ajout d'ions magnésium dans les milieux de culture des deux protéines pour favoriser leur autophosphorylation.

En conclusion, la formation de l'hétérodimère est visible dans ces conditions expérimentales mais l'intensité des espèces dimériques reste faible pour plusieurs raisons. Les monomères sont préférentiellement ionisés par rapport aux espèces dimériques (efficacités d'ionisation des monomères supérieures à celles des dimères) et l'interaction hydrophobe régissant l'interface dimérique des deux protéines ne favorise pas son maintien en phase gazeuse. De plus, la présence d'adduits et de différentes modifications post-traductionnelles affecte particulièrement la qualité spectrale sur la zone des dimères.

### 3.2.2. Analyses en SEC-MS native.

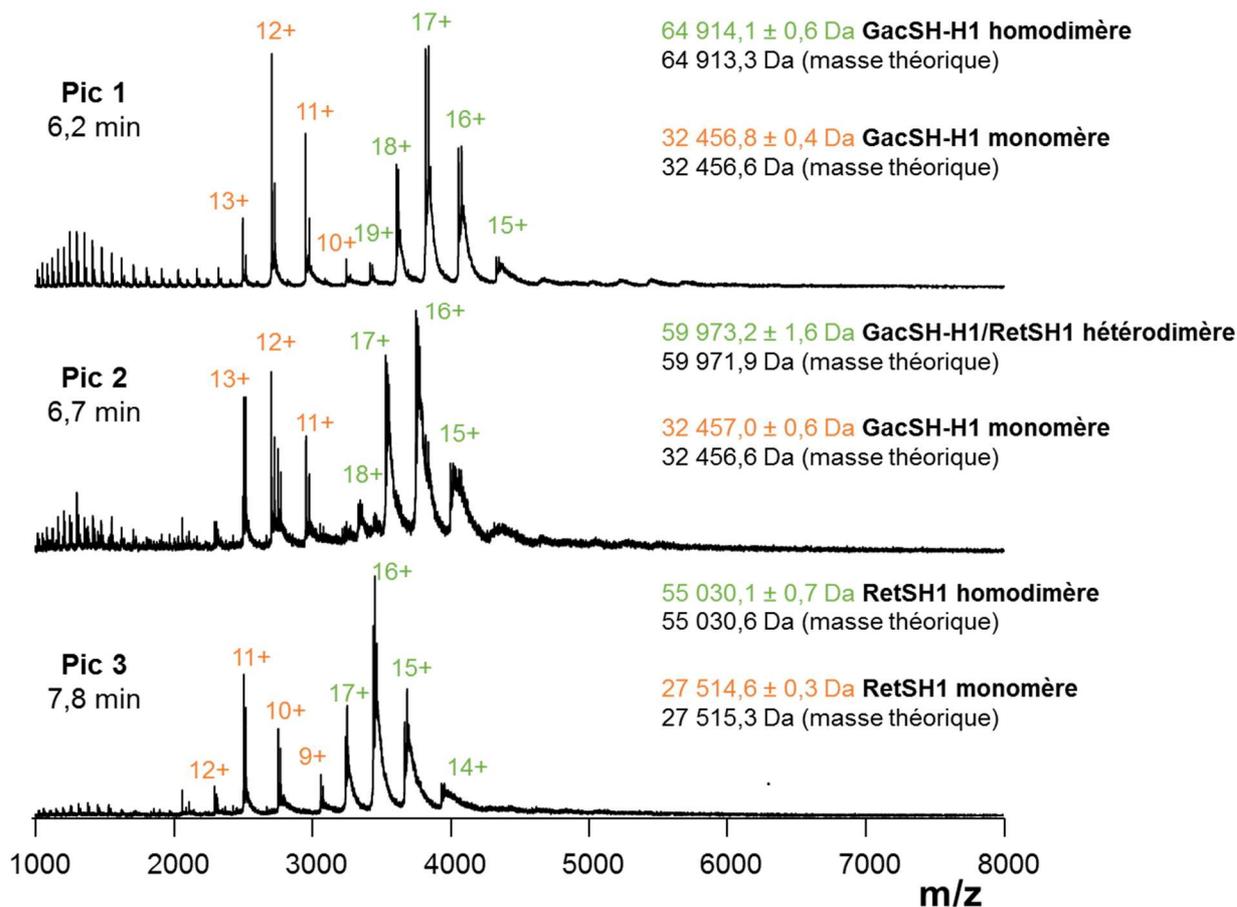
Face à ces difficultés pour la caractérisation de l'hétérodimère GacSH-H1/RetSH1 et au développement récent du couplage SEC-MS native pour la caractérisation de complexes multiprotéiques<sup>44-46</sup> et l'analyse d'anticorps monoclonaux<sup>47-49</sup>, j'ai évalué son potentiel dans le cadre de ce projet.

Trois pics correspondant aux espèces majoritaires attendues (homodimères de GacSH-H1 et RetSH1 + hétérodimère GacSH-H1/RetSH1) sont observés à 6,2 min, 6,7 min et 7,8 min sur le chromatogramme SEC. Les deux premiers pics ne sont pas séparés à la ligne de base, probablement due à une faible différence de masse entre ces deux espèces.



**Figure 19.** Séparation SEC du mélange GacSH-H1/RetSH1, les protéines ont été incubées en stœchiométrie 1 : 1 à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  pendant une heure à température ambiante puis injectées sur le système SEC. La colonne utilisée était une colonne Acquity BEH SEC (Waters, Manchester, UK) avec les dimensions suivantes : 4,6 x 150 mm (diamètre et longueur de la colonne), 1,7  $\mu\text{m}$  (taille des particules) et 200  $\text{\AA}$  (taille des pores). La phase mobile utilisée était  $\text{AcONH}_4$  500 mM pH 7,0 avec un débit de 0,25 mL/min de 0 à 4 min qui n'est pas dirigé vers la MS, de 4 à 10 min le débit est ralenti à 0,10 mL/min et le flux dirigé vers la MS pour la détection des espèces. Enfin de 10 à 12 min, le débit est augmenté à 0,25 mL/min et le flux est dirigé vers un bac de récupération : cette étape permet l'élimination des sels non-volatils contenus dans les tampons de purification.

L'analyse par MS native a permis une attribution des masses pour chacun des pics (figure 20). Les pics 1, 2 et 3 sont respectivement attribués à GacSH-H1 sous forme dimérique (spectre a), à l'hétérodimère GacSH-H1/RetSH1 (spectre b) et à RetSH1 sous forme dimérique (spectre c). L'ordre d'élution SEC est bien respecté car l'espèce de 65 kDa est éluee la première (GacSH-H1 dimérique), puis la seconde espèce éluee est l'hétérodimère d'environ 60 kDa et la dernière espèce est l'homodimère RetSH1 de 55 kDa. La qualité des spectres obtenus en couplage SEC est très supérieure à celle des spectres acquis en introduction directe montrant ainsi l'efficacité du dessalage par SEC (suppression des adduits non-covalents). De plus, la proportion d'espèces dimériques détectées sur le spectre de masse est très supérieure en SEC-MS vs introduction directe, ce qui pourrait être dû à la séparation des espèces en solution qui permet de diminuer les biais liés à la compétition à l'ionisation. Les tensions appliquées en source, trap et les débits de gaz au sein du spectromètre de masse en couplage SEC et en infusion directe sont identiques.

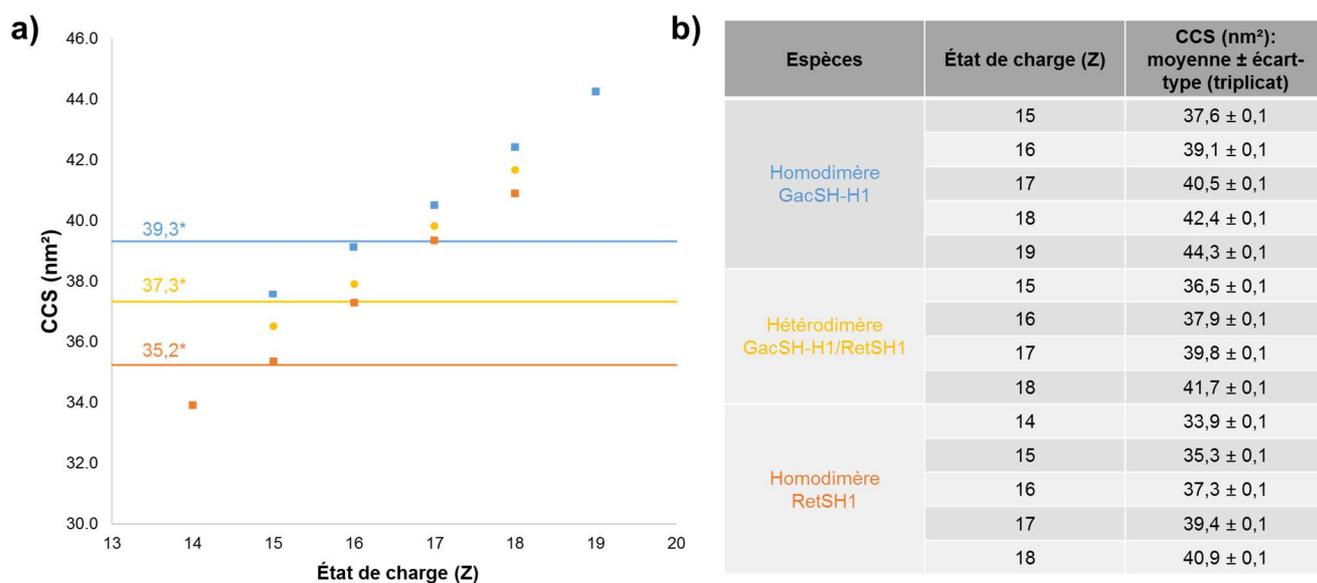


**Figure 20.** Caractérisation successive des homodimères et de l'hétérodimère RetSH1/GacSH-H1 par MS native en couplage SEC. Les spectres de masse ont été obtenus dans les conditions suivantes :  $V_c$  :40 V,  $P_i$  : 6mbar, trap gaz : 5 mL/min. Les pics non annotés sont des combinaisons d'homodimères RetSH1 et hétérodimères GacSH-H1/RetSH1 avec les modifications détectées en conditions dénaturantes (gluconylation, phosphorylation, ainsi que la modification covalente +275 Da).

### 3.2.3. Analyses en SEC-IM-MS native.

#### ❖ Détermination des CCS.

Afin d'évaluer la conformation de l'hétérodimère GacSH-H1/RetSH1 ainsi formé et pouvoir la comparer aux homodimères, j'ai utilisé la mobilité ionique couplée au système SEC-MS native mis en place pour mesurer les CCS de chaque espèce. Les CCS de l'hétérodimère sont, d'après mes mesures, intermédiaires entre celles mesurées pour les construits homodimériques GacSH et RetSH1 (figure 21a). Pour l'état de charge 16+ (figure 21b), les CCS mesurées sont respectivement de  $39,1 \pm 0,1 \text{ nm}^2$ ,  $37,9 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  et  $37,3 \pm 0,1 \text{ nm}^2$  pour les dimères GacSH-H1/GacSH-H1, GacSH-H1/RetSH1, et RetSH1/RetSH1. Ce classement et les valeurs absolues sont en accord avec les CCS prédites à partir de la masse des complexes<sup>15</sup> (représentées en figure 21a par une astérisque).



**Figure 21.** Mesure des CCS des homodimères et de l'hétérodimère. (a) Évolution des CCS en fonction de la charge. (b) Tableau détaillant les CCS mesurées pour chaque état de charge. L'étalonnage a été réalisé en utilisant la concanavaline A comme protéine référence<sup>16</sup>.

#### ❖ Comparaison aux données cristallographiques.

Les structures cristallographiques des deux homodimères ayant été obtenues par le Dr. Firas Fadel (non montrées pour des raisons de confidentialité), j'ai pu calculer les CCS de ces structures *in silico* en utilisant deux algorithmes différents : la méthode Projection Approximation (PA) et la méthode Trajectoire (TM). Ces méthodes sont décrites plus en détails en partie 1 du manuscrit.

- Concernant le dimère RetSH1, les algorithmes de calcul « Projection Approximation » et « Trajectory Method » permettent d'observer des CCS nettement différentes : la CCS estimée avec la méthode PA (33,0 nm<sup>2</sup>) est inférieure de 9,1 nm<sup>2</sup> en comparaison avec la méthode TM (42,1 nm<sup>2</sup>). La méthode préférée pour les calculs de CCS *in silico* est la méthode TM<sup>50</sup> car la méthode PA est décrite pour sous-estimer les CCS des biomolécules<sup>51-52</sup>, cette méthode ne tient pas compte des collisions entre les atomes. La CCS moyenne déterminée en IM-MS (38,2 nm<sup>2</sup>) est inférieure à la CCS déterminée par la méthode TM (42,1 nm<sup>2</sup>) laissant ainsi supposer une compaction en phase gazeuse du dimère RetSH1 d'environ 9%. Cet écart est attendu car, en phase gazeuse, l'effet stabilisateur de l'hydrophobicité est perdu. Les CCS déterminées par IM-MS sont ainsi souvent plus faibles que les CCS théoriques.

- Concernant, la caractérisation du dimère GacSH-H1, des conclusions similaires peuvent être dressées. La CCS estimée à partir de l’algorithme PA (50,8 nm<sup>2</sup>) est inférieure à celle calculée avec l’algorithme TM (66,3 nm<sup>2</sup>). Une compaction en phase gazeuse bien plus importante que pour RetSH1, d’environ 40 %, est observée sur le dimère GacSH-H1 avec une CCS estimée de 66,3 nm<sup>2</sup> selon la méthode TM contre environ 39,9 nm<sup>2</sup> à partir de la moyenne des CCS expérimentales. En effet, cet écart de compaction entre les deux construits pourrait provenir de la forme particulière en « tige » de GacSH-H1 dont le repliement s’effondrerait en partie en phase gazeuse, la structure de RetSH1 étant elle bien plus compacte. Face à ces résultats, on peut supposer que le modèle d’une protéine globulaire n’est pas forcément adapté pour la protéine GacSH-H1<sup>53</sup>.

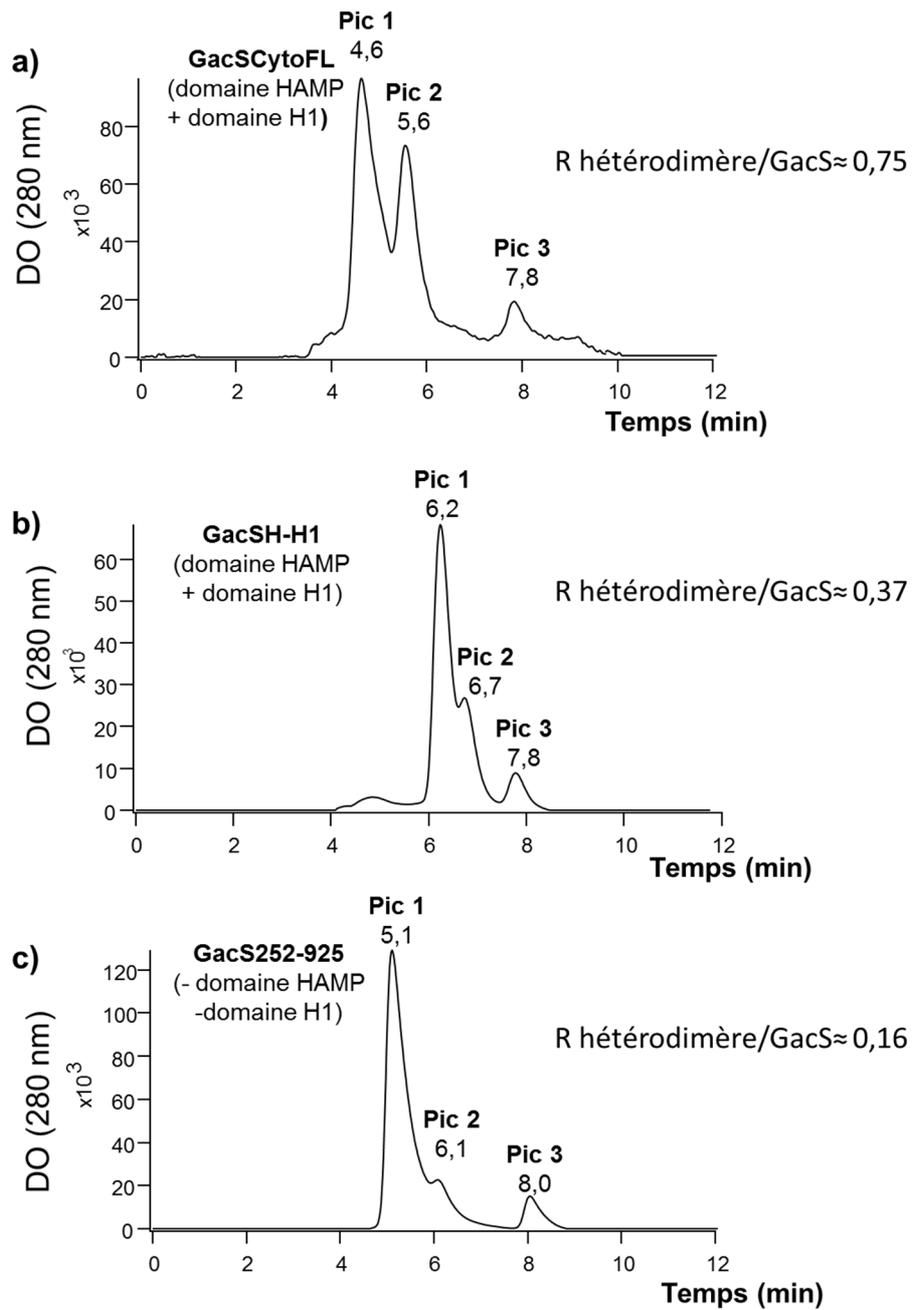
| Méthode                                  | CCS (nm <sup>2</sup> ) |                              |                      |
|--|------------------------|------------------------------|----------------------|
|  | RetSH1 dimère          | GacSH-H1/RetSH1 hétérodimère | GacSH-H1 dimère      |
| PA                                       | 33,0                   | -                            | 50,8                 |
| <b>TM</b>                                | <b>42,1</b>            | -                            | <b>66,3</b>          |
| IM-MS (14+)                              | 33,9 ± 0,1             | -                            | -                    |
| IM-MS (15+)                              | 35,3 ± 0,1             | 36,5 ± 0,1                   | 37,6 ± 0,1           |
| IM-MS (16+)                              | 37,3 ± 0,1             | 37,9 ± 0,1                   | 39,1 ± 0,1           |
| IM-MS (17+)                              | 39,4 ± 0,1             | 39,8 ± 0,1                   | 40,5 ± 0,1           |
| IM-MS (18+)                              | 40,9 ± 0,1             | 41,7 ± 0,1                   | 42,4 ± 0,1           |
| IM-MS (19+)                              | -                      | -                            | 44,3 ± 0,1           |
| <b>IM-MS (moyenne)</b>                   | <b>38,2 (15-18+)</b>   | <b>39,0 (15-18+)</b>         | <b>39,9 (15-18+)</b> |
| <b>Différence (%) entre TM et IM-MS.</b> | <b>-9,3</b>            | -                            | <b>-39,9</b>         |

**Tableau 1.** Comparaison des CCS expérimentales déterminées par IM-MS et des CCS théoriques déterminées à partir des structures cristallographiques pour les homodimères RetSH1 et GacSH-H1. Les CCS théoriques ont été estimées à l’aide du logiciel IMPACT<sup>54</sup> en utilisant les algorithmes PA et TM.

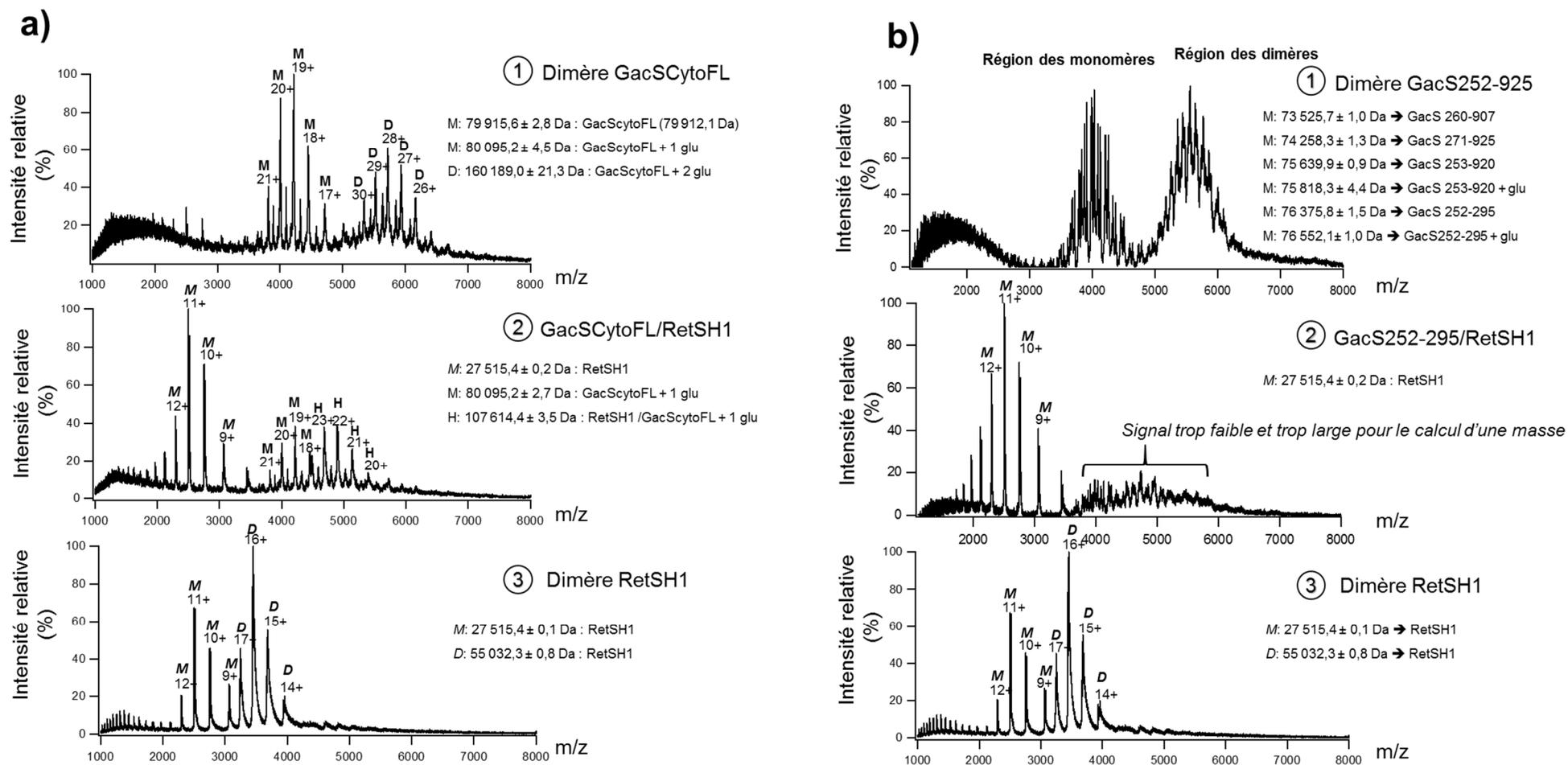
### 3.2.4. Criblage de construits GacS par SEC- MS native.

Afin de déterminer les zones d’interaction de GacS essentielles à la formation de l’hétérodimère avec RetSH1, deux autres construits GacS ont été purifiés, incubés avec RetSH1 dans les mêmes conditions que GacSH-H1 puis analysés avec la méthode SEC-MS native. Ces construits sont GacScytoFL, construit contenant l’intégralité de la région cytoplasmique, du domaine HAMP au domaine H2 et le construit GacS252-925, construit identique au construit GacScytoFL tronqué de son domaine HAMP. Les chromatogrammes SEC ainsi obtenus sont présentés en figure 22. Le construit GacS présentant la meilleure « affinité » avec le construit RetSH1 est GacScytoFL (figure 22a), avec un rapport hétérodimère/GacSdimère de 0,75. Ce

rapport a été calculé afin d'évaluer la proportion d'hétérodimère pour chaque construit de GacS, en divisant la DO mesurée à 280 nm de l'espèce dimérique GacS par la DO mesurée à 280 nm de l'espèce hétérodimérique. Le second construit (figure 22b), GacSH-H1 contenant également les domaines HAMP et H1, et permet également la formation de l'hétérodimère avec un rapport de 0,37. Ce rapport est inférieur à celui calculé pour le construit GacS contenant la région cytoplasmique entière et peut suggérer la coopérativité éventuelle des autres domaines pour renforcer l'interaction avec RetSH1. Concernant le construit GacS252-925, tronqué côté N-terminal (sans les domaines HAMP et H1), une très faible proportion d'hétérodimère est visible avec un rapport de 0,16, très inférieur au rapport observé avec le construit GacScytoFL (0,75). Ce résultat permet de suggérer, de manière préliminaire, l'importance des domaines HAMP et H1 dans l'interaction avec RetSH1. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis de mesurer des masses précises pour cette faible proportion d'hétérodimère pour ce construit (figure 23b, spectre 2).



**Figure 22.** Comparaison des chromatogrammes des mélanges GacSCytoFL/RetSH1 (a), GacSH-H1/RetSH1 (b) et GacS252-925/RetSH1 (c). Les conditions SEC sont similaires pour les trois analyses.



**Figure 23** : Spectres de masse obtenus en couplage SEC-MS native pour les mélanges GacSCytoFL/RetSH1 (a) et GacS252-925/RetSH1 (c). Les conditions MS sont similaires pour les deux analyses.

## 4. Conclusions.

Ce projet a été initié durant ma troisième année de thèse, d'un point de vue analytique, les optimisations présentées ont permis de mettre au point un protocole de MS native permettant le criblage de construits GacS avec la protéine RetS. L'utilisation du couplage SEC a permis les avantages suivants:

- une amélioration significative de la qualité spectrale en MS,
- la possibilité d'analyser les protéines dans des conditions « douces » pour limiter le déploiement protéique et la rupture des interactions faibles monomère/monomère permettant ainsi une caractérisation par mobilité ionique,
- la mise au point d'une approche systématique permettant le criblage rapide de différents construits de GacS ou RetS et l'automatisation de l'acquisition des données.

Les données obtenues ont permis de mettre en évidence pour la première fois la formation d'un hétérodimère GacS/RetS, en solution et en phase gazeuse. De plus la présence de monomères à de faibles tensions en source permet de souligner la faiblesse des interactions (hydrophobes) de la zone dimérique de GacS/RetS mais aussi sur les homodimères GacS/GacS et RetS/RetS.

Le criblage de différents construits de GacS sur RetS a permis de mettre en évidence *a priori* l'implication des domaines HAMP et H1 dans l'interaction. Les perspectives pour confirmer cette première hypothèse sont nombreuses :

- De nouveaux construits GacS tronqués sur ces domaines stratégiques pourraient être produits et analysés par SEC-MS native afin de renforcer cette hypothèse.
- La protéolyse ménagée pourrait aussi être une approche valable pour déterminer la zone minimale nécessaire à l'interaction entre les deux protéines.
- La combinaison d'approches de XL-MS et d'HDX-MS pourra permettre de caractériser plus finement les zones d'interaction GacS/RetS et de caractériser des changements conformationnels induits à une meilleure résolution spatiale (à l'échelle du peptide) que les expériences de mobilité ionique (échelle globale). Pour l'étude par HDX-MS, l'hétérodimère devra être impérativement purifié et la forme dimérique favorisée en solution afin d'éviter les signaux parasites liés à la présence des espèces homodimériques et monomériques.

L'intégration de données de MS native, IM-MS, XL-MS et HDX-MS devra à terme permettre de proposer des modèles structuraux de ce complexe et ainsi sa modélisation<sup>55-57</sup>.

