



**HAL**  
open science

# Dimérisation oxydative de protéines via des pontages d'acides aminés aromatiques

Anouchka Gatin

► **To cite this version:**

Anouchka Gatin. Dimérisation oxydative de protéines via des pontages d'acides aminés aromatiques. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF051 . tel-03826857

**HAL Id: tel-03826857**

**<https://theses.hal.science/tel-03826857>**

Submitted on 24 Oct 2022

**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.

# Dimérisation oxydative de protéines *via* des pontages d'acides aminés aromatiques

*Oxidative dimerization of proteins via aromatic amino acid cross-links*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571 : sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay.

Thèse préparée à l'**Institut de Chimie Physique (Université Paris-Saclay, CNRS)**, sous la direction de **Cécile SICARD-ROSELLI**, Maître de Conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 19 juillet 2022, par

**Anouchka GATIN**

## Composition du Jury

<b>Marie-Claude MENET</b> Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente
<b>Fabrice COLLIN</b> Maître de conférences, Université Toulouse III - Paul Sabatier	Rapporteur & Examineur
<b>Joëlle VINH</b> Directrice de recherche, CNRS, ESPCI	Rapporteuse & Examinatrice
<b>Sophie BOMBARD</b> Directrice de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay	Examinatrice
<b>Delphine ONIDAS</b> Maître de conférences, Université Paris-Cité	Examinatrice
<b>Cécile SICARD-ROSELLI</b> Maître de conférences, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse



**Titre :** Dimérisation oxydative de protéines *via* des pontages d'acides aminés aromatiques

**Mots clés :** oxydation, pontages covalents, bi-tyrosine, spectrométrie de masse, radiolyse

**Résumé :** La formation de pontages protéiques covalents impliquant des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane) a été associée à de nombreux processus biologiques aussi bien physiologiques que pathologiques. La bi-tyrosine, utilisée comme biomarqueur de l'oxydation protéique en est l'exemple type: elle a été mise en évidence dans des nombreuses protéines isolées, tissus et fluides biologiques. Dans le cadre de cette thèse, l'étude de la dimérisation covalente *via* des acides aminés aromatiques sera abordée à travers l'oxydation i) de protéines isolées, de peptides et d'acides aminés libres en solution, ii) d'un complexe protéique formé de la centrine 2 humaine (CEN2) et de la protéine *Xeroderma Pigmentosum* (XPC) puis iii) de cellules humaines de cancer du sein.

La formation de radicaux oxydants, comme le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) et le radical azoture ( $\text{N}_3\cdot$ ) sera médiée par l'irradiation des échantillons protéiques en solution aqueuse sous rayonnement gamma. La formation des pontages covalents induits sous oxydation radiolytique sera principalement analysée par chromatographie liquide ultra performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS). Une nouvelle méthodologie analytique basée sur le marquage isotopique et les échanges H/D a été développée pour déterminer la nature des liaisons chimiques en étant à l'origine.

Dans un premier temps, l'étude de la dimérisation de la tyrosine à l'échelle de l'acide aminé isolé a permis de mettre en évidence la formation d'au moins quatre isomères de bi-tyrosine. La démarche d'analyse mise en place a permis d'identifier une nouvelle famille de dimères de tyrosine. Ces derniers résultent de réactions de cycloaddition de Michael intramoléculaires et impliquent la position *para* du radical tyrosyle à l'origine de la dimérisation.

Dans un second temps, la pluralité structurale des dimères a été confirmée à l'échelle protéique.

La coexistence de nombreux intermédiaires et produits finaux d'additions de Michael a été soulignée, notamment *via* des expériences de spectrométrie de mobilité ionique (IMS). Tandis que la protéine considérée possède aussi des résidus tryptophane, des pontages tyrosine-tyrosine, tyrosine-tryptophane et tryptophane-tryptophane ont été détectés.

En troisième lieu, le comportement oxydatif de dimérisation de complexes protéiques formés de la CEN2 et de deux fragments de taille différente de la XPC a par la suite été étudié. Il a permis de mettre en évidence pour la première fois la formation de pontages covalents interprotéiques entre les deux partenaires. En fonction de la séquence en acides aminés du fragment considéré de la XPC (présence ou non d'un résidu tyrosine), la nature des liens covalents diffère : tyrosine-tyrosine ou tyrosine-tryptophane. Toutefois, quelle que soit la nature des pontages formés, les deux partenaires protéiques se lient de manière covalente lors d'une attaque oxydative. Dans le cadre de la formation de pluriels pontages tyrosine-tryptophane, une analyse détaillée de la nature des liaisons chimiques en étant à l'origine a été menée à l'échelle des acides aminés isolés et a amené à proposer de nouveaux types de pontage.

Enfin, une approche *in-cellulo* de détection de pontages covalents de la CEN2 formés lors de l'exposition à des radicaux oxydants a été entreprise. Les conditions de détection de la CEN2 endogène et de ses potentiels dimères ont été mises au point par Western-Blot. L'enrichissement en CEN2 des extraits cellulaires par immunoprécipitation et précipitation au sulfate d'ammonium a également été réalisé. Ces expériences préliminaires ouvrent la voie à l'investigation future de pontages covalents formés *in-cellulo*.



**Title :** Oxidative dimerization of proteins *via* aromatic amino acid cross-links

**Keywords :** oxidation, covalent cross-links, bi-tyrosine, mass spectrometry, radiolysis

**Abstract:** Covalent protein cross-links involving aromatic amino acids has been associated with a numerous of biological processes, as well physiological as pathological. Bi-tyrosine, used as a biomarker of protein oxidation is a typical example: it has been evidenced in a large number of isolated proteins, tissues and biological fluids.

In the context of this study, covalent dimerization *via* aromatic amino acids will be studied through oxidation of i) isolated proteins, peptides and free amino acids in solution, ii) a protein complex made of human centrin 2 (CEN2) and *Xeroderma Pigmentosum* group C protein (XPC), then of iii) breast cancer human cells.

Oxidative radicals' formation, as hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) and azide ( $\text{N}_3\cdot$ ) radicals will be mediated by irradiation of protein samples in aqueous solution with gamma rays. Radio-induced covalent cross-links will be mainly examined by ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS). A new analytic methodology based on isotopic labelling and H/D exchanges has been developed in order to precisely determine the chemical nature of the cross-links.

First, tyrosine dimerization study at the amino acid scale allowed to highlight the formation of at least four different bi-tyrosine isomers. The applied analytical approach allowed to identify a new dimers family. These latter result from intramolecular Michael cycloaddition reactions and involve the *para* position of the tyrosyl radical from which dimerization originated.

In the second part, dimers structural plurality has been confirmed at the protein scale.

Co-existence of plentiful Michael additions' intermediates and final products has been underlined in particular *via* ion mobility spectrometry (IMS) experiments. While the considered protein possesses also tryptophan residues, tyrosine-tyrosine, tyrosine-tryptophan and tryptophane-tryptophane cross-links were evidenced.

Third, oxidative dimerization behaviour of protein complexes composed of CEN2 and two XPC fragments of different size has been studied. It allowed to evidence for the first time the formation of covalent interprotein cross-links between both partners. In function of the amino acid sequence of the considered XPC fragment (presence or not of tyrosine), the cross-link nature differs: tyrosine-tyrosine or tyrosine-tryptophan. However, whatever the nature of the covalent bridges, both partners covalently bind throughout an oxidative attack. In the context of plural tyrosine-tryptophan cross-links formation, a detailed analysis of the chemical bonds nature has been completed at the amino acid scale. It brought to propose new types of tyrosine-tryptophan bridges.

Finally, *in-cellulo* approach of CEN2 covalent cross-links detection when exposed to oxidative radicals has been engaged. The conditions of endogenous CEN2 detection and of its potential dimers have been developed by Western-Blot. Cellular extracts enrichment steps by immunoprecipitation and ammonium sulfate precipitation were realized. These preliminary experiments pave the way of the future investigation of *in-cellulo* covalents cross-links.

# REMERCIEMENTS

---

Je remercie **Marie-Claude Menet** d'avoir présidé mon jury de thèse, **Fabrice Collin** et **Joëlle Vinh** qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail mais aussi **Sophie Bombard** et **Delphine Onidas** d'en avoir été les examinatrices. Merci également à **Virginie Redeker** d'avoir accepté l'invitation à ma soutenance. Merci à **Nicolas Moniaux**, pour sa présence en tant qu'invité mais aussi pour son implication lors du suivi de mes travaux tout au long de ses trois ans de thèse. Merci à tous pour votre bienveillance et pour la richesse des échanges qui vont nourrir de façon certaine la suite de ce projet de recherche.

Je tiens à remercier infiniment **Cécile Sicard-Roselli**, pour ces trois ans (et plus !) d'encadrement exceptionnel et de riches discussions scientifiques. Merci de m'avoir permis de continuer ce sujet de recherche que celui de l'oxydation de la centrine 2, resté en suspens depuis plusieurs années. Merci de m'avoir permis de publier dans plusieurs revues internationales, d'avoir été une encadrante si présente et notamment à la paillasse ! Merci pour tous vos précieux conseils, merci d'avoir le compas dans l'œil (15 cm entre le pouce et l'auriculaire ?), de voir les photons gamma, d'être MacGyver... Je sais changer des lampes de spectro d'absorption comme une cheffe. Merci aussi pour vos « coups de pied au cul », pour aller au L2 par exemple... Merci pour tous les cafés, que j'ai bien souvent trop chargés, pour tout le chocolat acheté, aussi pour les « manips à froid ». Je n'oublierai pas non plus nos séjours aux Etats-Unis (et les muscles de mes cuisses non plus d'ailleurs), de -17°C à 40°C, de Millenium Park au fin fond de Mishawaka. Merci aussi pour les imitations de la mouche écrasée sur son scotch, je pense que je peux mourir en paix après avoir vu ça (et être devenue docteure) ! Merci d'avoir aidé sans aucun doute à ce que Dumbo lâche sa plume... ou essaie du moins ! Merci pour tout. J'ai conscience de la chance que j'ai eu d'avoir une directrice de thèse comme vous, mais c'est important de le reconnaître et de l'écrire, en l'occurrence.

Merci à **Isabelle Billault**, « Madame Billault » -que je considère finalement comme une co-encadrante, Adum en dira ce qu'il voudra - pour sa présence pendant ces trois ans. Merci pour ces nombreuses sessions de spectrométrie de masse, à se cailler dans la salle E2, à tous nos « LC » oubliés et à la famille « MAD » ! Merci pour toutes les discussions scientifiques en trinôme avec Cécile, vous resterez toutes les deux les « Dupond & Dupont » de ma thèse, le binôme infernal, toujours prêtes à élucider une ou deux structures et ce toujours avec une pointe d'humour. « On dilue ? » ... « Luuuuu ! » Merci pour vos conseils avisés de chimiste organicienne, pour les mécanismes recadrés et pour tous vos PowerPoint à rallonge. Merci pour tout. Et on dit LES bi-tyrosines ! « Tyr 4ever » !

Merci à **Emilie Brun**, « ange gardien un jour, ange gardien toujours ». Bien que ta place au sein de mon projet de thèse n'ai pas été celle à laquelle on se serait attendu en 2017 quand j'arrivais fraîchement au laboratoire pour mon premier stage, tu restes un membre incontournable de ce riche entourage scientifique. Merci pour tout, merci pour ta présence, pour ton soutien à toute épreuve, notamment lors des derniers jours de rédaction... Merci d'avoir accompli la difficile tâche que de me former à la culture cellulaire... je reste une physico-chimiste pure et dure, désolée ! Merci pour nos discussions, merci pour ta rigueur et ta justesse scientifique. Merci aussi pour tes bons gâteaux, toutes tes recettes plus alléchantes les unes que les autres, merci pour les anecdotes de Théo qui me font craquer : « tu vois maman ? Ça c'est une petite grenouille qui prépare une conférence ! ».

Merci à **Guillaume Van der Rest**, qui a été un interlocuteur important dans ce projet impliquant (beaucoup) d'analyse par spectrométrie de masse. Merci pour les discussions scientifiques intenses et toujours sources de nouvelles idées.

Merci à **Patricia Duchambon**, pour la production et la purification des protéines qui ont alimenté ce travail. Merci pour les quelques semaines passées à l'Institut Curie (U1196 Inserm, sinon ça va barder) en votre présence, à découvrir la biochimiste que je ne serai jamais (ce n'est pas moi qui l'ai dit !!). Merci pour vos conseils et pour votre franc parler ! Merci aussi pour tous les repas partagés avec l'équipe...

Merci à nos collaborateurs de l'Université de Notre Dame aux Etats-Unis, **Aliaksandra Lisovskaya** et **Ian Carmichael**, pour leur accueil. Merci pour nos échanges, pour vos encouragements. Merci à Ian d'avoir été aussi intéressé et subjugué devant les structures proposées des nouveaux dimères de tyrosine. Merci à Aliaksandra pour sa disponibilité et de nous avoir fait découvrir que dans le Michigan, il y a des vignobles !

Merci aussi à **Vincent Pennaneach**, qui a fait partie de mon suivi de thèse, pour ses conseils, sa bienveillance et sa disponibilité.

Merci à tous les membres de l'Institut de Chimie Physique avec lesquels j'ai pu interagir, scientifiquement ou pas, notamment dans le cadre de mon rôle de représentante des doctorants. Merci à **Carine Clavaguéra**, pour sa gentillesse, d'avoir cru en moi depuis le Magistère, je me souviendrai toujours de cette fameuse présentation au 3<sup>ème</sup> étage du 349 ! Merci à **Fabien Caille** pour les calculs de chimie théorique et toutes les discussions qui en ont découlées. Merci à **Jessica Bowles** pour l'année commune de représentantes des doctorants et pour nos discussions « hors cadre » à parler équitation... Merci à **Ayoub Boulghobra** et **Lucie Arberet**, les expatriés du plateau, pour nos verres en terrasse, nos aventures dans les catacombes mais aussi pour les goûters offerts pendant mes TP d'électrochimie. Merci aussi à **Hana Valenta** et **Fanny Mousseau**, qui sont aussi devenues des

amies au-delà du laboratoire. Merci à **Salomé Laurans** et **Dounia Zamiaty** d'avoir pris le relais des représentantes. Merci à Jehan, Margaux, Hadrien, Dina, Sana, Jean, Rika, Marija... Il est difficile de faire une liste exhaustive, merci à tous !

Merci à **mes parents et à ma sœur**, pour leur soutien depuis le début de mes études. Sans vous, rien n'aurait été possible. Pour arriver jusqu'à la thèse, il y a eu beaucoup de week-ends passés enfermée à travailler, merci de m'avoir supportée ! Angèle, je n'oublierai jamais quand tu m'as dit « c'est quoi que tu fais comme études ? Car je ne veux surtout pas faire ça plus tard », j'en rigole encore en l'écrivant.

Merci à **Sophie Gadan**, amie et colocataire de choc. Qui aurait cru il y a 8 ans que lors de notre rencontre à l'IUT nous en serions là ?! La thèse est une « épreuve », on a décidé de la vivre un peu ensemble et je ne regrette pas ce choix ! Si c'était à refaire, je recommencerais sans hésiter. Merci pour ta présence au quotidien, pour ton soutien, pour tous les BK, McDo et Dominos partagés sur le canapé.

Last but not least, le meilleur pour la fin, merci à **Florent Ducrozet**. Quelle aventure que la thèse, mais qu'aurait-elle été sans le meilleur co-thésard que l'ICP n'ai jamais connu ? Merci pour tout, pour tous les moments passés ensemble, tous les fou-rires, tous les remontages de moral, toutes les sessions irradiation, tous les goûters (c'est toujours l'heure du goûter quelque part dans le monde), tous les potins, tous les services rendus (tu prépares Fricke pour lundi?). Merci d'avoir rendu ces trois ans encore meilleurs, tout simplement. Merci pour les journées passées dans le laboratoire, assis finalement l'un en face de l'autre sur nos paillasses flambantes neuves. Je me souviendrai longtemps de toutes les plaques passées au lecteur, du bruit des « grillons », de la Rhodamine, des nitrites, et évidemment des nanodiamants. Je me souviendrai des « elle n'a pas fini avec sa vinaigrette ? » quand je m'occupais des gels. Les sessions de remplissage de boîtes de cônes, également un incontournable de la thèse dans l'équipe « High Voltage », moment qui permet de lier l'utile à l'agréable, surtout en période de rédaction. Les journées d'irradiation gamma, à ne pas voir le jour pendant plusieurs heures, enfermés dans le bunker avec les araignées, les insectes en tout genre et même des rats crevés... « Ça sentait la mort, mais genre la vraie mort » « Rondier validé, veuillez sortir de la salle » « Chaîne de sécurité validée, appuyez sur suivant pour continuer » « Code correct, attention mise en irradiation ». Merci pour les moments partagés dans le bureau. D'abord contraints de se tourner le dos, notre rêve est devenu réalité en 2021 : pouvoir travailler l'un en face de l'autre ! Valérie Damido n'a qu'à bien se tenir, on a retourné la pièce. Cela aura été un plaisir de rédiger ma thèse face à toi, à attendre les regards en coin vers 10h et 16h30, pour les pauses gâteaux. J'en profite pour remercier officiellement Côte d'Or, Lindt, Ferrero, Lu et j'en passe. Merci aussi au Cif « Anti-bactérien & Brillance » pour son

aide dans l'entretien du bureau. Merci d'avoir tenu bon quand j'ai été insupportable, quand j'ai voulu sauter dans l'arbre pour échapper à la rédaction, quand on a fait une pause dehors sur les tables de pique-nique (1 seule en 3 ans, c'est dire son importance, il fallait la souligner), quand j'étais persuadée que je ne pourrais jamais soutenir en juillet, quand on est allé s'allonger dans la salle Ikea... Merci de m'avoir fait penser à autre chose pendant que je rédigeais en faisant appel à mes qualités de « service après-vente Origin, j'écoute ». Merci pour les mardis et jeudis fous, les pizzas auront été des alliés indispensables au maintien de notre moral, tout comme les buffets à volonté à Montrouge (on y va quand ?). Merci pour ton accent chantant, ta bonne humeur, merci pour les cours de provençal... Fan de chichourle !! Merci pour nos connexions neuronales communes, c'est assez agréable de ne pas avoir besoin de parler pour que l'autre sache ce que l'on pense ! Connectés jusqu'au bout. Merci pour nos escapades au Parc Astérix, une par an, le petit rituel de l'été, j'attends la dernière avec impatience. Merci pour tous les debriefs, en live ou par messages vocaux, merci pour tous les « tu préfères », les « pour combien », les memes, les parodies de Koh Lanta, des anges, du générique de Martin Matin, les faux Césars... Merci aussi d'être mon meilleur public, je me souviendrai longtemps du « salon de l'agitateur magnétique ». Je pense qu'on aurait pu littéralement mourir de rire plus d'une fois. Merci d'avoir arrosé notre « fils », sans toi il serait mort depuis longtemps, je n'ai vraiment pas la main verte. J'oublie certainement beaucoup de choses, il n'est pas possible de tout raconter, ou alors il faudrait un manuscrit entier. Merci d'être devenu bien plus qu'un co-thésard, un frère, un ami en or. J'aime bien dire que la vie m'a offert une sœur et que la thèse m'aura offert un frère. Et n'oublie pas, rendez-vous pour l'ouverture de la BioCoop dans quelques mois et dans quelques années si le destin en décide ainsi, je prépare les eppendorfs, tu m'auras comprise. Merci infiniment mon frère !

# ABREVIATIONS

---

Ac-Y: N-acétyl-L-tyrosine

Ac-Y-Et: Ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine

ADN: Acide désoxyribonucléique

AF: Acide formique

BER: *Base excision repair*

BCA: *Bicinchoninic acid assay*

BSA: *Bovine Serum Albumine*

CaM: Calmoduline humaine

CCS: *Collision cross section*

CEN2: Centrine 2 humaine

CFP: *Cyan fluorescent protein*

CID: *Collision induced dissociation*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DOPA: 3,4-dihydroxyphénylalanine

EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

ESI: *Electrospray ionization*

ESH: Electrode standard à Hydrogène

GFP: *Green fluorescent protein*

IMS: *Ion mobility spectrometry*

ICC: Immunocytochimie

IF: Immunofluorescence

IHC: Immunohistochimie

IP: Immunoprécipitation

IR: Infra-rouge

ITC: *Isothermal titration calorimetry*

EC: Énergie de collision

FLD: *Fluorescence detection*

MAD: *Michael addition dimers*

MS: *Mass spectrometry*

MS/MS: *Tandem mass spectrometry*

NER: *Nucleotide excision repair*

NLS: *Nuclear localization signal*

P17XPC: peptide issu de la protéine XPC

PBS: *Phosphate buffer solution*

PDA: *Photodiode array*

Q-ToF: *Quadrupole time of fly*

UPLC: *Ultra performance liquid chromatography*

RPE: Résonance paramagnétique électronique

RPM: Rotation par minute

RMN: Résonance magnétique nucléaire

SDS-PAGE: *Sodium docecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TBS: *Tris-buffered saline*

TCA: Acide trichloroacétique

TFA : Acide trifluoroacétique

TFA-Na : Trifluoroacétate de sodium

TR: Temps de rétention

TWIMS: *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*

UV: Ultra-violet

WB: *Western-Blot*

XP: *Xeroderma Pigmentosum*

XPC: *Xeroderma Pigmentosum group C protein*

XPC3: Fragment de la protéine XPC

# SOMMAIRE

---

I.	Introduction.....	15
II.	Contexte .....	17
II.1.	Pontages covalents dans les protéines .....	17
II.2.	Nature des pontages .....	17
II.3.	Focus sur l'oxydation de la tyrosine .....	20
II.3.1.	Espèces transitoires.....	20
II.3.2.	Produits d'oxydation .....	24
II.4.	Méthodes de détection des pontages covalents dans les protéines .....	27
III.	Stratégies.....	29
III.1.	Systèmes d'étude .....	29
III.1.1.	Centrine 2 humaine.....	29
III.1.2.	Calmoduline.....	31
III.1.3.	Centrine 2 humaine et XPC.....	31
III.1.4.	Echelle cellulaire.....	35
III.2.	Génération de pontages covalents par radiolyse.....	36
III.3.	Détection et caractérisation des pontages covalents .....	39
IV.	Dimérisation oxydative à l'échelle des acides aminés .....	41
IV.1.	Pontages tyrosine-tyrosine .....	41
IV.1.1.	Bi-tyrosine .....	41
IV.1.2.	Produits d'hydroxylation .....	46
IV.1.3.	Bilan des mécanismes d'oxydation .....	50
IV.1.4.	Investigation structurale .....	52
IV.1.5.	Caractérisation spectroscopique des différents isomères .....	66
IV.1.6.	Expériences de Spectrométrie de Mobilité Ionique (IMS) .....	68
IV.1.7.	Discussion.....	71
IV.2.	Pontages tyrosine-tryptophane .....	74
IV.2.1.	Expériences d'échanges H/D avec le solvant .....	77
IV.2.2.	Expériences de deutération .....	80
IV.2.3.	Expériences de fragmentation (MS/MS).....	85
IV.2.4.	Bilan d'investigation structurale des dimères tyrosine-tryptophane .....	90
IV.2.5.	Discussion.....	92
V.	Dimérisation oxydative au sein de tyrosines protégées et de peptides .....	95



V.1.	Dimérisation de tyrosines protégées .....	95
V.2.	Formation de bi-tyrosine au sein de peptides .....	102
V.2.1.	Peptide KTSLY .....	102
V.2.2.	Peptide KTSLYG.....	114
V.3.	Discussion .....	119
VI.	Dimérisation oxydative au sein de protéines isolées .....	123
VI.1.	Centrine 2 humaine .....	123
VI.2.	Calmoduline (CaM).....	135
VI.3.	XPC3.....	142
VI.4.	Discussion .....	155
VII.	Dimérisation oxydative au sein de complexes protéiques.....	159
VII.1.	Complexe CEN2-P17XPC.....	160
VII.1.1.	Caractérisation .....	160
VII.1.2.	Dimérisation oxydative.....	165
VII.2.	Complexe CEN2-XPC3.....	169
VII.2.1.	Caractérisation .....	169
VII.2.2.	Dimérisation oxydative.....	172
VII.3.	Discussion .....	181
VIII.	Vers une analyse <i>in-cellulo</i> de la dimérisation oxydative de la centrine 2 humaine .....	183
VIII.1.	Introduction.....	183
VIII.2.	Détection de centrine 2 humaine par Western-Blot.....	186
VIII.3.	Irradiation des cellules .....	190
VIII.3.1.	Irradiation pré-extraction.....	190
VIII.3.2.	Irradiation post-extraction .....	195
VIII.4.	Vers un enrichissement en centrine 2 des extraits cellulaires .....	198
VIII.4.1.	Immunoprécipitation .....	198
VIII.4.2.	Précipitation au sulfate d'ammonium.....	203
VIII.4.3.	Vers une analyse par UPLC-MS .....	207
VIII.5.	Bilan et perspectives .....	211
IX.	Conclusion générale .....	215
X.	Méthodes Expérimentales .....	219
X.1.	Protéines, peptides et acides aminés.....	219
X.2.	Irradiations gamma .....	219
X.2.1.	Source panoramique et débits de dose .....	220
X.2.2.	Dosimétrie de Fricke.....	220
X.2.3.	Expériences d'échange H/D avec le solvant.....	221

X.3.	Gels d'électrophorèse SDS-PAGE .....	222
X.4.	Spectroscopie de fluorescence.....	222
X.5.	Titration calorimétrique isotherme.....	223
X.6.	Digestion enzymatique.....	223
X.7.	Chromatographie liquide ultra-haute performance (UPLC).....	223
X.8.	Spectrométrie de masse.....	225
X.8.1.	Conditions natives .....	226
X.8.2.	Couplage UPLC-MS .....	227
X.8.3.	Fragmentation MS/MS .....	227
X.8.4.	Spectrométrie de mobilité ionique (IMS).....	227
X.8.5.	Couplage UPLC-UV .....	228
X.8.6.	Couplage UPLC-FLD .....	228
X.9.	Culture cellulaire .....	228
XI.	Liste des publications .....	231
XII.	Références bibliographiques.....	233



# I. INTRODUCTION

---

Le projet de recherche à l'origine de cette thèse était initialement composé de trois objectifs. Le premier objectif consistait en l'étude de la dimérisation de la centrine 2 humaine (CEN2) lors d'une oxydation induite par les radicaux hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) et azoture ( $\text{N}_3\cdot$ ). La centrine 2 humaine est une protéine considérée depuis de nombreuses années à l'Institut de Chimie Physique. La dégradation oxydative majoritaire de cette protéine consiste en la formation de dimères et il a été montré que cette dernière a lieu *via* son unique tyrosine terminale (Blouquit *et al.*, 2007; Brun *et al.*, 2010; Et Taouil *et al.*, 2014). Une particularité de la centrine 2 humaine est son extrême efficacité à former ces dimères de tyrosine, et donc à capter les radicaux oxydants. La visée de ce premier volet était donc de comparer la dimérisation de la centrine 2 en fonction du radical oxydant utilisé. *In-vivo*, la centrine 2 humaine est notamment impliquée dans la formation d'un complexe avec une autre protéine, la XPC (*Xeroderma Pigmentosum group C protein*) (Araki *et al.*, 2001; Popescu *et al.*, 2003; Nishi *et al.*, 2005). Le second objectif consistait à étudier les interactions de la centrine 2 humaine en présence de ce partenaire cellulaire identifié. Après caractérisation du complexe protéique formé, les dégradations induites lors d'une oxydation devaient être étudiées. La persistance de la dimérisation de la centrine 2 humaine devait notamment être sondée. Enfin, le dernier objectif était de mettre en évidence la présence d'oxydation de la centrine 2 humaine en milieu cellulaire. Dans le cadre de l'étude comparative de la dimérisation oxydative médiée par les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$ , des résultats inattendus ont amené à outrepasser les objectifs initialement définis. En effet, bien que la dimérisation de la centrine 2 humaine ait été largement étudiée, dans le cadre de ce travail, de nouveaux isomères de bi-tyrosine ont été détectés. Cette pluralité des structures formées a soulevé de nombreuses nouvelles questions. L'étude approfondie de la formation d'isomères de bi-tyrosine a donc constitué une part prédominante de ce travail de thèse.

Le chapitre II de ce manuscrit s'efforcera de resituer l'intérêt d'étudier les pontages covalents dans les protéines, comme la bi-tyrosine, utilisée comme biomarqueur de l'oxydation protéique. Le chapitre III présentera les systèmes d'étude considérés, de l'acide aminé à la cellule ainsi que les méthodes de génération des radicaux oxydants et de détection des dimères formés. Dans le chapitre IV, la formation de pontages impliquant la tyrosine sera étudiée d'un point de vue structural et mécanistique à travers la considération des acides aminés libres. Une nouvelle démarche analytique basée sur la chromatographie liquide ultra performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) et combinée à des expériences de marquage isotopique, d'échanges H/D et de spectrométrie de mobilité ionique (IMS) y sera développée. La formation de pontages covalents sera interrogée au sein

de systèmes plus complexes : dans le chapitre V, des tyrosines dont certaines fonctions chimiques auront été protégées et deux peptides de séquences choisies seront considérés et dans le chapitre VI des protéines dont la composition relative en résidus aromatiques varie. Le comportement de dimérisation oxydative de complexes protéiques impliquant la centrine 2 humaine fera l'objet d'étude du chapitre VII. Enfin, dans le chapitre VIII, la recherche de dimères covalents de protéines sera entreprise à l'échelle de la cellule. Ce dernier chapitre de résultats se focalisera essentiellement sur la mise au point de la détection endogène de la protéine cible à l'état monomérique avant de s'intéresser à la formation de pontages covalents.

## II. CONTEXTE

---

### II.1. Pontages covalents dans les protéines

La formation de liaisons covalentes dans les protéines joue souvent un rôle clé et ce dans divers processus biologiques. Certaines de ces liaisons sont formées sciemment par l'organisme *via* l'action d'enzymes notamment. Elles sont essentielles au maintien conformationnel ainsi qu'à la fonction et l'activité de certaines protéines et assurent un bon fonctionnement physiologique (*Wedemeyer et al., 2000; Eyre & Wu, 2005*). Cependant, l'apparition de ces pontages covalents est aussi souvent associée au vieillissement des tissus et/ou à l'exposition à des espèces oxydantes (*Bjorksten, 1968; Feeney & Schöneich, 2012*). L'accumulation de tels pontages peut alors avoir des effets préjudiciables pour les fonctions biologiques et certains de ces liens covalents sont même associés au développement de pathologies (*Pennathur et al., 1999; Andringa et al., 2004; DiMarco & Giulivi, 2007*). Par exemple, la formation de pontages covalents dans les protéines peut mener à la génération d'agrégats protéiques insolubles, susceptibles d'être dégradés moins efficacement par les enzymes protéolytiques (*Balasubramanian & Kanwar, 2002; Grune, 2020*). Ces pontages peuvent survenir au sein d'une même protéine (intramoléculaire) tout comme entre deux entités distinctes (intermoléculaire) et il existe une large diversité des liaisons chimiques à l'origine du lien covalent. Les liaisons covalentes impliquant des atomes de soufre sont souvent évoquées et ont été largement caractérisées, de par l'importance des ponts disulfure dans la structuration des protéines (*Thornton, 1981; Wedemeyer et al., 2000*). Pour autant, il existe de nombreux types de liens covalents impliquant d'autres atomes (carbone, azote, oxygène).

### II.2. Nature des pontages

La formation d'une liaison entre deux atomes de soufres des résidus cystéine est la modification covalente la plus commune des systèmes biologiques. De nombreux ponts disulfure sont formés enzymatiquement pendant ou juste après la synthèse des protéines (*Depuydt et al., 2011*). Ils sont donc inhérents à ces dernières dans leur conformation native. Ils assurent très souvent leur repliement tridimensionnel c'est-à-dire leurs structures secondaire et tertiaire (*Wedemeyer et al., 2000*). Dans les anticorps produits par le système immunitaire par exemple, les chaînes lourdes et légères sont reliées entre elles par des ponts disulfure (*Hagihara & Saerens, 2014*).

De nombreux types de pontages covalents entre les acides aminés autres que la cystéine sont susceptibles de se produire au sein ou entre les protéines. Des pontages impliquant les acides aminés aromatiques (tyrosine-tyrosine, tryptophane-tyrosine, tryptophane-tryptophane) ont été mis en

évidence dans plusieurs protéines isolées mais également au sein d'échantillons biologiques (protéines du plasma et du cristallin, urine...) (*Dalle-Donne et al., 2005; Paviani et al., 2017; Colombo et al., 2017; Paviani et al., 2020*). La formation de dimères de tryptophane ou de pontages tyrosine-tryptophane, bien que beaucoup moins documentée que celle de la bi-tyrosine, a aussi été rapportée dans divers systèmes et notamment dans des protéines extraites de cristallins de patients atteints de cataracte (*Bhaskar et al., 2003; Medinas et al., 2010; Leo et al., 2013; Leinisch et al., 2017; Carroll et al., 2017; Paviani et al., 2020*). La potentielle diversité des produits formés a récemment été évoquée par Fuentes-Lemus et al., justifiée par la délocalisation électronique sur les cycles pyrrolique et benzénique mais aussi par la présence de carbones asymétriques (*O' Malley et al., 1995; Lenzian et al., 1996; Walden & Wheeler, 1996; Fuentes-Lemus et al., 2021*). Etablir une liste exhaustive de la nature des pontages protéiques existants n'est pas réaliste et ne constitue pas l'objectif de cette thèse, il en existe une large diversité. Certains restent d'ailleurs certainement non élucidés à ce jour. Néanmoins, il est possible de citer la mise en évidence de liens impliquant au moins un acide aminé aromatique ou soufré : Tyr-Cys, Lys-Cys, Trp-Gly, Tyr-His, Cys-Ser... (*Fu et al., 2004; Torosantucci et al., 2012; Nagy et al., 2012; C. G. Davies et al., 2014; Wensien et al., 2021*).

La formation de dimères d'acides aminés aromatiques par recombinaison radicalaire de deux radicaux Tyr<sup>\*</sup> et/ou Trp<sup>\*</sup> est un processus extrêmement rapide dû à la faible barrière énergétique de telles réactions. Lorsqu'un radical protéique est formé, il est susceptible de réagir avec le dioxygène pour former des radicaux peroxydes ce qui limite en théorie la recombinaison du radical avec lui-même. Toutefois, la formation de dimères reste biologiquement pertinente puisque certains radicaux d'acides aminés comme la tyrosine ou le tryptophane voient leurs vitesses de réaction avec O<sub>2</sub> bien plus faibles (Tyr<sup>\*</sup> + O<sub>2</sub>,  $k < 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ; Trp<sup>\*</sup> + O<sub>2</sub>,  $k < 4\cdot 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) devant celles des recombinaisons Tyr<sup>\*</sup> + Tyr<sup>\*</sup> et Trp<sup>\*</sup> + Trp<sup>\*</sup> ( $k > 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (*Hunter et al., 1989; Candeias et al., 1997; Fang et al., 1998; Carroll et al., 2017; Fuentes-Lemus et al., 2021*). De plus, la tyrosine et le tryptophane se trouvent être les cibles principales de nombreux oxydants comme le radical hydroxyle <sup>\*</sup>OH, qui se trouve être l'espèce la plus réactive et la plus oxydante ( $E^\circ(^*\text{OH}/\text{OH}) = 1.90 \text{ V vs. ESH}$ ) produite au sein des organismes lors d'un phénomène de stress oxydatif (*M. J. Davies & Dean, 1997; M. J. Davies, 2016; Musat et al., 2021*). Les oxydations à un électron comme celles induites par <sup>\*</sup>OH vont permettre la formation des radicaux Tyr<sup>\*</sup> et Trp<sup>\*</sup> qui vont être amenés à se recombinaisonner comme cela vient d'être évoqué. Les vitesses de réaction du radical hydroxyle avec différents acides aminés sont exposées dans le Tableau 1 (*M. J. Davies & Dean, 1997*). Les vitesses de réaction du radical <sup>\*</sup>OH avec la tyrosine et le tryptophane sont parmi les plus rapides en comparaison avec des acides aminés non aromatiques et non soufrés, la cystéine étant également très réactive en présence du radical <sup>\*</sup>OH.

<b>Substrat</b>	<b>Vitesse de réaction (dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>)</b>
Glycine	1.7 x 10 <sup>7</sup>
Alanine	7.7 x 10 <sup>7</sup>
Phénylalanine	6.5 x 10 <sup>9</sup>
Méthionine	8.3 x 10 <sup>9</sup>
<b>Tyrosine</b>	<b>1.3 x 10<sup>10</sup></b>
<b>Tryptophane</b>	<b>1.3 x 10<sup>10</sup></b>
Cystéine	3.4 x 10 <sup>10</sup>

Tableau 1: Constantes de vitesse des réactions du radical  $\cdot\text{OH}$  avec différents acides aminés (M. J. Davies & Dean, 1997).

Lorsque les protéines possèdent des résidus tyrosine et tryptophane, il a été montré que des transferts d'électrons opèrent. Les radicaux  $\text{Trp}^{\cdot}$  formés (détectés en absorption à 520 nm (*Getoff, 1992*)) disparaissent au profit de la formation de radicaux  $\text{TyrO}^{\cdot}$ , détectés à 405 nm (*Prütz et al., 1980; Faraggi et al., 1989; Aubert et al., 1999*). Ces transferts d'électrons ont été mis en évidence à l'échelle de la microseconde et lorsque les résidus sont plus ou moins proches spatialement (jusqu'à 1.3 nm) (*Prütz et al., 1982*).

La formation de bi-tyrosine a largement été étudiée. Les pontages tyrosine-tyrosine sont formés post-traductionnellement par l'intermédiaire d'enzymes et assurent une certaine stabilité et/ou élasticité des protéines structurées (*Andersen, 1964; Raven et al., 1971; Balasubramanian & Kanwar, 2002*). Néanmoins, l'exposition des protéines à un environnement oxydant peut mener à la formation de pontages tyrosine-tyrosine supplémentaires délétères (*Huggins et al., 1993; Giulivi et al., 2003a*). Ainsi, les radicaux oxydants comme le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), peroxy ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), le radical  $\text{NO}_2^{\cdot}$ , le radical carbonate ( $\text{CO}_3^{\cdot}$ ) ou encore l'exposition à des rayonnements ultra-violet (UV) peuvent être à l'origine de ces ponts bi-tyrosine non désirés (*Gross & Sizer, 1959; Prütz et al., 1985; Santos et al., 2000; Correia et al., 2012; Houée-Levin et al., 2015; Fuentes-Lemus, Silva, Barrias, et al., 2018; Figueroa et al., 2020*). La présence de liens tyrosine-tyrosine a été reportée dans de nombreux peptides ou protéines isolées (myoglobine, insuline, calmoduline, lysozyme...) mais également au sein d'échantillons biologiques de patients notamment atteints de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (dimères de peptide  $\beta$ -amyloïde) ou de Parkinson (dimères d' $\alpha$ -synucléine) (*Malencik & Anderson, 1994; Abdelrahim et al., 1997; Leeuwenburgh et al., 1997; Galeazzi et al., 1999; Kato et al., 2000; Kadlcik et al., 2004; Atwood et al., 2004; Correia et al., 2012; Torosantucci et al., 2012; Al-Hilaly et al., 2013, 2016; Fuentes-Lemus et al., 2019; Gatin et al., 2021*). Sans prétendre établir une liste exhaustive, la présence de bi-tyrosine a également été mise en évidence dans des lipoprotéines (athérosclérose), dans l'urine de patients diabétiques ou encore dans les protéines du cristallin (*Leeuwenburgh et al., 1997; Kato et al., 2000; Truscott & Friedrich, 2016*).



C'est également dans des poudres de lait infantile que la bi-tyrosine a été détectée (Z. Chen et al., 2019). En effet, ce type de produits de l'industrie agro-alimentaire nécessite un traitement thermique pour assurer la sécurité microbiologique mais ce dernier est aussi susceptible d'induire des oxydations protéiques. La bi-tyrosine ayant été détectée dans de nombreuses protéines oxydées, des tissus, des fluides biologiques et associée au développement de certaines pathologies, elle est utilisée comme biomarqueur de l'oxydation protéique (DiMarco & Giulivi, 2007). Le développement d'anticorps anti bi-tyrosine a même permis d'étendre les techniques de détection de ce produit d'oxydation (Kato et al., 2000).

### II.3. Focus sur l'oxydation de la tyrosine

Le radical tyrosyle issu de l'oxydation de la tyrosine est impliqué dans de nombreuses réactions catalytiques *in-vivo* : sa formation et celles des produits d'oxydation de la tyrosine en général ont été examinées (Sjöberg et al., 1978; Stubbe, 2003). L'abondance des écrits dans la littérature a permis d'acquérir de nombreuses connaissances tant sur la réactivité radicalaire de la tyrosine que sur les produits d'oxydation en résultant. Bien que les espèces transitoires sondées soient souvent proposées comme précurseurs d'un type donné d'espèces finales détectées, aucune étude ne s'est attardée à déterminer précisément quelles espèces radicalaires assurent la formation des produits de dégradation connus. Ainsi, le mécanisme de formation de certains produits d'oxydation comme la bi-tyrosine, pourtant utilisée comme biomarqueur oxydatif, est équivoque. Pour tenter de faire le point sur les manquements, une synthèse des connaissances des intermédiaires réactionnels et des principaux produits finaux d'oxydation sera proposée.

#### II.3.1. Espèces transitoires

Lors d'une attaque sur la tyrosine, il a été proposé que le radical  $\cdot\text{OH}$  soit susceptible (Figure 1) (Getoff, 1992):

- de s'additionner sur le cycle aromatique pour former des adduits radicalaires  $(\text{Tyr}+\text{OH})\cdot$  en positions *ortho* et *méta*
- d'arracher un hydrogène au niveau de la fonction phénol pour former le radical  $\text{TyrO}\cdot$
- ou d'arracher un hydrogène du carbone en position  $\beta$  du cycle aromatique, formant ainsi un radical sur la chaîne latérale, ici appelé  $\text{TyrC}_\beta\cdot$ .

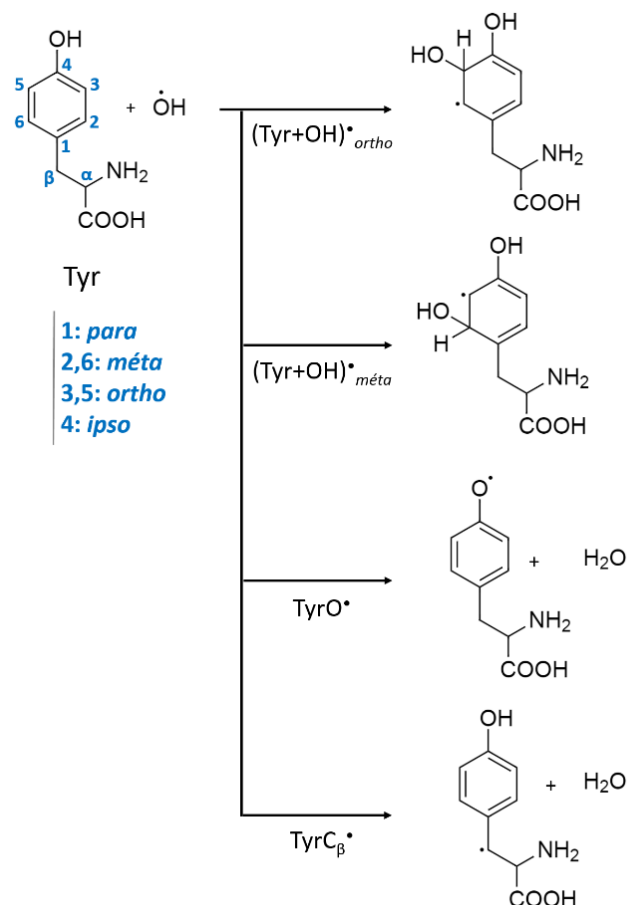


Figure 1: Sites proposés d'attaque du radical  $\cdot\text{OH}$  sur la tyrosine.

Des expériences de radiolyse pulsée résolue en temps ont permis l'obtention de spectres d'absorption transitoire des espèces radicalaires formées (Solar et al., 1984). L'attaque du radical  $\cdot\text{OH}$  sur la tyrosine induit la formation de plusieurs types d'intermédiaires : aux différentes échelles de temps sondées, diverses contributions spectrales sont détectées. Ainsi, quelques microsecondes après le pulse, plusieurs bandes d'absorption sont visibles avec des maxima à 260, 310, 330, 390 et 405 nm principalement. Une centaine de microsecondes après le pulse, le spectre d'absorption est modifié : les contributions à 310 et 330 nm s'amenuisent et celles à 260, 390 et 405 nm augmentent. Des spectres déconvolués à partir des différentes contributions sondées aux différents temps ont été calculés et ont permis une proposition d'attribution (Solar et al., 1984). Les bandes à 310 et 330 nm sont attribuées à la formation d'adduits (Tyr+OH) $\cdot$ , en position *ortho* et *mé*ta, résultant de l'addition du radical  $\cdot\text{OH}$  sur le cycle. Le groupement -OH du phénol est  $\pi$ -donneur et oriente la réaction du radical  $\cdot\text{OH}$  préférentiellement en *ortho* et *para* devant la position *mé*ta (Fossey et al., 1993). Néanmoins, ici, la position *para* est déjà substituée. A travers des études menées sur d'autres molécules phénoliques, Raghavan et al. ont tout de même proposé que les positions *para* et *ipso*

(Figure 1) puissent être le siège de la formation d'adduits (*Raghavan & Steenken, 1980*). Les bandes à 260, 390 et 405 nm ont été attribuées au radical TyrO\* (*Grossweiner & Mulac, 1959; Land et al., 1961; Land & Ebert, 1967; Land & Prütz, 1979*). Il est à noter qu'aucune des bandes d'absorption détectées n'ait été proposée pour expliquer la formation du radical sur la chaîne latérale alanine. Seule la détection d'ammoniac au sein de solutions de tyrosine irradiée a amené les auteurs à proposer sa formation (*Boguta & Dancewicz, 1981*). La croissance des signaux d'absorption assignés au radical TyrO\*, observée à l'échelle de la centaine de microsecondes après le pulse, a amené les équipes à suggérer que ce dernier puisse être formé par l'intermédiaire de deux mécanismes. Le premier correspondrait à l'oxydation directe à travers l'abstraction de l'hydrogène du phénol par  $\cdot\text{OH}$ , qui explique la présence des bandes d'absorption à 260, 390 et 405 nm dès les premières microsecondes qui suivent le pulse (*Chrysochoos, 1968*). La seconde voie de formation proposée est le réarrangement des adduits (Tyr+OH)\* suite à la perte d'une molécule d'eau, ce qui permettrait de justifier de l'augmentation des bandes caractéristiques de TyrO\* au cours du temps (*Land & Ebert, 1967*). La vitesse de disparition du signal de l'adduit (Tyr+OH)\*<sub>ortho</sub> suivant une cinétique du premier ordre, tout comme la vitesse de formation de TyrO\*, nombreuses sont les équipes qui suggèrent une corrélation entre ces deux espèces : l'une perd une molécule d'eau pour former l'autre. Pour autant, il a aussi été montré que la bande attribuée à l'adduit (Tyr+OH)\*<sub>méta</sub> suit une cinétique de disparition du second ordre, qui n'est pas en accord avec la perte d'une molécule d'eau (*Chrysochoos, 1968*). La formation du radical tyrosyle ne pourrait donc pas être expliquée par le réarrangement de ce dernier. Il a également été mis en avant que la vitesse de disparition du radical TyrO\* soit plus rapide que celle des adduits (Tyr+OH)\* (*Chrysochoos, 1968*). Les informations contradictoires s'accumulent et la relation de causalité entre les adduits (Tyr+OH)\* et le radical tyrosyle TyrO\* n'est donc toujours pas clairement établie.

Le radical tyrosyle, qu'il soit uniquement formé par abstraction de l'hydrogène du phénol ou qu'il provienne également du réarrangement des adduits (Tyr+OH)\*, est l'intermédiaire clé de l'oxydation de la tyrosine et est notamment à l'origine de la formation de bi-tyrosine (*Yamamoto & Okuda, 1975*). L'oxydation à un électron de la fonction phénol conduit dans un premier temps à la formation du radical sur l'oxygène TyrO\*, qui se trouve délocalisé sur l'ensemble du cycle aromatique par mésomérie (Figure 2).

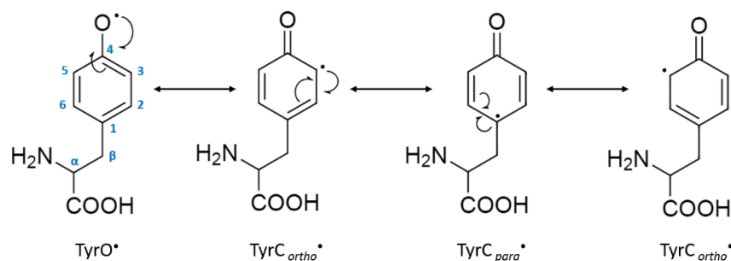


Figure 2: Formes mésomères du radical tyrosyle.

Des études de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) et de modélisation moléculaire ont permis d'obtenir les valeurs de densités de spin du radical sur les différents atomes de la tyrosine (Figure 3) (Oppiliart, 2007).

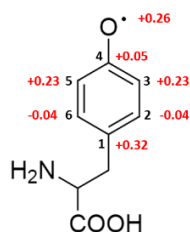


Figure 3: Densités de spin du radical tyrosyle.

Les densités de spin de l'atome d'oxygène et des carbones en *ortho* et *para* sont bien plus importantes devant celles des carbones en positions *méta* et *ipso*, ce qui corrobore les formes mésomères proposées. Des études de spectroscopies Infra-Rouge et Raman ont montré une élongation de la liaison C-O, en accord avec une délocalisation de l'électron sur l'oxygène (Kim et al., 1998; Tsuboi et al., 1998). Les valeurs exposées en Figure 3 sont celles calculées à l'échelle de l'acide aminé libre mais au sein de peptides ou de protéines, l'environnement du radical tyrosyle est susceptible de modifier la distribution de ses densités de spin et donc sa réactivité. Néanmoins, la détermination des densités de spin du radical tyrosyle au sein de protéines a permis de confirmer que l'atome d'oxygène ainsi que les carbones des positions *ortho* et *para* sont toujours les atomes possédant les valeurs de densités électroniques les plus importantes, et ce de loin devant les autres atomes (Tommos et al., 1995; Oppiliart, 2007).

Il est à noter que le radical hydroxyle n'est pas le seul oxydant susceptible d'induire la formation du radical tyrosyle. En théorie, tout oxydant à un électron dont le potentiel d'oxydo-réduction permet l'arrachement de l'hydrogène du phénol est en capacité de former un radical tyrosyle. Parmi ces oxydants à un électron, il est possible de citer le radical anion  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ , les radicaux anions halogénés ( $\text{Cl}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{Br}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{I}_2^{\cdot-}$ ) ou encore le radical azoture  $\text{N}_3^{\cdot}$  (Adams et al., 1972; S. Chen &

*Hoffman, 1973; Jovanovic et al., 1986*). Bien que non biologiquement pertinent, ce dernier possède un potentiel d'oxydo-réduction inférieur à celui du radical hydroxyle ( $E^\circ (N_3^*/N_3^-) = 1.33 \text{ V vs. ESH}$ ), ce qui limite sa réactivité. Il réagit en effet spécifiquement sur les acides aminés aromatiques. Contrairement au radical hydroxyle, il ne s'additionne pas sur le cycle aromatique et est uniquement susceptible d'arracher l'hydrogène de la fonction phénol pour former TyrO<sup>•</sup>. Les spectres d'absorption transitoire obtenus lors d'une exposition à N<sub>3</sub><sup>•</sup> sont donc caractéristiques du radical TyrO<sup>•</sup> uniquement (*Land & Prütz, 1979*). Trois bandes majoritaires sont détectées à 390 nm, 405 nm et une dernière en dessous de 300 nm. Elles correspondent effectivement aux caractéristiques spectrales du radical tyrosyle TyrO<sup>•</sup> précédemment décrites.

### II.3.2. Produits d'oxydation

#### II.3.2.1. Hydroxylation

Bien que le rôle des adduits (Tyr+OH)<sup>•</sup> dans la formation du radical tyrosyle ne soit pas édifié, il a en revanche été proposé que ces intermédiaires radicalaires permettent la formation de produits hydroxylés comme la DOPA (3,4-dihydroxy-phénylalanine), présentée en Figure 4 (*Lynn & Purdie, 1976*).

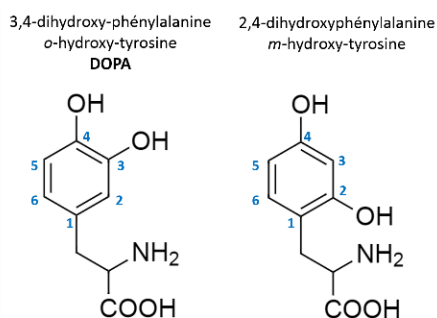


Figure 4: Produits hydroxylés de la tyrosine.

Classiquement, deux mécanismes sont proposés : la dismutation de l'adduit (Tyr+OH)<sup>•</sup><sub>ortho</sub>, qui conduit à la formation de DOPA et à la régénération de tyrosine (*Boguta & Dancewicz, 1981*). Une seconde voie de formation a été décrite, et ce dans des conditions aérobies, comme résultant de la réaction d'un adduit (Tyr+OH)<sup>•</sup> avec le dioxygène pour former un peroxyde instable qui se stabilise par la suite en DOPA (*Garrison, 1987; Houée-Levin et al., 2015*). De manière analogue, l'adduit (Tyr+OH)<sup>•</sup><sub>méto</sub> conduirait à la formation de 2,4-dihydroxy-phénylalanine (Figure 4). Pour autant, son existence n'a jamais été rigoureusement prouvée. Dans la littérature, les produits hydroxylés issus de l'oxydation de la tyrosine ne se limitent pas à la DOPA et à la 2,4-dihydroxy-phénylalanine. En effet, Möller et al. ont mis en évidence la formation d'un produit hydroxylé en position *para* de la tyrosine (*p*-hydroxy-tyrosine ou 1,4-dihydroxy-phénylalanine) lors de l'attaque de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (*Möller et al.,*

2012). En réagissant avec le radical  $\text{TyrO}^\bullet$ , il forme un hydroperoxyde, ensuite réduit en un produit hydroxylé plus stable (Figure 5).

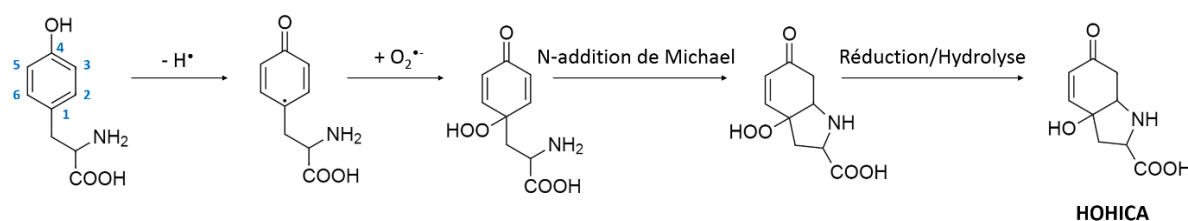


Figure 5: Formation d'un produit d'hydroxylation de la tyrosine en position *para*.

Les positions *ortho* et *para* du radical tyrosyle sont proposées comme sites d'attaque d' $\text{O}_2^\bullet$ . Les produits finaux d'oxydation résultant des réactions entre les positions *ortho* et *para* du radical  $\text{TyrO}^\bullet$  et  $\text{O}_2^\bullet$  sont donc respectivement la 2,4-dihydroxy-phénylalanine (DOPA) et ce qui pourrait être nommé la *p*-hydroxy-tyrosine (Möller *et al.*, 2012). Sur la base de ces résultats, lors d'études menées avec le radical  $^\bullet\text{OH}$ , la réactivité de la position *para* semble avoir été omise et la diversité des produits d'hydroxylation formés reste incomplète.

### II.3.2.2. Dimérisation

Quel que soit le mécanisme de formation du radical tyrosyle, sa recombinaison avec lui-même est à l'origine de la formation de bi-tyrosine. Alors que plusieurs formes mésomères du radical tyrosyle ont été mises en évidence dans les études de radiolyse pulsée, aucun lien n'est établi entre la formation de bi-tyrosine et ces dernières. Elles sont susceptibles de se recombiner entre elles et pourraient mener à plusieurs structures différentes. Dans la majorité des articles et revues s'intéressant au dimère de tyrosine, il y est décrit comme l'*ortho-ortho* bi-tyrosine (Figure 6). Comme son nom l'indique, ce dimère semble être issu de la recombinaison entre deux radicaux  $\text{Tyr}_{\text{ortho}}^\bullet$ .

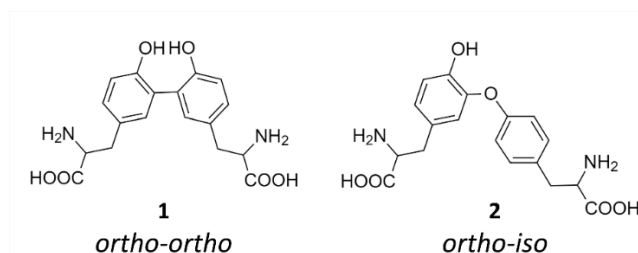


Figure 6: Structures des dimères *ortho-ortho* et *ortho-iso* de tyrosine.

Des expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont permis de confirmer la structure du dimère *ortho-ortho* et plus récemment, des expériences menées avec de la tyrosine spécifiquement deutériée sur les positions *ortho* ont permis de prouver l'implication de ces positions dans la liaison

covalente (Jacob et al., 1996; Saeed et al., 2006; Blouquit et al., 2007). Néanmoins, la formation d'un autre isomère de bi-tyrosine (nommé *iso* ou *ortho-iso* bi-tyrosine) a pu être soulignée : il pourrait correspondre à la recombinaison entre le radical centré sur l'oxygène du phénol (TyrO<sup>\*</sup>) et le radical localisé sur le carbone en *ortho* TyrC<sub>ortho</sub><sup>\*</sup> (Figure 6) (Karam et al., 1984). Sa structure a pu être élucidée grâce à une dérivation des positions phénoliques post-oxydation. Par une analyse en spectrométrie de masse, il a alors été possible de montrer que l'une des positions phénoliques était impliquée dans la liaison covalente et qu'elle n'avait donc pas pu être dérivée. Malgré la mise en évidence de ce second isomère, un grand nombre d'études sur l'oxydation de la tyrosine ou des protéines de manière générale néglige cette pluralité structurale. Malgré l'existence de trois formes mésomères du radical tyrosyle, l'implication de la position *para* dans la formation de bi-tyrosine n'a jamais été envisagée, bien que sa réactivité ait clairement été mise en évidence dans la formation de produits d'hydroxylation (Möller et al., 2012).

Au-delà du processus de dimérisation de la tyrosine, il a été montré à plusieurs reprises que la tyrosine est capable de former des oligomères d'ordre supérieur. Des trimères ont été mis en évidence (Figure 7) : la tri-tyrosine qui implique deux liaisons *ortho-ortho* ainsi que la pulcherosine qui est constituée d'un pontage *ortho-ortho* et d'un autre *ortho-iso* (Jacob et al., 1996). Il s'avère même que des oligomères jusqu'à l'octamère ont pu être détectés dans le cadre de la centrine 2 humaine, qui s'oligomérisent *via* sa tyrosine terminale mais pour laquelle la nature précise de la liaison covalente n'est pas connue (Brun et al., 2010).

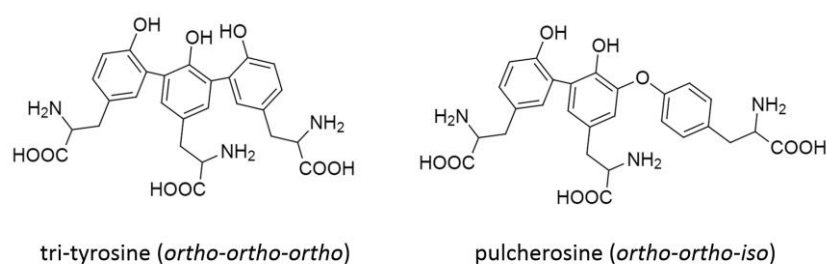


Figure 7: Structures de la tri-tyrosine et de la pulcherosine.

Dans la littérature, « la » bi-tyrosine, toujours représentée comme le dimère *ortho-ortho*, possède des propriétés d'absorption et de fluorescence bien spécifiques. La valeur du pKa du dimère de tyrosine est de 7.25 : la forme acide du dimère possède un maximum d'absorption à environ 285 nm alors que celui de la forme basique se trouve à 315 nm (Malencik & Anderson, 2003; Reid et al., 2019). Une émission de fluorescence caractéristique à environ 410 nm lors d'une excitation dans l'UV est observée et c'est cette propriété spectroscopique qui est très souvent utilisée pour mettre en

évidence la formation de bi-tyrosine, à la fois à l'échelle *in-vitro* mais aussi au sein d'échantillons biologiques (Kungl et al., 1994; Malencik & Anderson, 2003; Colombo et al., 2015; Zamora et al., 2020). Malgré l'existence d'au moins deux isomères de bi-tyrosine, aucune étude n'a précisé si les deux dimères fluorescent ou si un seul d'entre eux est à l'origine de cette propriété. D'après les structures (Figure 6), le dimère *ortho-ortho* semble relativement contraint suite à la formation de la liaison C-C entre les deux cycles aromatiques. Les voies de désexcitation non radiatives d'une telle molécule sont alors restreintes et il est plus probable qu'elle retrouve son état fondamental *via* une émission de fluorescence. Le dimère *ortho-iso* quant à lui apparaît moins contraint : la présence de l'atome d'oxygène entre les deux entités monomériques semble atténuer la rigidité de la structure. L'*ortho-iso* est ainsi présumé moins à même de fluorescer que l'*ortho-ortho*.

#### II.4. Méthodes de détection des pontages covalents dans les protéines

L'étude de la formation de pontages covalents intra- et interprotéiques reste actuellement un challenge analytique de taille malgré les avancées méthodologiques des dernières années. L'analyse des pontages protéiques covalents peut être scindée en trois grandes catégories :

i) l'analyse du changement de poids moléculaire : si des dimères sont formés, des techniques de séparation par chromatographie d'exclusion stérique ou par migration sur des gels d'électrophorèse peuvent permettre leur mise en évidence ;

ii) l'analyse de changements structuraux et/ou de conformation de la protéine oxydée en comparaison avec la protéine native : la formation de liens covalents, qu'ils aient lieu au sein d'une même entité ou entre deux monomères est susceptible d'induire un changement de structure. Les techniques classiquement utilisées pour mener à bien ce type d'analyse sont donc par exemple le dichroïsme circulaire, qui permet d'évaluer et de quantifier la structure secondaire des protéines (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ ) ou encore la cristallographie aux rayons X dans le cas où la protéine peut être cristallisée;

iii) l'analyse de la nature chimique exacte des résidus impliqués dans le pontage, principalement investiguée par des méthodes couplant des techniques chromatographiques séparatives avec la spectrométrie de masse.



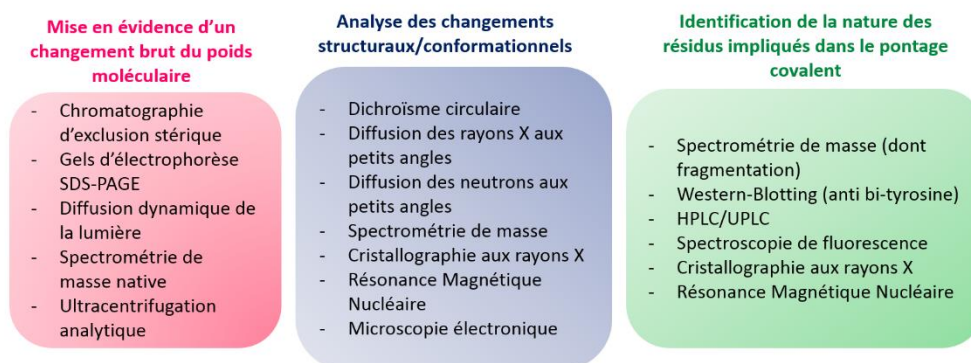


Figure 8: Méthodes analytiques classiquement utilisées dans le cadre de l'étude de pontages protéiques covalents.

Lorsque les protéines à étudier proviennent de matrices complexes (tissus, fluides biologiques, cultures cellulaires...), des étapes d'extraction et/ou d'enrichissement des échantillons sont nécessaires et conditionnent la mise en pratique des techniques d'analyse précédemment évoquées.

# III. STRATEGIES

## III.1. Systèmes d'étude

### III.1.1. Centrine 2 humaine

Historiquement, la centrine a été découverte en 1984 par Salisbury et al. dans les corps basaux d'algue verte au sein desquels elle assure un rôle de contraction des fibres sensibles au calcium (*Salisbury et al., 1984*). La famille des centrines fait partie d'une catégorie de protéines présentant des domaines dits « mains-EF », capables de lier les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Leur nom de « centrine » est en lien direct avec leur localisation cellulaire, au niveau du centrosome. Le centrosome est un organe cytoplasmique situé à proximité du noyau dans les cellules animales (Figure 9). Il est constitué de deux centrioles perpendiculaires l'un à l'autre, eux-mêmes composés de microtubules et entourés d'un matériel péricentriolaire. C'est le centre d'organisation des microtubules : il est à l'origine de la formation du fuseau mitotique nécessaire à la division cellulaire. La centrine 2 se situe au niveau des centrioles et est requise pour assurer leur duplication ainsi que la formation correcte du fuseau mitotique (*Salisbury, 1995; Lutz et al., 2001; Salisbury et al., 2002; Rice & Agard, 2002*). Chez les mammifères, il existe quatre centrines et deux d'entre elles sont ubiquitaires (les centrines 2 et 3) et ont un rôle dans le processus de division cellulaire (*Laoukili et al., 2000*). La centrine 2, qui sera la protéine principale d'étude de cette thèse, est principalement localisée au niveau du centrosome mais est aussi présente en quantité non négligeable dans le noyau (*Paoletti et al., 1996*).

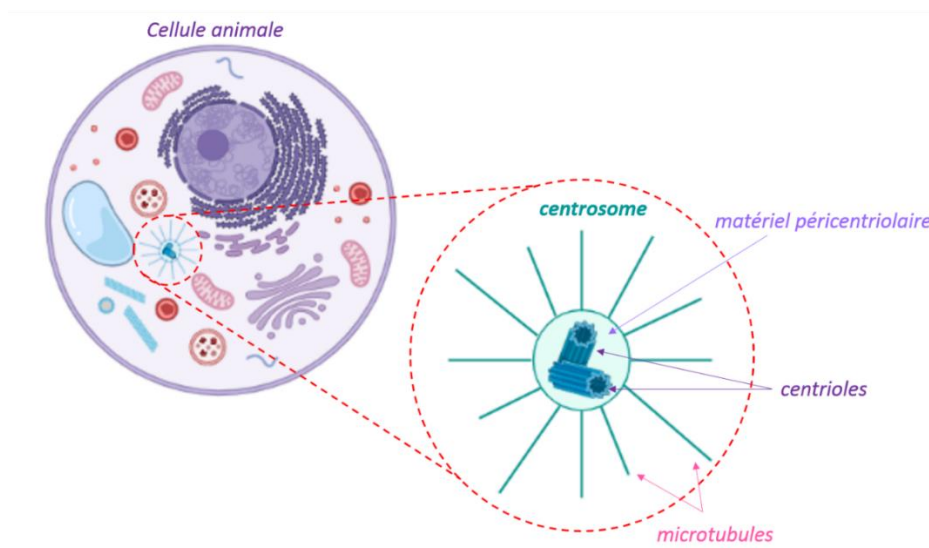


Figure 9: Schéma du centrosome. Localisation dans la cellule et constitution: deux centrioles sont entourés d'un matériel péricentriolaire et de microtubules. Créé avec Biorender.com.

La centrine 2 humaine est une protéine de 172 acides aminés qui pèse environ 19 kDa. Sa séquence est présentée ci-après, en Figure 10. Une particularité de cette protéine est qu'elle possède une unique tyrosine, qui se trouve être l'acide aminé C-terminal, mais aucun résidu cystéine ou tryptophane.

10	20	30	40	50	60	70
MASNFKKANM	ASSSQRK RMS	PKPEL TEEQK	QEIREAFDLF	DADGTGTIDV	KELKVAMRAL	GFEPKKEEIK
80	90	100	110	120	130	140
KMISEIDKEG	TGKMNF GDFL	TVMTQKMSEK	DTKEEILKAF	KLFDDDET GK	ISFKNLKRVA	KELGENLTDE
150	160	170				
ELQEMIDEAD	RDGDGEVSEQ	EFLRIMKKTS	LY			

Figure 10: Séquence de la centrine 2 humaine. La tyrosine est indiquée en rouge.

Elle possède deux domaines distincts (N- et C-terminaux) et une structure assez flexible. Les vingt-cinq premiers acides aminés du domaine N-terminal sont non structurés et possèdent une tendance à s'auto-assembler (*Tourbez et al., 2004*). Une forme tronquée de la centrine 2 (centrine 2  $\Delta$ 25) a d'ailleurs volontairement été construite pour pallier cet inconvénient lors d'études *in-vitro* (*Blouquit et al., 2007*). La centrine 2 possède quatre sites de liaison au calcium, qui correspondent aux quatre mains-EF déjà évoquées, et deux d'entre eux sont actifs et localisés sur le domaine C-terminal (*Craig et al., 2006*). Sur le domaine C-terminal également, se trouve une séquence consensus de phosphorylation,  $^{167}$ KKTSLY $^{172}$ , qui est la cible de la protéine kinase A. En 2001, Lutz et al. ont plus précisément montré qu'au moment de l'entrée en mitose des cellules, la serine 170 est phosphorylée et cette modification post-traductionnelle de la centrine 2 est probablement à l'origine de la duplication des centrioles (*Lutz et al., 2001*). Il a été montré que lorsque l'expression de la centrine 2 est réduite de 90% dans des cellules humaines, la duplication des centrioles n'est plus fonctionnelle et qu'elle est à même de mener à la formation de cellules uni- ou acentriolaires (*Rice & Agard, 2002*). D'autre part, dans des cellules de cancer du sein, des anomalies au niveau des centrosomes ont été mises en évidence, notamment la présence de centrioles surnuméraires et une potentielle corrélation avec une phosphorylation anormale de la centrine 2 a été proposée (*Lingle et al., 1998*).

Dans le cadre de l'étude de la dimérisation de la centrine 2 humaine par sa tyrosine terminale, des modèles simplifiés de la protéine seront aussi considérés. Ils permettront notamment de mener à bien l'analyse structurale des dimères. Le système le plus simple est évidemment la tyrosine libre. Puis, des tyrosines dont certaines fonctions chimiques ont été protégées seront considérées, dans le but de complexifier le système tout en restant à l'échelle de l'acide aminé. Ensuite, deux peptides de séquence choisie seront étudiés :

- i) Le peptide KTSLY, dont la séquence correspond aux cinq derniers acides aminés de la centrine 2 humaine : la tyrosine y est donc toujours terminale ;
- ii) Le peptide KTSLYG qui correspond simplement à l'ajout d'un résidu glycine au peptide précédent en position C-terminale, au sein duquel la tyrosine n'est donc plus terminale.

### III.1.2. Calmoduline

La calmoduline (CaM) fait partie de la famille des calci-protéines, comme la centrine 2 humaine. Elles possèdent 52.4% de similarité de séquence. C'est une protéine qui est constituée de 149 acides aminés dont la séquence est exposée en Figure 11. La calmoduline possède deux tyrosines mais aucun tryptophane ni aucune cystéine et sa dimérisation par des pontages tyrosine-tyrosine a précédemment été mise en évidence (*Malencik & Anderson, 1994*). La considération de cette protéine permettra de complexifier le système par rapport à celui de la centrine 2 puisqu'elle possède deux tyrosines qui sont non terminales.

10	20	30	40	50	60	70
MADQLTEEQI	AEFKEAFSLF	DKDGDGTITT	KELGTVMRSL	GQNPTEAELQ	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL
80	90	100	110	120	130	140
TMMARKMKDT	DSEEEIREF	RVFDKDGNGY	ISAAELRHVM	TNLGEKLTDE	EVDEMIREAD	IDGDGQVNYE
EFVQMMTAK						

Figure 11: Séquence de la calmoduline. Les tyrosines sont indiquées en rouge.

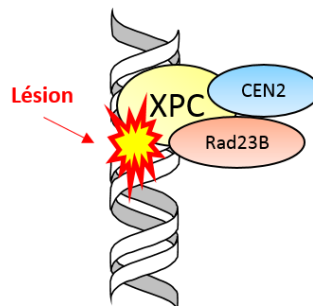
### III.1.3. Centrine 2 humaine et XPC

Au-delà de son implication dans le mécanisme de duplication des centrioles, la centrine 2 a également été identifiée dans un complexe protéique aussi composé de la XPC et de Rad23B (Figure 12) (*Araki et al., 2001*). La protéine XPC est impliquée dans l'étape de reconnaissance de lésions de l'ADN de la sous voie de réparation par excision de nucléotides, NER (« Nucleotide Excision Repair ») et c'est dans ce contexte qu'elle se trouve en interaction avec la centrine 2. Au sein des organismes, l'ADN peut être endommagé par le métabolisme cellulaire (erreurs de réplication, modifications spontanées de base ou attaques par les espèces réactives de l'oxygène) comme à travers l'intermédiaire de sources exogènes (rayonnements ionisants, rayonnements ultraviolets, agents chimiques). La large diversité des dommages qui peuvent être formés implique l'existence de divers systèmes de réparation (*Chatterjee & Walker, 2017*). Le NER permet la réparation d'une importante variété de lésions, y compris celles induites par les rayonnements UV (formation de photoproduits). La première étape du NER consiste en la reconnaissance de la lésion (Figure 12), étape clé permettant le

déclenchement de l'excision (*Scharer, 2013*). La protéine XPC a un rôle senseur des lésions au sein de la voie de réparation par excision de nucléotide (*Puumalainen et al., 2016*).

#### Réparation par Excision de Nucléotide (NER)

##### 1. Reconnaissance de la lésion



##### 2. Vérification de la lésion

##### 3. Excision

##### 4. Resynthèse

Figure 12: Etapes du NER. L'hétérotrimère XPC-Rad23B-CEN2 intervient dans la première étape de reconnaissance de la lésion.

En 1968, Cleaver mit en évidence le lien entre défaut des réparations des dommages induits par les UV, donc du NER et la maladie génétique *Xeroderma Pigmentosum* (XP) dont les malades possèdent une sensibilité accrue aux UV et une prédisposition importante aux cancers de la peau (*Cleaver, 1968*). En effet, lors de mutations génétiques impliquées dans l'expression de la XPC, des défauts de réparation des dommages apparaissent.