À plus long terme, afin de se rapprocher toujours au plus près des conditions *in vivo*, il serait intéressant de caractériser les protéines GacS et RetS sous leur forme entière afin de tenir compte de l'influence des parties N-terminales enchâssées dans la membrane sur le repliement protéique et probablement sur l'interaction et pourquoi pas les caractériser directement en milieu membranaire sans extraction avec les détergents.

Outre les approches de MS, l'étude de cette interaction est actuellement en cours par cristallographie afin d'obtenir des structures et par des tests de pull down réalisés sur les différents construits de GacS afin d'évaluer leur fixation sur RetS.

## ***CONCLUSION DE CETTE PARTIE.***

L'application de méthodes de MS native et IM-MS native à travers l'étude de différents systèmes protéine-protéine a permis de mettre en lumière une partie des avantages et des limites actuelles de ces approches.

L'étude la protéine mitoNEET (chapitre 1) a permis de souligner la capacité de la MS native à caractériser l'état d'oligomérisation et la capacité à maintenir un centre Fe-S d' un **système dynamique**. La déstabilisation du dimère et l'éjection du centre 2Fe-2S progressives ont pu être suivies au cours du temps dans différentes conditions de pH par cette approche. Ces résultats ont permis de proposer mNT comme une protéine pH senseur.

La caractérisation du complexe (NIUAF)<sub>2</sub> (chapitre 2) a souligné l'importance de la résolution en MS native pour la détermination d'une stœchiométrie non ambiguë. En effet, les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer précisément la stœchiométrie d'interaction des différents partenaires et montrent la nécessité de développer des instruments de plus haute résolution pour **l'étude de complexes hétérogènes**. Les instruments de type Q-Orbitrap développés par la société Thermo permettront probablement d'améliorer la résolution expérimentale et favoriseront ainsi la caractérisation de tels édifices.

Les **apports du couplage SEC-MS native** ont pu être décrits pour l'étude de la formation de l'hétérodimère GacS/RetS (chapitre 3). Outre l'obtention de spectres de résolution accrue, le couplage SEC-MS native a permis d'éviter l'utilisation de tensions en source élevées et donc la dissociation totale des homodimères et des hétérodimères présents en solution. Ce couplage sera par la suite à nouveau utilisé pour cribler différents construits de GacS et mettre en évidence les domaines nécessaires à l'interaction avec la protéine partenaire RetS. D'un point de vue analytique, ce couplage est particulièrement intéressant car il permet d'étudier la formation de l'hétérodimère à la fois en solution et en phase gazeuse de manière automatique. De plus, la possibilité de couplage offerte par la mobilité ionique permet d'estimer en une seule analyse la conformation des espèces préalablement séparées en SEC.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hou, X.; Liu, R.; Ross, S.; Smart, E. J.; Zhu, H.; Gong, W., Crystallographic studies of human MitoNEET. *J Biol Chem* **2007**, *282* (46), 33242-6.
2. Lin, J.; Zhou, T.; Ye, K.; Wang, J., Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (37), 14640-5.
3. Wiley, S. E.; Paddock, M. L.; Abresch, E. C.; Gross, L.; van der Geer, P.; Nechushtai, R.; Murphy, A. N.; Jennings, P. A.; Dixon, J. E., The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. *J Biol Chem* **2007**, *282* (33), 23745-9.
4. Bak, D. W.; Elliott, S. J., Conserved hydrogen bonding networks of MitoNEET tune Fe-S cluster binding and structural stability. *Biochemistry* **2013**, *52* (27), 4687-96.
5. Paddock, M. L.; Wiley, S. E.; Axelrod, H. L.; Cohen, A. E.; Roy, M.; Abresch, E. C.; Capraro, D.; Murphy, A. N.; Nechushtai, R.; Dixon, J. E.; Jennings, P. A., MitoNEET is a uniquely folded 2Fe-2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. *P Natl Acad Sci USA* **2007**, *104* (36), 14342-14347.
6. Colca, J. R.; McDonald, W. G.; Waldon, D. J.; Leone, J. W.; Lull, J. M.; Bannow, C. A.; Lund, E. T.; Mathews, W. R., Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2004**, *286* (2), E252-60.
7. Sohn, Y. S.; Tamir, S.; Song, L.; Michaeli, D.; Matouk, I.; Conlan, A. R.; Harir, Y.; Holt, S. H.; Shulaev, V.; Paddock, M. L.; Hochberg, A.; Cabanchick, I. Z.; Onuchic, J. N.; Jennings, P. A.; Nechushtai, R.; Mittler, R., NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (36), 14676-81.
8. santé, A. f. d. s. s. d. p. d. *Suspension de l'utilisation en France des médicaments antidiabétiques contenant de la pioglitazone (Actos®, Competact®)*. 2011.
9. Tamir, S.; Paddock, M. L.; Darash-Yahana-Baram, M.; Holt, S. H.; Sohn, Y. S.; Agranat, L.; Michaeli, D.; Stoffleth, J. T.; Lipper, C. H.; Morcos, F.; Cabantchik, I. Z.; Onuchic, J. N.; Jennings, P. A.; Mittler, R.; Nechushtai, R., Structure-function analysis of NEET proteins uncovers their role as key regulators of iron and ROS homeostasis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1853* (6), 1294-315.
10. Ferecatu, I.; Goncalves, S.; Golinelli-Cohen, M. P.; Clemancey, M.; Martelli, A.; Riquier, S.; Guittet, E.; Latour, J. M.; Puccio, H.; Drapier, J. C.; Lescop, E.; Bouton, C., The Diabetes Drug Target MitoNEET Governs a Novel Trafficking Pathway to Rebuild an Fe-S Cluster into Cytosolic Aconitase/Iron Regulatory Protein 1. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (41), 28070-28086.
11. Mons, C., Etude biochimique de mitoNEET humaine, protéine à centre [2Fe-2S], impliquée dans une voie de réparation des protéines Fe-S suite à un stress oxydatif. **2017**.
12. Golinelli-Cohen, M. P.; Lescop, E.; Mons, C.; Goncalves, S.; Clemancey, M.; Santolini, J.; Guittet, E.; Blondin, G.; Latour, J. M.; Bouton, C., Redox Control of the Human Iron-Sulfur Repair Protein MitoNEET Activity via Its Iron-Sulfur Cluster. *J Biol Chem* **2016**, *291* (14), 7583-93.
13. Zuris, J. A.; Harir, Y.; Conlan, A. R.; Shvartsman, M.; Michaeli, D.; Tamir, S.; Paddock, M. L.; Onuchic, J. N.; Mittler, R.; Cabantchik, Z. I.; Jennings, P. A.; Nechushtai, R., Facile transfer of [2Fe-2S] clusters from the diabetes drug target mitoNEET to an apo-acceptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (32), 13047-52.
14. Moulis, J. M.; Davasse, V.; Golinelli, M. P.; Meyer, J.; Quinkal, I., The coordination sphere of iron-sulfur clusters: Lessons from site-directed mutagenesis experiments. *J Biol Inorg Chem* **1996**, *1* (1), 2-14.
15. Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L.; Sandercock, A. M.; Hyung, S. J.; Robinson, C. V., Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat Protoc* **2008**, *3* (7), 1139-52.
16. Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T., Collision cross sections of proteins and their complexes: a calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Anal Chem* **2010**, *82* (22), 9557-65.
17. El-Kabbani, O.; Rogniaux, H.; Barth, P.; Chung, R. P.; Fletcher, E. V.; Van Dorsselaer, A.; Podjarny, A., Aldose and aldehyde reductases: correlation of molecular modeling and mass spectrometric studies on the binding of inhibitors to the active site. *Proteins* **2000**, *41* (3), 407-14.
18. Mons, C.; Botzanowski, T.; Nikolaev, A.; Hellwig, P.; Cianferani, S.; Lescop, E.; Bouton, C.; Golinelli-Cohen, M. P., The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistant Fe-S Redox Switch MitoNEET Acts as a pH Sensor To Repair Stress-Damaged Fe-S Protein. *Biochemistry* **2018**, *57* (38), 5616-5628.

19. Rouault, T. A.; Maio, N., Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J Biol Chem* **2017**, *292* (31), 12744-12753.
20. Braymer, J. J.; Lill, R., Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem* **2017**, *292* (31), 12754-12763.
21. Pandey, A.; Golla, R.; Yoon, H.; Dancis, A.; Pain, D., Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe-S cluster synthesis. *Biochem J* **2012**, *448* (2), 171-87.
22. Liu, X.; Hicks, W. M.; Silver, P. A.; Way, J. C., Engineering acyl carrier protein to enhance production of shortened fatty acids. *Biotechnol Biofuels* **2016**, *9*, 24.
23. Pandolfo, M., Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* **2002**, *2* (1-2), 87-93.
24. Colin, F.; Martelli, A.; Clemancey, M.; Latour, J. M.; Gambarelli, S.; Zeppieri, L.; Birck, C.; Page, A.; Puccio, H.; Ollagnier de Choudens, S., Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster assembly. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (2), 733-40.
25. Bridwell-Rabb, J.; Winn, A. M.; Barondeau, D. P., Structure-function analysis of Friedreich's ataxia mutants reveals determinants of frataxin binding and activation of the Fe-S assembly complex. *Biochemistry* **2011**, *50* (33), 7265-74.
26. Burk, K., Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias* **2017**, *4*, 4.
27. Cory, S. A.; Van Vranken, J. G.; Brignole, E. J.; Patra, S.; Winge, D. R.; Drennan, C. L.; Rutter, J.; Barondeau, D. P., Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISD11 interactions. *P Natl Acad Sci USA* **2017**, *114* (27), E5325-E5334.
28. Tsai, C. L.; Barondeau, D. P., Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe-S Cluster Biosynthetic Complex. *Biochemistry* **2010**, *49* (43), 9132-9139.
29. Schmucker, S.; Martelli, A.; Colin, F.; Page, A.; Wattenhofer-Donze, M.; Reutenauer, L.; Puccio, H., Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *Plos One* **2011**, *6* (1).
30. Parent, A.; Elduque, X.; Cornu, D.; Belot, L.; Le Caer, J. P.; Grandas, A.; Toledano, M. B.; D'Autreaux, B., Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat Commun* **2015**, *6*, 5686.
31. Fox, N.; Yu, X.; Feng, X.; Bailey, H.; Martelli, A.; Nabhan, J.; Strain-Damerell, C.; Bulawa, C.; Yue, W.; Han, S., Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. In *bioRxiv*, bioRxiv, Ed. 2019.
32. Stojko, J.; Fieulaine, S.; Petiot-Becard, S.; Van Dorsselaer, A.; Meinel, T.; Giglione, C.; Cianferani, S., Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *Analyst* **2015**, *140* (21), 7234-45.
33. Stojko, J. Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macromolécules et de leurs complexes associés. 2016.
34. Bécard, S. Développements méthodologiques en spectrométrie de masse et en mobilité ionique pour l'étude d'assemblages supramoléculaires en biologie. 2012.
35. Atmanene, C.; Petiot-Becard, S.; Zeyer, D.; Van Dorsselaer, A.; Vivat Hannah, V.; Sanglier-Cianferani, S., Exploring key parameters to detect subtle ligand-induced protein conformational changes using traveling wave ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (11), 4703-10.
36. Eldrid, C.; Ujma, J.; Kalfas, S.; Tomczyk, N.; Giles, K.; Morris, M.; Thalassinou, K., Gas phase stability of protein ions in a cyclic ion mobility travelling wave device. *chemrxiv.org* **2018**.
37. Ali-Ahmad, A. Functional and structural insights into the periplasmic detection domain of GacS HK (GacSp) responsible for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and The study of a family 39 glycoside hydrolase member from *Bacteroides cellulosilyticus* wh2. 2017.
38. Bhate, M. P.; Molnar, K. S.; Goulian, M.; DeGrado, W. F., Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure* **2015**, *23* (6), 981-94.
39. Ali-Ahmad, A.; Fadel, F.; Sebban-Kreuzer, C.; Ba, M.; Pelissier, G. D.; Bornet, O.; Guerlesquin, F.; Bourne, Y.; Bordini, C.; Vincent, F., Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep-Uk* **2017**, *7*.
40. Goodman, A. L.; Merighi, M.; Hyodo, M.; Ventre, I.; Filloux, A.; Lory, S., Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Gene Dev* **2009**, *23* (2), 249-259.

41. Francis, V. I.; Waters, E. M.; Finton-James, S. E.; Gori, A.; Kadioglu, A.; Brown, A. R.; Porter, S. L., Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* **2018**, *9*.
42. Willett, J. W.; Crosson, S., Atypical modes of bacterial histidine kinase signaling. *Mol Microbiol* **2017**, *103* (2), 197-202.
43. Geoghegan, K. F.; Dixon, H. B. F.; Rosner, P. J.; Hoth, L. R.; Lanzetti, A. J.; Borzilleri, K. A.; Marr, E. S.; Pezzullo, L. H.; Martin, L. B.; LeMotte, P. K.; McColl, A. S.; Kamath, A. V.; Stroh, J. G., Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a "His tag" in *Escherichia coli*: The cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins. *Anal Biochem* **1999**, *267* (1), 169-184.
44. Van der Rest, G.; Halgand, F., Size Exclusion Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry Coupling: a Step Toward Structural Biology. *J Am Soc Mass Spectr* **2017**, *28* (11), 2519-2522.
45. Muneeruddin, K.; Thomas, J. J.; Salinas, P. A.; Kaltashov, I. A., Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (21), 10692-10699.
46. Busch, F. M.; Sahasrabudde, A.; vanAernum, Z.; Rivera, B.; Wysocki, V. H., Analysis of proteins and protein interactions by size exclusion chromatography - high resolution mass spectrometry. *Faseb J* **2017**, *31*.
47. Ehkirch, A.; Hernandez-Alba, O.; Colas, O.; Beck, A.; Guillaume, D.; Cianferani, S., Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2018**, *1086*, 176-183.
48. Botzanowski, T.; Erb, S.; Hernandez-Alba, O.; Ehkirch, A.; Colas, O.; Wagner-Rousset, E.; Rabuka, D.; Beck, A.; Drake, P. M.; Cianferani, S., Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *MAbs* **2017**, *9* (5), 801-811.
49. Habegger, M.; Leiss, M.; Heidenreich, A. K.; Pester, O.; Hafenmair, G.; Hook, M.; Bonnington, L.; Wegele, H.; Haindl, M.; Reusch, D.; Bulau, P., Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry. *MAbs* **2016**, *8* (2), 331-9.
50. Gabelica, V.; Marklund, E., Fundamentals of ion mobility spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2018**, *42*, 51-59.
51. Jarrold, M. F., Unfolding, Refolding, and Hydration of Proteins in the Gas Phase. *Accounts of Chemical Research* **1999**, *32* (4), 360-367.
52. Jurnecko, E.; Barran, P. E., How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? The relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase. *Analyst* **2011**, *136* (1), 20-28.
53. Devine, P. W. A.; Fisher, H. C.; Calabrese, A. N.; Whelan, F.; Higazi, D. R.; Potts, J. R.; Lowe, D. C.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E., Investigating the Structural Compaction of Biomolecules Upon Transition to the Gas-Phase Using ESI-TWIMS-MS. *J Am Soc Mass Spectr* **2017**, *28* (9), 1855-1862.
54. Marklund, E. G.; Degiacomi, M. T.; Robinson, C. V.; Baldwin, A. J.; Benesch, J. L. P., Collision Cross Sections for Structural Proteomics. *Structure* **2015**, *23* (4), 791-799.
55. Nguyen-Huynh, N. T.; Sharov, G.; Potel, C.; Fichter, P.; Trowitzsch, S.; Berger, I.; Lamour, V.; Schultz, P.; Potier, N.; Leize-Wagner, E., Chemical cross-linking and mass spectrometry to determine the subunit interaction network in a recombinant human SAGA HAT subcomplex. *Protein Sci* **2015**, *24* (8), 1232-46.
56. Sinz, A.; Arlt, C.; Chorev, D.; Sharon, M., Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology. *Protein Sci* **2015**, *24* (8), 1193-209.
57. Saliou, J. M.; Manival, X.; Tillault, A. S.; Atmanene, C.; Bobo, C.; Branlant, C.; Van Dorselaer, A.; Charpentier, B.; Cianferani, S., Combining native MS approaches to decipher archaeal box H/ACA ribonucleoprotein particle structure and activity. *Proteomics* **2015**, *15* (16), 2851-61.

## ***AUTRES TRAVAUX***

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier également un système protéine-ligand et un système peptide-ligand dont les travaux sont résumés sous la forme de publications présentées en Annexes.

**Annexe 1** : Étude d'un système protéine-ligand par MS native.

Ehrmann, F. R., J. Kalim, T. Pfaffeneder, B. Bernet, C. Hohn, E. Schafer, T. Botzanowski, S. Cianferani, A. Heine, K. Reuter, F. Diederich and G. Klebe (2018). "Swapping Interface Contacts in the Homodimeric tRNA-Guanine Transglycosylase: An Option for Functional Regulation." *Angew Chem Int Ed Engl* **57**(32): 10085-10090.

**Annexe 2** : Étude d'un système peptide-ligand par MS native.

Mori, M., L. Kovalenko, S. Malancona, F. Saladini, D. De Forni, M. Pires, N. Humbert, E. Real, T. Botzanowski, S. Cianferani, A. Giannini, M. C. Dasso Lang, G. Cugia, B. Poddesu, F. Lori, M. Zazzi, S. Harper, V. Summa, Y. Mely and M. Botta (2018). "Structure-Based Identification of HIV-1 Nucleocapsid Protein Inhibitors Active against Wild-Type and Drug-Resistant HIV-1 Strains." *ACS Chem Biol* **13**(1): 253-266.

## *CONCLUSION GÉNÉRALE*

## *CONCLUSION GÉNÉRALE*

Ces travaux de thèse se sont articulés autour de développements méthodologiques mettant principalement en œuvre la spectrométrie de masse native (MS native) et la mobilité ionique (IM-MS) pour la caractérisation structurale de protéines d'intérêt thérapeutique et de complexes multiprotéiques. Différents objectifs ont ainsi pu être atteints lors de ces quatre années :

- mettre en place un protocole expérimental permettant la caractérisation de protéines membranaires en milieu détergent par MS native au laboratoire et évaluer la possibilité de cribler des ligands covalents et non-covalents par cette approche,
- implanter la méthodologie *Collision Induced Unfolding* au laboratoire et évaluer ses bénéfices et ses limites pour la caractérisation conformationnelle d'anticorps monoclonaux et dérivés,
- développer des méthodes de MS native et IM-MS complémentaires aux autres techniques biophysiques pour la caractérisation de complexes multiprotéiques solubles.

Un premier projet a consisté à développer des méthodologies pour l'analyse de protéines membranaires, des optimisations nécessaires à la mise en place de protocoles expérimentaux à l'analyse par MS native pour la caractérisation de protéines membranaires (PMs) en milieu détergent à travers trois exemples complémentaires :

- La première étude s'est focalisée sur le criblage de ligands covalents sur une PM à un domaine transmembranaire : la protéine ABHD. L'importance de la préparation d'échantillon (détergent & force ionique) pour la caractérisation par MS native ainsi que les conditions analytiques propres aux PMs ont été détaillées. La qualité spectrale ainsi obtenue a permis le criblage de 6 ligands covalents.
- La seconde étude a consisté à évaluer le criblage de ligands non-covalents sur une PM à plusieurs domaines transmembranaires par MS native: le récepteur à l'adénosine AA2A. Cette étude a permis de mettre en lumière les difficultés liées à l'analyse par MS native des récepteurs couplés aux protéines G pour leur caractérisation par cette approche.
- La dernière étude réalisée en milieu détergent avait pour objectif de déterminer l'état d'oligomérisation du peptide A $\beta$ 42 en milieu détergent. Face à la présence de multiples oligomères observés en MS native, le couplage de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à l'IM-MS s'est avéré particulièrement intéressant pour décomplexifier les spectres de masse et déterminer les états oligomériques présents mais également proposer un mécanisme d'assemblage de ce peptide impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

De mon point de vue, les futurs développements de MS structurale pour l'analyse des PMs seront tournés vers la caractérisation de PMs solubilisées avec des systèmes sans détergent comme les nanodisques afin de mieux mimer l'effet de la membrane sur le repliement protéique. Aujourd'hui l'étude des RCPGs par MS est toujours peu référencée en comparaison avec les autres PMs (canaux ioniques, tonneaux beta, etc.) et pourrait être facilitée en développant de nouvelles stratégies de solubilisation avec des systèmes facilement dissociables au sein du spectromètre de masse ou en utilisant des dérivés d'anticorps pour stabiliser les conformations actives (« *nanobodies* »).

Un second projet a consisté en la mise en place et l'évaluation de l'approche CIU au laboratoire dans le cadre d'études portant sur la caractérisation conformationnelle de différents formats d'anticorps monoclonaux.

- La première étape de ce travail a consisté à mettre en place un protocole expérimental de l'acquisition des données à leur retraitement et d'évaluer l'influence de plusieurs paramètres sur les empreintes CIU ainsi générées. Les nombreuses expériences réalisées ont permis de montrer une haute répétabilité et reproductibilité de cette approche pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux.

- La seconde étape de ce travail a été d'évaluer ses apports et ses limites à travers différents formats d'anticorps monoclonaux. L'approche CIU a permis : 1°) de démontrer la plus grande stabilité conformationnelle en phase gazeuse d'un VHH liée à la présence d'un pont disulfure ; 2°) de démontrer une meilleure résistance au déploiement de la conformation d'un anticorps immunoconjugué en comparaison avec son anticorps monoclonal parent ; 3°) de démontrer sa capacité à distinguer les isotypes d'anticorps thérapeutiques notamment à l'échelle des fragments F(ab')<sub>2</sub> mais aussi sur un anticorps hybride.

Outre sa capacité à sonder des différences de stabilité conformationnelle et/ou de déploiement en phase gazeuse, la CIU a permis d'observer, de manière originale, des différences de conformation peu ou pas visualisables/atteignables par la mobilité ionique native possédant actuellement un pouvoir de résolution plus modeste. Plusieurs écueils de cette approche ont également pu être mis en lumière lors de ce travail : la nécessité de comparer des états de charges identiques pour réaliser une interprétation adéquate des données et une acquisition manuelle et relativement longue de l'ordre de l'heure pour une expérience entière contre quelques minutes pour une caractérisation par mobilité ionique classique. Son automatisation par exemple via un couplage SEC pourrait favoriser son implémentation dans les entreprises pharmaceutiques.

La dernière partie de mes travaux de thèse a été dédiée à l'application de méthodologies de MS native et IM-MS native pour la caractérisation de complexes multiprotéiques solubles de tailles et complexités variables afin de répondre à des questions de biologie structurale.

- Si l'état oligomérique de la protéine mNT et sa capacité à fixer un centre 2Fe-2S étaient connus, sa dépendance au pH restait inconnue. La méthode de MS native développée a permis de caractériser cette dépendance en étudiant l'évolution de ces deux paramètres (temps et pH) montrant ainsi la déstabilisation dynamique et progressive de cet édifice. De plus, le rôle stabilisateur de l'histidine 87 impliquée dans la coordination du centre Fe-S a été vérifié.
- La caractérisation du complexe (NIUAF)<sub>2</sub> a permis d'illustrer les difficultés actuelles concernant l'étude de complexes protéiques hautement hétérogènes par MS native liées à une résolution expérimentale actuelle encore trop faible sur les spectromètres de masse pour la détermination d'une stœchiométrie non ambiguë de tels édifices.
- Enfin, l'apport du couplage SEC-MS native a pu être illustré pour l'obtention de spectres de masse simplifiés et de résolution expérimentale accrue. Ce couplage a permis d'étudier la formation de l'hétérodimère GacS/RetS jusqu'alors hypothétique et d'évaluer la conformation de ce dernier. Ce résultat constitue le point de départ pour une étude plus large combinant les différentes techniques de MS structurale visant à caractériser précisément les zones d'interaction de ces deux protéines.

De nombreuses limitations instrumentales ont été surmontées ces dernières années avec l'essor de nouvelles techniques (TIMS, CIU), de nouveaux instruments (mobilité cyclique, Q-TOF pour très hautes masses) et de nouvelles possibilités de couplage (SEC, couplage bidimensionnelle) qui ont permis d'élargir la boîte à outils de la MS structurale. Pour favoriser l'intégration de ces nouvelles techniques/technologies dans les entreprises biopharmaceutiques et optimiser les protocoles, le développement de nouveaux logiciels facilitant la génération et l'interprétation des données doit être poursuivi. De plus, l'intégration des données de MS structurale pourrait être facilitée à l'aide de plateformes de partage des données suite au processus de publication par exemple. Cela permettrait de combiner les nouvelles données acquises lors d'une étude et de les comparer directement aux données déjà existantes. L'amélioration continue de l'instrumentation et des méthodes associées permet aujourd'hui de commencer à étudier les protéines dans un environnement plus natif comme par exemple dans leur milieu de culture, sur des coupes de tissus voire directement en milieu *in vivo*.

## ***PARTIE EXPÉRIMENTALE***

Cette partie résume les conditions de préparation utilisées pour l'analyse des différentes protéines caractérisées durant cette thèse, elles sont classées par partie pour une plus grande clarté.