XPC existe sous la forme d'un hétérotrimère avec la centrine 2 et Rad23B schématisé en Figure 12 (*Masutani et al., 1994; Shivji et al., 1994; Araki et al., 2001*). Au sein de ce complexe, il a été montré que c'est XPC qui interagit avec l'ADN endommagé. Seules, la centrine 2 et Rad23B ne possèdent pas d'affinité pour les lésions mais il a été mis en évidence qu'*in-vitro*, elles permettent de stimuler l'interaction de XPC avec l'ADN lésé (*Araki et al., 2001; Nishi et al., 2005*). Ainsi, pour que la reconnaissance des dommages soit optimale, XPC semble devoir interagir avec ses partenaires protéiques.

La XPC est constituée de 940 acides aminés (125 kDa) dont la séquence est présentée en Figure 13. Ses domaines d'interaction avec l'ADN endommagé, Rad23B et la centrine 2 se situent dans sa partie C-terminale (*Li et al., 1997; Uchida et al., 2002; Popescu et al., 2003*).

10	20	30	40	50	60	70
MARKRAAGGE	PRGRELRSQK	SKAKSKARRE	EEEEDAFEDE	KPPKKSLLSK	VSQGKRKRGC	SHPGGSADGP
80	90	100	110	120	130	140
AKKKVAKVTV	KSENLKVIKD	EALSDGDDLK	DFPSDLKKAH	HLKRGATMNE	DSNEEEEESE	NDWEEVEELS
150	160	170	180	190	200	210
EPVLGDVRES	TAFSRSLLPV	KPVEIEIETP	EQAKTRERSE	KIKLEFETYL	RRAMKRFNKG	VHEDTHKVHL
220	230	240	250	260	270	280
LCLLANGFYR	NNICSQPDLH	AIGLSIIPAR	FTRVLPRDVD	TYYLSNLVKW	FIGTFTVNAE	LSASEQDNLQ
290	300	310	320	330	340	350
TTLEERRFAIY	SARDDEELVH	IFLLILRALQ	LLTRLVLSLQ	PIPLKSATAK	GKKPSKERLT	ADPGGSSETS
360	370	380	390	400	410	420
SQVLENHTKP	KTSKGTKQEE	TFAKGTCRPS	AKGKRNGGGR	KKRSKPSSSE	EDEGPGDKQE	KATQRRPHGR
430	440	450	460	470	480	490
ERRVASRVSY	KEESGSDEAG	SGSDFELSSG	EASDPSDEDS	EPGPPKQRKA	PAPQRTKAGS	KSASRTHRGS
500	510	520	530	540	550	560
HRKDPSLPAA	SSSSSSSKRG	KKMCSDEKA	EKRSIAGIDQ	WLEVFCEQEE	KWVCVDCVHG	VVGQPLTCYK
570	580	590	600	610	620	630
YATKPMYVV	GIDSDGWVRD	VTQRYDPVWM	TVTRKCRVDA	EWVAETLRPY	QSPFMDREKK	EDLEFQAKHM
640	650	660	670	680	690	700
DQPLPTAIGL	YKNHPLYALK	RHLLKYEAIY	PETAALGYC	RGEAVYSRDC	VHTLHSRDTW	LKKARVVRLG
710	720	730	740	750	760	770
EVPYKMKVGF	SNRARKARLA	EPQLREENDL	GLFGYWQTEE	YQPPVAVDVK	VPRNEFGNVY	LFLPSMMPIG
780	790	800	810	820	830	840
CVQLNLPNLH	RVARKLDIDC	VQAITGFDFH	GGYSHPVTDG	YIVCEEFKDV	LLTAWENEQA	VIERKEKEKK
850	860	870	880	890	900	910
EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE	AAAPHTDAGG	GLSSDEEEGT	SSQAEAARIL	AASWPQNRD
920	930	940				
EKQKLKGGP	KKTREKKA	ASHLFPFEQL				

Figure 13: Séquence de la XPC. La séquence du peptide P17XPC est indiquée en rose.

Les interactions à l'origine de la formation du complexe entre la centrine 2 humaine et la XPC ont d'abord été étudiées par bio-informatique et à travers des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC, « Isothermal Titration Calorimetry ») (Popescu et al., 2003; Nishi et al., 2005). Elles ont permis de prédire la séquence potentielle d'interaction avec la centrine 2. Il s'agit d'un peptide de dix-sept acides aminés, appelé P17XPC dont la séquence a été notifiée en rose sur la Figure 13 :  $^{847}\text{NWKLLAKGLLIRERLKR}^{863}$ . Il a été montré que la phosphorylation de la serine 170 de la centrine 2 ne modifie ni l'interaction ni l'affinité du complexe formé avec P17XPC (Yang et al., 2006). Une fois ce peptide identifié, plusieurs équipes se sont attelées à analyser la structure tridimensionnelle de ce complexe. Par RMN puis par cristallographie, il a été montré que c'est la partie C-terminale de la centrine 2 qui interagit avec le peptide issu de la XPC (Thompson et al., 2006; Yang et al., 2006). Les deux mains-EF du domaine C-terminal de la centrine adoptent une conformation ouverte et leurs deux hélices  $\alpha$  sont quasi-perpendiculaires l'une à l'autre, créant alors une cavité hydrophobe (Figure 14). C'est dû aux interactions avec cette poche hydrophobe que le peptide P17XPC, désordonné lorsqu'il est isolé, se structure en hélice  $\alpha$  de l'arginine  $^{847}\text{N}$  à la leucine  $^{855}\text{L}$ . Les interactions à l'origine de la stabilité du complexe sont électrostatiques et hydrophobes : elles impliquent majoritairement une

triade hydrophobe composée du tryptophane <sup>848</sup>W, des leucines <sup>851</sup>L et <sup>855</sup>L du peptide (Figure 14) et de la cavité du domaine C-terminal de la centrine.

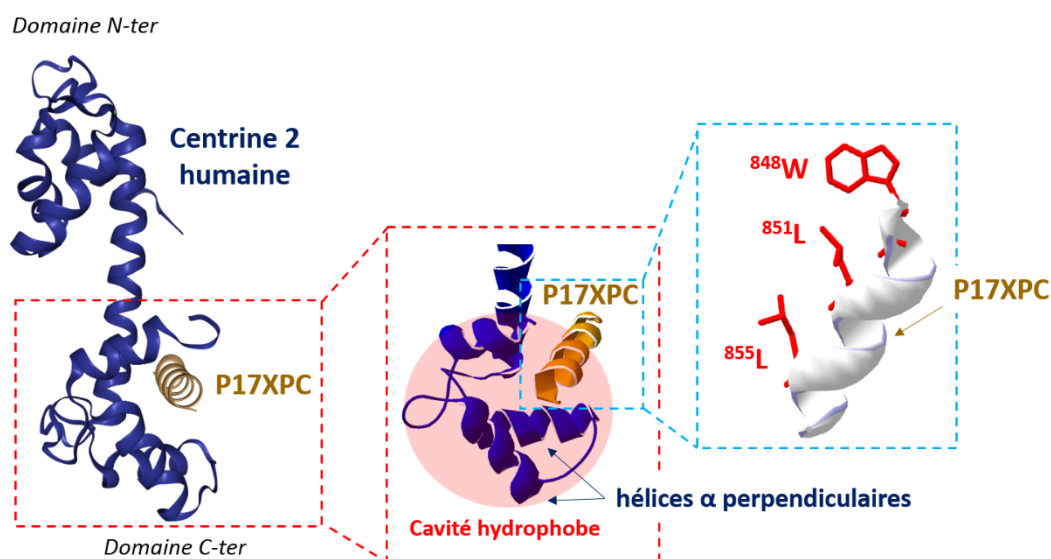


Figure 14: Structure du complexe CEN2-P17XPC obtenu par diffraction des rayons X (Thompson et al., 2006). Fichier PDB : 2OBH. La partie zoomée en rouge représente la zone d'interaction entre les deux partenaires. La partie zoomée en bleu schématise les interactions hydrophobes de la triade <sup>848</sup>W<sup>851</sup>L<sup>855</sup>L du peptide P17XPC avec la poche de la centrine 2 (inspiré de (Charbonnier et al., 2007)).

Des études *in-vitro* ont montré que lorsque le tryptophane <sup>848</sup>W est muté en alanine, aucune interaction entre la centrine 2 et P17XPC n'est détectée (Charbonnier et al., 2007). Ce résidu joue donc un rôle primordial dans la stabilité du complexe. Parmi les acides aminés de la centrine 2 impliqués dans les interactions hydrophobes et électrostatiques, la tyrosine terminale (Y<sup>172</sup>) a été proposée comme interagissant avec le peptide P17XPC. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle il a été possible de déceler les six derniers acides aminés de la centrine 2, dont la structure est généralement très désordonnée et flexible (Thompson et al., 2006). *In-cellulo*, des expériences menées avec des mutants de la XPC ont permis de confirmer que le tryptophane <sup>848</sup>W est critique pour l'interaction CEN2-XPC et que sa seule substitution par un autre acide aminé inhibe l'interaction entre les deux protéines (Charbonnier et al., 2007). Acu et al. ont étudié la localisation subcellulaire de la centrine 2 dans des cellules de cancer du sein lors de dommages à l'ADN (Acu et al., 2010). Il a été mis en évidence que cette dernière est dépendante de la présence de la protéine XPC. Lorsque la lignée cellulaire utilisée exprime XPC, la centrine 2 se « déplace » du cytoplasme vers le noyau de manière XPC-dépendante. Dans le cas d'une réduction ou d'une absence d'expression de la XPC, celle de la centrine 2 est aussi réduite et devient même indétectable dans la fraction nucléaire. Aussi, il a été montré que la centrine 2 possède une tendance à s'agréger au niveau du centrosome lorsqu'elle n'est pas délocalisée au noyau (Renaud, 2008; Renaud et al., 2011). A l'inverse, lorsque la XPC est

surexprimée dans des cellules, la centrine 2 est détectée en quantité beaucoup plus importante au noyau en comparaison avec un niveau d'expression basal de la XPC. Cette relocalisation nucléaire s'effectue au détriment de sa présence dans le centrosome. Or, la centrine 2 ne possède pas de signal de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*). Il est ainsi possible de proposer que sa relocalisation soit permise par son interaction avec la XPC, pourvue d'un NLS. Dans ce contexte, la nature exacte de l'interaction existante entre la centrine 2 et la XPC lors d'un dommage causé à l'ADN apparaît donc essentielle à étudier.

Dans le cadre de l'étude de la dimérisation oxydative *via* des acides aminés aromatiques et étant donné que la XPC a été identifiée comme partenaire cellulaire de la centrine 2, l'un des objectifs est de s'intéresser à leur comportement de dimérisation lorsqu'elles se trouvent sous la forme d'un complexe protéique. Pour ce faire, deux fragments de la XPC seront étudiés : i) le peptide P17XPC, qui a été présenté précédemment comme la partie identifiée de la XPC qui interagit avec la centrine 2 et qui contient un résidu tryptophane ; ii) la protéine XPC3, composée des 127 derniers acides aminés de la séquence de la XPC : elle contient 3 tryptophanes et une tyrosine mais pas de cystéine. Sa séquence est présentée en Figure 15. Leur considération va permettre, à l'échelle de la protéine isolée comme à l'échelle de complexes protéiques avec la centrine 2, de complexifier la nature des pontages covalents impliquant des acides aminés aromatiques susceptibles d'être formés (tyrosine-tyrosine, tyrosine-tryptophane et tryptophane-tryptophane). Aussi, dans ce contexte, la structure des pontages tyrosine-tryptophane sera investiguée à l'échelle des acides aminés en considérant un mélange de tyrosine et tryptophane libres.

820	830	840	850	860	870	880
MEEFKDV	LLTAWENEQA	VIERKEKEKK	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE	AAAPHTDAGG
890	900	910	920	930	940	
GLSSDEEEGT	SSQAEAAARIL	AASWPQNRED	EKQKLGKGGP	KKTKREKKA	ASHLFPFEQL	

Figure 15: Séquence de la XPC3. Les tryptophanes sont indiqués en bleu et la tyrosine en rouge.

#### III.1.4. Echelle cellulaire

La dernière étape de l'étude de dimérisation oxydative de protéines *via* des pontages d'acides aminés aromatiques sera menée à l'échelle cellulaire. Deux types de cellules humaines de cancer du sein qui expriment la centrine 2 seront considérés. Ils seront présentés plus en détails dans le chapitre VIII et c'est la dimérisation de la centrine 2 par le biais de ponts bi-tyrosine qui sera particulièrement investiguée.

La Figure 16 propose une représentation schématique des différents systèmes qui seront étudiés dans le cadre de ce manuscrit et de leur lien avec la centrine 2 humaine, qui est le point d'ancrage de ce projet de recherche.



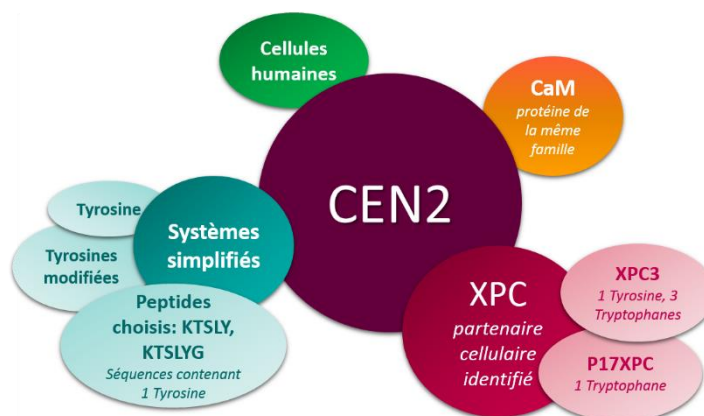


Figure 16: Illustration des systèmes d'étude.

### III.2. Génération de pontages covalents par radiolyse

Pour permettre la formation de dimères covalents au sein des systèmes qui viennent d'être présentés, ce sont des radicaux oxydants qui vont être générés et notamment le radical hydroxyle,  $\cdot\text{OH}$ . La production de radicaux oxydants comme le radical hydroxyle est classiquement réalisée par voie chimique, à travers la réaction de Fenton. Cette dernière consiste en la décomposition du peroxyde d'hydrogène par des ions métalliques comme l'ion ferreux (*Fenton, 1894*). Cette méthode présente plusieurs avantages : elle est facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Toutefois, la production de radicaux n'est pas nécessairement homogène au sein de la solution puisqu'ils sont produits à proximité des ions  $\text{Fe}^{2+}$ , susceptibles d'être fixés par certaines protéines possédant des sites de fixation au fer. De plus, la réaction de Fenton ne permet pas de connaître précisément la quantité de radicaux produits d'autant plus qu'il s'agit d'une réaction autocatalytique.

Une autre méthode de production de radicaux est la méthode physique d'exposition à un rayonnement ionisant. Un rayonnement ionisant est un rayonnement électromagnétique qui possède une énergie suffisante pour ioniser la matière qu'il traverse. Les rayonnements directement ionisants (flux d'électrons, protons, particules  $\alpha$ ) peuvent être distingués des rayonnements indirectement ionisants (photons X et  $\gamma$ ) (*Tilquin, 2001*). Dans le cadre de cette étude, ce sont des photons  $\gamma$  qui seront utilisés. Les échantillons se trouvant en solution aqueuse, c'est l'eau qui va être ionisée et qui va permettre la production de radicaux oxydants notamment. La radiolyse de l'eau s'effectue en plusieurs étapes et ce à différentes échelles de temps (*Mozumder & Hatano, 2004*). Un schéma récapitulatif est proposé en Figure 17. La première étape est l'étape dite physique : l'eau peut y être excitée électroniquement ou ionisée : un électron, appelé électron pré-solvaté peut être éjecté pour former le radical cation de l'eau. Ensuite, c'est l'étape physico-chimique : l'équilibre thermique s'établit, l'électron est solvaté pendant que l'eau excitée est dissociée en radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\cdot\text{H}$  et que le

radical cation de l'eau réagit à travers différents mécanismes. Enfin, à l'échelle de  $10^{-7}$  secondes, c'est l'étape chimique : les espèces formées diffusent et réagissent en fonction de leur réactivité propre. Ces espèces, radicalaires ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{H}$ ,  $e^-_{aq}$ ) ou moléculaires ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) constituent donc les produits de la radiolyse de l'eau.

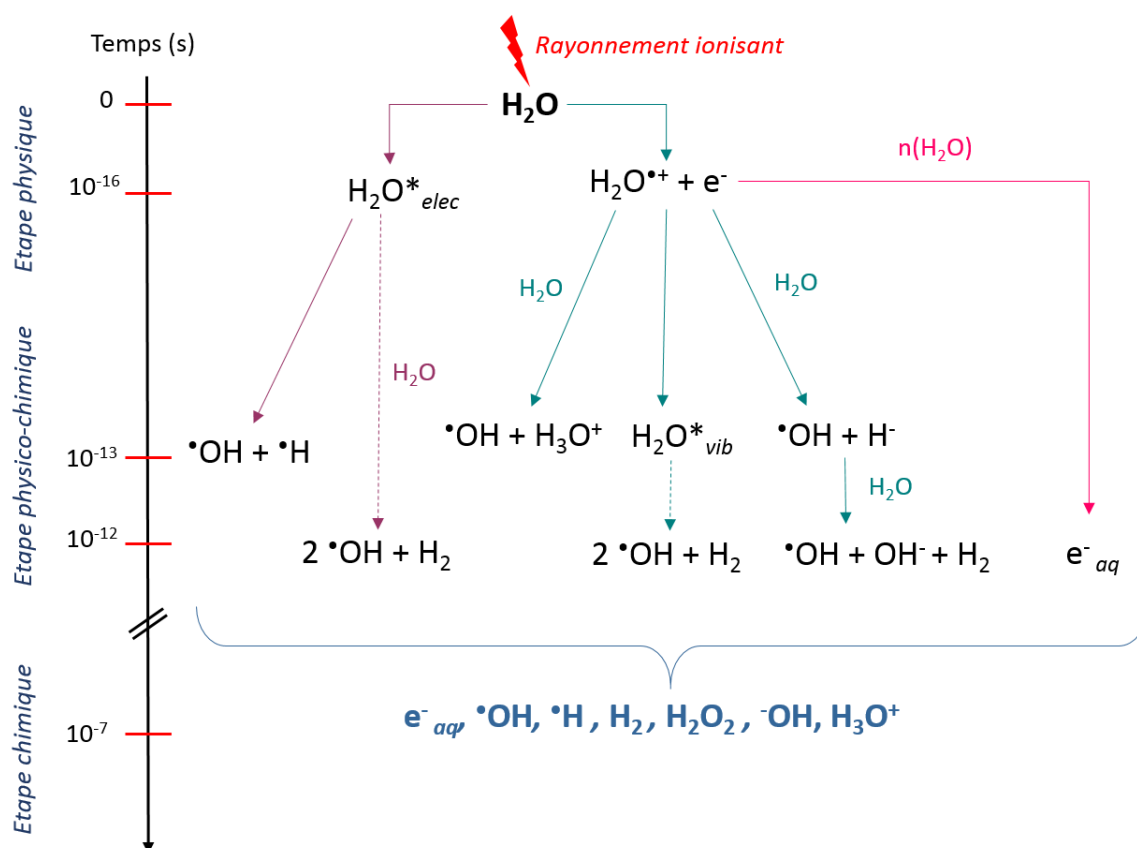


Figure 17: Radiolyse de l'eau.  $\text{H}_2\text{O}^*_{elec}$  : eau excitée électroniquement,  $\text{H}_2\text{O}^*_{vib}$  : eau excitée vibrationnellement.

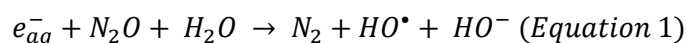
A l'échelle de quelques nanosecondes après le passage du rayonnement ionisant, le rendement de formation de ces espèces est appelé rendement radiolytique primaire,  $G$ . Il correspond au nombre de molécules formées par unité d'énergie absorbée ( $\text{mol}\cdot\text{J}^{-1}$ ). Les rendements radiolytiques primaires des produits de la radiolyse de l'eau en milieu neutre et en absence d'oxygène sous irradiation gamma sont exposés dans le Tableau 2. Un premier avantage de l'utilisation de la radiolyse est que cette méthode permet une génération contrôlée de la quantité de radicaux. Parmi les espèces formées, l'électron hydraté se trouve être un réducteur fort ( $E^\circ(\text{aq}/e^-_{aq}) = -2.87 \text{ V vs. ESH}$ ) et le radical hydroxyle une espèce fortement oxydante ( $E^\circ(\cdot\text{OH}/\text{OH}^-) = 1.90 \text{ V vs. ESH}$ ) (Sonntag, 1987; M. J. Davies & Dean, 1997).

Espèce	$\cdot\text{OH}$	$e^-_{\text{aq}}$	$\cdot\text{H}$	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2$	$\text{H}_3\text{O}^+$
Rendement radiolytique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{J}^{-1}$ )	0.28	0.28	0.06	0.07	0.04	0.28

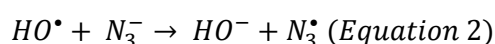
Tableau 2: Rendements radiolytiques primaires des espèces produites par la radiolyse de l'eau sous irradiation gamma en milieu neutre et en absence d'oxygène (Mozumder & Hatano, 2004).

En présence d'oxygène, les mêmes espèces sont formées mais certaines ( $e^-_{\text{aq}}$  et  $\cdot\text{H}$ ) vont réagir avec  $\text{O}_2$  pour former des radicaux superoxydes  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\text{HO}_2^{\cdot}$ .

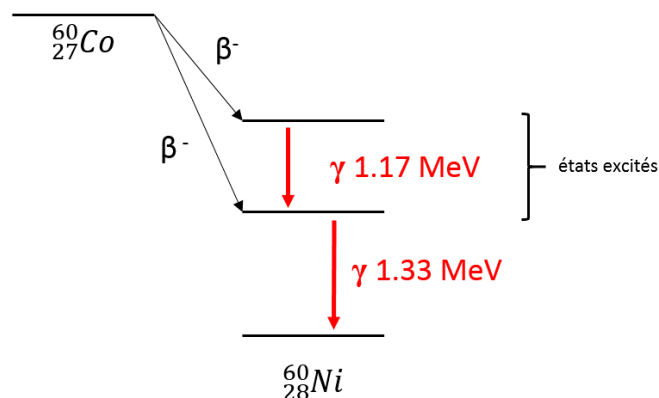
L'étude sélective des réactions du radical hydroxyle est rendue possible par ajout d'un capteur, le protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ) qui va permettre de transformer l'électron solvaté (Equation 1) en radical hydroxyle ( $k = 9.1 \cdot 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Janata & Schuler, 1982). Dans le cadre d'un dégazage au protoxyde d'azote, le rendement radiolytique de  $\cdot\text{OH}$  est alors de  $0.56 \mu\text{mol}\cdot\text{J}^{-1}$ .



Un autre avantage de l'utilisation de la radiolyse de l'eau pour la production de radicaux oxydants est la possibilité de transformer les radicaux hydroxyle produits en radicaux azoture (Equation 2) par ajout d'azoture de sodium en excès ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans la solution à irradier. Ces radicaux possèdent un potentiel d'oxydo-réduction plus faible ( $E^\circ (\text{N}_3^{\cdot}/\text{N}_3^-) = 1.33 \text{ V vs. ESH}$ ) que le radical hydroxyle, ce qui permet un ciblage de certains processus oxydatifs comme les dimérisations d'acides aminés aromatiques (Land & Prütz, 1979; Sonntag, 1987). En effet, les radicaux  $\text{N}_3^{\cdot}$  oxydent spécifiquement les acides aminés aromatiques comme le tryptophane ( $\text{Trp} + \text{N}_3^{\cdot}$ ,  $k = 4.1 \cdot 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et la tyrosine ( $\text{Tyr} + \text{N}_3^{\cdot}$ ,  $k = 3.6 \cdot 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Land & Prütz, 1979). Ainsi, dans le cadre de l'étude de la formation de dimères *via* des pontages d'acides aminés aromatiques, le radical  $\text{N}_3^{\cdot}$  s'avère être un outil de choix.



Les irradiations gamma ont été effectuées à l'Institut de Chimie Physique à travers l'utilisation d'une source continue  $^{60}\text{Co}$  (IL60PL Cis-Bio International). Le  $^{60}_{27}\text{Co}$  possède un excès de neutrons (27 protons et 33 neutrons) qu'il va pallier en émettant un électron (rayonnement  $\beta$ ) pour donner  $^{60}_{28}\text{Ni}$  dans un état excité. C'est la relaxation de ce dernier qui s'effectue en émettant successivement deux photons gamma de 1.17 et 1.33 MeV. Le schéma de désintégration est présenté en Figure 18.

Figure 18: Désintégration du  $^{60}\text{Co}$ .

Pour décrire la quantité d'énergie déposée par unité de masse par le rayonnement, c'est la dose qui est utilisée. Elle est exprimée en Gray (Gy), unité qui équivaut au dépôt d'un joule d'énergie par unité de masse ( $\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

### III.3. Détection et caractérisation des pontages covalents

Au regard de la diversité des systèmes considérés (de l'acide aminé à la cellule), la stratégie générale d'analyse des pontages covalents a été adaptée en fonction de la taille de ces systèmes. La démarche analytique adoptée pour la détection de pontages covalents formés *in-cellulo* étant assez spécifique et différente de celle menée sur les autres systèmes, elle sera spécifiquement décrite dans le chapitre VIII. A l'échelle des protéines, qu'elles soient considérées isolées ou sous la forme d'un complexe protéique, la mise en évidence de la formation de pontages covalents est toujours réalisée par gels d'électrophorèse. Cette technique permet de séparer les constituants d'un mélange protéique selon leur masse moléculaire et constitue donc une première approche de vérification de la formation de dimères ou d'oligomères. Dans le cadre de certains pontages (comme la bi-tyrosine) qui possèdent une émission de fluorescence caractéristique, des expériences de spectroscopie de fluorescence pourront être effectuées directement sur le mélange contenant les protéines intactes et leurs produits de dimérisation covalente. La comparaison de l'intensité du signal de fluorescence à cette longueur d'onde caractéristique pourra appuyer la proposition de formation d'un pontage covalent tyrosine-tyrosine. Pour permettre une analyse plus précise quant à la localisation et à la nature chimique du pontage, les protéines seront digérées à la trypsine, comme cela est classiquement réalisé dans les approches « bottom-up » de protéomique. Les peptides tryptiques résultants seront alors séparés par UPLC et leur détection assurée par spectrométrie de masse. L'analyse des pontages covalents est alors réalisée par la recherche de l'association de peptides tryptiques -2 Da en masse. Des expériences de

fragmentation des ions (MS/MS) seront également considérées pour mener à bien l'analyse structurale. La Figure 19 rassemble les étapes décrites ci-dessus.

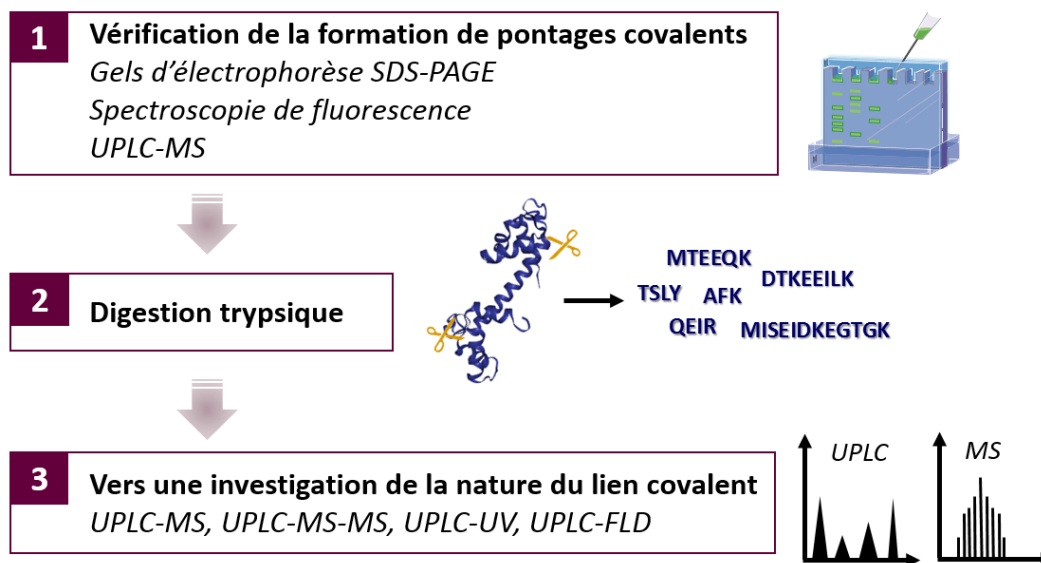


Figure 19: Illustration des étapes de l'analyse de pontages covalents dans les protéines isolées ou sous forme de complexes.

A l'échelle des acides aminés libres et des peptides, la réalisation de gels d'électrophorèse ne peut être envisagée. En effet, les peptides qui seront étudiés sont constitués de 5 ou 6 acides aminés et l'investigation de la formation de pontages covalents sera donc directement effectuée *via* l'analyse par UPLC-MS. Pour ce type d'échantillons, (< 10 acides aminés), l'étape de digestion trypsique n'est pas nécessaire. De même que pour les peptides issus de la dégradation trypsique des protéines, la fragmentation MS/MS permettra de compléter l'analyse structurale. Des expériences de spectrométrie de mobilité ionique seront aussi réalisées, permettant l'ajout d'une dimension séparative complémentaire. Le principe de cette technique sera explicité en IV.1.6.

# IV. DIMERISATION OXYDATIVE A L'ECHELLE DES ACIDES AMINES

---

## IV.1. Pontages tyrosine-tyrosine

L'état de l'art sur l'oxydation de la tyrosine à l'échelle de l'acide aminé (page 20) a amené à plusieurs questionnements sur la réactivité de cette dernière et la formation de ses produits d'oxydation restent ainsi sans réponse. Quel est le devenir des adduits (Tyr+OH)<sup>•</sup>, proposés comme précurseurs de la formation de produits hydroxylés ? Existe-t-il un lien entre la formation d'adduits (Tyr+OH)<sup>•</sup> et le radical tyrosyle TyrO<sup>•</sup> ? Si la recombinaison du radical tyrosyle est à l'origine de la formation de dimères de tyrosine, lesquelles de ses formes mésomères sont impliquées ? La position *para*, rarement considérée, est-elle engagée dans ce processus de dimérisation ? Pour tenter de répondre à certaines de ces interrogations, le comportement oxydatif de la tyrosine avec <sup>•</sup>OH sera étudié en regard de celui d'une tyrosine dont la fonction phénol est protégée, permettant de bloquer la voie de formation du radical TyrO<sup>•</sup> par abstraction de l'hydrogène. Seule la formation d'adduits (Tyr+OH)<sup>•</sup> devrait être observée et il sera alors possible de statuer quant au(x) rôle(s) de ces adduits dans les processus de dimérisation et d'hydroxylation. D'autre part, pour étudier de manière spécifique la dimérisation en s'affranchissant de l'hydroxylation qui a lieu sous <sup>•</sup>OH, des études seront menées avec le radical azote. Bien que seule la bi-tyrosine ait été détectée lors de l'utilisation du radical N<sub>3</sub><sup>•</sup>, rien ne garantit que la dimérisation induite de la tyrosine soit fidèle à celle observée sous l'influence d'<sup>•</sup>OH. Il sera intéressant d'établir s'il constitue un bon modèle de la formation de bi-tyrosine, c'est-à-dire que les voies mécanistiques impliquées dans la dimérisation soient les mêmes pour les deux radicaux. En combinant les expériences menées avec la tyrosine, la tyrosine dont la fonction phénol est protégée et les radicaux <sup>•</sup>OH et N<sub>3</sub><sup>•</sup>, de nombreuses réponses aux manquements soulevés devraient pouvoir être amenées.

### IV.1.1. Bi-tyrosine

La tyrosine a été irradiée avec un rayonnement gamma, permettant la formation *in-situ* de radicaux hydroxyle *via* la radiolyse de l'eau, dans certains cas volontairement convertis en radicaux azote pour isoler la dimérisation et permettre la comparaison de leur comportement. Les échantillons ont tout d'abord été analysés par UPLC-MS. En effet, la détection en spectrométrie de masse devrait permettre de s'affranchir des inconvénients que peuvent présenter d'autres techniques de détection. En absorption, comme des oligomères d'ordre supérieur sont susceptibles d'être formés simultanément, l'additivité des signaux risquerait d'entraver la détection spécifique de bi-tyrosine. En

fluorescence, comme aucune information n'est disponible sur la ou les structures à l'origine de l'émission à 410 nm, il existe un risque de négligence de la diversité dimérique. La séparation chromatographique a été mise au point en faisant varier le gradient mais aussi l'acidité de la phase mobile (à travers le % d'acide formique). En sélectionnant le rapport masse/charge ( $m/z$ ) de l'espèce d'intérêt à savoir l'association covalente (-2H) de deux tyrosines,  $m/z$   $[M+H]^+$  361.14, un chromatogramme ionique extrait est obtenu. En Figure 20 sont présentés les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $361.14 \pm 0.05$  (dimère de tyrosine) lors d'une oxydation par  $\cdot\text{OH}$  (a) et  $\text{N}_3\cdot$  (b) à 0 et 40 Gy. Le choix de cette dose d'irradiation dans le cas présent et pour le reste du manuscrit sera justifié ultérieurement. Pour rappel, l'utilisation du radical  $\text{N}_3\cdot$  permet de s'acquitter de la formation de produits d'hydroxylation formés en présence de  $\cdot\text{OH}$ .

### Di-Tyr $[M+H]^+$ $m/z$ $361.14 \pm 0.05$

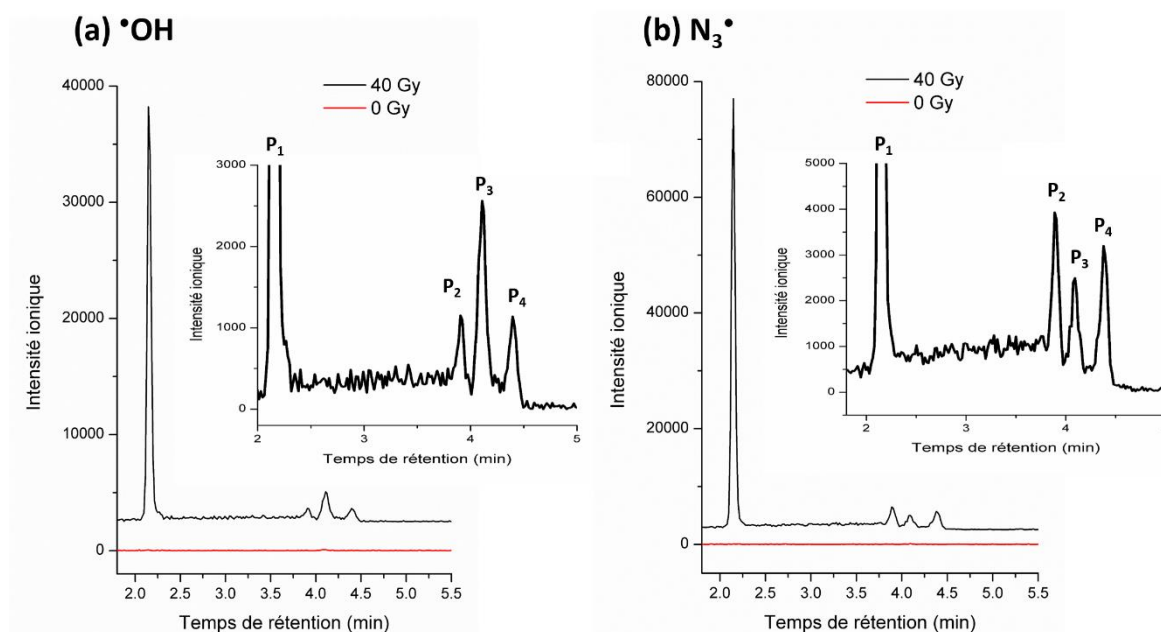


Figure 20: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $361.14 \pm 0.05$  (di-tyrosine) pour la tyrosine irradiée à 0 et 40 Gy sous l'influence de (a)  $\cdot\text{OH}$  et (b)  $\text{N}_3\cdot$ . Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Gradient chromatographique n°1 (Tableau 38).

A 0 Gy, aucun dimère n'est détecté. A 40 Gy, quatre pics chromatographiques (nommés P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> par ordre de temps de rétention) sont mis en évidence, et ce lors d'une oxydation par  $\cdot\text{OH}$  comme par  $\text{N}_3\cdot$ . La première information importante à noter est la détection de quatre espèces qui possèdent une contribution à  $m/z$  361.14, masse du dimère de tyrosine. L'excellente résolution chromatographique couplée à une détection extrêmement sélective a permis de mettre en évidence la formation de nouvelles espèces issues de la dimérisation de la tyrosine. En effet, dans la littérature, seuls deux isomères de bi-tyrosine sont évoqués et ont été caractérisés. Parmi les quatre pics

chromatographiques, l'un ( $P_1$ ) est largement intense devant les trois autres, qui se trouvent être des espèces plus hydrophobes puisqu'elles sont éluées plus tardivement sur la colonne à polarité de phase inversée. Les inserts de la Figure 20 (a) et (b) exposent un agrandissement des chromatogrammes permettant de mieux visualiser les trois pics chromatographiques de plus faible intensité. Leurs spectres de masse ont été extraits et sont présentés en Figure 21. Pour chacun des pics  $P_1$  à  $P_4$ , le profil isotopique permet de confirmer leur attribution à des isomères de bi-tyrosine : à  $m/z$  361.136, l'espèce détectée est bien monochargée. Ils ont été extraits pour les dimères formés sous  $N_3^\bullet$  mais les mêmes profils isotopiques sont observés sur les spectres de masse des dimères formés sous l'effet de  $^\bullet OH$ . Ainsi, quel que soit le radical oxydant utilisé,  $^\bullet OH$  ou  $N_3^\bullet$ , les mêmes dimères sont formés.

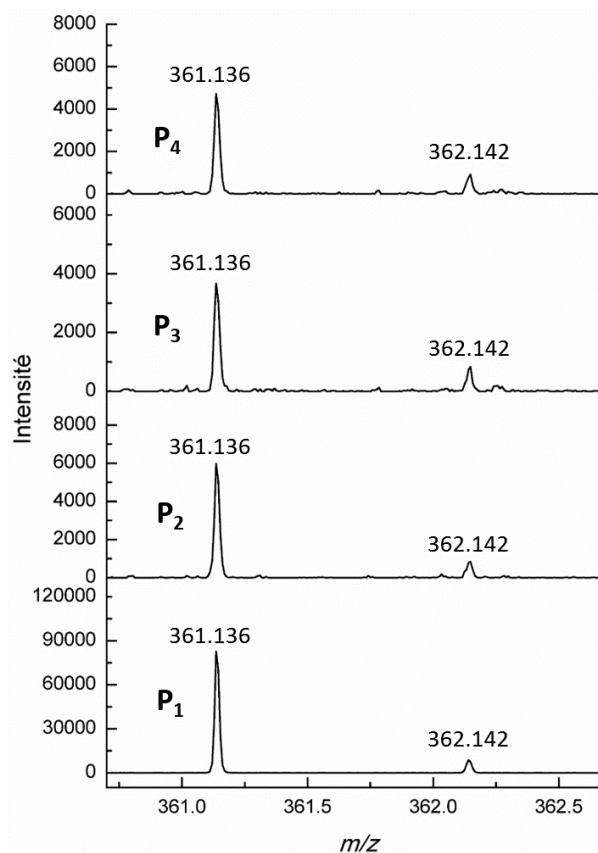


Figure 21: Spectres de masse centrés en  $m/z$  361 des pics de dimères  $P_1$  à  $P_4$  observés lors de l'oxydation de la tyrosine par  $N_3^\bullet$  à 40 Gy. L'intensité ionique est indiquée en valeur absolue.

D'un point de vue plus quantitatif, les intensités ioniques observées sur la Figure 20 sont plus importantes dans le cas d'une oxydation par le radical azoture excepté pour le pic  $P_3$ . Lors d'une oxydation avec le radical hydroxyle, comme cela a déjà été évoqué, des produits d'hydroxylation sont également formés, ce qui n'est pas le cas avec  $N_3^\bullet$  et qui pourrait expliquer la différence d'intensité.

L'effet de dose a été étudié sur la formation des dimères de tyrosine. Au travers de la dose d'irradiation, c'est une quantité de radicaux oxydants qui est considérée. Or, la tyrosine et les autres



entités (peptides, protéines) étant étudiées à  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , il semble cohérent de considérer des quantités de radicaux oxydants du même ordre de grandeur. Une dose de 1 Gy correspondant à  $0.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de radicaux  $\cdot\text{OH}$ , la gamme de dose considérée (0-125 Gy) équivaut à 0-70  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de radicaux oxydants formés. La Figure 22 présente l'effet de la dose d'irradiation entre 0 et 125 Gy sur la formation de dimères de tyrosine.

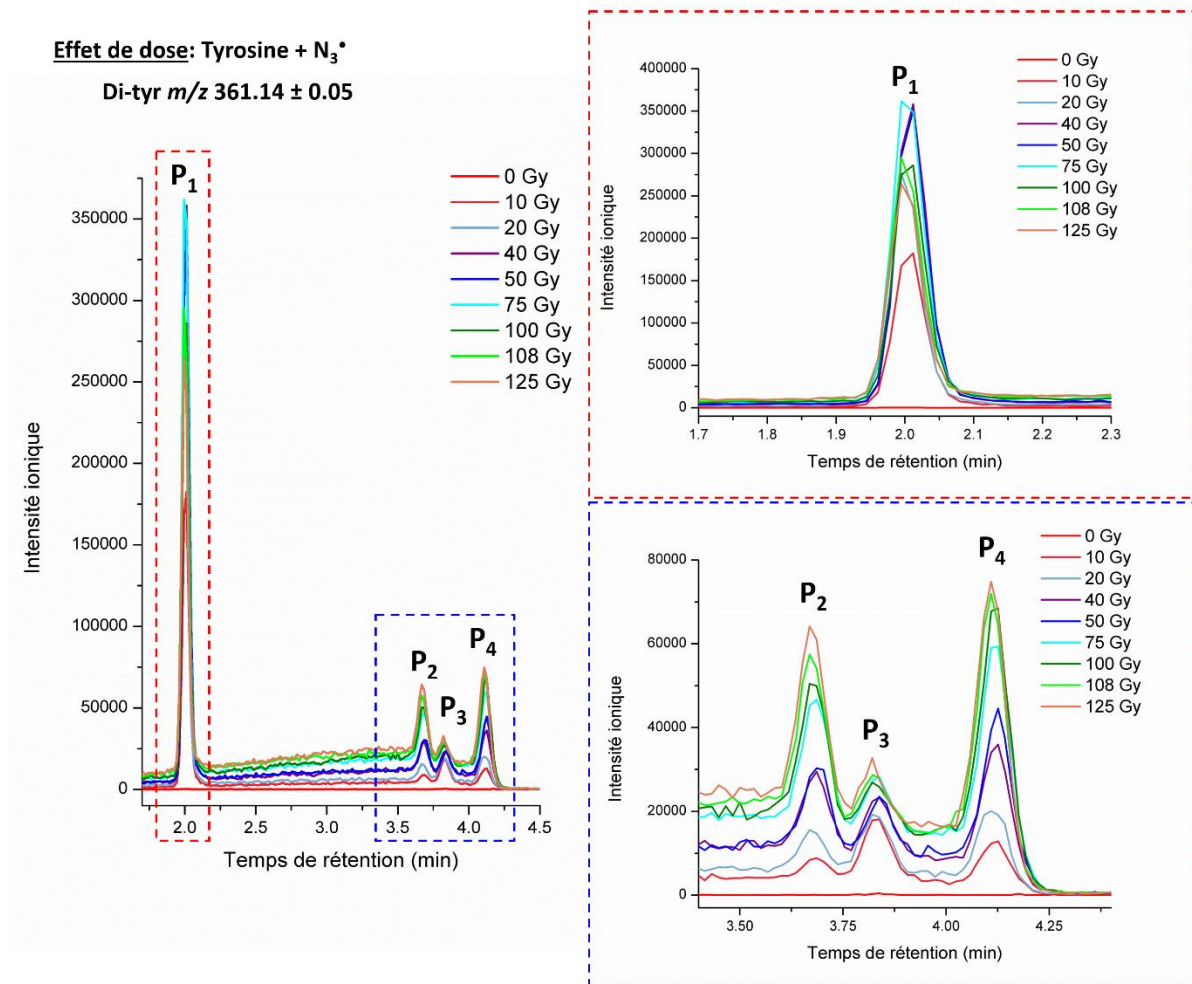


Figure 22: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $361.14 \pm 0.05$  (di-tyrosine) pour la tyrosine irradiée à 0, 10, 20, 40, 50, 75, 100, 108 et 125 Gy sous l'influence de  $\text{N}_3\cdot$ . Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Les zones de rétention du pic P<sub>1</sub> et des pics P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> sont agrandies dans les inserts en pointillés rouges et bleus. Gradient chromatographique n°1 (Tableau 38).

Globalement, l'intensité ionique des pics P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> augmente avec la dose. En s'intéressant de plus près au pic P<sub>1</sub>, le plus intense, l'intensité du signal semble maximale vers 75 Gy puis sa croissance semble ralentie pour des doses supérieures. Pour les pics P<sub>2</sub> à P<sub>4</sub>, l'intensité du signal augmente de 0 à 125 Gy mais pour le pic P<sub>3</sub>, l'augmentation de l'intensité avec la dose est moins évidente. Concernant le pic P<sub>1</sub>, le fait que le signal augmente jusqu'à un maximum puis diminue ensuite pourrait s'expliquer par la formation d'oligomères de tyrosine d'ordre supérieur à partir des mêmes espèces radicalaires ou par

consommation du dimère élué sous le pic  $P_1$ . Ce phénomène ne serait pas observé pour les pics  $P_2$  à  $P_4$  car leurs rendements relatifs de formation seraient inférieurs à celui de  $P_1$  : il faudrait sans doute une dose supérieure à 125 Gy pour observer le même processus. La formation de trimères et de tétramères de tyrosine a été investiguée et apparaît dès les plus faibles doses : il n'est pas possible de travailler à une dose qui permette de s'affranchir de la formation d'oligomères. Ainsi, sur la gamme de dose considérée (0-125 Gy), il a convenu de choisir une dose qui permette une intensité de signal de dimère suffisante tout en limitant la formation trop importante d'oligomères : c'est la dose de 40 Gy qui a été retenue. Elle correspond à une concentration en radicaux oxydants de  $22.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  soit environ 50% de la concentration en tyrosine initiale.

Avant de se pencher sur la question de l'élucidation structurale des quatre espèces et donc des nouveaux isomères de bi-tyrosine, il convient de revenir sur la formation de ces mêmes espèces dans le cas de l'utilisation des radicaux azoture comme hydroxyle. Au vu de la diversité des voies d'attaque respectives des radicaux précédemment exposées, un rendement de dimérisation plus important est attendu dans le cas du radical azoture. En effet, c'est ce qui s'est ici traduit par une intensité ionique à  $m/z$  361.14 plus élevée dans le cas de l'oxydation avec l'azoture pour trois des quatre dimères mis en évidence (cf. chromatogrammes ioniques extraits en Figure 20). Pour le dernier dimère ( $P_3$ ), l'intensité ionique est équivalente suite à une oxydation avec  $\cdot\text{OH}$  ou  $\text{N}_3\cdot$ . Alors que  $\text{N}_3\cdot$  n'est capable que d'arracher l'hydrogène du phénol de la tyrosine pour former le radical  $\text{TyrO}\cdot$ ,  $\cdot\text{OH}$  est également susceptible de s'ajouter sur le cycle pour former des adduits, proposés dans certaines études comme de potentiels intermédiaires de la formation de dimères de tyrosine (*Boguta & Dancewicz, 1981; Getoff, 1992*). Il est possible d'imaginer que le dimère élué sous le pic  $P_3$  provienne d'une espèce transitoire qui ne subisse pas d'hydroxylation en présence de  $\cdot\text{OH}$  mais dimérise uniquement, ce qui expliquerait que son rendement de formation soit le même quel que soit le radical oxydant utilisé. Pour investiguer le rôle des adduits hydroxylés dans le processus de dimérisation, l'oxydation d'une tyrosine méthylée sur la position phénolique (O-méthyl-L-tyrosine, TyrOMe) a été considérée. En effet, la position phénolique y est substituée par un groupement méthyl, ce qui inhibe la formation du radical  $\text{TyrO}\cdot$  par abstraction de l'atome d'hydrogène. Du point de vue de la dimérisation, cela devrait permettre de statuer quant à l'implication des adduits  $(\text{Tyr}+\text{OH})\cdot$  dans une potentielle seconde voie de formation.

La tyrosine méthylée sur la position phénolique (O-méthyl-L-tyrosine, TyrOMe) a été irradiée dans les mêmes conditions que la tyrosine. Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $389.17 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  du dimère de TyrOMe) en résultant sont présentés en Figure 23. Lorsque  $\text{N}_3\cdot$  est utilisé pour oxyder la tyrosine O-méthylée, aucun dimère n'est attendu puisque l'hydrogène du phénol ne peut être substitué pour former le radical  $\text{TyrO}\cdot$ . En effet, aucun dimère n'est détecté à aucun temps

de rétention dans le cas la tyrosine O-méthylée, dans le cadre d'une oxydation par  $N_3^\bullet$  mais aussi par  $^\bullet OH$ . Un pic d'une très faible intensité est détecté entre 3 et 4 min, mais il l'est également dans les chromatogrammes ioniques extraits à 0 Gy, ne constituant donc pas une espèce issue de l'oxydation de la tyrosine O-méthylée. La position phénolique étant bloquée, l'absence de dimères confirme que la dimérisation passe uniquement par la formation du radical  $TyrO^\bullet$  mais pas par la déshydratation des adduits  $(Tyr+OH)^\bullet$  puisque même sous l'influence de  $^\bullet OH$ , aucun dimère n'est observé.

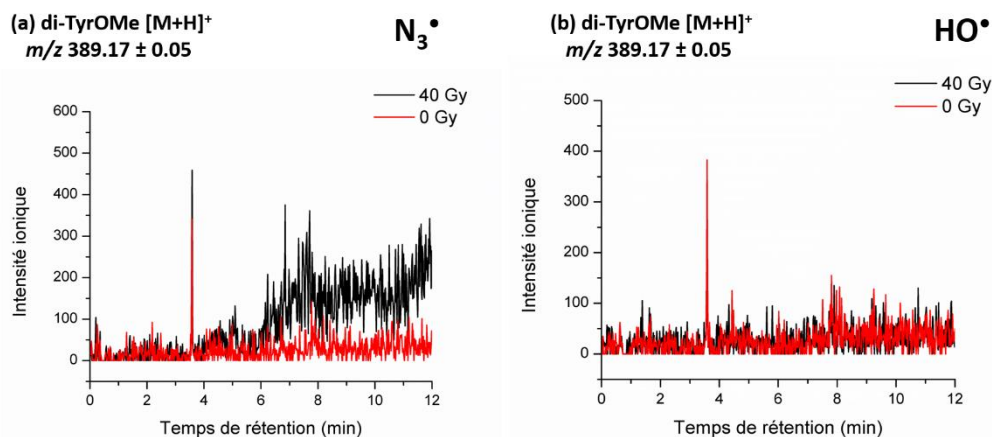


Figure 23: Dimérisation de la tyrosine O-méthylée. Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z 389.17 \pm 0.05$  (di-TyrOMe) pour la tyrosine O-méthylée irradiée à 0 et 40 Gy sous  $N_3^\bullet$  (a) et  $^\bullet OH$  (b). Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Gradient chromatographique n°2 (Tableau 38).

La formation d'adduits intermédiaires  $(Tyr+OH)^\bullet$  sur le cycle aromatique n'est pas responsable du processus de dimérisation et n'est probablement qu'à l'origine des produits d'hydroxylation.

#### IV.1.2. Produits d'hydroxylation

La formation de dérivés hydroxylés de la tyrosine et de la tyrosine O-méthylée a été investiguée en présence du radical  $^\bullet OH$ . La DOPA, qui correspond à l'addition d'un groupement  $-OH$  en *ortho* est très souvent évoquée mais d'autres produits d'oxydation de type  $M+16$  ont été proposés et/ou mis en évidence (Čudina et al., 1987; Getoff, 1992). La Figure 24 (a) expose les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z 198.08 \pm 0.05$  ( $[M+H+16]^+$ ) pour la tyrosine irradiée sous  $^\bullet OH$  ainsi que pour la DOPA. Ce rapport  $m/z$  correspond au gain d'un groupement hydroxyle (+17) et la perte d'un atome d'hydrogène (-1).

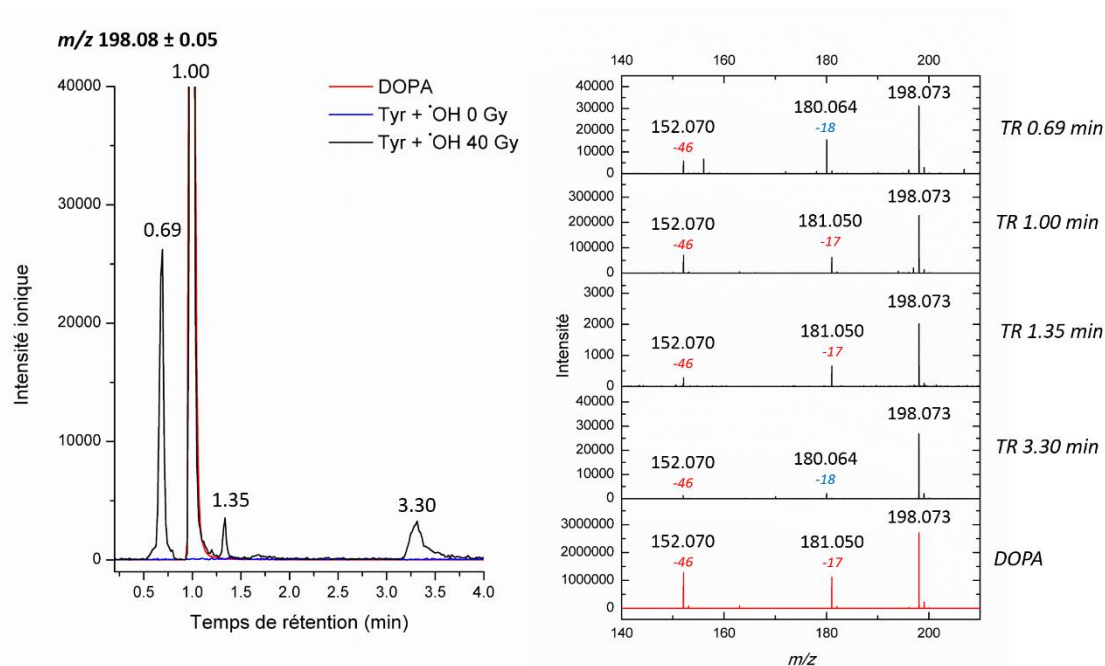


Figure 24: Formation de produits d'hydroxylation de la tyrosine. (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  198.08  $\pm$  0.05 pour la tyrosine irradiée sous  $\bullet$ OH à 0 et 40 Gy et la DOPA. Gradient chromatographique n°1 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics chromatographiques mis en évidence en pour la tyrosine irradiée (en noir) et de la DOPA (en rouge). Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Lorsque la tyrosine est irradiée avec  $\bullet$ OH à 40 Gy, quatre pics chromatographiques correspondant à des produits d'hydroxylation sont détectés. L'un d'entre eux, qui se trouve aussi être le produit avec l'intensité ionique la plus importante, possède le même temps de rétention que la DOPA commerciale. Il est donc possible de l'identifier parmi les dérivés hydroxylés formés de la tyrosine oxydée : il s'agit du pic chromatographique qui élue à 1.00 min. Les spectres de masse des quatre produits formés (TR 0.69, 1.00, 1.35 et 3.30 min, spectres noirs) sont présentés en Figure 24 (b) ainsi que celui de la DOPA (spectre rouge). Les conditions d'électrospray utilisées induisant de la fragmentation en source, les fragments caractéristiques de la perte de  $\text{NH}_3$  (-17,  $m/z$  181.05) et de  $[\text{H}_2\text{O}+\text{CO}]$  (-46,  $m/z$  152.070) sont visibles pour la DOPA commerciale ainsi que pour deux des quatre produits hydroxylés de la tyrosine irradiée (TR 1.00 et 1.35 min). Les espèces qui éluent à 0.69 min et 3.30 min perdent une masse de 46 ( $[\text{H}_2\text{O}+\text{CO}]$ ,  $m/z$  152.070) mais le fragment à  $m/z$  181.05 (-17,  $\text{NH}_3$ ) n'est pas clairement détecté : c'est ici une perte d' $\text{H}_2\text{O}$  (-18,  $m/z$  180.073) qui est décelée. L'absence du fragment caractéristique de la perte de  $\text{NH}_3$  pour les pics chromatographiques à 0.69 et 3.30 min permet de proposer que l'amine libre ait réagi de manière à ne pas pouvoir être fragmentée. Sur la base des produits proposés par Möller et al. lors de l'attaque d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  sur le radical tyrosyle, il peut être proposé qu'à 0.69 et 3.30 min éluent des espèces issues du dérivé hydroxylé en position *para* (Möller et al., 2012). En effet, ce dernier présente une structure de type cyclohexadiènone, susceptible de réagir *via* une N-addition de Michael intramoléculaire pour former le produit HOHICA (Figure 25). L'observation de deux pics pouvant

correspondre à ce type de produit pourrait s'expliquer soit par la formation de diastéréoisomères soit par la formation d'une double addition de Michael, une sur chacune des doubles liaisons C=C de la cyclohexadiènone. Quelles que soient les structures finales des produits hydroxylés, il a été montré que la position *para* de la tyrosine est extrêmement réactive et que les réactions qui y ont lieu sont complexes (Jin et al., 1993; Möller et al., 2012). La réactivité de cette position sera discutée ultérieurement. Les structures ainsi proposées des produits hydroxylés suite à l'oxydation de la tyrosine par le radical hydroxyle sont présentées en Figure 25, correspondant à l'addition du groupement -OH en positions *ortho*, *mé*ta et *para*.

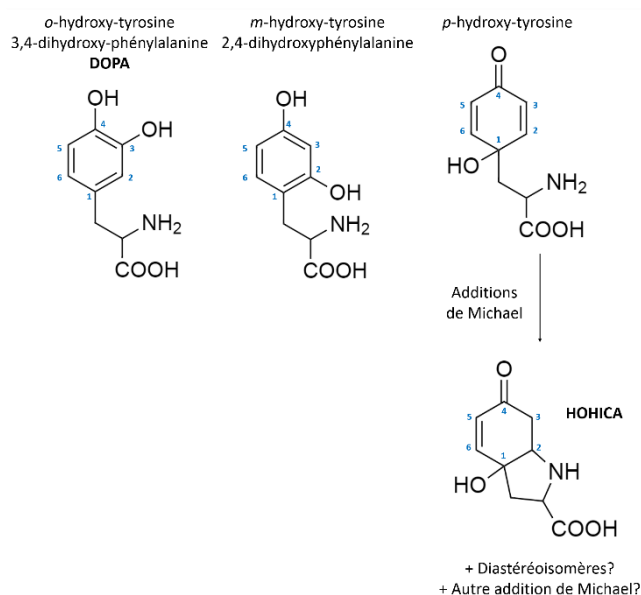


Figure 25: Structures proposées des produits hydroxylés (+16) de la tyrosine irradiée sous  $\bullet\text{OH}$ .

L'absence du fragment à  $m/z$  181.05 (-17) pour les pics chromatographiques à 0.69 et 3.30 min corrobore alors la formation de produits type HOHICA : l'amine initialement libre ne l'est plus. La perte d' $\text{H}_2\text{O}$  (-18) observée dans le cas de cette espèce est également rapportée par Möller et al. lors de la caractérisation de la tyrosine hydroxylée en position *para* (Möller et al., 2012). Ainsi, par élimination, le produit élué à 1.35 min pourrait correspondre à l'addition du groupement hydroxyle sur la position *mé*ta (2,4-dihydroxyphénylalanine). Quatre produits d'hydroxylation de la tyrosine ont pu être mis en évidence. Néanmoins, leur mécanisme de formation n'en est pas pour autant élucidé. Comme cela a été présenté précédemment, c'est l'addition du radical  $\bullet\text{OH}$  couplée à la perte d'un atome d'hydrogène qui est proposée. Les positions *ortho* et *mé*ta du cycle aromatique possèdent un atome d'hydrogène, susceptible d'être substitué par un groupement hydroxyle lorsque le radical  $\bullet\text{OH}$  s'y additionne. La formation de la 3,4-dihydroxy-phénylalanine et de la 2,4-dihydroxy-phénylalanine pourrait donc s'expliquer par cette substitution radicalaire. Pour autant, ce mécanisme semble difficilement

envisageable au niveau de la position *para*, pour laquelle aucun atome d'hydrogène n'est substituable. Un autre mécanisme participe donc sans aucun doute à la formation de ces produits hydroxylés.

L'étude de la formation des produits d'hydroxylation de la tyrosine O-méthylée va permettre de discuter de cette hypothèse. Si leur formation ne dépend que de l'attaque directe du radical hydroxyle, alors les trois mêmes produits d'hydroxylation que ceux observés dans le cas de la tyrosine devraient être détectés. Si, a contrario, comme cela est suspecté, un autre mécanisme induit la formation de produits hydroxylés de la tyrosine, les produits observés dans le cadre de la TyrOMe sont susceptibles d'être différents. La comparaison des produits hydroxylés de la tyrosine-O-méthylée avec ceux de la tyrosine n'est pas évidente puisqu'il s'agit de molécules différentes, les temps de rétention ne sont donc pas les mêmes. Les produits issus de l'addition d'un groupement hydroxyle sur la tyrosine O-méthylée ( $m/z$   $212.09 \pm 0.05$ ,  $[M+H]^+$ ) sont présentés sur le chromatogramme ionique extrait en Figure 26 (a). Ils sont, dans le cadre de la TyrOMe, présents au nombre de deux (TR 2.67 et 3.18 min).

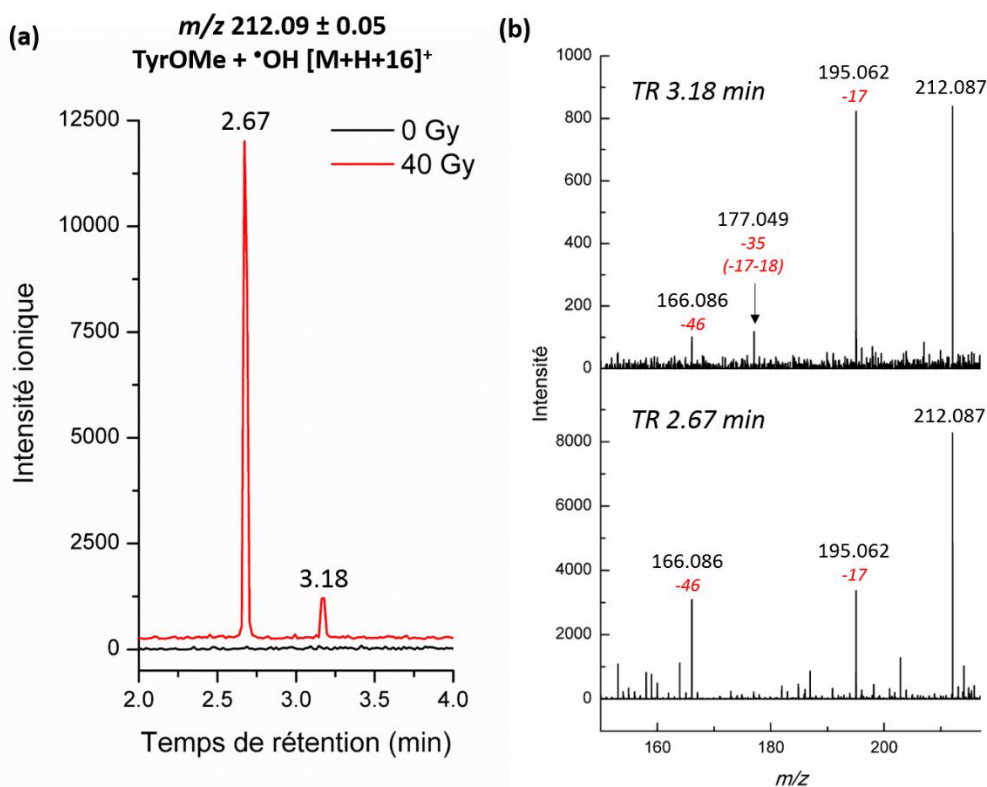


Figure 26: Formation de dérivés hydroxylés de la tyrosine O-méthylée sous  $\cdot\text{OH}$ . (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $212.09 \pm 0.05$  (0 et 40 Gy). Gradient chromatographique n°2 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics identifiés à 2.67 et 3.18 min. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Leurs spectres de masse sont présentés en Figure 26 (b) et des fragments caractéristiques de la perte de  $\text{NH}_3$  (-17,  $m/z$  195.062) et  $[\text{H}_2\text{O}+\text{CO}]$  (-46,  $m/z$  166.086) sont observés. Pour le pic à 3.18 min, un fragment supplémentaire est observé  $m/z$  177.049, il est caractéristique de la perte de  $[\text{NH}_3+\text{H}_2\text{O}]$  (-



35). Contrairement au cas de la tyrosine non modifiée pour laquelle quatre produits hydroxylés ont été mis en évidence, ici seules deux espèces sont séparées et correspondent à des adduits [M+16] qui semblent ne pas subir d'addition de Michael (présence du  $m/z$  caractéristique de la perte de  $\text{NH}_3$ ). Ces derniers pourraient donc correspondre aux produits hydroxylés en *ortho* et *méta* de la fonction -OMe. Le produit hydroxylé en *para* ne serait ici pas formé car le carbone est quaternaire et qu'il n'est pas possible pour  $\cdot\text{OH}$  de s'ajouter sur cette position.

#### IV.1.3. Bilan des mécanismes d'oxydation

A travers l'étude de la tyrosine et de la tyrosine O-méthylée sous l'influence des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$ , plusieurs réponses quant aux mécanismes impliqués dans la dimérisation ont pu être apportées. Les Figure 27 et Figure 28 exposent un récapitulatif des mécanismes proposés sur la base des espèces transitoires mises en évidence et des produits détectés. La dimérisation de la tyrosine n'a lieu que si et seulement si le radical  $\text{TyrO}\cdot$  est formé. L'indispensabilité de ce précurseur avait été soulevée en 1989 par Gmeiner et Seelos, qui mettaient en évidence l'inhibition de la dimérisation sous l'effet de  $\cdot\text{OH}$  via l'utilisation d'une tyrosine phosphorylée (Gmeiner & Seelos, 1989). La délocalisation de l'électron célibataire du radical  $\text{TyrO}\cdot$  permet la coexistence de plusieurs formes mésomères à même de dimériser entre elles. L'implication des adduits  $(\text{Tyr}+\text{OH})\cdot$  a donc été définitivement écartée du processus de dimérisation. La compréhension du mécanisme de formation des produits hydroxylés a également été amendée. L'unique différence entre la tyrosine et la tyrosine O-méthylée est la disponibilité de la fonction phénol pour former le radical tyrosyle. Lorsque ce dernier ne peut pas être formé ( $\text{TyrOMe}$ ), seuls deux produits d'hydroxylation sont détectés, et leurs profils de fragmentation semblent montrer que l'addition du groupement hydroxyle n'a lieu qu'en *ortho* et *méta* mais pas en *para* puisque le fragment caractéristique de la perte de  $\text{NH}_3$  a été constaté. *A contrario*, quatre produits d'hydroxylation co-existent dans le cas de la tyrosine pour laquelle  $\text{TyrO}\cdot$  est formé et est donc susceptible de participer au mécanisme. L'hypothèse faite est la suivante : deux voies de formation des produits d'hydroxylation existent. L'une fait intervenir la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement hydroxyle alors que l'autre implique une réaction radical-radical entre le radical tyrosyle et  $\cdot\text{OH}$ . La première voie de formation évoquée nécessite la disponibilité d'un hydrogène, ce qui limite la substitution aux positions *ortho* et *méta* de la tyrosine et qui explique la présence de deux produits d'hydroxylation seulement pour la  $\text{TyrOMe}$ . La seconde voie de formation, quant à elle, est susceptible de mener à des espèces hydroxylées en position *ortho* et *para* mais il n'est pas non plus à exclure la position phénolique, qui, sur la base des densités de spin de  $\text{TyrO}\cdot$  (Figure 3) pourrait également se recombinaison avec  $\cdot\text{OH}$ . Parmi les quatre produits d'hydroxylation détectés de la tyrosine, deux d'entre eux ont été proposés comme impliquant la position *para*, ce qui se justifie totalement avec l'hypothèse selon laquelle les formes mésomères de  $\text{TyrO}\cdot$  (dont  $\text{TyrC}_{para}\cdot$ ) réagissent avec  $\cdot\text{OH}$ .

La réaction de  $\cdot\text{OH}$  avec  $\text{TyrC}^{\text{ortho}}$  mène à la formation de DOPA, qui est alors un produit d'hydroxylation commun aux deux mécanismes proposés. Le produit résultant de la recombinaison entre  $\text{TyrO}^{\cdot}$  et  $\cdot\text{OH}$  pour mener à un peroxyde n'a pas été détecté, sans doute étant donné sa faible stabilité chimique en solution comme dans la source d'ionisation: il est peut-être formé intermédiairement mais la pérennité de la liaison O-O semble compromise.

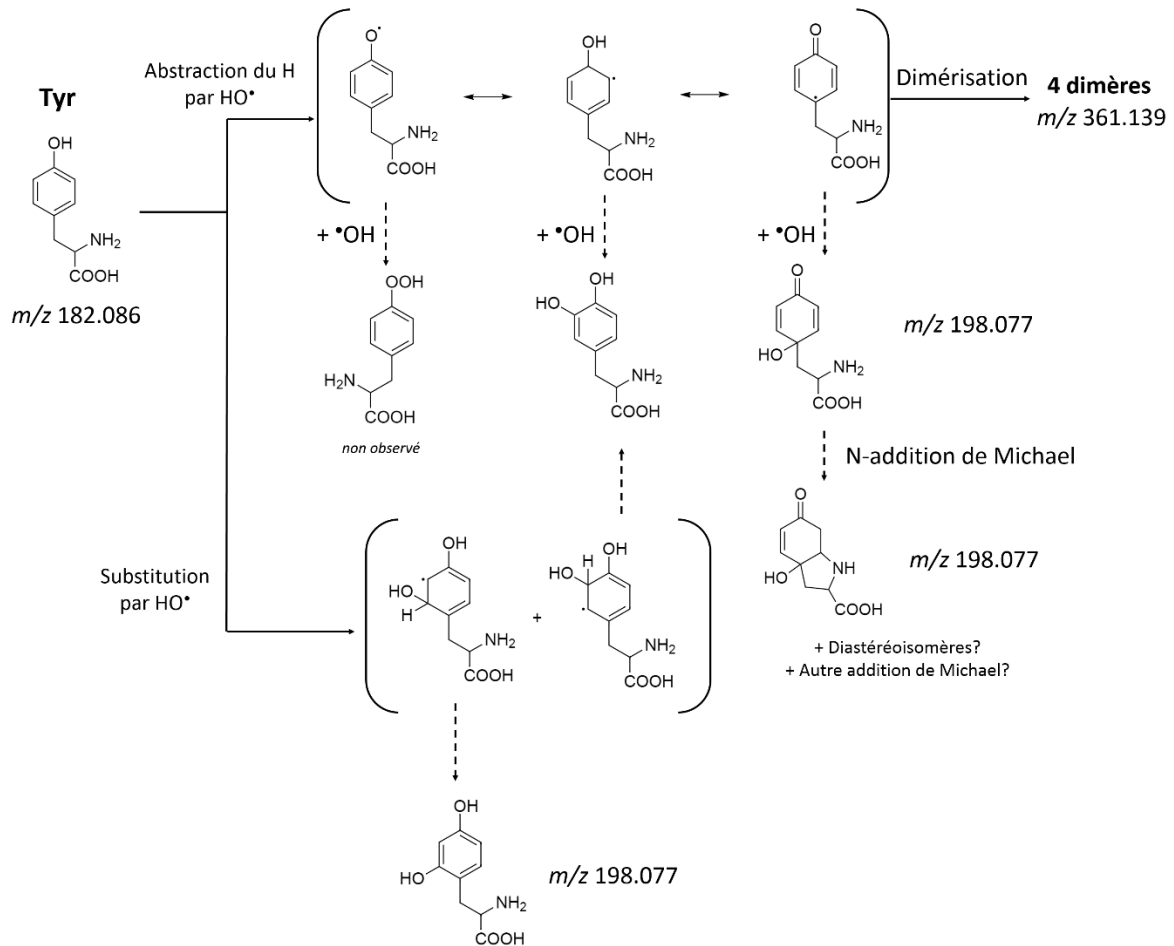


Figure 27: Illustration récapitulative du comportement de la tyrosine lors d'une l'oxydation avec  $\cdot\text{OH}$ .



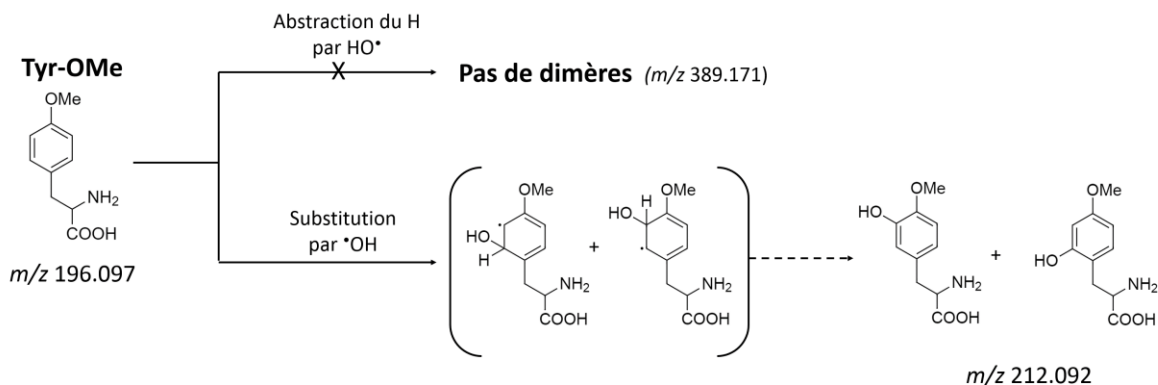


Figure 28: Illustration récapitulative du comportement de la tyrosine-O-méthylée lors d'une l'oxydation avec \*OH.

Ainsi, au-delà de la mise en évidence de la nécessité de formation du précurseur radicalaire TyrO\* dans le processus de dimérisation, à travers ces expériences, il a pu être montré que les radicaux \*OH et N<sub>3</sub>\* s'y comportent de manière analogue d'un point de vue mécanistique. Il est donc tout à fait cohérent de considérer le radical azoture pour étudier plus précisément la dimérisation ce qui va assurer un rendement plus important en dimères.

#### IV.1.4. Investigation structurale

Dans l'optique d'élucider les structures des nouveaux dimères mis en évidence et de confirmer celles déjà décrites dans la littérature, il convient de revenir à l'étape initiale de formation des dimères : la production du radical tyrosyle. Comme cela a été souligné précédemment, quel que soit le radical oxydant considéré (N<sub>3</sub>\* ou \*OH), c'est l'abstraction de l'hydrogène de la fonction phénol qui est la première étape de formation du radical TyrO\*. L'électron est en réalité délocalisé sur l'ensemble du cycle aromatique par mésomérie pour mener aux trois formes mésomères prédominantes antérieurement présentées (Figure 2). En faisant l'hypothèse que ces trois radicaux puissent se recombiner entre eux pour former des dimères, jusqu'à six isomères (Figure 29) sont susceptibles d'être formés et parmi eux, les dimères *ortho-ortho* (1) et *iso* (2) déjà décrits dans la littérature (Eickhoff et al., 2001). La probabilité d'existence des quatre autres recombinaisons proposées (3, 4, 5, 6) de radicaux peut être discutée. La présence d'une fonction peroxyde au sein du dimère *iso-iso* (6) en fait une structure peu stable chimiquement. Il en est de même pour le dimère *para-para* (5), pour lequel la gêne stérique induite par les chaînes latérales va contraindre la recombinaison des deux carbones en *para*. Les calculs théoriques de Shamovsky et al. sont en accord avec la faible stabilité supposée de certains dimères (Shamovsky et al., 2001). La détermination du diagramme d'énergie relative de dimères de *p*-crésol, modèle de la tyrosine utilisé par ces auteurs, a permis de définir un ordre de stabilité relative des six structures exposées en Figure 29 (de la plus à la moins stable): *ortho-ortho*, *ortho-iso*, *ortho-para*, *iso-para*, *para-para* et *iso-iso*.

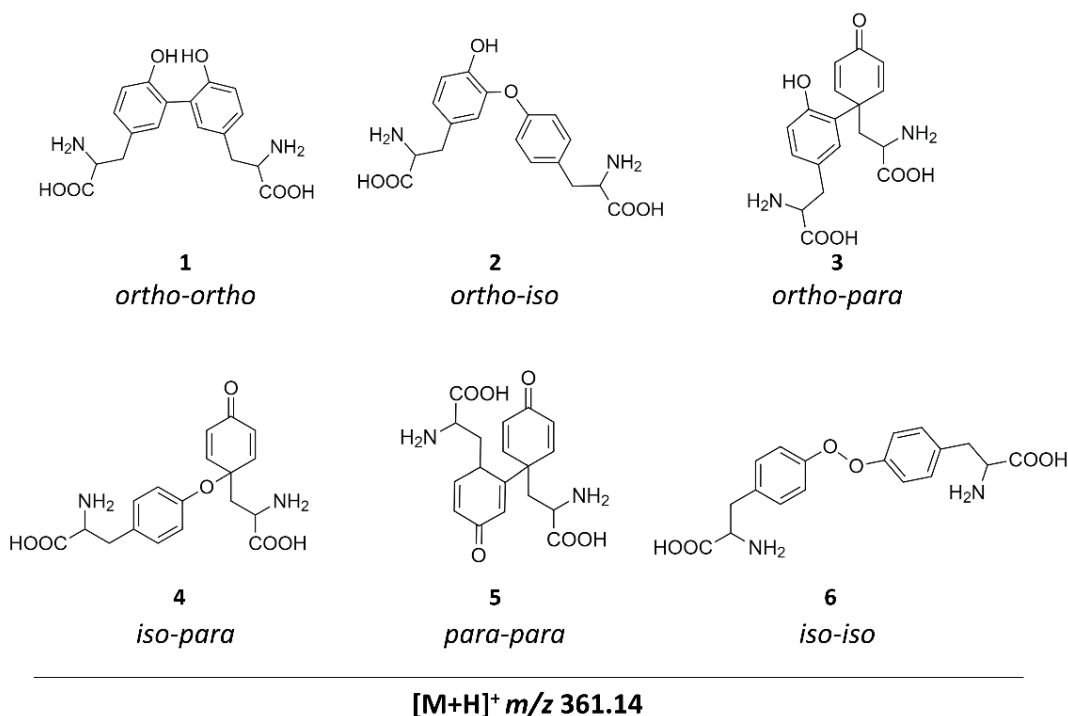


Figure 29: Structures des six potentiels dimères de tyrosine résultant de la recombinaison entre les radicaux TyrO<sup>•</sup>, TyrC<sup>•</sup><sub>ortho</sub> et TyrC<sup>•</sup><sub>para</sub>.

Une représentation simplifiée de ce diagramme est exposée en Figure 30. Le dimère *iso-iso* du *p*-crésol possède une énergie relative supérieure à 0, ce qui confirme qu'il n'est pas stable thermodynamiquement. Dans le cadre du *p*-crésol, le dimère *para-para* possède une énergie relative inférieure à 0 mais c'est sur cet exemple que la limite de ce modèle se traduit : la gêne stérique induite par le groupement méthyl n'est pas comparable à celle de la chaîne latérale de l'acide aminé. Dans le cadre du dimère *para-para* de tyrosine, l'énergie relative pourrait certainement être supérieure à 0. Néanmoins, l'ordre relatif de stabilité des structures reste valable. Les dimères 3, 4 et 5 possèdent une sous-structure de type cyclohexadiènone, propice aux additions de Michael, comme cela a été discuté dans le cadre de la formation de dérivés hydroxylés sous <sup>•</sup>OH. Ces structures, si elles sont formées, risquent donc d'évoluer à travers des additions de Michael intramoléculaires.

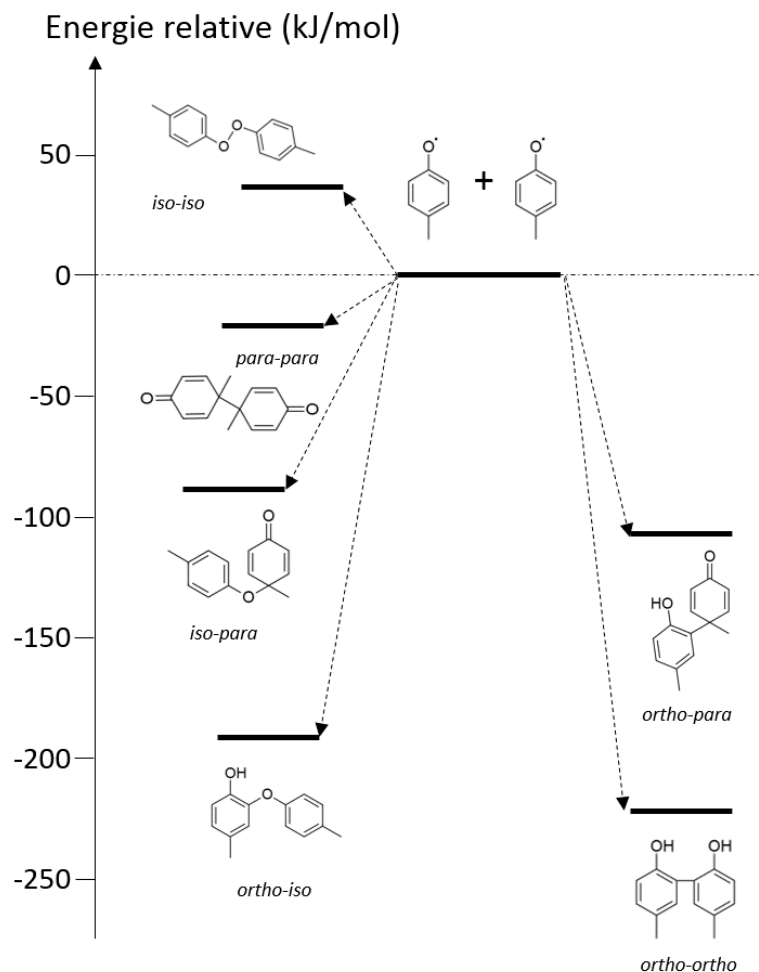
***p*-crésol**

Figure 30: Diagramme d'énergie relative simplifié des dimères de *p*-crésol. Inspiré de Shamovsky et al. (Shamovsky et al., 2001). La tyrosine y a été modélisée par le *p*-crésol et les calculs réalisés en DFT au niveau B3LYP/6-31G\*\*.

Pour mener à bien cette élucidation structurale, sur la base des structures potentielles présentées en Figure 29 et du diagramme des énergies relatives de la Figure 30, une stratégie analytique a été mise en place. A travers des expériences de fragmentation (MS/MS), de deutération spécifique et d'échanges H/D avec le solvant, une nouvelle famille de composés a pu être identifiée et des structures proposées.

#### IV.1.4.1. Expériences de fragmentation (MS/MS)

Des expériences de fragmentation (MS/MS) ont été réalisées (énergie de collision (EC) fixée à 20 eV) sur les quatre pics de dimères. Les spectres résultants sont présentés en Figure 31.

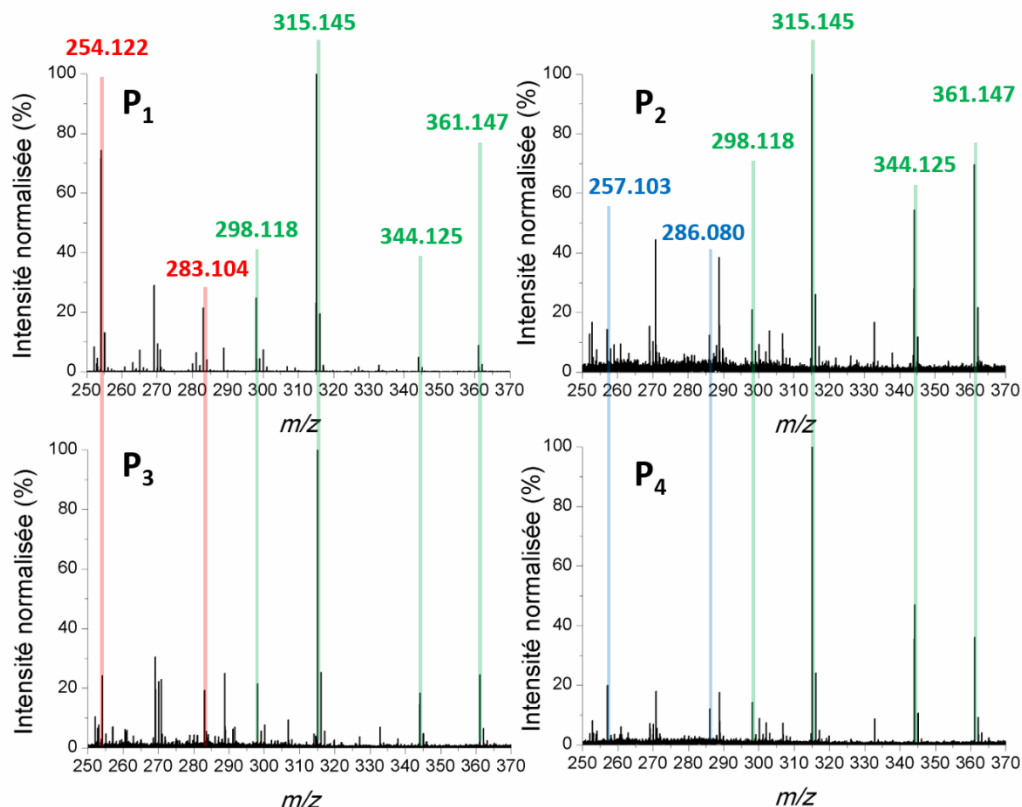


Figure 31: Spectres de fragmentation MS/MS des pics chromatographiques P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub>. Energie de collision : 20 eV,  $m/z$  sélectionné  $361 \pm 1$ . L'intensité est normalisée par rapport au fragment le plus intense à  $m/z$  315.145.

Des fragmentations classiques d'acides aminés (surlignées en vert) ont pu être mises en évidence pour les quatre dimères ( $m/z$  sélectionné  $361 \pm 1$ ). En partant du pic moléculaire  $MH^+$ , les pertes de 17  $[NH_3]$  et/ou 46  $[H_2O+CO]$  donnant respectivement lieu à des fragments à  $m/z$  344.12, 315.15 et 298.11 sont observées. En plus de ces fragments, les espèces P<sub>1</sub> et P<sub>3</sub> puis P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> possèdent des profils de fragmentation communs deux à deux. Comme visible sur la Figure 31, P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> présentent des fragments spécifiques, surlignés en bleu ( $m/z$  286.07 et 257.10) alors que les fragments à  $m/z$  283.10 et 254.13 sont caractéristiques des espèces P<sub>1</sub> et P<sub>3</sub> (surlignés en rouge). Certains fragments correspondent à des pertes combinées de  $NH_3$ ,  $CO$ ,  $H_2O$  ou encore  $CO_2$  mais d'autres n'ont pas précisément été attribués. Les fragments non surlignés mais observés avec une intensité non négligeable n'ont pas été attribués et appartiennent à d'autres espèces que les dimères de tyrosine qui éluent aux mêmes temps de rétention car ils possèdent des masses avec des décimales incompatibles avec une fragmentation du pic à  $m/z$  361.14. A ce stade, aucun lien entre les fragments observés et l'existence de différentes structures n'a pu être établi. L'identification structurale des nouveaux isomères ni des structures déjà connues n'a été rendue possible. Nonobstant, une

information précieuse obtenue grâce à ces profils de fragmentation est que les dimères de tyrosine semblent pouvoir être associés deux à deux.

#### IV.1.4.2. Expériences de deutérotation

Les expériences de MS/MS n'ayant pas permis de caractériser les quatre espèces dimériques, cette première approche a été complétée par la considération d'espèces deutériées. A partir des six potentiels accrochages covalents précédemment proposés (Figure 29), une solution pour effectuer une première discrimination est d'utiliser la tyrosine deutériée spécifiquement en position *ortho* ( $C_2$  et  $C_6$ ). Bien que des expériences aient déjà été réalisées avec celle-ci, la résolution chromatographique n'avait certainement pas permis la détection de tous les isomères de bi-tyrosine (Blouquit *et al.*, 2007). Les structures des dimères deutériés et leurs  $m/z$  attendus sont présentés en Figure 32.

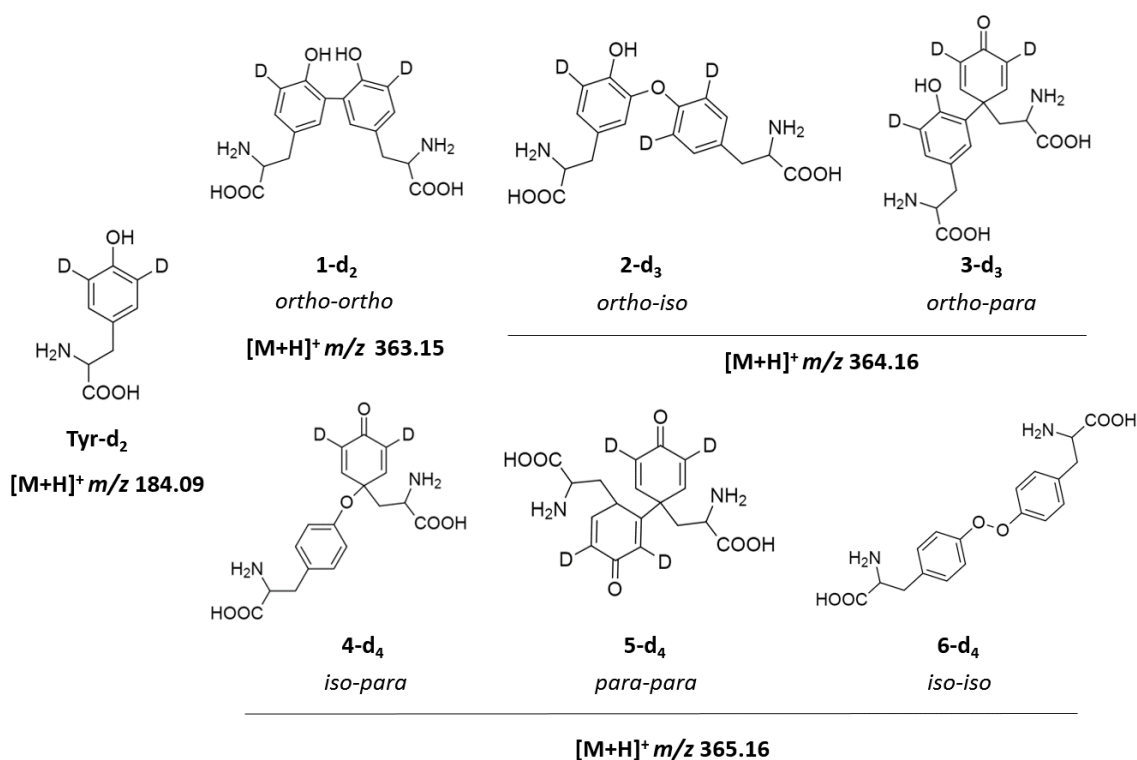


Figure 32: Structures de la tyrosine deutériée, de ses potentiels dimères formés et leurs  $m/z$  monoisotopiques associés.

En considérant les positions *ortho* deutériées, cela permet la discrimination du nombre de positions *ortho* impliquées, sur la base de leurs  $m/z$  mesurés sur les spectres de masse. Lorsque deux positions *ortho* sont impliquées dans la formation d'un dimère, le  $m/z$  mesuré est différent du cas où une seule position l'est et ces deux  $m/z$  différent également du cas où aucune des deux positions *ortho* n'est impliquée.

La tyrosine deutériée a donc été irradiée à 40 Gy en présence de radicaux  $N_3^*$  et analysée par UPLC-MS. La suspicion d'additions de Michael sur les structures possédant une cyclohexadiénone a amené à contrôler les conditions de conservation en amont de l'analyse UPLC-MS. Les conditions « T0 » correspondent au temps zéro pour lequel les échantillons ont été congelés à  $-20^\circ\text{C}$  directement après l'irradiation en regard des conditions « T48 » pour lesquelles les échantillons ont été conservés à  $37^\circ\text{C}$  pendant 48 heures pour favoriser les échanges H/D attendus lors d'une réaction d'addition sur la double liaison C=C de la cyclohexadiénone. Les chromatogrammes ioniques ne sont ici pas réextraits, mais les quatre mêmes pics chromatographiques que pour la tyrosine non deutériée sont observés, avec des temps de rétention identiques. Les spectres de masse correspondants aux pics  $P_1$  à  $P_4$  à T0 et T48 sont présentés en Figure 33 (a) et (b). A T0, un seul des quatre dimères de tyrosine deutériée possède une contribution unique à  $m/z$  363.158, caractéristique du dimère *ortho-ortho* 1- $d_2$  déjà connu dans la littérature. Il s'agit du pic  $P_1$ , qui se trouve aussi être le dimère le plus intense et qui ne possède aucun deutérium labile puisque son spectre de masse est identique à T0 et T48.

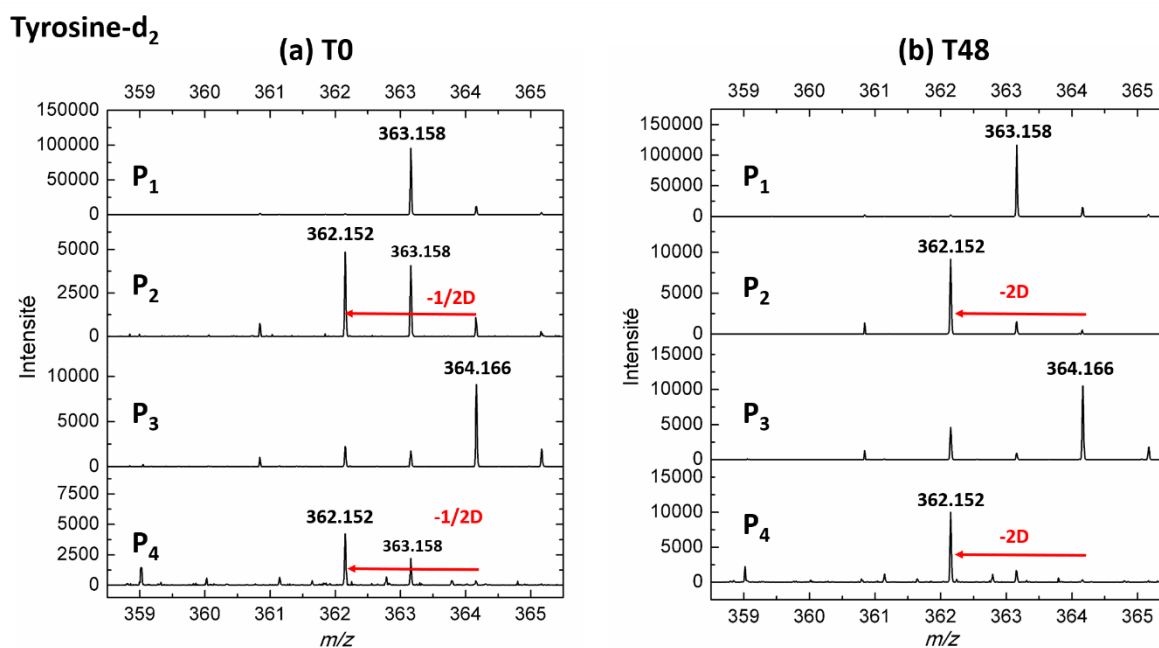


Figure 33: Spectres de masse des pics  $P_1$  à  $P_4$  à T0 (a) et T48 (b) pour la tyrosine- $d_2$  irradiée dans  $H_2O$ . Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

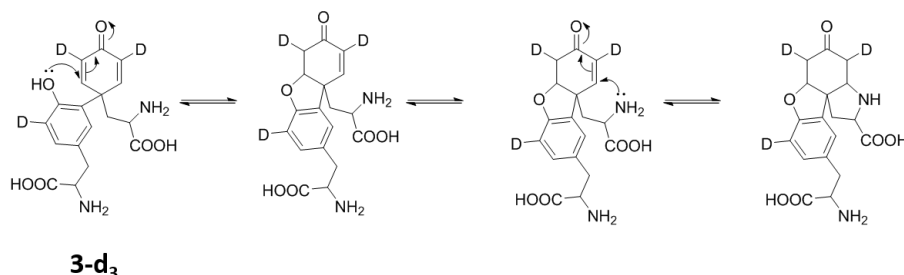
Le pic chromatographique  $P_3$  possède quant à lui un pic monoisotopique à  $m/z$  364.166, pouvant correspondre aux structures 2- $d_3$  (*ortho-iso*) et 3- $d_3$  (*ortho-para*) de la Figure 32. De même que pour  $P_1$ , le spectre de masse de  $P_3$  est identique à T0 et T48, il s'agit donc d'une espèce ne possédant aucun deutérium labile. Il est ainsi proposé que  $P_3$  corresponde au dimère 2- $d_3$ , déjà caractérisé dans la littérature comme l'*iso* di-tyrosine, structure pour laquelle aucun échange H/D n'est attendu. Comme cela est visible sur les spectres de masse de la Figure 33 (a), aucune des quatre espèces ne présente

de pic monoisotopique à  $m/z$  365.16 ni à T0 ni à T48. Les contributions visibles à cette masse proviennent du massif isotopique d'espèces possédant des  $m/z$  monoisotopiques à 363.15 ou 364.16. Ceci exclut alors trois des structures de bi-tyrosine proposées en Figure 32 à savoir 4-d<sub>4</sub>, 5-d<sub>4</sub> et 6-d<sub>4</sub>. A ce stade, et par élimination, les deux pics chromatographiques encore non attribués semblent provenir de la même recombinaison radicalaire, à savoir le dimère *ortho-para* 3-d<sub>3</sub> dont le  $m/z$  est de 364.16. En regardant plus en détails leurs spectres de masse, les pics chromatographiques P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> possèdent des contributions à  $m/z$  362.15 et 363.15 mais uniquement une très faible contribution à  $m/z$  364.16. De surcroît, leurs spectres de masse évoluent dans le temps entre T0 et T48. Alors qu'aucun n'échange H/D n'a été observé pour les pics P<sub>1</sub> et P<sub>3</sub>, les deux autres dimères correspondant aux pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> échangent des deutériums avec le solvant (ici, l'eau) immédiatement après irradiation puisque dès T0, le signal à  $m/z$  364.16 (pas d'échange) est difficilement détectable. De tels échanges H/D sont expliqués par l'équilibre céto-énolique de structures issues du dimère *ortho-para* qui évolueraient suite à la formation de la liaison covalente *via* des additions de Michael. Elles pourraient expliquer la présence de signaux à  $m/z$  363.15 (-1 D) et 362.15 (-2 D) à T0 puis la présence quasi unique du signal à  $m/z$  362.15 (-2 D) à T48. Ainsi, avec un  $m/z$  à 362.15, il ne reste qu'un unique deutérium sur le dimère issu de la combinaison de deux tyrosines deutériées. Les pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> présentent un comportement d'échange H/D extrêmement similaire, ce qui consolide l'hypothèse selon laquelle ils possèdent des structures très proches. D'autre part, d'après les simulations réalisées sur le *p*-crésol, le dimère issu de l'association entre les positions *ortho* et *para* se trouve être la troisième structure la plus stable après l'*ortho-ortho* et l'*ortho-iso* (Figure 30).

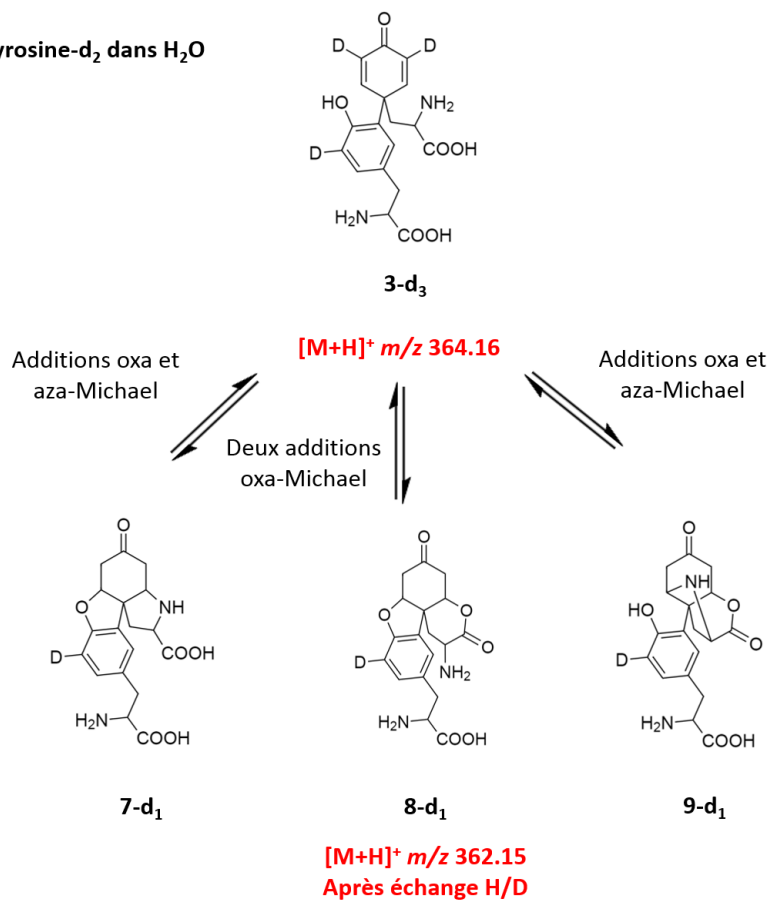
Des études menées sur l'oxydation de la position *para* du radical tyrosyle, évoquées plus en amont dans ce manuscrit, ont mis en évidence des réactions de N-addition de Michael intramoléculaire au niveau de la cyclohexadiénone (Jin et al., 1993; Möller et al., 2012). Dans le cas de la bi-tyrosine, en considérant la nouvelle liaison formée entre les radicaux *ortho* et *para*, le dimère 3-d<sub>3</sub> est susceptible d'évoluer à travers deux additions de Michael intramoléculaires, comme schématisé sur la Figure 34 (a). Cette réactivité génère la formation d'une nouvelle famille de dimères de tyrosine, formée de trois potentiels isomères tétracycliques 7-d<sub>1</sub>, 8-d<sub>1</sub> et 9-d<sub>1</sub> présentés en Figure 34 (b). Les trois structures proposées résultent de deux additions de Michael impliquant un atome d'azote (aza-addition de Michael) ou d'un atome d'oxygène (oxa-addition de Michael). Le dimère 7-d<sub>1</sub> est le dimère résultant d'une aza-addition de l'amine libre de la chaîne latérale d'un côté de la cyclohexadiénone et d'une oxa-addition de Michael de l'oxygène du phénol de l'autre. Le dimère 8-d<sub>1</sub> résulte quant à lui d'une double oxa-addition de Michael impliquant également l'atome d'oxygène du phénol ainsi que l'oxygène de la forme carboxylate de l'acide carboxylique. Enfin, le dimère 9-d<sub>1</sub> est le résultat d'une

aza-addition de Michael de l'amine libre de la chaîne latérale et d'une oxa-addition de Michael de l'oxygène du carboxylate de cette même chaîne latérale.

(a) Additions de Michael



(b) Tyrosine-d<sub>2</sub> dans H<sub>2</sub>O



Famille MAD (Michael Addition Dimers)

Figure 34: (a) Mécanisme d'additions de Michael intramoléculaires (O- et N-additions) illustré sur le dimère 3-d<sub>3</sub>; (b) Dimères 7-d<sub>1</sub>, 8-d<sub>1</sub> et 9-d<sub>1</sub> issus de 3-d<sub>3</sub> après échange H/D avec le solvant par équilibre céto-énolique.

La formation des pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> dès T<sub>0</sub> indique que les cyclisations *via* les additions de Michael sont rapides mais les différences observées sur les spectres de masse entre T<sub>0</sub> et T<sub>48</sub> semblent montrer que l'échange H/D avec le solvant est lent. Cette famille de nouvelles structures est appelée la famille MAD pour « Michael Addition Dimers ». Au-delà des structures figées représentées en Figure 34 (b), un grand nombre de diastéréoisomères peut être formé puisque des jonctions cycliques *cis* et *trans*



pour chacune des additions sont envisageables. En formant des hétérocycles à cinq ou six membres, ces additions sont thermodynamiquement favorables par rapport à des cycles impliquant moins de cinq ou plus de six atomes. A propos des échanges H/D ayant lieu sur ce type de structures, il existe une différence entre T0 et T48 pour les spectres de masse de P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub>. En effet, l'échange H/D n'est pas complet à T0, le pic à *m/z* 363.158, caractéristique de la perte d'un deutérium, est encore trop intense pour n'être que le contributeur isotopique M+1 du pic à *m/z* à 362.152. A T48, son intensité a fortement diminué et est à présent en accord avec une contribution du massif isotopique du pic à *m/z* 362.152 qui prouve la perte de deux deutériums. *In fine*, les dimères 7-d<sub>1</sub>, 8-d<sub>1</sub> et 9-d<sub>1</sub> ne possèdent donc plus qu'un unique deutérium non échangeable, qui se trouve être celui d'une des positions *ortho* de l'un des résidus tyrosine et non impliquée dans la liaison covalente. Les produits finaux de dimérisation 7-d<sub>1</sub>, 8-d<sub>1</sub> et 9-d<sub>1</sub> résultent donc d'une double addition de Michael. A ce stade de l'investigation, les pics chromatographiques de dimère de tyrosine P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> correspondent donc à des tétracycles et trois structures différentes sont proposées pour les deux pics. En Figure 35 est proposée une évolution des structures qui permet d'expliquer l'échange H/D et donc la perte de deutériums par équilibre céto-énolique. Le processus est exposé pour le dimère 7-d<sub>1</sub> mais est applicable aux trois dimères 7-d<sub>1</sub>, 8-d<sub>1</sub> et 9-d<sub>1</sub>.

#### Echange H/D par équilibre céto-énolique

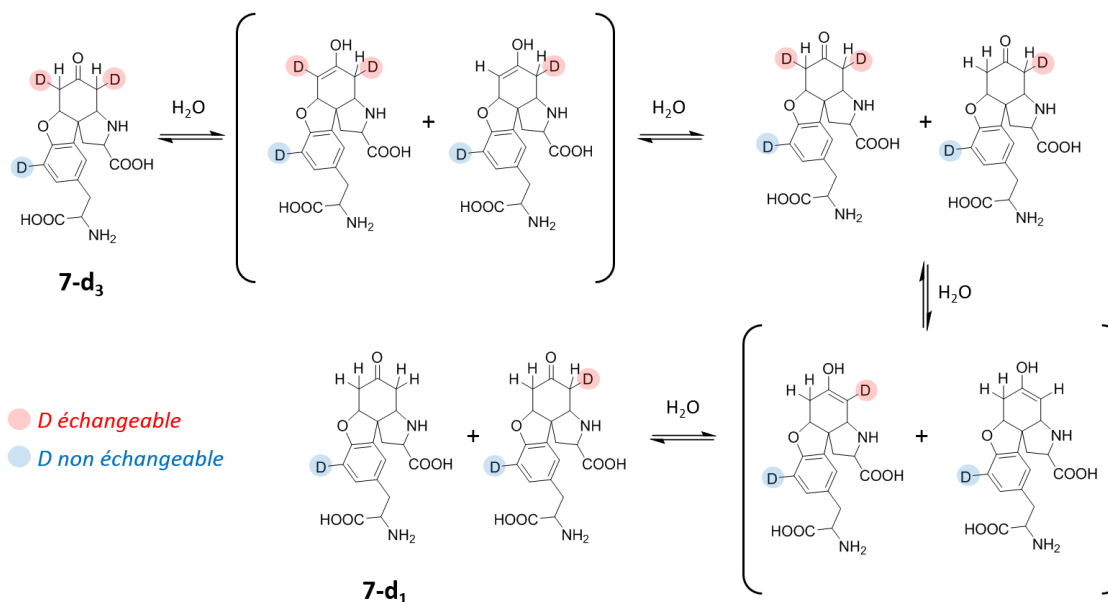


Figure 35: Proposition d'échange H/D avec le solvant pour la tyrosine-d<sub>2</sub> irradiée dans H<sub>2</sub>O. Le processus est exposé pour le dimère 7-d<sub>1</sub>.

#### IV.1.4.3. Expériences d'échanges H/D avec le solvant

Dans le but de confirmer les propositions de structures tétracycliques faites, des expériences ont été menées dans D<sub>2</sub>O pour tenter de corroborer ces structures avec les spectres de masse

expérimentaux. En effet, si des échanges H/D sont mis en évidence lorsque la tyrosine deutériée est irradiée dans l'eau, des échanges « inverses » doivent être observés lorsque la tyrosine est irradiée dans D<sub>2</sub>O. La tyrosine a été irradiée dans D<sub>2</sub>O et les conditions de conservation des échantillons en amont de l'analyse en UPLC-MS sont les mêmes que précédemment : T0 et T48. Bien qu'elle ait été irradiée dans D<sub>2</sub>O, les conditions d'analyse en UPLC impliquant une séparation chromatographique dans H<sub>2</sub>O, les hydrogènes labiles sont rééchangés sous leur forme hydrogène au contraire de ceux introduits suite à l'addition de Michael. Les structures résultantes proposées dans le cas de la tyrosine irradiée dans D<sub>2</sub>O sont présentées en Figure 36.

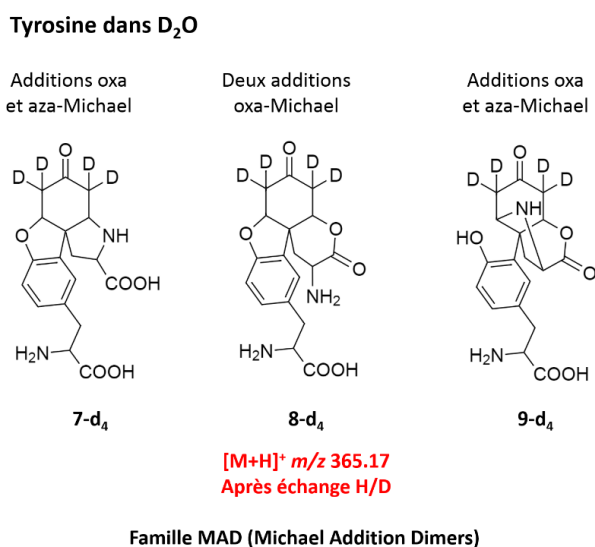


Figure 36: Dimères 7-d<sub>4</sub>, 8-d<sub>4</sub> et 9-d<sub>4</sub> issus de 3 après échange H/D avec le solvant par équilibre céto-énolique.

Les spectres de masse correspondants aux quatre pics chromatographiques P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> (chromatogrammes non extraits ici) sont présentés en Figure 37. Le nombre moyen de deutériums introduits a été calculé pour chacun des pics chromatographiques. Les masses moyennes pondérées par les intensités lors d'une irradiation dans H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O ont été calculées. La masse moyenne obtenue lors de l'irradiation dans H<sub>2</sub>O est ensuite retranchée à celle obtenue dans D<sub>2</sub>O et le nombre moyen de deutériums incorporés est ainsi estimé. Ces calculs sont présentés dans le Tableau 3. Ces expériences d'échange H/D réalisées dans D<sub>2</sub>O permettent de confirmer pour les dimères correspondants aux pics chromatographiques P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub>, que presque quatre deutériums ont pu être introduits par échange avec D<sub>2</sub>O à T48. Comme cela a été observé pour la tyrosine-d<sub>2</sub> irradiée dans H<sub>2</sub>O, une différence existe entre les spectres de masse de P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> à T0 et T48. A T0, le pic à m/z 364.166 est quasiment aussi intense que celui à m/z 365.175 : le gain moyen de deutériums est de 3.3 (Tableau 3). A T48, le profil du spectre de masse a évolué, le pic à m/z 365.17 est à présent le plus intense et le gain moyen de deutériums est en effet estimé à 3.7 (Tableau 3). Le mécanisme proposé en Figure 35 peut être transposé dans le

cas de la tyrosine irradiée dans D<sub>2</sub>O, l'échange H/D est simplement inversé. Toutes ces observations confirment la proposition de structures dimériques tétracycliques issues d'additions de Michael. Concernant les échanges H/D du dimère 1 *ortho-ortho* (P<sub>1</sub>), aucun échange H/D avec le solvant n'est attendu et c'est effectivement ce qui est observé sur le spectre de masse et appuyé par le calcul du nombre moyen de deutériums incorporés qui est nul. Pour le dimère 2 *ortho-iso* (P<sub>3</sub>), alors qu'aucun échange n'est attendu, bien que le pic monoisotopique se trouve à m/z 361.147, le nombre moyen de deutériums ajoutés est évalué à 1. Cette observation témoigne de la présence d'une espèce supplémentaire éluant au même temps de rétention et capable d'échanger des deutériums et sera discutée ultérieurement. Comme dans le cas de la tyrosine irradiée dans l'eau, la formation des pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> dès T0 indique que les cyclisations *via* les additions de Michael sont rapides mais les modifications observées sur les spectres de masse entre T0 et T48 montre que l'échange H/D avec le solvant est lent. A T48, la présence du pic à m/z 364.166 témoigne du fait que l'échange H/D n'est pas complet, ce qui est en accord avec les nombres de deutériums incorporés qui n'atteignent jamais 4 à T48.

### Tyrosine dans D<sub>2</sub>O

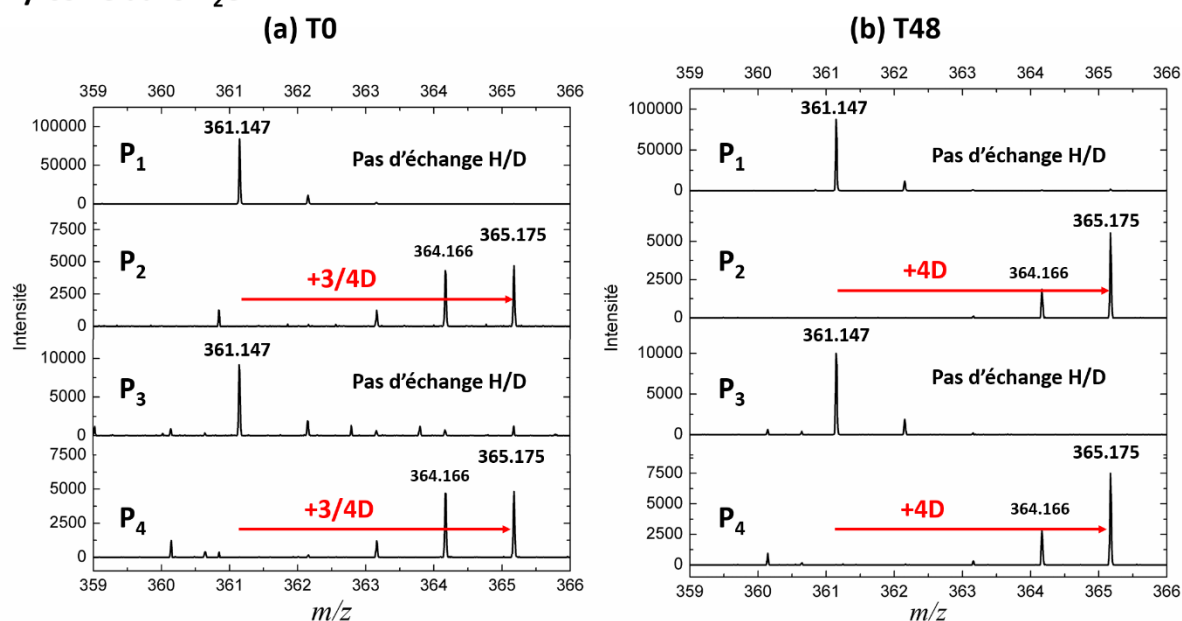


Figure 37: Spectres de masse des pics chromatographiques de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> à T0 (a) et T48 (b) pour la tyrosine irradiée dans D<sub>2</sub>O. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Nombre de deutériums échangés		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
Tyr	T0	0.1	<b>3.3</b>	1.0	<b>3.3</b>
	T48	0.1	<b>3.7</b>	1.0	<b>3.7</b>

Tableau 3 : Valeurs moyennes du nombre de deutériums incorporés pour la tyrosine lors des échanges H/D dans D<sub>2</sub>O. Les valeurs supérieures à 2 sont indiquées en rouge.

Une dernière vérification a été de considérer la tyrosine deutériée lors d'une irradiation dans D<sub>2</sub>O. Les structures de dimères proposées sont présentées en Figure 38 : cinq deutériums sont présents après l'échange.

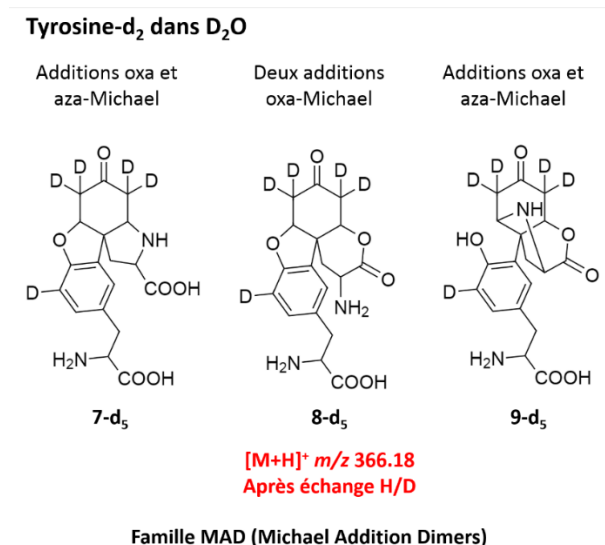


Figure 38: Dimères 7-d<sub>5</sub>, 8-d<sub>5</sub> et 9-d<sub>5</sub> issus de 3-d<sub>3</sub> après échange H/D avec le solvant par équilibre céto-énolique.

Ainsi, pour les dimères 1 et 2, les  $m/z$  attendus seront identiques à ceux de la Figure 33 puisqu'aucun échange n'est observé pour ces deux composés, c'est-à-dire  $m/z$  363.15 pour 1 et  $m/z$  364.16 pour 2. En revanche, pour les dimères issus de la famille MAD, deux deutériums supplémentaires peuvent être introduits pour mener à un  $m/z$  de 366.18 (7-d<sub>5</sub>, 8-d<sub>5</sub>, 9-d<sub>5</sub>). Les spectres de masse des dimères de tyrosine-d<sub>2</sub> irradiée dans D<sub>2</sub>O sont exposés en Figure 39. Ici, contrairement aux cas précédents de la tyrosine irradiée dans D<sub>2</sub>O ou de la tyrosine-d<sub>2</sub> irradiée dans H<sub>2</sub>O, pour lesquels une évolution était notable entre les conditions T0 et T48, malgré les échanges H/D dû à l'équilibre céto-énolique, il n'y a pas de modification de masse puisque seuls des deutériums sont considérés. Les spectres de masse sont donc uniquement exposés à T0 mais ils sont identiques à T48. Comme attendu, les dimères correspondants aux pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub> possèdent un profil isotopique typique de l'existence d'un gain en masse avec un maximum à  $m/z$  366.177, cohérent avec les structures proposées en Figure 38.

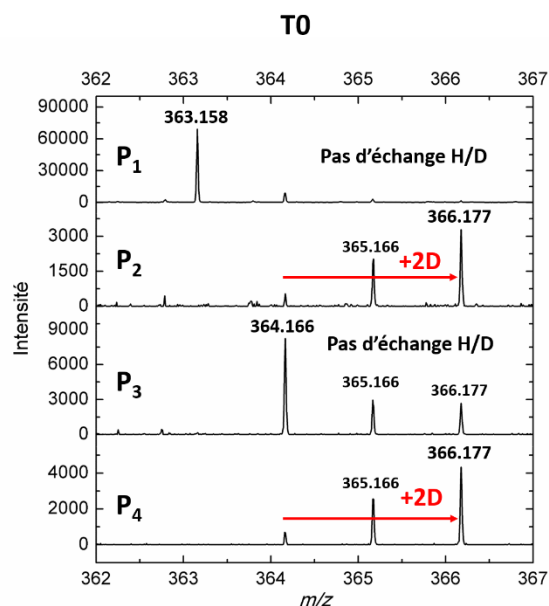
Tyrosine-d<sub>2</sub> dans D<sub>2</sub>O

Figure 39: Spectres de masse des pics chromatographiques de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> à T0 pour la tyrosine-d<sub>2</sub> irradiée dans D<sub>2</sub>O. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

## IV.1.4.4. Di-tyrosine : quatre isomères ?

Une nouvelle famille de dimères de tyrosine a été mise en évidence. Comme évoqué précédemment, la formation de tels composés multicycliques peut mener à l'existence de nombreux diastéréoisomères puisque deux jonctions de cycle sont formées suite aux cycloadditions. La séparation des quatre isomères mis en évidence ayant déjà été complexe, la séparation de diastéréoisomères sur la colonne à polarité de phase inversée (C18) semble illusoire. Cependant, comme proposé en Figure 40, en augmentant volontairement l'intensité du signal sur le chromatogramme extrait à  $m/z$  361.14, il est possible de distinguer une « enveloppe » au niveau de la ligne de base, comme une contribution globale de composés répondant à  $m/z$  361.14 sur toute une gamme de temps de rétention. Si cette contribution ne dépend que des dimères de la famille MAD comme cela est suspecté, alors elle ne devrait être visible que pour un  $m/z$  spécifique lors des expériences d'échanges H/D. Pour vérifier cette hypothèse, sur les panels b et c de la Figure 40 (cas de la tyrosine irradiée dans D<sub>2</sub>O) sont extraits les chromatogrammes pour  $m/z$   $365.17 \pm 0.05$  (b) et  $361.14 \pm 0.05$  (c). Ces extractions permettent de séparer les contributions des pics P<sub>1</sub> et P<sub>3</sub> ( $m/z$  361.14), attribués aux dimères 1 (*ortho-ortho*) et 2 (*iso*) des pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub>, dimères issus d'additions de Michael.

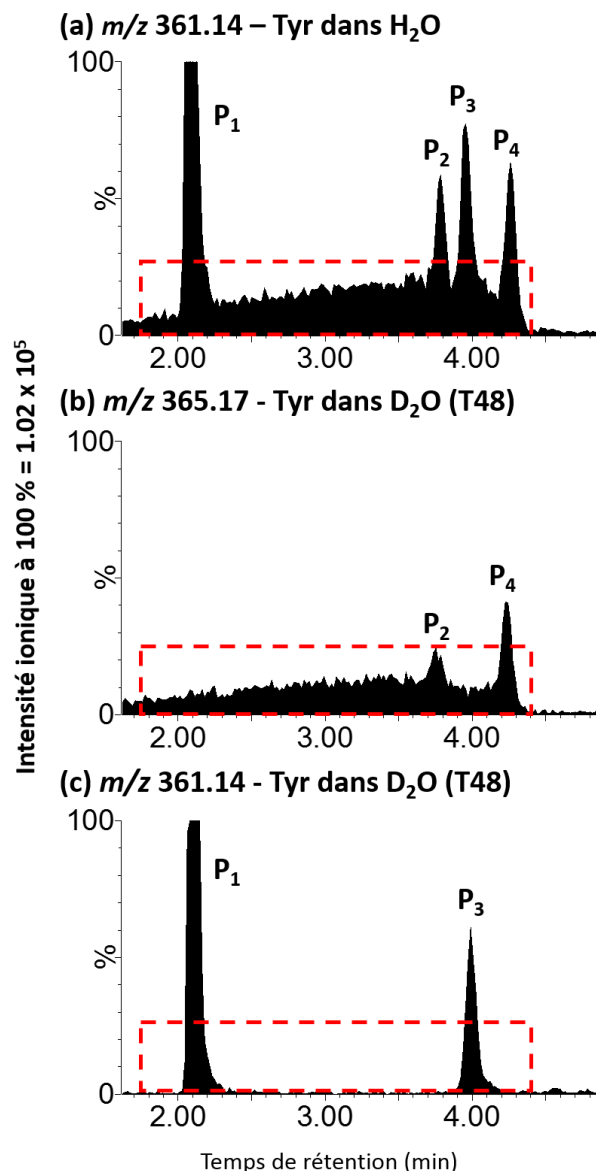


Figure 40: Comparaison des profils des chromatogrammes ioniques extraits de la tyrosine irradiée à 40 Gy dans  $H_2O$  ou  $D_2O$  en présence de  $N_3^*$ . Chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$   $361.14 \pm 0.05$  de la tyrosine irradiée dans  $H_2O$ , (b)  $m/z$   $365.17 \pm 0.05$  de la tyrosine irradiée dans  $D_2O$ , (c)  $m/z$   $361.14 \pm 0.05$  de la tyrosine irradiée dans  $D_2O$ . Gradient chromatographique n°1 (Tableau 38). Les intensités ioniques sont indiquées en pourcentage relatif. L'enveloppe de la ligne de base surlignant la présence ou non d'isomères est encadrée en ligne pointillée rouge.

Il est incontestable que cette « enveloppe » est uniquement présente sur les chromatogrammes extraits à  $m/z$  365.17, confirmant alors l'hypothèse selon laquelle cette dernière proviendrait de la contribution de diastéréoisomères de la famille MAD. Pour confirmer l'existence d'un mélange complexe de diastéréoisomères de la famille MAD, le nombre moyen de deutériums incorporés au niveau de l'« enveloppe » dans une zone exempte des pics  $P_1$  à  $P_4$  a été calculé pour le cas de la tyrosine irradiée dans  $D_2O$ . A T0, ce nombre a été estimé à 3.4 puis à 3.7 à T48 ce qui consolide l'hypothèse de la présence de dimères ayant subi des additions de Michael sur la totalité de l'« enveloppe » qui s'étend de 2 à presque 4.5 min. Ces calculs permettent également d'expliquer que pour le pic du dimère *ortho*-

*iso* ( $P_3$ ), un nombre moyen de deutériums échangés avait été estimé à 1 alors que sa structure ne permet en aucun cas d'expliquer l'incorporation d'un deutérium. En effet, c'est la faible contribution sous-jacente de diastéréoisomères de la famille MAD qui a mené à ce résultat inattendu. En conclusion, l'existence d'un mélange complexe de diastéréoisomères des dimères de la famille MAD est proposée en supplément des dimères *ortho-ortho* et *ortho-iso* déjà connus.

#### IV.1.5. Caractérisation spectroscopique des différents isomères

Pour donner suite à l'investigation structurale des composés dimériques, une caractérisation spectroscopique a été réalisée. Une détection en absorption ( $\lambda = 280 \pm 2$  nm) a été rendue possible sur le même système UPLC que celui utilisé pour la détection par spectrométrie de masse équipé d'un détecteur à barrettes de diode. Sur le second panel de la Figure 41 (a), plusieurs pics chromatographiques absorbant à 280 nm sont détectés, correspondant à des oligomères de tyrosine. Les spectres d'absorption extraits de chacune des espèces, visibles en Figure 42 sont très similaires entre eux avec un maximum d'absorption se situant entre 280 et 290 nm dans les conditions de chromatographie utilisées (pH 2.6, acétonitrile et acide formique). Les longueurs d'onde d'absorption pour lesquelles l'intensité est maximale ( $\lambda_{\max}$ ) des quatre pics sont rassemblées dans le Tableau 4.

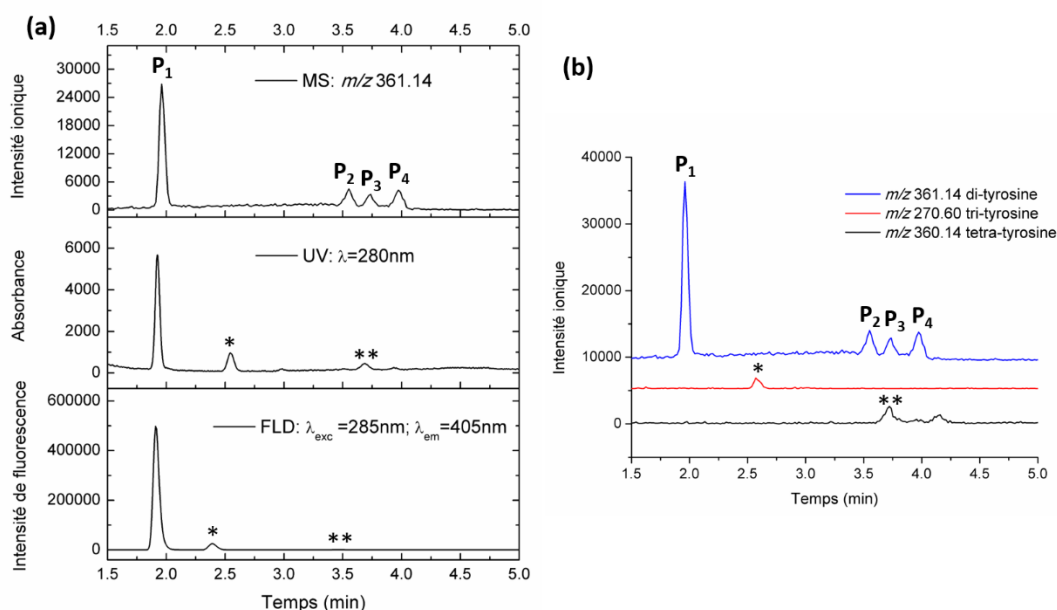
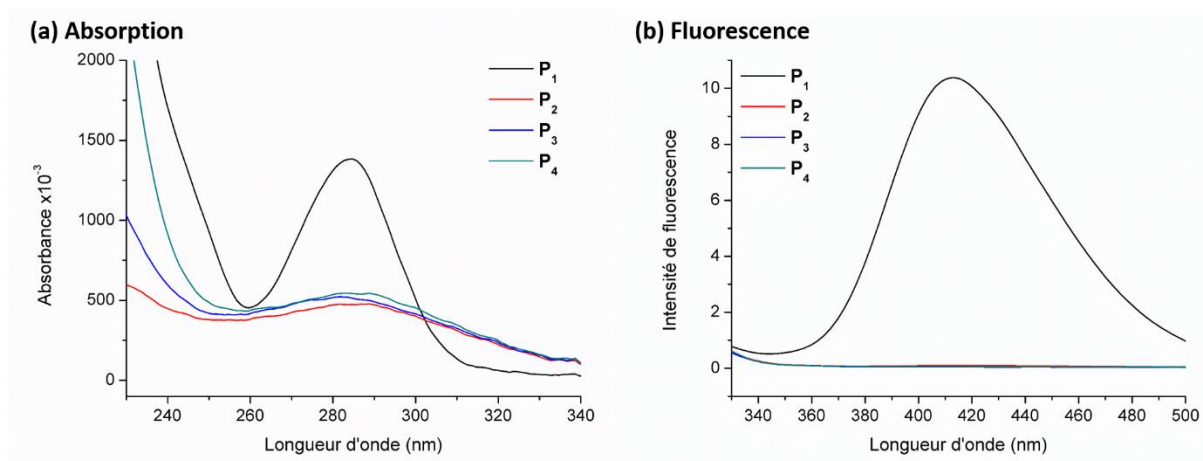


Figure 41: Chromatogrammes extraits de la tyrosine irradiée à 40 Gy sous N<sub>3</sub>. (a) De haut en bas : chromatogramme ionique extrait à  $m/z 361.14 \pm 0.05$ , chromatogramme d'absorption extrait ( $\lambda = 280 \pm 2$  nm), chromatogramme de fluorescence extrait ( $\lambda_{\text{exc}} = 285 \pm 10$  nm et  $\lambda_{\text{em}} = 405 \pm 10$  nm). Les intensités sont indiquées en valeur absolue. (b) Chromatogrammes ioniques extraits pour  $m/z 361.14 \pm 0.05$  (bi-tyr),  $m/z 270.60 \pm 0.05$  (tri-tyr,  $[M+2H]^{2+}$ ) et  $m/z 360.14 \pm 0.05$  (tétra-tyr,  $[M+2H]^{2+}$ ). L'intensité ionique est indiquée en valeur absolue. \* trimère et \*\*tétramère possédant au moins un motif *ortho-ortho*. Gradient chromatographique n°1 (Tableau 38).

Figure 42: Spectres d'absorption (a) et de fluorescence (b) des pics chromatographiques P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub>.

Pic chromatographique	$\lambda_{\max}$ absorption (nm)
P <sub>1</sub> ( <i>ortho-ortho</i> )	285
P <sub>2</sub> (MAD)	288
P <sub>3</sub> ( <i>ortho-iso</i> )	281
P <sub>4</sub> (MAD)	288

Tableau 4: Valeurs de longueurs d'onde maximales d'absorption des dimères de tyrosine.

Contrairement à la spécificité que peut offrir la détection en masse, l'absorption étant additive, le signal observé est la somme des dimères, des oligomères d'ordre supérieur mais aussi de toute potentielle espèce parasite. Le signal d'absorption à 280 nm le plus intense est détecté pour P<sub>1</sub> alors que les trois autres pics P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> ne possèdent qu'une très faible contribution à cette même longueur d'onde. Grâce à la détection en masse, le pic à 2.60 min a pu être attribué à un trimère ( $[M+H]^+$   $m/z$  270.60  $\pm$  0.05) de tyrosine. Le signal d'absorption à 3.72 min se trouve également être une superposition des contributions d'un des dimères (P<sub>3</sub>) et d'un tétramère ( $[M+H]^+$   $m/z$  360.14  $\pm$  0.05). Les spectres d'absorption extraits de chacune des espèces, visibles en Figure 42 sont très similaires entre eux avec un maximum d'absorption se situant entre 281 et 288 nm dans les conditions de chromatographie utilisées (milieu acide formique). Malencik et al. avaient déterminé le coefficient d'extinction molaire de la bi-tyrosine à 283 nm à pH 4 ( $\epsilon = 5680 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en travaillant très certainement sur le mélange d'isomères (Malencik et al., 1996). Au vu des structures proposées, il semble peu probable que les dimères de la famille MAD, qui ont perdu un des deux cycles aromatiques, possèdent un coefficient d'extinction molaire aussi important que celui des dimères *ortho-ortho* et *iso*. L'étude quantitative de la formation des quatre isomères majoritaires de bi-tyrosine est compromise par la méconnaissance de leurs valeurs respectives de coefficient d'extinction molaire à 280 nm qui sont sans doute très différentes. A 220 nm, le signal d'absorption observé résultant majoritairement



des liaisons simples C-C et C-H, il pourrait être intéressant de raisonner à cette longueur d'onde puisque les quatre isomères devraient posséder des coefficients d'extinction molaire assez proches. La condition sine qua non pour discuter de l'absorption à 220 nm est qu'aucune autre espèce n'élue au même temps de rétention que les espèces dont les spectres ont été extraits. Or, des tétramères ont été détectés sur la même gamme de temps de rétention que les dimères P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub>. D'autre part, l'acétonitrile utilisée pour la séparation chromatographique absorbe aussi vers 220 nm ce qui peut complexifier le raisonnement puisque le pourcentage d'acétonitrile augmente graduellement sur cette zone de temps de rétention.

Une détection complémentaire a été réalisée pour obtenir les spectres d'émission de fluorescence des différents isomères. Pour ce faire, les échantillons ont été excités à leur maximum d'absorption à pH acide,  $285 \pm 10$  nm et la fluorescence a été enregistrée entre 300 et 500 nm. Le troisième panel de la Figure 41 (a) expose le chromatogramme extrait pour  $\lambda_{em} = 405$  nm, longueur d'onde caractéristique de l'émission de fluorescence de la bi-tyrosine *ortho-ortho* connue dans la littérature (*Lehrer & Fasman, 1967*). Les spectres d'émission de fluorescence des pics P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> sont visibles en Figure 42 (b). Le dimère contenu sous le pic P<sub>1</sub> possède une intensité de fluorescence très intense à  $\lambda_{max} = 413$  nm contrairement aux trois autres pics P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub>. Il a précédemment été attribué au dimère *ortho-ortho*. Il est à noter que les trois autres isomères, correspondants à l'*ortho-iso* et à des dimères de la famille MAD, possèdent une intensité de fluorescence proche de zéro. Le trimère précédemment identifié ainsi que le tétramère qui co-élue avec P<sub>3</sub> fluorescent également, ce qui laisse à penser qu'ils contiennent au moins un motif *ortho-ortho*. Pour résumer, les quatre espèces dimériques possèdent un maximum d'absorption entre 280 et 290 nm dans des conditions acides alors que leur comportement d'émission de fluorescence est très différent : seul P<sub>1</sub> fluoresce à 413 nm. Cette information est d'une importance capitale puisque la fluorescence est utilisée pour détecter et quantifier la bi-tyrosine dans les échantillons biologiques (*M. J. Davies et al., 1999; Giulivi et al., 2003b*). Ces expériences apparaissent comme une réelle mise en garde à l'utilisation de la fluorescence comme technique de détection des dimères de tyrosine au regard de leur diversité structurale.

#### IV.1.6. Expériences de Spectrométrie de Mobilité Ionique (IMS)

En supplément des couplages de spectrométrie de masse avec la chromatographie liquide, la spectrométrie de mobilité ionique (IMS) est un outil qui permet l'introduction d'une dimension supplémentaire de séparation des ions en phase gaz (*Bohrer et al., 2008*). L'IMS permet la séparation des ions en fonction de leur géométrie, leur structure dans l'espace, leur forme. La séparation en IMS intervient suite à la séparation des espèces par UPLC et à la formation des ions dans la source d'ionisation et en amont de leur séparation en fonction du  $m/z$ . La séparation est basée sur la différence de section efficace de collision des ions. D'un point de vue expérimental, après la séparation

chromatographique, les ions sont formés dans l'électrospray puis exposés à un champ électrique qui les dirige vers la cellule IMS, appelée zone de dérive au sein de laquelle est introduit un flux de gaz (He ou N<sub>2</sub>) dans le sens contraire de déplacement des ions. Les ions rentrent alors en collision avec ce gaz, ce qui va permettre de les séparer en fonction notamment de leur géométrie. En effet, plus un ion va être compact, moindre sera sa surface exposée au gaz pour collisionner et plus rapide sera l'ion pour traverser la zone de collision. A l'inverse, un ion possédant une géométrie étendue dans l'espace va présenter une surface de collision plus importante, ce qui va freiner sa progression dans la cellule. Le temps mis par un ion pour traverser la cellule de collision est appelé temps de dérive et est classiquement exprimé en millisecondes. Plus précisément, dans le type de cellule de mobilité ionique qui sera utilisée, des radio-fréquences sont appliquées par des électrodes adjacentes (Figure 43, TWIMS, Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry). Des vagues de potentiel sont ainsi formées et vont permettre d'entraîner les ions plus ou moins rapidement. Les ions présentant de faibles sections efficaces de collision vont alors être à même de suivre la vague de potentiel alors que les ions plus lourds vont être retenus et vont mettre plus de temps à sortir de la cellule de dérive (Lanucara et al., 2014).

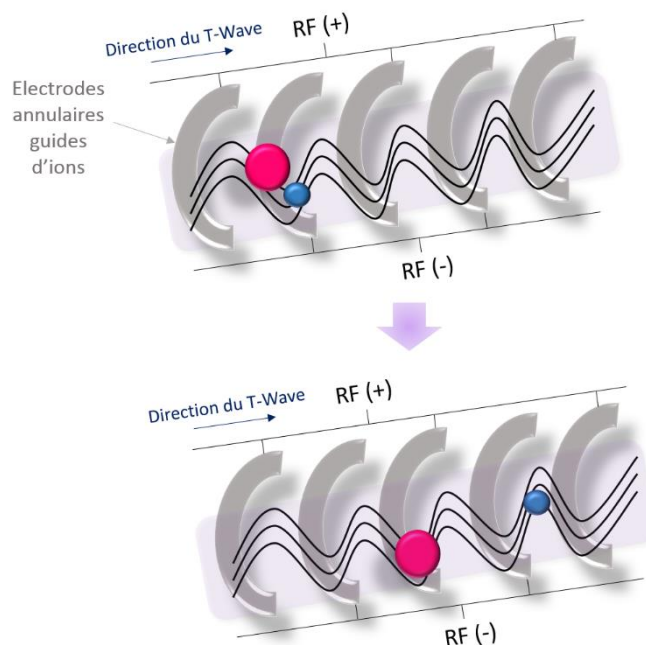


Figure 43: Schéma de la cellule de TWIMS: application de radiofréquences (RF): la séparation des ions avec une faible mobilité (bleus) sont emportés par les vagues de potentiel alors que ceux avec une forte mobilité (roses) sont retenus.

Des expériences d'IMS ont donc été effectuées sur les dimères de tyrosine dans le but de progresser dans l'investigation structurale. Des représentations 2D UPLC-IMS/MS peuvent être obtenues en sélectionnant un  $m/z$  donné : en abscisse est représenté le temps de rétention (tr) et en

ordonnée le temps de dérive (td). La représentation 2D td/tr extraite à  $m/z$  361.14 pour un échantillon de tyrosine irradiée à 40 Gy en présence de  $N_3^\bullet$  est présenté en Figure 44.

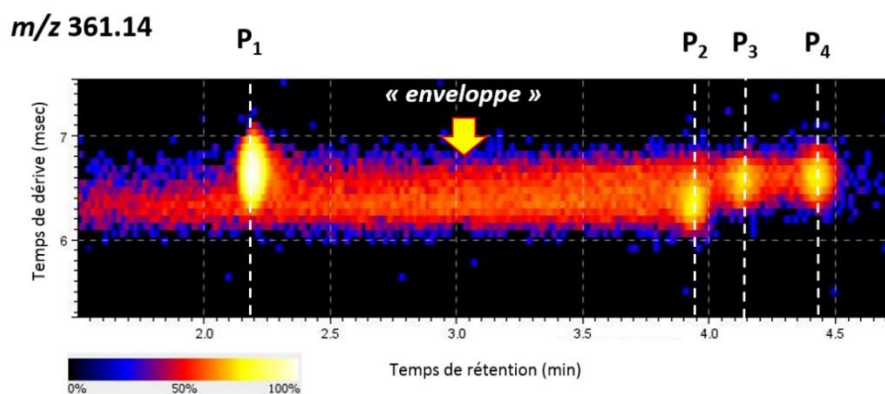


Figure 44: Représentation 2D du temps de dérive en fonction du temps de rétention (td/tr) des dimères de tyrosine ( $m/z$  361.14). Gradient chromatographique n°1 (Tableau 38).

Quatre pics 3D y sont visibles, ils correspondent aux quatre pics chromatographiques P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> de bi-tyrosine précédemment mis en évidence. Dans le cadre des dimères de tyrosine, les quatre espèces possèdent des temps de dérive compris entre 6 et 7 millisecondes (Tableau 5).

Espèce	Temps de dérive (msec)
P <sub>1</sub>	6.65
P <sub>2</sub>	6.35
P <sub>3</sub>	6.60
P <sub>4</sub>	6.60

Tableau 5: Valeurs des temps de dérive mesurés pour les dimères de tyrosine.

Le dimère *ortho-ortho* (P<sub>1</sub>), possède un temps de dérive quasi-identique à ceux des dimères P<sub>3</sub> (*ortho-iso*) et P<sub>4</sub> (dimère de la famille MAD). Seule l'espèce éluée sous le pic P<sub>2</sub> (autre dimère de la famille MAD) possède un temps de dérive significativement différent des trois autres : il est plus faible, témoignant d'une géométrie plus compacte. Les deux dimères de la famille MAD présentent des comportements différents en IMS, témoignant d'une compacité différente. En effet, suite aux additions de Michael, certains dimères multicycliques sont susceptibles de se retrouver contraints stériquement. Au-delà des quatre signaux observés sur la Figure 44, une contribution sur une large gamme de temps de rétention, de 1.5 à 4.5 minutes, est observée. Elle correspond à l'« enveloppe » préalablement évoquée sur les chromatogrammes ioniques extraits en Figure 40, proposée comme de potentiels diastéréoisomères de dimères de la famille MAD. Les temps de dérive mesurés pour cette enveloppe s'étalent effectivement de 6.35 à 6.60 millisecondes soit entre les valeurs observées pour les pics P<sub>2</sub> et P<sub>4</sub>. L'ajout d'une dimension supplémentaire dans la séparation des dimères formés appuie

l'existence de structures très diverses et très certainement de diastéréoisomères. A ce stade de l'étude de la formation de bi-tyrosine à l'échelle de l'acide aminé, une nouvelle famille de dimères issus de l'évolution du produit d'accrochage des radicaux *ortho* et *para* de la tyrosine a pu être mise en lumière. Les structures des produits résultant d'une double addition de Michael proposées sont au nombre de trois (bien que chacune d'entre elles soit composée de plusieurs diastéréoisomères) pour deux pics chromatographiques détectables.

#### IV.1.7. Discussion

Quatre isomères de bi-tyrosine ont été séparés et leurs structures investiguées. Deux des quatre isomères ont pu être identifiés comme l'*ortho-ortho* et l'*iso*, connus dans la littérature (*Yamamoto & Okuda, 1975; Karam et al., 1984*). Karam et al. avaient d'ailleurs séparé plusieurs pics (>2) qu'ils attribuent à « des dimères » de tyrosine. L'existence d'un nombre d'isomères supérieur à 2 avait donc été pressentie. De même, Mukherjee et al. ont séparé deux pics de dimères de l' $\alpha$ -synucléine dont l'un est très large et pourrait potentiellement contenir différents isomères de bi-tyrosine (*Mukherjee et al., 2017*). Les deux nouveaux isomères mis en évidence appartiennent à une nouvelle famille de dimères de tyrosine qui fait intervenir la position *para* du radical tyrosyle lors de la recombinaison radicalaire, position jusqu'alors négligée dans les mécanismes de dimérisation. Ainsi, les trois formes mésomères du radical tyrosyle sont impliquées dans la formation de dimères. Or, trois contributions spectrales (< 300 nm, 390 nm et 405 nm) ont été attribuées au radical phénol dans les études de radiolyse pulsée (*Land et al., 1961; Land & Ebert, 1967; Land & Prütz, 1979*). Il serait intéressant de savoir si chacune des contributions correspond à une délocalisation « figée » du radical ( $O^{\bullet}$ ,  $C_{para}^{\bullet}$ ,  $C_{ortho}^{\bullet}$ ) en comparant avec des études théoriques.

Les cyclohexadiénones formées suite à la dimérisation entre les positions *ortho* et *para* sont réactives et subissent des réactions de cycloaddition de Michael. La réactivité de la position *para* et la mise en évidence de réactions d'additions de Michael avaient déjà été montrées dans le cadre de la formation d'hydroperoxydes (*Möller et al., 2012*). Dans l'étude de dimérisation, ces additions de Michael font certainement intervenir i) l'atome d'oxygène de la fonction phénol du résidu tyrosine additionné en *ortho* et ii) les fonctions amine et/ou acide carboxylique de la chaîne latérale. Néanmoins, l'implication de ces fonctions reste à l'état d'hypothèse. Pour aller plus loin dans la détermination des structures exactes, l'idéal serait de pouvoir isoler les différents produits afin de réaliser des expériences de RMN et d'Infrarouge. En effet, dans l'hypothèse où des quantités suffisantes de chacun des isomères pourraient être obtenues, il serait intéressant d'identifier les dimères possédant une cyclohexanone suite aux cycloadditions ainsi que de discriminer la formation d'une lactone si le carboxylate s'additionne. Aussi, la signature spectrale des fonctions phénol doit certainement être différente dans le cadre de dimères impliquant une addition du phénol de l'un des

deux résidus sur l'autre. Il reste néanmoins la question de la séparation des isomères, qui a été rendue possible par UPLC mais qui semble illusoire à plus large échelle. Les quantités de dimères de tyrosine formées lors d'une irradiation à 40 Gy sont trop faibles (environ  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pour envisager de les séparer avec la résolution souhaitée en chromatographie préparative. En irradiant à une dose plus forte, des oligomères d'ordre supérieur seront formés et le risque est de ne pas récupérer plus de dimères mais de complexifier le milieu. Une proposition qu'il est intéressant de considérer est d'irradier la tyrosine à une concentration plus importante : cela a été effectué mais n'a pas permis un meilleur rendement en dimères. Une méthode pour discriminer quelles fonctions chimiques se sont additionnées lors de la dimérisation serait de dériver les produits post-irradiation avec des groupements choisis spécifiquement pour réagir sur l'amine ou l'acide carboxylique libres. Si le carboxylate s'additionne, une lactone est formée : des essais d'hydrolyse (acide et basique) ont été réalisés dans le but de voir si l'intensité de l'un des pics de dimères diminue au profit de la formation d'une nouvelle espèce à un rapport  $m/z +18$ . A ce jour, aucune conclusion claire n'a pas être tirée de ces expériences. Une autre alternative est de considérer des tyrosines dont les fonctions amine et/ou acide carboxylique sont protégées. En restreignant la disponibilité pour certaines fonctions de s'additionner, il devrait être possible de dénombrer le nombre de dimères formés. Il est primordial que les groupements protecteurs choisis ne soient pas susceptibles de réagir sur la cyclohexadiènone. Ces expériences de protection de la tyrosine feront l'objet du chapitre V. La potentielle existence d'un large nombre de diastéréoisomères issus d'additions de Michael a été mise en évidence notamment *via* les expériences d'IMS. A partir des temps de dérive obtenus dans le cadre de ses expériences, il serait intéressant de calculer les sections efficaces de collision (CCS) moyennant une calibration sur la gamme de temps de dérive considérée. La comparaison avec des valeurs calculées par Dynamique Moléculaire pour les structures proposées pourrait permettre de conforter ou non les propositions faites. Cette démarche a été initiée, une collaboration avec des chimistes théoriciens de l'Institut a été mise en place.