### **Partie 2 : Caractérisation des protéines membranaires.**

Les protéines membranaires caractérisées en partie 2 ont été analysées sur le Synapt G2 HDMS (Waters). Les seules expériences réalisées sur le LCT (Waters) sont les expériences de MS native sur ABHD WT. L'Exactive EMR (Thermo) a été utilisé à deux reprises pour caractériser par MS native ABHD WT et le peptide A $\beta$ 42.

| Protéine<br>(Chapitre<br>associé)       | Masse moléculaire<br>théorique (Da) | Technique et<br>tampon d'échange   | Séquence en acides aminés  |
|---|-------------------------------------|--|--|
| ABHD<br>(chapitre 2)                    | 40715,1                             | 2 cycles de<br>dessalage sur<br>colonne de filtration<br>sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br>ou directement en<br>sortie de SEC.<br>AcONH <sub>4</sub> 300 mM<br>pH 7,4 0,02-0,1%<br>m/v DDM | confidentielle   |
| AA2A<br>(chapitre 3)                    | 48830,5                             | directement en<br>sortie de SEC.<br>AcONH <sub>4</sub> 300 mM<br>pH 7,4 0,02-0,1%<br>m/v DDM   | <p><b>MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDEGDFDVAVLPFSNSTNGLLFIN</b><br/> <b>TTIASIAAKEEGVSLEKRDYKDDDDKDHSHHHHHHHHGDRENLYFQGGSPIMGSSVYITVELAIAV</b><br/> LAILGNVLCWAVWLNLSNLQNVNTNYFVVSLLAAADIAVGVLAIPFAITISTGFCACHGCLFIACFVLVL<br/> TQSSIFSLAIAIDRYAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPKGKNHSQG<br/> CGEGQVACLFEDVVPNMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTL<br/> QKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWMLYLAIVLSHTNSVVPFIYAYRIREFR<br/> QTFRKIIRSHVLRQEQPFKAAGTSARVLAHAGSDGEQVSLRLNGHPPGVWANGSAPHERRPNGYALG<br/> LVSGGSAQESQGNTGLPDVELLSHELKGVCPPEPGLDDPLAQDGAGVSTSEFENLYFQGGQFGGGTGGGA<br/> PAPAAGGAGAGKAGEGEIPAPLAGTVSKILVKEGDTVKAGQTVLVLEAMKMETEINAPTDGKVEKVL<br/> VKERDAVQGGGLIKIG*</p> <p><b>Gras</b> : séquence signal, théoriquement clivée de manière endogène par la levure lors de la synthèse protéique.<br/> <b>Souligné</b> : site de coupure à la TEV protéase.</p> |
| Peptide<br>A $\beta$ 42<br>(chapitre 4) | 4514,1                              | 2 cycles de<br>dessalage sur<br>colonne de filtration<br>sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br>ou SEC MS native<br>ammonium<br>bicarbonate 300<br>mM pH 9,0 + 14,2<br>mM C8E5                  | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA   |

### Partie 3: Caractérisation de différents formats d'anticorps monoclonaux.

Les différents formats d'anticorps monoclonaux caractérisés en partie 3 ont tous été analysés par IM-MS native et CIU sur le Synapt G2 HDMS (Waters).

| Protéine<br>(Chapitre associé)                              | Masse<br>moléculaire<br>théorique (Da) | Technique et tampon<br>d'échange   | Séquence en acides aminés  |
|---|--|--|--|
| Trastuzumab déglycosylé<br>(chapitre 1)                     | Intact :145864.1                       | 6-8 cycles de<br>dessalage par<br>ultrafiltration<br>(Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9 | LC :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS<br>GVPSRFGSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFI<br>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL<br>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br>HC :EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTN<br>GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYW<br>GQGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS<br>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD<br>SGSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| VHH anti-HER2, synthèse<br>chimique<br>(chapitre 2)         | 14024,6                                | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 7,4    | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGWYRQSPGKQREMVASINSGGTT<br>NYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDNNYWGQ<br>TQVTVSSHHHHHHH   |
| VHH anti-HER2, <i>P.</i><br><i>pastoris</i><br>(chapitre 2) | 14168,7                                | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 7,4    | GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGWYRQSPGKQREMVASINSGG<br>TTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDNNYWG<br>QGTQVTVSSHHHHHHH  |
| VHH anti-HER2, <i>E. coli</i><br>(chapitre 2)               | 14155,8                                | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 7,4    | MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGITFMRYALGWYRQSPGKQREMVASINSGG<br>TTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARWVKPQFIDNNYWG<br>GTQVTVSSHHHHHHH  |
| DAR 4 ADC déglycosylé<br>(chapitre 3)                       | Intact: 152771.2                       | 6 cycles de dessalage<br>par ultrafiltration<br>(Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9      | LC :DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDE<br>VPSRFGSGSGADYSLTISLSEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI<br>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL<br>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br>HC :DVQLQESGSLVKPSQSLTCTVTGYSITDFAWNWRQFPGNKLEWVARIYPTN<br>GNTRYNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRFPYWGQGTLLTV<br>SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALCTPSRGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP<br>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP<br>QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF<br>FLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSLCTPSRGS |
| mAb parent déglycosylé<br>(chapitre 3)                      | Intact: 147899.9                       | 6 cycles de dessalage<br>par ultrafiltration   | LC :DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDE<br>VPSRFGSGSGADYSLTISLSEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI  |

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
|   |  | (Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9  | FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSL<br>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSVTKSFNRGEC<br><b>HC</b> :DVQLQESGSPSLVKPSQSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYS<br>GNTRYNPSLKSRLSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVTV<br>SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALCTPSRGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSCDKTHTCPPCP<br>APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP<br>QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSLCTPSRGS   |
| Eculizumab déglycosylé<br>(chapitre 4)    | Intact : 145678<br>(Fab') <sub>2</sub> : 97476<br>Fc : 48238 | 6-8 cycles de<br>dessalage par<br>ultrafiltration<br>(Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9 | <b>LC</b> :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCGASENIYGALNWIYQKPKGKAPKLLIYGATNLA<br>DGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQNVLNTPITFGGQTKVEIKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTY<br>SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSVTKSFNRGEC<br><b>HC</b> :VQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGGLEWMGELPGS<br>GSTEYTENFKDRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDAVYYCARYFFGSSPNWYFDVW<br>GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFBSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG<br>SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG         |
| Natalizumab déglycosylé<br>(chapitre 4)   | Intact : 146619<br>(Fab') <sub>2</sub> : 98412<br>Fc : 48238 | 6-8 cycles de<br>dessalage par<br>ultrafiltration<br>(Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9 | <b>LC</b> :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCTKTSQDINKYMAWYQTPGKAPRLLIHYTSALQP<br>GIPSRFGSGSGRDYFTFTISSLQPEDIATYYCLQYDNLWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIF<br>PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSS<br>TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br><b>HC</b> :VQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQRLEWMGRIDPAN<br>GYTKYDPKFQGRVTITADTASTAYMELSSLRSEDAVYYCAREGYFGNYGVYAMDY<br>WGQGLTVTVSSAKTTPGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP<br>SCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFJSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR<br>REPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD<br>GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG |
| Panitumumab déglycosylé<br>(chapitre 4)   | Intact : 144733<br>(Fab') <sub>2</sub> : 96494<br>Fc : 48275 | 6-8 cycles de<br>dessalage par<br>ultrafiltration<br>(Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9 | <b>LC</b> :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWIYQKPKGKAPKLLIYDASNLET<br>GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDIATYFCQHFHDLPLAFGGGKVEIKRTVAAPSVFI<br>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSL<br>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br><b>HC</b> :VQLQESGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYIYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYS<br>GNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSVTAADTAIYCVDRDRVTGAFDIWQGTMTV<br>TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA<br>VLQSSGLYSLSSVTVPPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQFJSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLTP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG           |
| Adalimumab<br>déglycosylé<br>(chapitre 4) | Intact : 145890<br>(Fab') <sub>2</sub> : 97223<br>Fc : 48210 | 6-8 cycles de<br>dessalage par<br>ultrafiltration<br>(Vivaspin, MWCO :<br>10 kDa)<br>AcONH <sub>4</sub> 150 mM<br>pH 6,9 | <b>LC</b> :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQKPKGKAPKLLIYAASLTQS<br>GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPHYTFGGQTKVEIKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTY<br>SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br><b>HC</b> :EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSAITW<br>NSGHIDYADVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDY<br>WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSCDKT<br>HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  |

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
|  |  |  | KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV<br>LDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
|--|--|--|---|

## Partie 4: Caractérisation de complexes multiprotéiques solubles.

Les protéines caractérisées en partie 4 ont été analysées sur le Synapt G2 HDMS (Waters) sauf l'étude de stabilité du centre Fe-S de mNT WT qui a été réalisée sur le LCT (Waters) afin de favoriser le maintien du dimère en phase gazeuse.

| Protéine<br>(Chapitre associé) | Masse moléculaire<br>théorique (Da)   | Technique et tampon<br>d'échange  | Séquence en acides aminés  |
|--------------------------------|---|---|--|
| mNT WT<br>(chapitre 1)         | 8577,8  | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br><br>AcONH <sub>4</sub> 50 mM pH<br>variable         | MINLHIQKDNPKIVHAFDMEDLGDKAVYRCWRSKKFPFCDAHTKHNEETGDN<br>VGPLIIKKKETLEHHHHHH  |
| mNT H87C<br>(chapitre 1)       | 8543,8  | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br><br>AcONH <sub>4</sub> 50 mM pH<br>5,8              | MINLHIQKDNPKIVHAFDMEDLGDKAVYRCWRSKKFPFCDACTKHNEETGDN<br>VGPLIIKKKETLEHHHHHH  |
| Complexe ISCU<br>(chapitre 2)  | <b>NFS1</b> : 44646,1<br><b>ISD11</b> : 10723,4<br><b>ISCU</b> : 14617,8<br><b>ACP</b> : 8508,3<br><b>FXN</b> : 14410,9 | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br><br>AcONH <sub>4</sub> 10 mM pH<br>8,0              | <b>NFS1</b> : GSRPLYMDVQATPLDPRVLDAMLPYLNVNYGNPHSRTHAYGWESEAAM<br>ERARQQVASLIGADPREIIFTSGATESNNAIAIKGVARFYRSRKKHLVTTQTEHKCVL<br>DSCRSLEAEGFRVITYLPVQKSGIIDLKELEAAIQPDTSLVSVMTVNNEIGVKQPIAEI<br>GQICSSRVYFHTDAAQAVGKIPLDVNDMKIDLMSISGHKLYGPKGVGAIYIRRRP<br>RVRVEALQSGGGQERGMRSQVPTPLVVGLGAACELAQEMEYDHKRISKLAERL<br>VQNIMKNLPDVMNGDPKQHYPGCINLSFAVVEGESLLMALKDVALLSSGSACTSA<br>SLEPSYVLAIGTDEDLAHSIRFGIGRFTTEEEVDYTAEKCIHHVKRLREMSPLWE<br>MVQDGDILKSIKWTQH<br><b>ISD11</b> : AASSRAQVLDLYRAMMRESKHFSAYNYRMYAVRRIRDAFRENKNVKDPV<br>EIQALVNKAKRDLIIRRVHIGQLYSTDKLIENQEKPRT<br><b>ISCU</b> : GSYHKKVVDHYENPRNVGSLDKTSKNVGTGLVGAPACGDVMKLIQVDE<br>KGIKIVDARFKTFGCGSAIASSSLATEWVKGKTVEEALTIKNTDIKELCLPPVKLHC<br>SMLAEDAIAALADYKQKQESKKEPEKQ<br><b>ACP</b> : STIEERVKKIIGELGVKQEEVTNNASFVEDLGADSLDTVELVMALEEEFDTE<br>IPDEEAKEITTVQAAIDYINGHQ<br><b>FXN</b> : GSGTLDNPSSLDEYERLAETLDSLAEFFEDLADKPYTLEDYDVSFGDGV<br>LTIKLGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNVWVYSHDGVSLHELL<br>ARELTKALNTKLDLSSLAYSGKGT |
| GacSH-H1<br>(chapitre 3)       | 32456,6   | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br><br>Ou SEC-MS (500 mM<br>AcONH <sub>4</sub> pH 7,0) | SMGSNELDELASGINRMAETLQSAQEEMQHNIDQATEDVRQNLETIEIQNIELDLAR<br>KEALEASRIKSEFLANMSHEIRTPNLGILGFTNLLQKSELSPRQDYLTTIQKSAESL<br>LGIINEILDFSKIEAGKLVLENLFPNLRDLIQDALTMLAPAAHEKQLELVSLVYRDTP<br>IQLQGDPRQLKQILTNLVGNAIKFTQGGTVAVRAMLEDESDDRAQLRISVQDTGIG<br>LSEEDQQALFKAFSQADNSLSRQAGGTGLGLVISKRLIEQMGGEIGVDSTPGEGAEF<br>WISLSLPKS   |
| GacSCytoFL<br>(chapitre 3)     | 79912,2   | SEC-MS (500 mM<br>AcONH <sub>4</sub> pH 7,0)  | GHHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMGSNELDELASGINRMAETLQSAQEEMQHNIDQ<br>ATEDVRQNLETIEIQNIELDLARKEALEASRIKSEFLANMSHEIRTPNLGILGFTNLLQ<br>KSELSPRQDYLTTIQKSAESLGIINEILDFSKIEAGKLVLENLFPNLRDLIQDALTM  |

|                             |         |   |   |
|-----------------------------|---------|---|---|
|                             |         |   | LAPAAHEKQLELVSLVYRDTPIQLQGDQPRLKQILTNLVGNAIKFTQGGTVAVRAM<br>LEDESDDRAQLRISVQDTGIGLSEEDQQALFKAFSQADNSLSRQAGGTGLGLVISKR<br>LIEQMGGEGVDSTPGEGAEFWISLSLPKSRDDNEEPGASWAAGQRVALLEPQELT<br>RRSLHHQLTDFGLEVSEFADLDSLQESLRNPPPGQLPISLAVLGVSAAIHPPEELSQS<br>FWEFERLGCKTLVLCPTTEQAQYHATLPDEQVEAKPACTRKLQRKLQELLQVRPT<br>RSDKPHAMVSGRPPRLCVDNPNANLLVQTLSDLGAQVTAVDSGYAALEVQ<br>RERFDLVFMDVQMPGMDGRQATEAIRRWEAEREVSPVPVIALTAHALSNEKRALL<br>QAGMDDYLT KPIDEQQLAQVVLKWTGSLGQSLASMSRAPQLGQLSVLDPEEGLR<br>LAAGKADLAADMLAMLLASLAADRQAIRQARDNDRRTALLERVHRLHGATRYC<br>GVPQLRAACQTSETLLKQNDPAAAAALDELDKAIEALADTASATTHLSSTSLSDSSE<br>L  |
| GacS252-925<br>(chapitre 3) | 76313,4 | SEC-MS (500 mM<br>AcONH <sub>4</sub> pH 7,0)  | HHHHHHSSGVLDGTENLYFQSMATEDVQRNLETIEIQNIELDLARKEALEASRIKSE<br>FLANMSHEIRTPNLGILGFTNLLQKSELSPRQDYLTTIQKSAESLLGIINEILDFSKIE<br>AGKLVLENLPFNLRDLIQDALTMLAPAAHEKQLELVSLVYRDTPIQLQGDQPRLKQ<br>ILTNLVGNAIKFTQGGTVAVRAMLEDESDDRAQLRISVQDTGIGLSEEDQQALFKA<br>FSQADNSLSRQAGGTGLGLVISKRLIEQMGGEGVDSTPGEGAEFWISLSLPKSRDD<br>NEEPGASWAAGQRVALLEPQELTRRSLHHQLTDFGLEVSEFADLDSLQESLRNPP<br>GQLPISLAVLGVSAAIHPPEELSQSFWEFERLGCKTLVLCPTTEQAQYHATLPDEQV<br>EAKPACTRKLQRKLQELLQVRPTRSDKPHAMVSGRPPRLCVDNPNANLLVQTL<br>LSDLGAQVTAVDSGYAALEVQVRERFDLVFMDVQMPGMDGRQATEAIRRWEAE<br>REVSPVPVIALTAHALSNEKRALLQAGMDDYLT KPIDEQQLAQVVLKWTGSLGQ<br>SLASMSRAPQLGQLSVLDPEEGLRLAAGKADLAADMLAMLLASLAADRQAIRQA<br>RDNDRRTALLERVHRLHGATRYCGVPQLRAACQTSETLLKQNDPAAAAALDEL<br>KAIEALADTASATTHLSSTSLSDSSEL |
| RetSH1 (chapitre 3)         | 27515,3 | 2 cycles de dessalage<br>sur colonne de<br>filtration sur gel<br>(Zeba 0,5 mL)<br>Ou SEC-MS (500 mM<br>AcONH <sub>4</sub> pH 7,0) | GHHHHHHSSGVLDGTENLYFQSMTKAEFLAKISHEIRTPMNGVLGMESELLGTPLS<br>AKQRDYVQTIHSAGNELLTLINEILDISKLESQIELDEVQFDNLALIEDCLDIFRVK<br>AEQQRIELISFTQPQVPRVIGGDPTRLRQVVLSDLNFAFKQTEEGEILLVVALDDQG<br>ETPRLRIAVQDSGHPFDKEREALLTAELHSGDFLSASKLGLIARQLVRLMG<br>GEFGIQSGSSQGTTLSTLPLD  |

Suite à l'échange de tampon, la concentration de chaque protéine a été déterminée, en utilisant la loi de Beer-Lambert rappelée ci-dessous.

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) * l * c$$

$A(\lambda)$  représente l'absorbance de la solution à la longueur d'onde considérée

$\varepsilon(\lambda)$  représente le coefficient d'extinction molaire de la protéine à cette longueur d'onde

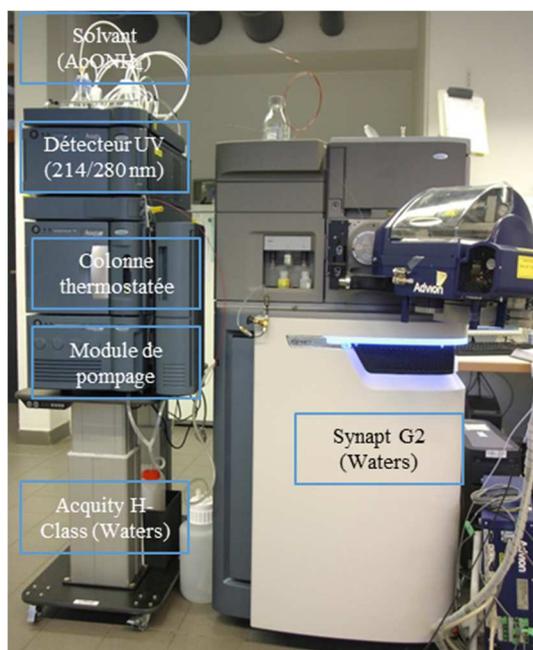
$l$  représente la longueur de la cellule (longueur du trajet parcouru)

$c$  représente la concentration de la protéine.

Durant cette thèse, la mesure de l'absorbance a été réalisée en triplicata à 280 nm en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) suite à la réalisation préalable d'un « blanc » avec le tampon d'échange. Le coefficient d'extinction molaire de chaque système  $\varepsilon_{280}$  a été calculé à partir de sa séquence théorique en acides aminés en utilisant l'outil ProtParam (disponible à l'adresse <https://web.expasy.org/protparam/> le 12/04/19).

### Précisions sur le couplage SEC utilisé.

Le développement du couplage SEC-MS native a été réalisé par Anthony Ehkirch durant son stage de Master 2 et durant sa thèse. Ce couplage est constitué d'un système chromatographique UPLC® (Waters), une colonne de chromatographie à exclusion stérique UPLC BEH SEC® (200 Å, 1,7 µm ; 4,6 x 150 mm, Waters) et du spectromètre de masse de Q-TOF Synapt G2® (Waters). Le système est entièrement piloté par le logiciel MassLynx v.4.1. Lorsque les protéines sont éluées, le débit est ralenti de 0,25 mL/min à 0,10 mL/min pour la détection MS. Deux phases mobiles ont été utilisées durant cette thèse : AcONH<sub>4</sub> 500 mM pH 7.0 (caractérisation de GacS/RetS) et NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 200 mM pH 8,0 + 14,2 mM C8E5 (caractérisation du peptide Aβ42).

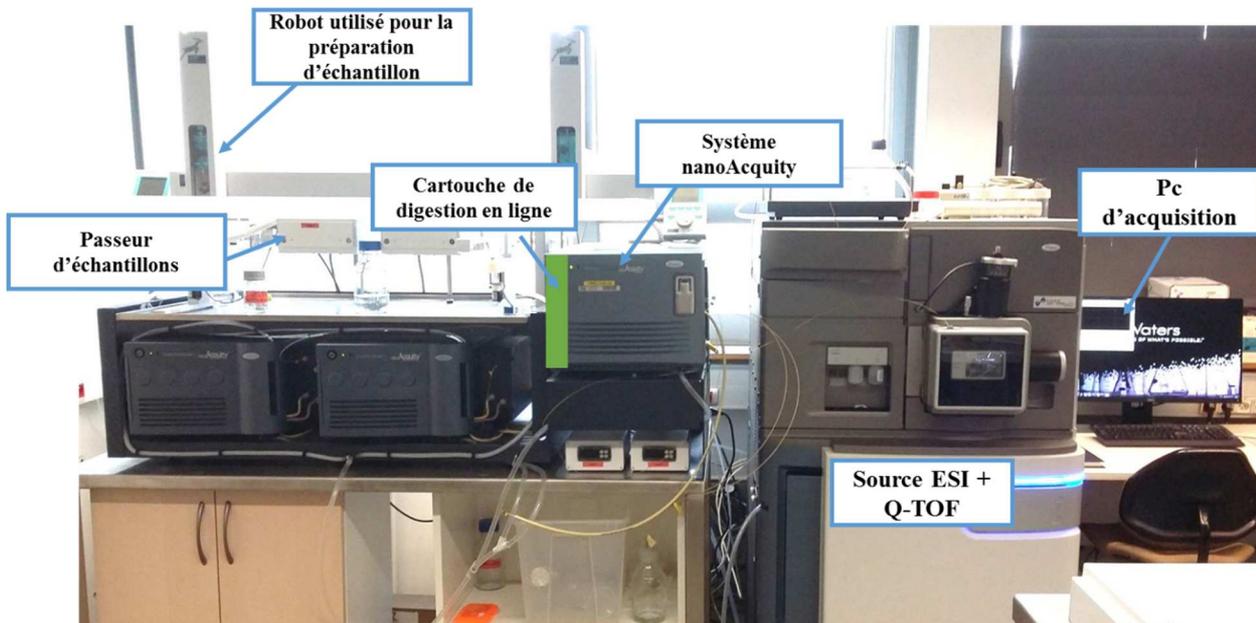


Photographie du système SEC-MS native utilisé pendant la thèse.

### Précisions sur le système HDX utilisé.

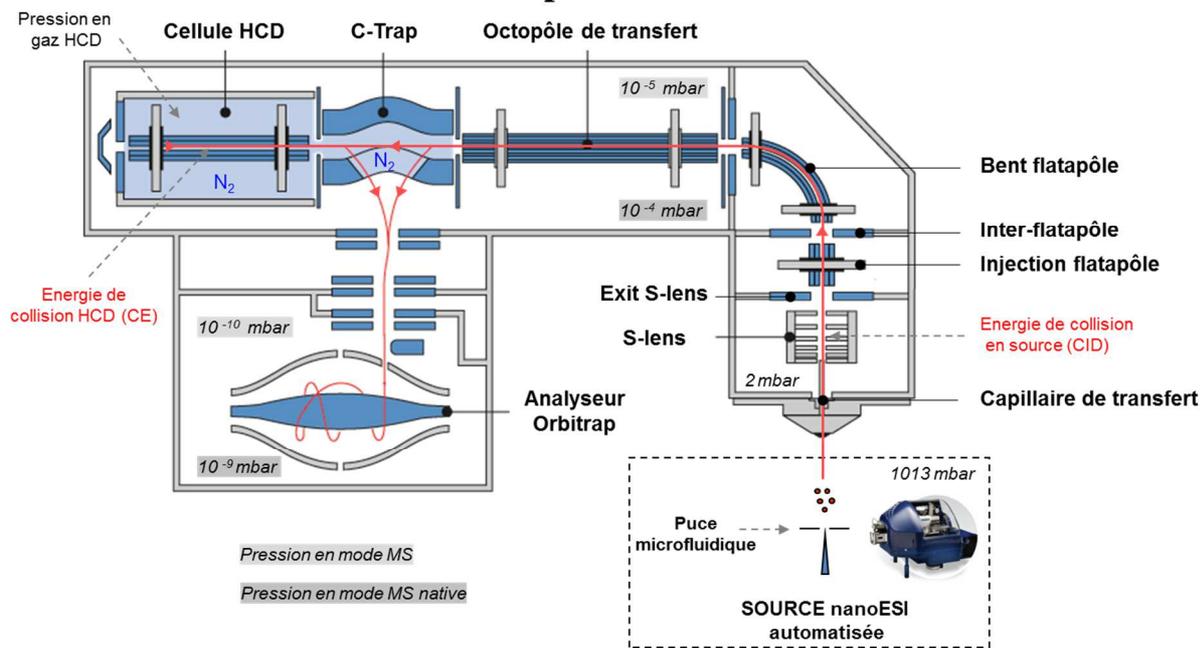
Le système HDX-MS utilisé durant ce travail de thèse est composé d'un passeur d'échantillons robotisé (Leap Technologies), d'un système chromatographique (Nanoacquity HDX technology, Waters) et du Synapt G2Si (Waters). Après incubation de la protéine dans un tampon deutéré, la protéine est dénaturée par dilution dans le tampon de quench et est infusée sur un système de digestion en ligne. Ce système est composé d'une cartouche de digestion Porozyme® (2,1 x 30 mm, Applied Biosystems) avec une enzyme immobilisée (pepsine, népenthésine 2 ou rhizopuspepsine). Les peptides sont ensuite piégés sur une précolonne de phase inverse C18 (Acquity UPLC® BEH C18, 2,5 x 5 mm, 1,7 µm, Waters) pour être concentrés avant la séparation chromatographique. La séparation est réalisée sur une colonne de phase inverse C18 (Acquity UPLC® BEH C18, 1,0 x 10 mm, 1,7 µm, Waters) à

l'aide d'un gradient de 2 à 40 % en ACN pendant 7 minutes puis le pourcentage d'ACN augmente jusqu'à 85 % en 30 secondes et ce pourcentage est maintenu pendant 5 minutes afin d'éluer les peptides hydrophobes. La totalité du module est maintenu à 0°C afin de limiter le phénomène d'échange inverse. L'ajout de masse correspondant à l'incorporation en deutérium est ensuite par spectrométrie de masse sans fragmentation CID afin d'éviter le phénomène de *scrambling*. L'établissement de la carte peptidique est préalablement réalisé (sans deutération) cette fois-ci avec des expériences MS/MS afin de séquencer les peptides en utilisant le mode MS<sup>E</sup>. Ce mode d'acquisition *Data Independent Acquisition* est basé sur une alternance des scans basse énergie (MS) et haute énergie (MS/MS) et l'utilisation de l'algorithme PLGS<sup>TM</sup> permet d'attribuer les ions fils aux ions parents.



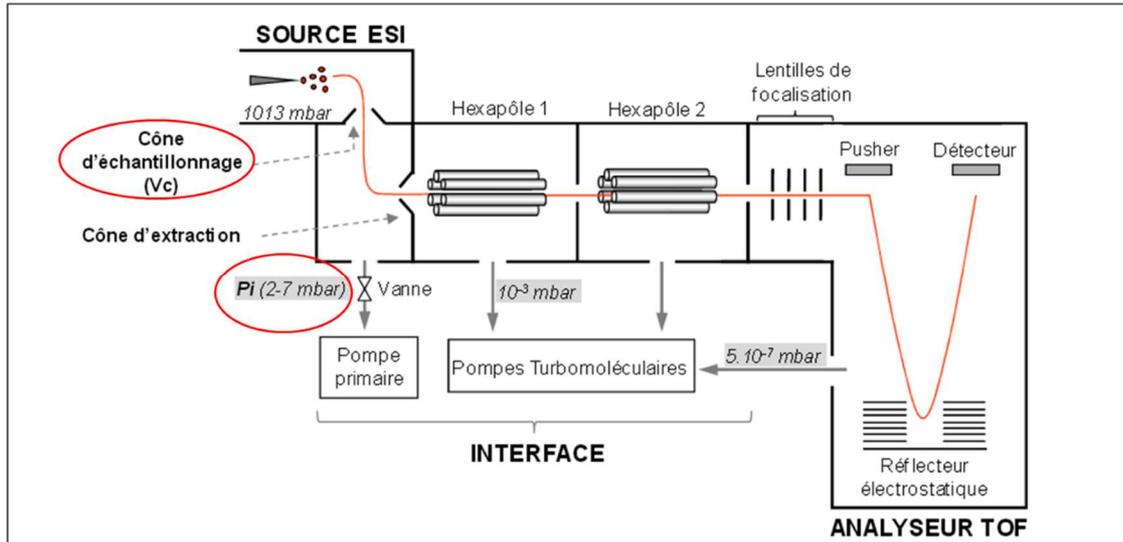
Photographie du système HDX-MS utilisé pendant la thèse.

## Schéma de l'Exactive EMR Orbitrap.



Représentation schématique de l'Exactive EMR Orbitrap (Thermo) utilisé pendant la thèse. Les tensions optimisées (CID et CE) pour la dissociation du complexe DDM/ABHD sont notées en rouge sur le schéma.

## Schéma du LCT (TOF)



Représentation schématique du LCT (TOF, Waters) utilisé pendant la thèse. Les principaux paramètres optimisés (Vc et Pi) pour le maintien ou la dissociation d'un complexe non-covalent sont entourés en rouge. Les échantillons sont infusés à l'aide d'une source nanoESI automatisée à pression atmosphérique.

## ***ANNEXES***

**ANNEXE 1** : CARACTÉRISATION D'UN SYSTÈME PROTÉINE-LIGAND PAR MS NATIVE.

**ANNEXE 2** : CARACTÉRISATION D'UN SYSTÈME PEPTIDE-LIGAND PAR MS NATIVE.

**ANNEXE 3** : LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.

***ANNEXE 1 : CARACTÉRISATION D'UN SYSTÈME  
PROTÉINE-LIGAND PAR MS NATIVE.***

**Swapping Interface Contacts in the Homodimeric tRNA-Guanine Transglycosylase: An Option  
for Functional Regulation.**

Ehrmann, F. R., J. Kalim, T. Pfaffeneder, B. Bernet, C. Hohn, E. Schafer, T. Botzanowski, S. Cianferani, A. Heine, K. Reuter, F. Diederich and G. Klebe.

*Angew Chem Int Ed Engl* ,2018, 57(32): 10085-10090.