Au-delà de l'investigation des structures, à propos des intensités relatives des dimères, il semble que l'intensité ionique absolue de l'un d'entre eux, attribué à l'*iso*, n'augmente pas avec la dose et varie très peu en fonction du radical oxydant utilisé. Alors que les autres dimères sont plus intenses lors d'une oxydation en présence de  $\text{N}_3^*$ , ce qui s'explique par le fait que  $^*\text{OH}$  induise d'autres oxydations que la dimérisation (hydroxylation), l'*iso* se comporte différemment. Il est possible i) qu'il soit consommé pour former d'autres produits d'oxydation ; ii) que la détection en masse soit un biais. Pour rappel, il s'agit du seul dimère lié par l'oxygène, la liaison à l'origine de la dimérisation pourrait donc se fragmenter en source et ainsi biaiser sa détection au  $m/z$  du dimère. Pour autant, même si cette espèce se fragmente en source, une augmentation de son signal avec la dose d'irradiation devrait

pouvoir être décelée. Il sera intéressant de vérifier si cette observation reste valable à des échelles plus complexes comme celles de peptides et de protéines par exemple.

Pour une dose d'irradiation donnée, les intensités ioniques relatives observées ne sont pas pour autant le reflet des quantités absolues formées puisqu'en spectrométrie de masse, l'intensité ionique est fonction du rendement d'ionisation de l'espèce en phase gaz. Or, il n'existe pas de standards des isomères de bi-tyrosine proposés qui permettraient de déterminer les rendements d'ionisation respectifs. Une possibilité serait de faire synthétiser les différents isomères pour obtenir des standards mais la synthèse des produits de la famille MAD semble très complexe. Dans une moindre mesure, il pourrait être intéressant de connaître les rendements d'ionisation de molécules structurellement proches des différents types d'isomères, donc possédant deux cycles benzéniques (*ortho-ortho*, *iso*) ou des cyclohexanones di-substituées en *para* (MAD) pour estimer si les intensités relatives observées sont très éloignées ou non des rendements relatifs de formation des dimères.

La détection en fluorescence des quatre isomères a montré que seul le dimère *ortho-ortho* fluoresce vers 405 nm. Cette information est capitale puisque c'est cette propriété qui est très souvent utilisée pour rendre compte de la présence de bi-tyrosine dans les fluides biologiques. Bien que sur la base des intensités relatives observées en masse et en UV, l'*ortho-ortho* semble être le dimère majoritaire, rien ne prouve que dans certaines conditions ou à différentes échelles moléculaires, seuls les isomères non fluorescents soient formés. Ainsi, le risque d'utiliser la fluorescence est de négliger la formation de bi-tyrosine. Aussi, l'utilisation d'anticorps anti-bi-tyrosine pour la détection de ces pontages amène à se poser la question de leur capacité de détecter tous les isomères ou uniquement l'*ortho-ortho* ? Cela revient à s'interroger sur la production de ces anticorps : qu'ont reçu les hôtes utilisés pour leur production ?

#### IV.2. Pontages tyrosine-tryptophane

La formation de bi-tyrosine dans les protéines a été beaucoup plus étudiée que celle d'autres pontages impliquant aussi le tryptophane. Or, la plupart des protéines contiennent des tryptophanes, qui se trouvent être très réactifs aux radicaux oxydants. Dans le cas particulier du radical azote, le tryptophane réagit même plus rapidement que la tyrosine (*Land & Prütz, 1979*). Bien que dans certaines conditions, le tryptophane effectue un transfert d'électron vers la tyrosine, il est aussi oxydé et susceptible de former des pontages covalents de type tyrosine-tryptophane par exemple. La question de la multiplicité structurale se pose donc pour ce type de pontages. La position *para* de la tyrosine est-elle impliquée également dans la formation de dimères avec le tryptophane ? Et qu'en est-il des atomes impliqués dans la liaison covalente au niveau du résidu tryptophane ? En 2020, Figueroa et al. ont séparé trois isomères dans le cadre d'une oxydation par le radical  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  et proposé des structures impliquant l'oxygène et le carbone en *ortho* au niveau de la tyrosine et l'azote et un des carbones de l'indole au niveau du tryptophane (*Figueroa et al., 2020*).

Un mélange équimolaire de tyrosine et de tryptophane a été irradié à 0 et 40 Gy en présence de  $\text{N}_3^{\bullet}$ . Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $384.17 \pm 0.05$ , correspondant au  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de l'accrochage covalent (-2H) entre les résidus tyrosine et tryptophane sont présentés en Figure 45 (a). Jusqu'à dix pics chromatographiques sont détectés lorsque le mélange est irradié à 40 Gy et ne sont pas présents à 0 Gy, témoignant qu'il s'agit bien de produits d'oxydation. Ces pics, étiquetés avec des lettres de [a] à [i] possèdent des intensités ioniques relatives variables, l'un d'entre eux est particulièrement large ([c]) et est susceptible de contenir plusieurs espèces. Au-delà de leurs intensités relatives, ce sont les temps de rétention de certains pics qui sont inattendus. En effet, la tyrosine éluant vers 2 min et le tryptophane à 6.5 min, l'élution de leur association covalente était plutôt attendue pour des temps de rétention supérieurs à 6.5 min. Pour autant, plusieurs pics possèdent des temps de rétention extrêmement faibles, parfois inférieurs à celui de la tyrosine monomérique. Ceci semble appuyer l'hétérogénéité structurale des espèces formées. Le pic observé vers 6.5 min sur la Figure 45, également détecté à 0 Gy, est attribué au tryptophane monomérique sur la base de son temps de rétention et suite à l'extraction de son spectre de masse (non présentée ici).

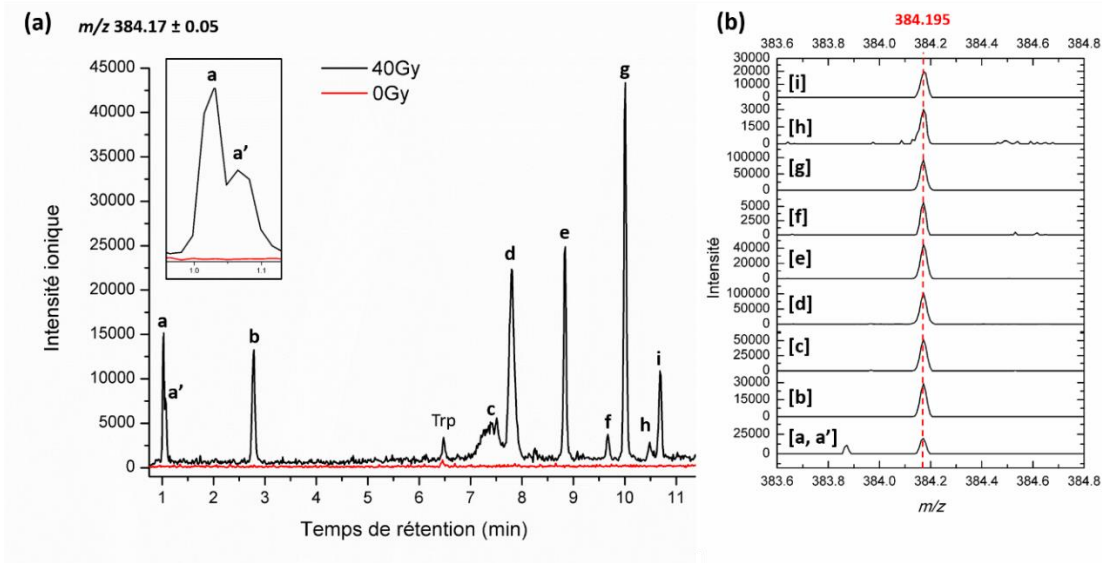


Figure 45: (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $384.17 \pm 0.05$  au sein du mélange Tyr/Trp irradié à 0 et 40 Gy en présence de  $N_3^*$ . Gradient chromatographique n°14 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics [a] à [i] centrés en  $m/z$  384.17.

Le pic [a] est dédoublé, comme cela est visible dans l'insert de la Figure 45 (a) : l'épaule est nommé [a']. Leur séparation n'a pas pu être améliorée davantage, le dédoublé du pic n'est même pas visible sur certains chromatogrammes étant donné la faible intensité ionique. Ainsi, pour la suite de l'étude, il n'a pas été possible de les dissocier l'un de l'autre. Les spectres de masse des pics [a] à [i] sont exposés en Figure 45 (b) et confirment que chacun possède une contribution au même  $m/z$ , à savoir 384.195 ( $m/z$  expérimental). Ainsi, dix isomères de l'hétérodimère Tyr-Trp sont ici mis en évidence, bien plus que ce qui a pu être rapporté jusqu'alors (Ghiladi et al., 2005; Paviani et al., 2020; Figueroa et al., 2020). La pluralité des structures est donc confirmée pour un pontage impliquant des acides aminés aromatiques de nature différente (tyrosine-tryptophane).

Dans l'objectif de comprendre comment autant d'isomères puissent être formés, similairement à ce qui a été réalisé lors de l'investigation structurale des bi-tyrosines, il convient de revenir sur la nature des espèces transitoires à l'origine de la formation des hétérodimères Tyr-Trp. C'est la recombinaison des radicaux tyrosyle et tryptophanyle qui mène à la génération de pontages Tyr-Trp. Le radical tyrosyle et l'existence de ses trois formes mésomères prédominantes ont déjà été évoquées plus tôt dans ce manuscrit. En ce qui concerne le radical tryptophanyle, ses densités de spin ont été mesurées ou calculées théoriquement: les valeurs mesurées par Lenzian et al. sont reportées en Figure 46 (Carroll et al., 2017; Jensen et al., 1996; Lenzian et al., 1996; Walden & Wheeler, 1996). Les atomes possédant les densités de spin les plus importantes sont l'azote  $N_1$ , le carbone  $C_3$  que l'on nommera carbone quaternaire  $C_Q$  pour la suite et les carbones  $C_4$  et  $C_6$  nommés  $C_{Ar}$ .



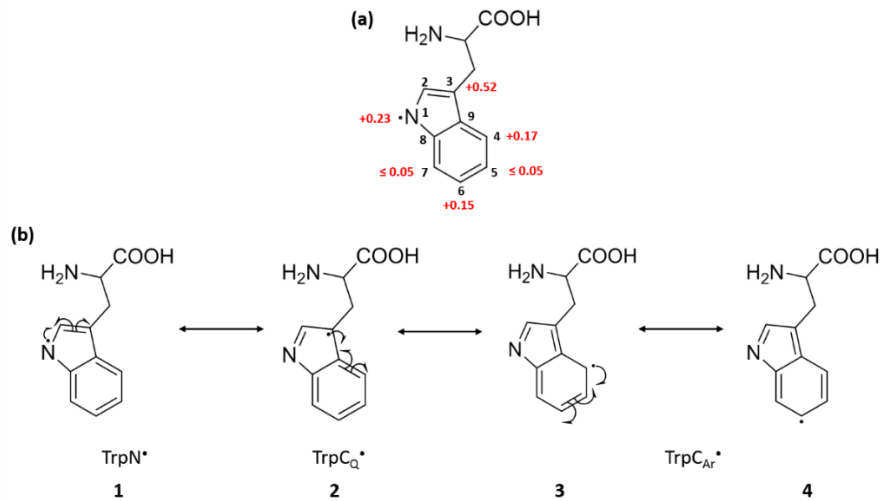


Figure 46: Densités de spin du radical tryptophanyle (a) et formes mésomères prédominantes (b).

Ainsi, trois radicaux tyrosyle et quatre radicaux tryptophanyle (1, 2, 3 et 4) sont susceptibles de se recombiner les uns avec les autres et de mener jusqu'à douze isomères Tyr-Trp, exposés en Figure 47. La dénomination de ces accrochages théoriques correspond à l'association d'une lettre (O, I ou P pour les positions *ortho*, *iso* et *para* du radical tyrosyle) et d'un chiffre (1, 2, 3 ou 4, pour les différentes formes mésomères du radical tryptophanyle).

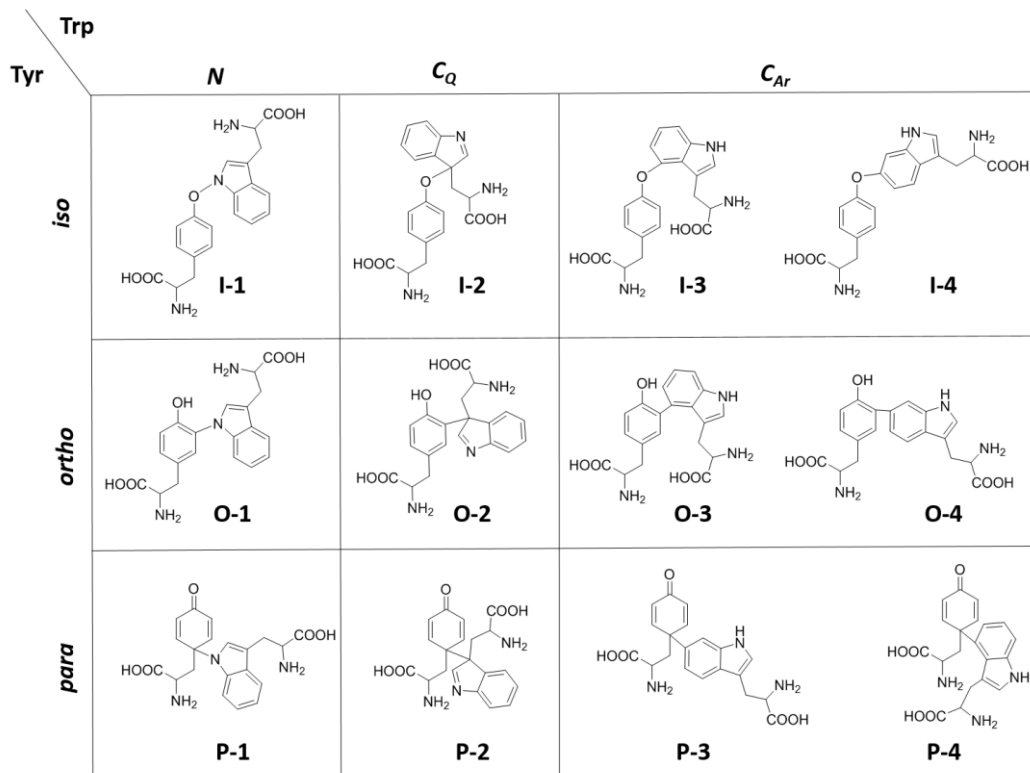


Figure 47: Structures des hétérodimères Tyr-Trp potentiellement formés par recombinaison des radicaux tyrosyle et tryptophanyle.

Parmi les douze structures théoriques Tyr-Trp, celles impliquant le radical TyrC<sub>para</sub>• (P-1 à P-4) peuvent évoluer à travers des réactions d'additions de Michael, similairement à ce qui a été mis en évidence lors de la formation de bi-tyrosine. D'autres évolutions structurales sont à envisager : (a) ouverture de l'imine formée dans les accrochages faisant intervenir le TrpC<sub>α</sub>• en aldéhyde et en amine primaire suite à une réaction d'hydrolyse, (b) addition de l'amine libre de la chaîne latérale du tryptophane sur l'imine. Ces potentielles évolutions sont présentées en Figure 48.

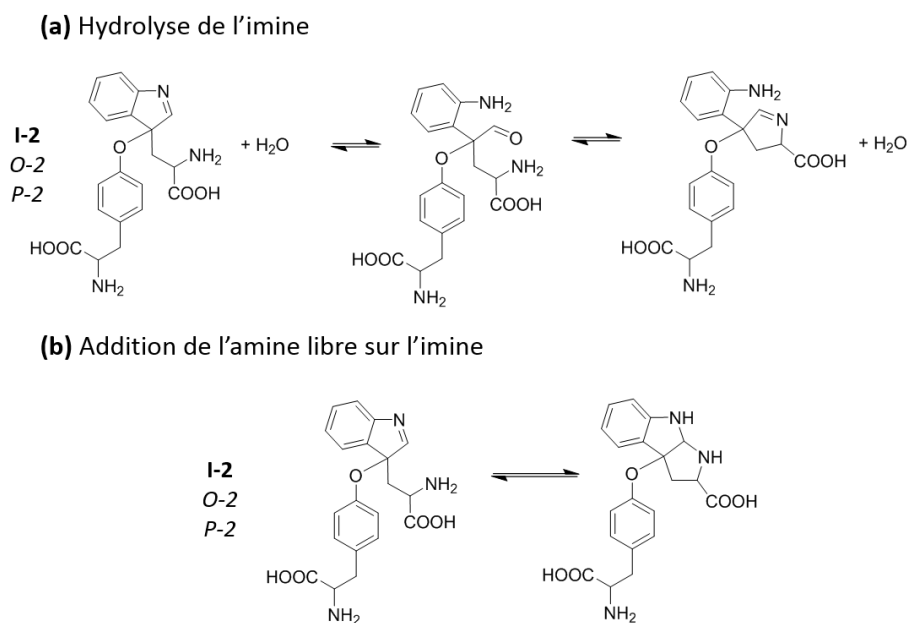


Figure 48: Evolutions possibles de l'imine formée dans les accrochages Tyr-Trp. Les évolutions sont présentées pour la structure I-2 mais sont aussi valables pour les structures O-2 et P-2.

A ce stade de la réflexion menée sur les structures théoriques, et pour faire un lien entre les douze types de liens proposés et les pics chromatographiques observés, une investigation structurale est nécessaire. L'objectif général de cette partie est d'investiguer quelles positions radicalaires de la tyrosine et du tryptophane sont impliquées dans la liaison covalente. Pour ce faire, des expériences d'échanges H/D avec le solvant, de deutération et de fragmentation MS/MS seront considérées.

#### IV.2.1. Expériences d'échanges H/D avec le solvant

Dans un premier temps, des expériences d'échanges H/D avec le solvant ont été effectuées. En effet, elles devraient permettre de distinguer les espèces pour lesquelles la position *para* de la tyrosine est engagée dans la liaison covalente. Si une addition de Michael a lieu sur l'une des doubles liaisons C=C et qu'elle prend place lorsque le solvant est l'eau deutériée, alors le gain de deux atomes de deutérium est attendu (Tableau 6). L'espèce résultante possèdera alors un *m/z* différent d'une structure impliquant une autre position radicalaire de la tyrosine.

P-1, P-2, P-3 et P-4	<i>m/z</i> théorique
Irradiation dans H <sub>2</sub> O	384.17
Irradiation dans D <sub>2</sub> O, 1 addition de Michael	386.19 (+2D)
Irradiation dans D <sub>2</sub> O, 2 additions de Michael	388.19 (+4D)

Tableau 6: Valeurs théorique de *m/z* attendues pour les structures P-1 à P-4 lors d'irradiation dans H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O.

Le mélange Tyr/Trp (1:1) a été irradié à 40 Gy dans D<sub>2</sub>O en présence de N<sub>3</sub><sup>•</sup> et analysé par UPLC-MS. Par analogie avec les expériences d'échange H/D effectuées dans le cadre de l'étude des bi-tyrosines, les échantillons ont été conservés à -20°C directement après irradiation (T0) ou laissés évoluer pendant 48 heures à 37°C (T48). Les échantillons à T48 ont montré une diminution globale de l'intensité du signal ionique, certaines espèces ne sont plus du tout détectées : il est possible que les échantillons aient précipité. Le raisonnement concernant les échanges H/D sera donc mené sur les échantillons à T0. La Figure 49 présente les chromatogrammes ioniques extraits à *m/z* 384.17 ± 0.05 ([M+H]<sup>+</sup> Tyr-Trp-2H) et *m/z* 386.19 ± 0.05 ([M+H]<sup>+</sup> Tyr-Trp-2H+2D). Les pics [a,a'], [b], [f] et [i] présentent de manière évidente une contribution à *m/z* 386.19 : un gain en masse, typique d'un échange H/D a eu lieu. La comparaison H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O est exposée Figure 50 et confirme l'évolution en masse : le signal à *m/z* 384.17 disparaît au profit de celui à *m/z* 386.19 lorsque l'irradiation a été réalisée dans D<sub>2</sub>O. Jusqu'à deux deutériums ont donc été acquis *via* un échange H/D avec le solvant, ce qui confirme que ces quatre pics chromatographiques correspondent à des structures qui évoluent à travers des additions de Michael. Aucun des pics ne possède de contribution à *m/z* 388.19 (+4D) : une seule addition de Michael a donc lieu, au contraire de ce qui a été observé pour les homodimères de tyrosine. Cette observation n'est pas très étonnante puisque l'un des groupements proposés comme effectuant une addition de Michael dans le cadre des bi-tyrosines est l'oxygène du phénol du résidu ponté *via* la position *ortho*, qui n'est pas disponible dans le cadre d'un pontage Tyr-Trp. Les autres pics chromatographiques ([c], [d], [e], [g] et [h]) répondent toujours à *m/z* 384.17, aucun échange H/D n'a eu lieu avec le solvant sur ces structures d'hétérodimères Tyr-Trp.

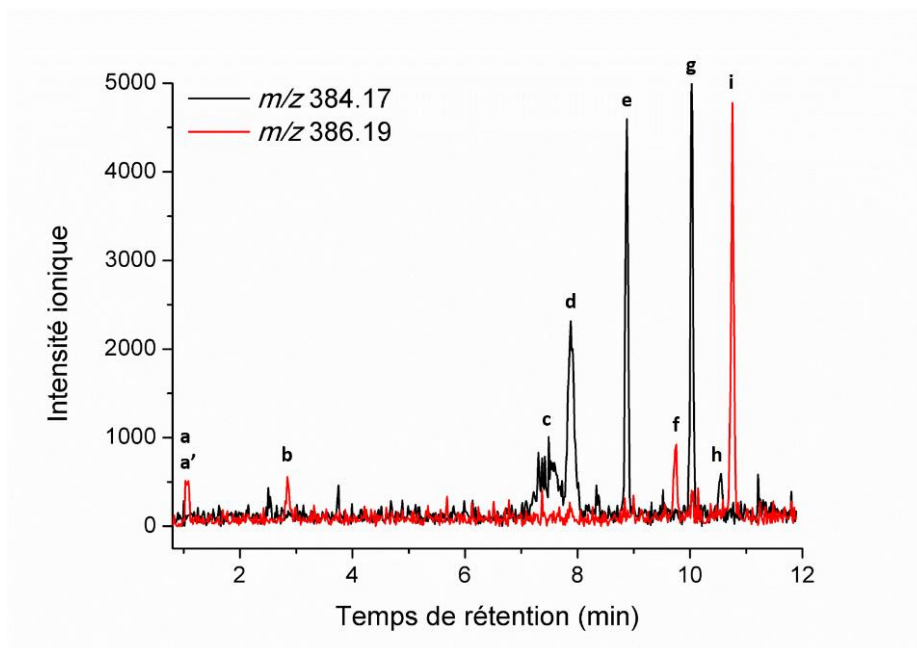


Figure 49: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  384.17  $\pm$  0.05 et  $m/z$  386.19  $\pm$  0.05 pour le mélange Tyr/Trp irradié à 40 Gy en présence de  $N_3^*$  dans  $D_2O$ . Gradient chromatographique n°11 (Tableau 38).

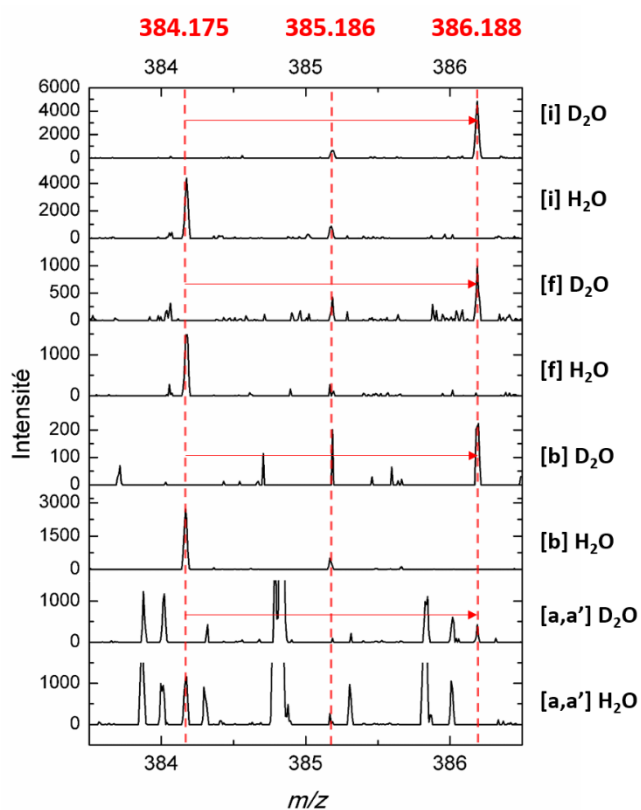


Figure 50: Spectres de masse centrés en  $m/z$  385 des pics [a,a'], [b], [f] et [i] lors d'une irradiation à 40 Gy en présence de  $N_3^*$  dans  $H_2O$  ou  $D_2O$ .

Ces expériences d'échange H/D avec le solvant ont permis de débiter l'investigation structurale des pontages covalents Tyr-Trp. Les pics [a,a'], [b], [f] et [i] font donc partie de ce qui a été appelé la famille MAD précédemment : en d'autres termes, ces accrochages proviennent de la position *para* du radical tyrosyle. Cette dernière, dont la réactivité a été mise en évidence dans la formation de bi-tyrosine, est donc également impliquée dans la formation d'hétérodimères tyrosine-tryptophane. Les pics [a,a'], [b], [f] et [i] peuvent donc être associés à la famille de structures constituée de P-1, P-2, P-3 et P-4.

#### IV.2.2. Expériences de deutération

Les espèces impliquant la position *para* de la tyrosine ont été identifiées. Pour tenter d'aller plus loin dans la classification des ponts Tyr-Trp mis en évidence, des résidus tyrosine et tryptophane deutériés (Tyr-D et Trp-D) ont été considérés (Figure 51). La tyrosine marquée est deutériée sur les deux positions *ortho* (C<sub>2</sub> et C<sub>6</sub>) et le tryptophane sur le cycle indole (C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> et C<sub>7</sub>).

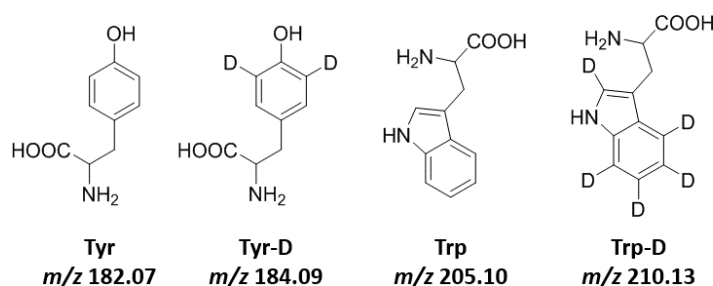
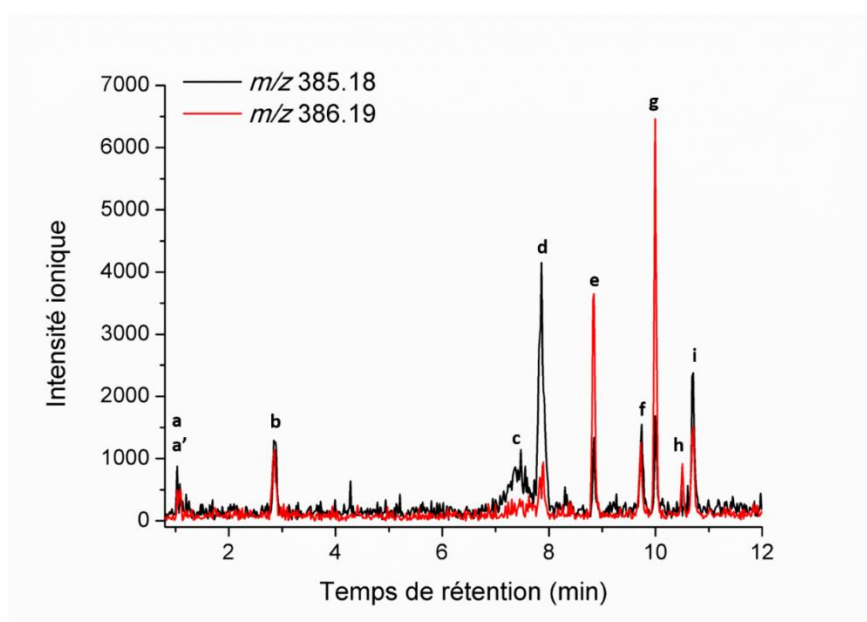


Figure 51: Structures et *m/z* associés de la tyrosine, du tryptophane, de leurs dérivés deutériés.

En considérant les couplages entre la tyrosine deutériée et le tryptophane non deutérié (Tyr-D/Trp-H), suivies de ceux de la tyrosine non deutériée avec le tryptophane deutérié (Tyr-H/Trp-D), des discriminations devraient être rendues possibles, sur la base de leurs différents *m/z*. Les expériences menées avec la tyrosine deutériée devraient permettre d'isoler les pontages faisant intervenir la position *ortho* de la tyrosine et celles avec le tryptophane deutérié les pontages impliquant un carbone aromatique du tryptophane. Le Tableau 7 expose les valeurs de *m/z* attendues pour les différentes combinaisons. Les valeurs de *m/z* attendues pour les structures P-1 à P-4 sont doubles car ces structures vont évoluer *via* des additions de Michael et dans ce cadre, perdre un atome de deutérium : leur profil isotopique devrait être constitué d'une contribution à *m/z* 386.17 mais à *m/z* 385.16 également. Les chromatogrammes ioniques extraits à *m/z* 385.16 ± 0.05 (perte d'un deutérium) et 386.17 ± 0.05 (pas de perte) sont visibles en Figure 52.

<i>m/z</i> attendu	Tyr-D-Trp-H	Tyr-H-Trp-D
I-1	386.17	389.19
I-2	386.17	389.19
I-3	386.17	388.18
I-4	386.17	388.18
O-1	385.16	389.19
O-2	385.16	389.19
O-3	385.16	388.18
O-4	385.16	388.18
P-1	385.16-386.17	389.19
P-2	385.16-386.17	389.19
P-3	385.16-386.17	388.18
P-4	385.16-386.17	388.18

Tableau 7: Valeurs attendues de *m/z* pour les différents pontages Tyr-Trp impliquant un résidu deutérié.Figure 52: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $385.18 \pm 0.05$  et  $386.19 \pm 0.05$  pour le mélange Tyr-D/Trp-H irradié à 40 Gy sous  $N_3^*$ . Gradient chromatographique n°11 (Tableau 38).

Comme attendu, les pics précédemment identifiés comme impliquant la position *para* de la tyrosine ([a,a'], [b], [f] et [i]) possèdent une intensité ionique quasi-identique à  $m/z$  385.16 et 386.17, expliquée par l'échange H/D ayant eu lieu entre un deutérium de l'une des positions *ortho* et un hydrogène du solvant, l'eau. Parmi les pics restants, les pics [c] et [d] présentent une intensité ionique à  $m/z$  385.16 bien plus importante qu'à  $m/z$  386.17 : ils proviennent probablement d'un couplage *via* la position *ortho* de la tyrosine. Au contraire, les pics [e], [g] et [h] présentent une intensité ionique plus importante à  $m/z$  386.17 : ils ne proviennent ni du radical tyrosyle localisé en *ortho* ni en *para*.

L'hypothèse qu'ils proviennent du radical centré sur l'oxygène (*iso*) est faite. La Figure 53 expose les spectres de masse centrés en  $m/z$  386 des pics [d], [g] et [i] qui illustrent les trois cas de figure évoqués. Le spectre de masse du pic [d] rend compte d'un pic monoisotopique à  $m/z$  385.177, en accord avec la perte d'un deutérium due à l'implication de la position *ortho* dans la liaison Tyr-Trp. Le spectre de masse du pic [g] est l'exemple contraire, aucun deutérium n'a été perdu, le pic monoisotopique se trouve à  $m/z$  386.180 et la contribution à  $m/z$  385.177 est négligeable. Enfin, le spectre de masse du pic [i] rend compte de l'échange H/D ayant lieu entre la tyrosine-D et le solvant, ici l'eau suite à l'addition de Michael : les contributions à  $m/z$  385.177 et  $m/z$  386.180 sont quasi de même intensité.

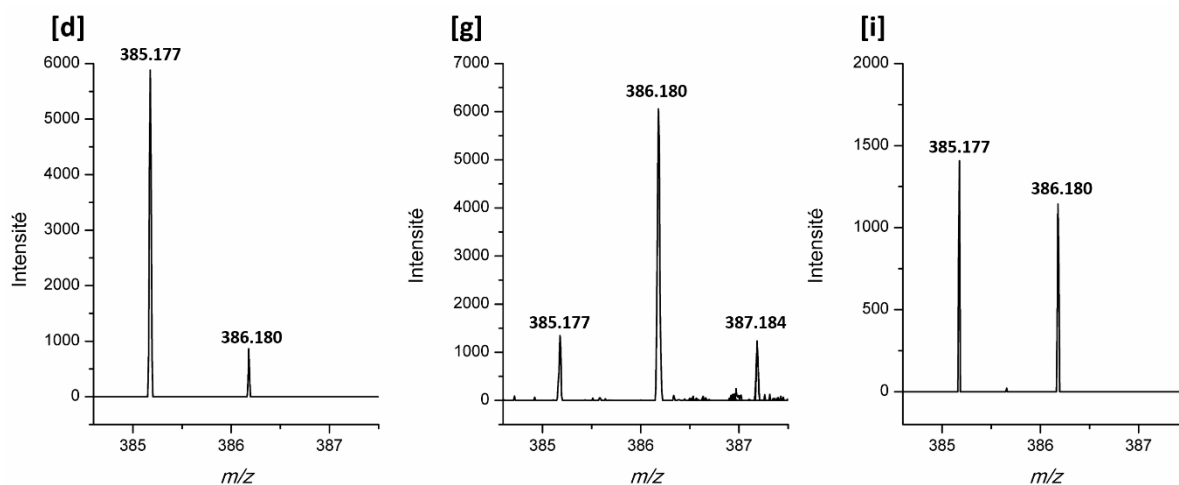


Figure 53: Spectres de masse centrés en  $m/z$  386 des pics [d], [g] et [i] de la Figure 52.

Ainsi, grâce aux échanges H/D et la considération de la tyrosine deutériée en *ortho*, les contributions des trois formes mésomères du radical tyrosyle dans les couplages Tyr-Trp ont pu être identifiées. Les espèces qui éluent sous les pics [c] et [d] proviennent du radical positionné en *ortho*, celles éluant sous les pics [e], [g] et [h] de celui centré sur l'oxygène (*iso*) et les enfin les espèces qui éluent sous les pics [a,a'], [b], [f] et [i] du radical *para*.

A ce stade, l'objectif est d'identifier les positions radicalaires du tryptophane impliquées dans les isomères de Tyr-Trp formés. La Figure 54 met en avant les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $388.18 \pm 0.05$  (perte d'un D) et  $389.19 \pm 0.05$  (pas de perte) dans le cadre de l'irradiation du mélange Tyr-H/Trp-D.

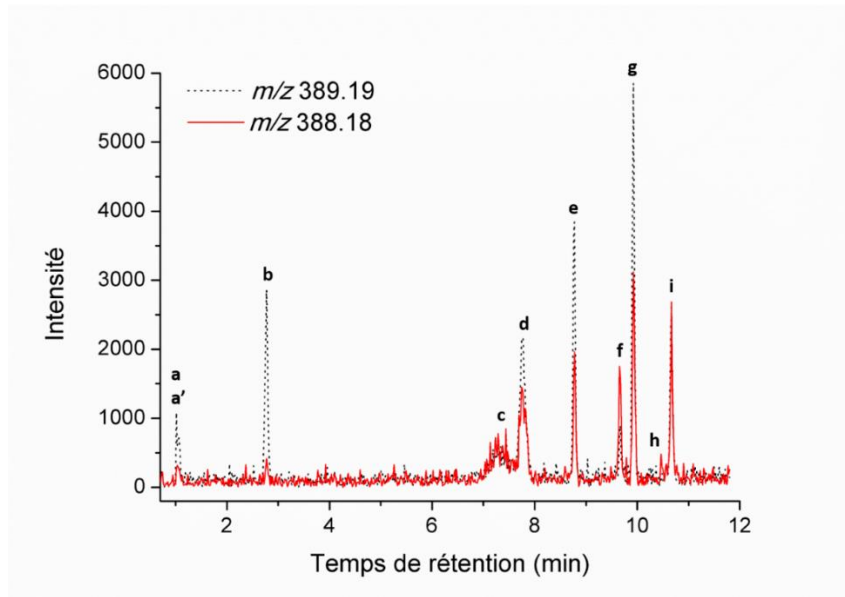


Figure 54: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  388.18  $\pm$  0.05 et 389.19  $\pm$  0.05 pour le mélange Tyr-H/Trp-D irradié à 40 Gy sous  $N_3^*$ . Gradient chromatographique n°11 (Tableau 38).

En contraste avec ce qui a été observé pour le mélange Tyr-D/Trp-H, ici les conclusions sont moins évidentes. La plupart des pics détiennent des contributions à  $m/z$  388.18 et 389.19 avec des intensités similaires. Ceci peut être expliqué par le comportement du monomère de tryptophane deutérié. Son spectre de masse est présenté en Figure 55 : le  $m/z$  attendu à 210.13 est pollué par une contribution non négligeable ( $\approx$  50%) à  $m/z$  209.12 typique de la perte d'un atome de deutérium.

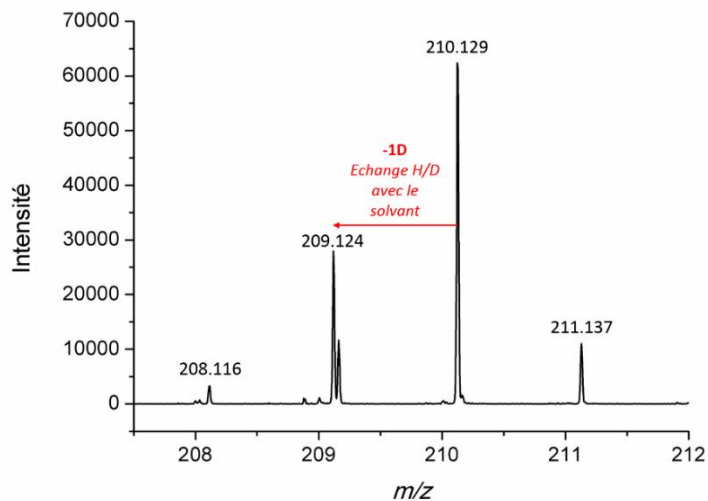


Figure 55: Spectre de masse du tryptophane deutérié: un échange H/D avec le solvant se produit pour donner un signal non négligeable à  $m/z$  209.12.



Un phénomène d'échange H/D semble donc avoir lieu lors de l'ionisation en source : des spectres ont été enregistrés avec différentes tensions de capillaire (données non présentées) et montrent une perte « progressive » des deutériums. Cet échange en source vient perturber l'attribution des pontages Tyr-Trp puisque la perte d'un atome de deutérium peut alors provenir de cet échange avec le solvant ou de la formation du lien covalent entre les deux acides aminés. D'après la structure du tryptophane deutérié, le deutérium le plus labile est celui porté par le carbone C<sub>2</sub> de l'indole. En supposant que ce deutérium soit celui subissant l'échange H/D, alors toutes les structures Tyr-Trp dont l'indole n'est pas modifié (I-1, I-3, I-4, O-1, O-3, O-4, P-1, P-3 et P-4) devraient être à même d'échanger un deutérium de la même manière que le tryptophane monomérique. *A contrario*, au sein des structures I-2, O-2 et P-2, l'indole est modifié, le pKa du deutérium en C<sub>2</sub> et la faisabilité de l'échange H/D sont susceptibles de l'être également. Sur la Figure 54, le pic [f] est le seul pic qui possède une plus grande contribution à  $m/z$  388.18 qu'à  $m/z$  389.19 ce qui concorde avec la perte d'un deutérium dû au pontage Tyr-Trp. Le pic [f] peut provenir d'un radical tryptophanyle localisé sur un carbone aromatique TrpC<sub>Ar</sub><sup>\*</sup>, radical dont la contribution dans la formation d'hétérodimères Tyr-Trp a été évoquée par Ghiladi et al. (Ghiladi et al., 2005). Les pics [a,a'] et [b] présentent une contribution à  $m/z$  389.19 nettement plus importante qu'à  $m/z$  388.18, ne laissant que peu de doute sur le fait qu'aucun deutérium n'ait été échangé, même au niveau du carbone C<sub>2</sub>. Les radicaux TrpN<sup>\*</sup> ou TrpC<sub>Q</sub><sup>\*</sup> pourraient donc être impliqués dans la formation des espèces éluant sous les pics [a,a'] et [b]. L'absence totale d'échange H/D permet de proposer que l'aromaticité de l'indole ait été perdue et donc que les pics [a,a'] et [b] proviennent du radical TrpC<sub>Q</sub><sup>\*</sup>. L'intensité des signaux à  $m/z$  388.18 des pics [d], [e] et [g] représentent environ 50% de celle observée à  $m/z$  389.19, comme c'est le cas pour le tryptophane deutérié monomérique (le pic à  $m/z$  209.12 représente environ 50% de celui à  $m/z$  210.13). Ainsi, ces pics n'ont pas perdu de deutérium lors de la dimérisation Tyr-Trp et correspondent certainement à des pontages dont l'indole n'est pas modifié : le radical TrpN<sup>\*</sup> est probablement à l'origine de la formation de la liaison. Enfin, pour les pics [c], [h] et [i], les contributions relatives à  $m/z$  389.19 et 388.18 sont d'intensité quasi similaire ce qui restreint la possibilité d'aller plus loin dans l'investigation des structures de dimères Tyr-Trp. La Figure 56 expose les spectres de masse des pics [b], [f], [g] et [i] illustrant les quatre cas de figures évoqués. Le spectre de masse du pic [b] présente un pic monoisotopique à  $m/z$  389.188 et aucune contribution à  $m/z$  388.181. Aucun échange H/D n'a donc lieu. Les espèces possédant un tel spectre de masse ont été proposées comme des pontages Tyr-Trp pour lesquels l'indole a été modifié (impliquant le TrpC<sub>Q</sub><sup>\*</sup>). Le spectre de masse du pic [f] possède quant à lui un pic monoisotopique à  $m/z$  388.181 et la contribution observée à  $m/z$  389.188 provient de son massif isotopique : il s'agit d'une espèce pour laquelle un deutérium semble avoir été perdu suite à la formation d'une liaison avec la tyrosine. Ainsi, le TrpC<sub>Ar</sub><sup>\*</sup> est probablement à l'origine de liaison covalente avec le résidu tyrosine. Le spectre de masse du pic [g] présente une contribution majoritaire à  $m/z$  389.188 ainsi qu'une

contribution à  $m/z$  388.181 représentant environ 50% de l'intensité de celle à  $m/z$  389.188. Cette situation est similaire à celle observée en Figure 55 pour le tryptophane monomérique. Les espèces présentant ce type de distribution en masse sont donc attribuées à des structures dont l'indole n'est pas modifié et dont les carbones aromatiques ne semblent pas impliqués dans la liaison covalente : c'est donc le TrpN\* qui semble à l'origine du lien avec la tyrosine. Enfin, le spectre de masse du pic [i] est assez proche de celui du pic [g] mais l'intensité relative à  $m/z$  388.181 est beaucoup plus importante vis-à-vis de celle à  $m/z$  389.188. La contribution à  $m/z$  388.181 n'est donc pas uniquement due à un échange H/D du deutérium du carbone C<sub>2</sub>. Pour les espèces présentant un tel profil en masse, aucune proposition concernant le radical tryptophanyle impliqué n'a pu être faite.

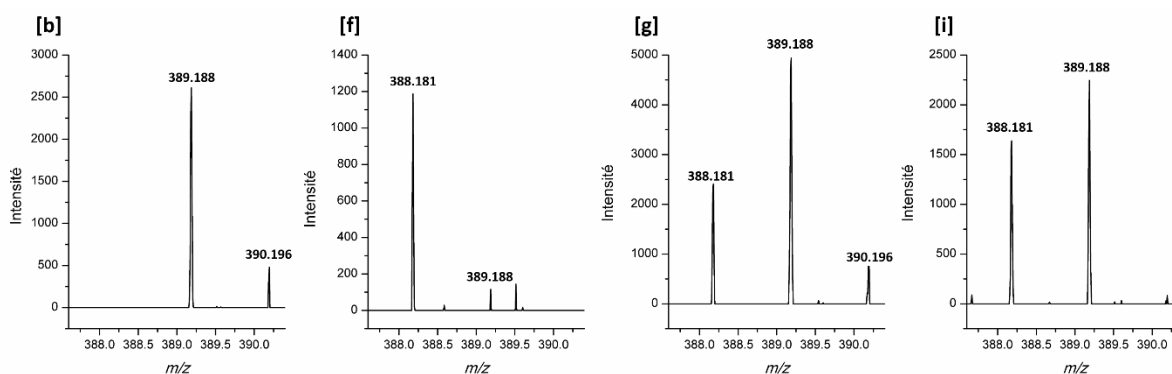


Figure 56: Spectres de masse des pics [b], [f], [g] et [i] de la Figure 54.

Ainsi, bien que ces propositions nécessitent d'être confirmées, les espèces qui élurent sous les pics [a,a'] et [b] pourraient provenir du radical TrpC<sub>Q</sub>\*, celle sous le pic [f] du radical TrpC<sub>Ar</sub>\* et les pics [d], [e] et [g] du radical TrpN\*.

#### IV.2.3. Expériences de fragmentation (MS/MS)

Enfin, des expériences de MS/MS ont été réalisées. Figueroa et al. (Figueroa et al., 2020) ont postulé que la fragmentation de certains accrochages Tyr-Trp induit la formation d'un fragment à  $m/z$  203. Ce fragment correspondant au relargage du [tryptophane -2H]. Il a été proposé qu'il provienne de composés dont la liaison covalente formée entre le tryptophane et la tyrosine soit assez labile pour être fragmentée. Ces auteurs ont ainsi postulé que les accrochages tyr-trp impliquant des liaisons C-N et C-O soient assez labiles et qu'ils soient plus à même de présenter un fragment à  $m/z$  203 devant ceux liés par un pontage C-C, dont le fragment majoritaire serait celui à  $m/z$  367, caractéristique d'une désamination de l'une des chaînes latérales. Trois pics chromatographiques ont été séparés par cette équipe et quatre structures théoriques proposées (équivalentes à I-1, I-2, O-1 et O-2). Deux de leurs isomères présentent un fragment à  $m/z$  203. Ils ont alors fait l'hypothèse que I-2 et O-1, qui impliquent un hétéroatome, soient à l'origine de ces pics ; que O-2, qui implique une liaison C-C, ne le forme pas

et que l'isomère I-1 ne soit pas détecté dans les conditions de masse utilisées car la liaison N-O est trop instable.

Sur la base des douze structures théoriques proposées dans le cadre de cette étude, celles pour lesquelles il est proposé que le fragment  $m/z$  203 ne se forme pas sont les suivantes : O-1, O-2, O-3 et O-4. En effet, ces pontages semblent relativement stables : ils impliquent tous le carbone *ortho* de la tyrosine et l'aromaticité de cette dernière y est conservée. Aucun atome à proximité du lien covalent ne semble susceptible de se protoner pour « stimuler » la fragmentation. A l'inverse, pour les structures I-1, I-2, I-3 et I-4 (Figure 57), la formation du fragment à  $m/z$  203 peut être attendue. En effet, comme l'atome d'oxygène de la tyrosine (ex-phénol) est impliqué dans la liaison covalente, il pourrait se protoner et activer la fragmentation. En fonction de l'atome du tryptophane impliqué dans la liaison, le carbocation à  $m/z$  203 résultant peut être de différentes natures. Pour I-1 et I-2, c'est un carbocation tertiaire en C<sub>3</sub> qui est formé, il semble assez stable. Pour I-3 et I-4, les carbocations résultants semblent moins favorables (en C<sub>4</sub>/C<sub>6</sub>) puisqu'ils sont secondaires. Concernant les quatre structures restantes, P-1, P-2, P-3 et P-4 (Figure 58), sur la base de ce qui vient d'être proposé, le fragment  $m/z$  203 devrait pouvoir se former également. En effet, en se basant sur les structures « ouvertes » (pas de cycloaddition de Michael), l'atome d'oxygène de la cyclohexadiénone peut se protoner et déclencher la fragmentation. La fragmentation mènerait alors aux mêmes carbocations ( $m/z$  203) que précédemment proposés (tertiaire en C<sub>3</sub> ou secondaire en C<sub>4</sub>/C<sub>6</sub>). Ces hypothèses étant faites, parmi les carbocations à  $m/z$  203 susceptibles de se former, celui en C<sub>3</sub> est probablement formé plus favorablement que ceux en C<sub>4</sub> et C<sub>6</sub>. Les hypothèses faites par Figueroa et al. ne correspondent pas en tout point à celles faites au sein de cette étude, qui restent à l'état de proposition (Figueroa et al., 2020).

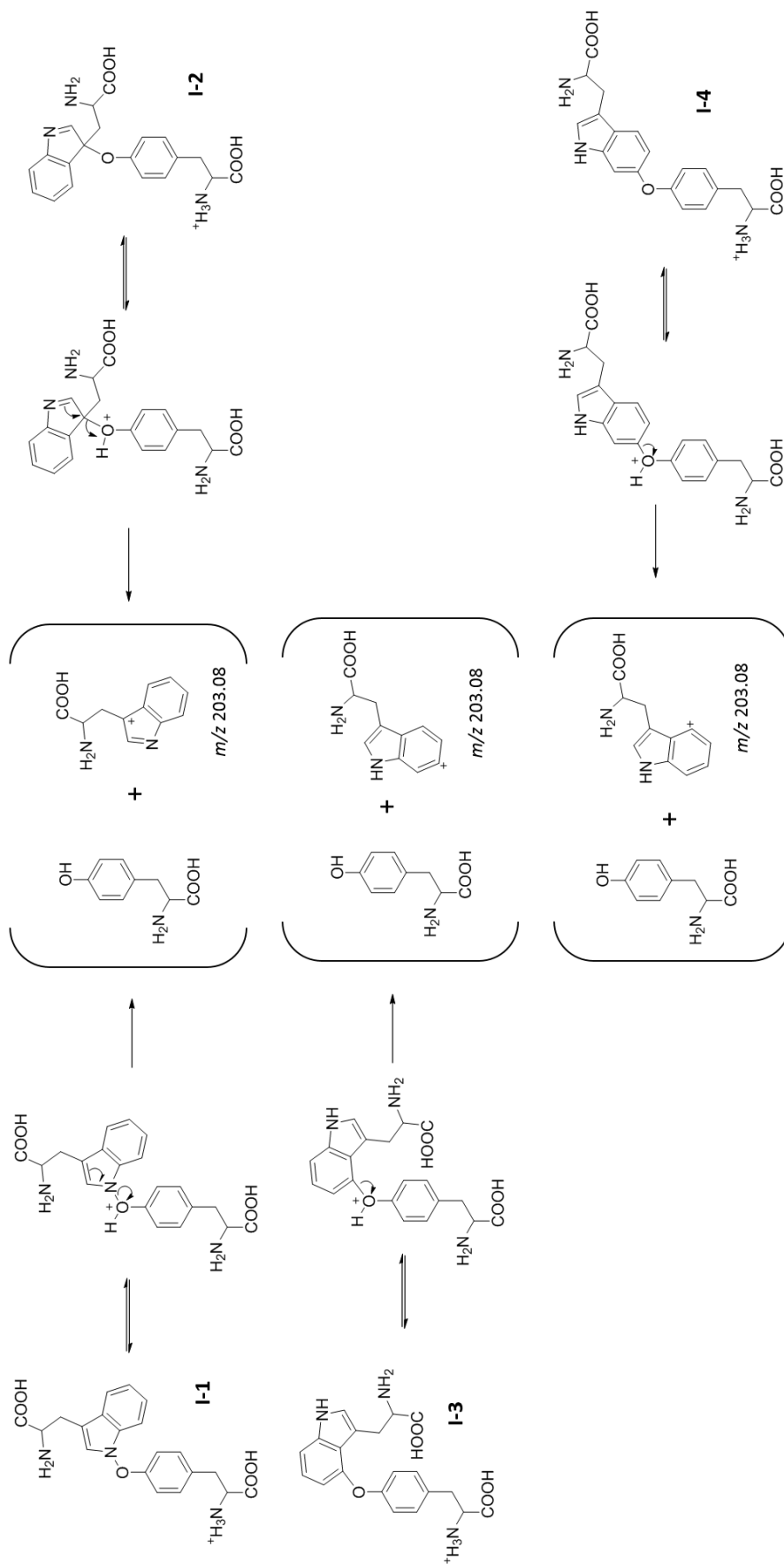


Figure 57: Proposition de formation du fragment  $m/z$  203 pour les pontages Tyr-Trp théoriques I-1, I-2, I-3 et I-4.

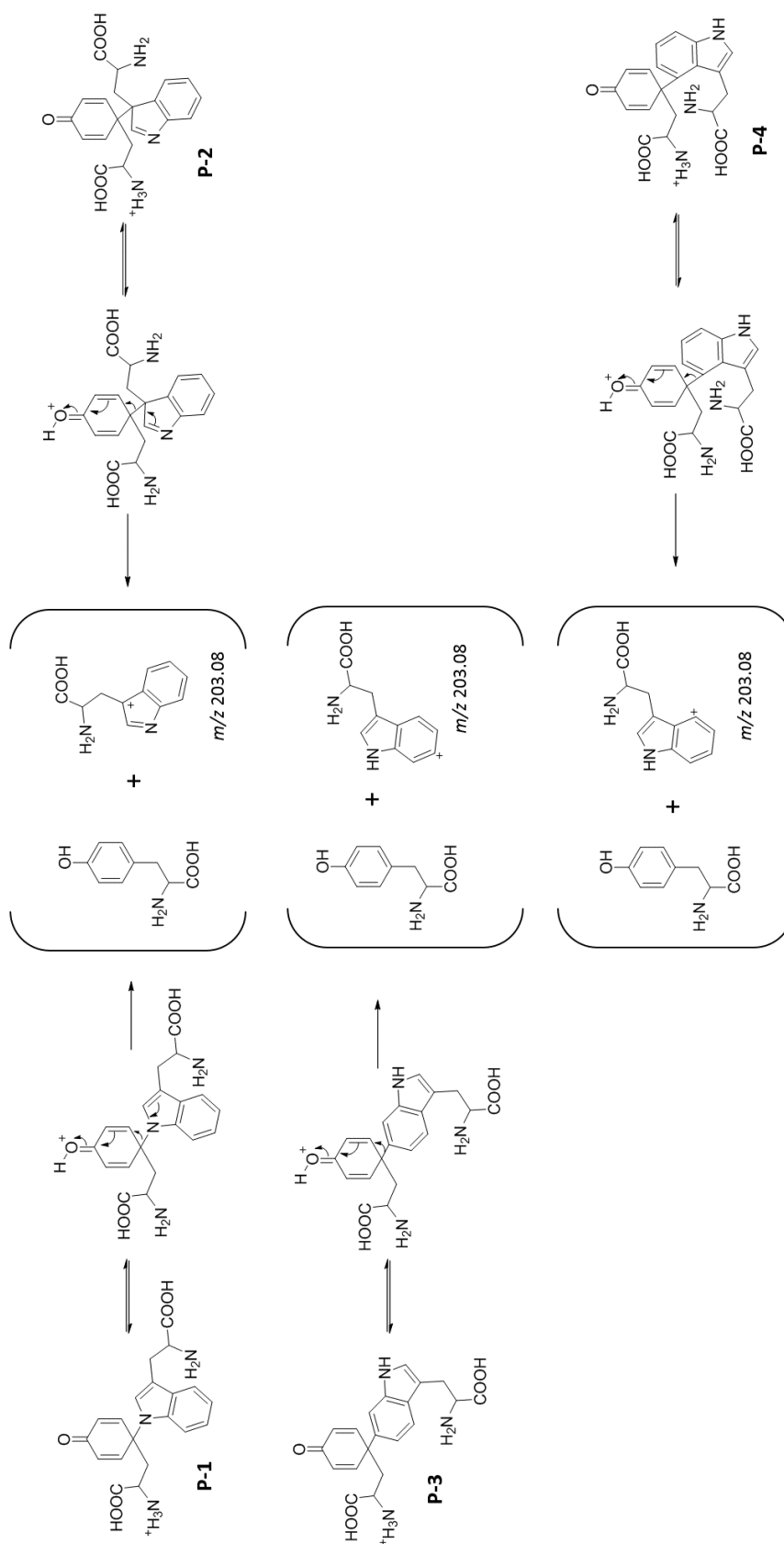


Figure 58: Proposition de formation du fragment  $m/z$  203 pour les pontages Tyr-Trp théoriques P-1, P-2, P-3 et P-4.

Les spectres MS/MS obtenus lors d'une fragmentation à  $m/z$   $384 \pm 1$  sont présentés en Figure 59. Ils sont centrés en  $m/z$  203. Tous les pics (excepté le pic [h] qui est trop peu intense) possèdent une contribution à  $m/z$  367.14 (non présentée ici) qui correspond à la désamination de l'une des chaînes latérales du tryptophane ou de la tyrosine. Deux pics présentent clairement un signal à  $m/z$  203.088 : il s'agit des pics [e] et [g]. Il se trouve que ces deux pics présentent également cette contribution à  $m/z$  203.090 dans leurs spectres de masse classiques, non issus de la fragmentation, ce qui confirme l'aisance de ces pontages Tyr-Trp à se fragmenter. Ainsi, il peut être proposé que les pics [e] et [g] correspondent à des structures pour lesquelles la fragmentation du lien covalent est favorable. Ces derniers ont été proposés en amont comme issus de la recombinaison entre les radicaux TyrO<sup>\*</sup> et TrpN<sup>\*</sup> soient correspondants à la structure I-1, pour laquelle, d'après la Figure 57, le fragment à  $m/z$  203 est attendu et favorisé par la formation d'un carbocation tertiaire. De plus, cette fragmentation est en accord avec la nature de la liaison impliquant deux hétéroatomes, qui avait été considérée tellement labile par Figueroa et al. qu'ils ont proposé de ne pas l'avoir détectée du tout. Les pics [a,a'] et [b] possèdent aussi une faible contribution à  $m/z$  203.088, dont l'intensité est très proche de celle du bruit. Néanmoins, ces pics ont précédemment été proposés comme correspondant à la structure P-2. Sur la base de la Figure 58, il est possible d'expliquer la formation de ce fragment à partir de P-2, ce qui appuie la proposition d'attribution faite. D'autre part, à travers les expériences réalisées avec le tryptophane deutérié, les spectres de fragmentation réalisés dans ce cadre ont montré que les pics [aa'], [b], [e] et [g] possèdent un fragment à  $m/z$  208 (données non présentées). Autrement dit, ce fragment n'a perdu aucun deutérium et les pics [aa'], [b], [e] et [g] correspondent donc à des accrochages impliquant l'azote ou le carbone C<sub>α</sub> du tryptophane ce qui est en accord avec les structures proposées (I-1, P-2).

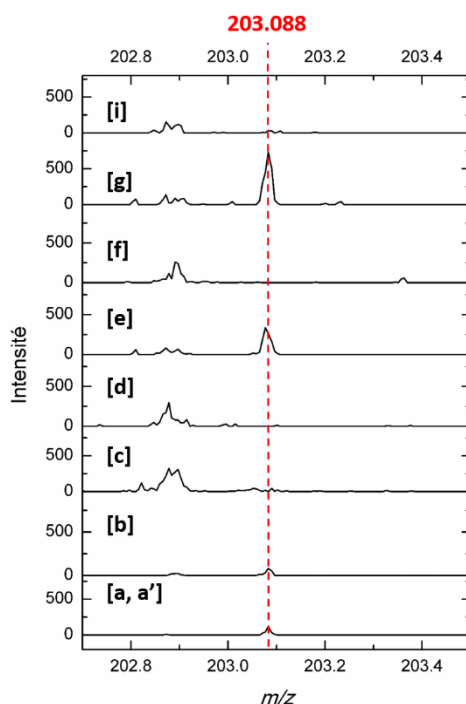


Figure 59: Spectres de fragmentation MS/MS des pontages Tyr-Trp pour  $m/z$  384  $\pm$  1, centré en  $m/z$  203 (Energie de collision : 30 eV).

#### IV.2.4. Bilan d'investigation structurale des dimères tyrosine-tryptophane

En effectuant un bilan de toutes les informations obtenues par pic chromatographique par pic chromatographique, sans aucune prétention d'assigner précisément les pontages, une classification a pu être réalisée. Le Tableau 8 recense les résultats obtenus pour chacun des pics chromatographiques (nature du radical des deux acides aminés impliqué dans la liaison et présence du fragment  $m/z$  203) et les structures correspondantes ainsi proposées.

	Radical Tyr	Radical Trp	$m/z$ 203	Structures proposées
<b>aa'</b>	<i>Para</i>	C <sub>Q</sub>	OUI	P-2
<b>b</b>	<i>Para</i>	C <sub>Q</sub>	OUI	P-2
<b>c</b>	<i>Ortho</i>	NA	NON	O-1, O-2, O-3, O-4
<b>d</b>	<i>Ortho</i>	NA	NON	O-1
<b>e</b>	<i>Iso</i>	N	OUI	I-1, I-2
<b>f</b>	<i>Para</i>	C <sub>Ar</sub>	NON	P-3, P-4
<b>g</b>	<i>Iso</i>	N	OUI	I-1, I-2
<b>h</b>	<i>Iso</i>	NA	NA	I-1, I-2, I-3, I-4
<b>i</b>	<i>Para</i>	NA	NON	P-3, P-4

Tableau 8: Résumé des correspondances proposées entre les pics chromatographiques et les structures présumées d'hétérodimères Tyr-Trp. NA : non attribué.

Le pic [a,a'] certainement composé de deux espèces se comportant de manière très similaire, a été identifié comme appartenant à la famille MAD, la position *para* de la tyrosine est impliquée. Il est proposé que le tryptophane ait réagi *via* TrpC<sub>Q</sub><sup>\*</sup> puisqu'aucun deutérium n'a été perdu lorsque le tryptophane deutérié a été utilisé. Cela amène donc à proposer la structure P-2 comme correspondante au pic [a,a']. Les expériences de fragmentation ont permis d'appuyer cette proposition sur la base des hypothèses faites à ce propos. Le pic [b] possède exactement le même comportement que le pic [a,a'], la structure P-2 lui a donc également assignée. Il n'est pas surprenant d'attribuer plusieurs pics chromatographiques à cet hétérodimère potentiel. Cette structure est susceptible d'évoluer au niveau du résidu tyrosine à travers des réactions d'additions de Michael de différentes natures mais aussi au niveau du tryptophane au sein duquel l'amine de la chaîne latérale pourrait s'ajouter sur l'imine : ces évolutions mèneraient alors à la formation de diverses structures polycycliques. Au-delà des différentes additions possibles, des diastéréoisomères peuvent aussi être formés. Les structures finales ainsi formées sont probablement compactes, ce qui pourrait expliquer leurs faibles temps de rétention. La contribution de la position *ortho* de la tyrosine a été mise en évidence pour le pic [c], bien que ce pic soit très large et que plusieurs espèces éluent potentiellement à son temps de rétention. Il n'a pas été possible de statuer quant à la perte d'un deutérium au niveau du tryptophane deutérié lors de la formation de la liaison covalente mais l'absence du fragment à  $m/z$  203 permet d'appuyer qu'il s'agit d'une liaison impliquant la position *ortho* de la tyrosine: le pic [c] peut correspondre aux structures O-1, O-2, O-3 ou O-4. Le comportement du pic [d] est très similaire à celui du pic [c] : la position *ortho* de la tyrosine est impliquée mais aucune perte de deutérium sur le tryptophane n'est à noter et l'indole n'est pas modifié. Ainsi, pour le pic [d], les structures O-2, O-3 et O-4 sont évincées ce qui restreint l'association du pic [d] à la structure O-1. Pour le pic [e], qui se comporte comme le pic [g], c'est le radical centré sur l'oxygène de la tyrosine qui a été proposé comme prenant part à la formation du lien covalent Tyr-Trp. Une perte de deutérium attribuée à l'échange H/D précédemment évoqué a été mise en évidence, c'est à la structure théorique I-1 que les pics [e] et [g] sont attribués puisque l'indole n'y est pas modifié et la présence du fragment à  $m/z$  203 permet d'appuyer cette proposition. Néanmoins, pour la structure I-1, aucun diastéréoisomère n'est attendu et l'attribution de deux pics pour cette même structure théorique semble impossible. Il est probable qu'un autre atome que l'azote soit impliqué au niveau du tryptophane étant donné les difficultés survenues lors de l'interprétation des expériences de deutération de ce résidu. La structure I-2 pourrait aussi être proposée pour les pics [e] et [g]. Le pic [f] appartient à la famille MAD du côté du résidu tyrosine, donc la position *para* est à l'origine du lien covalent. La perte d'un deutérium due à la formation du pontage Tyr-Trp lorsque le tryptophane deutérié est considéré a été proposée : TrpC<sub>Ar</sub><sup>\*</sup> semble impliqué. Théoriquement, le pic [f] peut donc correspondre aux structures P-3 et P-4. L'absence de fragment à  $m/z$  203 peut s'expliquer par le fait que le carbocation formé est peu stabilisé car



secondaire (Figure 58). Le pic [h] présente une très faible intensité : la seule information concernant cette espèce est qu'elle provient du radical TyrO<sup>\*</sup> en ce qui concerne la tyrosine. Le pic [h] peut alors correspondre à I-1, I-2, I-3 ou I-4. Finalement, à propos du pic [i], il correspond à une espèce qui implique la position *para* de la tyrosine mais pour laquelle aucune discrimination concernant la position du tryptophane n'a été possible. Cependant, l'absence de fragment à *m/z* 203 lors des expériences de MS/MS indique qu'il s'agit d'un pontage covalent qui ne se fragmente pas aisément: les structures pouvant lui correspondre sont donc P-3 ou P-4.

#### IV.2.5. Discussion

Alors que Figueroa et al. avaient montré la formation de trois isomères tyrosine-tryptophane, jusqu'à dix pics ont été identifiés comme tels suite à une oxydation en présence de N<sub>3</sub><sup>\*</sup> (Figueroa et al., 2020). Bien que l'identification exhaustive des dix structures d'hétérodimères Tyr-Trp mis en évidence à l'échelle des acides aminés ne soit pas complète, il a été possible de faire des hypothèses sur leurs potentielles attributions structurales et notamment sur la nature des atomes à l'origine de la dimérisation. Il a été mis en évidence que la formation d'hétérodimères Tyr-Trp impliquant des additions de Michael a lieu, comme lors de la formation de bi-tyrosines. Cela appuie d'autant plus la réactivité de la position *para* de la tyrosine et son implication certaine dans les processus de dimérisation.

Pour aller plus loin dans l'élucidation de ces structures, tout comme pour le cas des bi-tyrosines, il serait idéal de pouvoir former ces espèces en plus grande quantité et de pouvoir les isoler pour les caractériser par RMN par exemple. Hormis les faibles quantités, la contrainte supplémentaire dans ce cas est qu'il existe une compétition avec la formation de bi-tyrosines notamment, et très certainement de bi-tryptophanes. Il faudrait pouvoir inhiber la formation des bi-tyrosines pour isoler l'hétérodimérisation. En considérant différents ratios [tyrosine]:[tryptophane], un optimum pourrait être déterminé pour favoriser la formation des liens tyrosine-tryptophane devant celle des bi-tyrosines. La diversité des structures mise en évidence est d'autant plus importante que deux résidus différents se lient à travers au moins trois types d'atomes chacun. La démarche initiée à l'échelle des bi-tyrosines concernant la comparaison des données obtenues grâce à l'IMS avec des données calculées semble d'autant plus complexe. Des expériences d'IMS, non présentées dans ce travail, ont d'ailleurs été réalisées sur les pontages tyrosine-tryptophane mais les différences de temps de dérive observées sont trop faibles pour espérer discriminer certains isomères. Parmi les structures proposées, certaines devraient fluorescer, à commencer par celles pour lesquelles les sous-structures de la tyrosine et du tryptophane, qui fluorescent respectivement à 305 et 330 nm environ, ne sont pas modifiées. Toutefois, le faible rendement de formation de ces espèces n'a pas permis de déterminer leur potentielle longueur d'onde d'excitation et donc s'ils fluorescent. Concernant les produits issus de

la position *para* de la tyrosine, ils risquent de présenter des signatures différentes. Sur les isomères identifiés comme résultant d'une liaison sur la position *para*, une unique cycloaddition de Michael a d'ailleurs été mise en évidence. Cette observation vient appuyer l'hypothèse selon laquelle, dans le cas des bi-tyrosines, la fonction phénol est impliquée dans une des deux additions de Michael. Ici, aucune fonction phénol n'est disponible pour s'ajouter. Par analogie avec les réactions « secondaires » d'additions de Michael sur la tyrosine, en existe-t-il au niveau du tryptophane ? La réactivité de l'imine a notamment été évoquée. Ghiladi et al. avaient proposé l'implication du carbone aromatique du tryptophane dans la formation de liaisons covalentes avec la tyrosine (Ghiladi et al., 2005). Pour conforter l'hypothèse selon laquelle les carbones aromatiques du tryptophane ( $C_{Ar}$ ) puissent être impliqués dans les pontages, il serait intéressant de protéger ces positions et de dénombrer les isomères formés dans ce cas. Bien qu'une élucidation exhaustive des isomères tyrosine-tryptophane semble à ce jour un défi analytique entier, cette étude peut être considérée comme une mise en garde sur la diversité des produits attendus et sur la réactivité de certains atomes ou certaines fonctions chimiques qui n'avaient pas été envisagées auparavant. La pluralité des pontages tyrosine-tryptophane mise en lumière à l'échelle des acides aminés amène à s'interroger sur la présence de ces divers isomères à d'autres échelles comme celles des protéines. Des réponses y seront apportées dans le chapitre VI.



## V. DIMERISATION OXYDATIVE AU SEIN DE TYROSINES PROTEGEES ET DE PEPTIDES

Pour faire suite à la mise en évidence de divers isomères de pontages impliquant des acides aminés aromatiques, ce chapitre s'intéresse plus en détails aux dimères de tyrosine impliquant des additions de Michael. Pour rappel, deux pics chromatographiques ont été attribués à ces dimères MAD et trois structures proposées qui impliquent des additions de fonctions chimiques différentes.

### V.1. Dimérisation de tyrosines protégées

Les fonctions amine et acide carboxylique de la chaîne latérale de la tyrosine ont été proposées comme impliquées dans les additions de Michael mises en évidence lors de la dimérisation de la tyrosine. Afin de se pencher sur leur implication dans ce processus, une tyrosine dont la fonction amine est acétylée a été considérée (structure en Figure 60 (a)). Cette acétylation permet de bloquer l'amine libre *via* une fonction amide ce qui mime également la fonction peptidique d'une chaîne protéique. Une autre tyrosine protégée à la fois sur les fonctions amine et acide carboxylique a aussi été étudiée : l'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine (structure présentée en Figure 60 (b)). En théorie, si ces deux fonctions sont bloquées, seule la fonction phénol devrait être susceptible de s'additionner et seul un intermédiaire de la famille MAD devrait être détecté.

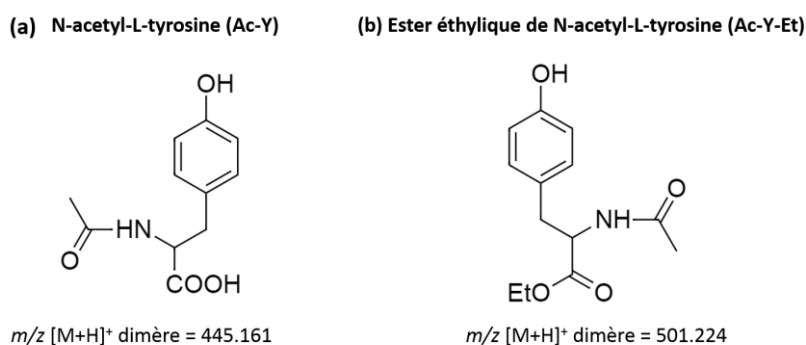


Figure 60: Structures des tyrosines protégées considérées et  $m/z$  de leurs dimères respectifs.

La tyrosine N-acétylée (Ac-Y) a été irradiée à 40 Gy et analysée par UPLC-MS selon la même stratégie que pour la tyrosine libre. Les échantillons ont été analysés à T0 (congélation immédiate à -20°C après irradiation) ainsi qu'à T48 (évolution à 37°C pendant 48 heures suivie d'une congélation à -20°C). Dans un premier temps, la tyrosine N-acétylée a été irradiée dans H<sub>2</sub>O et les chromatogrammes ioniques

extraits à  $m/z$  445.16 ( $[M+H]^+$  du dimère) sont présentés en Figure 61 (a) à T0 et T48. A T0, quatre pics chromatographiques ( $P_1$  à  $P_4$ ) sont détectés entre 4.5 et 6 min.

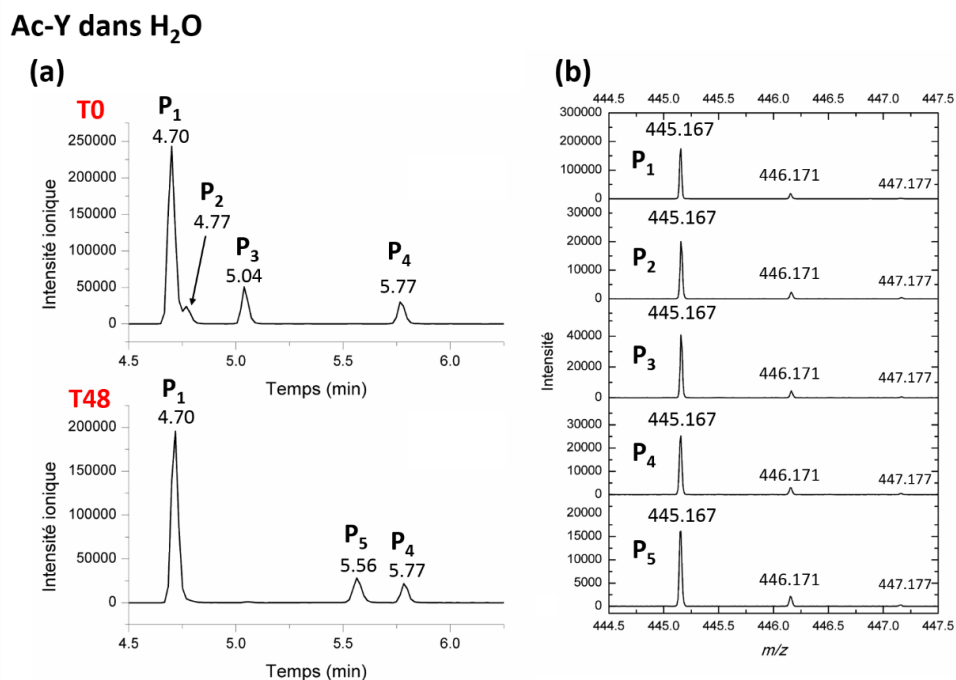


Figure 61: (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  445.16  $\pm$  0.05 à T0 et T48 pour la tyrosine N-acétylée irradiée à 40 Gy dans H<sub>2</sub>O (N<sub>3</sub>\*). Gradient chromatographique n°3 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Comme pour la tyrosine libre, un des pics est plus intense et c'est celui qui possède le temps de rétention le plus faible. Après incubation à 37°C, à T48, les pics P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> ne sont plus détectés sur le chromatogramme et un nouveau pic, P<sub>5</sub>, est maintenant localisé à 5.56 min. Les spectres de masse des cinq pics (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>) sont présentés en Figure 61 (b) et confirment leur correspondance à des dimères covalents. Des intermédiaires de dimérisation semblent donc être détectés à T0 (P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>). En considérant cette tyrosine modifiée, les cinétiques de dimérisation apparaissent différentes de celle de la tyrosine libre, pour laquelle tous les dimères sont formés dès T0. Des expériences ont été réalisées dans D<sub>2</sub>O dans le but de mettre en avant les potentiels échanges H/D caractéristiques de la famille MAD. La Figure 62 expose les spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> à T0 et T48 lors d'une irradiation dans D<sub>2</sub>O.

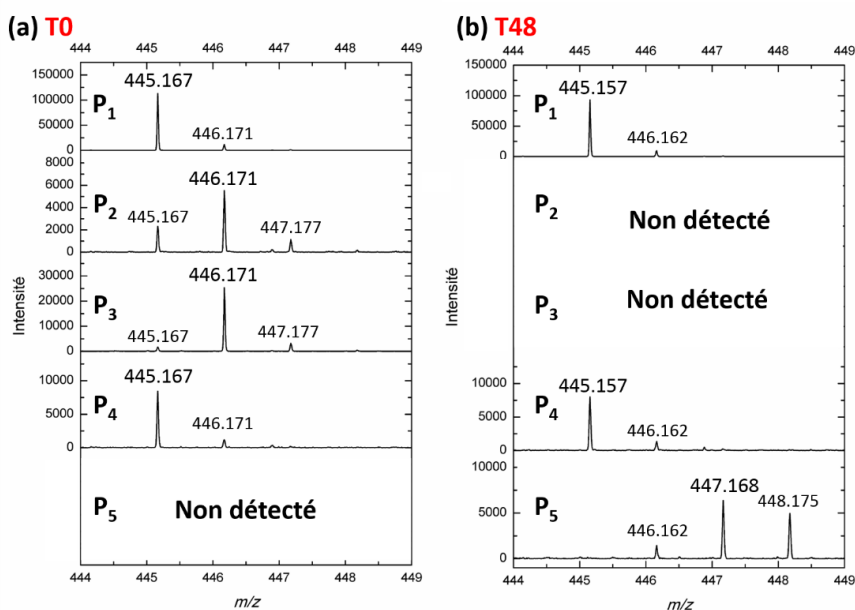
Ac-Y dans D<sub>2</sub>O


Figure 62: Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> à T0 (a) et T48 (b) pour la tyrosine N-acétylée irradiée à 40 Gy dans D<sub>2</sub>O (N<sub>3</sub>\*). Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Premièrement, les spectres des pics P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub> sont identiques à ceux dans H<sub>2</sub>O et ne présentent aucune modification de masse. Ainsi, leur attribution aux dimères *ortho-ortho* et *ortho-iso* peut être faite. Comme déjà évoqué, sur la base de leurs temps de rétention, P<sub>1</sub> est assigné au dimère *ortho-ortho* et P<sub>4</sub> à l'*iso*. Comme précisé dans le cas de la tyrosine, bien qu'irradiée dans D<sub>2</sub>O, les conditions d'analyse en UPLC impliquant une séparation chromatographique dans H<sub>2</sub>O, tous les hydrogènes labiles incluant ceux des fonctions amides sont rééchangés.

		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
Ac-Y	T0	0.03	0.70	0.94	-0.01	ND
	T48	-0.01	ND	ND	-0.02	<b>2.24</b>
Ac-Y-Et	T0	0.86	0.39	1.56	-0.04	0.01
	T48	ND	-0.03	<b>2.70</b>	<b>2.66</b>	0.01

Tableau 9 : Valeurs moyennes du nombre de deutériums incorporés pour Ac-Y et Ac-Y-Et lors des échanges H/D dans D<sub>2</sub>O. ND : non détecté. Les valeurs supérieures à 2 sont indiquées en rouge.

Dans D<sub>2</sub>O, les spectres de masse de P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> indiquent un m/z à 446.17, soit une augmentation moyenne en masse d'environ 1 unité (+0.70 D et +0.94 D respectivement, Tableau 9), concordant avec le gain d'un atome de deutérium. De plus, pour le pic P<sub>5</sub>, un gain de plus de deux deutériums (+2.24 D, Tableau 9) est observé, ce qui indique qu'il s'agit d'un dimère final issu de la double cycloaddition et que P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> soient des produits de simple cycloaddition. Ceci corrobore le fait qu'après formation de la liaison

*ortho-para*, les dimères évoluent jusqu'à une double cycloaddition de Michael, l'une avec la fonction phénol et une seconde plus probablement avec la fonction acide carboxylique puisque la fonction amine n'est plus libre. Contrairement au cas de la tyrosine libre, ici, les cinétiques de cyclisation *via* les additions de Michael peuvent être différenciées des cinétiques d'échange H/D par équilibre céto-énolique. En effet, la formation de produits doublement cycloadditionnés est plus lente que dans le cas de la tyrosine puisque des intermédiaires sont détectés. Les pics P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>5</sub> ainsi attribués, leur ordre de rétention concorde avec les fonctions proposées comme à même de s'ajouter. Comme il s'agit de fonctions polaires (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH), si elles ne sont plus libres mais impliquées dans une liaison, plus le nombre d'additions de Michael est important, moindre devrait être la polarité du dimère. La tyrosine N-acétylée ne possédant plus de fonction amine libre, il semble donc que les dimères MAD observés impliquent des oxa-additions de Michael *via* l'oxygène du phénol et celui de l'acide carboxylique de la chaîne latérale, qui lui n'est pas protégé.

L'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine a été irradié à 40 Gy dans H<sub>2</sub>O puis D<sub>2</sub>O et analysé en UPLC-MS. Comme visible en Figure 63 (a) sur les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  501.22 ± 0.05 ([M+H]<sup>+</sup> du dimère covalent), à T0, jusqu'à cinq pics chromatographiques sont détectés (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>) dont deux présentant une intensité très faible (P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub>) devant celle des trois autres. Les spectres de masse respectifs des pics P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> sont présentés en Figure 63 (b) et confirment leur attribution à des dimères covalentement liés.

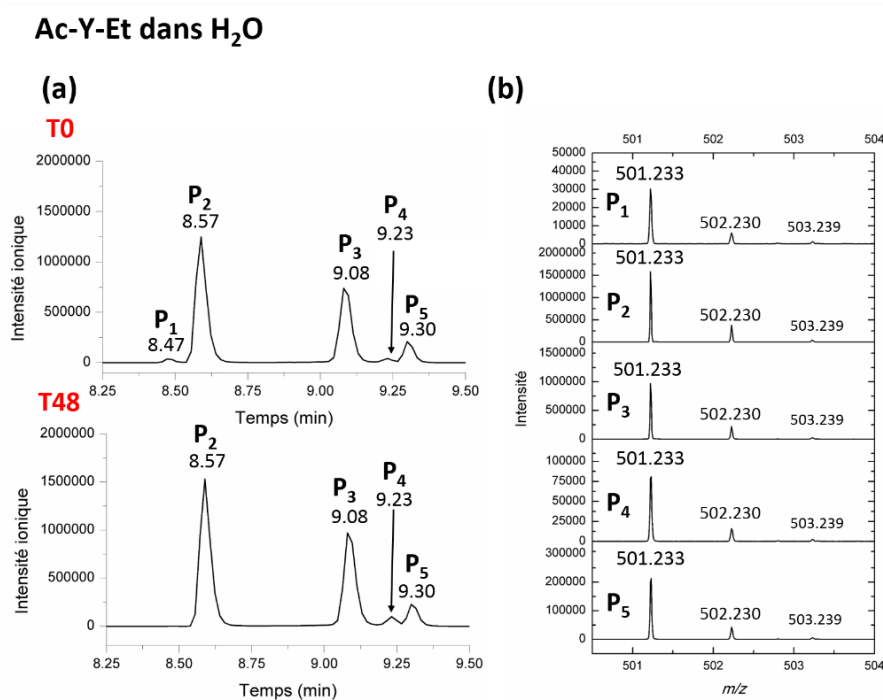


Figure 63: (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  501.22 ± 0.05 à T0 et T48 pour l'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine (Ac-Y-Et) irradié à 40 Gy dans H<sub>2</sub>O (N<sub>3</sub><sup>\*</sup>). Gradient chromatographique n°4 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Lorsque les irradiations sont effectuées dans D<sub>2</sub>O (Figure 64), le profil isotopique de P<sub>5</sub> n'est pas affecté par la modification de solvant. Pour P<sub>2</sub>, la situation est similaire mais légèrement plus complexe : à T<sub>0</sub>, *m/z* 501.22 est le pic le plus intense mais son profil isotopique n'est pas en accord avec celui d'une espèce pure, la contribution du [M+H+1]<sup>+</sup> (*m/z* 502.23) est trop importante pour un dimère n'ayant pas subi d'incorporation de deutérium. A T<sub>48</sub>, le profil de P<sub>2</sub> a changé et correspond désormais à celui d'un dimère pur sans gain de deutérium, comme c'est aussi le cas pour P<sub>5</sub>. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au temps de rétention du pic P<sub>2</sub>, les contributions de deux espèces se superposent et que l'une d'entre elles évolue dans le temps pour disparaître à T<sub>48</sub>. Ainsi, il est proposé qu'au temps de rétention de P<sub>2</sub> co-éluent un dimère insensible aux échanges H/D et un intermédiaire sensible aux échanges dans D<sub>2</sub>O. P<sub>5</sub> n'effectue aucun échange avec D<sub>2</sub>O et est élué à un temps de rétention supérieur à P<sub>2</sub>. Sur la base des temps de rétention, P<sub>2</sub> est attribué à l'*ortho-ortho* et P<sub>5</sub> à forme *iso*.

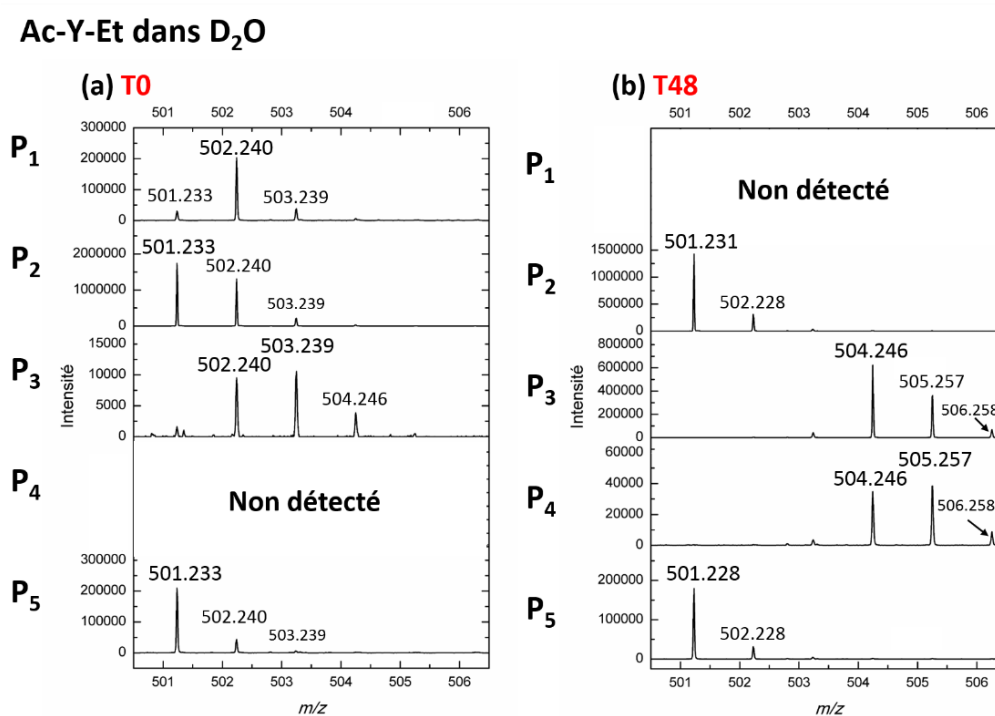


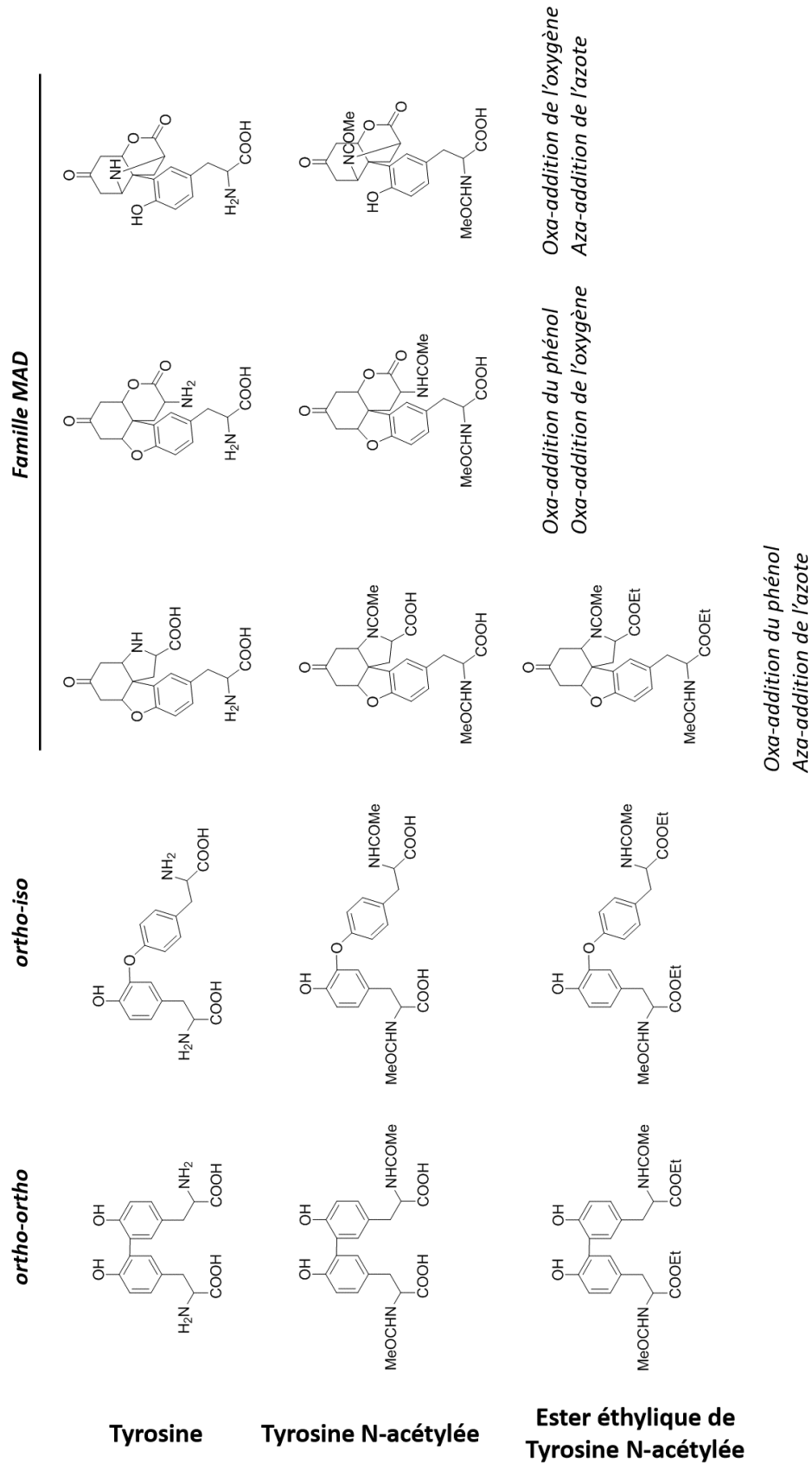
Figure 64: Spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> à T<sub>0</sub> (a) et T<sub>48</sub> (b) pour l'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine (Ac-Y-Et) irradié à 40 Gy dans D<sub>2</sub>O (N<sub>3</sub><sup>\*</sup>). Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Pour le pic P<sub>3</sub>, les échanges H/D illustrent parfaitement l'incorporation lente de deutériums avec une valeur moyenne d'incorporation de +2.7D à T<sub>48</sub>. Ainsi, P<sub>3</sub> résulte d'une double cycloaddition mais est formé rapidement puisque détecté dès T<sub>0</sub> mais les échanges H/D avec D<sub>2</sub>O sont lents. Sur la base des profils de masse, P<sub>1</sub> est attribué à une espèce intermédiaire (+0.86 D) de la famille MAD, uniquement détecté à T<sub>0</sub>. Dans le cadre de l'irradiation dans D<sub>2</sub>O, P<sub>4</sub> n'est pas détecté à T<sub>0</sub> contrairement au cas de l'irradiation dans l'eau. En revanche, il est bien détecté à T<sub>48</sub> : il est proposé comme un dimère MAD résultant d'une double cycloaddition (+2.66 D à T<sub>48</sub>) avec un profil isotopique proche de celui de P<sub>3</sub>.



Une hypothèse est que les irradiations dans H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O aient été réalisées des jours différents et que les conditions «T0 » ne soient pas strictement équivalentes. Ces résultats sont en désaccord avec les hypothèses proposées: en protégeant les fonctions amine et acide carboxylique de la tyrosine, certaines cyclisations avaient été envisagées comme non réalisables et un nombre limité de dimères était attendu. Cependant, deux composés de la famille MAD impliquant un nombre de deutériums introduits supérieur à 2 sont observés. Bien que l'ex-amine soit protégée, il reste un atome d'hydrogène lié à l'azote, susceptible d'être hydrolysé si l'azote s'additionne sur la cyclohexadiénone. *A contrario*, sur l'ex-acide carboxylique, l'oxygène n'est plus lié à aucun atome d'hydrogène. Il semble donc plus compliqué d'envisager cet oxygène comme à même de s'additionner. La fonction amide formée lors de la protection des tyrosines semble donc à même d'être engagée dans une cycloaddition de Michael *via* son atome d'azote. L'observation de deux dimères de la famille MAD à T48 s'expliquerait alors par la présence de diastéréoisomères.

La Figure 65 est un résumé des structures finales proposées de dimères de tyrosine, tyrosine N-acétylée et de l'ester éthylique de tyrosine N-acétylée. La pluralité des structures de bi-tyrosine ayant été mise en évidence aussi bien à l'échelle de la tyrosine libre que de tyrosines protégées avec des fonctions amides ou carbamates, l'échelle suivante d'investigation est à présent celle des peptides.



## V.2. Formation de bi-tyrosine au sein de peptides

Dans l'objectif de s'intéresser à des systèmes plus proches de la protéine, des peptides ont été étudiés. Le choix des peptides considérés a été effectué en gardant en tête l'objectif de l'étude de la dimérisation de la centrine 2 humaine. Ainsi, la stratégie a été de travailler avec un premier peptide synthétique de même séquence que l'un des fragments issus de la digestion tryptique de la centrine 2 humaine et qui contient bien évidemment la tyrosine, qui se trouve être C-terminale. Il s'agit d'un peptide composé des cinq derniers acides aminés de la centrine 2 humaine : KTSLY. Dans un second temps, à la séquence du premier peptide a été ajouté un acide aminé du côté C-terminal afin de pouvoir envisager la tyrosine au milieu d'une séquence, impliquant que la fonction acide carboxylique, jusqu'alors libre se trouve engagée dans une liaison peptidique. C'est une glycine qui a été ajoutée : le deuxième peptide d'étude est donc KTSLYG.

### V.2.1. Peptide KTSLY

Le peptide KTSLY synthétique a été utilisé pour étudier la dimérisation de la tyrosine à une échelle intermédiaire entre l'acide aminé et la protéine. La formation de bi-tyrosine au sein de ce peptide de cinq acides aminés a principalement été analysée par UPLC-MS. Contrairement au cas de la tyrosine libre, qui est une entité avec un faible poids moléculaire, ici, les ions sont multichargés. Plus précisément, ces sont les états de charge +2 et +3 des dimères de KTSLY qui ont été utilisés pour permettre l'étude de la dimérisation. Au-delà des différents états de charge susceptibles d'être exploités, le peptide KTSLY ayant été étudié tout au long de la durée de cette thèse, différentes conditions de séparation chromatographique pourront être présentées. Aussi, les peptides présentant des masses plus importantes que les acides aminés, ils peuvent être ionisés à différents états de charge (2+ et 3+ pour KTSLY). En fonction de l'état de charge considéré, des contributions d'oligomères d'ordre supérieur seront susceptibles d'interférer au  $m/z$  extrait.

#### V.2.1.1. Quid de la pluralité des espèces ?

A l'échelle d'un peptide, plusieurs isomères de bi-tyrosine sont-ils formés également ? Pour tenter de répondre à cette question, le peptide KTSLY a été irradié à 40 Gy en présence du radical  $N_3^{\bullet}$  et analysé par UPLC-MS. La Figure 66 expose le chromatogramme ionique extrait à  $m/z$   $610.35 \pm 0.05$  ( $[M+2H]^{2+}$  du dimère). Jusqu'à quatorze pics chromatographiques sont détectés et possèdent des temps de rétention entre 7.96 et 10.66 minutes.

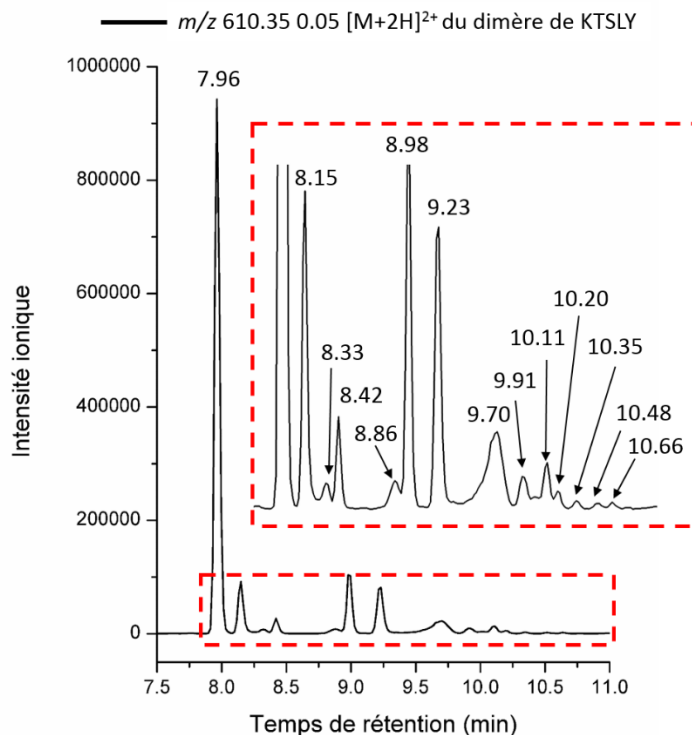


Figure 66: Chromatogramme ionique extraits pour le peptide KTSLY irradié à 40 Gy en présence de  $N_3^+$  pour  $m/z$   $610.35 \pm 0.05$ . L'insert est un agrandissement de la zone indiquée en pointillés rouges. Gradient chromatographique n°5 (Tableau 38).

Afin de connaître la nature des espèces ainsi mises en évidence, leurs spectres de masse ont été extraits et sont exposés en Figure 67. Sur les quatorze spectres, tous possèdent une contribution à  $m/z$  610.35 mais ce  $m/z$  n'est pas spécifique du dimère bichargé du peptide. En effet, à  $m/z$  610.35 se trouvent aussi les contributions isotopiques  $M+1$  de l'ion trichargé du trimère et  $M+2$  de l'ion tétrachargé du tétramère. En fonction du pic monoisotopique observé sur la Figure 67, une attribution est proposée (D : dimère, T : trimère, Te : tétramère). Les correspondances respectives des  $m/z$  indiqués sont explicitées dans le Tableau 10. Ainsi, cinq pics de dimères du peptide KTSLY ont été identifiés (TR: 7.96, 8.15, 8.42, 8.98 et 9.70 min). D'après les spectres de masse de la Figure 67 et les  $m/z$  du Tableau 10, lorsque l'état de charge 2+ est utilisé, la stratégie pour sélectionner spécifiquement le dimère de KTSLY consiste à considérer le  $[M+2H+1]^{2+}$  ( $m/z$  610.85).

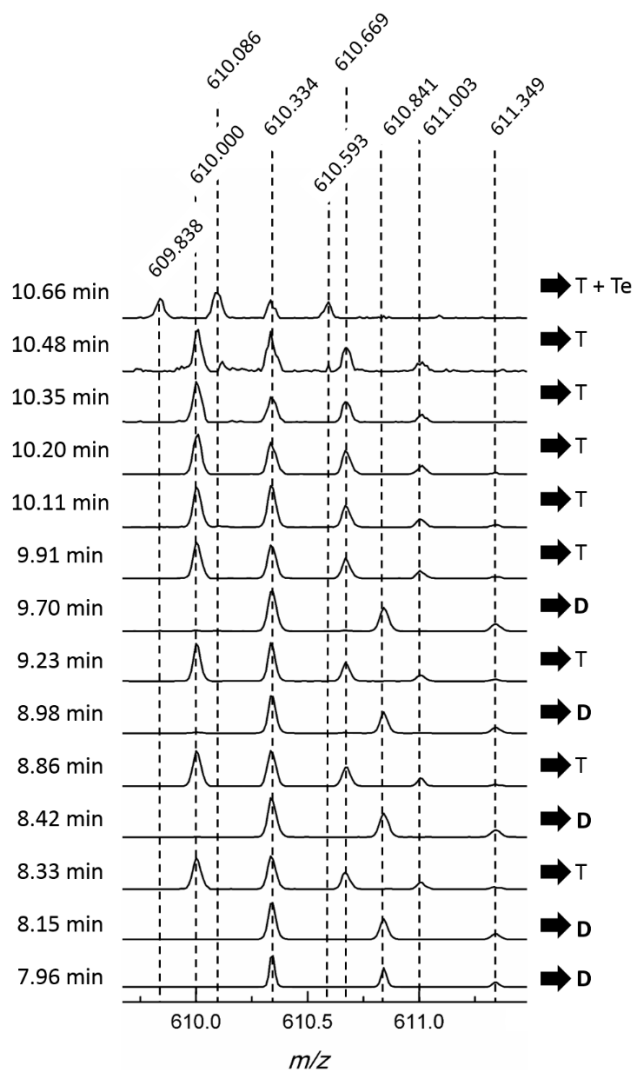


Figure 67: Spectres de masse des pics chromatographiques extraits à  $m/z$   $610.35 \pm 0.05$  en Figure 66. D : dimère, T : trimère, Te : tétramère.

$m/z$	Correspondance	Spécificité
<b>609.838</b>	$[M+4H]^{4+}$ du tétramère	Spécifique du tétramère
<b>610.000</b>	$[M+3H]^{3+}$ du trimère	Spécifique du trimère
<b>610.086</b>	$[M+4H+1]^{4+}$ du tétramère	Spécifique du tétramère
	$[M+2H]^{2+}$ du dimère	
<b>610.334</b>	$[M+3H+1]^{3+}$ du trimère	Non spécifique
	$[M+4H+2]^{4+}$ du tétramère	
<b>610.593</b>	$[M+4H+2]^{4+}$ du tétramère	Spécifique du tétramère
<b>610.669</b>	$[M+3H+2]^{3+}$ du trimère	Spécifique du trimère
<b>610.841</b>	$[M+2H+1]^{2+}$ du dimère	Spécifique du dimère
<b>611.003</b>	$[M+3H+3]^{3+}$ du trimère	Spécifique du trimère
<b>611.349</b>	$[M+2H+2]^{2+}$ du dimère	Spécifique du dimère

Tableau 10: Résumé des  $m/z$  observés sur les spectres de masse de la Figure 67.

Avant de se pencher sur l'analyse approfondie de la formation des cinq dimères de KTSLY, le chromatogramme ionique extrait à  $m/z$   $407.22 \pm 0.05$  ( $[M+3H]^{3+}$  du dimère) est exposé en Figure 68 (a). Les cinq pics chromatographiques ( $P_1$  à  $P_5$ ) précédemment attribués à des dimères du peptide KTSLY sont détectés. Leurs spectres de masse sont présentés en Figure 68 (b) et leurs profils isotopiques (ion trichargé, pic monoisotopique à  $m/z$  407.229) confirment leur attribution à des dimères covalents de KTSLY. Dans le cadre de l'ion trichargé, aucune interférence avec des oligomères d'ordre supérieur ne gêne la détection des dimères.

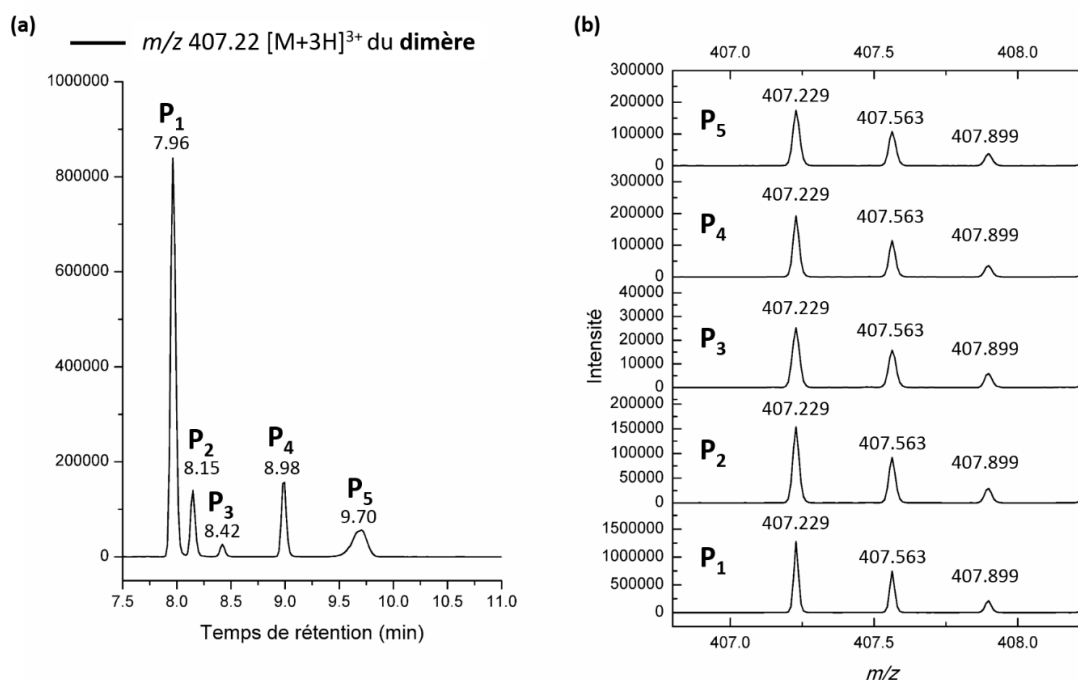


Figure 68: (a) Chromatogramme ionique extrait pour le peptide KTSLY irradié à 40 Gy en présence de  $N_3^*$  pour (a)  $m/z$   $407.22 \pm 0.05$  ( $[M+3H]^{3+}$  du dimère); (b) Spectres de masse des pics  $P_1$  à  $P_5$  extraits en (a), centrés en  $m/z$  407.5.

Pour résumer, la pluralité des dimères est donc vérifiée à l'échelle peptidique lors d'une exposition au radical  $N_3^*$ . A ce stade, bien que les radicaux  $^*OH$  et  $N_3^*$  aient montré un comportement de dimérisation similaire dans le cadre de l'étude de la tyrosine, la formation de plusieurs dimères de KTSLY a été interrogée lors d'une oxydation avec  $^*OH$ .

#### V.2.1.2. Dimérisation oxydative: $^*OH$ vs. $N_3^*$

Le peptide KTSLY a été oxydé en présence de  $^*OH$  en vue d'une comparaison avec l'oxydation mise en évidence sous  $N_3^*$ . Dans le cadre de cette comparaison entre les deux radicaux, les conditions d'électrospray ont favorisé la formation de l'ion bichargé du dimère alors que l'ion trichargé est quasiment indétectable. La Figure 69 expose donc les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $610.85 \pm 0.05$ , spécifique du dimère, pour une oxydation sous  $N_3^*$  (en rouge) et sous  $^*OH$  (en noir). Les cinq mêmes pics chromatographiques de dimères, nommés  $P_1$  à  $P_5$  sont présents dans les deux

conditions considérées. Ces expériences appuient une fois de plus la validité du travail mécanistique mené avec  $N_3^\bullet$  qui permet de mimer le comportement de dimérisation du radical  $^\bullet OH$ , et ce même à l'échelle peptidique. En tout état de cause, l'objectif de ce travail est d'entreprendre une investigation structurale des cinq isomères formés.

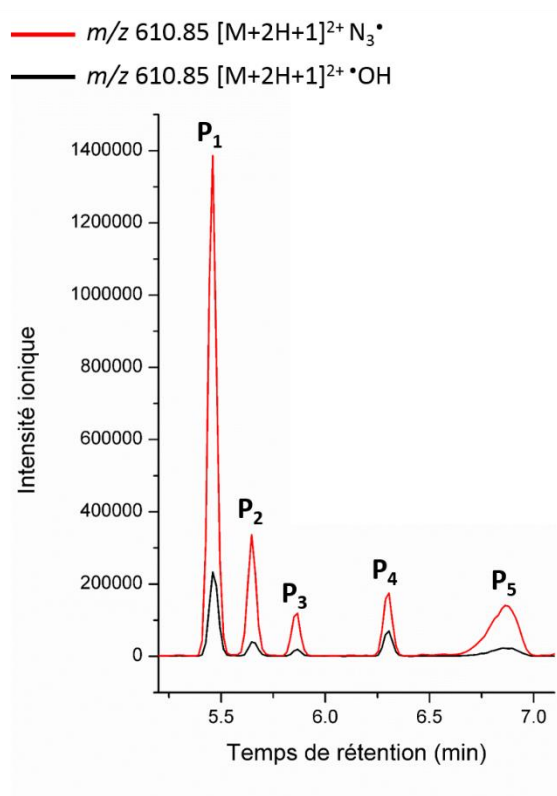


Figure 69: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  610.85  $\pm$  0.05 pour KTSLY irradié à 40 Gy sous  $N_3^\bullet$  et  $^\bullet OH$ . Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Gradient chromatographique n°6 (Tableau 38).

### V.2.1.3. Expériences de fragmentation (MS/MS)

Cinq dimères du peptide KTSLY ont été mis en exergue. Pour autant, la localisation précise de la liaison covalente n'a pas encore été discutée. Rien ne confirme à ce stade qu'il s'agisse de cinq isomères de bi-tyrosine. Afin de permettre une description complète de la nature de ces liaisons covalentes, des expériences de fragmentation (MS/MS) ont été réalisées. L'ion sélectionné pour ces fragmentations est  $m/z$  610  $\pm$  1 et l'énergie de collision est fixée à 20 eV. Le spectre de fragmentation obtenu pour le dimère P<sub>1</sub> est présenté en Figure 70.

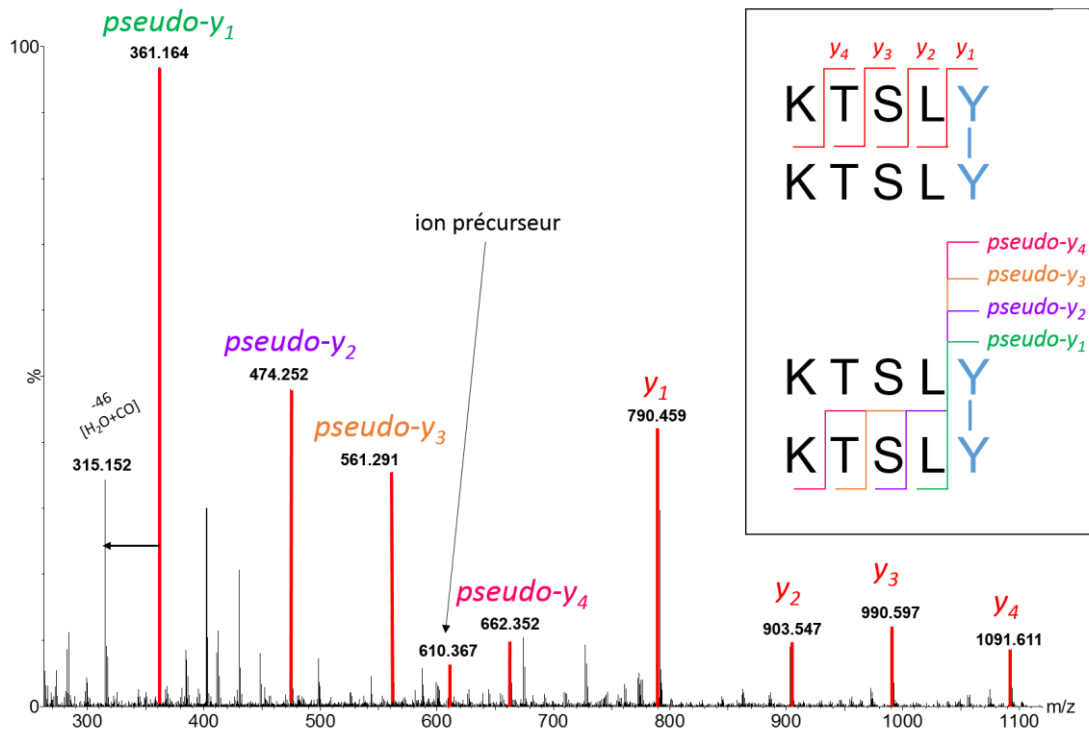


Figure 70: Spectre de fragmentation MS/MS du dimère P<sub>1</sub> de KTSLY ( $m/z$  610  $\pm$  1) obtenu avec une énergie de collision de 20 eV. L'intensité ionique est indiquée en pourcentage relatif par rapport à  $m/z$  361.164.

Ces expériences ont conduit à la formation de plusieurs fragments dits de série y mais également de fragments appelés ici pseudo-y correspondant à une double fragmentation autour de la liaison covalente (voir insert de la Figure 70) dont la nature reste à identifier. La présence de ces séries y et pseudo-y confirme qu'il s'agit d'un dimère formé *via* un pont bi-tyrosine : les fragmentations de toutes les liaisons amide jusqu'au motif Y-Y sont observées. Le fragment à  $m/z$  361.164, issu de la fragmentation combinée des deux côtés du pont covalent est le fragment le plus intense et correspond au pont bi-tyrosine « isolé » de tous les autres acides aminés de la séquence du dimère. Sa seule présence suffit à certifier la formation d'un lien tyrosine-tyrosine. Ce fragment à  $m/z$  361.164 est d'ailleurs observé dans l'ensemble des spectres de fragmentation des autres dimères (P<sub>2</sub> à P<sub>5</sub>). Le Tableau 11 rassemble les  $m/z$  mesurés sur les spectres MS/MS des cinq dimères de KTSLY et permet une comparaison avec la valeur calculée du  $m/z$  théorique attendu pour un pontage *via* les tyrosines. Les cinq dimères du peptide KTSLY sont donc des isomères de bi-tyrosine. L'utilisation du  $m/z$  de l'ion bichargé n'est pas un problème car les fragments pseudo-y permettant d'identifier le pontage ne peuvent provenir que d'un dimère et pas d'oligomères d'ordre supérieur. Néanmoins, les expériences de fragmentation (MS/MS) ont aussi été effectuées en sélectionnant l'ion trichargé du dimère à  $m/z$  407  $\pm$  1 et les mêmes fragments ont pu être identifiés (données non présentées).



Fragment pseudo y	KTSLY KTSLY	KTSLY TSLY	KTSLY SLY	KTSLY LY	KTSLY Y	TSLY Y	SLY Y	LY Y	Y Y
Etat de charge (+)	2	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>m/z</i> théorique	610.332	1091.561	990.514	903.482	790.398	662.303	561.255	474.223	361.139
<i>m/z</i> mesuré	P <sub>1</sub>	610.367	990.597	903.547	790.459	662.352	561.291	474.252	361.164
	P <sub>2</sub>	610.367	1091.626	903.547	790.422	662.307	561.291	474.271	361.172
	P <sub>3</sub>	610.377	1091.582	990.611	903.521	790.459	662.363	561.281	361.164
	P <sub>4</sub>	610.377	1091.611	990.528	903.534	790.422	662.374	561.281	361.172
	P <sub>5</sub>	610.377	1091.640	990.583	903.547	790.434	662.341	561.312	361.156

Tableau 11: Fragments pseudo y issus des expériences de MS/MS sur les dimères de KTSLY à  $m/z$  610  $\pm$  1 après irradiation à 40 Gy avec N<sub>3</sub><sup>•</sup>. Les valeurs de *m/z* théoriques sont comparées aux mesurées.

## V.2.1.4. Investigation structurale

De même que lors de l'étude réalisée sur la tyrosine, l'étape qui suit la mise en évidence de la pluralité des espèces dimériques est leur investigation structurale. La stratégie d'échange H/D développée à l'échelle de l'acide aminé peut ici être mise en place sans difficultés expérimentales supplémentaires à l'inverse des expériences de deutération des positions *ortho* de la tyrosine. Le peptide KTSLY a donc été irradié dans D<sub>2</sub>O en parallèle de l'irradiation menée dans H<sub>2</sub>O. Par analogie avec les expériences réalisées sur la tyrosine libre et les tyrosines protégées, une attention toute particulière a été portée à la conservation des échantillons post-irradiation. Ils ont été congelés immédiatement après l'oxydation (T0), conservés à 37°C pendant 48 heures (T48) mais aussi conservés à 37°C pendant des durées intermédiaires de 1, 3, 5, 7, 24 et 30 heures (T1, T3, T5, T7, T24 et T30). L'ion trichargé du dimère (M+3H)<sup>3+</sup>, *m/z* 407.22) a ici pu être considéré pour extraire les chromatogrammes et pour analyser les échanges H/D. Bien que les dimères du peptide KTSLY irradié dans l'eau aient déjà été extraits, ils sont ici à nouveau à différentes étapes de la conservation contrôlée des échantillons. La Figure 71 expose les chromatogrammes ioniques extraits à *m/z* 407.22 ± 0.05 à T0, T5 et T48 pour le peptide KTSLY irradié dans H<sub>2</sub>O.

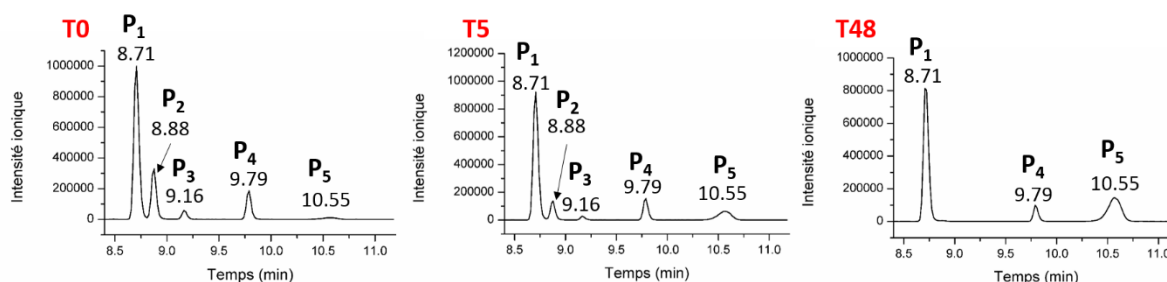
KTSLY dans H<sub>2</sub>O

Figure 71: Chromatogrammes ioniques extraits à *m/z* 407.22 ± 0.05 [M+3H]<sup>3+</sup> à T0, T5 et T48 pour le peptide KTSLY irradié dans H<sub>2</sub>O (N<sub>3</sub>\*). Gradient chromatographique n°7 (Tableau 38).

Les spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> ne sont pas ici réextraits car ils ont déjà été présentés en Figure 68. A T0, les cinq pics chromatographiques déjà mis en évidence précédemment sont apparents. A T5, les intensités relatives des dimères P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> semblent avoir largement diminué au regard du dimère P<sub>5</sub> qui voit son intensité augmenter. A T48 finalement, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> ne sont même plus détectables et P<sub>5</sub> a très nettement crû. Pour les pics P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub>, aucune évolution n'est à noter. Ce comportement fait immédiatement écho à celui observé pour la tyrosine N-acétylée à savoir la disparition de deux isomères au cours du temps accompagnée de l'apparition ou du moins la croissance d'un autre. Une cinétique d'évolution a été réalisée en considérant tous les temps intermédiaires d'incubation des échantillons à 37°C entre T0 et T48 : T1, T3, T5, T7, T24 et T30. Les aires de chacun des cinq pics de dimères ont été intégrées pour *m/z* 610.85 ± 0.05 ([M+2H+1]<sup>2+</sup>) et *m/z* 407.22 ± 0.05 ([M+3H]<sup>3+</sup>) à

chaque stade d'évolution à 37°C. En Figure 72 sont présentés les histogrammes correspondants.

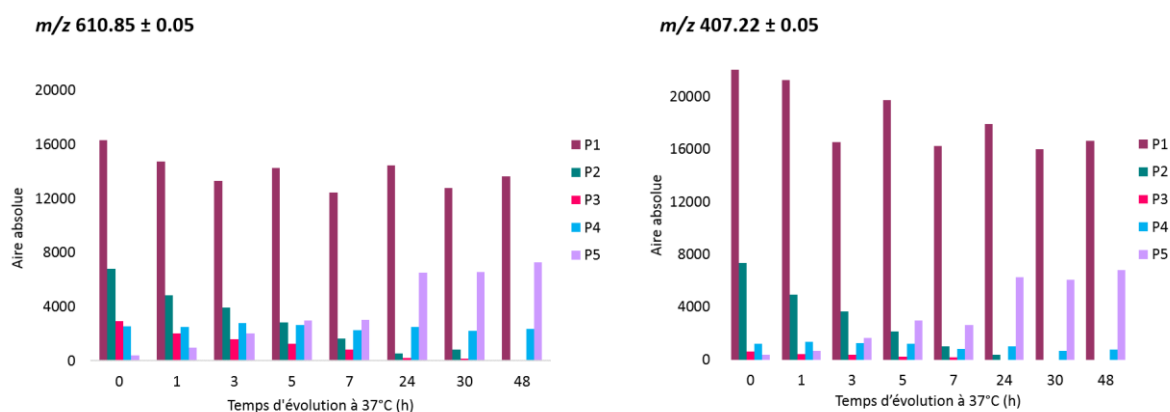


Figure 72: Histogrammes des aires absolues des pics P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> du peptide KTSLY irradié à 40 Gy (N<sub>3</sub><sup>\*</sup>) en fonction du temps d'évolution à 37°C pour m/z 610.85 ± 0.05 et m/z 407.22 ± 0.05.

L'aire du dimère P<sub>1</sub> semble diminuer légèrement entre T<sub>0</sub> et T<sub>48</sub>, et ce pour les deux états de charge considérés. Néanmoins, cet effet n'est pas significatif devant les évolutions des aires des dimères P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>5</sub>. L'aire du dimère P<sub>4</sub> semble varier très peu avec l'évolution en température ou si une évolution existe, elle est de l'ordre de grandeur de celle mise en évidence pour P<sub>1</sub>. Les aires des pics P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> diminuent quant à elles drastiquement au cours du temps jusqu'à une disparition totale à T<sub>48</sub>, quel que soit l'état de charge considéré. Enfin, le dimère P<sub>5</sub>, intégré en très faible quantité à T<sub>0</sub> voit son aire significativement augmenter au cours du temps. Sur la base de ses évolutions temporelles, les pics P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub> pourraient correspondre aux dimères *ortho-ortho* et *iso*, les pics P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> à des intermédiaires de Michael et le pic P<sub>5</sub> à un dimère final issu d'additions de Michael. Ces hypothèses seront confrontées ci-après lors d'expériences d'échanges H/D. Il est à noter que les pics P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> possèdent une aire absolue bien plus importante dans le cas de l'ion bichargé (m/z 610.85) que l'ion trichargé (m/z 407.22). L'hypothèse pour expliquer une telle différence de comportement est l'implication de l'oxygène dans la liaison covalente (directe ou *via* additions de Michael), qui n'est donc plus disponible pour assurer la stabilisation des charges.

Des expériences d'échange H/D avec le solvant (D<sub>2</sub>O) ont ensuite été effectuées. La Figure 73 met en avant les spectres de masse à T<sub>0</sub> (a), T<sub>5</sub> (b) et T<sub>48</sub> (c) des cinq pics chromatographiques de dimères (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>) à la suite d'une irradiation dans D<sub>2</sub>O.

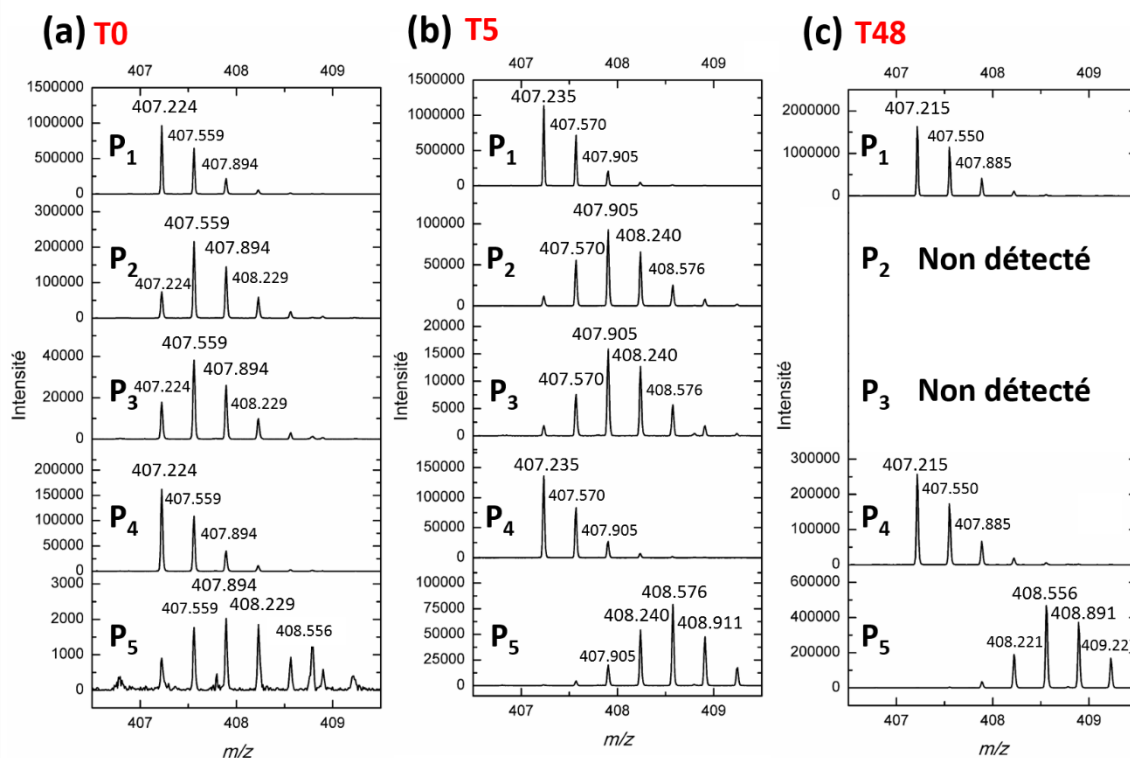
KTSLY dans D<sub>2</sub>O

Figure 73: Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> à T0 (a), T5 (b) et T48 (c) du dimère KTSLY irradié dans D<sub>2</sub>O. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Les pics P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub>, dont l'intensité varie peu de T0 à T48, sont insensibles aux échanges H/D : leurs spectres de masse sont invariables. Ainsi, P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub> peuvent être respectivement attribués aux isomères *ortho-ortho* et *iso* de bi-tyrosine comme P<sub>1</sub> apparaît plus hydrophile que P<sub>4</sub>. Les spectres de masse des pics P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> évoluent entre T0 et T5 : le *m/z* moyen augmente et le calcul de la masse moyenne pondérée par les intensités permet d'estimer l'incorporation moyenne d'atomes de deutérium à respectivement +0.87 D et +0.75 D (Tableau 12). Ainsi, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> sont proposés comme des dimères issus d'une première cycloaddition de Michael qui évoluent dans le temps probablement au profit de la formation du dimère contenu sous le pic P<sub>5</sub>. En effet, à T48, d'après le spectre de masse de P<sub>5</sub>, une incorporation moyenne de +3.85 D (Tableau 12) a eu lieu. Autrement dit, le pic chromatographique P<sub>5</sub> correspond à une espèce dimérique ayant subi deux additions de Michael (nombre moyen de deutériums incorporé supérieur à 2). Une analogie peut être effectuée avec la tyrosine N-acétylée, dont seule la fonction amine est protégée : deux espèces dimériques intermédiaires disparaissent dans le temps alors qu'un nouveau dimère est formé au cours de l'évolution à 37°C. Plusieurs hypothèses peuvent être faites à propos des fonctions impliquées dans les additions de Michael. La fonction phénol est très certainement impliquée dans une des additions puis soit la fonction acide carboxylique libre s'additionne, soit l'azote est capable de s'additionner malgré son implication dans la liaison

peptidique. Il n'est pas non plus à exclure la combinaison de l'addition de l'atome d'azote de la liaison peptidique avec l'addition de l'acide carboxylique libre.

		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
	T0	0.09	0.87	0.75	0.09	1.35
<b>KTSLY</b>	T5	0.05	1.59	1.64	0.07	<b>3.26</b>
	T48	0.10	ND	ND	0.07	<b>3.85</b>

Tableau 12: Valeurs moyennes du nombre de deutériums incorporés pour le peptide KTSLY lors des échanges H/D dans D<sub>2</sub>O. ND : non détecté.

La Figure 74 expose un schéma récapitulatif des structures de dimères du peptide KTSLY. Les carbones asymétriques y sont indiquées par des cercles rouges en transparence : des diastéréoisomères sont attendus.

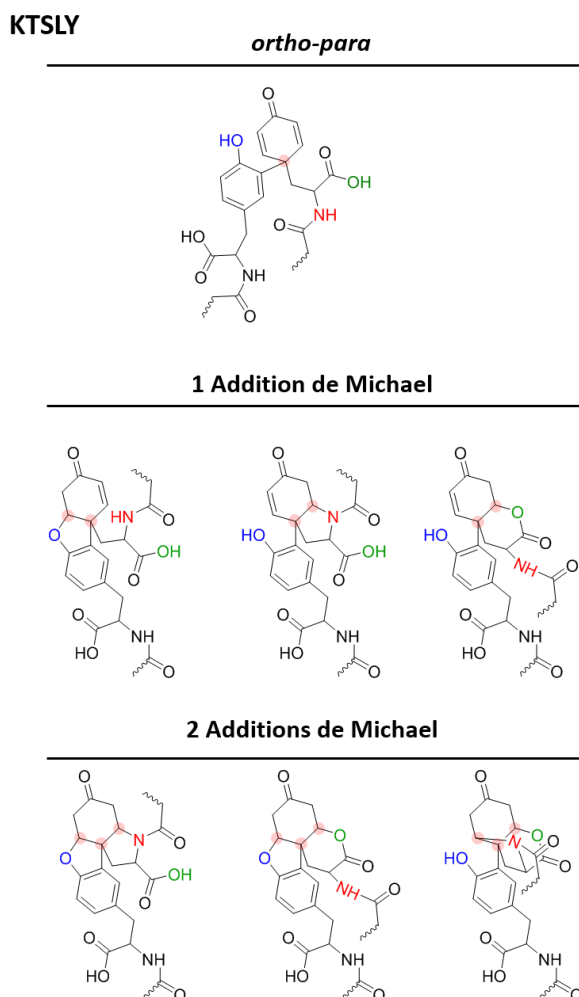


Figure 74: Récapitulatif des structures potentielles de dimères du peptide KTSLY. Les carbones indiqués par un cercle rouge sont les carbones asymétriques formés lors de la dimérisation.

## V.2.1.5. Expériences de spectrométrie de mobilité ionique (IMS)

Des expériences d'UPLC-IMS/MS ont été réalisées sur les dimères du peptide KTSLY. L'état de charge 3+ a été considéré pour l'extraction des représentations 2D UPLC-IMS/MS (td/tr). Les temps de dérive obtenus sur ces chromatogrammes sont directement reliés à la section efficace de collision de l'ion, elle-même dépendante de la charge portée par ce dernier ainsi que de sa mobilité réduite. La Figure 75 expose les représentations 2D UPLC-IMS/MS (td/tr) extraits à  $m/z$  407.22 ( $[M+3H]^{3+}$ ) obtenus à T0, T5 et T48 pour les dimères du peptide KTSLY. Plusieurs pics 3D sont observés sur ces représentations et ils sont plus nombreux que les pics chromatographiques préalablement mis en évidence : en effet, pour un temps de rétention donné, plusieurs isomères sont susceptibles d'être séparés grâce à la dimension supplémentaire qu'offre la mobilité ionique. Dans le cas considéré ici, les pics chromatographiques P<sub>2</sub> (à T0 et T5), P<sub>3</sub> (à T0) et P<sub>5</sub> (à T5 et T48) possèdent les contributions (appelées A et B) d'au moins deux espèces qui se comportent différemment vis-à-vis de collisions avec un gaz inerte. Ces trois pics ont précédemment été attribués à des dimères de la famille MAD ayant subi respectivement une et deux additions de Michael. Or, comme cela a déjà été proposé, plusieurs diastéréoisomères de telles structures sont potentiellement formés et l'utilisation d'une seconde dimension de séparation *via* l'IMS permet de conforter cette hypothèse. Quel que soit le pic présentant plusieurs contributions en temps de drift, une des contributions est toujours majoritaire devant l'autre (P<sub>2</sub>A < P<sub>2</sub>B, P<sub>3</sub>A < P<sub>3</sub>B, P<sub>5</sub>A < P<sub>5</sub>B).

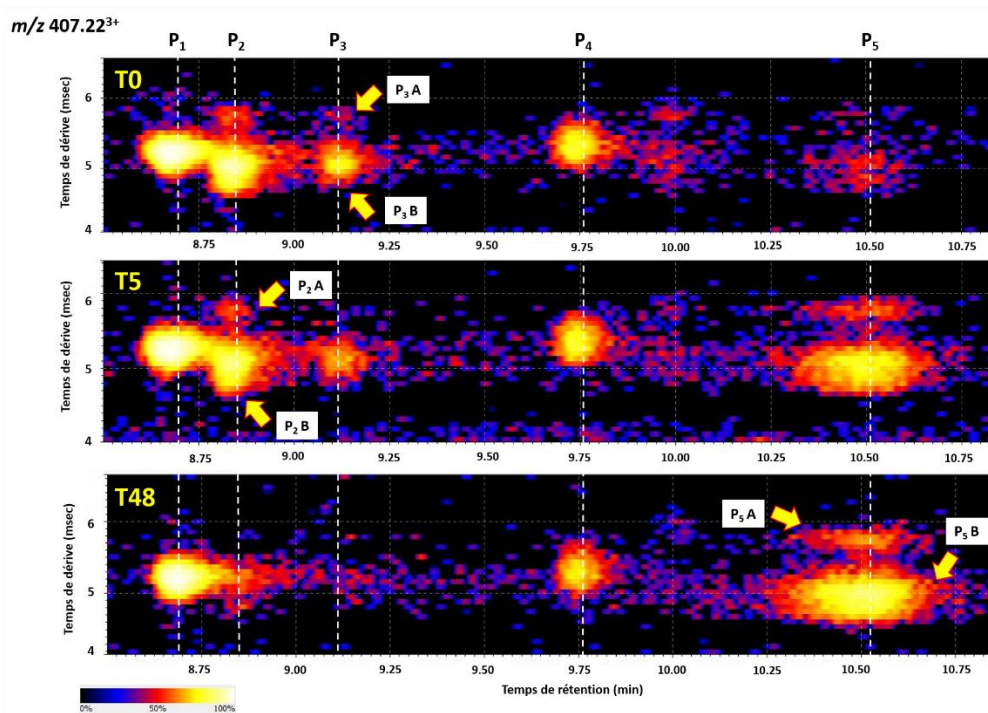


Figure 75: Spectres de mobilité ionique obtenus à T0, T5 et T48 pour les dimères du peptide KTSLY (irradié à 40 Gy en présence de N<sub>3</sub><sup>\*</sup>) à  $m/z$  407.22. Gradient chromatographique n°7 (Tableau 38).

La comparaison entre T0, T5 et T48 permet de rendre compte de l'évolution structurale des dimères: les pics P<sub>2</sub>A, P<sub>2</sub>B et P<sub>3</sub>A et P<sub>3</sub>B disparaissent alors que la formation des dimères P<sub>5</sub>A et P<sub>5</sub>B est observée. A T48 sont présents les dimères attribués à l'*ortho-ortho* (P<sub>1</sub>), l'*ortho-iso* (P<sub>4</sub>) et aux diastéréoisomères issus de doubles additions de Michael (P<sub>5</sub>A et P<sub>5</sub>B). La dimension supplémentaire offerte par la mobilité ionique a donc permis d'atteindre la séparation de huit isomères de di-KTSLY.

En plus de la présence supposée de diastéréoisomères, des temps de dérive différents sont mesurés pour les différentes espèces : ils sont exposés dans le Tableau 13. Les différences observées sont le témoin de géométries diverses pour les différentes bi-tyrosines formées et d'autant plus dans le cas de diastéréoisomères.

Espèce	Temps de dérive (msec)
P <sub>1</sub>	5.25
P <sub>2</sub> A	5.75
P <sub>2</sub> B	4.95
P <sub>3</sub> A	5.70
P <sub>3</sub> B	5.05
P <sub>4</sub>	5.30
P <sub>5</sub> A	5.80
P <sub>5</sub> B	5.00

Tableau 13: Valeurs des temps de dérive des dimères du peptide KTSLY (ion trichargé à  $m/z$  407.22).

Ainsi, les expériences d'IMS ont permis l'introduction d'une nouvelle dimension de séparation. Les conditions chromatographiques ayant déjà mené à la différenciation d'au moins cinq dimères du peptide, ici c'est la présence de plusieurs isomères éluant au même temps de rétention mais possédant des géométries diverses qui est mis en évidence.

Un peptide dont la fonction acide carboxylique terminale est aussi impliquée dans une liaison peptidique a été considéré, de la même manière que cela a été envisagé à l'échelle de l'acide aminé avec la protection en carbamate. Pour ce faire, une glycine a été ajoutée à la séquence KTSLY précédemment considérée : le peptide résultant est KTSLYG.

### V.2.2. Peptide KTSLYG

Le peptide KTSLYG a été irradié à 40 Gy dans les conditions de formation de N<sub>3</sub><sup>•</sup> et analysé par UPLC-MS. Les conditions chromatographiques ont été optimisées pour permettre de rendre compte de la diversité des dimères existant. Dans un premier temps irradié dans H<sub>2</sub>O, les échantillons ont été conservés à -20°C immédiatement après oxydation (T0) ou soumis à évolution à 37°C pendant 72 heures (T72). Le panel (a) de la Figure 76 expose les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  445.31 ± 0.05, [M+3H]<sup>3+</sup> du dimère covalent du peptide KTSLYG.

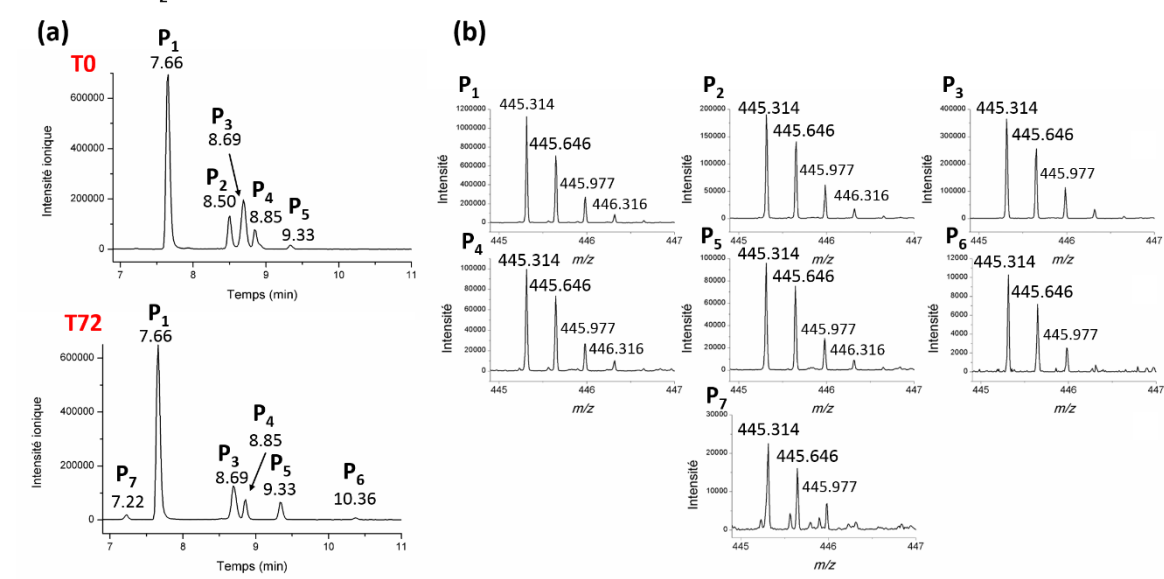
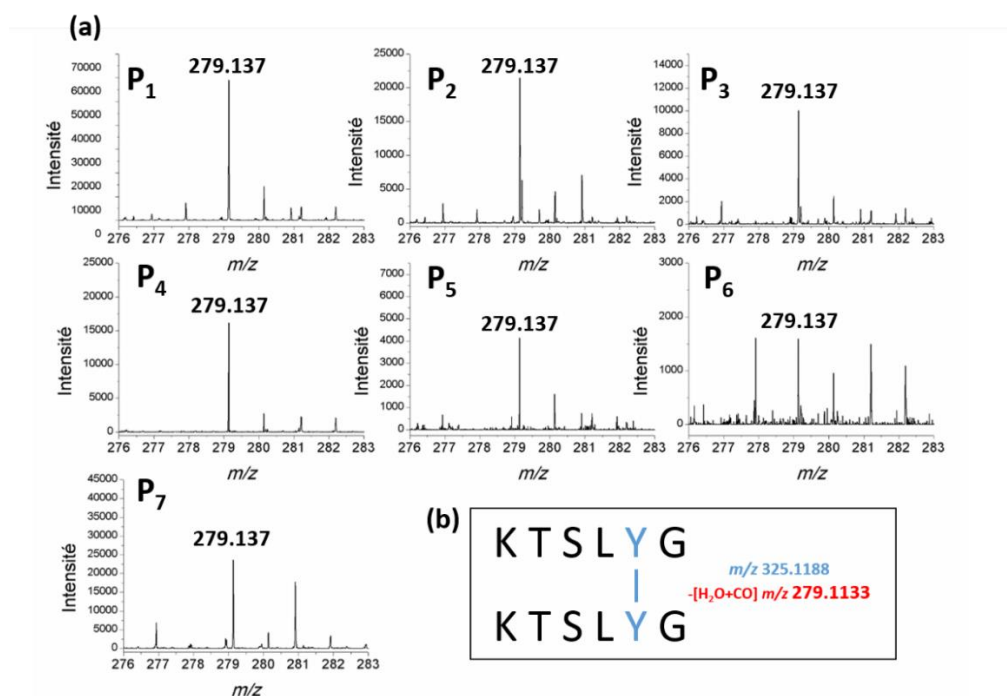
KTSLYG dans H<sub>2</sub>O


Figure 76: (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $445.31 \pm 0.05$   $[M+3H]^{3+}$  à T0 et T72 pour le peptide KTSLYG irradié à 40 Gy ( $N_3^*$ ) dans H<sub>2</sub>O. Gradient chromatographique n°7 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub>, centrés en  $m/z$  445. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

A T0, jusqu'à cinq pics chromatographiques (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>) sont détectés, malgré l'implication des fonctions amine et acide carboxylique de la tyrosine dans des fonctions peptidiques. A T72, le dimère P<sub>2</sub> a complètement disparu et deux autres dimères d'intensités très faibles sont apparus : P<sub>6</sub> et P<sub>7</sub>. Les spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> sont présentés sur le panel (b) de la Figure 76 et les profils isotopiques confirment leur attribution à des dimères de KTSLYG. Jusqu'à sept pics chromatographiques répondant au  $m/z$  d'un dimère covalent du peptide KTSLYG ont été détectés, certains étant probablement des dimères résultant d'additions de Michael. Bien que sa séquence soit extrêmement proche de KTSLY et que le radical oxydant utilisé soit l'azoture, il convient de vérifier la nature du lien covalent à l'origine de la dimérisation. Pour ce faire, des expériences de fragmentation (MS/MS) ont été réalisées. Toutefois, dans les conditions d'électrospray de la détection MS simple, plus drastiques que celles ayant été utilisées pour KTSLY par exemple, plusieurs fragments sont déjà observés et permettent de statuer directement sur la nature de la liaison covalente. Le Tableau 14 rassemble les fragments observés pour le pic P<sub>1</sub> particulièrement. Parmi ces fragments, l'un justifie sans ambiguïté qu'il s'agit d'un lien bi-tyrosine et ce pour les sept dimères. Il s'agit du fragment à  $m/z$  279.14 : il correspond au fragment caractéristique de la bi-tyrosine ( $m/z$  325.14) qui a lui-même perdu  $[H_2O+CO]$  (-46) comme présenté en Figure 77. Les spectres de masse centrés en  $m/z$  279 des pics P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> sont présentés en Figure 77. Ainsi, dans le cas du peptide KTSLYG au sein duquel la tyrosine n'est pas terminale, sept isomères de bi-tyrosine sont mis en évidence.



Fragments	Correspondance	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental
$y_1$	G	76.0393	76.049
$b_2$	KT	230.1499	230.185
$b_3$	KTS	317.1819	317.234
$b_4$	KTSL	430.2660	430.336
<i>pseudo y</i>	Y KTSLYG	816.4018	ND
<i>pseudo y</i>	YG KTSLYG	904.4411	904.595
<i>pseudo y</i>	LYG KTSLYG	1017.5251	1017.705
<i>pseudo y</i>	SLYG KTSLYG	1104.5572	1104.744
<i>pseudo y</i>	TSLYG KTSLYG	1205.6048	1205.814
<i>pseudo y</i>	Y Y	325.1188	ND
<i>pseudo y</i>	Y -[H <sub>2</sub> O+CO]	279.1133	279.137

 Tableau 14: Fragments type MS/MS du dimère P<sub>1</sub> de KTSLYG obtenu lors d'une irradiation à 40 Gy en présence de N<sub>3</sub><sup>\*</sup>.

 Figure 77: (a) Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> du peptide KTSLYG irradié à 40 Gy (N<sub>3</sub><sup>\*</sup>) dans H<sub>2</sub>O, centrés en  $m/z$  279. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue ; (b) Représentation du fragment à  $m/z$  325.12 (en bleu) dans la séquence du dimère de peptide. Le fragment observé à  $m/z$  279.14 correspond à la perte de [H<sub>2</sub>O+CO] du fragment à  $m/z$  325.12.

Afin d'investiguer quelles espèces proviennent de la famille MAD, KTSLYG a été irradié dans D<sub>2</sub>O. Les spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> centrés en *m/z* 446 sont présentés en Figure 78 à T0 (a) et T72 (b).

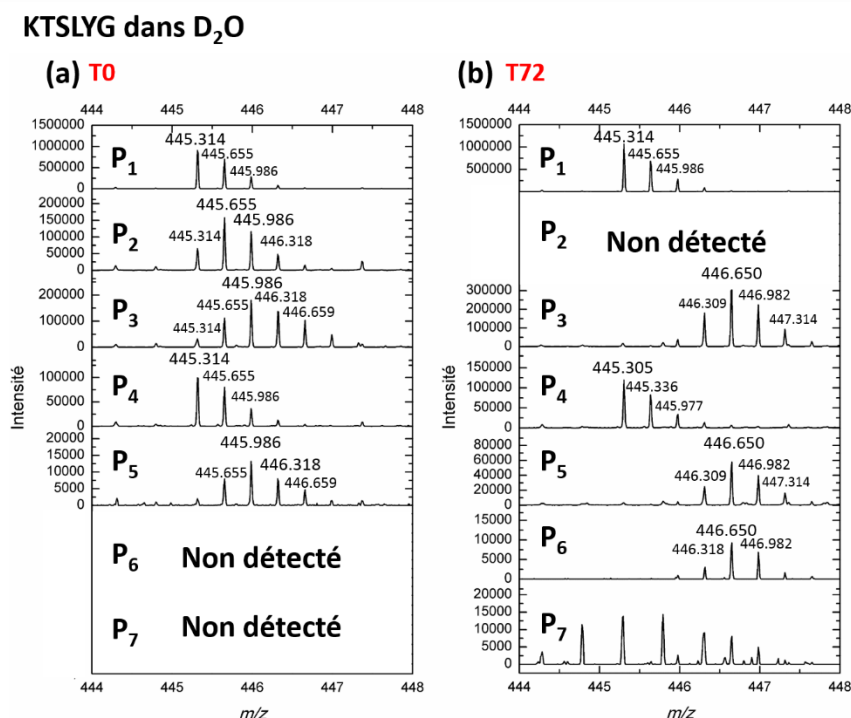


Figure 78: Spectres de masse des pics de dimères P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> à T0 (a) et T72 (b) du peptide KTSLYG irradié à 40 Gy (N<sub>3</sub><sup>\*</sup>) dans D<sub>2</sub>O. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. A T72, P<sub>7</sub> co-élué avec une impureté.

Deux dimères sont insensibles aux échanges H/D avec D<sub>2</sub>O. Il s'agit de P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub> qui sont donc proposés comme correspondant respectivement aux isomères *ortho-ortho* et *iso* bi-tyrosine au vu de leurs temps de rétention relatifs. Le pic P<sub>2</sub> est détecté à T0 mais ne l'est plus à T72 : d'après son profil isotopique à T0, il s'agit d'un intermédiaire de la famille MAD, qui aurait subi une unique cyclisation (+0.7 D, cf. Tableau 15). Le pic P<sub>3</sub>, bien que déjà présent à T0 avec un nombre moyen de deutériums incorporés de +0.7 D, est toujours détecté à T72 avec un nombre moyen de deutériums incorporés de +3.49 D (Tableau 15). P<sub>3</sub> correspond donc à un dimère ayant subi deux additions de Michael, pour lequel l'échange H/D avec le solvant est lent puisque plusieurs jours sont nécessaires à l'incorporation de presque quatre deutériums.