# Swapping Interface Contacts in the Homodimeric tRNA-Guanine Transglycosylase: An Option for Functional Regulation

Frederik Rainer Ehrmann, Jorna Kalim, Toni Pfaffeneder, Bruno Bernet, Christoph Hohn, Elisabeth Schäfer, Thomas Botzanowski, Sarah Cianférani, Andreas Heine, Klaus Reuter, François Diederich,\* and Gerhard Klebe\*

**Abstract:** The enzyme tRNA-guanine transglycosylase, a target to fight Shigellosis, recognizes tRNA only as a homodimer and performs full nucleobase exchange at the wobble position. Active-site inhibitors block the enzyme function by competitively replacing tRNA. In solution, the wild-type homodimer dissociates only marginally, whereas mutated variants show substantial monomerization in solution. Surprisingly, one inhibitor transforms the protein into a twisted state, whereby one monomer unit rotates by approximately 130°. In this altered geometry, the enzyme is no longer capable of binding and processing tRNA. Three sugar-type inhibitors have been designed and synthesized, which bind to the protein in either the functionally competent or twisted inactive state. They crystallize with the enzyme side-by-side under identical conditions from the same crystallization well. Possibly, the twisted inactive form corresponds to a resting state of the enzyme, important for its functional regulation.

The large body of structurally characterized biomolecules shows that a large portion of proteins is present in oligomeric form. This observation immediately raises the question whether such oligomerization presents any biological advantage.<sup>[1,2]</sup> Undoubtedly, oligomerization provides multiple options to regulate protein function in the course of conformational and/or configurational transformations. These features can be realized without increasing genome size, simultaneously enhancing metabolic stability by reducing the total accessible surface area of the protein. The

classical textbook example hemoglobin undergoes large conformational and domain-wide rearrangements involving allosteric cooperativity during the regulation of oxygen transportation. In this contribution, we describe an example of intriguing structural adaptations performed by a homodimeric enzyme that swaps ligand-induced the packing of its monomer units. As a result, the homodimer interface is rearranged and the enzyme transforms from a functionally active into a twisted functionally inactive state.

We recently reported on the prokaryotic tRNA-modifying enzyme TGT (tRNA-guanine transglycosylase) that is only functional as a homodimer.<sup>[3–5]</sup> Only in this state, it can recognize a tRNA molecule, establishing a 2:1 complex, which is subsequently modified via a complete nucleobase-exchange reaction in the wobble position.<sup>[6]</sup> Even though both monomeric subunits of the homodimer are catalytically competent, only the intact dimer can bind tRNA and perform catalysis using one of its active sites for the enzyme reaction. The second subunit assists substrate recognition and orients the tRNA appropriately in space by means of polar interactions established by its  $\beta E\beta F$  loop with the phosphate backbone (see the Supporting Information (SI), Figure S1).

The base-exchange reaction occurs in the deeply buried ribose-34 pocket. Many of our potent *lin*-benzoguanine inhibitors, developed in the past, are accommodated by this pocket, which, as a matter of fact, is placed in the proximity of the dimer contact interface.<sup>[7]</sup> Surprisingly, the hydrophobic residues Val282, Leu68, and Val45 flanking the lower end of this ribose-34 pocket are highly sensitive toward interactions with functional groups attached to our ligands, which are placed upon protein binding next to these residues.<sup>[8]</sup> As a consequence, these inhibitors can induce remarkable structural perturbations in this region and provoke conformational rearrangements of a loop–helix motif (Thr47–Ala61). This amino acid stretch prevents water access to a crucial hydrophobic cluster of four aromatic amino acids (Trp326, Tyr330, His333, and Phe92'), which are imbedded in the center of a typical O-ring motif.<sup>[9]</sup> The integrity of the spatial arrangement of the latter four aromatic amino acids could be shown to be essential for the stability of the homodimer interface.<sup>[8,9]</sup> We used non-denaturing nano-ESI mass spectrometry to analyze the monomer-to-dimer ratio in solution, particularly by expanding the study to variants of the protein modified at single residue sites. The monomer–dimer equilibrium is increasingly shifted toward the monomeric state through destabilization of the loop–helix motif and the cluster of four aromatic residues (see SI, Figures S2 and S3). Consistent with this finding is the fact that an increase of

[\*] Dr. F. R. Ehrmann, Prof. Dr. A. Heine, Prof. Dr. K. Reuter, Prof. Dr. G. Klebe

Institut für Pharmazeutische Chemie  
Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Germany)  
E-mail: klebe@mail.uni-marburg.de

J. Kalim, Dr. T. Pfaffeneder, Dr. B. Bernet, Dr. C. Hohn, Dr. E. Schäfer, Prof. Dr. F. Diederich  
Laboratorium für Organische Chemie  
ETH Zürich

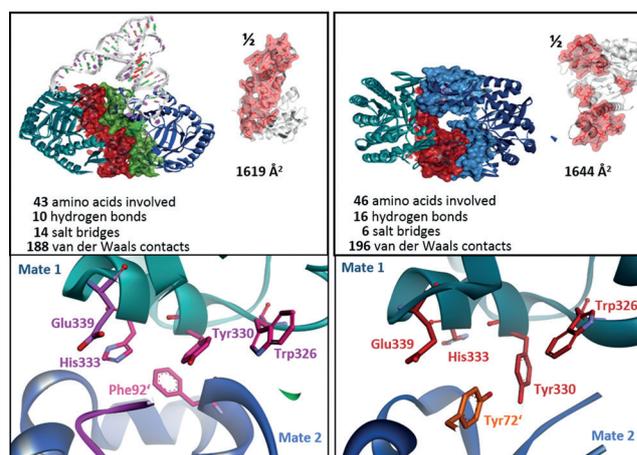
Vladimir-Prelog-Weg 3, HCI, 8093 Zürich (Switzerland)  
E-mail: diederich@org.chem.ethz.ch

Dr. T. Botzanowski, Dr. S. Cianférani  
Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique  
Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178  
67000 Strasbourg (France)

Supporting information (including the biophysical characterization and crystallographic analysis of the complexes and the synthesis and characterization of the ligands) and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under: <https://doi.org/10.1002/anie.201804627>.

protein concentration shifts the equilibrium back toward more dimer. As a consequence, in the dense crystal packing the enzyme was exclusively found with  $C_2$  symmetry as a homodimer.

To our surprise, with one bound ligand (**1**, Table 1) we succeeded in perturbing or stabilizing the interface in such a way that a completely novel dimer interface with twisted arrangement of the monomer subunits was established (see SI, Figure S1). The new interaction geometry could be analyzed by co-crystallizing the twisted complex.<sup>[10]</sup> The novel interface spans over nearly the same surface area as that present in the former  $C_2$ -symmetrical packing (Figure 1). It shows a buried contact area with a comparable interaction inventory. Facing both packings, the twisted arrangement formally results from an approximately  $130^\circ$  rotation of one dimer mate against the other. The newly shared common surface does not span contiguously as in the functional dimer across the interface, but splits into four patches. Still, the twisted interface shows a cluster of aromatic residues. Whereas Trp326, Tyr330, and His333, residing on helix  $\alpha_E$ , are complemented by Phe92' from the packing mate in the  $C_2$ -symmetrical functional dimer (Figure 1, left), in the twisted arrangement, Tyr72' replaces Phe92' (Figure 1, right). The crucial residue Glu339', which forms a salt bridge to Lys52 across the interface in the functional dimer, comes close to the ligand's side chain attached to C(4) of the parent *lin*-benzoguanine scaffold (Figures 2e and 3c; for positional labeling, see Table 1). Most importantly, from a functional point of view, the novel twisted homodimer adopts a geometry, which for steric reasons is no longer competent to recognize the tRNA and thus, does not catalyze the base-exchange reaction (see SI, Figure S4).



**Figure 1.** Comparison of the arrangement in the functional (left, space group  $C_2$ ) and twisted (right, space group  $P_2_1$ ) homodimer of TGT. The latter dimer is no longer capable of recognizing the tRNA for steric reasons (SI, Figure S4). The two dimers differ by a formal  $130^\circ$  rotation of the two monomeric subunits against each other. The produced packing interfaces hardly differ in the size of the commonly shared interface surface; however, the functional dimer forms a contiguously connected interface whereas the twisted one is assembled by four individual patches. The inventory of contributing amino acids and established contacts is also comparable for both forms. Crucial for the interface formed by the functional dimer is a cluster of the aromatic amino acids Trp326, Tyr330, His333 complemented by Phe92' from the dimer mate. In the twisted dimer, the named residues find with Tyr72' another residue from the dimer mate to form an alternative aromatic cluster.

Supposedly, the perturbances of the loop–helix motif are a kind of regulatory handle to modulate interface stability and

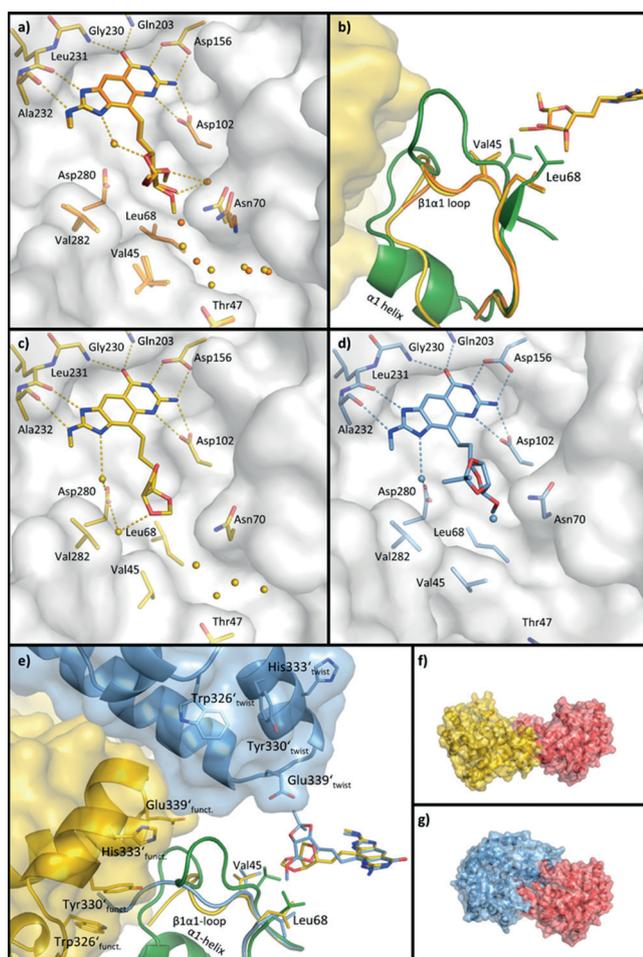
adjust the concentration of the available functional dimer. We speculate that the bound ligand induces, stabilizes, or even triggers this transformation and drives the functional homodimer into a kind of resting state where the enzyme is no longer capable of fulfilling its catalytic function. Since such behavior most likely relates to an important functional option, which, admittedly, is at present unknown to us, we searched for novel ligands that might stabilize both the catalytically competent and the twisted resting homodimer state.

We previously showed that ligands exposing a sugar moiety next to the above-mentioned hydrophobic residues flanking the lower end of the ribose 34 pocket are able to influence the structural properties of the regulating

**Table 1:** Studied inhibitors of TGT, crystal structures, and affinity data.

| X | R | Co-crystallized structures |                        |                | PDB code | $K_i^{[b]}$ [nM] | Monomer <sup>[c]</sup> [%] |
|---|---|----------------------------|------------------------|----------------|----------|------------------|----------------------------|
|   |   | X                          | Complex <sup>[a]</sup> | Resolution [Å] |          |                  |                            |
| 1 |   | H                          | TGT-1 <sup>P21</sup>   | 1.89           | 5I07     | 1000 ± 300       | 12.6 ± 2.8                 |
| 2 |   | MeNH                       | TGT-2 <sup>C2</sup>    | 1.41           | 4LEQ     | 217 ± 81         | 5.3 ± 1.1                  |
| 3 |   | MeNH                       | TGT-3 <sup>C2</sup>    | 1.32           | 4KWO     | 353 ± 106        | 9.6 ± 1.1                  |
| 4 |   | MeNH                       | TGT-4 <sup>C2</sup>    | 1.42           | 5LPO     | 243 ± 14         | 12.3 ± 1.1                 |
| 5 |   |                            | TGT-5 <sup>C2</sup>    | 1.99           | 5LPP     | 544 ± 174        | 6.0 ± 0.8                  |
|   |   | MeNH                       | TGT-5 <sup>P21</sup>   | 2.52           | 5LPQ     |                  |                            |
| 6 |   |                            | TGT-6 <sup>C2</sup>    | 1.27           | 5LPS     | 237 ± 41         | 10.3 ± 0.7                 |
|   |   | MeNH                       | TGT-6 <sup>P21</sup>   | 2.36           | 5LPT     |                  |                            |

[a] Superscript  $C_2$  or  $P_2_1$  indicates the crystal form in space group  $C_2$  or  $P_2_1$ . [b] Determined by a functional assay recording the incorporation of radioactively labeled guanine into tRNA. [c] Referring to the amount of monomer as determined by nano-ESI MS



**Figure 2.** a) Superimposition of the crystal structures of TGT-3<sup>C2</sup> (orange, PDB code: 3KWO) and TGT-4<sup>C2</sup> (yellow, PDB code: 5LPO). The binding modes of the two ligands resemble each other very closely, the additional 2'-OMe group in **4** replaces one water molecule in comparison to the complex with **3**. b) A comparison of TGT-3<sup>C2</sup> and TGT-4<sup>C2</sup> is shown with the structure of the apo-enzyme (green). The  $\beta 1\alpha 1$  loop adopts a different orientation in the ligand complexes compared to the uncomplexed protein. c, d) Binding mode of **5** in the functional dimer (left, yellow, space group C2, PDB code: 5LPP) and in the twisted dimer (right, blue, space group P2<sub>1</sub>, PDB code: 5LPQ). e) Superimposition of the two crystal structures (yellow, blue) showing the reshuffled interface contact and the differences in the C(4) furanosylethyl side-chain orientation. The modulated packing of the functional (f) and twisted (g) dimer with **5** is shown on the right.

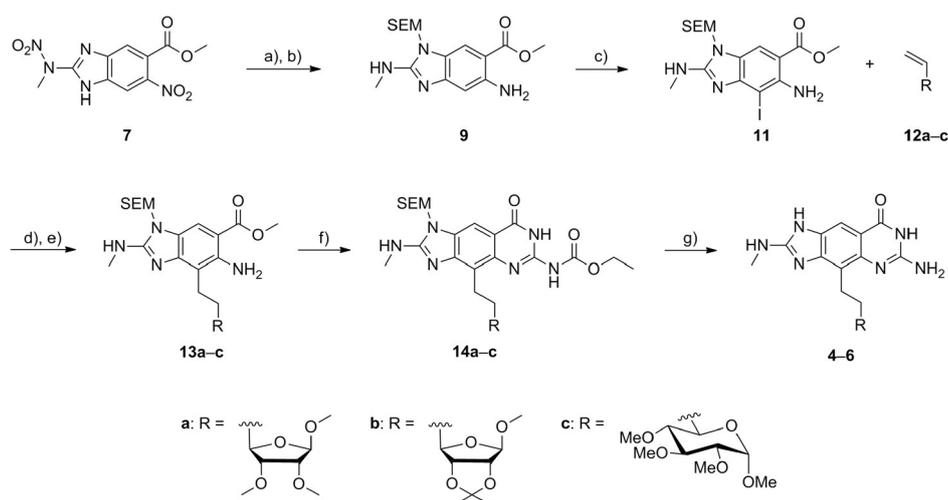
loop–helix motif with minor modifications of their substitution pattern.<sup>[10]</sup> The mere addition of a further methyl group provided us with **3** and **4**, which either leave the loop–helix motif unperturbed or induce major rearrangements of the motif. Possibly, this high sensitivity relates to the fact that this pocket hosts in the natural substrate a ribofuranose moiety. We therefore tested additional *lin*-benzoguanine derivatives with further modified furanose or pyranose sugar-type moieties in this region.

Substituted *lin*-benzoguanines **1–3** were prepared according to a procedure previously published by us.<sup>[11,12]</sup> The synthesis of **4–6** is presented in Scheme 1. The 2-(nitro)amino-6-nitrobenzimidazole **7** was obtained by nitration of 2-amino-

benzimidazole **8** (see Section S6.4 in the SI for details). The SEM protecting group was introduced using SEM chloride, affording an inseparable mixture of *N*-protected regioisomers.<sup>[13]</sup> Selective reduction of the nitro groups was achieved by using zinc in aq. acetic acid, to give amine **9** as well as *N*-substituted regioisomer **10** (see Section S6.5 in the SI), which were separated by flash column chromatography. Small-molecule crystal structures obtained for **9** and **10** allowed assignment of the exact structures (see Section S6.6 in the SI). Iodination of **9** afforded iodobenzimidazole **11**. A key step in this synthetic approach was the coupling of hex-5-enofuranosides **12a/b** and hept-6-enopyranoside **12c** (see Section S6.1 in the SI) with **11** by a one-pot hydroboration Suzuki cross-coupling reaction to give **13a–c**.<sup>[14]</sup> This coupling method presents an improvement to the former strategy wherein furanosyl moieties were introduced via Sonagashira cross-coupling, requiring an additional step for the reduction of the alkynylated benzimidazoles.<sup>[12]</sup> Cyclization proceeded via the formation of a thiourea intermediate, which undergoes intramolecular cyclization promoted by the addition of EDCI to afford carbamate-protected guanidines **14a–c**.<sup>[15]</sup> Gratifyingly, cleavage of the SEM and carbamate protecting groups was achieved concomitantly by use of a fluoride source under mild conditions and short reaction times, with complete retention of the stereochemistry at the carbohydrate moiety, yielding the unprotected *lin*-benzoguanines **4–6**.<sup>[16]</sup> In order to remove the TBA salts, nontraditional 2D-MPLC had to be employed which required stacking a polyamide PF-100P6/8G column above an amino PF-15NH2/6G column, leading to mixtures of free bases and the corresponding ammonium acetates (see SI Section S6.4).

Next, we determined the binding affinities of **4–6** using a functional assay recording the incorporation of radioactively labeled guanine into tRNA.<sup>[11]</sup> This assay characterized **4–6** as three-digit nanomolar inhibitors (Table 1). Subsequently performed nano-ESI MS studies qualified these ligands to shift the monomer-to-dimer ratio slightly toward increased monomeric state. Finally, we performed isothermal titration calorimetry as these experiments make it possible to discover ligands that induce major conformational changes in the interface. In this case, the binding is largely characterized by an entropic signature leading to hardly detectable ITC signals. Similar to **3** but in contrast to **2**, **4–6** follow such a behavior suggesting that also they assert a strong influence on the interface geometry. Surprisingly, in our subsequently performed crystallization trials, we discovered with **5** and **6** crystals exhibiting different lattice dimensions. They were grown from the same well of our crystallization plates, whereas this observation could not be found for **4**. Since even the habitus of the different crystals from the same well did not vary in a significant, easily observable way, we became aware of this rather surprising fact only by mounting and analyzing several crystals in test measurements to check diffraction quality prior to data collection on the synchrotron. Fortunately, we still do this validation routinely in order to select the best-diffracting crystals for our synchrotron measurements.

Detailed analysis showed that some of the crystals grown with **4–6** turned out to correspond to space group C2,



**Scheme 1.** Synthesis of carbohydrate-substituted *lin*-benzoguanine ligands **4–6** (shown in Table 1). Reagents and conditions: a) SEMCl, NaH, DMF, 25–50 °C, 20 h; b) Zn, H<sub>2</sub>O, AcOH, MeOH, 0 °C, 2 h, **9**: 27% and **10** (*3H* tautomer): 21% over two steps; c) I<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, 23 °C, 4 h, 84%; d) 9-BBN, THF, 0–23 °C, 1.5–4.5 h; e) [PdCl<sub>2</sub>(dppf)], K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, THF/DMF, 80 °C, MW, 60–75 min, **13a**: 82%, **13b**: 73%, **13c**: 38% over two steps; f) EtOCONCS, HMDS, EDCI, MeCN, 23 °C, 12–18 h, **14a**: 69%, **14b**: 80%, **14c**: 51%; g) TBAF, THF, 100 °C, MW, 1–1.5 h, **4**: 45%, **5**: 61%, **6**: 72%. SEM = 2-(trimethylsilyl)-ethoxymethyl, DMF = *N,N*-dimethylformamide, 9-BBN = 9-borabicyclo[3.3.1]nonane, dppf = 1,1'-bis-(diphenylphosphino)ferrocene, THF = tetrahydrofuran, HMDS = hexamethyldisilazine, EDCI = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, MW = microwave, TBAF = tetrabutylammonium fluoride.

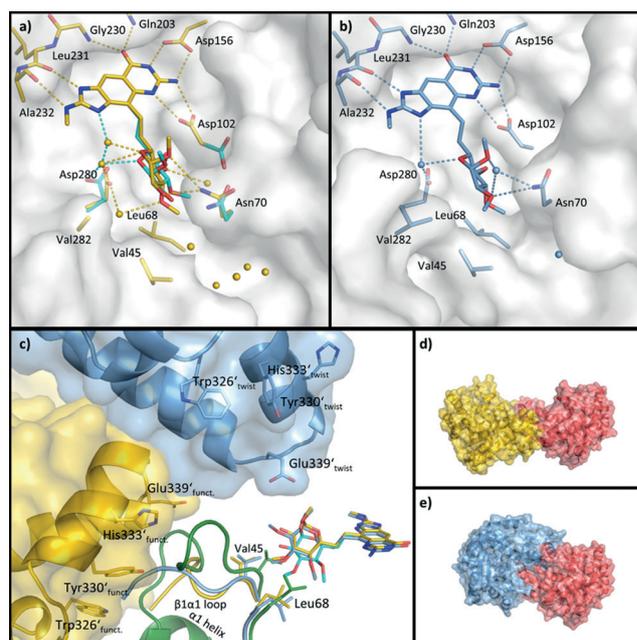
commonly found for these complexes with the usual homodimer packing. In case of crystal growth with **5** and **6** however, also crystals with deviating lattice dimensions in the monoclinic space group  $P2_1$  were detected. This novel lattice symmetry had previously only been detected with **1** disclosing the enzyme with twisted homodimer geometry.<sup>[10]</sup> As both crystal forms exhibit monoclinic symmetry, this explains why macroscopically no easily recognizable differentiation was possible between both forms in terms of deviating crystal habitus.

Structure refinement of the five crystal structures showed in all cases that the tricyclic *lin*-benzoguanine portion forms eight hydrogen bonds with the surrounding residues Asp102, Asp156, Gln203, Gly230NH, Ala232CO, and Leu231CO (Figures 2a, 3a, and S2). Furthermore, stacking of the tricyclic core with Tyr106 above and Met260 below was detected. Ligand **4**, which differs from **3** by a sole additional methyl group, adopts a binding geometry nearly identical to that of **3** (Figure 2a).<sup>[10]</sup> As the only difference, we could detect that the additional 2'-OMe group pushes one water molecule out of the binding site. Nevertheless, in comparison to the uncomplexed *apo*-protein, the  $\beta 1\alpha 1$  loop adopts a perturbed, strongly altered arrangement (Figure 2b). This is in agreement with an undetectable ITC heat signal as the huge conformational adaptation of the entire loop makes the binding process overall largely entropic (see SI).

In the other  $C_2$  structures of TGT-5 and TGT-6, the substituents R, attached to C(4) of the tricycle, are slightly less well-characterized in the electron density than the parent scaffold. This indicates either enhanced residual mobility or scatter over several spatial arrangements. In TGT-5 (Figure 2c), the anomeric methoxy group as well as the two methyl groups of the acetonide protecting group are not fully

visible in the difference electron density. In TGT-6 (Figure 3a), the attached pyranose ring does not allow to assign the equatorial 2'-methoxy group and the entire ring seems placeable into the difference density in two alternative orientations (42% vs. 58% occupancy). As found for the other two furanose ligands, the steric requirements of the pyranose ring induce a very similar rearrangement of the crucial  $\beta 1\alpha 1$  loop. This is also found for TGT-3 to TGT-5 with the consequence that the space vacated by the latter loop is now filled by water molecules. The observed disorder of the terminal sugar moiety seems to correlate with scattered arrangements of Asn70, Asp102, and Asp280.

The surprising reshuffling of the entire dimer interface is observed in TGT-5 (Figure 2d) and TGT-6 (Figure 3b) in the  $P2_1$



**Figure 3.** a, b) Binding modes of **6** in the functional dimer (left, beige/cyan, space group  $C_2$ , PDB code: 5LPS) and in the twisted dimer (right, blue, space group  $P2_1$ , PDB code: 5LPT). In the structure in space group  $C_2$ , the pyranose ring of the C(4) side chain occurs in two nearly equally populated orientations (beige/cyan). c) Superimposition of the two crystal structures (yellow, blue) showing the reshuffled interface contact and the differences in the C(4) pyranose side-chain orientation. The binding pose found in space group  $P2_1$  (blue) closely resembles that observed for the higher populated conformer in space group  $C_2$  (beige). The modulated packing of the functional (d) and twisted (e) dimer with **6** is shown on the right.

crystal form. This rearrangement must have occurred in solution prior the co-crystallization and it results, most likely, from an equilibrium between the functional and twisted dimer of the protein. We suppose that with **5** and **6**, both geometries can be captured in the crystalline state. It remains at present unresolved whether the interface transformation, formally involving a relative rotation of one subunit against the other, occurs via full dissociation to separated monomers, which reassemble or whether the rotational transition follows a pathway where the two monomers remain in close contact. Furthermore, it remains speculative to what percentage both forms are present in solution; however, we suppose that energetically both must be comparable, for otherwise they would hardly crystallize side-by-side in the same crystallization well. Crystal growth is a process that expands over many days and should be largely governed by equilibrium conditions.

The crystal structures with **5** (Figure 2 d) and **6** (Figure 3 b) in  $P2_1$  show the ligands with well-defined difference electron density. Two crystallographically independent polypeptide chains are observed with largely identical geometry. Comparing the ligand binding modes of **5** in the functional and twisted homodimer demonstrates that the terminal sugar moiety adopts a different orientation with respect to the parent *lin*-benzoguanine scaffold (Figure 2c,d). The ethylene bridge at C(4) roughly follows a mirrored orientation leading to deviating placement of the furanose moiety. Since interface packing results in totally different contacts, the pivotal Glu339' of the adjacent crystal mate now gets into close contact with the ligand (Figure 2e). Considering the binding mode of **6** in the two deviating dimers, the pose of the pyranose substituent at C(4) in the twisted dimer resembles that of the higher populated one in the functional dimer (Figure 3a,b).

In summary, the tRNA-modifying enzyme TGT is only capable of recognizing its substrate as a homodimer. Moreover, the protein can form an alternative, twisted homodimer that is no longer capable of binding the tRNA for steric reasons (see SI, Figure S4). The interfaces formed by both dimers are virtually of the same size with similar interaction inventory. We designed two ligands with a furanosyl and pyranosyl moiety that readily crystallize with the protein side-by-side in the same crystallization well. We believe that the two homodimeric forms are close in energy and exist in equilibrium in solution. The binding modes of the ligands in both forms are very similar. We speculate that the twisted form corresponds to a kind of resting state, as it is incompetent to bind and process tRNA. Possibly, this second form is necessary for the functional regulation of the enzyme. Our hypothesis is supported by the observation that many TGTs from eukaryotic organisms are functional as heterodimers, but via dissociation, they can also form homodimers. We suggest that this is only another, however on first sight more complex, variation to regulate the function of this class of enzymes.