		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>7</sub>
<b>KTSLYG</b>	T0	0.06	0.70	1.83	0.14	1.44	ND	1.88
	T72	0.01	ND	<b>3.49</b>	0.01	<b>3.53</b>	<b>3.44</b>	<b>3.56</b>

Tableau 15: Valeurs moyennes du nombre de deutériums incorporés pour Le peptide KTSLYG lors des échanges H/D dans D<sub>2</sub>O. ND : non détecté.

De même, pour le pic P<sub>5</sub> déjà détecté à T0 (+1.44 D), qui, à T72 a incorporé un nombre de deutérium supérieur à 2 (+3.53 D, cf. Tableau 15), il correspond à un dimère de la famille MAD sur lequel deux cycloadditions ont eu lieu et pour lequel l'échange H/D est lent. Pour le pic P<sub>6</sub>, non détecté à T0 mais à T72, il s'agit ici encore d'un dimère ayant subi deux additions de Michael d'après la valeur du nombre de deutérium introduits à T72 (+3.44 D, cf. Tableau 15). Il est à ce stade possible de faire l'hypothèse que P<sub>2</sub>, proposé comme un intermédiaire de la famille MAD, disparaisse au profit de l'apparition de P<sub>6</sub>. Enfin, à T72 lors de l'irradiation dans D<sub>2</sub>O, le pic P<sub>7</sub> co-élue avec une autre espèce qui possède un *m/z* empêchant une lecture correcte du massif isotopique de P<sub>7</sub> comme cela peut être distingué sur son spectre de masse. Pour ce pic uniquement, le spectre de masse a donc été extrait à un autre état de charge (2+) et plus précisément à *m/z* 667.47 (T0) [M+2H+1]<sup>2+</sup>. Cet état de charge permet à la fois de s'affranchir de la contribution de l'espèce « polluante » mais aussi de détecter P<sub>7</sub> à T0, qui ne l'était pas à *m/z* 445.351. La Figure 79 expose les spectres de masse de P<sub>7</sub> centrés en *m/z* 669.5 à T0 (en rouge) et T72 (en noir).

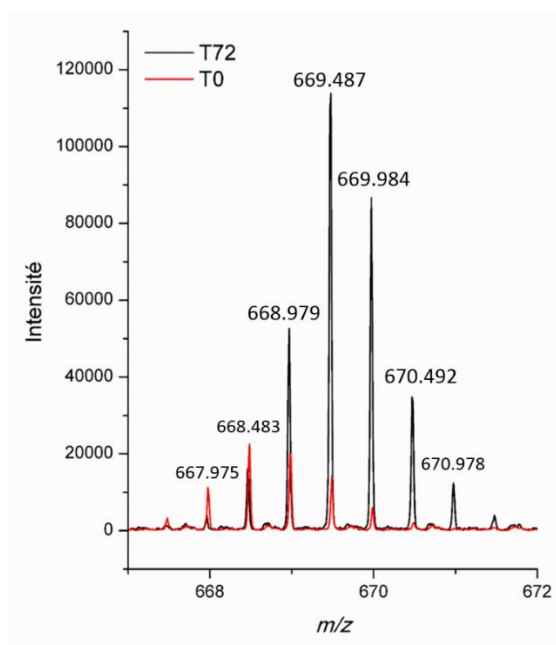


Figure 79: Spectres de masse du pic P<sub>7</sub> centrés en *m/z* 669.5 à T0 (rouge) et T72 (noir).

Des gains de +1.88 D à T0 et +3.56 D à T72 ont pu être calculés: le nombre de deutérium incorporé étant supérieur à 2 à T72, P<sub>7</sub> est proposé comme un dimère MAD sur lequel deux additions de Michael ont été effectuées. Ce produit de double cycloaddition est néanmoins formé dès T0, c'est l'échange H/D avec le solvant qui est lent. Ainsi, au moins quatre espèces ont pu être identifiées comme des dimères MAD doublement cyclisés (P<sub>3</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub> et P<sub>7</sub>) et un intermédiaire a été mis en évidence (P<sub>2</sub>). Le comportement de dimérisation du peptide KTSLYG, similaire à celui de l'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine, confirme que malgré leur implication dans des liaisons peptidiques, les fonctions initialement

amine semblent capables de s'additionner sur la cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée. La tyrosine étant ici au milieu d'une séquence peptidique, deux liaisons amide sont à proximité, la famille MAD est donc susceptible d'être formée de plusieurs isomères (Figure 80), en accord avec l'important nombre d'espèces mis en lumière dans le cadre de cette étude.

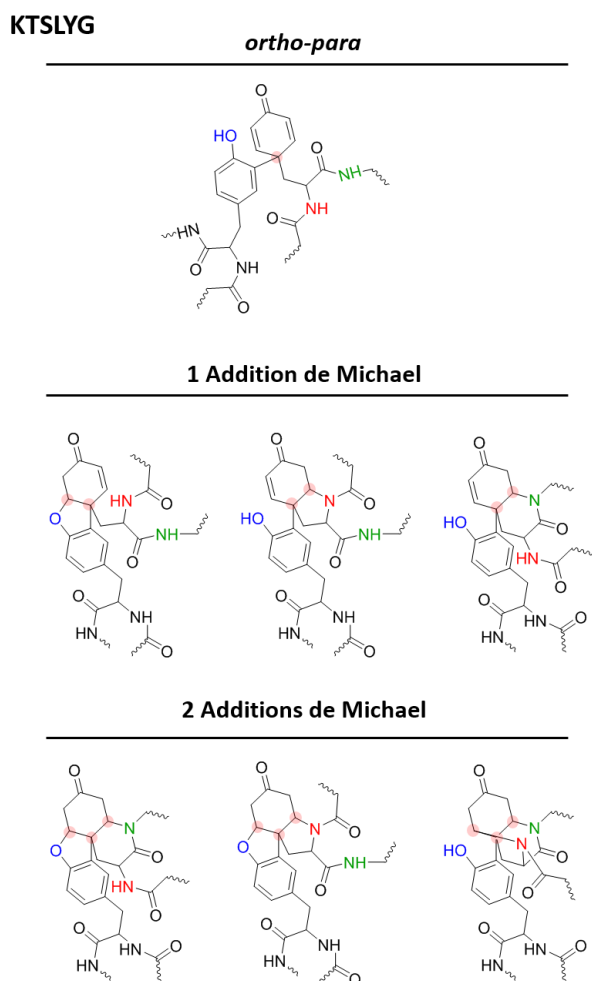


Figure 80: Représentation schématique des structures de dimères proposés issus d'une double cycloaddition de Michael dans le peptide KTSLYG.

### V.3. Discussion

Les protections des fonctions amine (Ac-Y et peptide KTSLY) puis acide carboxylique (Ac-Y-Et et peptide KTSLYG) avaient pour objectif de discriminer quel(les) fonction(s) sont à l'origine des pics de dimères détectés. La cohérence des résultats obtenus pour la tyrosine N-acétylée et le peptide KTSLY d'un côté et l'ester éthylique de tyrosine N-acétylée et le peptide KTSLYG de l'autre a permis d'appuyer les hypothèses faites. La première cycloaddition de Michael a toujours été considérée comme impliquant l'atome d'oxygène du phénol de la tyrosine liée en *ortho*. Dans le cadre de l'étude de la tyrosine N-acétylée et du peptide KTSLY, trois isomères finaux dont un identifié comme un MAD

final ont été mis en évidence. Cela a amené à proposer que l'acide carboxylique, encore libre, soit impliqué dans la seconde addition de Michael. Toutefois, en considérant l'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine et le peptide KTSLYG, un nombre supérieur de dimères a été mis en évidence dont au moins deux identifiés comme des dimères MAD doublement cycloadditionnés. Dans le cas de l'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine, l'atome d'oxygène (ex-carboxylate) ne peut être à l'origine de l'addition sur la cyclohexadiénone puisqu'il ne possède plus d'hydrogène qui pourrait se substituer lors de l'addition. Ainsi, il est proposé que ce soit l'azote des fonctions amides des protections qui s'additionne. Pour le peptide KTSLYG, le cas de figure est différent puisque ce sont deux liaisons peptidiques qui se trouvent à proximité de la cyclohexadiénone, aucun atome d'oxygène ne peut être impliqué. Les atomes d'azote des liaisons peptidiques semblent donc être en capacité de s'additionner et ce malgré la présence des autres acides aminés de part et d'autre du lien covalent. De plus, des diastéréoisomères sont potentiellement formés au vu des différentes jonctions de cycles possibles. Les structures exactes des liaisons à l'origine des additions de Michael ne sont donc pas attendues identiques dans le cas de la tyrosine libre et de systèmes plus proches de l'échelle protéique. Il est possible que les isomères de bi-tyrosine impliquent l'addition du carboxylate comme il est probable que seule l'amine soit à l'origine de la seconde addition et que des diastéréoisomères expliquent la présence de deux pics chromatographiques. C'est ainsi que l'étude à l'échelle de l'acide aminé atteint ses limites : elle aura permis de mettre en évidence la nouvelle famille de dimères et d'avancer dans la compréhension des mécanismes mais elle ne permet pas de rendre compte de ce qu'il se passe à l'échelle de peptides.

Aussi, contrairement au cas de la tyrosine libre, des intermédiaires ont été mis en évidence dans ce chapitre : cela montre que la cinétique d'évolution des structures dimériques est plus lente. Il est alors proposé que les azotes des fonctions amine libres s'additionnent plus rapidement que leurs homologues des liaisons amides/peptidiques. Cette hypothèse semble raisonnable étant donné l'absence d'encombrement stérique pour la tyrosine libre.

Dans le cadre de la dimérisation du peptide KTSLY, la comparaison effectuée entre  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$  permet de revenir sur le rendement de formation de l'isomère *iso*, qui à l'échelle de l'acide aminé, semblait se comporter différemment des autres dimères et ne pas se former davantage avec la dose (IV.1.4). Dans le cadre du peptide, l'intensité ionique absolue de l'*iso* augmente entre une oxydation avec  $\cdot\text{OH}$  ou  $\text{N}_3\cdot$  (Figure 69) mais son augmentation semble moindre comparée à celle des autres dimères. Les hypothèses de sa consommation pour former d'autres espèces ou du biais apporté par la détection en masse restent valables. Une étude de l'effet de dose par une détection orthogonale comme l'absorption UV-visible permettrait de s'affranchir de ce potentiel biais. Toutefois, seul l'isomère attribué à l'*ortho-ortho* possède un signal assez intense à 285 nm pour être détecté.

La cyclisation induite par ces réactions de Michael amène à s'interroger sur les modifications structurales qui en découlent. Ici, les peptides sont peu structurés car longs de six acides aminés au maximum mais sont-ils de bons modèles de ce qu'il advient à l'échelle d'une protéine ? Qu'en est-il pour des peptides plus longs ? Moins flexibles ? L'étude de la dimérisation d'un peptide de douze acides aminés (EFLRIMKKTSLY, non présenté) a également montré que plusieurs dimères MAD étaient formés. Des peptides d'une séquence croissante jusqu'à celle de la centrine 2 entière pourraient être considérés. Aussi, la nature des acides aminés à proximité de la tyrosine a-t-elle son importance ? Par exemple, les prolines sont souvent associées à la formation de coudes dans les protéines et donc à l'augmentation des contraintes stériques. Si la séquence du peptide contient une ou plusieurs prolines, qu'advient-il de la faisabilité des cycloadditions ? La contrainte stérique induite par certains résidus ou par la séquence 3D peut-elle limiter la diversité des isomères formés ? Il serait intéressant de confronter le nombre de dimères de tyrosine détectés avec l'analyse en dichroïsme circulaire des peptides considérés. Dans le cadre de peptides plus longs pour lesquels un arrangement 3D se précise, est-il possible d'imaginer que d'autres résidus porteurs d'une fonction amine libre et proches spatialement de la liaison dimérique formée soient capables de s'ajouter ? L'analyse des spectres de fragmentation MS/MS devrait permettre d'évincer ou non cette hypothèse pour des peptides courts et l'analyse de la digestion trypsique également dans le cadre de peptides plus longs ou de protéines. L'étape suivante dans l'étude des dimères d'acides aminés aromatiques s'effectue à l'échelle de protéines entières. Les mêmes phénomènes seront-ils observés quant à la diversité des dimères formés ? Le chapitre VI tentera de répondre à cette interrogation.



## VI. DIMERISATION OXYDATIVE AU SEIN DE PROTEINES ISOLEES

Trois protéines seront étudiées. Elles ont été présentées en détails dans le chapitre III. Dans un premier temps, c'est la centrine 2 humaine (CEN2) qui possède une unique tyrosine en position C-terminale qui fera l'objet de cette étude. Ensuite, une protéine dont la séquence contient deux tyrosines sera considérée, il s'agit de la calmoduline (CaM). Enfin, le comportement de dimérisation d'une protéine qui possède une tyrosine ainsi que trois résidus tryptophane sera examinée : celui de la XPC3 (127 derniers acides aminés de la *Xeroderma Pigmentosum group C protein*). Leurs séquences respectives sont rappelées en Figure 81.

CEN2	10	20	30	40	50	60	70
	MASNFKKANM	ASSSQKRMS	PKPELTTEEQK	QEIREAFDLF	DADGTGTIDV	KELKVAMRAL	GFEPKKEEIK
	80	90	100	110	120	130	140
	KMISEIDKEG	TGKMNFDFL	TVMTQKMSEK	DTKEEILKAF	KLFDDDETGK	ISFKNLKRVA	KELGENLTDE
	150	160	170				
	ELQEMIDEAD	RDGDGEVSEQ	EFLRIMKKTS	LY			
CaM	10	20	30	40	50	60	70
	MADQLTEEQI	AEFKAEFSLF	DKDGDGTITT	KELGTVMRSL	GQNPTEAELQ	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL
	80	90	100	110	120	130	140
	TMMARKMKDT	DSEEEIREAF	RVFDKDGNGY	ISAAELRHVM	TNLGEKLTDE	EVDEMIREAD	IDGDGQVNYE
	EFVQMMTAK						
XPC3	820	830	840	850	860	870	880
	MEEFKDV	LLTAWENEQA	VIERKEKEKK	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE	AAAPHTDAGG
	890	900	910	920	930	940	
	GLSSDEEEGT	SSQAEAARIL	AASWPQNRD	EEKQKLKGGP	KTKREKKA	ASHLFPPEQL	

Figure 81: Séquences de la centrine 2, la calmoduline et la XPC3. La numérotation de la séquence de XPC3 débute à l'acide aminé <sup>815</sup>E sur la base de la séquence de la XPC entière. Une méthionine supplémentaire est présente en début de séquence, elle est nécessaire à la production de la protéine. Les tyrosines sont indiquées en rouge et les tryptophanes en bleu.

### VI.1. Centrine 2 humaine

La centrine 2 humaine et plus particulièrement sa dimérisation sont au cœur du projet d'étude faisant l'objet de cette thèse. La centrine 2 humaine dans son entièreté ainsi qu'une forme tronquée (centrine 2 humaine  $\Delta 25$ ) ont été utilisées. L'intérêt de travailler avec cette forme tronquée est de s'affranchir des 25 premiers acides aminés qui possèdent une tendance à s'auto-assembler (*Tourbez et al., 2004*). Bien que dépourvue des 25 premiers acides aminés de la séquence, il a précédemment été montré que cela n'affecte en rien son comportement de dimérisation (*Blouquit et al., 2007*). La



considération de l'une ou l'autre des séquences a été fonction des productions protéiques générées par nos collaborateurs.

La centrine 2 humaine  $\Delta 25$  a été irradiée à différentes doses en présence des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$  et analysée à travers plusieurs techniques analytiques complémentaires. Une première approche a été la réalisation de gels d'électrophorèse SDS-PAGE. Un exemple de gel est présenté en Figure 82.

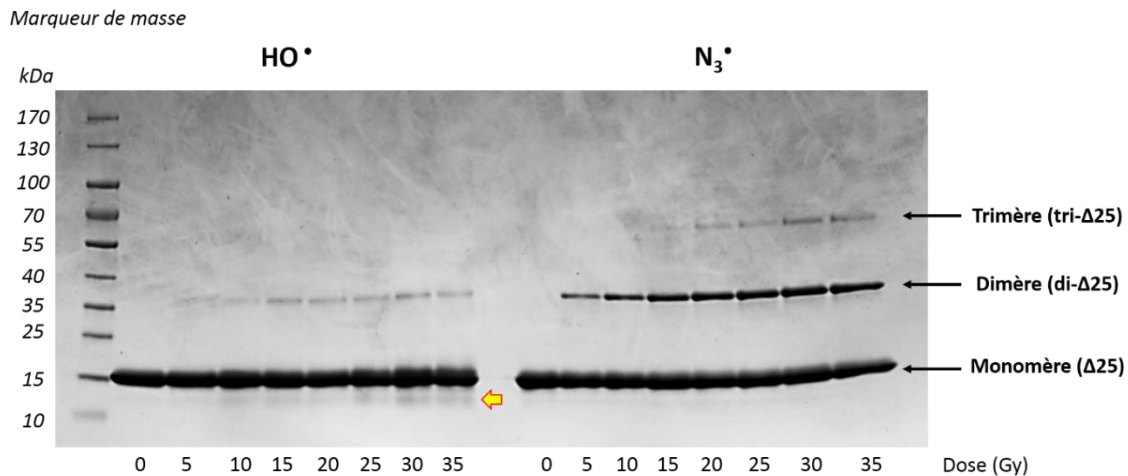


Figure 82: Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la centrine 2 humaine  $\Delta 25$  irradiée entre 0 et 35 Gy sous  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$ .

Sur la partie gauche est visible l'effet de dose en présence de  $\cdot\text{OH}$ , directement comparable à l'effet de dose en présence de  $\text{N}_3\cdot$  sur la partie droite du gel. La protéine non modifiée, à l'état de monomère migre légèrement au-dessus de 15 kDa. Dans le cas du radical  $\text{HO}\cdot$ , l'irradiation engendre la formation d'espèces de plus haut poids moléculaire (di- $\Delta 25$ , vers 37 kDa) dont la nature a précédemment été confirmé par spectrométrie de masse (Blouquit et al., 2007). De plus, une bande d'un poids moléculaire légèrement plus faible que celui de la protéine (indiquée par une flèche jaune sur le gel) apparaît avec la dose, pouvant correspondre à une fragmentation de la protéine ou à une oxydation. En comparant les bandes du monomère entre 0 et 35 Gy, elles semblent devenir de plus en plus diffuses, ce qui indique l'existence d'espèces oxydées. Les radicaux hydroxyle sont susceptibles d'induire des oxydations sur l'ensemble des acides aminés de la séquence, créant ainsi des potentielles espèces oxydées qui migreraient similairement au monomère non modifié puisque la différence de poids moléculaire est trop minime pour permettre une séparation. Dans le cas des radicaux azote, les oxydations induites sont exclusivement la formation de dimères (di- $\Delta 25$ , vers 37 kDa) et de trimères (tri- $\Delta 25$ , entre 55 et 70 kDa) qui apparaissent respectivement vers 5 et 15 Gy. L'intensité des bandes pour chacun des puits a été mesurée à l'aide du logiciel *ImageJ*. En considérant que toutes les bandes observées correspondent à 100% des protéines déposées, il est possible d'estimer la quantité de dimères formée en fonction de la concentration en radical oxydant. La Figure 83 montre une

augmentation linéaire de la production du dimère de centrine 2  $\Delta 25$  sous  $N_3^{\bullet}$  jusqu'à  $5.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en radicaux produits par radiolyse, qui équivalent à 10 Gy. La pente issue de la régression effectuée est de  $0.44 \pm 0.02$ , ce qui signifie que dans la gamme de dose de 0 à 10 Gy, la dimérisation est quasi stœchiométrique ( $\approx 90\%$ ). Au-delà de 10 Gy, une diminution de la pente de formation du dimère est observée, en accord avec la formation de trimères à cette même concentration. Pour une même dose de 40 Gy ( $22.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de radicaux), qui est la dose la plus utilisée pour l'analyse approfondie de la dimérisation, les concentrations attendues en dimères sont donc de l'ordre de 1 à  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pour mener à bien l'étude de la dimérisation à l'échelle de la protéine, l'approche analytique a donc été de travailler sur le mélange contenant à la fois la protéine intacte et ses produits d'oxydation suite à une irradiation gamma.

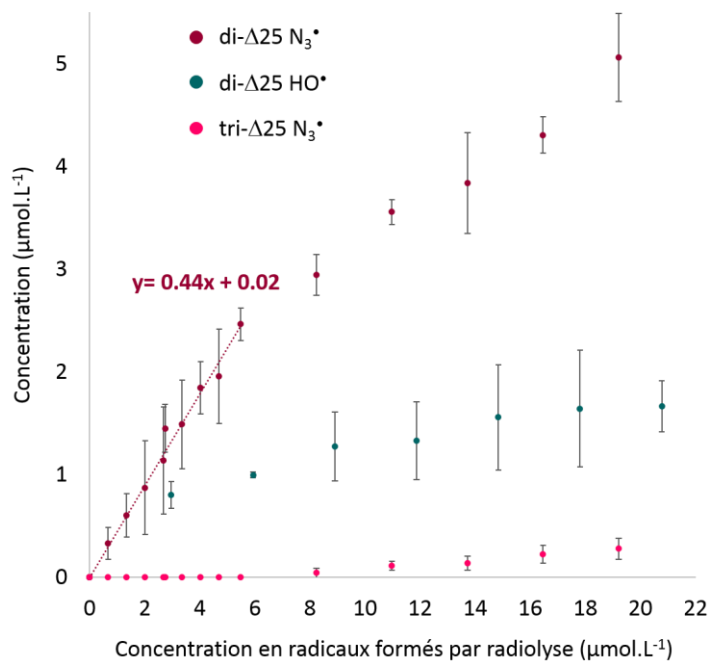


Figure 83: Evolution des concentrations en dimères et trimères de la centrine 2  $\Delta 25$  en fonction de la concentration en radical oxydant ( $^{\bullet}\text{OH}$ ,  $N_3^{\bullet}$ ) produit par radiolyse. Chaque point est la moyenne de trois analyses indépendantes provenant de trois gels différents.

Les spectres d'émission de fluorescence de centrine 2 irradiée à 0 et 48 Gy en présence de  $N_3^{\bullet}$  ont été enregistrés ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) et sont présentés en Figure 84. A 0 Gy, aucun signal n'est détecté alors qu'à 48 Gy, une émission est détectée avec un maximum à environ 405 nm, longueur d'onde caractéristique de l'émission de fluorescence de bi-tyrosine. La formation de dimère de centrine 2 *via* le résidu tyrosine est mise en évidence par le biais de la fluorescence.

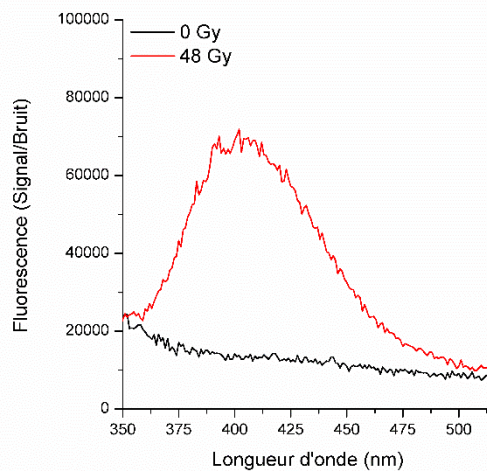


Figure 84: Spectres d'émission de fluorescence de la centrine 2 humaine irradiée à 0 et 48 Gy en présence de  $N_3^*$ . Concentration :  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de tampon phosphate à pH 7 et  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaN}_3$ .

Dans l'objectif de caractériser plus précisément la dimérisation de la centrine 2, une digestion enzymatique de la protéine a été effectuée dans le but d'obtenir des peptides de poids moléculaire adapté à une séparation sur une colonne C18, comme celle utilisée pour l'étude des peptides et acides aminés. Des expériences d'UPLC-MS et d'UPLC-MS/MS ont été réalisées sur le mélange de peptides résultant. Au même titre que cela a été précisé pour le peptide KTSLY en V.2.1, différentes conditions de séparation chromatographique et de détection en spectrométrie de masse seront susceptibles d'être présentées. La séquence de la centrine 2 humaine et de sa forme tronquée  $\Delta 25$  sont rappelées en Figure 85 (a). Pour rappel, une seule tyrosine est présente dans la séquence et il se trouve que c'est le résidu C-terminal. L'enzyme choisie pour mener à bien la digestion est la trypsine, qui clive les protéines au niveau des résidus lysine (K) et arginine (R). Ainsi, deux fragments tryptiques contenant la tyrosine terminale sont attendus : TSLY (169-172) et KTSLY (168-172). Les digestions tryptiques de la centrine 2 humaine (entière ou  $\Delta 25$ ) ont été réalisées avec différents gradients d'élution, certains permettant de confirmer le recouvrement de séquence et d'autres ayant été adaptés à l'étude de la formation de dimères. Le chromatogramme ionique total d'un exemple de digestion de la centrine 2  $\Delta 25$  non irradiée est ici présenté en Figure 85 (b). Dans ce cas, le gradient utilisé est tel qu'il permet de rendre compte du recouvrement de séquence.

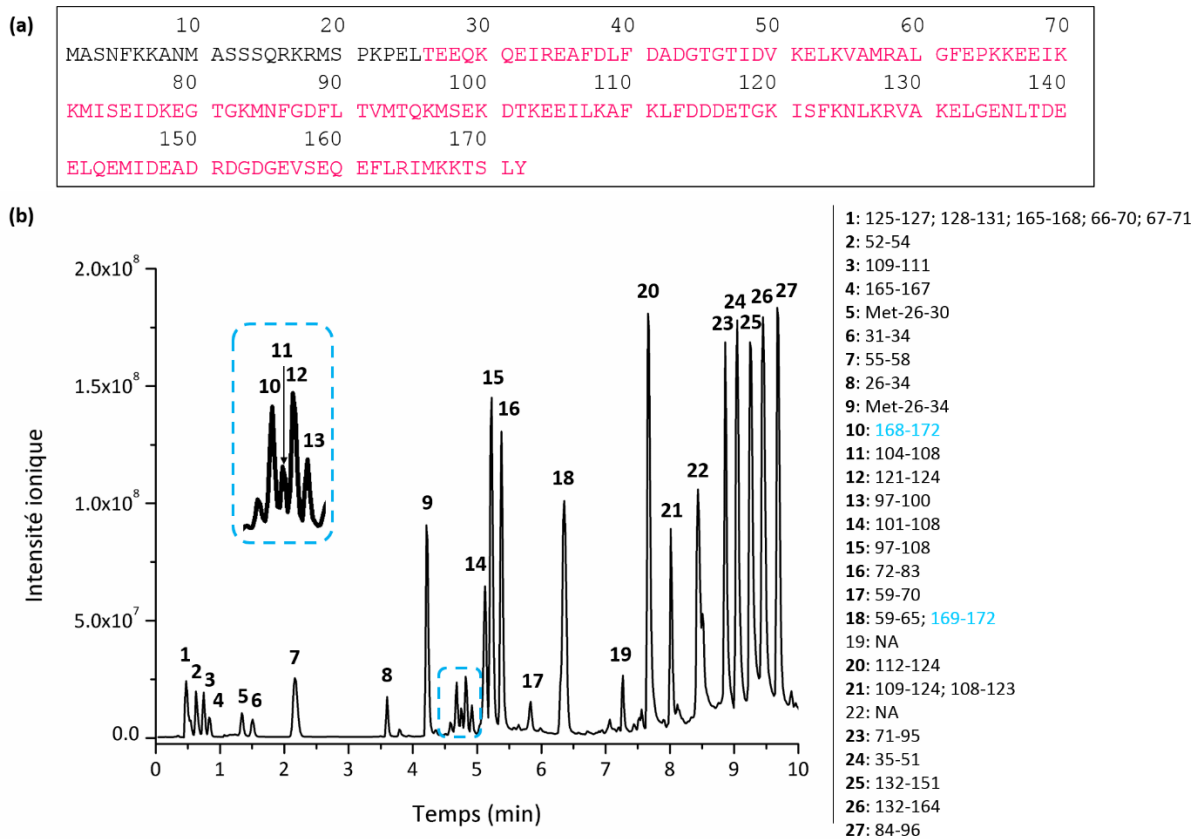


Figure 85 : (a) Séquence de la centrine 2 humaine. Celle de la  $\Delta 25$  est indiquée en rose. (b) Chromatogramme ionique total de la digestion tryptique de la centrine 2 humaine  $\Delta 25$  non irradiée. Gradient chromatographique n°8 (Tableau 38). Chaque pic chromatographique est numéroté et attribué à un fragment issu de la digestion à l'exception des pics n°19 et 22 qui ne sont pas attribués. NA : non attribué. L'insert en pointillés bleus correspond au zoom de la zone contenant le peptide KTSLY. L'intensité ionique est indiquée en valeur absolue.

Une trentaine de pics chromatographiques est décelée : les plus intenses d'entre eux ont été numérotés de 1 à 27 et attribués pour la plupart à des fragments de la centrine 2 humaine  $\Delta 25$  sur la base de leurs spectres de masse (non présentés ici) et en s'appuyant sur une prédiction des peptides attendus *via* le logiciel *ProteinProspector*. La numérotation des peptides issus de la digestion débute à l'acide aminé n°26, permettant de conserver les mêmes numéros d'acides aminés que pour la centrine 2 humaine totale. Bien que deux pics (n°19 et 22) chromatographiques n'aient pas pu être reliés à un fragment tryptique de la centrine 2, la totalité de la séquence est couverte par les peptides détectés. Le Tableau 16 rassemble les fragments tryptiques détectés, leurs  $m/z$  théoriques, leurs  $m/z$  expérimentaux et leur temps de rétention. Les peptides attendus contenant la tyrosine terminale sont effectivement détectés: TSLY et KTSLY. Il est à noter que l'un de ces peptides a été étudié dans le paragraphe V.2.1 et constitue donc un modèle de choix et va permettre une comparaison des espèces formées aux différentes échelles que constituent le peptide et la protéine.

	10	20	30	40	50	60	70
	MASNFKKANM	ASSSQKRMS	PKPELTEEQK	QEIREAFDLF	DADGTGTIDV	KELKVAMRAL	GFEPKKEEIK
	80	90	100	110	120	130	140
	KMISEIDKEG	TGKMNFGDFL	TVMTQKMSEK	DTKEEILKAF	KLFDDDETGK	ISFKNLKRVA	KELGENLTDE
	150	160	170				
	ELQEMIDEAD	RDGDGEVSEQ	EFLRIMKKTS	LY			

Peptide tryptique	Clivage manquant	m/z théorique	m/z expérimental	TR (min)	N° pic LC
<b>Met-26-30</b>	0	383.1760 <sup>2+</sup>	383.182 <sup>2+</sup>	1.34	5
<b>26-34</b>	1	1160.5906 <sup>+</sup>	1160.633 <sup>+</sup>	3.60	8
<b>Met-26-34</b>	1	1291.6311 <sup>+</sup>	1291.683 <sup>+</sup>	4.21	9
<b>31-34</b>	0	545.3042 <sup>+</sup>	545.313 <sup>+</sup>	1.50	6
<b>35-51</b>	0	907.4282 <sup>2+</sup>	907.433 <sup>2+</sup>	9.05	24
<b>52-54</b>	0	389.2395 <sup>+</sup>	389.241 <sup>+</sup>	0.63	2
<b>55-58</b>	0	476.2650 <sup>+</sup>	476.267 <sup>+</sup>	2.16	7
<b>59-65</b>	0	761.4192 <sup>+</sup>	761.423 <sup>+</sup>	6.36	18
<b>59-70</b>	2	1388.7784 <sup>+</sup>	1388.790 <sup>+</sup>	5.83	17
<b>66-70, 67-71</b>	1	323.6921 <sup>2+</sup>	323.699 <sup>2+</sup>	0.54	1
		646.3770 <sup>+</sup>	646.404 <sup>+</sup>		
<b>71-95</b>		1410.6845 <sup>2+</sup>	1410.732 <sup>2+</sup>	8.86	23
		940.7921 <sup>3+</sup>	940.829 <sup>3+</sup>		
<b>72-83</b>	1	654.3292 <sup>2+</sup>	654.331 <sup>2+</sup>	5.38	16
<b>72-96</b>	2	705.8459 <sup>4+</sup>	705.869 <sup>4+</sup>	8.96	
<b>84-96</b>	0	766.3678 <sup>2+</sup>	766.372 <sup>2+</sup>	9.69	27
<b>85-100</b>	2	620.9841 <sup>3+</sup>	621.001 <sup>3+</sup>	8.01	21
		465.9899 <sup>4+</sup>	466.010 <sup>4+</sup>		
<b>97-100</b>	0	494.2279 <sup>+</sup>	494.244 <sup>+</sup>	4.92	13
<b>97-108</b>	2	1450.7458 <sup>+</sup>	1450.805 <sup>+</sup>	5.22	15
<b>101-108</b>	1	488.2715 <sup>2+</sup>	488.273 <sup>2+</sup>	5.11	14
<b>104-108</b>	0	631.3661 <sup>+</sup>	631.369 <sup>+</sup>	4.75	11
<b>109-111</b>	0	365.2183 <sup>+</sup>	365.225 <sup>+</sup>	0.74	3
<b>112-124</b>	1	757.8723 <sup>2+</sup>	757.873 <sup>2+</sup>	7.68	20
<b>121-124</b>	0	494.2973 <sup>+</sup>	494.303 <sup>+</sup>	4.92	12
<b>125-127</b>	0	374.2398 <sup>+</sup>	374.243 <sup>+</sup>	0.49	1
<b>128-131</b>	1	473.3194 <sup>+</sup>	473.326 <sup>+</sup>	0.49	1
<b>132-151</b>	0	1175.0236 <sup>2+</sup>	1175.016 <sup>2+</sup>	9.32	25
<b>132-164</b>	1	1905.8422 <sup>2+</sup>	1905.846 <sup>2+</sup>	9.45	26
<b>165-167</b>	0	391.2374 <sup>+</sup>	391.243 <sup>+</sup>	0.83	4
<b>165-168</b>	1	519.3323 <sup>+</sup>	519.341 <sup>+</sup>	0.47	1
<b>168-172</b>	1	611.3399 <sup>+</sup>	611.341 <sup>+</sup>	4.68	10
<b>169-172</b>	0	483.2449 <sup>+</sup>	483.249 <sup>+</sup>	6.39	18

Tableau 16: Peptides tryptiques issus de la digestion de la centrine 2 humaine Δ25.

Le mélange protéique issu de la digestion de la centrine 2 humaine (ou de sa forme tronquée  $\Delta 25$ ) irradiée à 40 Gy en présence de  $N_3^*$  a été analysé par UPLC-MS. Les chromatogrammes ioniques totaux sont présentés en Figure 86 avec un gradient mis au point pour la séparation optimale des dimères du peptide synthétique KTSLY. Il est important de noter qu'aucune différence n'est décelable sur ces chromatogrammes ioniques totaux entre les cas de la protéine oxydée suite à une irradiation à 40 Gy et la protéine intacte (0 Gy).

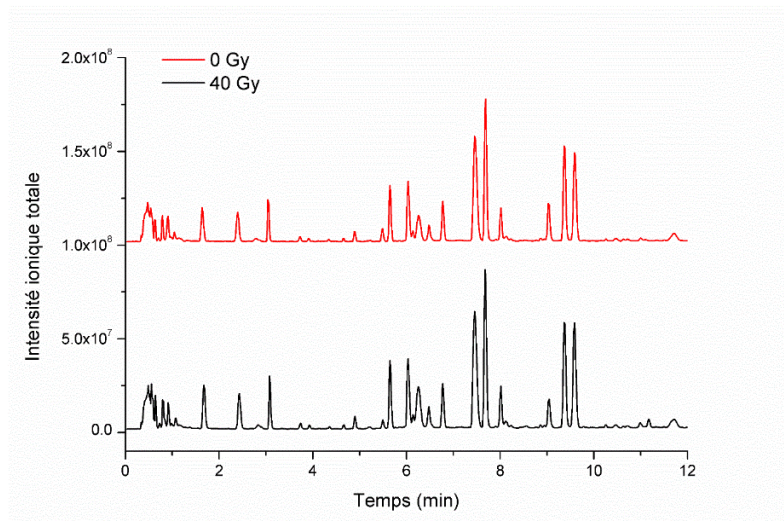


Figure 86: Chromatogrammes ioniques totaux de la digestion trypsique de la centrine 2 irradiée à 0 ou 40 Gy sous  $N_3^*$ . Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Gradient chromatographique n°9 (Tableau 38).

Il est en effet indispensable d'utiliser les chromatogrammes ioniques extraits à un  $m/z$  précis au vu de la faible quantité de dimère formé au sein du digestat trypsique. Les chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$   $610.85 \pm 0.05$  ( $[M+2H+1]^{2+}$  du dimère de KTSLY) et (b)  $m/z$   $407.22 \pm 0.05$  ( $[M+3H]^{3+}$  du dimère de KTSLY) sont présentés en Figure 87.

## Dimères de KTSLY dans la digestion protéique

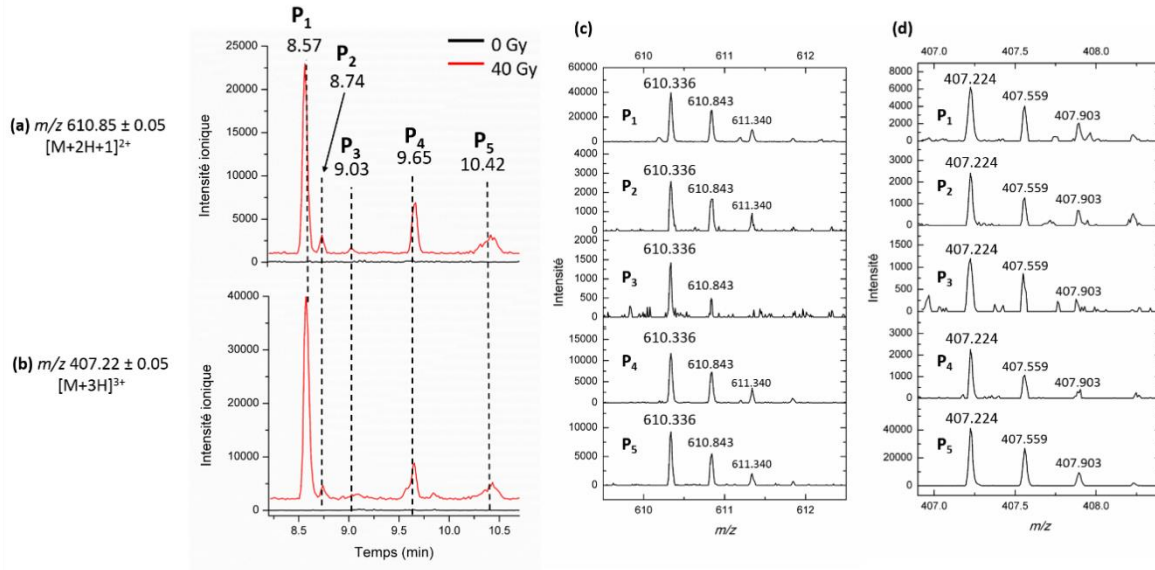


Figure 87: Dimères de KTSLY dans la digestion trypsique de la centrine 2 humaine irradiée à 0 et 40 Gy sous N<sub>3</sub>\*. (a,b) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  (a) 610.85  $\pm$  0.05; (b) 407.22  $\pm$  0.05. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Gradient chromatographique n°9 (Tableau 38). (c,d) Spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub> centrés en (c)  $m/z$  610.35 et (d)  $m/z$  407.22. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Cinq pics chromatographiques (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>) y sont détectés, aux mêmes temps de rétention pour les deux états de charge considérés. Les spectres de masse correspondants centrés en (c)  $m/z$  610.35 et (d)  $m/z$  407.22 sont exposés en Figure 87 et confirment leur attribution à des dimères de KTSLY. A l'échelle de la protéine, cinq dimères de KTSLY sont de fait formés. Les profils chromatographiques étant très similaires à ceux observés dans le cadre de l'étude du peptide synthétique KTSLY (Figure 69), cela appuie leur très probable attribution à des dimères liés par les résidus tyrosine. Dans le cadre de l'étude de la dimérisation à l'échelle de la protéine, le fragment trypsique TSLY et par conséquent ses dimères sont bien plus intenses (environ trente fois) que ceux observés pour KTSLY. En effet, cela s'explique par l'action de la trypsine qui clive après les lysines. La présence de KTSLY est en fait due à un clivage manquant. Ainsi, bien que les dimères du fragment KTSLY aient permis de comparer le processus de dimérisation avec le cas du peptide synthétique, ce sont les dimères de TSLY qui seront considérés par la suite de l'étude. En Figure 88 sont présentés les chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$  482.75  $\pm$  0.05  $[M+2H+1]^{2+}$  du dimère de TSLY). Pour les dimères de TSLY, aucun peptide synthétique de la même séquence n'ayant été considéré, leur attribution à l'*ortho-ortho*, l'*ortho-iso* et aux dimères issus de l'*ortho-para* est moins directe que celle des dimères de KTSLY.



## Dimères de TSLY dans la digestion protéique

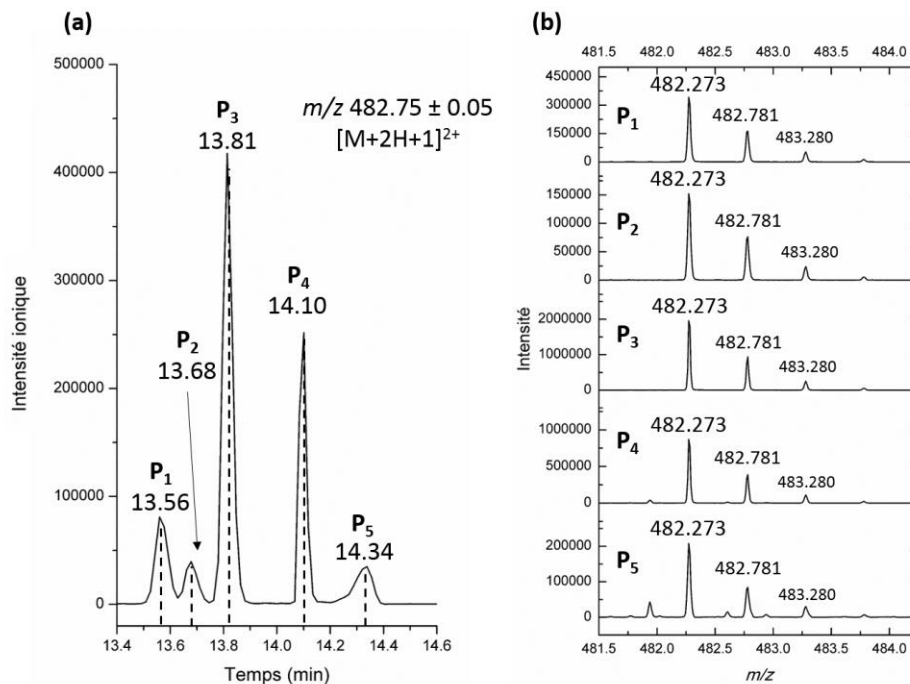


Figure 88: Dimères de TSLY dans la digestion tryptique de la centrine 2 humaine irradiée à 40 Gy sous  $N_3^*$ . (a) Chromatogrammes ioniques extraits  $m/z 482.75 \pm 0.05$ . Gradient chromatographique n°10 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics  $P_1$  à  $P_5$  issus de l'extraction à  $m/z 482.75 \pm 0.05$ , centrés en  $m/z 482.78$ . Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Pour TSLY comme pour KTSLY, cinq pics chromatographiques sont identifiés. Ici, les temps de rétention des espèces dimériques sont plus importants que pour les dimères de KTSLY. L'absence de la lysine rend plus hydrophobe le peptide et donc ses dimères. Les spectres de masse des pics extraits à  $m/z 482.75 \pm 0.05$ , nommés  $P_1$  à  $P_5$  sont exposés en Figure 88 (b), confirmant leur attribution à des dimères de TSLY. Lors de l'étude du peptide KTSLY synthétique, il est apparu que les échantillons étaient sensibles aux conditions de conservation : certaines espèces ont été identifiées comme des intermédiaires réactionnels. Dans le cas de la protéine, l'étape de digestion s'effectuant à 37°C pendant 4 heures, il n'est en toute rigueur pas possible d'obtenir les conditions dites « T0 » qui correspondraient jusqu'alors à une congélation à -20°C immédiatement après irradiation. Pour autant, la digestion tryptique a pu être opérée soit directement après l'oxydation soit après une évolution préalable de 48 heures à 37°C. Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z 482.75 \pm 0.05$  dans les deux conditions précédemment explicitées sont présentés en Figure 89.



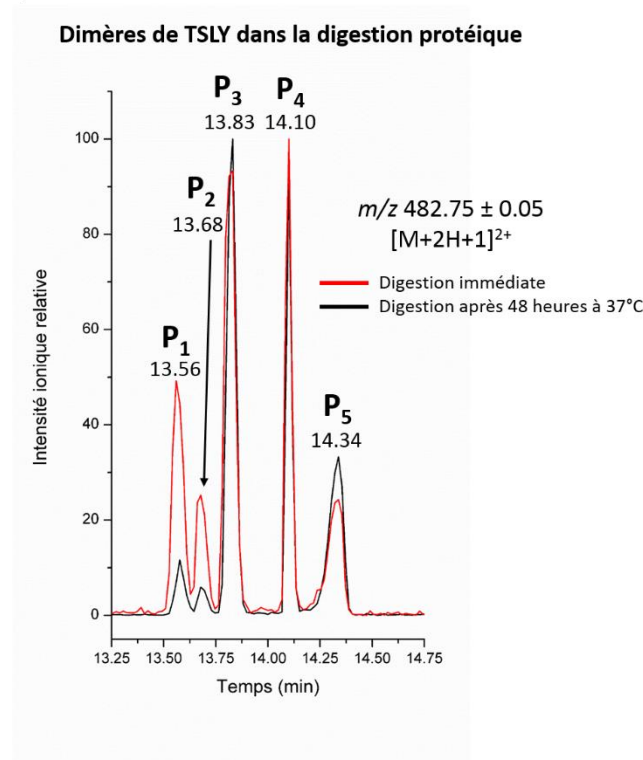


Figure 89: Dimères de TSLY dans la digestion de la centrine 2 humaine irradiée à 40 Gy sous N<sub>3</sub>\*. Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z\ 482.75 \pm 0.05$  pour une digestion réalisée immédiatement après irradiation (T0) ou après 48 heures à 37°C (T48). L'intensité ionique est indiquée en pourcentage relatif par rapport au pic le plus intense. Gradient chromatographique n°10 (Tableau 38).

Dans le cas d'une digestion immédiate, les cinq pics chromatographiques (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>) détectés sont ceux ayant déjà été décrits dans la Figure 87. Ils y sont ici comparés au cas où l'incubation à 37°C de l'échantillon est effectuée en amont de la digestion : les pics P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> y voient leur intensité relative diminuer alors que celle du pic P<sub>5</sub> augmente. Cette observation est en totale adéquation avec ce qui a pu être constaté lors de l'étude du peptide KTSLY synthétique : deux dimères (ici P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>) semblent disparaître au fur et à mesure de l'évolution à 37°C au profit de la croissance d'un autre dimère, P<sub>5</sub>. Contrairement au cas du peptide isolé pour lequel des réelles conditions « T0 » ont pu être appliquées, ici le pic P<sub>5</sub> est déjà apparent puisque l'étape de digestion induit malgré elle une évolution des espèces simultanément au clivage. Toutefois, même à l'échelle d'une protéine de 172 acides aminés, les mêmes isomères de dimères sont mis évidence et par analogie avec les résultats obtenus sur le peptide synthétique KTSLY, certains dimères évoluent à travers des réactions additions de Michael. Il est à noter que le processus de cyclisation semble très lent : la double cycloaddition s'exécuterait en plus de 48 heures puisqu'ici, les intermédiaires P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> y sont toujours visibles. Le processus de cyclisation semble donc plus lent au sein de la protéine entière qu'au sein du peptide isolé mais la présence de la séquence protéique ne semble pas induire de changement des dimères formés.

Les conditions d'UPLC-MS de la Figure 88 ayant permis d'obtenir un chromatogramme ionique extrait avec un excellent rapport signal/bruit pour l'extraction effectuée à  $m/z$   $482.75 \pm 0.05$ , c'est ce  $m/z$  qui a été choisi pour les expériences de fragmentation (MS/MS) afin de certifier qu'un pont tyrosine-tyrosine est à l'origine des cinq dimères. L'énergie de collision a ici été fixée à 30 eV pour un  $m/z$  sélectionné de  $482 \pm 1$ . Les spectres de fragmentation résultant sont exposés en Figure 90.

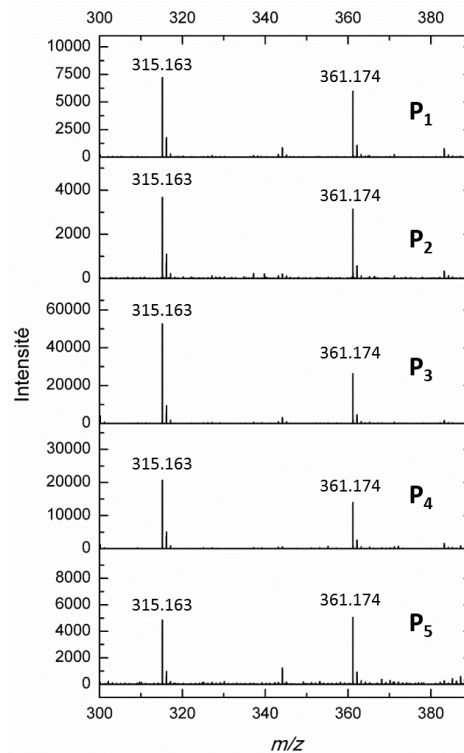


Figure 90: Spectres de fragmentation (MS/MS) des dimères de TSLY (P<sub>1</sub> à P<sub>5</sub>, cf. Figure 88) dans la digestion de la centrine 2 humaine irradiée à 40 Gy sous N<sub>3</sub>\* pour  $m/z$   $482 \pm 1$ . Energie de collision : 30 eV. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue.

Les deux fragments les plus intenses pour chacune des cinq espèces dimériques sont  $m/z$  361.174 et 315.163. Ces derniers se trouvent être des preuves directes de la nature du lien covalent : une bi-tyrosine. En effet, le fragment  $m/z$  361.174 correspond à une double fragmentation de type  $y$  d'un côté et de l'autre du lien covalent (*pseudo-y*) aboutissant à la formation de bi-tyrosine « isolée », toutes les liaisons peptidiques ayant été fragmentées (Tableau 10 en V.2.1.3). L'énergie de collision étant ici plus importante que celle utilisée pour la fragmentation des dimères du peptide KTSLY synthétique (Figure 70), le fragment  $m/z$  315.163  $y$  est plus intense et correspond à une perte de 46 (-[H<sub>2</sub>O+CO]) du fragment à  $m/z$  361.174. Ainsi, à l'échelle de la protéine, suite à une digestion enzymatique et sans aucune séparation préliminaire du mélange complexe protéique, il a pu être confirmé que cinq dimères sont formés et qu'ils sont tous des isomères de bi-tyrosine.

Ainsi, en considérant les intensités, les formes des pics  $P_1$  à  $P_5$  par analogie avec ceux de KTSLY et suite à l'évolution des espèces en amont de la digestion trypsique, il peut être proposé que  $P_3$ , le plus intense soit l'*ortho-ortho*, que  $P_4$ , le second plus intense qui élué après l'*ortho-ortho* soit l'*ortho-iso*. Ensuite, les pics  $P_1$  et  $P_2$  semblent être des intermédiaires de la famille MAD, qui dans ce cas sont élués en amont de l'*ortho-ortho*, le % d'acide formique étant différent. Enfin,  $P_5$ , le pic le plus large et qui élué en dernier semble être un dimère MAD doublement cycloadditionné issu de l'*ortho-para*.

Bien qu'il ait été montré dans le cadre de l'étude de sa dimérisation que les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$  forment les mêmes espèces, l'influence du radical  $\cdot\text{OH}$  a également été interrogée à l'échelle de la protéine, à travers la dimérisation du fragment TSLY. Comme le montrent les chromatogrammes ioniques extraits pour  $m/z 482.75 \pm 0.05$  exposés en Figure 91, les cinq mêmes espèces dimériques sont détectées pour une oxydation sous  $\text{N}_3\cdot$  et sous  $\cdot\text{OH}$  mais dans des proportions relatives différentes.

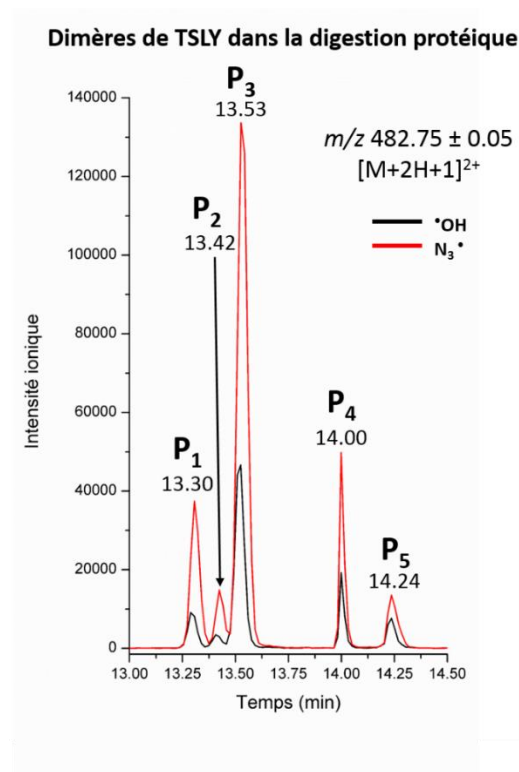


Figure 91: Dimères de TSLY dans la digestion de la centrine 2  $\Delta 25$  irradiée à 40 Gy sous  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$ . Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z 610.35 \pm 0.05$ . T: trimère. Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Gradient chromatographique n°9 (Tableau 38).

Dans le cas de la centrine 2 humaine, cinq isomères de bi-tyrosine sont formés lors d'une oxydation par  $\cdot\text{OH}$  ou  $\text{N}_3\cdot$ . Néanmoins, comme cela a déjà été mentionné, la tyrosine par laquelle ont lieu les pontages est terminale. La centrine 2 humaine est-elle un cas particulier de dimérisation multiple ? La tyrosine est-elle assez accessible et localisée sur une séquence dont la structure est peu ordonnée, ce

qui permet la formation d'une telle diversité de structures ? Pour tenter de répondre à ces questions, la dimérisation par des ponts tyrosine-tyrosine au sein de deux autres protéines va être étudiée.

## VI.2. Calmoduline (CaM)

Dans le but d'étendre l'étude spécifique menée sur la centrine 2 humaine à une autre protéine et d'étudier plus en détails l'impact de la localisation de la tyrosine, le comportement de dimérisation de la calmoduline a été examiné. La calmoduline (CaM) fait partie de la famille des calci-protéines, comme la centrine 2 humaine mais elle possède deux tyrosines dont aucune n'est terminale. La tyrosine <sup>99</sup>Y est située dans une boucle et la tyrosine <sup>138</sup>Y sur l'hélice  $\alpha$  VII (Figure 92 (a)) (Babu et al., 1988). La tyrosine <sup>99</sup>Y pointe vers l'extérieur, elle est exposée au solvant avec lequel elle effectue des liaisons hydrogène (Babu et al., 1988). La tyrosine <sup>138</sup>Y est quant à elle orientée vers l'intérieur de la structure et pointe vers l'hélice  $\alpha$  IV. Un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la calmoduline irradiée à différentes doses jusqu'à 112 Gy est présenté en Figure 92 (b) et révèle la formation d'oligomères. En effet, des bandes dont l'intensité augmente avec la dose sont détectées à des poids moléculaires caractéristiques de dimères ( $\approx$  45 kDa) et trimères ( $\approx$  70 kDa). De manière intéressante, deux bandes différentes correspondent à un poids moléculaire proche de celle du dimère. Cette différence de migration est relativement surprenante de prime abord : même si différents dimères sont formés, ils possèdent la même masse et leur migration est alors attendue sur une même bande. En réalité, comme les protéines sont dénaturées en amont de la migration et de la mise en contact avec le SDS, si des conformères existent, et que leurs géométries sont très différentes, leur migration peut en être modifiée.

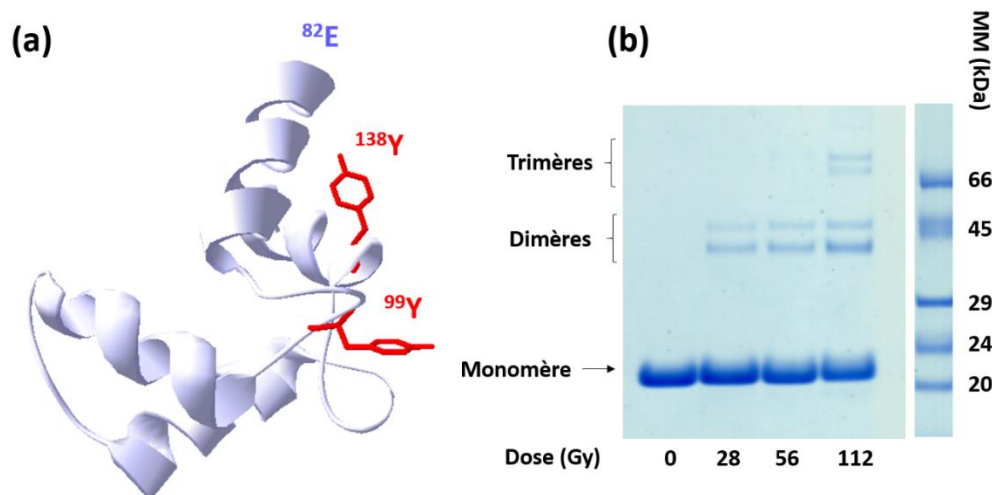


Figure 92: (a) Représentation locale des tyrosines dans la séquence (Babu et al., 1988). Les tyrosines sont représentées en rouge. Les zones non représentées de la séquence ne modifient pas l'accessibilité des tyrosines. (b) Gel SDS-PAGE de la calmoduline irradiée entre 0 et 112 Gy en présence de  $N_3^*$ .

La protéine irradiée a été soumise à une digestion trypsique et les fragments ainsi formés analysés en UPLC-MS. La séquence de la calmoduline est rappelée dans la première ligne du Tableau 17. A l'inverse de ce qui a été observé avec la centrine 2  $\Delta 25$ , la première méthionine est ici absente de la séquence. Dans la séquence présentée, les tyrosines sont ainsi en positions 100 et 139 mais elles seront appelées  $^{99}\text{Y}$  et  $^{138}\text{Y}$  pour la suite de l'étude. La Figure 93 présente le chromatogramme ionique total de la digestion trypsique de la calmoduline non irradiée et le Tableau 17 recense les peptides identifiés. La couverture protéique suite à la digestion enzymatique est de 100%.

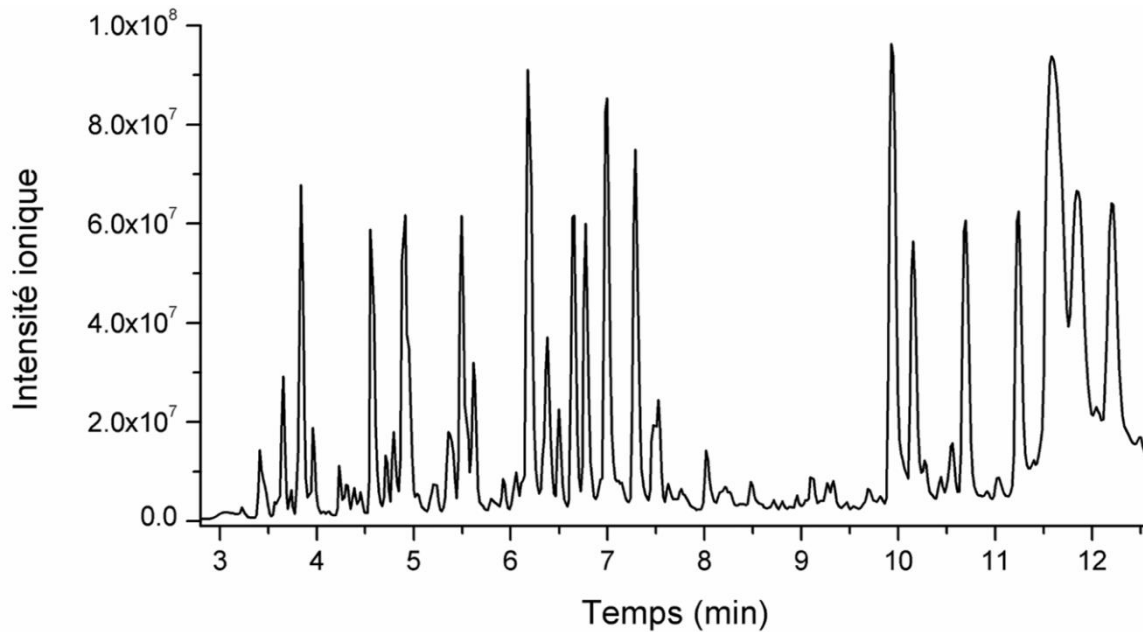


Figure 93: Chromatogramme ionique total de la digestion trypsique de la CaM non irradiée. Gradient chromatographique n°11 (Tableau 38).

	10	20	30	40	50	60	70
	MADQLTEEQI	AEFKEAFSLF	DKDGDGTITT	KELGTVMRSL	GQNPTEAELQ	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL
	80	90	100	110	120	130	140
	TMMARKMKDT	DSEEEIREF	RVFDKDGNGY	ISAAELRHVM	TNLGEKLTDE	EVDEMIREAD	IDGGDQVNYE
	EFVQMMTAK						

Peptide trypsique	Clivage manquant	m/z théorique	m/z expérimental	TR (min)
<b>1-14 (-Met)</b>	0	761.3752 <sup>2+</sup>	761.378 <sup>2+</sup>	6.65
<b>15-22</b>	0	956.4724 <sup>+</sup>	956.478 <sup>+</sup>	7.28
		478.7398 <sup>2+</sup>	478.742 <sup>2+</sup>	
<b>15-31</b>	1	1844.8913 <sup>+</sup>	1844.924 <sup>+</sup>	7.00
		922.9423 <sup>2+</sup>	922.959 <sup>2+</sup>	
		615.6353 <sup>3+</sup>	615.637 <sup>3+</sup>	
<b>23-31</b>	0	907.4367 <sup>+</sup>	907.443 <sup>+</sup>	3.74
		454.2220 <sup>2+</sup>	454.222 <sup>2+</sup>	
<b>32-38</b>	0	805.4326 <sup>+</sup>	805.432 <sup>+</sup>	4.55
		403.2155 <sup>2+</sup>	403.214 <sup>2+</sup>	
<b>39-76</b>	1	1399.9853 <sup>3+</sup>	1399.991 <sup>+</sup>	12.49
		1352.5998 <sup>+</sup>	1352.609 <sup>+</sup>	
<b>77-87</b>	1	676.8036 <sup>2+</sup>	676.807 <sup>2+</sup>	3.96
		451.5381 <sup>3+</sup>	451.537 <sup>3+</sup>	
<b>76-87</b>	2	494.2364 <sup>3+</sup>	494.233 <sup>3+</sup>	3.65
<b>77-91</b>	2	1855.8491 <sup>+</sup>	1855.871 <sup>+</sup>	5.50
		928.4282 <sup>2+</sup>	928.431 <sup>2+</sup>	
<b>88-91</b>	0	522.2671 <sup>+</sup>	522.267 <sup>+</sup>	3.41
<b>92-95</b>	0	508.2766 <sup>+</sup>	508.277 <sup>+</sup>	4.91
<b>92-107</b>	1	1754.8708 <sup>+</sup>	1754.890 <sup>+</sup>	6.17
		877.9390 <sup>2+</sup>	877.942 <sup>2+</sup>	
		585.6284 <sup>3+</sup>	585.632 <sup>3+</sup>	
<b>108-116</b>	0	1028.5193 <sup>+</sup>	1028.527 <sup>+</sup>	3.84
		514.7633 <sup>2+</sup>	514.763 <sup>2+</sup>	
<b>108-127</b>	1	1180.0670 <sup>2+</sup>	1180.082 <sup>2+</sup>	7.29
		787.0471 <sup>3+</sup>	787.054 <sup>3+</sup>	
		590.5372 <sup>4+</sup>	590.543 <sup>4+</sup>	
<b>108-149</b>	2	1610.7345 <sup>3+</sup>	1610.755 <sup>3+</sup>	10.70
		1208.3027 <sup>4+</sup>	1208.321 <sup>4+</sup>	
<b>117-127</b>	0	1329.6253 <sup>+</sup>	1329.641 <sup>+</sup>	6.77
		675.3163 <sup>2+</sup>	675.320 <sup>2+</sup>	
<b>117-149</b>	1	1910.8473 <sup>2+</sup>	1910.883 <sup>2+</sup>	11.24
		1274.2340 <sup>3+</sup>	1274.246 <sup>3+</sup>	
<b>128-149</b>	0	1245.5436 <sup>2+</sup>	1245.567 <sup>2+</sup>	10.15

Tableau 17: Peptides tryptiques issus de la digestion de la calmoduline.

Les tyrosines se trouvent dans des peptides tryptiques de séquence  $^{92}\text{V}$ - $^{107}\text{R}$  pour la  $^{99}\text{Y}$  et  $^{128}\text{E}$ - $^{149}\text{K}$  pour  $^{138}\text{Y}$  respectivement élués à 10.15 et 6.17 minutes. Au sein de la calmoduline, jusqu'à trois types de combinaisons entre les tyrosines sont attendues : deux homodimères  $^{99}\text{Y}$ - $^{99}\text{Y}$  et  $^{138}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$  ainsi qu'un hétérodimère  $^{99}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$ . Le Tableau 18 expose les valeurs théoriques de  $m/z$  attendus pour différents états de charge pour les trois types de dimères. Les valeurs expérimentales de  $m/z$  y sont également présentées.

Type de dimère	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental
$^{99}\text{Y}$ - $^{99}\text{Y}$ (dimère du peptide $^{92}\text{V}$ - $^{107}\text{R}$ )	877.4351 <sup>4+</sup>	877.431 <sup>4+</sup>
	702.1496 <sup>5+</sup>	702.144 <sup>5+</sup>
	585.2925 <sup>6+</sup>	585.286 <sup>6+</sup>
$^{99}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$ (dimère entre les peptides $^{92}\text{V}$ - $^{107}\text{R}$ et $^{128}\text{E}$ - $^{149}\text{K}$ )	1414.6474 <sup>3+</sup>	1414.639 <sup>3+</sup>
	1061.2374 <sup>4+</sup>	1061.233 <sup>4+</sup>
	849.1914 <sup>5+</sup>	849.178 <sup>5+</sup>
$^{138}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$ (dimère du peptide $^{128}\text{E}$ - $^{149}\text{K}$ )	831.6982 <sup>3+</sup>	ND
	623.2754 <sup>4+</sup>	ND
	498.8218 <sup>5+</sup>	ND

Tableau 18: Valeurs des  $m/z$  théoriques attendus pour les trois types de dimères  $^{99}\text{Y}$ - $^{99}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$ ,  $^{138}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$  et des  $m/z$  expérimentaux. ND : non détecté.

Aucun homodimère  $^{138}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$  n'a été détecté. Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $702.14 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$  du dimère  $^{99}\text{Y}$ - $^{99}\text{Y}$ ) et  $m/z$   $849.18 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$  du dimère  $^{99}\text{Y}$ - $^{138}\text{Y}$ ) sont exposés en Figure 94 (a) et (b). A partir du panel (a) de la Figure 94, il est clair qu'au moins six pics chromatographiques correspondent à la masse caractéristique de l'homodimère  $^{99}\text{Y}$ - $^{99}\text{Y}$ , ce qui est confirmé par leurs spectres de masse présentés en Figure 94 (c). Dans le cas de l'hétérodimère, quatre pics chromatographiques sont séparés et leurs spectres de masse, exposés en Figure 94 (d) confirment leur attribution à des hétérodimères.

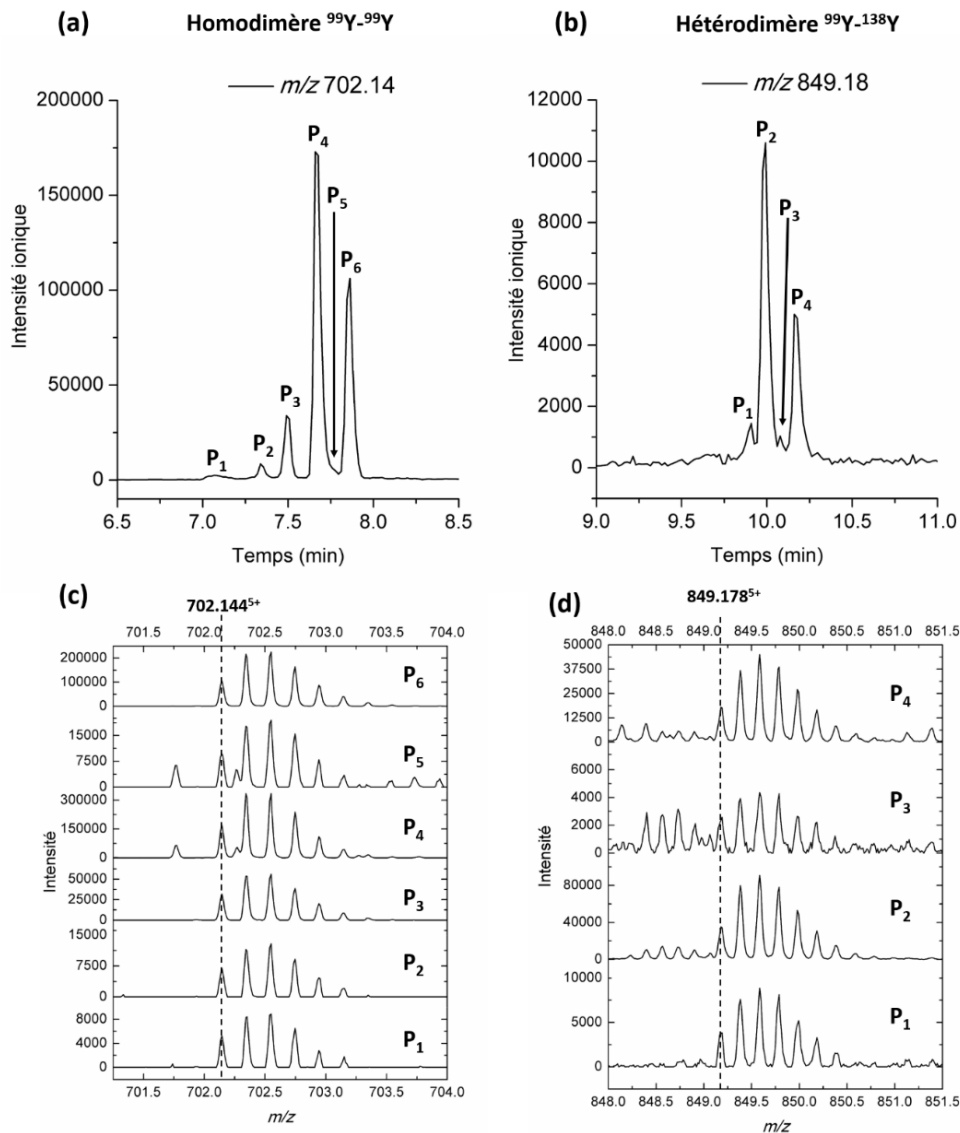


Figure 94: Dimérisation de la calmoduline irradiée à 40 Gy en présence de  $\text{N}_3^*$ . Chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$   $702.14 \pm 0.05$  pour l'homodimère  $^{99}\text{Y}\text{-}^{99}\text{Y}$  et (b)  $m/z$   $849.18 \pm 0.05$  pour l'hétérodimère  $^{99}\text{Y}\text{-}^{138}\text{Y}$ . Gradient chromatographique n°11 (Tableau 38). Spectres de masse des pics extraits aux temps de rétention des homodimères (c) et hétérodimères (d).

Des expériences de MS/MS (énergie de collision : 30 eV) ont été réalisées en fragmentant les dimères respectivement à  $m/z$   $702 \pm 1$  et  $849 \pm 1$ . Les fragments classiques *y* et *b* attendus sont présentés en Figure 95 et leur numérotation s'arrête au résidu tyrosine. En effet, si la tyrosine est impliquée dans la liaison covalente, les fragments *b* et *y* la contenant ne doivent pas être détectés. Les spectres de fragmentation des pics chromatographiques présentant l'intensité ionique la plus importante dans chacun des cas (P<sub>4</sub> pour  $^{99}\text{Y}\text{-}^{99}\text{Y}$  et P<sub>2</sub> pour  $^{99}\text{Y}\text{-}^{138}\text{Y}$ ) ont été exploités et les fragments sont listés dans le Tableau 19.





Figure 95: Fragments y et b des peptides contenant les tyrosines. Peptides issus de la digestion trypsique de la calmoduline.

Fragments <sup>99</sup> Y	m/z théorique	m/z expérimental ( <sup>99</sup> Y- <sup>99</sup> Y)	m/z expérimental ( <sup>99</sup> Y- <sup>138</sup> Y)	Fragments <sup>138</sup> Y	m/z théorique	m/z expérimental ( <sup>99</sup> Y- <sup>138</sup> Y)
y <sub>1</sub>	175.1190	175.132	175.131	y <sub>1</sub>	147.1128	147.127
y <sub>2</sub>	288.2030	288.224	288.231	y <sub>2</sub>	218.1499	218.161
y <sub>3</sub>	417.2456	417.269	417.269	y <sub>3</sub>	319.1976	319.210
y <sub>4</sub>	488.2827	488.309	488.328	y <sub>4</sub>	450.2381	450.269
y <sub>5</sub>	559.3198	559.351	559.362	y <sub>5</sub>	581.2786	581.318
y <sub>6</sub>	646.3519	646.400	646.400	y <sub>6</sub>	709.3371	709.390
y <sub>7</sub>	759.4359	759.489	759.501	y <sub>7</sub>	808.4056	808.464
y <sub>8</sub>	922.4993	ND	ND	y <sub>8</sub>	955.4740	955.494
b <sub>2</sub>	247.1141	247.154	247.140	y <sub>9</sub>	1084.5166	1084.616
b <sub>3</sub>	362.1710	362.154	362.188	y <sub>10</sub>	1213.5592	1213.662
b <sub>4</sub>	490.2660	490.318	ND	y <sub>11</sub>	1376.6225	ND
b <sub>5</sub>	605.2930	605.339	605.329	b <sub>2</sub>	201.0870	201.135
b <sub>6</sub>	662.3144	662.325	662.370	b <sub>3</sub>	316.1139	316.137
b <sub>7</sub>	776.3573	ND	776.414	b <sub>4</sub>	429.1980	429.233
b <sub>8</sub> <sup>2+</sup>	417.1930	ND	417.1930	b <sub>5</sub>	544.2249	544.256
b <sub>9</sub> <sup>2+</sup>	498.7247	ND	ND	b <sub>6</sub>	601.2464	601.275
				b <sub>7</sub>	716.2733	ND
				b <sub>8</sub>	773.2948	ND
				b <sub>9</sub>	901.3534	ND
				b <sub>10</sub>	1000.4218	1000.478
				b <sub>11</sub>	1114.4647	ND
				b <sub>12</sub>	1277.5281	ND

 Tableau 19: Fragments y et b issus des spectres de fragmentation du pic P<sub>4</sub> de l'homodimère <sup>99</sup>Y-<sup>99</sup>Y et du pic P<sub>2</sub> de l'hétérodimère <sup>99</sup>Y-<sup>138</sup>Y de la calmoduline irradiée à 40 Gy en présence de N<sub>3</sub><sup>\*</sup>. ND : non détectés.