## Acknowledgements

We thank the Helmholtz-Zentrum (Berlin), Elettra (Trieste), EMBL-Desy (Hamburg), and ESRF (Grenoble) for allocation of synchrotron radiation beamtime, travel support, and the beamline scientists for help during data collection. Work at ETH has been supported by the ETH research council (ETH-01 13-2). We thank Dr. Nils Trapp (ETH Zurich) for resolving the small-molecule crystal structures. We are grateful to the NMR service of the LOC (ETH Zurich) for recording 1D/2D NMR spectra. This work was also supported by the CNRS, the University of Strasbourg, the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR), and the French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INBS-08-03). We thank GIS IBISA and Région Alsace for financial support in purchasing a Synapt G2 HDMS instrument. T.B. acknowledges the Institut de Recherche Servier for funding his PhD fellowship.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** drug discovery · homodimers · medicinal chemistry · protein crystallography · protein dynamics

**How to cite:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10085–10090  
*Angew. Chem.* **2018**, *130*, 10242–10247

- [1] a) H. Nishi, K. Hashimoto, T. Madej, A. R. Panchenko, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *117*, 3–24; b) K. Hashimoto, H. Nishi, S. Bryant, A. R. Panchenko, *Phys. Biol.* **2011**, *8*, 035007; c) G. G. Hammes, C. W. Wu, *Science* **1971**, *172*, 1205–1211.
- [2] M. Q. Fatmi, C.-E. A. Chang, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, e1000994.
- [3] B. Stengl, K. Reuter, G. Klebe, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1926–1939.
- [4] B. Stengl, E. A. Meyer, A. Heine, R. Brenk, F. Diederich, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 492–511.
- [5] T. Ritschel, C. Atmanene, K. Reuter, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianfèrani, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 833–847.
- [6] W. Xie, X. Liu, R. H. Huang, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 781–788.
- [7] F. Immekus, L. J. Barandun, M. Betz, F. Debaene, S. Petiot, S. Sanglier-Cianfèrani, K. Reuter, F. Diederich, G. Klebe, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1163–1178.
- [8] S. Jakobi, T. X. P. Nguyen, F. Debaene, A. Metz, S. Sanglier-Cianfèrani, K. Reuter, G. Klebe, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2014**, *82*, 2713–2732.
- [9] S. Jakobi, P. T. X. Nguyen, F. Debaene, S. Cianfèrani, K. Reuter, G. Klebe, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1897–1907.
- [10] F. R. Ehrmann, J. Stojko, A. Metz, F. Debaene, L. J. Barandun, A. Heine, F. Diederich, S. Cianfèrani, K. Reuter, G. Klebe, *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175723.
- [11] E. A. Meyer, N. Donati, M. Guillot, W. B. Schweizer, F. Diederich, B. Stengl, R. Brenk, K. Reuter, G. Klebe, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 573–597.
- [12] L. J. Barandun, F. R. Ehrmann, D. Zimmerli, F. Immekus, M. Giroud, C. Grünenfelder, W. B. Schweizer, B. Bernet, M. Betz, A. Heine, G. Klebe, F. Diederich, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 126–135.
- [13] J. P. Whitten, D. P. Matthews, J. R. McCarthy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1891–1894.

- [14] P. N. Collier, A. D. Campbell, I. Patel, T. M. Raynham, R. J. K. Taylor, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1802–1815.
- [15] C. Lecoutey, C. Fossey, S. Rault, F. Fabis, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2785–2788.
- [16] U. Jacquemard, V. Bénétteau, M. Lefoix, S. Routier, J.-Y. Mérour, G. Coudert, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10039–10047.

Manuscript received: April 20, 2018  
Revised manuscript received: June 4, 2018  
Accepted manuscript online: June 21, 2018  
Version of record online: July 16, 2018

---

***ANNEXE 2 : CARACTÉRISATION D'UN SYSTÈME  
PEPTIDE-LIGAND PAR MS NATIVE.***

**Structure-Based Identification of HIV-1 Nucleocapsid Protein Inhibitors Active against Wild-Type and Drug-Resistant HIV-1 Strains.**

Mori, M., L. Kovalenko, S. Malancona, F. Saladini, D. De Forni, M. Pires, N. Humbert, E. Real, T. Botzanowski, S. Cianferani, A. Giannini, M. C. Dasso Lang, G. Cugia, B. Poddesu, F. Lori, M. Zazzi, S. Harper, V. Summa, Y. Mely and M. Botta.

*ACS Chem Biol* , 2018, **13**(1): 253-266.

# Structure-Based Identification of HIV-1 Nucleocapsid Protein Inhibitors Active against Wild-Type and Drug-Resistant HIV-1 Strains

Mattia Mori,<sup>†,‡,§,¶</sup> Lesia Kovalenko,<sup>‡,§,¶</sup> Savina Malancona,<sup>||,¶</sup> Francesco Saladini,<sup>⊥,¶,Ⓚ</sup> Davide De Forni,<sup>#</sup> Manuel Pires,<sup>‡</sup> Nicolas Humbert,<sup>‡</sup> Eleonore Real,<sup>‡</sup> Thomas Botzanowski,<sup>▽</sup> Sarah Cianfèrani,<sup>▽,Ⓚ</sup> Alessia Giannini,<sup>⊥</sup> Maria Chiara Dasso Lang,<sup>†</sup> Giulia Cugia,<sup>#</sup> Barbara Poddesu,<sup>#</sup> Franco Lori,<sup>#</sup> Maurizio Zazzi,<sup>⊥</sup> Steven Harper,<sup>||</sup> Vincenzo Summa,<sup>\*,||</sup> Yves Mely,<sup>\*,‡,Ⓚ</sup> and Maurizio Botta<sup>\*,†,Ⓚ,Ⓚ</sup>

<sup>†</sup>Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, via Aldo Moro 2, 53100 Siena, Italy

<sup>‡</sup>Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, CNRS, 74 Route du Rhin, 67401 Illkirch, France

<sup>§</sup>Department of Chemistry, Kyiv National Taras Shevchenko University, 01033 Kyiv, Ukraine

<sup>||</sup>IRBM Science Park S.p.A., Via Pontina Km 30.600, 00071 Pomezia (RM), Italy

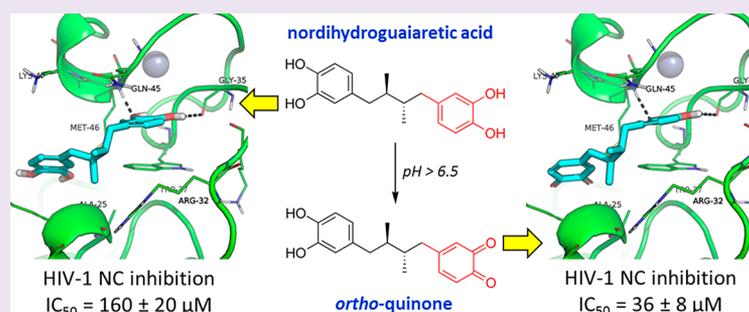
<sup>⊥</sup>Department of Medical Biotechnologies, University of Siena, Viale Mario Bracci, 16, 50100 Siena, Italy

<sup>#</sup>ViroStatics S.r.l., Viale Umberto I 46, 07100 Sassari, Italy

<sup>▽</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>Ⓚ</sup>Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, Center for Biotechnology, College of Science and Technology, Temple University, BioLife Science Bldg., Suite 333, 1900 N 12th Street, Philadelphia, Pennsylvania 19122, United States

## Supporting Information



**ABSTRACT:** HIV/AIDS is still one of the leading causes of death worldwide. Current drugs that target the canonical steps of the HIV-1 life cycle are efficient in blocking viral replication but are unable to eradicate HIV-1 from infected patients. Moreover, drug resistance (DR) is often associated with the clinical use of these molecules, thus raising the need for novel drug candidates as well as novel putative drug targets. In this respect, pharmacological inhibition of the highly conserved and multifunctional nucleocapsid protein (NC) of HIV-1 is considered a promising alternative to current drugs, particularly to overcome DR. Here, using a multidisciplinary approach combining *in silico* screening, fluorescence-based molecular assays, and cellular antiviral assays, we identified nordihydroguaiaretic acid (**6**), as a novel natural product inhibitor of NC. By using NMR, mass spectrometry, fluorescence spectroscopy, and molecular modeling, **6** was found to act through a dual mechanism of action never highlighted before for NC inhibitors (NCIs). First, the molecule recognizes and binds NC noncovalently, which results in the inhibition of the nucleic acid chaperone properties of NC. In a second step, chemical oxidation of **6** induces a potent chemical inactivation of the protein. Overall, **6** inhibits NC and the replication of wild-type and drug-resistant HIV-1 strains in the low micromolar range with moderate cytotoxicity that makes it a profitable tool compound as well as a good starting point for the development of pharmacologically relevant NCIs.

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) is still one of the major global public health issues. The Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS) estimated that at the end of 2016 there were approximately 36.7 million people infected by HIV, and about 35 million people have died of AIDS-related causes since the beginning of the epidemic.

Received: October 19, 2017

Accepted: December 13, 2017

Published: December 13, 2017

Despite dramatic progress in the development of antiretroviral agents, HIV cannot be eradicated yet, and thousands of new cases of HIV-1 infection occur daily.<sup>1</sup>

During the past 25 years, the arsenal of drugs to combat HIV-1 infection has increased continuously.<sup>2</sup> More than 25 antiretroviral drugs targeting the entry steps of HIV-1 into the host cells, or the key HIV-1 enzymes Reverse Transcriptase (RT), Protease (PR), or Integrase (IN), have been approved in the U.S. and Europe, but several are not used any more or only under special circumstances. Indeed, currently most used drugs include four nucleoside RT inhibitors (NRTIs), three non-nucleoside RT inhibitors (NNRTIs), three PR inhibitors (PIs), and three IN inhibitors (INIs). It is worth noting that, with only the exception of one maturation inhibitor and one attachment inhibitor, all of the few drug candidates under clinical investigation still belong to the NRTI, NNRTI, or INI class.<sup>3</sup>

Although current drugs have been proved to be potent and selective, notably when administered in combination (Highly Active Anti-Retroviral Therapy - HAART), treatment failures continue to occur, mostly due to the emergence of drug resistance (DR), as a result of the ability of HIV-1 to mutate in response to pharmacological pressure. In fact, DR has been the most critical limitation in antiretroviral therapy since its advent, as underlined by the World Health Organization in establishing the "Global HIV-1 Drug Resistance Network."<sup>4</sup> As a consequence, an investigational anti-HIV drug is requested to have a favorable resistance profile prior to proceeding further with clinical studies. New antiretroviral candidates belonging to drug classes already in clinical use are easier to develop but are often affected by cross-resistance with earlier compounds of the same class. By contrast, compounds targeting a new step in the HIV-1 life cycle are expected to be active against viral strains harboring resistance mutations selected by previous treatment with licensed drugs working with a different mechanism. In addition, an ideal new target protein should show limited natural variability to warrant drug susceptibility across different HIV-1 subtypes and variants.

The HIV-1 nucleocapsid protein (NC) is highly conserved in diverse HIV subtypes and plays a central role in virus replication that makes it an ideal target for drug discovery. The main structural and functional features of NC and its pharmacological relevance as a potential drug target have been recently reviewed.<sup>5</sup> The protein is thought to act as a nucleic acid chaperone, which in turn enhances the efficiency of RT and IN within the initial phases of the HIV-1 replication cycle, where genomic RNA is converted into double-stranded DNA and then integrated within the host genome.<sup>6–10</sup> In the late steps of HIV-1 replication, the chaperone activity of the NC domain of the Gag polyprotein is required for efficient packaging and dimerization of the full-length genomic RNA, which is critical for viral assembly, maturation, and budding.<sup>11–16</sup> The 55-amino acid sequence of mature NC is highly conserved across HIV-1 strains and particularly in strains harboring drug-resistant mutations deriving from selective pressure from currently used antiretroviral drugs. In fact, the NC has a low tendency to mutate in HIV-infected patients, and single point NC mutants are often inactive *in vitro*, resulting in the production of noninfectious viral particles.<sup>17–24</sup> Taken together, these findings suggest that the NC is a profitable target for the development of small molecule inhibitors (NCIs) that may impact several HIV-1 replication steps. Moreover, specific inhibition of the NC at multiple steps of the HIV-1

replication cycle with a single small molecule is expected to significantly enhance the genetic barrier to DR.

The first NCI was disclosed in 1993 by Rice et al., who developed zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds having remarkable antiretroviral activity *in vitro*.<sup>25</sup> Since then, efforts were focused on the discovery of novel NCIs operating through different mechanisms of action. Three main classes of NCIs have been disclosed: (i) zinc ejectors, (ii) noncovalent NCIs binding to nucleic acid partners of NC, and (iii) noncovalent NCIs binding to NC.<sup>5</sup> Zinc ejectors showed potent antiviral activity and have been recently progressed through preclinical studies,<sup>26</sup> even though most of the chemical agents from this class appeared to be quite toxic. Thus, their use as systemic antiretroviral agents has been discontinued in favor of their possible development as topical microbicides.<sup>27</sup> Noncovalent NCIs targeting nucleic acids are generally low specificity DNA- or RNA-intercalating agents that mainly proved to be valuable tools in understanding NC functions and druggability. In contrast, NCIs directly binding to NC represent a greater opportunity in antiretroviral drug discovery and have been the subject of extensive studies conducted at multiple levels and with different types of chemical entities by our own and by other research groups in the past few years.<sup>28–40</sup>

Despite significant progress in the field, the majority of noncovalent NCIs developed so far have showed only moderate antiretroviral effects in infected cells, which has limited their investigation in the context of DR. Therefore, challenging investigations aimed at consolidating NC as a potential drug target and identifying novel chemotypes for NCIs endowed with chemical and physicochemical features suitable for further development are urgently needed.

With the aim of advancing the state of the art in the development of NCIs as novel anti-HIV therapeutics, we screened large libraries of compounds from proprietary collections or commercial vendors through a multidisciplinary approach boosted by computational studies. Candidate NCIs selected *in silico* were tested in both molecular and cellular assays *in vitro* and further profiled for their mechanism of NC inhibition. The nonspecific cytotoxicity and the effect of NCIs on the replication of wild-type and drug-resistant HIV-1 strains were monitored as well.

## RESULTS

**Screening Libraries.** In the present work, two different libraries were screened to identify new chemotypes of NCIs: (i) the compound library from IRBM Science Park S.p.A., comprising around 100 000 compounds at the time of this work and (ii) a custom subset of the ZINC database of commercially available compounds, composed of around 5.4 million compounds. This subset was provided by drug-like filtration of the all-now subset of the ZINC database by using the filter developed by Oprea.<sup>41</sup> The main features and physical properties of compounds included in the ZINC database and its subsets are available at the ZINC Web site (<https://zinc.docking.org/>) as well as in the original publication.<sup>42</sup> The main physical properties of compounds included in the IRBM proprietary library were calculated using the QikProp software<sup>43</sup> and showed that the library contains mostly small molecules endowed with lead- and drug-like properties (Supporting Information Figures S1 and S2).

**Virtual Screening.** Computational modeling proved to be a valuable tool in rational design and screening of NCIs.<sup>34,35</sup> The availability of NMR structures of NC in complex with RNA,

DNA and a small molecule inhibitor,<sup>31,44–46</sup> facilitates structure-based methods such as molecular docking. Here, we used a previously described structure-based virtual screening.<sup>33,35</sup>

On the basis of the well-known conformational flexibility and adaptability to binding partners of the NC, the virtual screening protocol was implemented with three receptor structures, namely the (i) Molecular Dynamics (MD)-refined structure of NC in binding conformation to the SL3 psi-RNA recognition element, hereafter referred to as NC-RNA; (ii) MD-refined structure of NC in binding conformation to the DNA (–)primer binding site (PBS) DNA, hereafter referred to as NC-DNA;<sup>45</sup> and (iii) NMR structure of NC bound to a small molecule NCI in 1:2 stoichiometry, hereafter referred to as NC-LIG.<sup>31</sup>

Different from the virtual screening already described,<sup>33–35</sup> here we used the FRED docking program from OpenEye<sup>47,48</sup> to perform fast and accurate molecular docking of library compounds toward the NC. After docking, some rescoring functions were tested for their ability to correctly rank a training set composed by available NCIs.<sup>5</sup> Therefore, the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) method was selected for rescoring docking poses toward the NC-RNA structure, whereas the Chemscore function implemented in GOLD<sup>49</sup> was selected for rescoring docking poses toward the NC-DNA and NC-LIG protein conformations. It is not surprising that the same scoring function proved to perform well toward these two NC structures. Indeed, NC-DNA and NC-LIG share a very similar organization of residue side chains within the two zinc fingers, thus forming very similar binding pockets for small molecules (RMSD = 1.42 Å for atoms in residues 29–38).

After docking and rescoring, the 10% top ranking molecules were further processed. To enhance chemical diversity in virtual screening results, virtual hits were clustered based on a combination of molecular fingerprints and substructures as described by Stahl et al.,<sup>50</sup> and only a few molecules from each cluster were selected for further studies. After visual inspection, 65 and 180 virtual hits were progressed to *in vitro* assays from the IRBM proprietary library and the custom subset of the ZINC database, respectively.

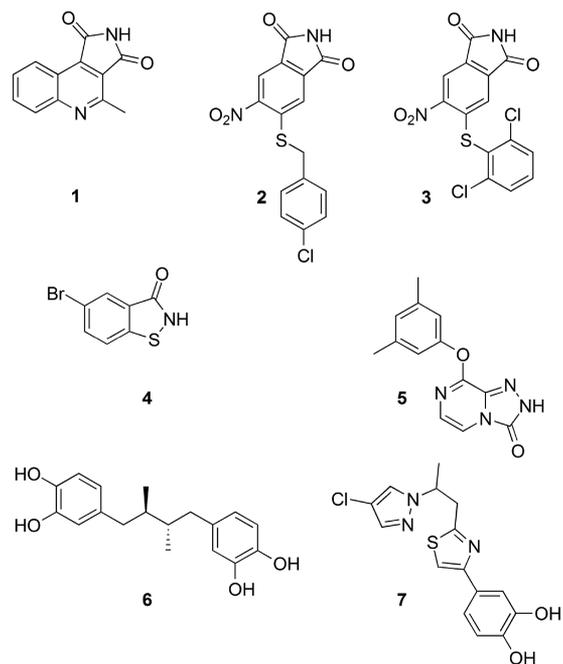
**NC Inhibition *in Vitro*.** Selected virtual hits were further screened *in vitro* for their ability to inhibit the nucleic acid chaperone activity of the NC protein. NC is known to destabilize the secondary structure of cTAR DNA, the complementary sequence of the transactivation response element, which is involved in minus-strand DNA transfer during reverse transcription.<sup>51–61</sup> This destabilization is highly specific and very sensitive to the proper folding of the zinc-bound finger motifs of NC.<sup>62–65</sup> In this assay, the destabilization is monitored with a cTAR sequence which is labeled with a dye (Rh6G or Alexa488) and a quencher (Dabcyl) at its 5' and 3' ends, respectively. In the absence of destabilization, the close proximity of both cTAR ends results in a strong fluorescence quenching of the dye emission by the Dabcyl group.<sup>66</sup> NC(11–55) added to cTAR at a ratio of 10 NC/cTAR melts the bottom of the cTAR stem, which increases the distance between the dye and the quencher and as a result increases the dye fluorescence.<sup>36,53</sup> NCIs are expected to prevent the NC-induced destabilization of cTAR and thus reverse the NC-induced increase in the fluorescence of the labeled cTAR.<sup>36</sup> The activity of the inhibitor was evaluated from the ratio of the fluorescence intensity observed in the

presence of NC with the molecule to that in the absence of the compound. All compounds were tested at two final concentrations, namely, 10 and 100 μM. Using a threshold of 25% inhibition at 100 μM concentration, seven positive hits were identified (Table 1, and Figure 1). All selected

**Table 1.** *In Vitro* NC Inhibition Activity and Antiviral Activity of NCI hits

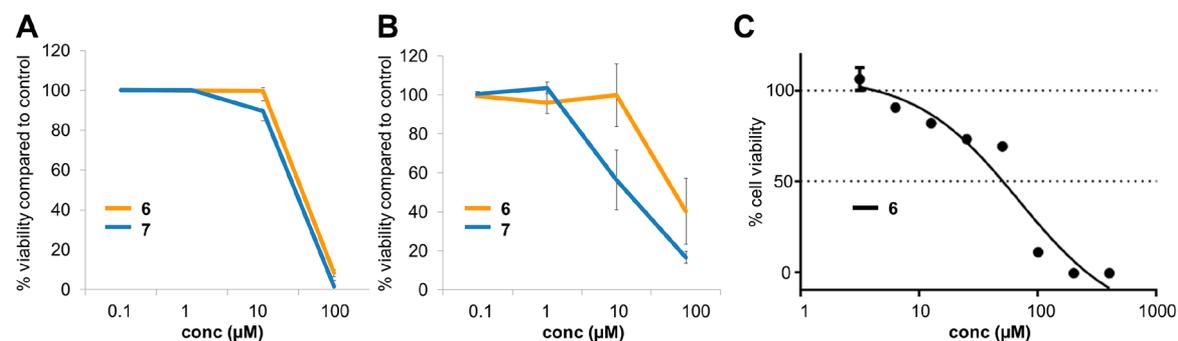
| compound         | IC <sub>50</sub> <sup>a,b</sup> (μM) | single-cycle assay IC <sub>50</sub> (μM) | BiCycle IC <sub>50</sub> (95% CI) <sup>g</sup> (μM) |
|------------------|--------------------------------------|--|---|
| 1                | 100 ± 10                             | N.A. <sup>e</sup>                        | N.A. <sup>e</sup>                                   |
| 2                | 35 ± 7                               | cytotoxic                                | N.A. <sup>e</sup>                                   |
| 3                | 70 ± 10                              | 170 ± 20                                 | N.A. <sup>e</sup>                                   |
| 4 <sup>c</sup>   | 170 ± 10                             | N.T. <sup>f</sup>                        | N.T. <sup>f</sup>                                   |
| 5                | 35 ± 7                               | N.A. <sup>e</sup>                        | N.A. <sup>e</sup>                                   |
| 6 <sup>c,d</sup> | 26 ± 2                               | 42 ± 4                                   | 4.3 (1.1–18.2)                                      |
| 7 <sup>d</sup>   | 110 ± 30                             | 33 ± 1                                   | 25.5 (11.7–55.3)                                    |

<sup>a</sup>Data are average ± SD of at least two independent experiments. <sup>b</sup>All compounds were tested with cTAR Rh6G/Dabcyl. <sup>c</sup>Compounds showing a time dependent inhibition. <sup>d</sup>These compounds were found to interact with free Rh6G label and were confirmed to inhibit the NC-induced destabilization of cTAR Alexa488/Dabcyl. <sup>e</sup>N.A. = not active. <sup>f</sup>N.T. = not tested. <sup>g</sup>95% confidence intervals calculated for each IC<sub>50</sub> value



**Figure 1.** Chemical structure of the positive NCI hits identified by the *in vitro* NC inhibition assay.

compounds were also tested for their direct interaction with the free Rh6G label. Two compounds, 6 and 7, were found to quench the Rh6G fluorescence. As these compounds do not interact with the Alexa448 dye, they were further retested with cTAR Alexa488/Dabcyl, which confirmed their inhibitory activity. Also, the inhibition effect was monitored in time for all compounds, and interestingly, 4 and 6 showed significant time-dependent inhibition in this assay. The benzothiazolone 4 belongs to a well-known class of zinc-ejecting NC inhibitors<sup>67–70</sup> and falls out of the scope of this work. All other compounds were further investigated in cells infected



**Figure 2.** Cytotoxicity of NC Inhibitors measured through Trypan blue assay (A), MTS assay (B), and CellTiter-Glo 2.0 assay (C).

**Table 2.** TD<sub>50</sub> Values (Trypan Blue and MTS Assays)

| compound | TD <sub>50</sub> Trypan Blue | TD <sub>50</sub> MTS | TD <sub>50</sub> (95% CI) MT-2 cells | TI <sub>TrypanBlue</sub> (TD <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ) | TI <sub>MTS</sub> (TD <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ) | TI <sub>MT-2</sub> (TD <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ) |
|----------|------------------------------|----------------------|--------------------------------------|---|--|---|
| 6        | 35 μM                        | 60 μM                | 68.5 (32.1–146.3) μM                 | 8.1   | 13.9   | 15.9  |
| 7        | 30 μM                        | 20 μM                | n.d.                                 | 1.2   | 0.8  | n.d.  |

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> is calculated in the BiCycle assay (Table 1) against wild-type HIV-1. n.d.: not determined.

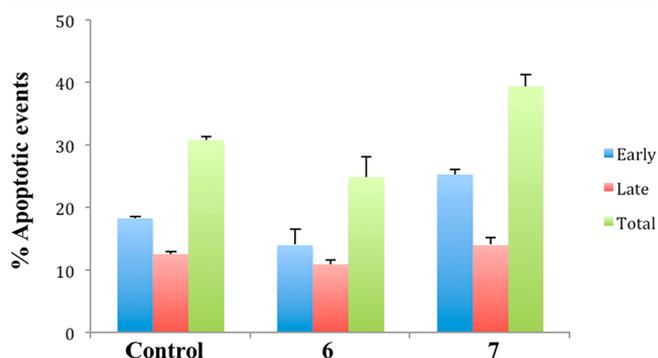
either with the wild-type NL4-3 HIV-1 strain or with pseudoviral particles.

**Antiretroviral Activity of NCI Hits.** The antiretroviral activity of positive hits identified in the cTAR destabilization assay was then evaluated by means of two different cell based assays, one involving VSV-G pseudotyped nonreplicative lentiviral particles that mimic the early steps of infection (single-cycle assay), the other consisting of a replicative two-round infection assay using the HIV-1 wild-type reference strain NL4-3 (BiCycle assay). In the single-cycle assay, antiretroviral activities below 50 μM were observed for 6 and 7, the best molecules of this series (Table 1). The activity of 2 could not be determined due to its cell toxicity. The two other molecules were found to be inactive. Results of the BiCycle assay are reported in Table 1 and were in good agreement with results of the single-cycle assay. 1, 2, and 3 share the common phthalimide scaffold, which was suggested to interact with the NC and to inhibit its chaperoning functions at a low micromolar concentration (Table 1). Despite the nice trend and rough structure–activity relationships (SAR) observed in the fluorescence assay, these molecules proved inactive or moderately active in inhibiting the replication of HIV-1 *in vitro* and were therefore discontinued. A lack of antiviral activity was also observed for the triazolone 5. Contrarily, the naturally occurring nordihydroguaiaretic acid 6 and the phenyl-aminothiazole 7 were active in cells at low micromolar concentration. The effects of 7 in a single-cycle assay and BiCycle assays were very similar, suggesting that this molecule acts mainly on the early steps of infection. 6 showed an IC<sub>50</sub> value 10 times lower in the BiCycle assay as compared to the single-cycle assay, suggesting that it may act on both early and late phases, but with a higher efficiency on late steps. Based on their promising activity, these molecules were therefore selected for further in depth analysis of cytotoxicity.

**Cytotoxicity, Apoptotic Effect, and Mitochondrial Toxicity of Compounds 6 and 7.** The cytotoxicity of NCIs 6 and 7 was evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. Stimulated PBMCs were treated for 7 days with different concentrations (range 0.1–100 μM) of compounds 6 and 7, and cytotoxicity was then measured through both Trypan blue staining (Figure 2A) and MTS assay (Figure 2B). The compounds showed a moderate

cytotoxicity profile with 50% toxic dose (TD<sub>50</sub>) values in the high micromolar range (Table 2). However, an acceptable therapeutic index (TI) was observed only for compound 6, while 7 proved to be quite toxic at the bioactive concentration either by Trypan Blue and MTS assays. Therefore, cytotoxicity of 6 was also evaluated on the same cell line (namely, MT-2 cells) used for efficacy IC<sub>50</sub> determination, providing a TD<sub>50</sub> value of 68.5 μM (Figure 2C, Table 2).

The effect of the compounds on apoptosis was also measured. Stimulated PBMCs were treated for 7 days with 10 and 100 μM compounds 6 and 7; apoptosis was then evaluated through 7-aminoactinomycin D (7-AAD)/Annexin-V staining and cytofluorimetric analysis. Compounds 6 and 7 appeared to be toxic at 100 μM (as per 7-AAD staining), while at 10 μM they did not induce significant apoptosis compared to the untreated control. Percentages of early, late, and total apoptotic events induced by treatment with the two compounds are presented graphically in Figure 3.