Concernant le peptide <sup>92</sup>V-R<sup>107</sup>, qu'il soit impliqué dans un homodimère ou un hétérodimère, tous ses fragments y sont observés jusqu'à y<sub>7</sub> et le fragment y<sub>8</sub> n'est pas détecté : la tyrosine semble donc bien impliquée dans la dimérisation. De même, une majorité des fragments b sont visibles jusqu'au fragment b<sub>6</sub> pour le dimère <sup>99</sup>Y-<sup>99</sup>Y et jusqu'au b<sub>8</sub><sup>2+</sup> pour le peptide <sup>92</sup>V-R<sup>107</sup>. Le fragment b<sub>9</sub><sup>2+</sup> n'est pas détecté et vient confirmer la proposition de l'implication de la tyrosine <sup>99</sup>Y dans la liaison dimérique.

Les fragments  $\gamma$  du peptide  $^{128}\text{E-K}^{149}$  sont détectés jusqu'à  $\gamma_{10}$  et le fragment  $\gamma_{11}$  n'est pas observé. Du côté des fragments  $b$ , ils sont détectés de  $b_2$  à  $b_6$  puis  $b_{10}$  également. Ainsi, même si  $b_{11}$  n'est pas mis en évidence, en combinant ces informations avec celles des fragments  $\gamma$ , la tyrosine  $^{138}\text{Y}$  est proposée comme impliquée dans la formation de l'hétérodimère. En toute rigueur, ces fragmentations devraient être observées pour l'ensemble des pics de dimères mais la faible intensité de certains d'entre eux a rendu difficile leur détection. Néanmoins, au vu des séquences peptidiques impliquées et de l'utilisation du radical azoture, la tyrosine est toujours supposée être le seul acide aminé oxydé. Dans le cadre d'une protéine pour laquelle les tyrosines se trouvent au sein d'une séquence peptidique, le processus de dimérisation implique une diversité des structures formées pour une combinaison de tyrosines donnée. En effet, dans le cadre de la calmoduline, plusieurs isomères de l'homodimère  $^{99}\text{Y-}^{99}\text{Y}$  et de l'hétérodimère  $^{99}\text{Y-}^{138}\text{Y}$  ont été mis en évidence et certains sont susceptibles d'appartenir à la famille MAD qui implique des réarrangements structuraux. Aucun homodimère  $^{138}\text{Y-}^{138}\text{Y}$  n'a été détecté. Cette observation est en accord avec la présence des deux bandes distinctes sur le gel en Figure 92 (b) et pourrait s'expliquer par la position respective des tyrosines dans la structure 3D de la protéine (Figure 92). La  $^{138}\text{Y}$  se situe sur une hélice  $\alpha$  et pointe vers l'intérieur de la structure vers une seconde hélice, ce qui est susceptible de contraindre l'accès et la flexibilité de ce résidu à l'inverse de la  $^{99}\text{Y}$  qui devrait être plus accessible car pointant vers l'extérieur de la boucle, non structurée. Néanmoins, l'hétérodimère  $^{99}\text{Y-}^{138}\text{Y}$  a été mis en évidence mais rien ne prouve qu'il s'agisse réellement d'un dimère ou d'un pontage intramoléculaire au sein d'un monomère. Il a d'ailleurs été montré que des pontages intra- et intermoléculaires peuvent avoir lieu et dans de précédentes études, l'homodimère  $^{138}\text{Y-}^{138}\text{Y}$  n'avait pas non plus été détecté (*Malencik & Anderson, 1994; Balasubramanian & Kanwar, 2002*). Aussi, des expériences de dichroïsme circulaire ont montré une réduction du % d'hélices  $\alpha$  lors de la formation de dimères intra- comme intermoléculaires de calmoduline (*Balasubramanian & Kanwar, 2002*).

### VI.3. XPC3

Le comportement de dimérisation d'une troisième protéine isolée a été étudié. Cette protéine est la XPC3 : elle correspond aux 127 derniers acides aminés de la séquence de la XPC (*Xeroderma Pigmentosum group C protein*), qui en compte 940. A notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à la dimérisation oxydative de la XPC3. Il se trouve que la XPC3 possède une tyrosine et trois résidus tryptophane, très réactifs aux radicaux  $N_3^{\bullet}$  utilisés pour isoler les processus de dimérisation. Comme évoqué dans les chapitres III et IV, les radicaux  $N_3^{\bullet}$  réagissent plus rapidement avec le tryptophane qu'avec la tyrosine et des transferts d'électrons sont susceptibles de s'opérer entre ces deux types de résidus. Le radical tryptophanyle formé lors de la réaction avec le radical azoture est capable d'oxyder une tyrosine pour former un radical tyrosyle (Land & Prütz, 1979; Prütz et al., 1980). Il est donc intéressant de s'interroger sur la formation de bi-tyrosine dans une protéine possédant aussi des tryptophanes, pour pouvoir comparer ce cas aux deux protéines précédemment considérées. De plus, le comportement concerté de dimérisation de la CEN2 en présence de XPC3 sera examiné dans le chapitre VII de cette thèse et il est donc important d'avoir considéré celui de la XPC3 isolée dans un premier temps. La séquence de la XPC3 sera rappelée dans la première ligne du Tableau 20. Pour faciliter les notations, c'est la numérotation des acides aminés de la séquence de la XPC qui sera conservée ( $^{815}E-L^{940}$ ).

Des gels d'électrophorèse SDS-PAGE de la protéine irradiée à différentes doses entre 0 et 50 Gy en présence de  $N_3^{\bullet}$  sont présentés en Figure 96. Différents pourcentages d'acrylamide ont été utilisés : en (a) est présenté un gel réalisé avec un gradient d'acrylamide (4-15%) et en (b) un gel composé de 12% d'acrylamide. Des différences de migration entre les deux gels présentés sont donc susceptibles d'être observées. Après exposition aux radicaux azoture, des oligomères de la protéine semblent être formés, et ce sur les deux gels. La XPC3 possède un poids moléculaire d'environ 14.5 kDa mais elle migre légèrement au-dessus par rapport au marqueur moléculaire. Ainsi, au vu des masses apparentes, les bandes principales formées sous irradiation sont susceptibles de correspondre à des dimères (entre 35 et 40 kDa), trimères ( $\approx$  55 kDa) et probablement des tétramères (entre 55 et 70 kDa sur le gel de gauche et vers 70 kDa sur le gel de droite) de la protéine. Sur le gel de la Figure 96 (a), une bande supplémentaire migrant vers 35 kDa est détectée et ce dès 0 Gy, ce qui n'est pas le cas dans la Figure 96 (b). Son intensité reste constante sous irradiation, elle est donc attribuée à une contamination et son absence dans le gel visible en (b) le confirme.

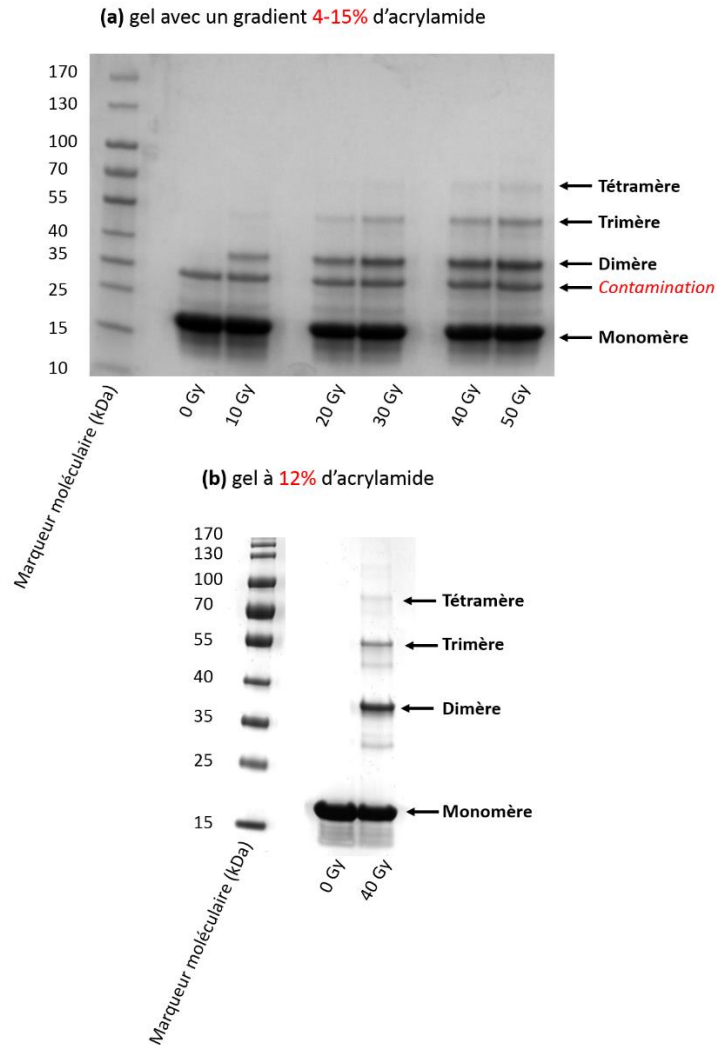


Figure 96: Gels d'électrophorèse SDS-PAGE de la XPC3 irradiée en présence de  $N_3^*$  (a) entre 0 et 50 Gy (4-15% acrylamide) et (b) à 0 et 40 Gy (12% acrylamide).

La protéine irradiée a ensuite été digérée à la trypsine. Le Tableau 20 expose les peptides issus de la digestion trypsique, permettant de rendre compte du recouvrement complet de séquence. Le peptide trypsique majoritaire contenant la tyrosine a été identifié comme 865-868 :  $^{865}YGPK^{868}$ . Le Tableau 21 recense les valeurs de  $m/z$  du dimère bichargé et trichargé du peptide YGPK et les recouvrements existants avec les profils isotopiques des oligomères d'ordre supérieur. D'après ce tableau, ce sont les  $m/z$  du M+1 des profils isotopiques qu'il est judicieux d'utiliser pour permettre la visualisation des dimères en s'affranchissant des trimères et tétramères.

820	830	840	850	860	870	880
MEEFKDV	LLTAWENEQA	VIERKEKEKK	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE	AAAPHTDAGG
890	900	910	920	930	940	
GLSSDEEEGT	SSQAEAAARIL	AASWPQNRED	EEKQKLGKGP	KKTKREKKA	ASHLFPFEQL	
Peptide tryptique	Clivage manquant	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental	TR (min)		
<b>Met-815-818</b>	0	683.3069 <sup>+</sup>	683.303 <sup>+</sup>	4.23		
		342.1571 <sup>2+</sup>	342.154 <sup>2+</sup>			
<b>819-834</b>	0	1885.9654 <sup>+</sup>	1885.966 <sup>+</sup>	18.85		
		943.4863 <sup>2+</sup>	943.493 <sup>2+</sup>			
<b>819-835</b>	1	1007.5338 <sup>2+</sup>	1007.529 <sup>2+</sup>	18.73		
		672.0250 <sup>3+</sup>	672.028 <sup>3+</sup>			
<b>835-837, 836-838, 838-840</b>	1	404.2504 <sup>+</sup>	404.245 <sup>+</sup>	0.34, 0.48		
<b>841-847</b>	1	422.7430 <sup>2+</sup>	422.737 <sup>2+</sup>	4.49		
<b>844-849</b>	0	688.3777 <sup>+</sup>	688.375 <sup>+</sup>	6.33		
		344.6925 <sup>2+</sup>	344.692 <sup>2+</sup>			
<b>850-853</b>	0	444.3180 <sup>+</sup>	444.324 <sup>+</sup>	2.15		
<b>854-858</b>	0	571.3926 <sup>+</sup>	571.399 <sup>+</sup>	7.54		
<b>859-862</b>	1	545.3406 <sup>+</sup>	545.334 <sup>+</sup>	0.51		
<b>861-863</b>	1	416.2980 <sup>+</sup>	416.296 <sup>+</sup>	0.46		
<b>864-868</b>	1	620.3515 <sup>+</sup>	620.346 <sup>+</sup>	1.49		
		310.6794 <sup>2+</sup>	310.680 <sup>2+</sup>			
<b>865-868</b>	0	464.2504 <sup>+</sup>	464.246 <sup>+</sup>	1.74		
<b>869-898</b>	0	1444.6243 <sup>2+</sup>	1444.631 <sup>2+</sup>	8.53		
		963.4186 <sup>3+</sup>	963.413 <sup>3+</sup>			
<b>899-908</b>	0	1155.6269 <sup>+</sup>	1155.641 <sup>+</sup>	11.81		
		578.3171 <sup>2+</sup>	578.322 <sup>2+</sup>			
<b>909-913</b>	0	649.2675 <sup>+</sup>	649.259 <sup>+</sup>	0.46		
<b>914-917</b>	1	516.3504	516.314	1.69		
<b>918-921</b>	0	358.2085 <sup>+</sup>	358.209 <sup>+</sup>	0.70		
<b>922-924</b>	1	376.2554 <sup>+</sup>	376.254 <sup>+</sup>	0.38		
<b>925-927, 841-843</b>	1	432.2565 <sup>+</sup>	432.252 <sup>+</sup>	0.34, 0.46		
		673.3668 <sup>2+</sup>	673.374 <sup>2+</sup>			
<b>928-939</b>	1	449.2470 <sup>3+</sup>	449.247 <sup>3+</sup>	10.58		
		337.1870 <sup>4+</sup>	337.186 <sup>4+</sup>			
<b>929-939</b>	0	609.3193 <sup>2+</sup>	609.325 <sup>2+</sup>	13.20		
		406.5486 <sup>3+</sup>	406.555 <sup>3+</sup>			
<b>929-940</b>	1	1330.7154 <sup>+</sup>	1330.735 <sup>+</sup>	16.50		
		665.8613 <sup>2+</sup>	665.868 <sup>2+</sup>			
		444.2433 <sup>3+</sup>	444.250 <sup>3+</sup>			

Tableau 20: Peptides tryptiques issus de la digestion de la XPC3.

<b>Dimère</b>	<b><i>m/z</i> théorique</b>	<b>Autres contributions</b>
<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	463.2425	[M+3H+1] <sup>3+</sup> du trimère
<b>[M+3H]<sup>3+</sup></b>	309.1641	[M+6H+2] <sup>6+</sup> du tétramère
<b>[M+2H+1]<sup>2+</sup></b>	463.7464	∅
<b>[M+3H+1]<sup>3+</sup></b>	309.5000	∅

Tableau 21: Valeurs de *m/z* des dimères du peptide YGPK et interférences avec les oligomères d'ordre supérieur.

Les chromatogrammes ioniques extraits  $m/z$   $463.75 \pm 0.05$  et  $m/z$   $309.50 \pm 0.05$  ( $[M+2H+1]^{2+}$  et  $[M+3H+1]^{3+}$  du dimère de YGPK) sont exposés en Figure 97 (a) et (b). Quel que soit l'état de charge considéré, trois pics chromatographiques (nommés  $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$ ) possèdent une contribution au  $m/z$  appelé. Malgré une optimisation des conditions chromatographiques, il n'a pas été possible d'améliorer davantage la séparation : le pic  $P_1$  de très faible intensité n'est pas rigoureusement séparé de  $P_2$ . Les spectres de masse des pics  $P_1$  à  $P_3$  sont exposés en Figure 97 (c) et (d) et le profil isotopique observé confirme leur attribution à des dimères du peptide YGPK.

Dimères de YGPK dans la digestion tryptique de XPC3

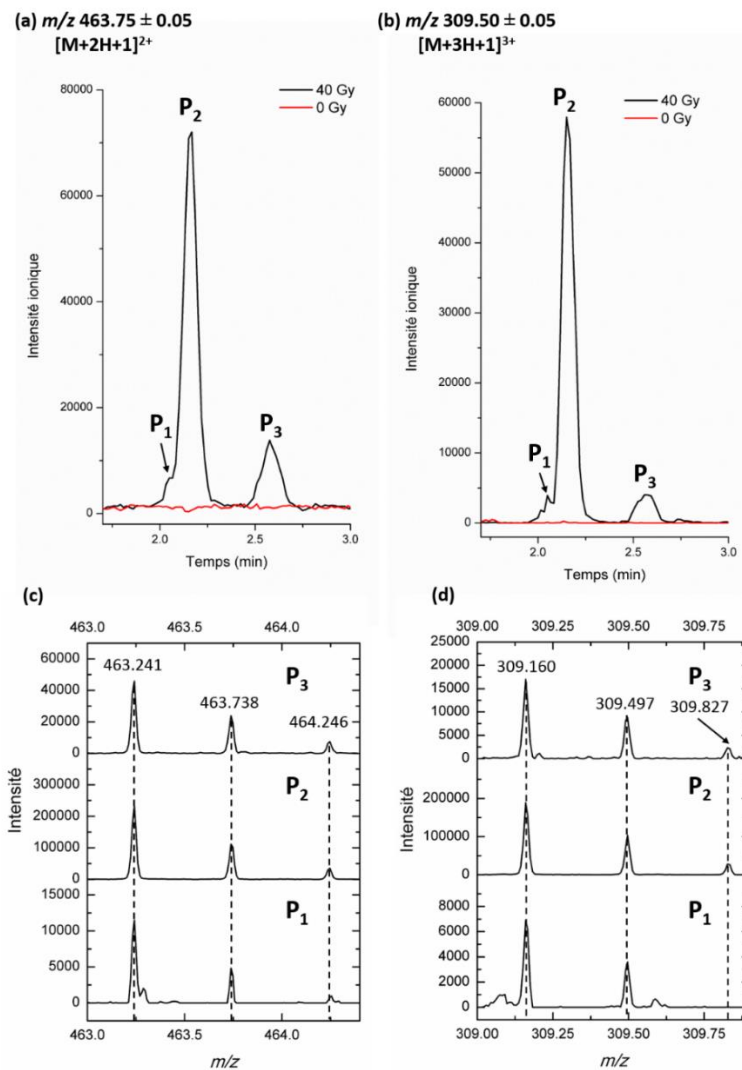
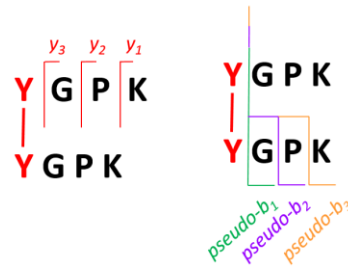


Figure 97: Dimères du peptide YGPK dans la digestion tryptique de la XPC3 irradiée à 40 Gy ( $N_3^*$ ). Chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$   $463.75 \pm 0.05$  ( $[M+2H+1]^{2+}$  du dimère) et (b)  $m/z$   $309.17 \pm 0.05$  ( $[M+3H+1]^{3+}$  du dimère). Gradient chromatographique n°12 (Tableau 38). Spectres de masse des pics  $P_1$  à  $P_3$  centrés en (c)  $m/z$  463.75 et (d)  $m/z$  309.50.

Ainsi, trois isomères du peptide tryptique YGPK sont mis en évidence, dont un très majoritaire. Sur la base de l'utilisation du radical azoture et au vu de la nature des acides aminés qui constituent le peptide tryptique YGPK, les trois dimères observés correspondent sans doute à des ponts bi-tyrosine. Toutefois, des expériences de MS/MS ont été effectuées en fragmentant  $m/z$   $463 \pm 1$  à 20 eV. La tyrosine est ici N-terminale dans le peptide YGPK issu de la digestion de la XPC3. Or, les fragments *pseudo-y* qui avaient permis d'identifier le pont bi-tyrosine sans ambiguïtés dans KTSLY par exemple ne contiennent pas la tyrosine dans le cas présent. Ce sont les fragments *pseudo-b* qui le permettraient (Figure 98) mais la probabilité de formation des fragments *b* est moindre devant celle des fragments *y*.

Figure 98: Représentation des fragments  $y$  et  $pseudo-b$  du dimère de peptide YGPK.

Le Tableau 22 rassemble les fragments  $y$  identifiés pour le pic chromatographique P<sub>2</sub>. Les fragments  $y_1$  à  $y_3$  sont observés ce qui témoigne du fait que la glycine, la proline et la lysine ne sont pas impliqués dans la liaison covalente et que c'est probablement la tyrosine qui l'est. Comme attendu, aucun des fragments  $pseudo-b$  n'a été observé.

Fragments	Correspondance	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental
$y_1$	K	147.1128	147.102
$y_2$	PK	244.1656	244.144
$y_3$	GPK	301.1870	301.167

Tableau 22: Fragments MS/MS issus de la fragmentation à  $m/z$  463  $\pm$  1 du pic P<sub>2</sub> de dimère du peptide YGPK au sein de la digestion trypsique de XPC3.

Dans le cas particulier de ce peptide au sein duquel la tyrosine est N-terminale, la détection en spectrométrie de masse n'est pas suffisante pour conclure sur la nature du lien covalent. Les spectres d'émission de fluorescence de la XPC3 irradiée à 0 et 40 Gy ( $N_3^*$ ) ont été enregistrés. Si le lien covalent formé lors de la dimérisation est une bi-tyrosine, une émission de fluorescence vers 400 nm devrait être mise en évidence dans le cadre de l'échantillon irradié. La XPC3 contenant également trois tryptophanes qui fluorescent vers 350 nm lors d'une excitation à 280 nm, il est alors difficile de comparer la contribution de la fluorescence vers 400 nm en excitant à 280 nm. Les spectres d'émission de fluorescence ont donc été enregistrés lors d'une excitation à 320 nm permettant de s'affranchir de la contribution des tryptophanes : ils sont présentés en Figure 99. Un signal de fluorescence est détecté vers 360 nm : il s'agit du signal Raman de l'eau. Outre cette contribution, à 0 Gy est détecté un signal dont le maximum d'émission de fluorescence se situe à 403 nm. Il est possible que la protéine soit légèrement oxydée, les expériences étant effectuées à l'air libre à température ambiante. Cela expliquerait qu'une faible quantité de dimères serait détectée même à 0 Gy. Les expériences de spectroscopie de fluorescence ont été effectuées sur les échantillons déposés sur le gel d'électrophorèse de la Figure 96 (b) soit celui ne présentant pas de contamination. Toutefois, à 40 Gy, l'intensité relative de ce signal de fluorescence a augmenté drastiquement. L'observation d'une



émission de fluorescence à cette longueur d'onde caractéristique de la formation de bi-tyrosine montre que sous irradiation, du dimère de tyrosine est donc formé. Plus rigoureusement, du dimère *ortho-ortho* de tyrosine est formé dans la XPC3 lors de l'exposition aux radicaux azoture.

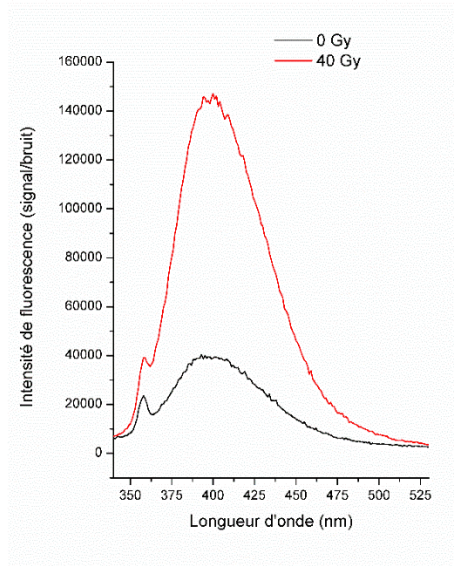


Figure 99: Spectres d'émission de fluorescence de la XPC3 irradiée à 0 et 40 Gy en présence de  $N_3^*$  ( $\lambda_{exc}=320$  nm). Concentration :  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans  $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de tampon phosphate à pH 7 et  $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaN}_3$ .

Ainsi, au sein de la protéine XPC3, la formation de bi-tyrosine a pu être mise en évidence et au moins deux isomères sont formés. La présence d'un troisième isomère est fortement présumée. La diversité structurale des dimères de tyrosine est moindre que dans les cas de la centrine 2 et de la calmoduline. Plusieurs hypothèses peuvent être faites. Soit la structure de la XPC3 est telle que la formation de dimères impliquant des réarrangements comme ceux de la famille MAD est difficile et contrainte stériquement. Soit la quantité de dimères formée n'est pas suffisante pour permettre une détection exhaustive de tous les isomères. Cette seconde hypothèse assure le lien avec la suite de l'étude. En effet, la formation simultanée d'autres types de pontages impliquant les tryptophanes ont lieu dans la XPC3. Un bilan sur les pontages tyrosine-tyrosine dans les trois protéines sera proposé plus loin dans ce chapitre (page 155).

En s'intéressant de plus près à la XPC3, comme abordé précédemment, il se trouve qu'elle possède également trois tryptophanes, résidus très sensibles à l'oxydation de  $N_3^*$ . Des dimères de tryptophane sont notamment susceptibles d'être formés (Paviani et al., 2017; Fuentes-Lemus, Silva, Leinisch, et al., 2018; Paviani et al., 2020). Au sein de la digestion trypsique de la XPC3, les peptides contenant les tryptophanes sont  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$ ,  $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$  et  $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$ . Le

Tableau 23 recense les valeurs de  $m/z$  attendus dans le cadre de la formation de di-tryptophane entre ces peptides tryptiques contenant respectivement les résidus  $^{825}\text{W}$ ,  $^{848}\text{W}$  et  $^{904}\text{W}$ .

Type de dimères	Tryptophanes impliqués	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental
Homodimères	di- $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$	942.9824 <sup>4+</sup>	ND
		754.5874 <sup>5+</sup>	ND
		628.9907 <sup>6+</sup>	ND
	di- $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$	687.3699 <sup>2+</sup>	ND
		458.5823 <sup>3+</sup>	ND
		344.1886 <sup>4+</sup>	ND
	di- $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$	770.0818 <sup>3+</sup>	ND
		577.8132 <sup>4+</sup>	ND
		462.4520 <sup>5+</sup>	ND
Hétérodimères	$^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$	857.7782 <sup>3+</sup>	857.789 <sup>3+</sup>
		643.5855 <sup>4+</sup>	643.592 <sup>4+</sup>
		515.0699 <sup>5+</sup>	ND
	$^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$	1013.5280 <sup>3+</sup>	1013.546 <sup>3+</sup>
		760.3978 <sup>4+</sup>	760.400 <sup>4+</sup>
		608.5197 <sup>5+</sup>	ND
	$^{844}\text{ALGNWK}^{849}$ - $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$	920.9945 <sup>2+</sup>	ND
		614.3321 <sup>3+</sup>	ND
		461.0009 <sup>4+</sup>	ND

Tableau 23: Valeurs de  $m/z$  attendues dans le cadre de la formation de dimères de tryptophane au sein de la XPC3.

Parmi toutes les combinaisons possibles, aucun homodimère ( $^{825}\text{W}$ - $^{825}\text{W}$ ,  $^{848}\text{W}$ - $^{848}\text{W}$ ,  $^{904}\text{W}$ - $^{904}\text{W}$ ) n'a été détecté mais deux types d'hétérodimères ont pu être identifiés : entre les peptides  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$  et  $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$  ( $^{825}\text{W}$ - $^{848}\text{W}$ ) ainsi qu'entre  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$  et  $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$  ( $^{825}\text{W}$ - $^{904}\text{W}$ ). Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  643.83  $\pm$  0.05 ( $[\text{M}+4\text{H}+1]^{4+}$  de l'hétérodimère  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$ ) et  $m/z$  760.65  $\pm$  0.05 ( $[\text{M}+4\text{H}+1]^{4+}$  de l'hétérodimère  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$ ) sont présentés en Figure 100 pour des doses de 0 et 40 Gy ( $\text{N}_3^*$ ). Ce sont ici les contributions du pic M+1 qui ont été sélectionnées car ce sont les plus intenses des profils isotopiques. Une dizaine de pics chromatographiques formés suite à l'irradiation est détectée pour chacun des deux  $m/z$  appelés.

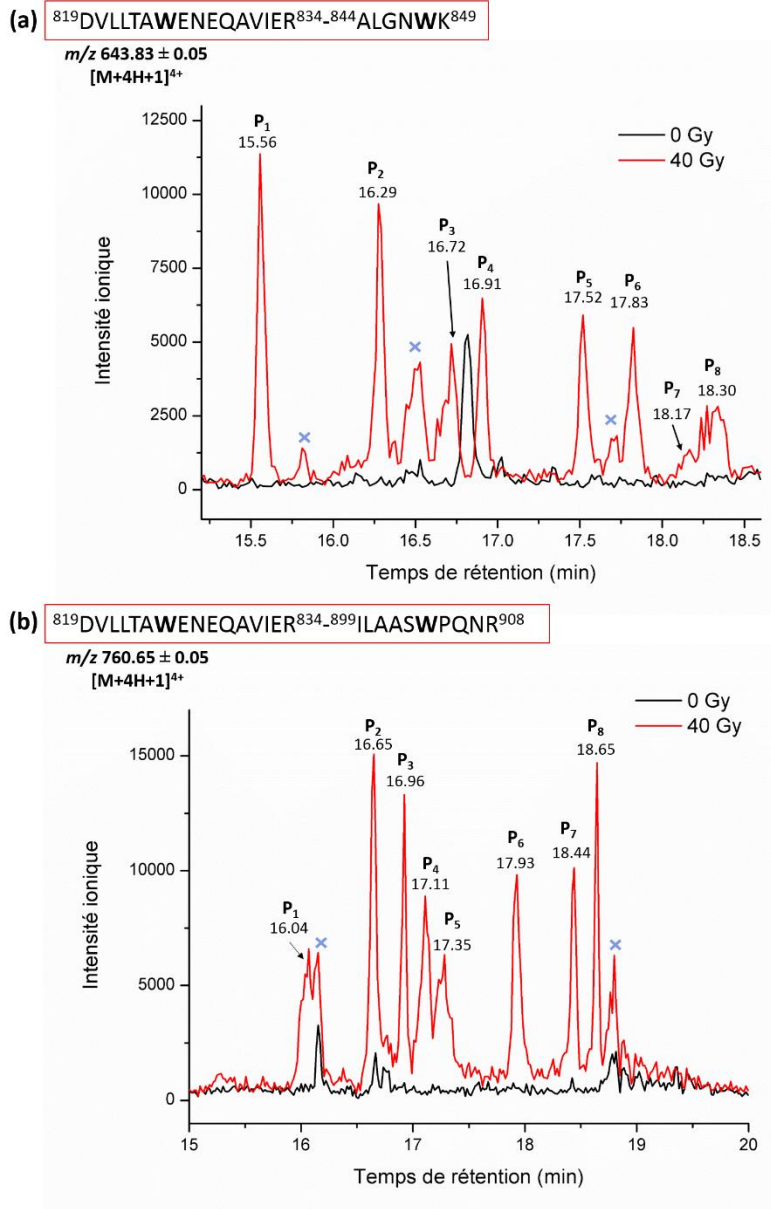


Figure 100: Hétérodimères (a)  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834-844}\text{ALGNWK}^{849}$  et (b)  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834-899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$  dans la digestion trypsique de la XPC3 irradiée à 0 et 40 Gy ( $\text{N}_3^*$ ). Chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z\ 643.83 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+4\text{H}+1]^{4+}$ ) et (b)  $m/z\ 760.65 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+4\text{H}+1]^{4+}$ ). Les intensités ioniques sont indiquées en valeur absolue. Les croix bleues indiquent des pics ne correspondant pas à des dimères de tryptophane. Gradient chromatographique n°12 (Tableau 38)

Pour chacun des pics formés sous irradiation, le spectre de masse a été extrait à (a)  $m/z\ 643.83 \pm 0.05$  ou (b)  $m/z\ 760.65 \pm 0.05$  afin d'identifier les pics chromatographiques de dimères de XPC3. Ainsi, sur la Figure 100, seuls les pics pour lesquels un temps de rétention est indiqué ont été confirmés comme étant des dimères issus de l'association covalente entre les peptides  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$  et  $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$  (a) ou  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$  et  $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$  (b). Bien que tous les spectres de masse ne soient pas présentés, des exemples sont présentés en Figure 101 (profils isotopiques des ions tri- et tétrachargés du pic P<sub>2</sub> du dimère issu de la dimérisation  $^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}$ -

<sup>844</sup>ALGNWK<sup>849</sup> et Figure 102 (les profils isotopiques des ions tri- et tétrachargés du pic P<sub>2</sub> du dimère supposé issu de la dimérisation <sup>819</sup>DVLLTAWENEQAVIER<sup>834\_899</sup>ILAASWPQNR<sup>908</sup>).

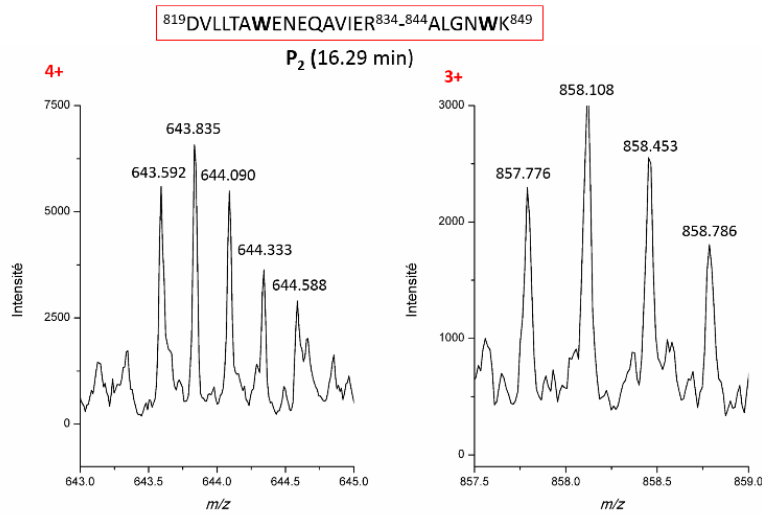


Figure 101: Spectre de masse du pic P<sub>2</sub> (<sup>819</sup>DVLLTAWENEQAVIER<sup>834\_844</sup>ALGNWK<sup>849</sup>) de la Figure 100 (a) centré en  $m/z$  643.83 (4+) et  $m/z$  858.11 (3+).

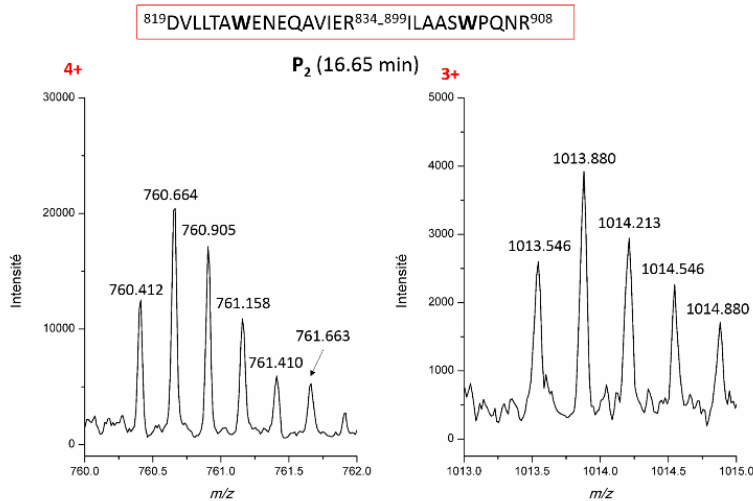


Figure 102: Spectre de masse du pic P<sub>2</sub> (<sup>819</sup>DVLLTAWENEQAVIER<sup>834\_899</sup>ILAASWPQNR<sup>908</sup>) de la Figure 100 (b) centrés en  $m/z$  760.41 (4+) et  $m/z$  1013.55 (3+).

En toute rigueur, pour confirmer la nature exacte de ces pontages, des expériences de MS/MS devraient être réalisées. Toutefois, au vu des séquences (Tableau 23), il est très probable que les résidus tryptophanes soient à l'origine de ces dimérisations, d'autant plus lors d'une oxydation en présence de  $N_3^+$ , spécifique des acides aminés aromatiques. Si les pics P<sub>1</sub> à P<sub>8</sub> correspondent effectivement à des pontages tryptophane-tryptophane, alors la diversité structurale existante apparaît extrêmement intéressante à investiguer plus en détails mais ne fait pas l'objet de cette étude.

Suite à la mise en évidence de dimères entre des peptides tryptiques contenant la tyrosine puis ceux contenant les tryptophanes, la formation d'hétérodimères tyrosine-tryptophane a été investiguée. Le Tableau 24 recense les valeurs de  $m/z$  attendues dans le cadre de pontages covalents entre le peptide tryptique contenant la tyrosine,  $^{865}\text{YGPK}^{868}$ , et les trois peptides tryptiques contenant les tryptophanes.

Dimères Y-W	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental
$^{819}\text{DVLTTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{865}\text{YGPK}^{868}$	783.0691 <sup>3+</sup>	783.071 <sup>3+</sup>
	587.5537 <sup>4+</sup>	587.558 <sup>4+</sup>
	470.2444 <sup>5+</sup>	ND
$^{844}\text{ALGNWK}^{849}$ - $^{865}\text{YGPK}^{868}$	1149.605 <sup>1+</sup>	ND
	575.3062 <sup>2+</sup>	ND
	383.8732 <sup>3+</sup>	ND
$^{865}\text{YGPK}^{868}$ - $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$	808.9308 <sup>2+</sup>	ND
	539.6230 <sup>3+</sup>	539.625 <sup>3+</sup>
	404.9690 <sup>4+</sup>	ND

Tableau 24: Valeurs de  $m/z$  attendues dans le cadre de la formation de dimères tyrosine-tryptophane au sein de la XPC3.

Parmi les trois pontages Y-W possibles, deux d'entre eux ont été détectés dans les échantillons de XPC3 irradiée à 40 Gy ( $\text{N}_3^*$ ) puis digérée. Il s'agit de l'association covalente entre les peptides tryptiques  $^{819}\text{DVLTTAWENEQAVIER}^{834}$  et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$  ainsi que  $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$  et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$  mais aucune espèce correspondante au pontage entre les peptides  $^{844}\text{ALGNWK}^{849}$  et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$  n'a été observée. La Figure 103 présente les chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$   $783.07 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  de l'association covalente des peptides tryptiques  $^{819}\text{DVLTTAWENEQAVIER}^{834}$  et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$ ) et (b)  $m/z$   $539.63 \pm 0.05$  ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  de l'association covalente des peptides tryptiques contenant la  $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$  et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$ ). Dans le cadre de l'association  $^{819}\text{DVLTTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{865}\text{YGPK}^{868}$ , quatre pics chromatographiques, nommés P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub> (Figure 103 (a)) ont été identifiés comme des espèces dont les profils isotopiques des ions tri- et tétrachargés confirment qu'il s'agit de dimères de la XPC3 impliquant ces peptides tryptiques. Un exemple du spectre de masse centré pour les états de charge +3 et +4 du pic P<sub>3</sub> est proposé en Figure 103 (c). D'autre part, au moins six pics chromatographiques nommés P<sub>1</sub> à P<sub>6</sub> (Figure 103 (b)) sont proposés comme des dimères résultant de l'association covalente  $^{865}\text{YGPK}^{868}$ - $^{899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$ . Un exemple de spectre de masse du pic P<sub>4</sub> est exposé en Figure 103 (d) : seul l'ion trichargé est détecté dans le cadre de cette espèce. En effet, l'intensité ionique absolue des pics extraits à  $m/z$  539.63 est très petite devant celle observée dans le cadre des dimères supposés  $^{819}\text{DVLTTAWENEQAVIER}^{834}$ - $^{865}\text{YGPK}^{868}$  extraits à  $m/z$  783.07.

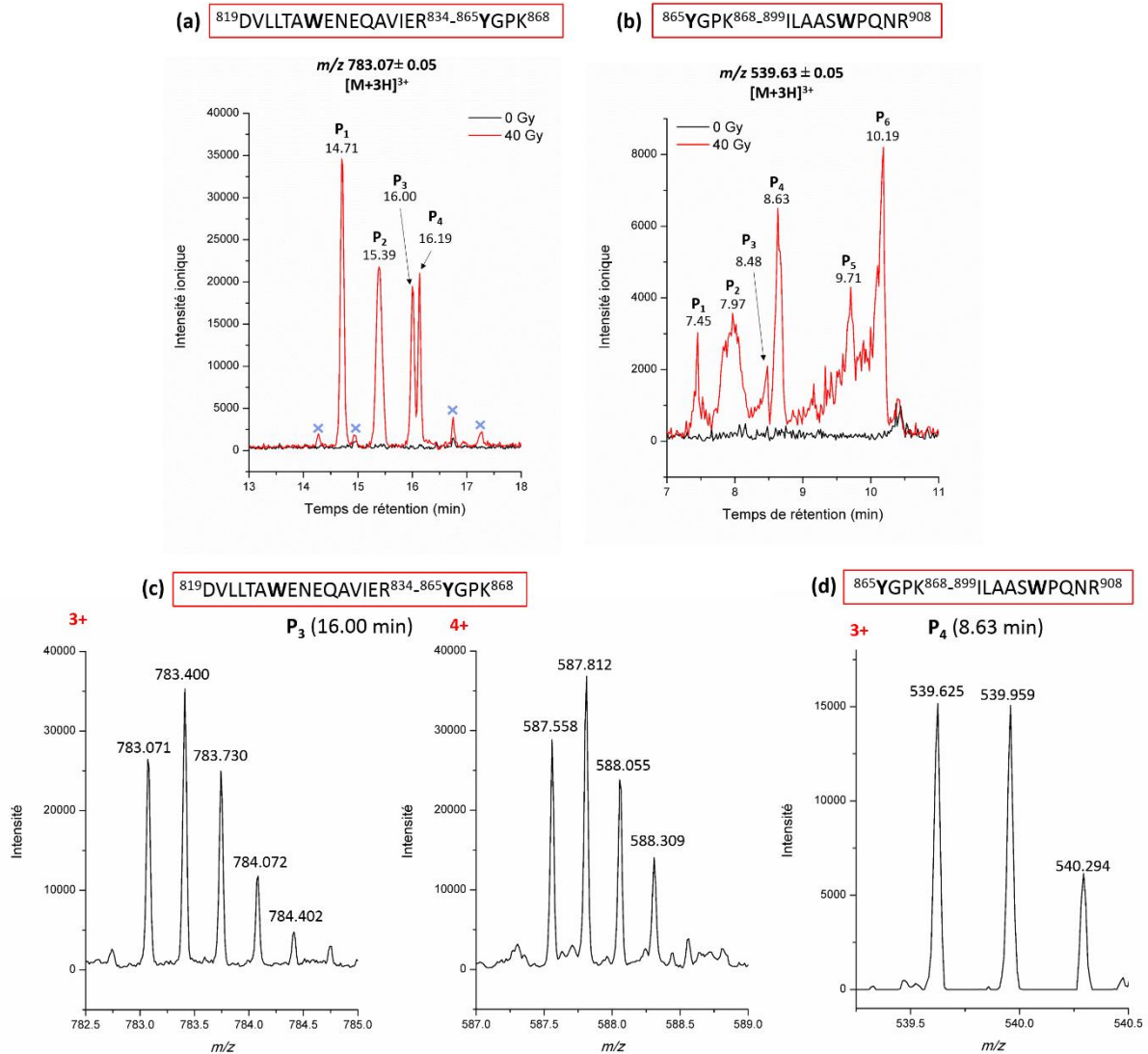


Figure 103: Hétérodimères (a,c)  $^{819}\text{DVLWTAWENEQAVIER}^{834\_865}\text{YGPK}^{868}$  et (b,d)  $^{865}\text{YGPK}^{868\_899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$  dans la digestion trypsinique de la XPC3 irradiée à 0 et 40 Gy ( $\text{N}_3^*$ ). Chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$  783.07 ± 0.05  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  de l'association covalente des peptides tryptiques contenant le  $^{825}\text{W}$  et la  $^{865}\text{Y}$  et (b)  $m/z$  539.63 ± 0.05  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  de l'association covalente des peptides tryptiques contenant le  $^{904}\text{W}$  et la  $^{865}\text{Y}$ . Gradient chromatographique n°12 (Tableau 38). Spectres de masse (c) du pic P<sub>3</sub> du panel (a) centrés en  $m/z$  783.07 (3+) et 587.56 (4+), (d) du pic P<sub>4</sub> du panel (b) centrés en  $m/z$  539.62 (3+).

Tout comme pour les dimères impliquant les peptides contenant les tryptophanes, il faudrait à ce stade effectuer des expériences de fragmentation pour attester de la nature exacte des dimères détectés en Figure 103. Néanmoins, au vu des séquences et de l'utilisation du radical  $\text{N}_3^*$ , ces associations covalentes sont largement suggérées. Aussi, plusieurs pics chromatographiques ayant été mis en évidence, cela témoigne de l'existence d'une diversité structurale des hétérodimères Y-W, comme cela a été le cas à l'échelle des acides aminés.

Au sein de la XPC3, en présence de  $N_3^*$ , différents types de dimères ont été mis en exergue : bi-tyrosine, bi-tryptophane et tyrosine-tryptophane. La tyrosine n'est donc pas uniquement impliquée dans la formation d'homodimères tyrosine-tyrosine mais réagit également avec deux des trois résidus tryptophanes pour former des hétérodimères. Bien qu'il n'existe pas de structure cristallographique de la XPC, une structure prédite est disponible (AlphaFold), permettant de discuter des dimères observés (*Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022*). En Figure 104 est présentée une visualisation de la structure prédite de la partie de la XPC3 contenant les acides aminés d'intérêt à savoir les tryptophanes et la tyrosine.

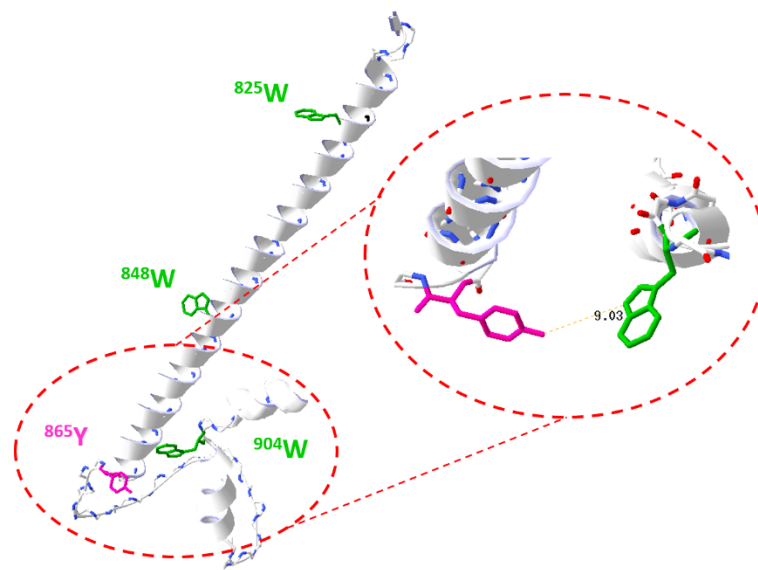


Figure 104: Visualisation des résidus tryptophane (en vert) et tyrosine (en rose) sur la structure prédite de la XPC. La distance entre l'atome d'oxygène du phénol de la tyrosine et l'atome d'azote du tryptophane est estimée à 9 Å.

La tyrosine <sup>865</sup>Y est située dans une boucle, à proximité d'une hélice  $\alpha$  et d'une proline (<sup>867</sup>P), acide aminé susceptible d'apporter une contrainte stérique non négligeable. Il est possible que la localisation de la tyrosine et donc son accessibilité au sein de la séquence en fasse un résidu plus ou moins disposé à former des bi-tyrosines de la famille MAD puisque les additions de Michael qui suivent la recombinaison radicalaire nécessitent une certaine mobilité des chaînes peptidiques proches. C'est pourquoi au sein de la XPC3, deux isomères majoritaires de tyrosine-tyrosine seraient observés et pourraient correspondre à l'*ortho-ortho* et à l'*iso*. Le troisième isomère détecté pourrait être un dimère de la famille MAD et sa faible intensité traduirait une formation moins favorable en regard des protéines pour lesquelles la tyrosine est moins contrainte (centrine 2 notamment). Il est aussi notable que la tyrosine est spatialement proche du tryptophane <sup>904</sup>W, situé sur une boucle mais pointant vers l'extérieur de la structure 3D. La distance entre l'atome d'oxygène de la tyrosine et l'atome d'azote du



tryptophane a été estimée à 9.03 Å. Cette distance est à la fois i) propice à la formation d'un pontage covalent entre les deux résidus, ce qui mènerait alors à un dimère intra-protéique qu'il est difficile de discriminer d'un pontage interprotéique suite à la digestion trypsique, ii) typique de la distance pour laquelle un transfert d'électrons Trp→Tyr peut avoir lieu (Prütz *et al.*, 1982). Dans le cadre de la XPC3, le tryptophane <sup>904</sup>W, oxydé par N<sub>3</sub><sup>•</sup>, serait alors susceptible de transférer son électron pour former le radical tyrosyle, qui réagit ensuite pour former des dimères de tyrosine ou des hétérodimères avec un tryptophane. Les tryptophanes <sup>825</sup>W et <sup>848</sup>W se trouvent sur une même hélice α mais semblent orientés vers l'extérieur de la structure 3D globale, ce qui en fait des résidus relativement accessibles ce qui appuie leur implication dans la formation de dimères de tryptophane. Parmi les dimères investigués dans le cadre de l'oxydation de la XPC3, seule la formation de bi-tyrosine apparaît nécessairement comme un pontage interprotéique puisqu'elle est la seule de la séquence. Concernant les dimères de tryptophane, aucun homodimère (impliquant le même tryptophane) n'a été détecté. Il est possible de faire l'hypothèse que les liens covalents W-W impliquant deux résidus différents aient lieu au sein d'un même monomère de XPC3. Il en est de même pour les pontages Y-W. Il est important de rappeler que la structure sur laquelle est basée cette réflexion reste une structure prédite, de la XPC dans son entièreté qui plus est. Il n'en demeure pas moins que la relation entre la structure initiale de la protéine et la formation de dimères lors d'une oxydation apparaît extrêmement importante à considérer. Aussi, la structure de la protéine suite à la formation de dimères, qu'ils soient intra- ou interprotéiques en est certainement modifiée.

#### VI.4. Discussion

A travers l'étude de trois protéines, la formation de dimères de tyrosine à l'échelle protéique a pu être investiguée. A l'image de ce qui avait été observé avec le peptide modèle KTSLY, la centrine 2 humaine dont la tyrosine est terminale forme jusqu'à cinq isomères de bi-tyrosine et parmi eux certains impliquent des additions de Michael post recombinaison radicalaire. La cohérence observée avec les résultats obtenus précédemment à l'échelle peptidique a permis de se référer à certaines expériences menées sur KSTLY qu'il aurait été compliqué d'entreprendre sur la protéine entière.

En gardant en tête que la bi-tyrosine est sondée dans les protéines comme marqueur de l'oxydation, la détection de l'*ortho-ortho* en fluorescence n'est pas du tout représentative de l'ensemble des dimères formés. De plus, bien que l'*ortho-ortho* possède toujours l'intensité ionique la plus élevée, les intensités ioniques relatives observées semblent montrer des proportions plus homogènes des dimères en comparaison avec le cas de l'acide aminé libre. Les autres isomères constituent des espèces issues de l'oxydation aussi importantes à considérer que l'*ortho-ortho*.



La tyrosine de la centrine 2 humaine étant extrêmement accessible et flexible mais également non impliquée dans une liaison peptidique du côté C-terminal, la diversité structurale observée quant aux dimères formés aurait pu s'expliquer par ces particularités. Pour autant, à travers la considération de la calmoduline, qui possède deux tyrosines non terminales, la mise en évidence d'un nombre d'isomères supérieur à quatre pour chacun des dimères observés a montré que le caractère C-terminal n'est pas à l'origine de la multiplicité des structures de bi-tyrosine. Les critères d'accessibilité et de flexibilité du résidu tyrosine y contribuent quant à eux très certainement : la tyrosine doit être accessible pour permettre la dimérisation et l'évolution structurale observée pour les dimères de la famille MAD nécessite une certaine flexibilité des chaînes peptidiques environnantes. En accord avec la littérature, l'homodimère  $^{138}\text{Y}-^{138}\text{Y}$  de la calmoduline n'est pas formé et c'est effectivement cette tyrosine qui apparaît la moins accessible des deux dans la structure. L'homodimère  $^{99}\text{Y}-^{99}\text{Y}$  de la calmoduline, dans lequel sont impliquées deux tyrosines localisées sur une boucle assez flexible, présente plus d'isomères que l'hétérodimère  $^{99}\text{Y}-^{138}\text{Y}$  dans lequel l'une des deux tyrosines est plus contrainte spatialement de par son implication dans une hélice  $\alpha$ . Le nombre de dimères détectés est donc en accord avec les contraintes stériques respectives des résidus impliqués. Dans la protéine XPC3, d'après la structure prédite, la tyrosine est localisée dans une boucle et se trouve à proximité d'une hélice  $\alpha$  ainsi que d'un résidu proline qui contraignent certainement les réarrangements structuraux induits par des additions de Michael. Une certaine cohérence entre le nombre de dimères détectés et l'accessibilité de la tyrosine semble également avoir été mise en exergue. Pour continuer cette étude, une protéine dont la structure a été caractérisée et non uniquement prédite, et dont une tyrosine ait été montrée comme contrainte et peu accessible pourrait être considérée. L'environnement plus ou moins proche des tyrosines (structure tridimensionnelle et nature des voisins directs) semble jouer un rôle primordial dans la diversité structurale des dimères mis en évidence. Ces contraintes stériques structurales sont valables pour tout accrochage covalent de quelque nature qu'il soit mais sont d'autant plus importantes à considérer pour la formation d'isomères induisant des réarrangements qui impliquent toute la chaîne peptidique adjacente. A l'échelle protéique, les modifications structurales induites par les dimérisations pourraient être déterminées par dichroïsme circulaire : si des dimères MAD se forment, les structures secondaires et tertiaires des protéines sont susceptibles de changer. Le cas échéant, qu'advient-il de la capacité de la protéine à assurer ses fonctions ?

Dans la XPC3, la présence additionnelle de tryptophanes a amené à s'interroger sur la formation d'autres types de pontages (tyrosine-tryptophane, tryptophane-tryptophane) et sur leur pluralité. Plusieurs pics chromatographiques ont effectivement été associés à leur formation. Pour aller plus loin dans la détermination de leur nature exacte, il serait intéressant d'étudier des peptides synthétiques de séquences correspondantes aux coupures tryptiques de la XPC3, par analogie avec le

peptide KTSLY pour la CEN2. Alors que les résidus tryptophane réagissent plus rapidement que les tyrosines avec le radical azoture, comme des hétéropontages ont été mis en évidence (tyrosine-tryptophane), il a été proposé que des transferts d'électrons aient lieu des résidus tryptophanes vers la tyrosine. Des expériences de radiolyse pulsée pourraient permettre de vérifier cette hypothèse: si un ou des transferts Trp→Tyr ont lieu, la cinétique de décroissance des signaux caractéristiques du radical tryptophanyle devrait pouvoir être corrélée à la cinétique de formation du radical tyrosyle.

A l'échelle de la centrine 2 humaine, l'étude cinétique a permis de montrer que des intermédiaires de la famille MAD sont présents à l'échelle de plusieurs jours (> 48 heures). Qu'il s'agisse d'intermédiaires ou de dimères finaux, qu'en est-il de la toxicité de ces espèces ? Dans l'hypothèse où tous ces isomères soient formés *in-vivo*, peuvent-ils être dégradés par les systèmes cellulaires prévus à cet effet ? La considération de protéines recombinantes isolées est-elle appropriée pour une description des processus qui ont lieu à des échelles plus complexes ? Qu'advient-il de la formation de bi-tyrosine de la centrine 2 lorsqu'un ou des partenaires protéiques sont présents ? Pour tenter d'apporter des informations, dans le chapitre VII, la centrine 2 humaine sera considérée en présence d'un partenaire cellulaire identifié.



# VII. DIMERISATION OXYDATIVE AU SEIN DE COMPLEXES PROTEIQUES

---

Dans les parties précédentes de ce manuscrit, la formation de dimères de tyrosine a été étudiée à plusieurs échelles moléculaires jusqu'à celle des protéines isolées. D'un point de vue fonctionnel, la centrine 2 humaine est notamment impliquée dans le processus NER de réparation de l'ADN (*Araki et al., 2001; Nishi et al., 2005*) au sein duquel elle interagit avec la protéine XPC. Le comportement de dimérisation de la centrine 2 humaine lors de la formation d'un complexe formé avec deux fragments de la XPC (P17XPC et XPC3) va être investigué. Au-delà de l'analyse des pontages en tant que telle, lorsque des complexes protéiques sont considérés, la formation du complexe non covalent doit être investiguée. Trois méthodes seront utilisées dans ce cadre: la spectroscopie de fluorescence, la spectrométrie de masse native et la titration calorimétrique isotherme (ITC). La spectroscopie de fluorescence est une méthode de choix pour la mise en évidence de complexes protéiques en solution, sous réserve qu'un ou plusieurs résidus tryptophanes soient impliqués dans l'interaction non covalente. En effet, la longueur d'onde d'émission de fluorescence des résidus tryptophanes est sensible à l'hydrophobicité du milieu dans lequel ils se trouvent. Lorsque l'environnement proche du tryptophane devient plus hydrophobe, un décalage de la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence est observé vers les plus basses longueurs d'onde, vers le « bleu » (*Burstein et al., 1973*). L'utilisation de cette méthode dans cette étude permettra uniquement de justifier de la formation des complexes d'un point de vue qualitatif. L'analyse de complexes protéiques non covalents par spectrométrie de masse est réalisable lorsque les conditions d'ionisation sont assez douces pour que les interactions non covalentes existantes en solution soient conservées en phase gazeuse. Le cas échéant, c'est la somme des masses de chacune des entités constituant le complexe qui est considérée pour sa détection à différents rapports masse sur charge ( $m/z$ ). De la même manière que la spectroscopie de fluorescence, la spectrométrie de masse native sera utilisée pour mettre en évidence qualitativement la formation des complexes. Enfin, l'ITC est une technique qui permet de rendre compte de l'affinité existante entre deux partenaires moléculaires par mesure des échanges de chaleur lors de leur mise en contact. Elle permet d'obtenir des données thermodynamiques comme la constante d'affinité du complexe considéré ou encore sa stœchiométrie. Le principe de cette technique sera explicité en VII.1.1.

Après la caractérisation des complexes, il conviendra de répondre aux questions suivantes : la dimérisation de la centrine 2 est-elle toujours effective ? Les fragments protéiques de la XPC (P17XPC, XPC3) forment-ils également des dimères dans le cadre de la formation du complexe ? Des dimères entre les deux membres du complexe (hétérodimères) sont-ils à prévoir ? Le cas échéant, de quelle nature sont-ils ?

## VII.1. Complexe CEN2-P17XPC

### VII.1.1. Caractérisation

Le complexe formé par la centrine 2 humaine et le peptide P17XPC a déjà été caractérisé d'un point de vue structural et thermodynamique dans la littérature, ce qui a permis d'identifier les principaux sites d'interactions hydrophobes (Popescu *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2006; Charbonnier *et al.*, 2007). A travers des expériences de titration calorimétrique isotherme, de spectroscopie de fluorescence et de spectrométrie de masse en conditions natives, le complexe CEN2-P17XPC sera caractérisé dans les conditions d'irradiation  $\gamma$  (tampon phosphate pH 7, 10 mmol·L<sup>-1</sup> et NaN<sub>3</sub>, 10 mmol·L<sup>-1</sup>).

L'affinité existante entre la centrine 2 et le peptide issu de la XPC a été étudiée par titration calorimétrique isotherme. Les échanges de chaleur provoqués par l'interaction sont mesurés entre une cellule de référence contenant classiquement le solvant ou le tampon d'étude et une cellule de travail contenant une solution de l'un des partenaires au sein de laquelle est introduit progressivement le second partenaire. La constante d'équilibre d'association ( $K_a$ ) et la stœchiométrie ( $n$ ) de la réaction étudiée peuvent en être extraites à travers la mesure de la chaleur libérée ou reçue par le système. La Figure 105 présente une représentation simplifiée du montage et des données obtenues en ITC.

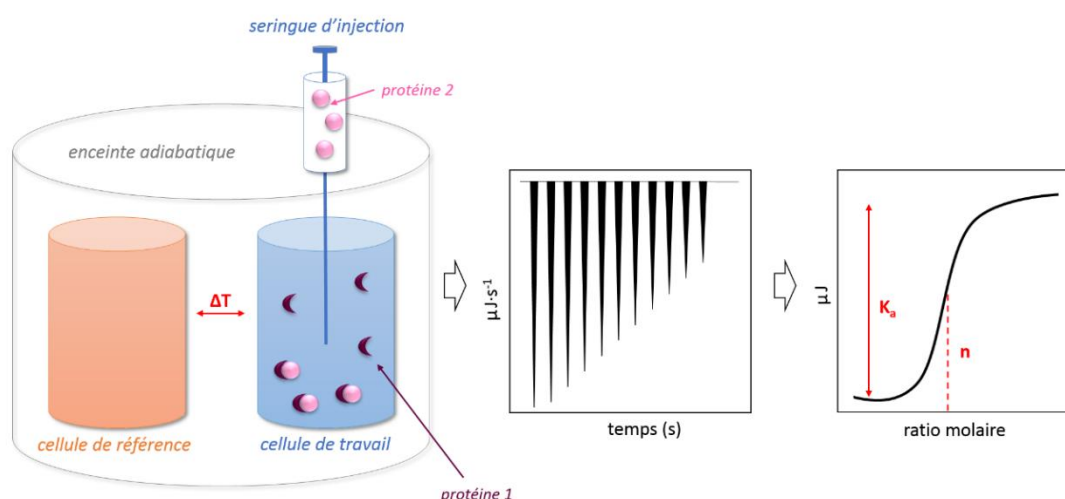


Figure 105: Illustration simplifiée du montage de titration calorimétrique isotherme (ITC) et des données obtenues.

La Figure 106 présente les données obtenues en ITC. A gauche (a) est présentée la variation de chaleur en fonction du temps (données brutes) et à droite (b) l'aire des pics observés sur le panel de gauche en fonction de l'injection du ligand et donc du ratio ligand/protéine. L'ajustement des données selon un modèle indépendant a permis d'estimer la valeur de la stœchiométrie à 1 et de  $K_a$  à environ  $3,5 \cdot 10^6$  L·mol<sup>-1</sup>.

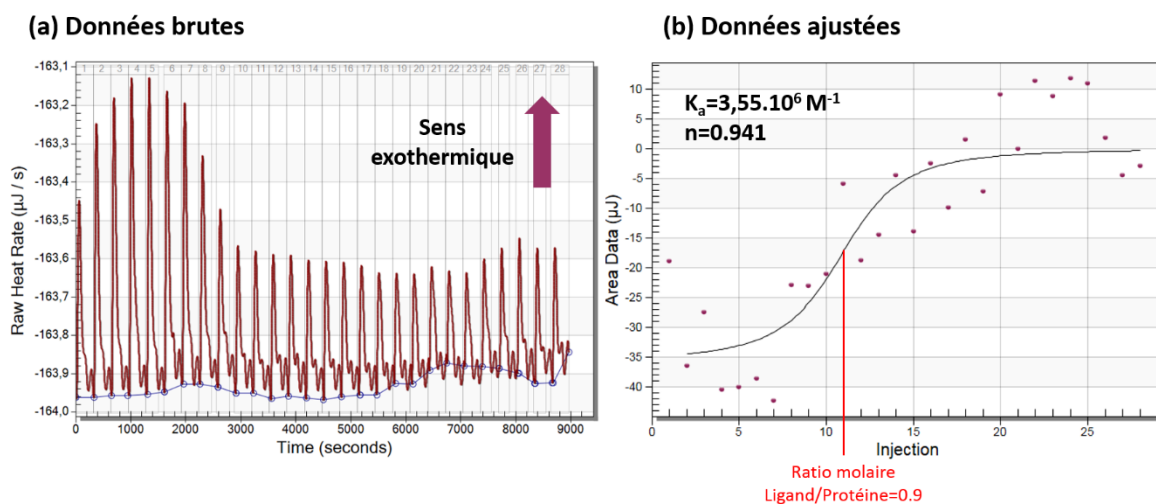


Figure 106: Etude thermodynamique. Données brutes d'ITC (a) et données ajustées selon un ajustement indépendant (b).

Les valeurs de  $n$  et de  $K_a$  obtenues au cours de ce travail sont largement comparables à celles publiées ( $n = 1$ ,  $K_a = 8 \cdot 10^6$  L·mol<sup>-1</sup>) par (Charbonnier *et al.*, 2007). Bien que les concentrations utilisées ne soient pas identiques et que le tampon diffère, une réaction exothermique a lieu ( $\Delta G = -37$  kJ·mol<sup>-1</sup>) et un complexe est formé. Au-delà de la comparaison effectuée avec les données de la littérature, l'expérience a permis de confirmer que le complexe se forme effectivement dans les conditions d'irradiation  $\gamma$ .

D'autres techniques de caractérisation ont été envisagées : la spectroscopie de fluorescence et la spectrométrie de masse en conditions natives (sans dénaturation). En effet, le peptide P17XPC possède un tryptophane, fluorophore intrinsèque aux protéines, dont la fluorescence est sensible à l'environnement et notamment à l'hydrophobicité du milieu (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Or, le tryptophane de P17XPC se trouve être l'un des résidus identifiés comme à l'origine des interactions électrostatiques et hydrophobes existantes entre la centrine 2 et ce dernier (Charbonnier *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2006). Ainsi, une différence d'émission de fluorescence est attendue entre le cas du peptide P17XPC isolé et complexé avec la centrine 2 humaine (Shi *et al.*, 2017). La Figure 107 présente les spectres d'émission de fluorescence du peptide P17XPC et du complexe CEN2-P17XPC lors d'une excitation à 280 nm. Le peptide seul présente un maximum de fluorescence à  $\lambda_{em} = 352$  nm, longueur d'onde classiquement décrite comme celle du tryptophane isolé en solution aqueuse (Teale & Weber, 1957). Au sein du complexe CEN2-P17XPC, l'émission de fluorescence est décalée vers le bleu ( $\lambda_{em} =$

330 nm). Ce décalage vers les basses longueurs d'onde est en accord avec une augmentation de l'hydrophobicité du milieu, qui s'explique par l'enfouissement du tryptophane dans la poche hydrophobe de la centrine 2. Une augmentation relative de la fluorescence est également observée : une proposition à cette observation serait l'augmentation du rendement quantique de fluorescence du tryptophane, qui, confiné dans la poche hydrophobe serait moins efficace à relaxer son énergie *via* des voies non radiatives. La formation du complexe est ainsi bien mise en évidence.

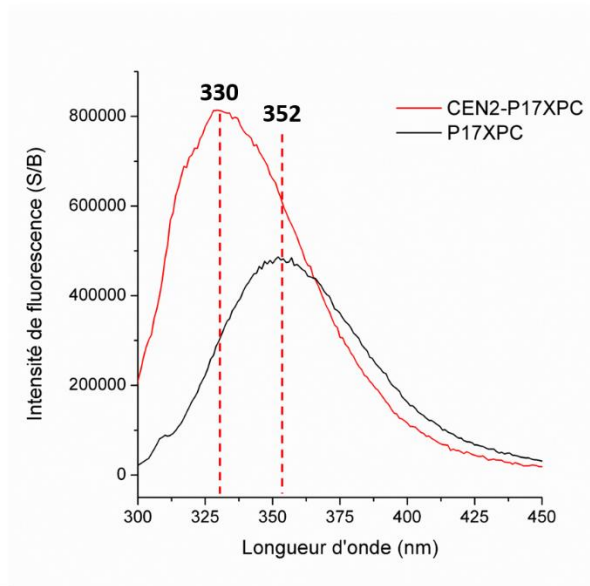


Figure 107: Spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{em} = 280$  nm) du peptide P17XPC et du complexe CEN2-P17XPC (1:1) auquel a été retranchée la contribution de la CEN2. Concentration =  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans un tampon phosphate pH 7,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Dans l'optique de compléter la caractérisation du complexe formé entre la centrine 2 humaine et P17XPC, des expériences de spectrométrie de masse en conditions natives ont été effectuées. Les conditions d'électrospray sont plus douces que celles utilisées lorsqu'une séparation chromatographique est effectuée en amont, ce qui permet également de préserver les liaisons non covalentes comme celle à l'origine du complexe considéré. Pour cette partie de l'étude de caractérisation, c'est la centrine 2  $\Delta 25$  qui a été considérée. Dans un premier temps, la centrine 2  $\Delta 25$  a été analysée isolée. Son spectre de masse est présenté en Figure 108 (a).

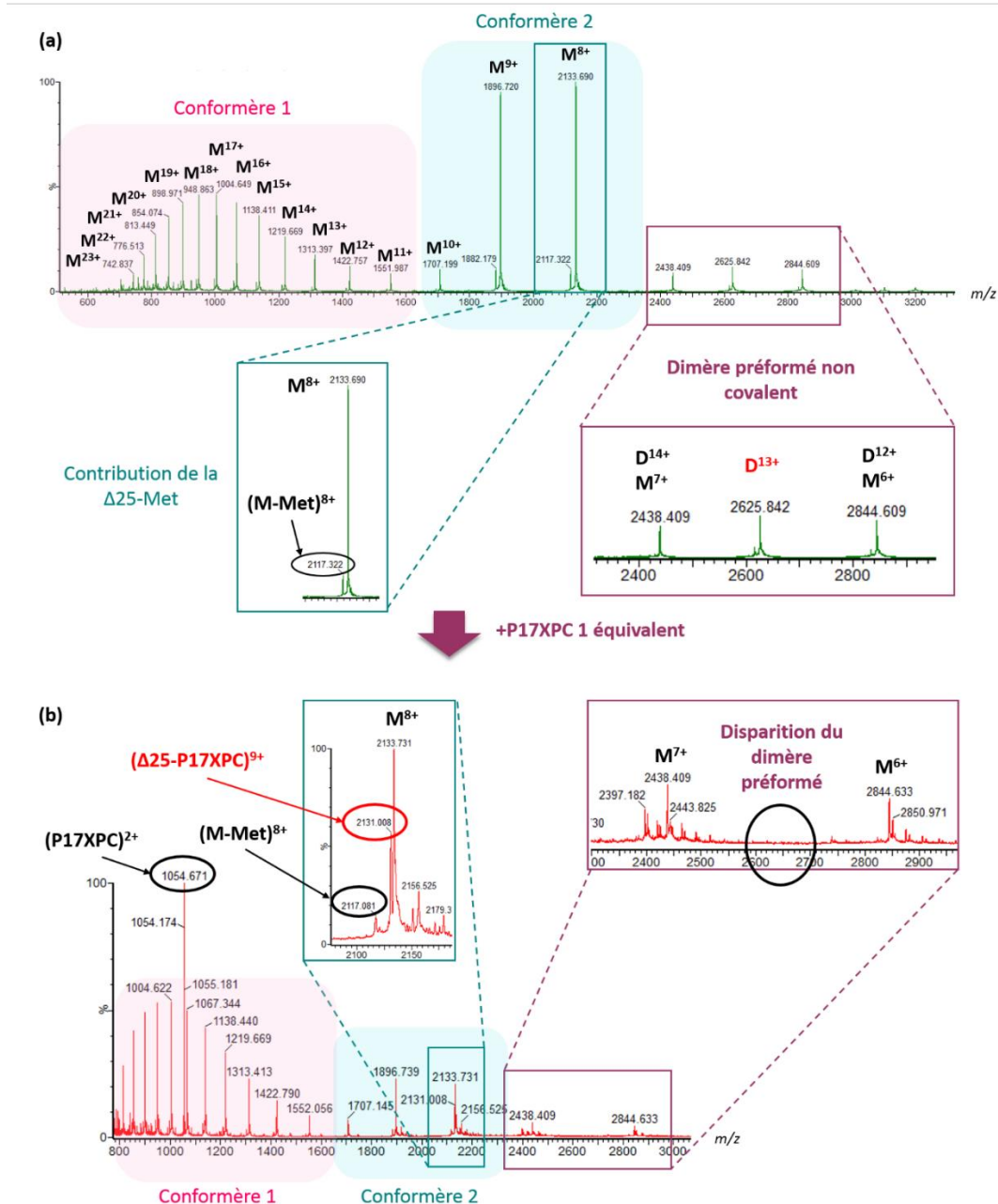


Figure 108: Spectres de masse natifs (a) de la CEN2 $\Delta$ 25 et (b) du complexe CEN2 $\Delta$ 25-P17XPC (1:1) à 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acétate d'ammonium. Les inserts sont des zones agrandies des spectres.

Deux distributions de charge  $y$  sont visibles : une première avec un état de charge maximum de +17 ( $m/z$  1004.6, fond rose) et une seconde pour laquelle l'état de charge maximum de +8 ( $m/z$  2133.7, fond bleu). L'observation de ces deux distributions témoigne de la présence de deux conformères de la protéine, dont l'existence avait déjà été évoquée (Craig *et al.*, 2006). Comme exposé dans l'encart bleu de la Figure 108, une contribution d'un rapport  $m/z$  inférieur est remarquée pour l'ensemble des états de charge : il s'agit de celle du monomère de « $\Delta$ 25-Met» alors que les pics observés correspondent en réalité à la  $\Delta$ 25 qui contient une méthionine supplémentaire en début de séquence.



Aux plus hauts rapports  $m/z$ , comme exposé dans l'encart violet de la Figure 108, les pics à  $m/z$  2438.409 et  $m/z$  2844.609 correspondent à un dimère non covalent de la protéine, chargé respectivement +14 ( $D^{14+}$ ) et +12 ( $D^{12+}$ ) dont les signaux sont confondus avec ceux du monomère chargé 7+ ( $M^{7+}$ ) et 6+ ( $M^{6+}$ ). Toutefois, pour un dimère non covalent de charge impaire, il n'y a pas d'interférences avec le monomère : le dimère chargé 13+ ( $D^{13+}$ ) est isolé et permet de mettre en évidence la présence d'un dimère non covalent préformé pour la protéine non irradiée. Le Tableau 25 recense les valeurs de  $m/z$  théoriques et expérimentales de la  $\Delta 25$ .