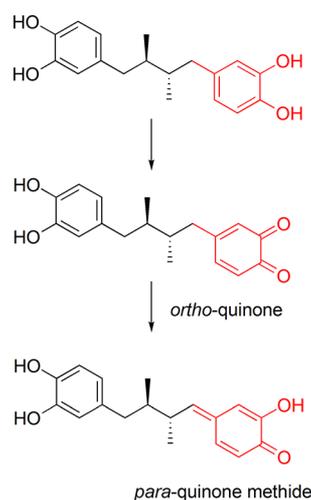


**Figure 3.** Percentages of early (cells reactive to Annexin-V alone), late (cells reactive to Annexin-V and 7-AAD), and total (early plus late) apoptotic events after treatment with 10 μM NCIs.

Mitochondrial toxicity was evaluated in the human pancreatic adenocarcinoma cell line BxPC-3. Compounds 6 and 7 at 10 μM showed no mitochondrial toxicity (Supporting Information, Figure S3).

**Insights into the Mechanism of Action of Compound 6.** On the basis of the results described above, 6 appears as the

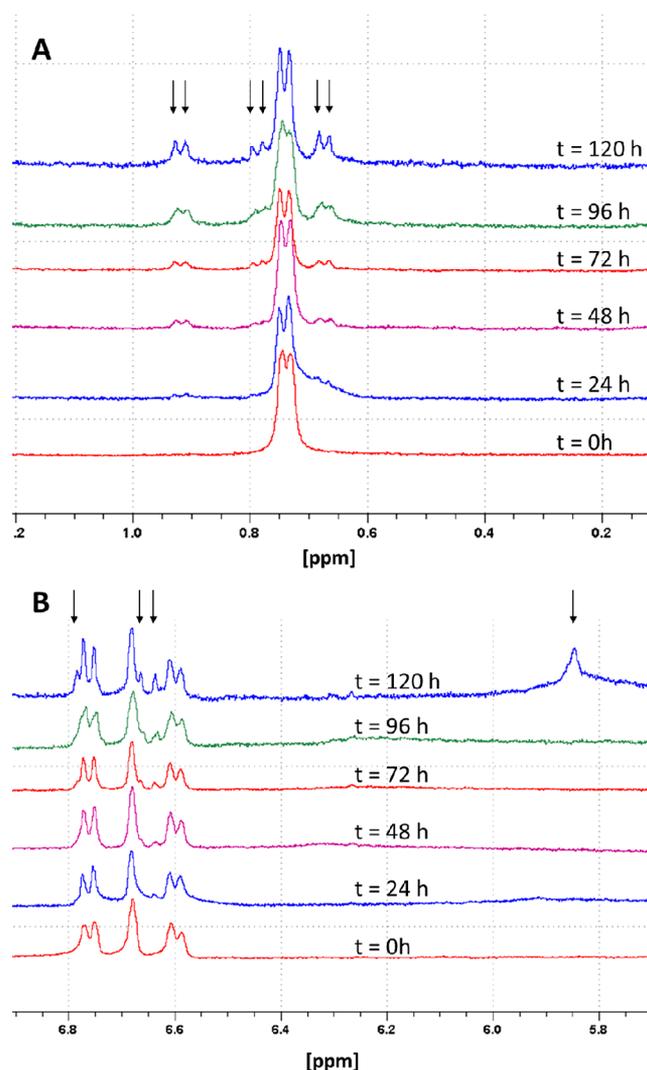
most interesting NCI among the test set and could become a valuable tool compound for pharmacological NC inhibition. However, this molecule showed time-dependent NC inhibition *in vitro*, thus raising the need to investigate further its mechanism of action at the molecular level. From a chemical standpoint, **6** is the nordihydroguaiaretic acid, naturally found in the leaves and twigs of *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) and long known as an antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer agent.<sup>71</sup> Notably, the catechol moiety of **6** could be oxidized *in vitro* as described in Figure 4,<sup>72–74</sup> thus providing



**Figure 4.** Putative oxidation pathway of the nordihydroguaiaretic acid **6**. The first species formed is the *ortho*-quinone by means of fast oxidation. This compound then slowly isomerizes to the *para*-quinone methide.

chemical species that may interact with the protein by means of different pharmacophores. To elucidate the mechanism of action of this promising NCI, in depth fluorescence-based NC inhibition assays were performed under different conditions, and the results were coupled with mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and molecular modeling. Antiretroviral activity of **6** was monitored also with multiple drug resistant HIV-1 strains.

**NMR Analysis of the Chemical Stability of 6.** The chemical stability of **6** in screening conditions was monitored by NMR spectroscopy, which already proved highly versatile in identifying the bioactive species of chemically unstable small molecules in solution.<sup>75,76</sup> According to the oxidation pathway of **6** proposed by Billinsky et al.<sup>72</sup> (Figure 4), the signals of aromatic and vinyl protons at 5.5–7 ppm and the signals of methyl protons at 0–1 ppm are informative for the chemical species in solution. Whereas the spectra recorded at  $t = 0$  showed the existence of a single and symmetric species (**6**), starting from  $t = 24$  h new methyl signals appeared and became even more evident up to 120 h. These signals suggest the formation of a new nonsymmetric species, in agreement with the hypothesis that oxidation may affect only one of the two catechol rings of **6** (Figure 5A).<sup>72,73</sup> These chemical changes are accompanied by a variation of the solution color, which moves from colorless to light brown (Supporting Information, Figure S4). In the aromatic region, new signals appeared after 24 or 48 h and increased their intensity until  $t = 120$  h. These data, coupled with the lack of signals attributable to the vinyl proton, indicate that the new species is the *ortho*-quinone derivative (Figure 5B). At  $t = 120$  h, a rather intense and broad

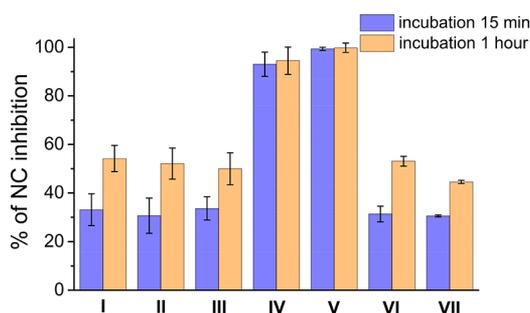


**Figure 5.** Superimposition of NMR spectra of **6** recorded at different time points. The molecule is dissolved at 200  $\mu$ M in TRIS buffer at pH 7.5 ( $D_2O$  was used to prepare the buffer). Spectra were recorded at 400 MHz at different time points. (A) Magnification of the methyl/aliphatic region at 0–1.2 ppm, showing the peaks attributed to the methyl groups of the molecule. (B) Magnification of the aromatic/vinyl region at 5.7–6.9 ppm, showing the peaks attributed to the phenyl rings and the vinyl proton ( $t = 120$  h). The new peaks compared to the spectrum recorded at  $t = 0$  are highlighted by black arrows. The times at which the spectra are recorded are labeled over the baseline.

signal appeared at 5.85 ppm (Figure 5B) and was attributed to the vinyl proton of the *para*-quinone methide species.<sup>72,73,77,78</sup> In line with our data, isomerization of the *ortho*-quinone to the *para*-quinone methide has already been reported to be a very slow process.<sup>72,79</sup> Notably, this peak disappeared after an additional 24 h ( $t = 144$  h, data not shown), suggesting that the *para*-quinone methide may be a rather labile species in screening conditions and that NC inhibition is most likely due to the *ortho*-quinone oxidized form of **6**. Finally, no variation was observed within 120 h in the NMR spectra of **6** dissolved in  $DMSO-d_6$  or in pure  $D_2O$ , indicating that the buffer at pH 7.5 is required to promote oxidation (data not shown).

**NC Inhibition Assays.** To further understand the time-dependent effect observed in the NC inhibitory activity of **6**

(Table 1), we performed additional experiments by varying the mixing order of reagents and the time of incubation. The freshly prepared solution of **6** in DMSO was mixed directly with the cTAR/NC complex (Figure 6-I) and incubated for



**Figure 6.** Effect of preincubation, incubation time, and mixing order on the inhibitory activity of **6**. In all experiments, a freshly prepared solution of **6** in DMSO was used. Conditions I–VII are described in the text. In all samples, the concentration of cTAR Alexa488/Dabcyl was 0.1  $\mu\text{M}$ ; NC, 1  $\mu\text{M}$ ; **6**, 20  $\mu\text{M}$  (1% of DMSO v/v in the final volume). Experiments were performed in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 mM NaCl, and 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Excitation wavelength was 480 nm. Error bars from duplicate experiments are shown.

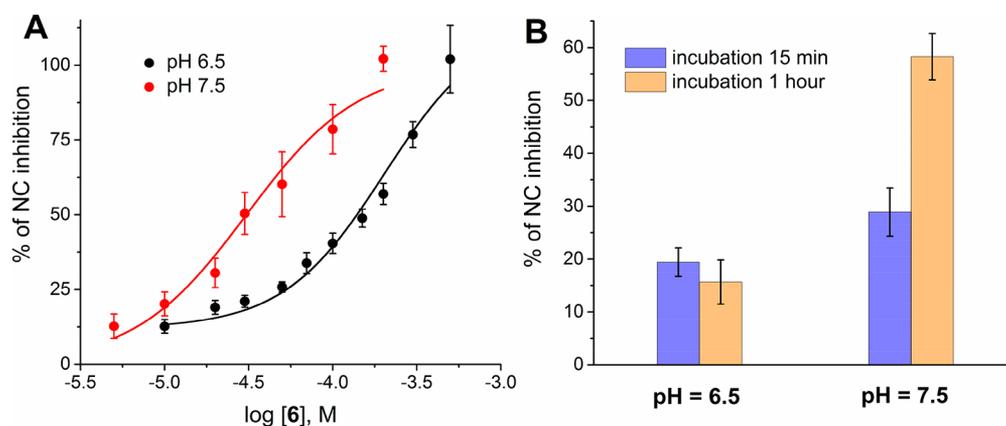
either 15 min or 1 h before measurements. Alternatively, the solution of **6** was preincubated in buffer for either 2 h (Figure 6-II) or 24 h (Figure 6-III) before mixing with the cTAR/NC complex. After mixing with cTAR/NC complex, inhibition was measured after 15 min and 1 h incubation. In another set of experiments, the **6** solution was preincubated with NC for 2 h (Figure 6-IV) or 24 h (Figure 6-V). Then, the mixture was added to cTAR, and inhibition was measured after 15 min and 1 h incubation. Finally, the solution of **6** was preincubated with cTAR for 2 h (Figure 6-VI) or 24 h (Figure 6-VII), before the addition of NC, and further incubation for 15 min or 1 h.

As shown in Figure 6-I–III, when the **6** solution was added directly or after 2 or 24 h preincubation in the buffer to the NC/cTAR complex, we observed a 30–40% inhibition of NC activity after 15 min incubation (violet bars) and 50–60% inhibition after 1 h of incubation (orange bars). Similar percentages were obtained when the **6** molecule was first

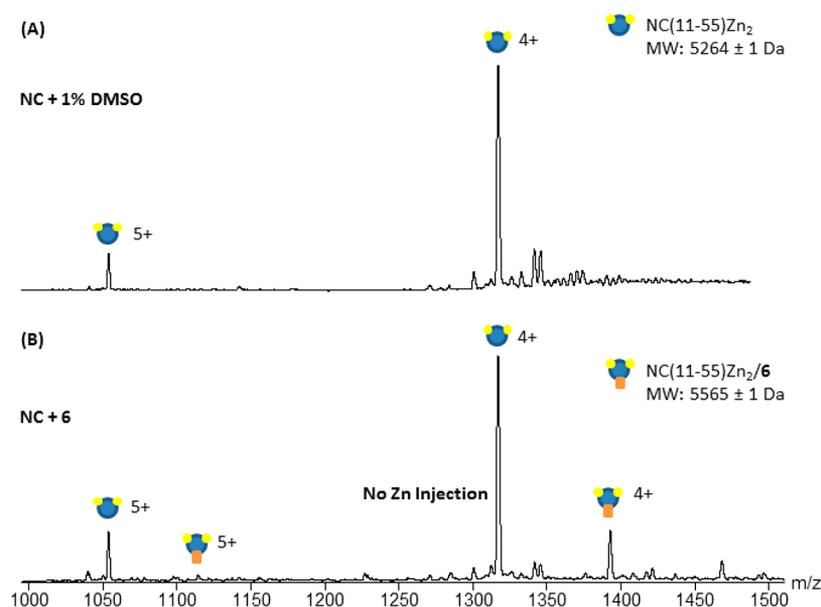
preincubated with cTAR (Figure 6-VI–VII). In contrast, when **6** was preincubated for 2 or 24 h with NC (Figure 6-IV,V), an inhibition close to 100% was already reached 15 min after the final addition of cTAR. This suggests that **6** may react in a time-dependent way with NC, in order to inhibit its cTAR destabilization activity. Taking into account the sensitivity of **6** to oxidation, the most likely explanation is that the hit may chemically react with NC, possibly after the oxidation shown in Figure 4 has occurred.

To check this hypothesis, we repeated the inhibition assay at pH 6.5, as it was previously shown that this catechol undergoes a pH-dependent auto-oxidation reaction<sup>72</sup> and stays in its fully reduced form at pH  $\leq 6.5$ . Interestingly, compound **6** tested at pH 6.5 inhibited NC destabilization activity, with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $160 \pm 20 \mu\text{M}$  (Figure 7A, black line) and showed no time-dependent inhibition (Figure 7B), indicating that the compound in its reduced form is able to inhibit the NC destabilization activity. The hit was clearly more active at pH 7.5, showing an  $\text{IC}_{50}$  value of  $36 \pm 8 \mu\text{M}$  (Figure 7A, red line) and a clear time-dependent effect (Figure 7B). Thus, oxidation of **6** may trigger a chemical reaction that further increases the inhibitory activity of the molecule against the NC.

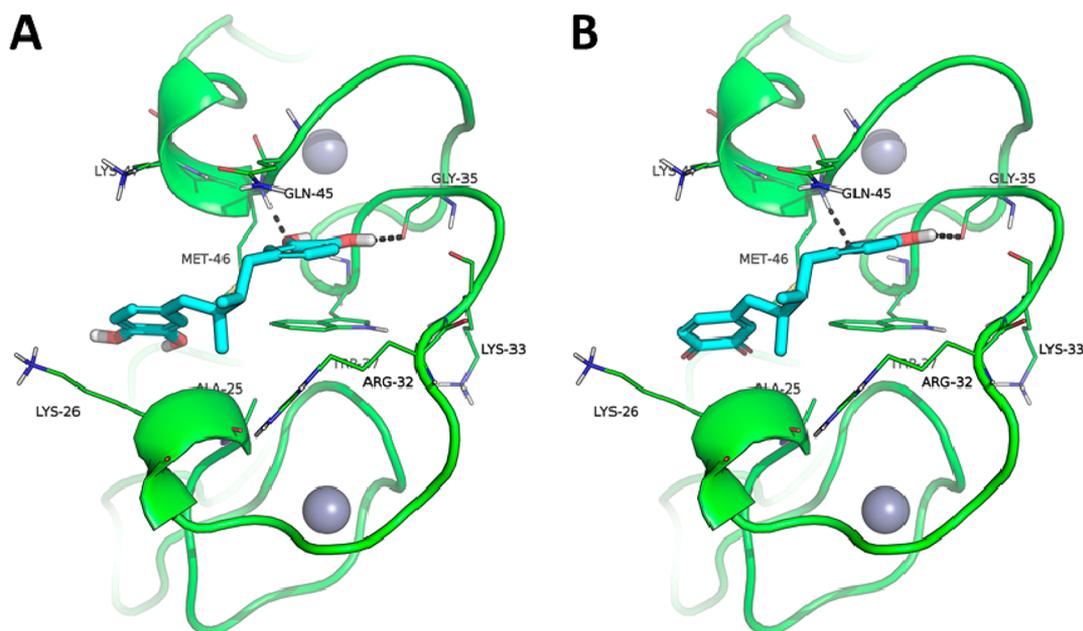
**Mass Spectrometry.** In order to confirm the formation of a complex between NC and **6**, mass spectrometry (MS) of NC(11–55) was performed in nondenaturing conditions in the presence of 1% DMSO or a 20-molar excess of **6** dissolved in 1% DMSO at pH 6.5. In the presence of 1% DMSO, the zinc-bound form of NC(11–55) was detected (Figure 8A). In the presence of 100  $\mu\text{M}$  of **6**, the NC(11–55) was detected in its free form and as a 1:1 complex with **6**, clearly confirming the ability of the molecule to bind the NC (Figure 8B). No peaks corresponding to zinc-depleted NC either in its free form or bound to **6** could be observed (Figure 8B). Moreover, no significant change in the mass spectra was observed as a function of the incubation time at this pH (data not shown), whereas incubation of the peptide with **6** overnight at pH 7.5 showed a significant degradation of the protein (Supporting Information Figure S5), confirming that a reaction between the NC and **6** occurs at pH 7.5. Comparing MS experiments (Figure SSC) with NC inhibition experiments (Figure 6) clearly suggests that the strongest NC inhibitory effect observed



**Figure 7.** Effect of pH on NC inhibition by compound **6**. (A) Inhibition of NC-induced cTAR Alexa488/Dabcyl destabilization by **6** at pH 6.5 (black line) and pH 7.5 (red line). The percentage of inhibition is plotted as a function of the hit concentration. The  $\text{IC}_{50}$  value for **6** is ( $160 \pm 20$ )  $\mu\text{M}$  at pH 6.5 and ( $36 \pm 8$ )  $\mu\text{M}$  at pH 7.5. (B) Time-dependent inhibition of NC-induced cTAR destabilization by 20  $\mu\text{M}$  **6** at pH 6.5 and 7.5. Buffers: 25 mM MES (pH 6.5), 30 mM NaCl, and 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 mM NaCl, and 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Excitation wavelength was 480 nm.



**Figure 8.** Binding of **6** to NC(11–55), as monitored by ESI-MS. Mass spectra in nondenaturing conditions of 5  $\mu$ M NC(11–55) in 50 mM AcONH<sub>4</sub> at pH 6.5 in the presence of 1% v/v DMSO (A) or in the presence of 100  $\mu$ M of **6** in 1% DMSO (B) after 2 h of incubation. Measurements were performed at 20 °C. The accelerating voltage (Vc) was fixed at 40 V, and the pressure in the first pumping stage of the instrument (Psi) was fixed to 5 mbar.



**Figure 9.** Predicted binding mode of **6** in its reduced form (A) and in the *ortho*-quinone form (B). Small molecules are shown as cyan sticks, the protein as green cartoon and lines (only residues within 5 Å from the ligands are shown and labeled). Zinc ions are shown as gray spheres. H-bonds are highlighted by black dashed lines; nonpolar H atoms are omitted. The protein is in the ligand-binding conformation as determined by NMR spectroscopy (PDB ID: 2M3Z).<sup>31</sup>

by preincubation of NC with **6** for 24 h (Figure 6-V) is attributable to chemical degradation of NC.

**Molecular Modeling.** The possible binding mode of **6** and its oxidized *ortho*-quinone form to the NC was investigated by molecular modeling. The two molecules were docked toward the hydrophobic pocket of the NC using the protocol described above. Theoretical affinity was then estimated by the Chemgauss4 function implemented in the FRED docking program.<sup>47</sup> Both species are able to establish an H-bond interaction with the backbone of Gly35 and Met46 (Figure 9),

two key residues for the interaction of nucleic acids as well as noncovalent NCIs to the NC.<sup>31,33,35,45</sup> The catechol ring seems to interact preferentially within the hydrophobic pocket by stacking between the side chains of Trp37 and Gln45 in a guanine-mimetic manner, whereas the second ring occupies the cleft that projects toward the N-terminal end of the NC. Methyl groups are docked in a hydrophobic cleft formed by Trp37 and Ala25 residues. With respect to the score, the Chemgauss4 function indicated that the *ortho*-quinone species has the highest theoretical affinity for the NC, followed by the catechol

form of **6** (Chemgauss4 score =  $-7.54$  and  $-7.06$ , respectively; the lower the score, the higher the affinity).<sup>47</sup> Overall, this molecular modeling study suggests that the most abundant species of **6** are both able to fit the hydrophobic pocket of the NC and to establish interactions with key residues.

**Compound 6 Inhibits the Replication of HIV-1 Drug Resistant Strains.** The antiviral activity of compound **6** was further evaluated against four representative HIV-1 strains resistant to drugs currently included in most of the recommended antiretroviral regimens. As shown in Table 3,

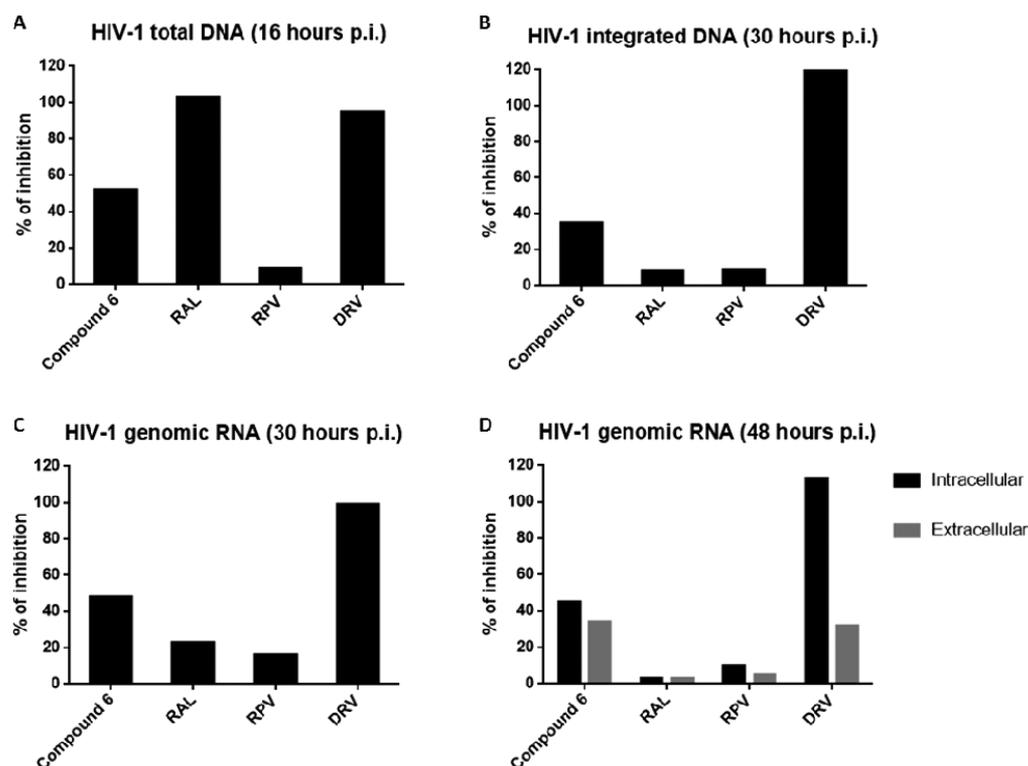
**Table 3. Antiviral Activity of Compound 6 against Viruses Harboring Mutations Conferring Resistance to Most HIV-1 Inhibitors Used in Clinical Practice**

| viral strain <sup>a</sup> | resistance mutations (HIV-1 drug target–drug class) <sup>b</sup>                               | BiCycle IC <sub>50</sub> (95% CI; $\mu$ M) | fold change <sup>c</sup> |
|---------------------------|--|--|--------------------------|
| 114                       | NL4–3 wild type strain   | 4.0 (1.4–11.9)                             |                          |
| 11808                     | 10F 11I 20T 32I 33F 35G 54V 71I 73S 84V 89V 90M (protease - PIs)                               | 7.7 (2.3–25.5)                             | 1.9                      |
| 7401                      | 41L, 67N, 184V, 210W, 215Y (reverse transcriptase - NRTIs)                                     | 2.5 (0.7–9.0)                              | 0.6                      |
| 12231                     | 103N, 181C, 179F (reverse transcriptase - NNRTIs); M41L, T215F (reverse transcriptase - NRTIs) | 2.9 (0.6–14.8)                             | 0.7                      |
| 11845                     | 140S, 148H (integrase - INIs)  | 4.5 (0.8–24.5)                             | 1.1                      |

<sup>a</sup>ARP Catalog number. <sup>b</sup>PIs: protease inhibitors; NRTIs: nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors; NNRTIs: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; INIs: integrase inhibitors. <sup>c</sup>Ratio between the IC<sub>50</sub> value of the resistant virus and the IC<sub>50</sub> value of the wild-type reference virus;

the fold change values close to 1 indicate that the mutations conferring high levels of resistance to most licensed HIV-1 inhibitors do not impair the antiviral activity of compound **6**.

**Compound 6 Impairs Both Early and Late HIV-1 Replication Steps.** The antiviral effects of **6** were evaluated through the measurement of the viral nucleic acids isoforms produced at the different steps of HIV-1 replication. Compound **6** was compared to representative licensed HIV-1 antivirals including the reverse transcriptase inhibitor rilpivirine (RPV), the integrase inhibitor raltegravir (RAL), and the protease inhibitor darunavir (DRV; Figure 10). The use of these reference compounds allows gaining insights into the virus life cycle step(s) affected by compound **6**. Indeed, RPV is expected to halt production of total HIV-1 DNA by reverse transcription, while RAL has no impact on reverse transcription but impairs the following step of HIV-1 DNA integration into the cellular genome. Finally, DRV does not block either reverse transcription or integration but interferes with the late steps of polyprotein processing and virion maturation. Although to a lesser extent compared with RPV, **6** decreased total HIV-1 DNA at 16 h postinfection, while RAL and DRV did not impair reverse transcription. This effect is consistent with the critical role of the NC in mediating highly specific and efficient reverse transcription and is fully supported by the fact that compound **6** inhibits the chaperoning functions of the NC, although it does not interfere directly with the RT.<sup>10</sup> This rate of inhibition was conserved in the following integration and provirus expression steps, as measured by quantification of integrated HIV-1 DNA and intracellular HIV-1 RNA, respectively, at 30 h postinfection, implying that no significant effects are exerted by **6** at these later stages. The comparison between the amount of



**Figure 10.** Real-time PCR quantification of HIV-1 nucleic acid species produced in the presence of **6** ( $20 \mu\text{M}$ ) or the reference compounds darunavir (DRV), rilpivirine (RPV), and raltegravir (RAL;  $2 \mu\text{M}$  each). The percent inhibition was calculated with respect to the no drug control culture. The different graphs show the effects on total HIV-1 DNA at 16 h postinfection (p.i.; A), integrated HIV-1 DNA at 30 h postinfection (B), intracellular genomic HIV-1 RNA at 30 h postinfection (C), and both intracellular and extracellular genomic HIV-1 RNA at 48 h postinfection (D).

intracellular and extracellular genomic HIV-1 RNA indicated that **6** may have a modest additional effect on the production of viral particles. However, the fairly larger IC<sub>50</sub> value obtained with the single-cycle assay compared with the BiCycle Assay (42  $\mu$ M and 4  $\mu$ M, respectively, see Table 1) indicated that **6** could significantly affect the infectivity of viral particles, since the single-cycle assay evaluates antiviral activity in the early steps of viral replication (from entry to provirus expression), while BiCycle Assay measures antiviral activity on the whole HIV-1 replication cycle. All the reference HIV-1 inhibitors yielded the expected effects throughout the experiment, corroborating the accuracy of the results.

## DISCUSSION

Despite the success of current antiretroviral therapy, HIV/AIDS is still one of the major causes of death worldwide due to an infectious agent.<sup>1,2</sup> To date, highly effective antiretroviral drugs targeting the entry of HIV-1 into the host cell, or the key viral enzymes RT, PR, or IN, have been approved in the U.S. and Europe. However, these drugs cannot eradicate HIV-1 and must be administered over a lifetime. Due to tolerability and adherence issues, individual pharmacokinetics variability, and limited drug availability in low-middle income countries, treatment failures still occur and are often associated with emergence of DR.<sup>4</sup> For these reasons, drugs acting on validated or novel targets are still needed.<sup>80</sup> In this context, the NC protein is a desirable target, because (i) it is highly conserved across HIV-1 subtypes and strains, (ii) it is involved in multiple steps of the HIV-1 life cycle, thus offering the unique opportunity to inhibit HIV-1 at different levels with a single small molecule,<sup>5</sup> and (iii) circulating clinically derived drug-resistant isolates are expected to remain susceptible to NCIs. Due to its high degree of conservation and multiple key functions, the NC is also expected to show a genetic barrier toward development of DR, an additional feature making NCIs a profitable drug class to be used either alone or in combination with existing antiretrovirals.<sup>5</sup> Unfortunately, no NCIs have reached the clinical stages of development so far.

In this context, the THINPAD consortium was established within the seventh framework programme (FP7) of the European Community, with the aim to discover and develop novel NCIs up to preclinical or clinical candidates. Starting from chemical collections available *in house* (IRBM compounds library) or from commercial vendors (ZINC database), computational screening tools were used to filter compounds endowed with suitable pharmacophoric and shape features for interacting with NC and inhibiting its chaperone functions.<sup>33,35,36,45</sup> Virtual hits were further analyzed *in vitro* by using a fluorescence assay to monitor the effective NC inhibition, while their antiretroviral activity was evaluated in cells infected with HIV-1 or nonreplicative pseudoviral particles. Two promising hits were identified, namely **6** and **7** (Table 1, Figure 1), which were able to inhibit NC *in vitro* at low micromolar concentrations and to inhibit the replication of wild-type HIV-1 strain NL4-3 in infected cells with moderate toxicity.

It is worth mentioning that **6** is nordihydroguaiaretic acid, a natural product found in the leaves and twigs of *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae).<sup>81,82</sup> This compound is known to inhibit lipoxigenases,<sup>83,84</sup> voltage-activated Ca<sup>2+</sup> or K<sup>+</sup> Kv1.5 currents,<sup>85,86</sup> and TNF $\alpha$  activation<sup>87</sup> and is well-known for its antioxidant effects as candidate therapeutics<sup>88</sup> or as an additive in fats and oils. Nordihydroguaiaretic acid (**6**, trade name:

Masoprocol) was used for the treatment of the precancerous skin growth known such as actinic keratosis until 1996, when it was withdrawn from the U.S. drug market due to high incidence of contact sensitivity and allergy reactions.<sup>89–91</sup> Although some antioxidant polyphenols have been identified previously as privileged structures to targeting the NC,<sup>40,92,93</sup> to the best of our knowledge no records linking **6** to NC inhibition have been published before. In contrast, a detailed report by Gnabre *et al.* has characterized the anti-HIV activity of **6**, showing a mechanism of action based on the specific targeting of a small region of the HIV long terminal repeat, thus preventing transcription of HIV-1 proteins and providing antiretroviral effects.<sup>94</sup> Subsequent studies have highlighted the higher efficacy of the tetra-*O*-methyl derivative of **6** as compared to the parent compound as an anti-HIV and antihuman papillomavirus (HPV) agent.<sup>95,96</sup> It is worth mentioning that the tetra-*O*-methyl derivative of **6** proved inactive in our NC inhibition assay (data not shown), which highlights the requirement of specific pharmacophores to bind the hydrophobic pocket of the NC, as already highlighted in previous studies, and further reinforces the consistency of our integrated results (see also Figure 9 for predicted binding mode).<sup>33,35</sup> In this respect, **6** contains two catechol rings that may represent the pharmacophoric moieties of the molecule, even though they are known to oxidize *in vitro* to *ortho*-quinone or *para*-quinone methide species (Figure 4).<sup>72</sup> To monitor whether this reactivity may impair NC inhibition, and to provide insights into the mechanism of action of **6**, in depth NC inhibition studies were conducted, while NMR spectroscopy and native MS spectrometry were used to monitor the chemical stability of **6** and its interaction with the NC. These studies indicate that the predominant form of **6** at pH 6.5 is the catechol species, which is able to bind specifically to NC and provide NC inhibition without promoting zinc ejection (Figure 8). At pH 7.5, the *ortho*-quinone species becomes predominant and provides a more potent inhibition of the NC, with a time-dependent mechanism (Figures 6 and 7). After a long incubation time (overnight), **6** was able to degrade the protein, thus suggesting that the oxidized form of **6** is highly reactive and chemically modifies the NC (Supporting Information Figure S5). Overall, these results point to a novel mechanism of action, never identified before for NCIs.

In previous works, the antioxidant effects of **6** and its derivatives and their ability to impair the replication of HIV and HPV by interacting with nucleic acids have been described.<sup>94–96</sup> Here, we clearly show that, among the multiple and generally unpredictable molecular effects that a polyphenol compound may provide, and besides targeting the HIV long terminal repeat,<sup>94</sup> **6** is certainly able to target the HIV-1 NC by specific and noncovalent binding.

Experiments performed to investigate the mechanism of action of **6** based on quantification of the different HIV-1 nucleic acids and encompassing from reverse transcription to virus release, suggested that the molecule may impair reverse transcription and additionally decrease the infectivity of the viral particles generated, as previously described for other investigational NCIs.<sup>38</sup> Overall, our data point to a novel mechanism of action targeting multiple steps of the virus life cycle not currently targeted by available antiretroviral drugs. Most notably this mechanism of action, coupled with effects reported above, is responsible for inhibiting the replication of NRTI-, NNRTI-, PI-, and INI-resistant HIV-1 strains, showing

comparable  $IC_{50}$  values with respect to the reference wild type virus, as expected for ideal NCI (Table 3).

Taken together, these results represent a noticeable step forward in the development of NCIs<sup>33–35</sup> and in assessing the druggability of the NC.<sup>5</sup>

## CONCLUSION

In this study, we applied a computational structure-based screening to identify novel chemotypes of NCIs. The most promising compound, the natural product nordihydroguaiaretic acid **6**, was further investigated to understand its mechanism of action at a molecular level. First among NCIs, this compound showed a dual mechanism of action with a specific recognition of NC protein, followed by its oxidation, that results in a potent chemical inactivation of NC. Being active against both wild-type and drug-resistant HIV-1 strains and showing a moderate cytotoxicity, compound **6** appears to be promising in terms of future optimization. The scaffold of **6** is considered to be important for the interaction with NC and its inhibition by means of a new mechanism of action. On the other hand, the catechol moiety should be avoided in the future in order to limit possible oxidation reactions, and development of this chemotype up to a preclinical candidate will obviously require additional design, synthesis, and testing efforts. Therefore, also considering that compound **6** is commercially available, it appears as a profitable tool to achieve pharmacological inhibition of the NC *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

**General Computational Modeling Directions.** Ligands were downloaded from the ZINC database ([zinc.docking.org](http://zinc.docking.org)) or were retrieved in three-dimensional format from the IRBM proprietary library. A drug-like filter was applied using the Filter program from OpenEye, version 2.5.1.4.<sup>97</sup> Virtual screening was then performed by following the cascade already described,<sup>35</sup> except for molecular docking that was carried out with FRED, version 3.0.1, from OpenEye.<sup>48</sup> Ligand conformational analysis that is required for docking with FRED was performed with Omega2, version 2.5.1.4,<sup>98</sup> by saving up to 600 conformers for each molecule, including the initial conformation, and keeping all other parameters at their default value. During molecular docking against all three selected NC receptor structures, only the best docking pose of molecules that establish H-bond interaction with the carbonyl oxygen atom of G35 residue was stored. Molecules were ranked according to the Chemgauss4 score calculated by FRED.

**Inhibition of NC(11–55)-Induced cTAR Destabilization.** The doubly labeled cTAR DNA oligonucleotides (55nt) were synthesized and purified by IBA GmbH Nucleic Acids Product Supply (Göttingen, Germany). The 5' terminus of cTAR was labeled with 6-carboxyrhodamine (Rh6G) or Alexa 488, and the 3' terminus was labeled with 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid (Dabcyl). Extinction coefficients at 260 nm of 577 530  $M^{-1} cm^{-1}$  and 573 240  $M^{-1} cm^{-1}$  were used to determine the concentration of cTAR Rh6G/Dabcyl and cTAR Alexa 488/Dabcyl, respectively.

The NC(11–55) peptide was synthesized by solid-phase peptide synthesis on a 433A synthesizer (ABI, Foster City, CA) as previously described.<sup>99</sup> The peptide was stored lyophilized and was resuspended in water before use. The concentration of peptide was determined by using an extinction coefficient of 5700  $M^{-1} cm^{-1}$  at 280 nm. To obtain the zinc-bound protein, 2.5 mol equiv of  $ZnSO_4$  were added, and pH was raised to its final value by adding buffer.

All experiments were performed at 20 °C in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 mM NaCl, and 0.2 mM  $MgCl_2$ . To evaluate the inhibition activity of compounds on NC-induced cTAR destabilization in our screening assay, cTAR DNA (0.1  $\mu M$ ) was preincubated with 1  $\mu M$  NC(11–55) (molar ratio NC/cTAR = 10:1) for 15 min at room

temperature before addition of a compound. In the first screening round, all compounds were tested at two final concentrations, 10  $\mu M$  and 100  $\mu M$ . For the  $IC_{50}$  determination, inhibition of NC-induced cTAR melting was monitored through addition of increasing concentrations of the selected molecules to the preformed NC(11–55)-cTAR complex. After the addition of compound, the mixture was incubated for 15 min at RT before the reading. The fluorescence signal was recorded at 20 °C with a plate reader Xenius (SAFAS Monaco) or Fluoromax 3 spectrofluorometer (Horiba Jobin-Yvon). The excitation and emission wavelengths were fixed at 500 and 555 nm for cTAR Rh6G/Dabcyl and 480 and 520 nm for cTAR Alexa 488/Dabcyl, respectively. In plate measurements, we systematically explored the possible time dependence of the inhibition, by measuring the fluorescence intensity 15, 30, and 60 min after mixing. The spectra were corrected for dilution, buffer fluorescence, and screening effect due to the absorption of compound. In order to check the occurrence of aggregation, we performed an additional absorption measurement with the plate reader Xenius (SAFAS Monaco) or Cary 4000 spectrophotometer (Agilent). Each experiment was performed at least in duplicate.

**BiCycle Assay.** The antiviral activity of candidate NCIs was evaluated with a phenotypic assay, named BiCycle assay, consisting of a first round of infection of the T-cell line MT-2 using replication-competent HIV-1 strains, followed by a second round of infection of the reporter cell line TZM-bl.<sup>100</sup> MT-2 cells were seeded at a concentration of 50 000 cells/well in a 96-well plate and infected with the reference strain NL4–3 or selected NRTI-, NNRTI-, PI-, and INI-resistant strains in the presence of 4-fold dilutions of the compounds. After 48 h, 50  $\mu L$  of supernatant from each well, containing the virus produced in the first round of infection, was used to infect TZM-bl cells seeded in a 96-well plate at a concentration of 30 000 cells/well. Two days later, cells were lysed, adding 40  $\mu L$  of Glo Lysis Buffer (Promega) in each well for 5 min, then 40  $\mu L$  of Bright-Glo Luciferase Reagent (Promega) was added to each well for relative luminescence units (RLU) counting using the Glo-Max Multi Detection System (Promega). Experiments were repeated twice, and RLU values from each well were elaborated using the GraphPad v5.0 software to calculate the  $IC_{50}$  value of each compound and the relative 95% confidence intervals. All cell lines and viral strains were obtained from the NIH AIDS Reagent Program (ARP; <https://www.aidsreagent.org/>).

**Single-Cycle Assay.** VSV-G pseudotyped nonreplicative lentiviral particles harboring a luciferase gene reporter of the infection were produced in 293T cells.<sup>101</sup> The particles were used to infect HeLa cells in the presence of different concentrations of the tested compounds as described in detail elsewhere.<sup>101</sup> Twenty-four hours after infection, cells were washed and lysed with Passive Lysis Buffer (Promega) supplemented with 0.5% Triton X-100 for 30 min under constant shaking. Then, luciferase activity was measured for 10 s in a luminometer (Tristar 2 Multimode reader LB 942, Berthold) after injection of 50  $\mu L$  of luciferine reagent (25 mM Tricine Buffer at pH 7.8, 0.5 mM EDTA at pH 7.9, 5 mM  $MgSO_4$ , 5 mM DTT, 0.5 mM ATP, 1.65 mM D-luciferin sodium salt, and 0.325 mM Coenzyme A Sodium Salt hydrate). For each concentration of tested compound, the percentages of inhibition and half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) were determined.

**Mechanism of Action in Cells.** MT-2 cells were infected with the HIV-1 reference strain NL4–3 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 in the presence of compound **6** (20  $\mu M$ ) or reference compounds darunavir (DRV), rilpivirine (RPV), or raltegravir (RAL; 2  $\mu M$  each). Total cell associated HIV-1 DNA and RNA were extracted from MT-2 cells through the “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche) following the manufacturer's instructions. Total HIV-1 DNA was quantified through a quantitative real time PCR targeting a highly conserved region within the HIV-1 LTR and normalized on a beta-globin standard curve then expressed as copies per million cells.<sup>102</sup> Integrated HIV-1 DNA was first amplified through an Alu-PCR protocol followed by the quantification of Alu-Gag amplicons through the same quantitative real time PCR used for total HIV-1 DNA. Extracellular viral genomic RNA was extracted through the EZ1

Advanced XL automated system (Qiagen) and the quantification of both extracellular and intracellular viral RNA was performed as previously described.<sup>103</sup>

**Determination of Cytotoxicity of the Compounds.** Peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy donors were stimulated with phytohemagglutinin (Sigma) and interleukin-2 (Miltenyi Biotec) and treated with different concentrations of the NC inhibitors. After 7 days, the cytotoxicity was measured through both Trypan blue (exclusion dye; Gibco) staining and MTS assay (Promega).

In the Trypan blue assay, the dye enters dead cells through their compromised cell membranes and colors them blue. Live cells are counted at the microscope using a hemocytometer. MTS assay is a colorimetric assay for assessing cell viability. NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase enzymes reflect the number of viable cells present in the cell culture. These enzymes are capable of reducing the tetrazolium dye MTS into formazan. The absorbance of the colored solution was quantified through an ELISA reader (Infinite F50, Tecan).

Cytotoxicity in MT-2 cells was determined by using the CellTiter-Glo 2.0 assay (Promega). MT-2 cells were seeded at 50 000 cells/well in duplicate in the presence of serial 2-fold dilutions of compound **6** (range 400–3.125  $\mu\text{M}$ ) and incubated for 72 h. Cell viability was calculated by measuring cellular ATP as a marker of metabolically active cells through a luciferase based chemical reaction.

In all assays, the viability was expressed as a percentage of alive cells compared to the untreated control, indicated as 100%.  $\text{TD}_{50}$ , Toxic Dose 50%, was calculated (concentration that kills 50% of cells).

**Apoptosis Induction.** Peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy donors were stimulated with phytohemagglutinin and interleukin-2 and treated with different concentrations of the compounds. After 7 days, to study the effect of the compounds on apoptosis, cells were stained for 15 min with Annexin-V and 7-AAD (7-aminoactinomycin D; all reagents from Becton Dickinson) and then analyzed with BD FACS Canto II in order to determine the percentage of early (cells reactive to Annexin-V alone), late (cells reactive to Annexin-V and 7-AAD), and total (early plus late) apoptotic events.

**Determination of Mitochondrial Toxicity.** BxPC-3, a human pancreatic adenocarcinoma cell line (ATCC, Manassas, Virginia, USA), was cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mol/L L-glutamine, 50 U/mL penicillin, and 50 mg  $\text{mL}^{-1}$  streptomycin (all from Gibco Life Technologies, Glasgow, UK), referred to as complete media (CM), in a 6-well plate (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA) at a concentration of  $2.5 \times 10^5$  cells/mL, in the presence of different concentrations of NCs. At day 7, cultured cells were split, counted, and replated with drugs. At day 14, cells were harvested and stained with the lipophilic cationic probe JC-1 (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA). Briefly, JC-1 is a lipophilic carbocyanine that exists in a monomeric form and is able to accumulate in mitochondria. In the presence of a high membrane potential, JC-1 can reversibly form aggregates that, after excitation at 488 nm, emit in the orange/red channel (namely, in the FL2 channel of commonly used flow cytometers). Monomers emit in the green channel (FL1). A collapse in membrane potential provokes a decrease in the number of JC-1 aggregates (revealed by a decrease in FL2) and a consequent increase of monomers (an increase in FL1). BxPC-3 cells were stained by adding 10 mmol/L JC-1 and were then incubated for 15 min in the dark. Within 30 min after staining, cells were analyzed using a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman-Coulter, Milan, Italy). Analysis of the flow-cytometry data was performed first by transforming the obtained results from logarithmic into linear scale and then by calculating the ratio of the median fluorescence intensity in FL2 divided by the median fluorescence in FL1. Cells obtained from the untreated sample were the negative control. Cells exposed for 5 min at RT to the mitochondrial toxicity-inducing agent valinomycin (500 nmol/L) represented the positive control. Maximal toxicity was measured in the positive control. The mitochondrial toxicity index (MTI) was calculated as the percentage change from 0 (negative

control, untreated samples) to 100 (maximal toxicity, valinomycin treated samples). Values below 0 were considered to be equal to 0.

**NMR Spectroscopy.** NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DPX400 spectrometer at 400 MHz for  $^1\text{H}$  NMR. Chemical shifts of protons are reported in parts per million ( $\delta$  scale) and internally referenced to the DMSO- $d_6$  signal at 2.50 ppm, or to the  $\text{D}_2\text{O}$  signal at 4.79 ppm. All commercially available chemicals were used as purchased without further purification.  $\text{D}_2\text{O}$  was purchased from Euriso-top (99.90%D). **6** was dissolved in Tris, NaCl, and  $\text{MgCl}_2$  buffer at pH 7.5 that is also used for NC inhibition assays *in vitro*.  $\text{D}_2\text{O}$  was further added to the solution of **6** in a buffer, up to a final concentration of 200  $\mu\text{M}$ . Then, the  $^1\text{H}$  NMR spectra of the sample were recorded at 400 MHz at multiple time points, namely,  $t = 0, 24, 48, 72, 96,$  and 120 h.

**Mass Spectrometry.** Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis was performed in the positive ion mode on an electrospray time-of-flight mass spectrometer (LCT, Waters, Manchester, UK) equipped with an automated nanoESI source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY). Calibration of the instrument was performed using a 2  $\mu\text{M}$  horse heart myoglobin solution prepared in a mixture of water/acetonitrile (1:1) acidified with 1% formic acid. MS data were acquired and analyzed using the MassLynx 4.1 software (Waters, Manchester, UK).

For native mass spectrometry experiments, NC(11–55) was prepared in water with 2 mol equiv of  $\text{ZnSO}_4$  and the concentration was measured using an extinction coefficient of  $5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 280 nm. Before use, the protein was buffered with 50 mM ammonium acetate ( $\text{AcONH}_4$ ) at pH 6.5 or at pH 7.5. In order to avoid the dissociation of noncovalent bonds, the analyses under nondenaturing conditions were carried out with an accelerating voltage (Vc) from 5 to 40 V, and the pressure in the first pumping stage (backing pressure) of the instrument was fixed to 5 mbar. NC(11–55) protein (5  $\mu\text{M}$ ) was incubated with 100  $\mu\text{M}$  of **6** (20-fold excess, 1% of DMSO v/v in the final volume) at 20  $^\circ\text{C}$  for different periods of time, from 0 min until overnight, before recording the mass spectra. The ligand solution in DMSO was freshly prepared before measurements.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acchembio.7b00907.

Main features of the IRBM proprietary library; additional data on mitochondrial toxicity; color of the solutions of compound **6**; MS spectra of NC(11–55) + compound **6** at pH = 7.5 (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*Phone: +39 0691093680. Fax: +39 0691093654. E-mail: v.summa@irbm.it.

\*Phone: +39 0577234306. Fax: +39 0577234303. E-mail: botta.maurizio@gmail.com.

\*Phone: +33 368854263. Fax: +33 368854313. E-mail: yves.mely@unistra.fr.

### ORCID

Mattia Mori: 0000-0003-2398-1254

Francesco Saladini: 0000-0002-9934-377X

Sarah Cianfèrani: 0000-0003-4013-4129

Yves Mely: 0000-0001-7328-8269

Maurizio Botta: 0000-0003-0456-6995

### Author Contributions

◆ Authors equally contributed to this work

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This project has received funding from the European Union's Seventh Programme for research, technological development, and demonstration under grant agreement no. 601969. The authors wish to thank the OpenEye Free Academic Licensing Program for providing a free academic license for molecular modeling and cheminformatics software. T.B. acknowledges the Institut de Recherche Servier for funding of his Ph.D.

## REFERENCES

- (1) <http://www.unaids.org> (accessed on October 2017).
- (2) Mehellou, Y., and De Clercq, E. (2010) Twenty-Six Years of Anti-HIV Drug Discovery: Where Do We Stand and Where Do We Go? *J. Med. Chem.* 53, 521–38.
- (3) Olender, S. A., Taylor, B. S., Wong, M., and Wilkin, T. J. (2015) Croi 2015: Advances in Antiretroviral Therapy. *Top Antivir Med.* 23, 28–45.
- (4) <http://www.who.int/HIV/topics/drugresistance/hivresnet/en> (accessed on October 2017).
- (5) Mori, M., Kovalenko, L., Lyonais, S., Antaki, D., Torbett, B. E., Botta, M., Mirambeau, G., and Mely, Y. (2015) Nucleocapsid Protein: A Desirable Target for Future Therapies against HIV-1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 389, 53–92.
- (6) Rein, A., Henderson, L. E., and Levin, J. G. (1998) Nucleic-Acid-Chaperone Activity of Retroviral Nucleocapsid Proteins: Significance for Viral Replication. *Trends Biochem. Sci.* 23, 297–301.
- (7) Levin, J. G., Guo, J., Rouzina, L., and Musier-Forsyth, K. (2005) Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein: Critical Role in Reverse Transcription and Molecular Mechanism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 80, 217–286.
- (8) Godet, J., and Mely, Y. (2010) Biophysical Studies of the Nucleic Acid Chaperone Properties of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *RNA Biol.* 7, 687–99.
- (9) Darlix, J. L., Godet, J., Ivanyi-Nagy, R., Fosse, P., Mauffret, O., and Mely, Y. (2011) Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *J. Mol. Biol.* 410, 565–81.
- (10) Levin, J. G., Mitra, M., Mascarenhas, A., and Musier-Forsyth, K. (2010) Role of HIV-1 Nucleocapsid Protein in HIV-1 Reverse Transcription. *RNA Biol.* 7, 754–74.
- (11) Darlix, J. L., Garrido, J. L., Morellet, N., Mely, Y., and de Rocquigny, H. (2007) Properties, Functions, and Drug Targeting of the Multifunctional Nucleocapsid Protein of the Human Immunodeficiency Virus. *Adv. Pharmacol.* 55, 299–346.
- (12) Muriaux, D., and Darlix, J. L. (2010) Properties and Functions of the Nucleocapsid Protein in Virus Assembly. *RNA Biol.* 7, 744–53.
- (13) Rein, A. (2010) Nucleic Acid Chaperone Activity of Retroviral Gag Proteins. *RNA Biol.* 7, 700–5.
- (14) D'Souza, V., and Summers, M. F. (2005) How Retroviruses Select Their Genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 643–655.
- (15) Lu, K., Heng, X., and Summers, M. F. (2011) Structural Determinants and Mechanism of HIV-1 Genome Packaging. *J. Mol. Biol.* 410, 609–633.
- (16) Keane, S. C., and Summers, M. F. (2016) Nmr Studies of the Structure and Function of the HIV-1 5-Leader. *Viruses* 8, 338.
- (17) Aldovini, A., and Young, R. A. (1990) Mutations of Rna and Protein Sequences Involved in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Packaging Result in Production of Noninfectious Virus. *J. Virol* 64, 1920–6.
- (18) Demene, H., Dong, C. Z., Ottmann, M., Rouyez, M. C., Jullian, N., Morellet, N., Mely, Y., Darlix, J. L., Fournie-Zaluski, M. C., Saragosti, S., et al. (1994) 1h Nmr Structure and Biological Studies of the His23→Cys Mutant Nucleocapsid Protein of HIV-1 Indicate That the Conformation of the First Zinc Finger Is Critical for Virus Infectivity. *Biochemistry* 33, 11707–11716.
- (19) Gorelick, R. J., Benveniste, R. E., Gagliardi, T. D., Wiltout, T. A., Busch, L. K., Bosche, W. J., Coren, L. V., Lifson, J. D., Bradley, P. J., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (1999) Nucleocapsid Protein Zinc-Finger Mutants of Simian Immunodeficiency Virus Strain Mne Produce Virions That Are Replication Defective in Vitro and in Vivo. *Virology* 253, 259–70.
- (20) Gorelick, R. J., Fu, W., Gagliardi, T. D., Bosche, W. J., Rein, A., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (1999) Characterization of the Block in Replication of Nucleocapsid Protein Zinc Finger Mutants from Moloney Murine Leukemia Virus. *J. Virol* 73, 8185–8195.
- (21) Gorelick, R. J., Nigida, S. M., Jr., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., Henderson, L. E., and Rein, A. (1990) Noninfectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutants Deficient in Genomic Rna. *J. Virol* 64, 3207–3211.
- (22) Wu, H., Mitra, M., McCauley, M. J., Thomas, J. A., Rouzina, L., Musier-Forsyth, K., Williams, M. C., and Gorelick, R. J. (2013) Aromatic Residue Mutations Reveal Direct Correlation between HIV-1 Nucleocapsid Protein's Nucleic Acid Chaperone Activity and Retroviral Replication. *Virus Res.* 171, 263.
- (23) Dorfman, T., Luban, J., Goff, S. P., Haseltine, W. A., and Gottlinger, H. G. (1993) Mapping of Functionally Important Residues of a Cysteine-Histidine Box in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein. *J. Virol* 67, 6159–6169.
- (24) Ottmann, M., Gabus, C., and Darlix, J. L. (1995) The Central Globular Domain of the Nucleocapsid Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Critical for Virion Structure and Infectivity. *J. Virol* 69, 1778–84.
- (25) Rice, W. G., Schaeffer, C. A., Harten, B., Villingier, F., South, T. L., Summers, M. F., Henderson, L. E., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., McDougal, J. S., et al. (1993) Inhibition of HIV-1 Infectivity by Zinc-Ejecting Aromatic C-Nitroso Compounds. *Nature* 361, 473–5.
- (26) Hartman, T. L., Yang, L., Helfrick, A. N., Hassink, M., Shank, N. I., George Rosenker, K., Scerba, M. T., Saha, M., Hughes, E., Wang, A. Q., Xu, X., Gupta, P., Buckheit, R. W., Jr., and Appella, D. H. (2016) Preclinical Evaluation of a Mercaptobenzamide and Its Prodrug for Ncp7-Targeted Inhibition of Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Res.* 134, 216–225.
- (27) Yang, Y., Zhu, J. Y., Hassink, M., Jenkins, L. M. M., Wan, Y. M., Appella, D. H., Xu, J. Q., Appella, E., and Zhang, X. Y. (2017) A Novel Preventive Strategy against HIV-1 Infection: Combinatorial Use of Inhibitors Targeting the Nucleocapsid and Fusion Proteins. *Emerging Microbes Infect.* 6, e40.
- (28) Avilov, S. V., Boudier, C., Gottikh, M., Darlix, J. L., and Mely, Y. (2012) Characterization of the Inhibition Mechanism of HIV-1 Nucleocapsid Protein Chaperone Activities by Methylated Oligoribonucleotides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1010–8.
- (29) Breuer, S., Chang, M. W., Yuan, J., and Torbett, B. E. (2012) Identification of HIV-1 Inhibitors Targeting the Nucleocapsid Protein. *J. Med. Chem.* 55, 4968–77.
- (30) Goldschmidt, V. M. J. L.M., de Rocquigny, H., Darlix, J. L., Mely, Y., and Miller Jenkins, L. M. (2010) The Nucleocapsid Protein of HIV-1 as a Promising Therapeutic Target for Antiviral Drugs. *HIV Ther.* 4, 179–198.
- (31) Goudreau, N., Hucke, O., Faucher, A. M., Grand-Maitre, C., Lepage, O., Bonneau, P. R., Mason, S. W., and Titolo, S. (2013) Discovery and Structural Characterization of a New Inhibitor Series of HIV-1 Nucleocapsid Function: Nmr Solution Structure Determination of a Ternary Complex Involving a 2:1 Inhibitor/Nc Stoichiometry. *J. Mol. Biol.* 425, 1982–98.
- (32) Grigorov, B., Bocquin, A., Gabus, C., Avilov, S., Mely, Y., Agopian, A., Divita, G., Gottikh, M., Witvrouw, M., and Darlix, J. L. (2011) Identification of a Methylated Oligoribonucleotide as a Potent Inhibitor of HIV-1 Reverse Transcription Complex. *Nucleic Acids Res.* 39, 5586–96.
- (33) Mori, M., Manetti, F., and Botta, M. (2011) Predicting the Binding Mode of Known Ncp7 Inhibitors to Facilitate the Design of Novel Modulators. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 446–54.
- (34) Mori, M., Nucci, A., Lang, M. C., Humbert, N., Boudier, C., Debaene, F., Sanglier-Cianferani, S., Catala, M., Schult-Dietrich, P., Dietrich, U., Tisne, C., Mely, Y., and Botta, M. (2014) Functional and Structural Characterization of 2-Amino-4-Phenylthiazole Inhibitors of the HIV-1 Nucleocapsid Protein with Antiviral Activity. *ACS Chem. Biol.* 9, 1950–5.

- (35) Mori, M., Schult-Dietrich, P., Szafarowicz, B., Humbert, N., Debaene, F., Sanglier-Cianferani, S., Dietrich, U., Mely, Y., and Botta, M. (2012) Use of Virtual Screening for Discovering Antiretroviral Compounds Interacting with the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Virus Res.* 169, 377–87.
- (36) Shvadchak, V., Sanglier, S., Rocle, S., Villa, P., Haiech, J., Hibert, M., Van Dorselaer, A., Mely, Y., and de Rocquigny, H. (2009) Identification by High Throughput Screening of Small Compounds Inhibiting the Nucleic Acid Destabilization Activity of the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Biochimie* 91, 916–23.
- (37) Strizhak, A. V., Postupalenko, V. Y., Shvadchak, V. V., Morellet, N., Guttet, E., Pivovarenko, V. G., Klymchenko, A. S., and Mely, Y. (2012) Two-Color Fluorescent L-Amino Acid Mimic of Tryptophan for Probing Peptide-Nucleic Acid Complexes. *Bioconjugate Chem.* 23, 2434.
- (38) Kim, M. J., Kim, S. H., Park, J. A., Yu, K. L., Jang, S. I., Kim, B. S., Lee, E. S., and You, J. C. (2015) Identification and Characterization of a New Type of Inhibitor against the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Nucleocapsid Protein. *Retrovirology* 12, 90.
- (39) Spell, S. R., Mangrum, J. B., Peterson, E. J., Fabris, D., Ptak, R., and Farrell, N. P. (2017) Au(Iii) Compounds as HIV Nucleocapsid Protein (Ncp7)-Nucleic Acid Antagonists. *Chem. Commun.* 53, 91–94.
- (40) Susic, A., Cappellini, M., Sinigaglia, L., Jacquet, R., Deffieux, D., Fabris, D., Quideau, S., and Gatto, B. (2015) Polyphenolic C-Glucosidic Ellagitannins Present in Oak-Aged Wine Inhibit HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Tetrahedron* 71, 3020–3026.
- (41) Oprea, T. I. (2000) Property Distribution of Drug-Related Chemical Databases. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 14, 251–64.
- (42) Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S., and Coleman, R. G. (2012) Zinc: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 1757–68.
- (43) *Qikprop*, version 3.4, (2011) Schrödinger, Llc, New York.
- (44) De Guzman, R. N., Wu, Z. R., Stalling, C. C., Pappalardo, L., Borer, P. N., and Summers, M. F. (1998) Structure of the HIV-1 Nucleocapsid Protein Bound to the Sl3 Psi-Rna Recognition Element. *Science* 279, 384–388.
- (45) Mori, M., Dietrich, U., Manetti, F., and Botta, M. (2010) Molecular Dynamics and Dft Study on HIV-1 Nucleocapsid Protein-7 in Complex with Viral Genome. *J. Chem. Inf. Model.* 50, 638–50.
- (46) Bourbigot, S., Ramalanjaona, N., Boudier, C., Salgado, G. F. J., Roques, B. P., Mely, Y., Bouaziz, S., and Morellet, N. (2008) How the HIV-1 Nucleocapsid Protein Binds and Destabilises the (–)Primer Binding Site During Reverse Transcription. *J. Mol. Biol.* 383, 1112–1128.
- (47) McGann, M. (2011) Fred Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 578–96.
- (48) *Fred 3.0.1*, Openeye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com> (accessed on October 2017).
- (49) Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., and Taylor, R. D. (2003) Improved Protein-Ligand Docking Using Gold. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 52, 609–23.
- (50) Stahl, M., and Mauser, H. (2005) Database Clustering with a Combination of Fingerprint and Maximum Common Substructure Methods. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 542–8.
- (51) Azoulay, J., Clamme, J. P., Darlix, J. L., Roques, B. P., and Mely, Y. (2003) Destabilization of the HIV-1 Complementary Sequence of Tar by the Nucleocapsid Protein through Activation of Conformational Fluctuations. *J. Mol. Biol.* 326, 691–700.
- (52) Beltz, H., Azoulay, J., Bernacchi, S., Clamme, J. P., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J. L., and Mely, Y. (2003) Impact of the Terminal Bulges of HIV-1 Ctar DNA on Its Stability and the Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein Ncp7. *J. Mol. Biol.* 328, 95–108.
- (53) Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B. P., Darlix, J. L., and Mely, Y. (2002) HIV-1 Nucleocapsid Protein Activates Transient Melting of Least Stable Parts of the Secondary Structure of Tar and Its Complementary Sequence. *J. Mol. Biol.* 317, 385–99.
- (54) Shvadchak, V. V., Klymchenko, A. S., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2009) Sensing Peptide-Oligonucleotide Interactions by a Two-Color Fluorescence Label: Application to the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Nucleic Acids Res.* 37, e25.
- (55) Darlix, J. L., Vincent, A., Gabus, C., de Rocquigny, H., and Roques, B. (1993) Trans-Activation of the 5' to 3' Viral DNA Strand Transfer by Nucleocapsid Protein During Reverse Transcription of HIV1 Rna. *C R Acad. Sci. III* 316, 763–771.
- (56) Rodriguez-Rodriguez, L., Tsuchihashi, Z., Fuentes, G. M., Bambara, R. A., and Fay, P. J. (1995) Influence of Human Immunodeficiency Virus Nucleocapsid Protein on Synthesis and Strand Transfer by the Reverse Transcriptase in Vitro. *J. Biol. Chem.* 270, 15005–15011.
- (57) Lapadat-Tapolsky, M., Gabus, C., Rau, M., and Darlix, J. L. (1997) Possible Roles of HIV-1 Nucleocapsid Protein in the Specificity of Proviral DNA Synthesis and in Its Variability. *J. Mol. Biol.* 268, 250–60.
- (58) Guo, J., Henderson, L. E., Bess, J., Kane, B., and Levin, J. G. (1997) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein Promotes Efficient Strand Transfer and Specific Viral DNA Synthesis by Inhibiting Tar-Dependent Self-Priming from Minus-Strand Strong-Stop DNA. *J. Virol* 71, 5178–5188.
- (59) Williams, M. C., Rouzina, I., Wenner, J. R., Gorelick, R. J., Musier-Forsyth, K., and Bloomfield, V. A. (2001) Mechanism for Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein Revealed by Single Molecule Stretching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6121–6.
- (60) Hong, M. K., Harbron, E. J., O'Connor, D. B., Guo, J., Barbara, P. F., Levin, J. G., and Musier-Forsyth, K. (2003) Nucleic Acid Conformational Changes Essential for HIV-1 Nucleocapsid Protein-Mediated Inhibition of Self-Priming in Minus-Strand Transfer. *J. Mol. Biol.* 325, 1–10.
- (61) Heilman-Miller, S. L., Wu, T., and Levin, J. G. (2004) Alteration of Nucleic Acid Structure and Stability Modulates the Efficiency of Minus-Strand Transfer Mediated by the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *J. Biol. Chem.* 279, 44154–65.
- (62) Beltz, H., Clauss, C., Piemont, E., Ficheux, D., Gorelick, R. J., Roques, B., Gabus, C., Darlix, J. L., de Rocquigny, H., and Mely, Y. (2005) Structural Determinants of HIV-1 Nucleocapsid Protein for Ctar DNA Binding and Destabilization, and Correlation with Inhibition of Self-Primed DNA Synthesis. *J. Mol. Biol.* 348, 1113–26.
- (63) Guo, J., Wu, T., Anderson, J., Kane, B. F., Johnson, D. G., Gorelick, R. J., Henderson, L. E., and Levin, J. G. (2000) Zinc Finger Structures in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein Facilitate Efficient Minus- and Plus-Strand Transfer. *J. Virol* 74, 8980–8.
- (64) Guo, J., Wu, T., Kane, B. F., Johnson, D. G., Henderson, L. E., Gorelick, R. J., and Levin, J. G. (2002) Subtle Alterations of the Native Zinc Finger Structures Have Dramatic Effects on the Nucleic Acid Chaperone Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein. *J. Virol* 76, 4370–8.
- (65) Williams, M. C., Gorelick, R. J., and Musier-Forsyth, K. (2002) Specific Zinc-Finger Architecture Required for HIV-1 Nucleocapsid Protein's Nucleic Acid Chaperone Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8614–9.
- (66) Bernacchi, S., and Mely, Y. (2001) Exciton Interaction in Molecular Beacons: A Sensitive Sensor for Short Range Modifications of the Nucleic Acid Structure. *Nucleic Acids Res.* 29, 62e–62.
- (67) Tummino, P. J., Harvey, P. J., McQuade, T., Domagala, J., Gogliotti, R., Sanchez, J., Song, Y., and Hupe, D. (1997) The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Nucleocapsid Protein Zinc Ejection Activity of Disulfide Benzamides and Benzisothiazolones: Correlation with Anti-HIV and Virucidal Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 394–400.
- (68) Turpin, J. A., Song, Y. S., Inman, J. K., Huang, M. J., Wallqvist, A., Maynard, A., Covell, D. G., Rice, W. G., and Appella, E. (1999) Synthesis and Biological Properties of Novel Pyridinioalkanoyl Thioesters (Pate) as Anti-Hiv-1 Agents That Target the Viral Nucleocapsid Protein Zinc Fingers. *J. Med. Chem.* 42, 67–86.
- (69) Sharmeen, L., McQuade, T., Heldsinger, A., Gogliotti, R., Domagala, J., and Gracheck, S. (2001) Inhibition of the Early Phase of

- HIV Replication by an Isothiazolone, Pd 161374. *Antiviral Res.* 49, 101–14.
- (70) Loo, J. A., Holler, T. P., Sanchez, J., Gogliotti, R., Maloney, L., and Reily, M. D. (1996) Biophysical Characterization of Zinc Ejection from HIV Nucleocapsid Protein by Anti-HIV 2,2'-Dithiobis-[Benzamides] and Benzisothiazolones. *J. Med. Chem.* 39, 4313–20.
- (71) Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., and Cardenas, R. (2005) Larrea Tridentata (Creosote Bush), an Abundant Plant of Mexican and US-American Deserts and Its Metabolite Nordihydroguaiaretic Acid. *J. Ethnopharmacol.* 98, 231–9.
- (72) Billinsky, J. L., Marcoux, M. R., and Krol, E. S. (2007) Oxidation of the Lignan Nordihydroguaiaretic Acid. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1352–8.
- (73) Bolton, J. L., Acay, N. M., and Vukomanovic, V. (1994) Evidence That 4-Allyl-O-Quinones Spontaneously Rearrange to Their More Electrophilic Quinone Methides: Potential Bioactivation Mechanism for the Hepatocarcinogen Safrole. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 443–50.
- (74) Riley, P. A., and Stratford, M. R. (2015) Oxidative Calcium Release from Catechol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1453–4.
- (75) Roberts, G. C. (2000) Applications of Nmr in Drug Discovery. *Drug Discovery Today* 5, 230–240.
- (76) Valensin, D., Cau, Y., Calandro, P., Vignaroli, G., Dello Iacono, L., Chiariello, M., Mori, M., and Botta, M. (2016) Molecular Insights to the Bioactive Form of Bv02, a Reference Inhibitor of 14–3-3sigma Protein-Protein Interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 894–8.
- (77) Dyall, L. K., and Winstein, S. (1972) Nuclear Magnetic Resonance Spectra and Characterization of Some Quinone Methides. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 2196–2199.
- (78) Saladino, R., Neri, V., Mincione, E., and Filippone, P. (2002) Selective Oxidation of Phenol and Anisole Derivatives to Quinones with Hydrogen Peroxide and Polymer-Supported Methylrhodium Trioxide Systems. *Tetrahedron* 58, 8493–8500.
- (79) Iverson, S. L., Hu, L. Q., Vukomanovic, V., and Bolton, J. L. (1995) The Influence of the P-Alkyl Substituent on the Isomerization of O-Quinones to P-Quinone Methides: Potential Bioactivation Mechanism for Catechols. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 537–44.
- (80) Richman, D. D. (2014) Extending HIV Drug Resistance Testing to Low Levels of Plasma Viremia. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1174.
- (81) Gisvold, O. (1948) A Preliminary Survey of the Occurrence of Nordihydroguaiaretic Acid in Larrea Divaricata. *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* 37, 194–6.
- (82) Luo, J., Chuang, T., Cheung, J., Quan, J., Tsai, J., Sullivan, C., Hector, R. F., Reed, M. J., Meszaros, K., King, S. R., Carlson, T. J., and Reaven, G. M. (1998) Masoprocol (Nordihydroguaiaretic Acid): A New Antihyperglycemic Agent Isolated from the Creosote Bush (Larrea Tridentata). *Eur. J. Pharmacol.* 346, 77–9.
- (83) Hirata, M., Inamitsu, T., Hashimoto, T., and Koga, T. (1984) An Inhibitor of Lipoxygenase, Nordihydroguaiaretic Acid, Shortens Actin Filaments. *J. Biochem.* 95, 891–4.
- (84) Wang, B., Yu, S. C., Jiang, J. Y., Porter, G. W., Zhao, L. T., Wang, Z., Tan, H., Cui, Y. H., Qian, C., Ping, Y. F., and Bian, X. W. (2011) An Inhibitor of Arachidonate 5-Lipoxygenase, Nordy, Induces Differentiation and Inhibits Self-Renewal of Glioma Stem-Like Cells. *Stem Cell Rev.* 7, 458–70.
- (85) Korn, S. J., and Horn, R. (1990) Nordihydroguaiaretic Acid Inhibits Voltage-Activated Ca<sup>2+</sup> Currents Independently of Lipoxygenase Inhibition. *Mol. Pharmacol.* 38, 524–530.
- (86) Gong, Y. Z., Ding, W. G., Wu, J., Tsuji, K., Horie, M., and Matsuura, H. (2008) Cinnamyl-3,4-Dihydroxy-Alpha-Cyanocinnamate and Nordihydroguaiaretic Acid Inhibit Human Kv1.5 Currents Independently of Lipoxygenase. *Eur. J. Pharmacol.* 600, 18–25.
- (87) West, M., Mhatre, M., Ceballos, A., Floyd, R. A., Grammas, P., Gabbita, S. P., Hamdheydari, L., Mai, T., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, S., Williamson, K. S., Zemlan, F., and Hensley, K. (2004) The Arachidonic Acid 5-Lipoxygenase Inhibitor Nordihydroguaiaretic Acid Inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha Activation of Microglia and Extends Survival of G93a-Sod1 Transgenic Mice. *J. Neurochem.* 91, 133–43.
- (88) Lu, J. M., Nurko, J., Weakley, S. M., Jiang, J., Koungias, P., Lin, P. H., Yao, Q. Z., and Chen, C. Y. (2010) Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Nordihydroguaiaretic Acid (Ndga) and Its Derivatives: An Update. *Medical Science Monitor* 16, Ra93–Ra100.
- (89) Masoprocol for Multiple Actinic Keratoses. *Med. Lett. Drugs Ther* 1993, 35, 97.
- (90) Barnaby, J. W., Styles, A. R., and Cockerell, C. J. (1997) Actinic Keratoses. Differential Diagnosis and Treatment. *Drugs Aging* 11, 186–205.
- (91) McGillis, S. T., and Fein, H. (2004) Topical Treatment Strategies for Non-Melanoma Skin Cancer and Precursor Lesions. *Semin. Cutaneous Med. Surg.* 23, 174–83.
- (92) Stephen, A. G., Worthy, K. M., Towler, E., Mikovits, J. A., Sei, S., Roberts, P., Yang, Q. E., Akee, R. K., Klausmeyer, P., McCloud, T. G., Henderson, L., Rein, A., Covell, D. G., Currens, M., Shoemaker, R. H., and Fisher, R. J. (2002) Identification of HIV-1 Nucleocapsid Protein: Nucleic Acid Antagonists with Cellular Anti-HIV Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1228–37.
- (93) Cruceanu, M., Stephen, A. G., Beuning, P. J., Gorelick, R. J., Fisher, R. J., and Williams, M. C. (2006) Single DNA Molecule Stretching Measures the Activity of Chemicals That Target the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Anal. Biochem.* 358, 159–170.
- (94) Gnabre, J. N., Brady, J. N., Clanton, D. J., Ito, Y., Dittmer, J., Bates, R. B., and Huang, R. C. (1995) Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription and Replication by DNA Sequence-Selective Plant Lignans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11239–43.
- (95) Hwu, J. R., Hsu, M. H., and Huang, R. C. C. (2008) New Nordihydroguaiaretic Acid Derivatives as Anti-HIV Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1884–1888.
- (96) Craigio, J., Callahan, M., Huang, R. C., and DeLucia, A. L. (2000) Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression by Nordihydroguaiaretic Acid Plant Lignan Derivatives. *Antiviral Res.* 47, 19–28.
- (97) Filter, version 2.5.1.4, Openeye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>. (accessed on October 2017).
- (98) Omega 2.5.1.4, Openeye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>. (accessed on October 2017).
- (99) de Rocquigny, H., Ficheux, D., Gabus, C., Fournie-Zaluski, M. C., Darlix, J. L., and Roques, B. P. (1991) First Large Scale Chemical Synthesis of the 72 Amino Acid HIV-1 Nucleocapsid Protein Ncp7 in an Active Form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 1010–8.
- (100) Saladini, F., Giannini, A., Boccuto, A., Vicenti, I., and Zazzi, M. (2017) Agreement between an in-House Replication Competent and a Reference Replication Defective Recombinant Virus Assay for Measuring Phenotypic Resistance to HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Inhibitors. *J. Clin. Lab. Anal.* e22206.
- (101) Elgaher, W. A., Sharma, K. K., Haupenthal, J., Saladini, F., Pires, M., Real, E., Mely, Y., and Hartmann, R. W. (2016) Discovery and Structure-Based Optimization of 2-Ureidothiophene-3-Carboxylic Acids as Dual Bacterial Rna Polymerase and Viral Reverse Transcriptase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 59, 7212–22.
- (102) Vicenti, I., Meini, G., Saladini, F., Giannini, A., Boccuto, A., Schiaroli, E., and Zazzi, M. (2017) Development of an Internally Controlled Quantitative Pcr to Measure Total Cell-Associated HIV-1 DNA in Blood. *Clin. Chem. Lab. Med.*, DOI: 10.1515/cclm-2017-0587.
- (103) Shan, L., Rabi, S. A., Laird, G. M., Eisele, E. E., Zhang, H., Margolick, J. B., and Siliciano, R. F. (2013) A Novel Pcr Assay for Quantification of HIV-1 Rna. *J. Virol* 87, 6521–5.

## ***ANNEXE 3 : LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.***

### **Publications.**

1. Botzanowski T\*, Erb S\*, Hernandez-Alba O, Ehkirch A, Colas O, Wagner-Rousset E, Rabuka D, Beck A, M Drake P, Sanglier-Cianferani S. Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *mAbs* (2017), 9, 801-811 (couverture).
2. Mori M, Kovalenko L, Malancona S, Saladini F, De Forni D, Pires M, Humbert N, Real E, Botzanowski T, Cianfèrani S, Giannini A, Dasso Lang MC, Cugia G, Poddesu B, Lori F, Zazzi M, Harper S, Summa V, Mely Y, Botta M. Structure-Based Identification of HIV-1 Nucleocapsid Protein Inhibitors Active against Wild-Type and Drug-Resistant HIV-1 Strains. *ACS Chemical Biology* (2018), 1, 253-266.
3. Ehrmann FR, Kalim J, Pfaffeneder T, Bernet B, Hohn C, Schäfer E, Botzanowski T, Cianfèrani S, Heine A, Reuter K, Diederich F, Klebe G. Swapping Interface Contacts in the Homodimeric tRNA-Guanine Transglycosylase: An Option for Functional Regulation. *Angew Chem Int Ed Engl.* (2018), 32, 10085-10090.
4. Behrens C\*, Biela I\*, Petiot-Bécard S, Botzanowski T, Cianfèrani S, Sager CP, Klebe G, Heine A, Reuter K. Homodimer Architecture of QTRT2, the Noncatalytic Subunit of the Eukaryotic tRNA-Guanine Transglycosylase. *Biochemistry* (2018), 26, 3953-3965.
5. Mons C, Botzanowski T, Nikolaev A, Hellwig P, Cianfèrani S, Lescop E, Bouton C, Golinelli-Cohen MP. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistant Fe-S Redox Switch MitoNEET Acts as a pH Sensor To Repair Stress-Damaged Fe-S Protein. *Biochemistry* (2018), 38, 5616-5628.
6. Botzanowski T, Hernandez-Alba O, Wagner-Rousset E, Colas O, Beck A, Cianfèrani S. Native ion mobility-mass spectrometry and collision induced unfolding experiments at middle level for a better differentiation of antibody isoforms and hybrid formats. *Article en cours de rédaction.*
7. Hartmann L\*, Botzanowski T\*, Galibert M, Chabrol E, Zeder-Lutz G, Kugler V, Strub J-M, Ferry G, Boutin J, Puget K, Cianfèrani S, Wagner R. VHH characterizations. Part 2: comparison of recombinant with the chemically synthesized anti-HER2 VHHs. *Article en cours de rédaction.*

\*contribution équivalente de deux auteurs.

## **Communications orales.**

1. Botzanowski, T., Hernandez-Alba, O., Cianférani, S. (2016) “Collision Induced Unfolding experiments for the characterization of mAbs” École Thématique CNRS, 17-20 octobre, Cabourg.
2. Botzanowski, T., Cianférani, S. (2016) “Development of mass spectrometry methodologies for characterization of membrane proteins” Institut Physique Hubert Curien 07 mars Concours Ma thèse en 180s, Strasbourg.
3. Botzanowski, T., Erb, S., Hernandez-Alba, O., Ehkirch, A., Colas, O., Wagner-Rousset, E., Rabuka, D., Beck, A., Drake, P., Cianferani S. (2017) “Caractérisation d’anticorps immunoconjugués site spécifiques par spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique” Club Jeune de la Société Française Spectrométrie de Masse (CJSFSM), 23 mars, Strasbourg.
4. Botzanowski, T., Erb, S., Hernandez-Alba, O., Ehkirch, A., Colas, O., Wagner-Rousset, E., Rabuka, D., Beck, A., Drake, P., Cianferani S. (2017) “Characterization of site specific ADCs by Ion Mobility-Mass Spectrometry” Journée des Doctorants, École Doctorale des Sciences Chimiques, 10 novembre, Strasbourg.
5. Botzanowski, T., Puig, E., Carulla, N., Cianferani, S. (2018) “Unravelling  $\beta$ -barrel Pore Oligomer formation by online SEC - Native Ion Mobility-Mass Spectrometry” Journée des Doctorants, École Doctorale des Sciences Chimiques, 23 novembre, Strasbourg.

## **Posters.**

Les travaux réalisés durant cette thèse ont été présentés par plusieurs collaborateurs dans différents congrès. Le présentateur est souligné pour chaque présentation.

1. Botzanowski T, Erb S, Hernandez-Alba O, Ehkrich A, Colas O, Rabuka D, Beck A, Drake P, Cianférani, S. (2017) “Insights from native mass spectrometry approaches for top and middle characterization of site-specific antibody-drug conjugates” American Society Mass Spectrometry Conference, 04-08 juin, Indianapolis (États-Unis).
2. Botzanowski T, Erb S, Hernandez-Alba O, Ehkrich A, Colas O, Rabuka D, Beck A, Drake P, Cianférani, S. (2017) “Insights from native mass spectrometry approaches for top and middle characterization of site-specific antibody-drug conjugates”, Société de Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique Conférence, 02-05 octobre, Paris (France).
3. Botzanowski T, Hernandez-Alba, O, Cianférani, S. (2018) “Assessment of collision induced unfolding experiments for protein characterization: the case of monoclonal antibodies” European Mass Spectrometry Conference, 11-15 mars, Saarbrücken (Allemagne).

4. Ciudad S, Puig E, Mayzel M, Botzanowski T, Serra-Batiste M, Cianferani S, Orekhov V, Carulla N. (2018) “Toward the three-dimensional structure of pore-forming amyloid- $\beta$  oligomers by solution NMR” European Magnetic Resonance Meeting, 01-05 juillet, Nantes (France).

5. Diemer H, Botzanowski T, Wagner-Rousset E, Colas O, Beck A, Cianférani S.(2018) “Characterization of a disulfide bridge network in the CDR of a mAb using a combination of mass spectrometry and ion mobility approaches”, Société Française d’Electrophorèse & Analyse Protéomique, 09-12 octobre, Albi (France).

### **Enseignements dispensés comme moniteur de chimie à l’Université de Strasbourg.**

- Année universitaire 2016-2017

Travaux dirigés en chromatographies (Licence 3)

Travaux dirigés en spectrométrie de masse (Licence 3)

Travaux pratiques en chimie analytique (Licence 3)

- Année universitaire 2017-2018

Travaux dirigés en chromatographies (Licence 3)

Travaux dirigés en spectrométrie de masse (Licence 3)

Travaux pratiques en chimie analytique (Licence 3)

## Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de protéines d'intérêt thérapeutique et de complexes multiprotéiques.

### Résumé

Ce travail de thèse repose sur le développement de méthodes en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de protéines d'intérêt thérapeutique et de complexes multiprotéiques. L'optimisation fine et conséquente de la préparation d'échantillon et des conditions analytiques ont permis la caractérisation de protéines membranaires solubilisées en milieu détergent, protéines hydrophobes habituellement réfractaires à l'analyse par MS. D'autre part, une nouvelle approche de mobilité ionique appelée *Collision Induced Unfolding* a été évaluée et mise en place au laboratoire. Elle a permis une caractérisation conformationnelle approfondie et originale de plusieurs formats d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Enfin, les techniques de MS native et de mobilité ionique ont été utilisées pour caractériser des complexes multiprotéiques d'hétérogénéité variable mettant ainsi en lumière leurs avantages et les progrès réalisés dans le domaine de la MS structurale.

Mots-clés : Spectrométrie de masse native, mobilité ionique, collision induced unfolding, protéines membranaires, anticorps thérapeutiques, complexes multiprotéiques.

### Résumé en anglais

This PhD work focuses on developments in native mass spectrometry and ion mobility methods for the structural characterization of therapeutic proteins and multiprotein complexes. First, careful optimizations of sample preparation and analytical conditions allowed the characterization of membrane proteins, which are hydrophobic proteins difficult to analyze by MS approaches in detergent environment. Then, a new ion mobility-based activation approach called Collision Induced Unfolding has been set up and evaluated. CIU allowed extensive and original conformational characterization of several therapeutic monoclonal antibody formats. Finally, native MS and ion mobility techniques were used for the characterization of heterogeneous multiprotein complexes depicting their benefit when combined to other biophysical techniques for the structural characterization of multiprotein complexes.

Key words : native mass spectrometry, ion mobility, collision induced unfolding, membrane proteins, monoclonal antibodies, multiprotein complexes.