$\Delta 25$	$m/z$ monoisotopique théorique	$m/z$ moyen théorique	$m/z$ moyen expérimental
$M^{6+}$	2842.9232	2844.7551	2844.609
$D^{12+}$	2843.0071	2844.8391	2844.609
$D^{13+}$	2624.3918	2626.0828	2625.954
$M^{7+}$	2436.9352	2438.5054	2438.409
$D^{14+}$	2437.0072	2438.5774	2438.409
$M^{8+}$	2132.4442	2133.8182	2133.690
$M^{9+}$	1895.6179	1896.8392	1896.720
$M^{10+}$	1706.1568	1707.2560	1707.127
$M^{11+}$	1551.1432	1552.1425	1552.022
$M^{12+}$	1421.9652	1422.8813	1422.774
$M^{13+}$	1312.6608	1313.5063	1313.413
$M^{14+}$	1218.9712	1219.7564	1219.669
$M^{15+}$	1137.7736	1138.5065	1138.425
$M^{16+}$	1066.7257	1067.4128	1067.330
$M^{17+}$	1004.0364	1004.6831	1004.622
$M^{18+}$	948.3126	948.9233	948.836
$M^{19+}$	898.4544	899.0330	898.971
$M^{20+}$	853.5820	854.1317	854.074
$M^{21+}$	812.9832	813.5068	813.449
$M^{22+}$	776.0752	776.5750	776.525
$M^{23+}$	742.3766	742.8546	742.789

Tableau 25: Valeurs de  $m/z$  théoriques et expérimentales pour la  $\Delta 25$  en conditions natives.

Après avoir mis en évidence deux conformères de  $\Delta 25$  et l'existence d'un dimère préformé en solution, le complexe  $\Delta 25$ -P17XPC (1:1) est analysé dans les mêmes conditions. Le spectre de masse correspondant est présenté en Figure 108 (b). A  $m/z$  1054.671 est détecté le peptide P17XPC non complexé. Les deux conformères de centrine 2 sont toujours détectés. La contribution de la  $\Delta 25$ -Met est toujours visible, ici par exemple à  $m/z$  2117 ( $\Delta 25$ -Met) $^{8+}$ . En s'attardant sur l'encart vert de la Figure 108 (b), à  $m/z$  2131 apparait la contribution du complexe non covalent ( $\Delta 25$ -P17XPC) $^{9+}$ . Le Tableau 26 rassemble les valeurs de  $m/z$  théoriques et expérimentales permettant de rendre compte de la

formation du complexe  $\Delta 25$ -P17XPC. Concernant le dimère non covalent  $D^{13+}$ , il a disparu lors de l'introduction de P17XPC. L'affinité de la  $\Delta 25$  pour le peptide pourrait être plus importante que celle qu'elle a pour elle-même. Les deux conformères de centrine 2  $\Delta 25$  ne possèdent certainement pas la même affinité pour le peptide d'après leur variation d'intensité relative lors de l'ajout de P17XPC.

<b>[<math>\Delta 25</math>-P17XPC]</b>	<b><i>m/z</i> monoisotopique théorique</b>	<b><i>m/z</i> moyen théorique</b>	<b><i>m/z</i> moyen expérimental</b>
<b>[P17XPC]<sup>2+</sup></b>	1054.1706	1054.8257	1054.671
<b>[<math>\Delta 25</math>-P17XPC]<sup>7+</sup></b>	2737.9829	2739.7404	2739.535
<b>[<math>\Delta 25</math>-P17XPC]<sup>8+</sup></b>	2395.8610	2397.3987	2397.182
<b>[<math>\Delta 25</math>-P17XPC]<sup>9+</sup></b>	2129.7661	2131.1330	2130.927
<b>[<math>\Delta 25</math>-P17XPC]<sup>10+</sup></b>	1916.8902	1918.1205	1917.794
<b>[<math>\Delta 25</math>-P17XPC]<sup>11+</sup></b>	1742.7191	1743.8375	1743.587

Tableau 26: Valeurs de *m/z* théoriques et expérimentales du complexe  $\Delta 25$ -P17XPC en conditions natives.

L'ensemble des expériences menées dans cette partie amènent à la même conclusion : le complexe  $\Delta 25$ -P17XPC se forme dans les conditions d'oxydation utilisées. En ITC, la stœchiométrie et la constante d'équilibre d'association sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature. Le décalage de l'émission de fluorescence du tryptophane de P17XPC confirme son interaction hydrophobe avec la partie C-terminale de la protéine. La spectrométrie de masse permet de confirmer la complexation.

### VII.1.2. Dimérisation oxydative

Après avoir mis en évidence la formation d'un complexe non covalent entre les deux partenaires considérés, c'est leur comportement face à l'exposition à des radicaux oxydants qui va être étudié. Le complexe protéique (1:1) a été irradié à différentes doses entre 0 et 72 Gy en présence de  $N_3^{\bullet}$ . La Figure 109 expose le gel d'électrophorèse SDS-PAGE correspondant. Etant donné le faible poids moléculaire du peptide P17XPC, il ne peut être détecté sur le gel, il n'y est pas retenu. De même que lorsque la centrine 2 est exposée seule aux radicaux azoture, la principale dégradation oxydative est l'oligomérisation de la protéine mais l'apparition de nouvelles bandes est à noter. Dans l'encart vert de la Figure 109, deux bandes de poids moléculaire plus important que le monomère sont détectées et semblent distantes du même écart de masse l'une de l'autre. Ce gel ayant été réalisé dans des conditions dénaturantes, les bandes ainsi détectées correspondent à des assemblages moléculaires covalamment liés. L'hypothèse selon laquelle un pontage covalent s'effectuerait entre la centrine 2 humaine et le peptide issu de la XPC peut être faite.

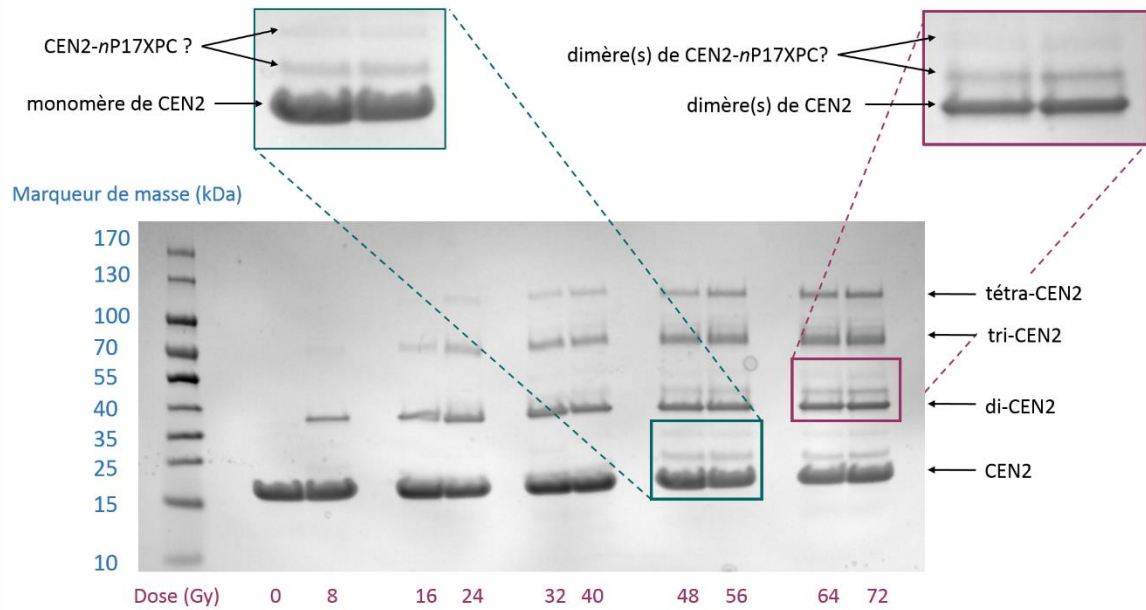


Figure 109: Gel d'électrophorèse SDS-PAGE du complexe CEN2-P17XPC irradié en présence de  $N_3^\bullet$  de 0 à 72 Gy.

L'existence de plusieurs bandes au-dessus de celle du monomère laisse à penser que deux entités du peptide P17XPC seraient susceptibles de se lier covalamment à un monomère de centrine 2 humaine. De même, l'encart violet de la Figure 109 met en avant la bande du dimère de centrine au-dessus de laquelle au moins deux bandes supplémentaires apparaissent en présence du peptide. Au niveau de la bande du trimère, à *minima* trois nouvelles bandes sont perceptibles et permettent de conforter l'hypothèse de pontages multiples entre les deux partenaires considérés.

Afin de valider la formation d'un pontage covalent entre la CEN2 et le P17XPC et d'en connaître la nature exacte, une analyse approfondie des produits formés sous irradiation a été effectuée. Le complexe protéique a été irradié à 40 Gy en présence de  $N_3^\bullet$  et digéré à la trypsine pour permettre l'obtention de peptides plus facilement analysables en UPLC-MS. Au niveau des clivages tryptiques concernant la centrine 2 humaine, les peptides tryptiques issus de la digestion ne sont pas rappelés ici mais toute la séquence a été retrouvée et le peptide  $^{169}\text{TSLY}^{172}$  est toujours le plus intense de ceux contenant la tyrosine. En ce qui concerne le P17XPC, le peptide tryptique contenant le tryptophane est composé de trois acides aminés :  $^{847}\text{NWK}^{849}$ . Le Tableau 27 présente les peptides tryptiques issus de la digestion de P17XPC dans le mélange CEN2-P17XPC.

Peptides tryptiques	Correspondance	Clivage manquant	$m/z$ théorique (monoisotopique)	$m/z$ expérimental (monoisotopique)
847-849	NWK	0	447.5172 <sup>+</sup>	447.240 <sup>+</sup>
850-853	LLAK	0	444.5982 <sup>+</sup>	444.317 <sup>+</sup>
854-858	GLLIR	0	571.7450 <sup>+</sup>	571.399 <sup>+</sup>
859-862	ERLK	1	545.6632 <sup>+</sup>	545.305 <sup>+</sup>
860-863	LKR	1	416.5470 <sup>+</sup>	416.303 <sup>+</sup>
847-853	NWKLLAK	1	873.0926 <sup>+</sup>	ND
			437.0500 <sup>2+</sup>	ND
850-858	LLAKGLLIR	1	997.3205 <sup>+</sup>	ND
			499.1640 <sup>2+</sup>	ND
			333.1118 <sup>3+</sup>	ND
854-860	GLLIRER	1	857.0499 <sup>+</sup>	ND
			429.0287 <sup>2+</sup>	ND

Tableau 27: Valeurs de  $m/z$  théoriques et expérimentales des peptides tryptiques de P17XPC issus de la digestion du mélange CEN2-P17XPC. ND: non détecté.

L'association covalente (-2H) des peptides tryptiques <sup>847</sup>NWK<sup>849</sup> de P17XPC et <sup>169</sup>TSLY<sup>172</sup> de la centrine 2 mène à la formation d'une espèce dont le  $[M+2H]^{2+}$  théorique possède un  $m/z$  à 464.2322. La Figure 110 (a) expose les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $464.25 \pm 0.05$  ( $[M+2H]^{2+}$ ). En comparant les chromatogrammes extraits à 0 et 40 Gy, l'apparition de six pics (nommés P<sub>1</sub> à P<sub>6</sub>) formés sous irradiation est à noter : quatre pics chromatographiques (P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>5</sub> et P<sub>6</sub>) d'une intensité de signal non négligeable et deux autres pics d'intensité plus faible (P<sub>1</sub> et P<sub>4</sub>). Leurs spectres de masse ont été extraits en Figure 110 (b). Les profils isotopiques de ces six espèces sont en accord avec un pontage covalent «NWK-TSLY» (P<sub>6</sub> semble co-éluer avec une autre espèce).

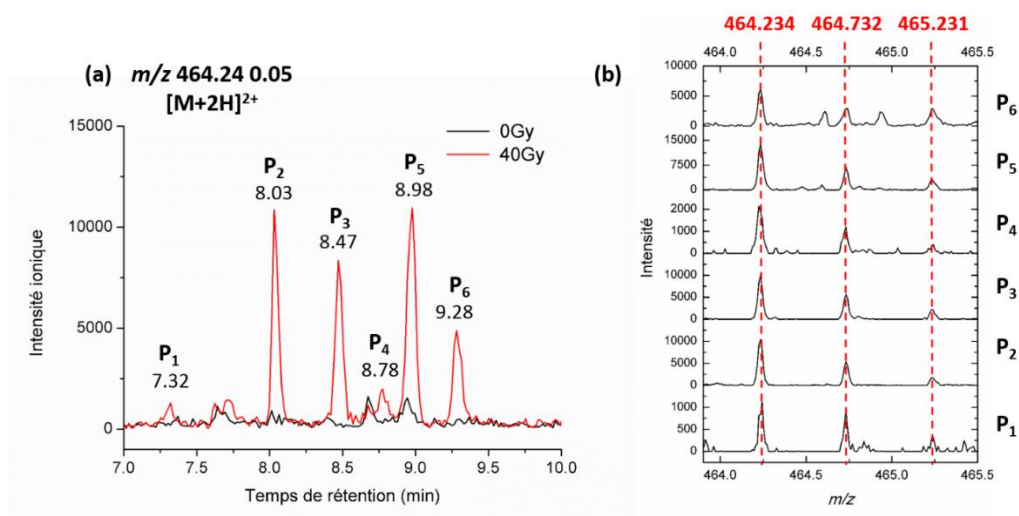


Figure 110: Dimères «NWK-TSLY» formés sous irradiation. (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $464.25 \pm 0.05$  pour le complexe CEN2-P17XPC irradié à 0 et 40 Gy en présence de  $N_3^+$ . Gradient chromatographique n°13 (Tableau 44). (b) Spectres de masse des pics P<sub>1</sub> à P<sub>6</sub> identifiés en (a).

Ainsi, la formation d'un accrochage covalent entre le fragment tryptique de la centrine 2 humaine qui contient la tyrosine et celui qui contient le tryptophane dans le peptide issu de la XPC est confirmée et vient corroborer l'hypothèse faite lors de la détection de nouvelles bandes sur le gel de la Figure 109. Au-delà de cette confirmation, c'est ici aussi la pluralité des espèces formées qui se doit d'être soulignée.

Afin de confirmer l'implication de la tyrosine de la centrine 2 et du tryptophane de P17XPC dans l'association covalente, des expériences d'UPLC-MS/MS ont été réalisées en sélectionnant le  $m/z$  du pontage précédemment mis en évidence ( $m/z$  464  $\pm$  1, énergie de collision= 30 eV). Les spectres de fragmentation ainsi obtenus sont présentés en Figure 111. Pour cinq des six pics (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>5</sub> et P<sub>6</sub>), le fragment à  $m/z$  321.12, attribué au pontage tyrosine-tryptophane qui a perdu 46 unités de masse (soit  $-[H_2O+CO]$ ), est détecté. La présence de ce fragment permet de confirmer la localisation du lien covalent radio-induit entre la centrine 2 humaine et P17XPC.

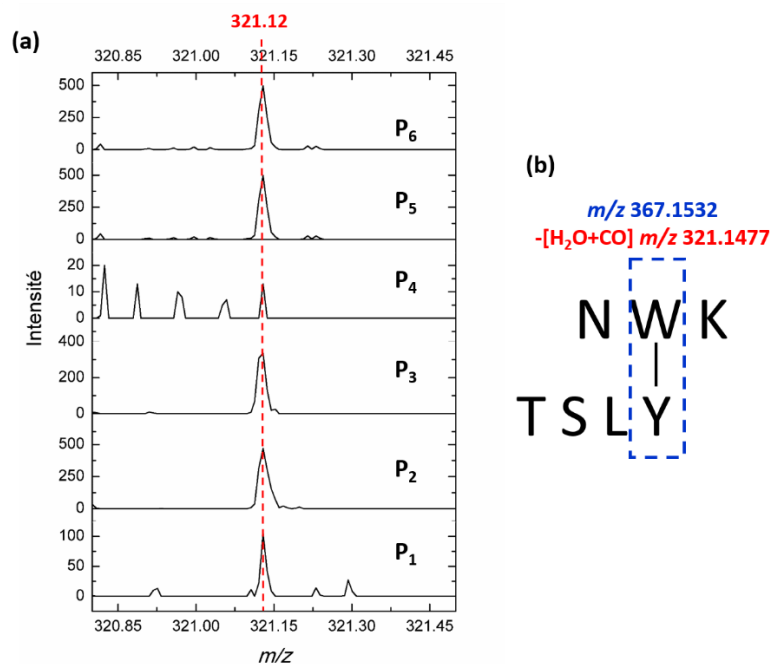


Figure 111: (a) Spectres de fragmentation (MS/MS), centrés en  $m/z$  321, des pontages covalents "NWK-TSLY" mis en évidence lors d'une irradiation à 40 Gy en présence de  $N_3^*$ . Énergie de collision : 30 eV,  $m/z$  sélectionné 464  $\pm$  1. (b) Localisation du fragment à  $m/z$  367.15 au sein du pontage covalent entre NWK et TSLY, caractéristique d'un accrochage entre le tryptophane et la tyrosine. Le fragment observé à  $m/z$  321.12 correspond à la perte de  $[H_2O+CO]$ .

Le spectre de fragmentation de P<sub>4</sub> présente une très faible contribution du pic à  $m/z$  321.12, son intensité ionique est typique de celle du bruit et il n'a donc pas été possible de conclure sur la nature exacte de cette espèce. Néanmoins, au moins cinq des six isomères du pontage covalent «NWK-TSLY» ont pu être clairement identifiés comme des ponts tyrosine-tryptophane.

Pour conclure sur l'étude du complexe CEN2-P17XPC, pour la première fois, la formation de pontages covalents induits sous irradiation entre les deux partenaires a été mise en évidence. Plusieurs isomères ont pu être séparés grâce à l'excellente résolution chromatographique et identifiés pour cinq d'entre eux comme des liens tyrosine-tryptophane. Dans le cadre de l'oxydation de la XPC3 isolée, plusieurs pontages proposés comme des liens tyrosine-tryptophane ont également été mis en évidence. A présent, un autre complexe protéique va être étudié : CEN2-XPC3. En effet, bien que le peptide P17XPC soit un modèle de la XPC utilisé dans la littérature, une séquence plus longue en acides aminés, la XPC3, est considérée. Elle possède pour rappel trois tryptophanes et une tyrosine. Le complexe CEN2-XPC3 sera tout d'abord caractérisé puis son comportement de dimérisation considéré. Cette partie essaiera de répondre aux questions suivantes : des liens covalents radio-induits sont-ils toujours formés entre les deux partenaires du complexe ? Le cas échéant, de quelle nature sont-ils ? La dimérisation de la centrine 2 est-elle toujours effective dans le cas du complexe CEN2-XPC3 ? Et celle de la XPC3 ?

## VII.2. Complexe CEN2-XPC3

### VII.2.1. Caractérisation

Contrairement au complexe CEN2-P17XPC, le complexe CEN2-XPC3 a été peu considéré dans la littérature. Sa formation a été caractérisée par spectroscopie de fluorescence, comme cela a été effectué pour le complexe CEN2-P17XPC. Alors que le peptide P17XPC ne contient qu'un résidu tryptophane, XPC3 en contient trois ( $^{825}\text{W}$ ,  $^{848}\text{W}$ ,  $^{904}\text{W}$ ) ainsi qu'une tyrosine ( $^{865}\text{Y}$ ). Ainsi, le signal de fluorescence résultant lors d'une excitation à 280 nm est la somme des contributions des différents tryptophanes. La tyrosine est également excitée à 280 nm mais elle fluoresce à environ 305 nm. Les spectres d'émission de fluorescence de la XPC3 isolée et du complexe CEN2-XPC3 (1:1), excités à 280 nm sont présentés en Figure 112. La XPC3 seule présente un maximum de fluorescence à  $\lambda_{em} = 353$  nm, même longueur d'onde que celle observé pour le peptide P17XPC isolé. En présence de CEN2, l'émission de fluorescence est légèrement décalée vers le bleu,  $\lambda_{em} = 347$  nm. Au sein du complexe CEN2-XPC3, le décalage du maximum de fluorescence observé en Figure 112 est donc moins marqué que dans le cas du P17XPC. En considérant que deux des trois tryptophanes fluorescent « classiquement » à 353 nm et que le troisième fluoresce à 330 nm, longueur d'onde d'émission du tryptophane dans le peptide P17XPC lors de l'interaction avec la centrine 2, alors la fluorescence moyenne est estimée à 345 nm, ce qui corrobore celle détectée à 347 nm. En effet, les tryptophanes  $^{825}\text{W}$  et  $^{904}\text{W}$  n'ont pas été proposés comme impliqués dans l'interaction avec la poche hydrophobe de la centrine 2 (*Charbonnier et al., 2007*), leur fluorescence ne devrait donc pas être modifiée. A *contrario*, le tryptophane impliqué dans l'interaction de faible énergie avec la centrine ( $^{848}\text{W}$ ) doit voir son environnement devenir plus hydrophobe, induisant un décalage de fluorescence, effectivement

observé. La fluorescence résultante du complexe est donc bien la somme de la fluorescence non modifiée pour deux des trois tryptophanes et d'une fluorescence décalée vers le bleu pour le troisième.

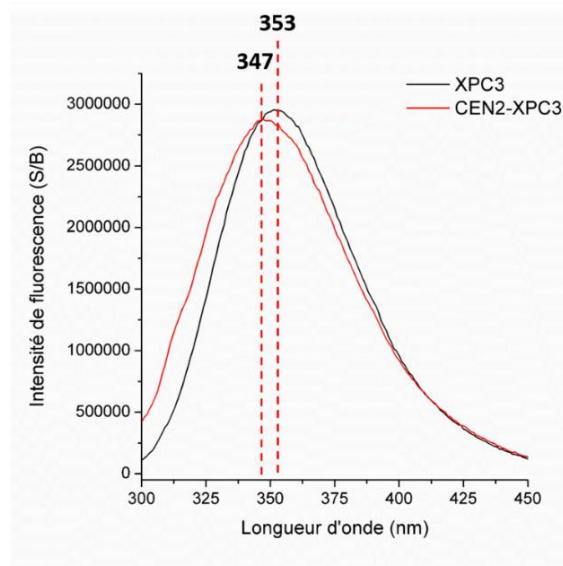


Figure 112: Spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc}= 280$  nm) de la protéine XPC3 et du complexe CEN2-XPC3 (1:1). Concentration  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans  $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de tampon phosphate.

Des expériences de spectrométrie de masse native pour révéler la formation du complexe non covalent entre CEN2 et XPC3 ont été réalisées. La Figure 113 expose les spectres de masse natifs du complexe XPC3-CEN2 pour un ratio 1:1 (a) et 1:9 (b) et le panel du bas est un agrandissement de la zone d'intérêt. Sur ces spectres, plusieurs massifs, sont attribués au complexe non covalent CEN2-XPC3 à différents états de charge (ronds violets). Le Tableau 28 recense les valeurs des  $m/z$  mesurés et calculés de l'association non covalente des deux protéines. Plusieurs autres massifs correspondent à la XPC3 plus ou moins chargée (triangles bleus, Figure 113). Quel que soit le ratio de XPC3 introduit par rapport à la CEN2, cette dernière n'a pas été détectée. L'hypothèse qui est faite est que la XPC3 s'ionise beaucoup plus efficacement que la CEN2. Plusieurs massifs isotopiques visibles sur les spectres de la Figure 113 n'ont pas été attribués. Toutefois, le complexe non covalent CEN2-XPC3 a été mis en évidence grâce à ces expériences en natif.

En 2010, Brun et al. ont montré par des expériences de titration calorimétrique isotherme que le complexe CEN2-XPC3 se forme spontanément en solution ( $\Delta G= -5.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) avec une stœchiométrie de 1 et une constante d'affinité d'environ  $5.10^8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Brun et al., 2010).



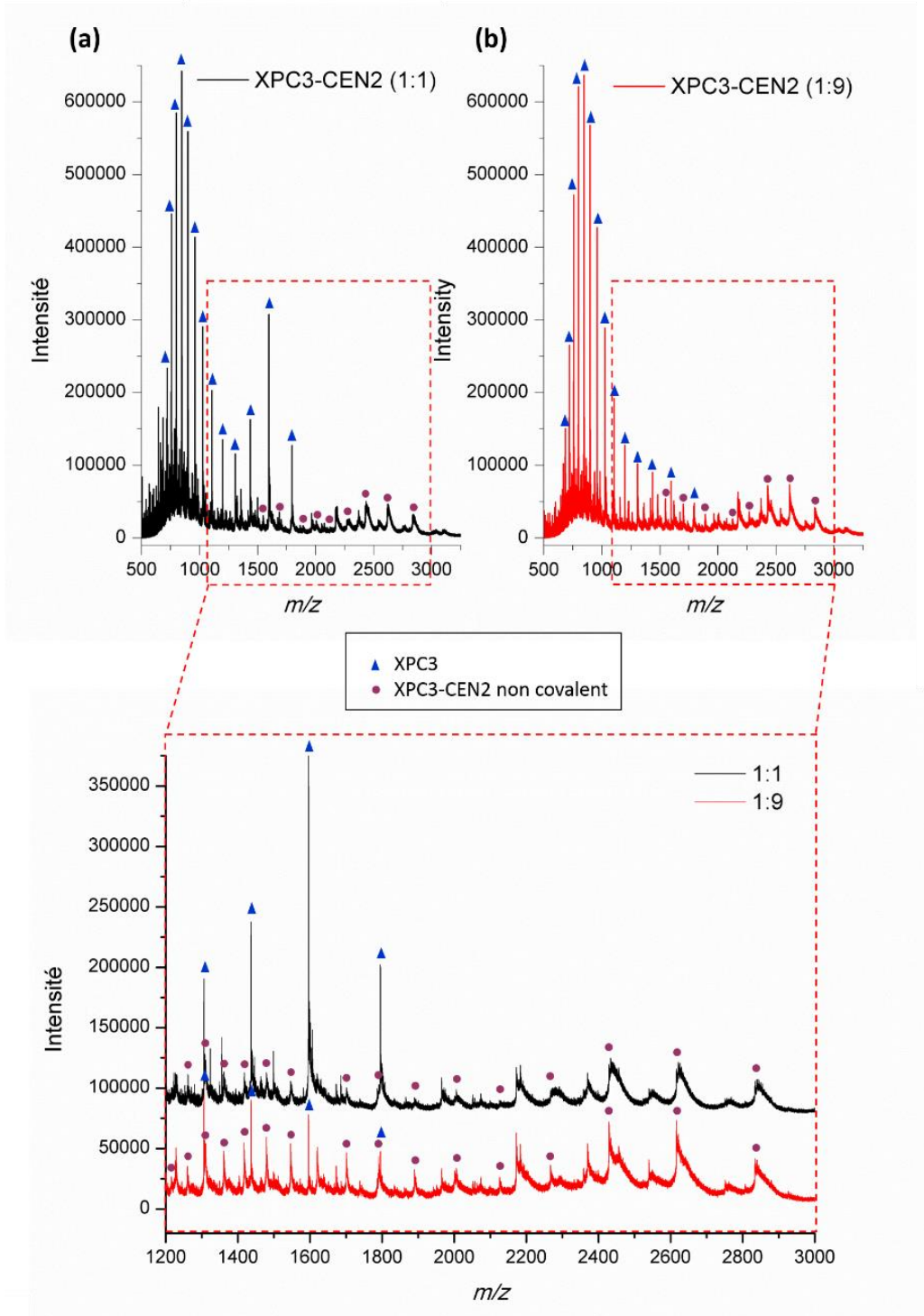


Figure 113: Spectres de masse natifs du complexe XPC3-CEN2 à différents ratios: (a) 1:1 et (b) 1:9. Le panel du bas est un agrandissement de la zone entre  $m/z$  1200 et  $m/z$  3000.



Etat de charge (+)	<i>m/z</i> monoisotopique théorique	<i>m/z</i> expérimental (m/z le plus intense)
12	2831.1745	2834.455
13	2613.4694	2616.315
14	2426.8650	2429.524
15	2265.1412	2267.419
16	2123.6328	2125.951
17	1998.7725	2001.123
18	1887.7856	1889.883
19	1788.4815	1790.509
20	1699.1078	1701.045
21	1618.2459	1620.066
22	1544.7351	1546.394
23	1477.6165	1479.231
24	1416.0912	1417.664
25	1359.4878	1360.960
26	1307.2386	1308.694
27	1258.8597	1260.330
28	1213.9364	1215.325
29	1172.1113	1172.990

Tableau 28 : Valeurs des *m/z* théoriques et expérimentales du complexe non covalent XP3-CEN2 en conditions natives.

### VII.2.2. Dimérisation oxydative

La CEN2 et la XPC3 ont été irradiées ensemble (1:1) en présence de  $N_3^*$  de 0 à 40 Gy. Un gel d'électrophorèse SDS-PAGE correspondant à leur irradiation simultanée de 0 à 40 Gy est présenté en Figure 114.

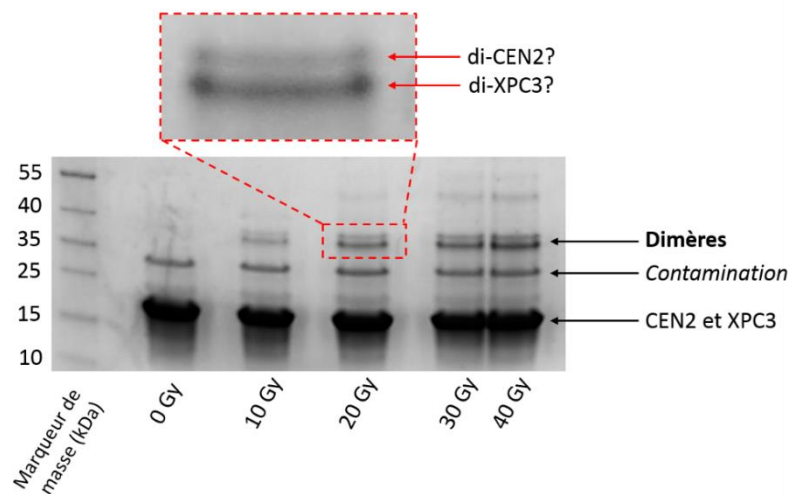


Figure 114: Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (4-15% acrylamide) du complexe CEN2-XPC3 irradié en présence de  $N_3^*$  de 0 à 40 Gy. L'encart en pointillés rouges est un agrandissement des bandes de dimères à 20 Gy.

La CEN2 et la XPC3 possédant des poids moléculaires assez proches l'une de l'autre, leur séparation à l'état de monomères n'est pas rendue possible avec ce gel et leur migration est attribuée à la bande diffuse qui migre entre 15 et 25 kDa. Dès 0 Gy, une bande d'un poids moléculaire entre 25 et 35 kDa est détectée et elle le reste tout au long de l'effet de dose : elle est assignée à une contamination présente dans l'échantillon de départ. A partir de 10 Gy, deux bandes très proches en masse, migrant entre 35 et 40 kDa sont formées et leur intensité est exaltée avec la dose d'irradiation : il s'agit de produits d'oxydation radio-induits. D'après leur masse, il semble s'agir d'espèces dimériques. Des homodimères (di-CEN2, di-XPC3) ayant été observés lors de l'étude des protéines isolées, une première hypothèse est que leur formation lors de l'irradiation simultanée des deux protéines subsiste. L'encart en pointillés rouges de la Figure 114 expose un agrandissement de ces deux bandes lors d'une irradiation à 20 Gy. La bande qui migre à un poids moléculaire plus faible que l'autre est aussi la plus intense. Sur la base des masses relatives de la CEN2 et la XPC3, il est attendu que le dimère de CEN2 migre au-dessus du dimère de XPC3 : la bande du dimère de XPC3 serait donc plus intense que celle du dimère de CEN2. Par analogie avec ce qui a été observé dans le cadre du complexe CEN2-P17XPC, il est également possible d'envisager la formation d'hétérodimères (CEN2-XPC3). Pour tenter d'aller plus loin dans l'élucidation de la nature de ces bandes de dimères, les protéines isolées irradiées ont été déposées sur le même gel, permettant une comparaison directe avec le cas du complexe. Aussi, un mutant de la CEN2 a été considéré en interaction avec XPC3 : il s'agit de la centrine 2 à laquelle la tyrosine terminale a été retirée, qui sera nommée CEN2 $\Delta$ Tyr. La Figure 115 présente le gel d'électrophorèse correspondant, toujours réalisé en conditions dénaturantes non réductrices (avec un pourcentage d'acrylamide différent du gel précédent). La CEN2 et la XPC3 ne sont toujours pas séparées à l'état monomérique. Néanmoins, en comparant les différentes conditions, il est visible que lorsqu'un complexe (CEN2-XPC3 ou CEN2 $\Delta$ Tyr-XPC3) est considéré, la bande qui migre entre 15 et 25 kDa semble plus diffuse que dans le cas de protéines isolées ce qui peut témoigner de la présence de deux protéines non séparées. Les comportements respectifs de la CEN2 et de la XPC3 isolées ont déjà été discutés dans ce manuscrit. Des dimères de CEN2 sont formés sous irradiation *via* la tyrosine terminale, ils sont effectivement détectés entre 35 et 40 kDa sur le gel de la Figure 115. Des dimères de XPC3 ont également été mis en évidence: tyrosine-tyrosine, tyrosine-tryptophane et tryptophane-tryptophane qui migrent aussi entre 35 et 40 kDa mais à une masse inférieure à celle du dimère de CEN2. Concernant le complexe CEN2-XPC3, dont les échantillons irradiés à 0 et 40 Gy ont été déposés sur le gel de la Figure 115, une bande légèrement diffuse possédant une masse proche de celle des dimères de CEN2 et de XPC3 est formée sous irradiation.

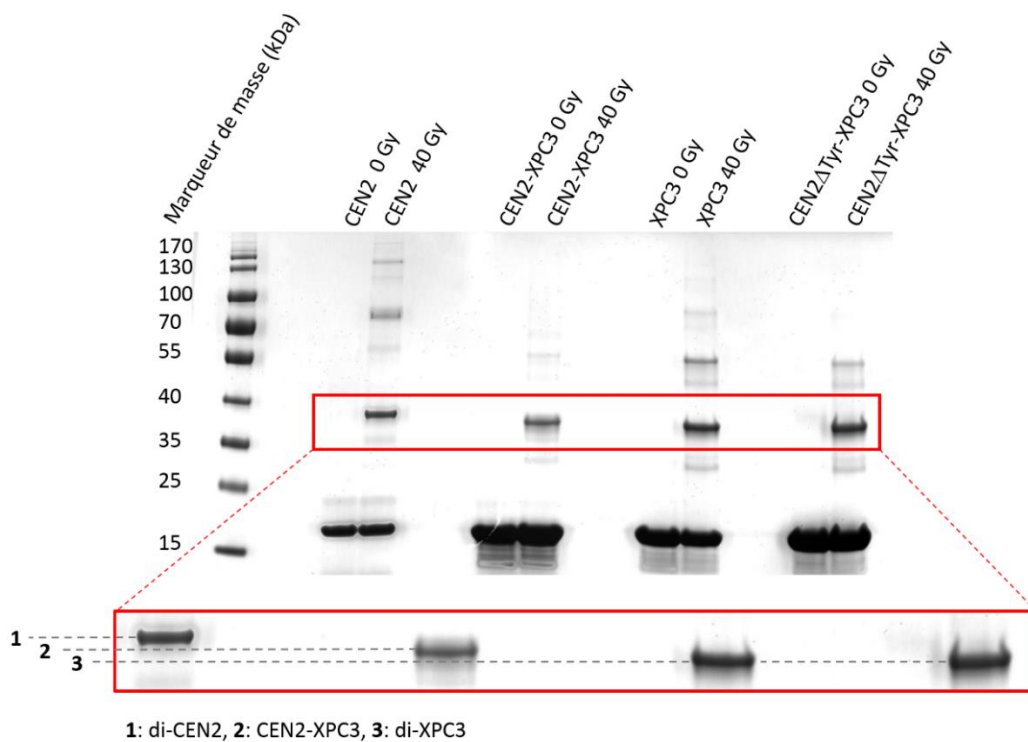


Figure 115: Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (12% acrylamide) de la CEN2 isolée, du complexe CEN2-XPC3, de la XPC3 isolée et du complexe CEN2 $\Delta$ Y-XPC3, irradiés à 0 et 40 Gy.

Ici, la séparation de deux bandes distinctes n'est pas visible comme elle l'était sur le gel de la Figure 114. Cette dissemblance est corrélée avec le changement du pourcentage d'acrylamide utilisé. La zone du gel correspondant à la migration des espèces dimériques a été agrandie dans l'encart rouge de la Figure 115, permettant de mettre en évidence que la masse de la bande formée semble intermédiaire aux masses des homodimères de CEN2 et XPC3. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les deux protéines se lient covalamment entre elles et forment un ou des hétérodimères peut être faite. La formation d'homodimères de CEN2 ne semble pas perdurer car aucune bande n'est détectée à sa masse dans le cas du complexe CEN2-XPC3 irradié. De manière intéressante, lorsque la CEN2 $\Delta$ Tyr est irradiée avec XPC3, la masse de la bande formée à 40 Gy migre à la même hauteur que celle du dimère de XPC3. La tyrosine de la CEN2, comme attendu, joue un rôle important dans la formation du pontage covalent entre la CEN2 et la XPC3. Il est essentiel de garder en tête que la résolution et la sensibilité des gels d'électrophorèse ne sont pas comparables avec celles qu'offrent les expériences d'UPLC-MS, c'est pourquoi la formation d'hétérodimères covalents CEN2-XPC3 sera investiguée ainsi que celle des homodimères (di-CEN2, di-XPC3) détectés dans les protéines isolées.

Les spectres d'émission de fluorescence du complexe CEN2-XPC3 irradié à 0 et 40 Gy sont présentés en Figure 116 lors d'une excitation à 320 nm. Le choix de cette longueur d'onde d'excitation

a déjà été explicité lors de l'étude de la XPC3 isolée : elle permet de s'affranchir de l'excitation des résidus tryptophane de la XPC3.

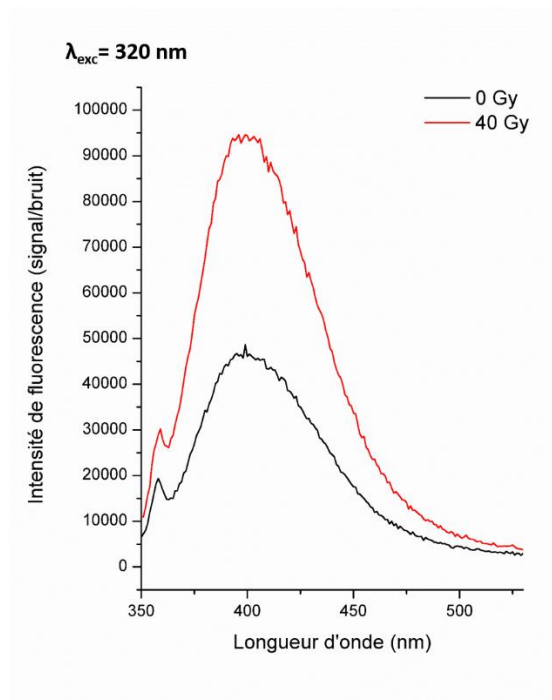


Figure 116: Spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) du complexe CEN2-XPC3 irradié à 0 et 40 Gy ( $N_3^*$ ).

Le signal Raman de l'eau est observé à 360 nm. Un signal d'émission de fluorescence est détecté avec un maximum vers 400 nm dès 0 Gy et l'intensité de ce signal augmente lors d'une irradiation à 40 Gy. L'observation d'une émission de fluorescence à 400 nm étant caractéristique de la présence de bi-tyrosine *ortho-ortho*, l'irradiation du complexe CEN2-XPC3 semble avoir mené à la formation de dimères liés *via* des résidus tyrosine. La présence du signal dès 0 Gy a déjà été discutée lors de l'étude de la XPC3 isolée (page 142). L'information à retenir reste néanmoins l'augmentation de ce signal sous irradiation, témoin de la formation de bi-tyrosine dans ce cadre. Ainsi, parmi les dimères formés lors de l'irradiation simultanée de la CEN2 et de la XPC3, des ponts tyrosine-tyrosine semblent formés.

Par analogie avec la stratégie mise en place pour l'élucidation des liens formés à l'échelle de protéines, le complexe CEN2-XPC3 a été irradié puis soumis à une digestion à la trypsine afin d'être analysé par UPLC-MS. Le gradient chromatographique a été adapté à l'étude du complexe CEN2-XPC3 et plus spécifiquement des dimères qui vont être investigués. La Figure 117 présente les chromatogrammes ioniques totaux et extraits pour certains  $m/z$  avec ce gradient optimisé. Parmi tous les peptides tryptiques issus de la digestion, ce sont ceux contenant les résidus tyrosine et tryptophane qui ont été spécifiquement désignés sur la Figure 117.

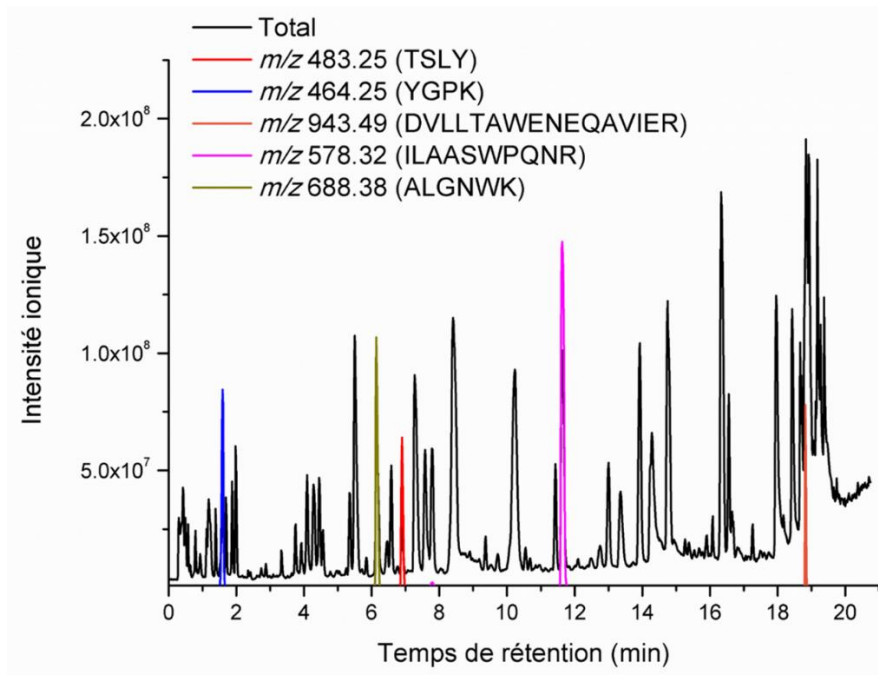


Figure 117: Chromatogrammes ionique total et extraits à  $m/z$  483.25  $\pm$  0.05 ( $[M+H]^+$  TSLY),  $m/z$  464.25  $\pm$  0.05 ( $[M+H]^+$  YGPK),  $m/z$  943.49  $\pm$  0.05 ( $[M+2H]^{2+}$  DVLLTAWENEQAVIER),  $m/z$  578.32  $\pm$  0.05 ( $[M+2H]^{2+}$  ILAASWPQNR) et  $m/z$  688.38  $\pm$  0.05 ( $[M+H]^+$  ALGNWK) du complexe CEN2-XPC3 non irradié. Les intensités des chromatogrammes extraits ont été multipliées par dix pour permettre de les distinguer du chromatogramme ionique total. Gradient chromatographique n°15 (Tableau 38).

Le Tableau 29 recense les valeurs de  $m/z$  théoriques et expérimentales de ces peptides tryptiques provenant des digestions de la CEN2 et de la XPC3 ainsi que leur temps de rétention sur les chromatogrammes de la Figure 117.

Protéine d'appartenance	Peptides tryptiques	$m/z$ monoisotopique théorique	$m/z$ monoisotopique expérimental	Temps de rétention (min)
CEN2	<sup>169</sup> TSLY <sup>172</sup>	483.2449 <sup>+</sup>	483.247 <sup>+</sup>	6.90
XPC3	<sup>865</sup> YGPK <sup>868</sup>	464.2504 <sup>+</sup>	464.247 <sup>+</sup>	1.59
	<sup>819</sup> DVLLTAWENEQAVIER <sup>834</sup>	1885.9654 <sup>+</sup>	1885.972 <sup>+</sup>	18.82
		943.4863 <sup>2+</sup>	943.489 <sup>2+</sup>	
	<sup>899</sup> ILAASWPQNR <sup>908</sup>	1155.6269 <sup>+</sup>	1155.635 <sup>+</sup>	11.63
		578.3171 <sup>2+</sup>	578.319 <sup>2+</sup>	
<sup>844</sup> ALGNWK <sup>849</sup>	688.3777 <sup>+</sup>	688.377 <sup>+</sup>	6.14	

Tableau 29: Valeurs de  $m/z$  des peptides tryptiques contenant les tyrosines et les tryptophanes des protéines CEN2 et XPC3.

La formation de dimères covalents entre les deux protéines du complexe a été investiguée. Le Tableau 30 présente les valeurs de  $m/z$  théoriques des dimères interprotéiques (CEN2-XPC3) tyrosine-tryptophane et tyrosine-tyrosine susceptibles d'être formés, ainsi que les  $m/z$  expérimentaux lorsqu'un dimère a été détecté.

Type de dimères	Peptides impliqués	$m/z$ monoisotopique théorique	$m/z$ monoisotopique expérimental
Y-W	$^{169}\text{TSLY}^{172-819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{83}$	$1183.5974^{2+}$	ND
		$789.4007^{3+}$	ND
		$592.3023^{4+}$	ND
		$474.0433^{5+}$	ND
	$^{169}\text{TSLY}^{172-844}\text{ALGNWK}^{849}$	$1168.5597^+$	ND
		$584.8035^{2+}$	ND
Y-Y	$^{169}\text{TSLY}^{172-865}\text{YGPK}^{868}$	$818.4281^{2+}$	ND
		$545.9545^{3+}$	ND
		$944.4724^+$	$944.481^+$
		$472.7398^{2+}$	$472.750^{2+}$
		$315.4956^{3+}$	$315.495^{3+}$

Tableau 30: Valeurs de  $m/z$  théoriques et expérimentales des dimères Y-W et Y-Y interprotéiques au sein du complexe CEN2-XPC3 irradié. ND : non détecté.

Aucun dimère tyrosine-tryptophane n'a été détecté lors d'une irradiation du complexe à 40 Gy en présence de  $\text{N}_3^*$  mais des pontages de bi-tyrosine ont été mis en évidence. En effet, l'association covalente des fragments tryptiques contenant respectivement les tyrosines ( $^{169}\text{TSLY}^{172}$  pour la CEN2 et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$  pour la XPC3) mène à un hétérodimère dont l'ion bichargé se trouve à  $m/z$  472.75. Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $472.75 \pm 0.05$  sont présentés en Figure 118 (a) : quatre pics chromatographiques sont détectés, l'un d'entre eux étant déjà présent à 0 Gy. Ainsi, trois pics semblent correspondre à des espèces issues du pontage covalent entre les deux fragments tryptiques. Les spectres de masse des trois pics formés sous irradiation sont exposés en Figure 118 (b) et sont en accord avec la formation d'une liaison covalente entre  $^{169}\text{TSLY}^{172}$  et  $^{865}\text{YGPK}^{868}$ .

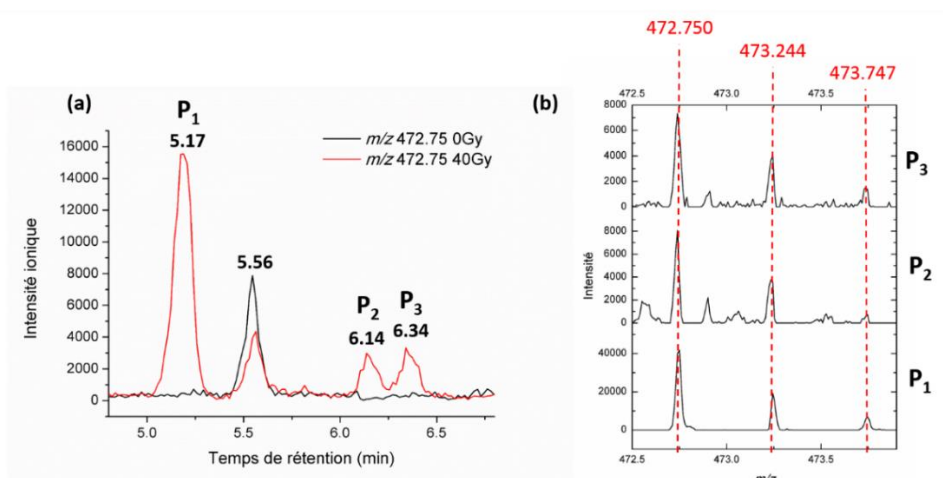


Figure 118: (a) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$   $472.75 \pm 0.05$  pour le complexe CEN2-XPC3 irradié à 0 et 40 Gy en présence de  $\text{N}_3^*$ . Gradient chromatographique n°15 (Tableau 38). (b) Spectres de masse des pics chromatographiques détectés en (a). Le pic à 5.56 min est également présent à 0 Gy, il ne s'agit pas d'un dimère  $^{169}\text{TSLY}^{172-865}\text{YGPK}^{868}$ .

Afin de confirmer la nature précise de la liaison radio-induite, des expériences d'UPLC-MS/MS ont été réalisées en sélectionnant le rapport  $m/z$  de l'accrochage précédemment évoqué à savoir  $m/z$   $473 \pm 1$ . Le spectre de fragmentation obtenu pour le pic élué à 5.17 min est présenté en Figure 119 (a).

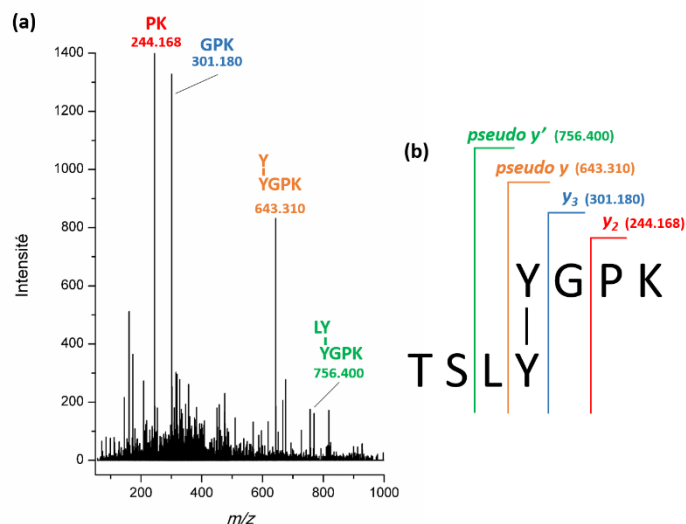


Figure 119: (a) Spectre de fragmentation MS/MS du pontage covalent "TSLY-YGPK" élué à 5.17 min dans la Figure 118. Ion précurseur  $m/z$   $473 \pm 1$ . Energie de collision= 25 eV. (b) Fragments  $y$  et *pseudo-y* mis en évidence sur le spectre de fragmentation.

Plusieurs fragments (rassemblés dans le Tableau 31 et illustrés en Figure 119 (b)) caractéristiques d'un pontage covalent entre deux tyrosines sont identifiés : les fragments  $y$  «GPK » à  $m/z$  301.18 et *pseudo-y* « Y-(YGPK) » à  $m/z$  643.31 permettent d'attribuer sans ambiguïtés cet accrochage à une liaison bi-tyrosine.

Fragments	Correspondance	$m/z$ théorique	$m/z$ expérimental
$y_2$	PK	244.1656 <sup>+</sup>	244.168 <sup>+</sup>
$y_3$	GPK	301.1870 <sup>+</sup>	301.180 <sup>+</sup>
<i>pseudo y</i>	Y YGPK	643.3086 <sup>+</sup>	643.310 <sup>+</sup>
<i>pseudo y</i>	LY YGPK	756.3927 <sup>+</sup>	756.400 <sup>+</sup>

Tableau 31: Fragments MS/MS du pic chromatographique élué à 5.16 min (pontage TSLY-YGPK)

Les deux autres espèces, éluées à 6.14 et 6.34 min, possèdent des intensités ioniques assez faibles à  $m/z$  472.75 ce qui rend plus difficile la détection de fragments sur leurs spectres MS/MS. Néanmoins, ils possèdent tous un fragment à  $m/z$  301.18, ce qui laisse à penser qu'il s'agisse également de ponts bi-tyrosine puisque les acides aminés GPK sont détectés et ne participent donc pas à la liaison covalente du côté de la XPC3. Au niveau des protéines isolées, il a déjà été mis en évidence que les

tyrosines respectives soient réactives aux radicaux azoture et soient donc à l'origine de la formation du lien covalent. Ainsi, lorsque le complexe formé de la CEN2 et de la XPC3 est oxydé avec  $N_3^*$ , trois isomères interprotéiques de bi-tyrosine ont pu être mis en lumière.

Des dimères intraprotéiques (désignés ici comme entre deux monomères d'une même protéine) ayant également été mis en évidence lors de l'oxydation des protéines isolées, ces derniers sont investigués dans le cadre du complexe CEN2-XPC3. Le Tableau 32 rassemble les  $m/z$  des dimères (Y-Y, Y-W et W-W).

Type de dimères	Peptides impliqués	$m/z$ monoisotopique théorique	$m/z$ monoisotopique expérimental
CEN2	$^{169}\text{TSLY}^{172}_{-169}\text{TSLY}^{172}$	$482.2371^{2+}$ [M+1] $482.7488^{2+}$	$482.240^{2+}$ [M+1] $482.738^{2+}$
	$^{865}\text{YGPK}^{868}_{-865}\text{YGPK}^{868}$	$463.2425^{2+}$	$463.242^{2+}$
	$^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}_{-844}\text{ALGNWK}^{849}$	$857.7782^{3+}$ $643.5855^{4+}$ $515.0699^{5+}$	ND ND ND
	$^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}_{-899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$	$1013.5280^{3+}$ $760.3978^{4+}$ $608.5197^{5+}$	ND ND ND
XPC3	$^{819}\text{DVLLTAWENEQAVIER}^{834}_{-865}\text{YGPK}^{868}$	$783.0691^{3+}$ $587.5537^{4+}$ $470.2444^{5+}$	$783.071^{3+}$ $587.554^{4+}$ ND
	$^{865}\text{YGPK}^{868}_{-899}\text{ILAASWPQNR}^{908}$	$808.9308^{2+}$ $539.6230^{3+}$ $404.9690^{4+}$	ND $539.615^{3+}$ ND

Tableau 32: Valeurs théoriques et expérimentales de  $m/z$  des dimères intraprotéiques (di-CEN2 et di-XPC3) Y-Y, W-W et Y-W lors d'une irradiation du complexe CEN2-XPC3 à 40 Gy ( $N_3^*$ ).

Une attention particulière sera portée aux cas des dimères de tyrosine (di-TSLY dans la CEN2 et di-YGPK dans XPC3) dont la formation sera comparée à celle au sein de la CEN2 et la XPC3 oxydées seules en solution avec le même gradient chromatographique que celui adapté à l'étude du complexe. La Figure 120 présente les chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$   $482.75 \pm 0.05$  ([M+2H+1] $^{2+}$ ) du dimère de TSLY et (b)  $m/z$   $463.25 \pm 0.05$  ([M+2H+1] $^{2+}$ ) du dimère de YGPK) pour le complexe CEN2-XPC3 et pour la protéine isolée correspondante (CEN2 ou XPC3) à chacun des cas.



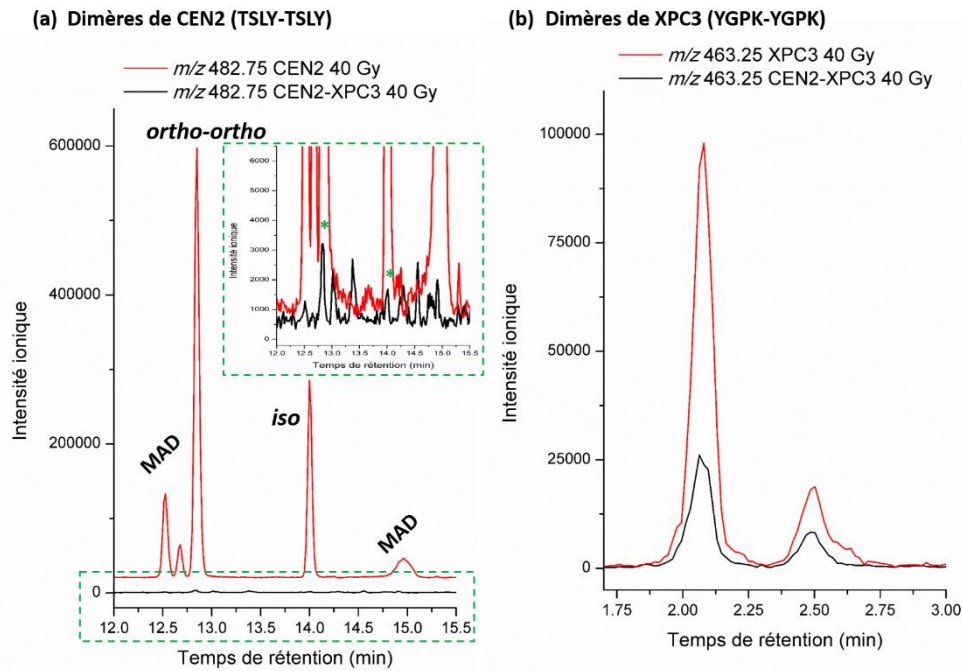


Figure 120: Chromatogrammes ioniques extraits à (a)  $m/z$  482.75  $\pm$  0.05 pour la CEN2 isolée et le complexe CEN2-XPC3 irradiés à 40 Gy en présence de  $N_3^*$  et (b)  $m/z$  463.25  $\pm$  0.05 pour la XPC3 isolée et le complexe CEN2-XPC3 irradiés à 40 Gy en présence de  $N_3^*$ . L'insert du panel (a) est un agrandissement de la zone en pointillés verts. Gradient chromatographique n°15 (Tableau 38).

Sur la Figure 120 (a) sont ainsi visibles les dimères de bi-tyrosine formés lorsque la centrine 2 est irradiée à 40 Gy seule en solution avec le même gradient. Dans le cas du complexe CEN2-XPC3 irradié, la formation de dimères du peptide tryptique  $^{169}\text{TSLY}^{172}$  est drastiquement réduite: il faut agrandir le chromatogramme ionique extrait (insert en pointillés verts de la Figure 120) pour déceler de faibles contributions aux temps de rétention des dimères *ortho-ortho* et *iso*. La formation de dimères entre la CEN2 et la XPC3 semble donc favorisée devant celle des dimères de CEN2. Il est possible que la structure 3D du complexe non covalent que forment la CEN2 et la XPC3 en solution favorise la formation de certains pontages covalents par rapport à d'autres. Sur la Figure 120 (b) sont extraits les pics de dimères du peptide tryptique  $^{865}\text{YGPK}^{868}$  au sein de la XPC3 seule ou complexée avec la CEN2 : dans les deux cas des dimères du peptide tryptique  $^{865}\text{YGPK}^{868}$  sont détectés. Pour le complexe CEN2-XPC3, l'intensité du signal d'ions est environ quatre fois plus faible que pour la XPC3 seule, ce qui corrobore la formation simultanée de dimères interprotéiques avec le fragment tryptique de la CEN2 ( $^{169}\text{TSLY}^{172}$ ).

Dans le cadre de l'oxydation du complexe CEN2-XPC3, aucun dimère W-W de la XPC3 n'a été détecté mais deux types de dimères Y-W (di-XPC3) ont été identifiés comme cela est rapporté dans le Tableau 32. Des pontages covalents interprotéiques (CEN2-XPC3) ayant été mis en évidence, il est cohérent que pour une même dose d'irradiation, certains produits d'oxydation détectés dans le cadre

de l'oxydation d'une protéine isolée ne le soient pas lorsque le complexe protéique est irradié. En effet, une même quantité de radicaux est produite au sein d'une solution contenant deux protéines à une même concentration.

### VII.3. Discussion

A travers l'exemple du complexe formé entre la centrine 2 et la XPC au sein du processus NER, la formation de pontages covalents interprotéiques a pu être investiguée lors d'une exposition à des radicaux oxydants. L'utilisation d'un peptide de 17 acides aminés, P17XPC, comme modèle de la XPC longue de 940 acides aminés, trouve sa limitation lorsque la réactivité du complexe est étudiée. La séquence de P17XPC limite inévitablement les réactions d'oxydation susceptibles de se produire sur la XPC entière. Ainsi, l'étude complexe CEN2-P17XPC a mené à l'observation d'au moins cinq pontages covalents entre une tyrosine et un tryptophane, hétérodimères souvent dépréciés dans la littérature en regard de la formation de bi-tyrosines. Cette mise en évidence est à corrélérer avec l'étude plus fondamentale de la formation d'isomères Tyr-Trp à l'échelle des acides aminés, menée dans le chapitre IV. Jusqu'à dix isomères différents avaient été détectés. La variation en nombre observée à ces deux échelles pourrait s'expliquer par l'augmentation des contraintes stériques lorsque la complexité des systèmes considérés augmente aussi. Comme cela a été proposé dans la discussion sur la dimérisation des protéines isolées, la nature des dimères formés pourrait être approfondie *via* la considération de peptides synthétiques dont les séquences sont choisies comme celle des peptides tryptiques identifiés dans ce chapitre. Les expériences d'irradiation dans D<sub>2</sub>O pourraient notamment permettre de statuer sur la présence de dimères impliquant des additions de Michael. Dans l'objectif de se rapprocher un peu plus des conditions physiologiques, une séquence plus longue de la XPC a donc été considérée, la XPC3, qui possède trois tryptophanes et une tyrosine. Ce sont des pontages tyrosine-tyrosine qui ont été mis en évidence dans ce cas. Tout comme à l'échelle de la XPC3 isolée, il est supposé que des transferts d'électrons Trp→Tyr aient lieu. La formation des radicaux tyrosyle (localisés sur la CEN2 et la XPC3) seraient médiée par un ou plusieurs des résidus tryptophane de la XPC3 qui réagissent en priorité avec le radical N<sub>3</sub><sup>•</sup>.

Plus généralement, quelle que soit leur nature, à travers ces études, il a pu être montré que des accrochages covalents sont formés entre les deux partenaires du complexe. Les études ont été menées avec le radical azote, qui a permis d'isoler les processus de dimérisation *via* les acides aminés aromatiques. A présent, il est indispensable de considérer une oxydation par le radical hydroxyle, qui est physiologique. Comme <sup>•</sup>OH peut attaquer l'ensemble des acides aminés, il faudra certainement considérer des doses d'irradiation beaucoup plus importantes, pour qu'une quantité équivalente en radicaux à celle de N<sub>3</sub><sup>•</sup> attaque les tyrosines et les tryptophanes. Aussi, la pertinence de P17XPC a déjà été discutée mais qu'en est-il de celle de XPC3 ? Bien qu'elle ait permis de complexifier le système

d'étude, sa séquence est encore très éloignée de celle de la XPC entière qui contient 23 tyrosines et 10 tryptophanes. L'étude du complexe CEN2-XPC, qui est biologiquement pertinent, serait très intéressante à considérer mais elle nécessiterait la production de la XPC dans son entièreté. Les pontages identifiés persisteraient-ils avec la protéine entière ? De plus, le complexe formé entre la CEN2 et la XPC fait aussi intervenir d'autres « partenaires », comme la protéine Rad23B et l'ADN lésé. En ajoutant des partenaires supplémentaires dans l'étude de dimérisation *in-vitro*, les mêmes pontages seraient-ils observés ? La protéine Rad23B se lierait-elle de manière covalente à XPC ? L'étude de complexes de plus en plus proches de la réalité de la cellule pourraient assurer la continuité progressive vers l'approche *in-cellulo*. D'ailleurs, la question qui se pose est la suivante : les pontages covalents observés *in-vitro* sont-ils formés *in-cellulo* ? Le chapitre VIII proposera une approche à l'échelle de cellules humaines.

Les pontages covalents mis en évidence entre le centrine 2 et les fragments de la XPC ont été induits sous irradiation gamma. La question qu'il convient de se poser est la suivante : peut-on transposer la formation de ces pontages lors d'une oxydation induite avec une irradiation UV ? La formation de bi-tyrosine sous rayonnement UV a déjà été rapportée *in-vitro* (Lehrer & Fasman, 1967; Malencik & Anderson, 2003; Correia et al., 2012). Il a été proposé que le radical tyrosyle TyrO\* soit formé par photoionisation (Neves-Petersen et al., 2009). Les dimères de tyrosine observés dans ce contexte d'oxydation sont-ils les mêmes que ceux observés lors d'une irradiation  $\gamma$  ? Sur la base de la formation du radical TyrO\*, les mêmes dimères sont attendus. En faisant l'hypothèse que les mêmes pontages soient formés lors d'une irradiation  $\gamma$  et sous UV, serait-il possible de faire un lien entre un potentiel complexe covalent CEN2-XPC et la localisation concomitante de la CEN2 et de la XPC au noyau lors de dommages à l'ADN formés sous UV ? Le niveau d'expression et la localisation cellulaire de la CEN2 ayant été montrés comme dépendants de la présence de XPC, il peut être suggéré que leur association covalente soit liée à la modification subcellulaire observée lorsque l'ADN est endommagé (Acu et al., 2010; Renaud, 2008). De plus, il a été rapporté que la XPC est également impliquée dans une autre voie de réparation de l'ADN que le NER, le BER (réparation par excision de bases) (Nemzow et al., 2015). Or, le BER intervient pour la réparation des lésions telles que celles induites par les rayonnements ionisants (cassures simples brins, oxydation de bases...).

# VIII. VERS UNE ANALYSE *IN-CELLULO* DE LA DIMERISATION OXYDATIVE DE LA CENTRINE 2 HUMAINE

---

## VIII.1. Introduction

Dans le contexte d'interaction au sein du processus NER de la centrine 2 et de la XPC, il a été mis en évidence que la localisation subcellulaire de la centrine 2 est dépendante de la XPC lorsque des dommages sont induits à l'ADN (Acu et al., 2010). La centrine 2 semble se « déplacer » du cytoplasme vers le noyau de manière XPC-dépendante. L'induction de dommages à l'ADN, par irradiation UV ou  $\gamma$  (Acu et al., 2010; Renaud et al., 2011) impliquant notamment la formation d'espèces réactives de l'oxygène, soumet donc les cellules à un phénomène de stress oxydant. La question de la formation de pontages covalents entre la CEN2 et la XPC *in-cellulo* dans ces conditions se pose alors. Dans cette partie, l'objectif est de répondre à la question qui suit : l'irradiation  $\gamma$  de cellules humaines induit-elle la formation de pontages covalents ? Plus précisément, c'est la formation de dimères de centrine 2 qui sera investiguée. Pour mener à bien cette étude, il est tout d'abord nécessaire de s'assurer que la centrine 2 humaine à l'état monomérique puisse être détectée à un niveau endogène. En effet, les concentrations *in-cellulo* sont largement inférieures à celles considérées lors des études *in-vitro*. L'utilisation de techniques plus sensibles et/ou d'étapes de préparation d'échantillons sont requises. Assez classiquement, c'est dans un premier temps à travers la réalisation de Western-Blots avec des anticorps anti-centrine 2 que cette dernière et ses éventuels oligomères ont été investigués. Dans un second temps, deux approches d'enrichissement des extraits protéiques ont été considérées avec pour objectif final l'analyse par UPLC-MS de la centrine 2 et de ses potentiels produits d'oxydation *in-cellulo* : l'immunoprécipitation et la précipitation des protéines au sulfate d'ammonium.

Au cours de cette étude, deux lignées cellulaires qui expriment la centrine 2 humaine ont été considérées : les MDA-MB-231 et les MCF-7. Elles correspondent aux deux types de cellules de cancer du sein étudiées par Acu et al. (Acu et al., 2010). MCF-7 correspond à un stade précoce de cancer dont le phénotype a conservé des points de contrôle du cycle cellulaire médiés par p53. A l'inverse, les MDA-MB-231 correspondent à un stade de cancer plus agressif pour lequel ces points de contrôle ont été perdus et qui présente une forte instabilité génomique (Price et al., 1990; Levenson & Jordan, 1997; D'Assoro et al., 2008). Comme cela déjà été évoqué, les MDA-MB-231 sont déficientes en XPC,

partenaire identifié de la centrine 2. L'intérêt initial de considérer ces deux lignées est de pouvoir comparer le comportement de la centrine 2 dans des cellules pourvues ou non de XPC.

A partir des cultures, les protéines ont été extraites selon un protocole classique, schématisé en Figure 121. Les cellules étant adhérentes, elles sont d'abord décollées de leur contenant par l'action de la trypsine, puis isolées de leur milieu de culture par centrifugation. Le culot cellulaire alors récupéré est mis en contact avec le tampon d'extraction, une solution hypotonique qui a pour but de lyser les cellules par choc osmotique. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et la fraction soluble résultante contient les protéines.

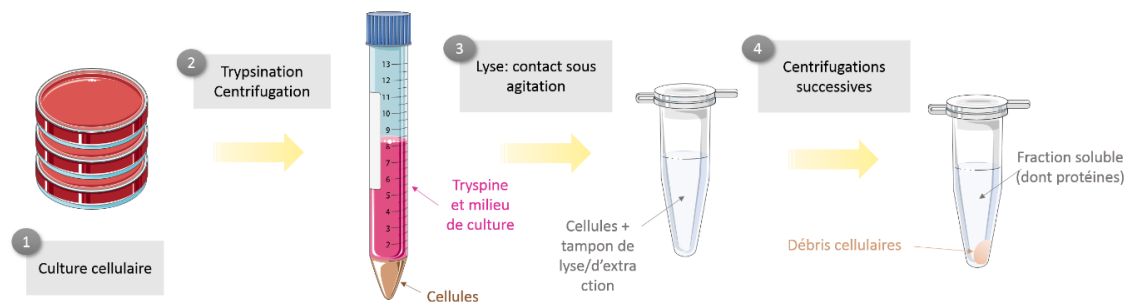


Figure 121: Représentation schématique du protocole d'extraction des protéines à partir d'une culture cellulaire.

Au cours de cette étude, jusqu'à cinq anticorps anti-centrine 2 différents ont été considérés. Aucun des anticorps commerciaux anti-centrine 2 n'a fait l'objet d'une utilisation en Western-Blot dans des publications. Les équipes s'étant intéressées à la détection de centrine 2 *in-cellulo* ont principalement utilisé des anticorps « à façon » et isolé les bandes d'intérêt sans montrer l'intégralité des membranes (Salisbury et al., 2002; D'Assoro et al., 2008). Il a donc tout d'abord convenu de s'intéresser à leur sensibilité et leur spécificité sur des échantillons de centrine 2 purifiée (*in-vitro*) puis sur des extraits cellulaires. Les cinq anticorps susceptibles d'être considérés sont présentés dans le Tableau 33. Tous sont commercialisés comme permettant une utilisation en Western-Blot (WB) et un seul pour des expériences d'immunoprécipitation (IP). Dans le cas où il a été spécifié par le fournisseur, le domaine reconnu au sein de la séquence de la protéine est précisé dans le Tableau 33.

Nom de l'anticorps	Type d'anticorps	Applications	Domaine reconnu
<b>ab196554 (Abcam)</b>	Polyclonal	<b>WB</b> , IF, IHC, ICC	Non spécifié
<b>CST 2091 (Cell Signaling)</b>	Polyclonal	<b>WB</b>	N-ter
<b>PA5-80470 (Invitrogen)</b>	Polyclonal	<b>WB</b> , ELISA, IF, ICC	Non spécifié
<b>ab229538 (Abcam)</b>	Polyclonal	<b>WB</b>	N-ter
<b>sc293192 (Santa Cruz)</b>	Monoclonal	<b>WB</b> , <u>IP</u> , ELISA	C-ter

Tableau 33: Liste des anticorps anti-centrine 2. WB : western-blot, IF : immunofluorescence, IHC : immunohistochimie, ICC : immunocytochimie, IP : immunoprécipitation, ELISA : test d'immunoabsorption enzymatique.

Chacun des anticorps a été testé dans différentes conditions. Plusieurs paramètres ont pu être modifiés: la solution permettant le blocage de la membrane (solution saturée en *Bovine Serum Albumin* (BSA) ou en lait), la dilution de l'anticorps primaire mais aussi du secondaire et enfin le type d'échantillons sur lequel il a été utilisé (*vitro/cellulo*). L'ensemble des conditions testées est rassemblé dans le Tableau 34. Deux anticorps parmi les cinq (ab196554 et CST 2091) ont présenté une réponse relativement sensible et spécifique mais une forte dépendance inter-lots a été mise en évidence, complexifiant alors la continuité de leur utilisation tout au long de cette thèse.

Nom de l'anticorps	Application	Blocage membrane	Dilution AC 1 <sup>aire</sup>	Dilution AC 2 <sup>aire</sup>	Types d'échantillons
<b>ab196554</b>	WB	BSA/lait	1/500 1/550 1/1000 1/2000	1/2000	<i>vitro/cellulo</i>
<b>CST 2091</b>	WB	BSA/lait	1/500 1/550 1/1000 1/2000	1/2000	<i>vitro/cellulo</i>
<b>CST 2091</b>	IP		1/100		<i>vitro</i>
<b>PA5-80470</b>	WB	BSA	1/500 1/1000	1/2000 1/5000	<i>vitro</i>
<b>ab229538</b>	WB	BSA/lait	1/1000 1/2000 1/2500 1/4000 1/5000 1/10000	1/2000 1/10000	<i>vitro/cellulo</i>
<b>sc293192</b>	WB	lait	1/500	1/10000	<i>vitro/cellulo</i>
<b>sc293192</b>	IP		1/100		<i>vitro/cellulo</i>

Tableau 34: Conditions d'utilisation des anticorps anti-centrine 2.

### VIII.2. Détection de centrine 2 humaine par Western-Blot

Au début de l'étude de détection de la centrine 2 au sein d'extraits cellulaires, il a été convenu de vérifier la réponse des anticorps alors disponibles au laboratoire (ab196554 et PA5-80470) d'un point de vue de leur spécificité. Pour ce faire, des échantillons de centrine 2 mais aussi de centrine 3 et de calmoduline recombinantes ont été déposés sur Western-Blot. Ces protéines possédant des séquences proches, la spécificité des anticorps pourra être interrogée : la centrine 3 possède 57.6% de similarité de séquence avec la centrine 2 et la calmoduline 52.4%. Les membranes résultantes à la suite d'une révélation par chimiluminescence sont présentées en Figure 122. L'utilisation de l'anticorps ab196554 permet la détection de la centrine 2 et de ses oligomères mais cet anticorps ne reconnaît ni la centrine 3 ni la calmoduline. *A contrario*, avec l'anticorps PA5-80470, la centrine 3 et ses oligomères sont distinctement reconnus. Sur les pistes contenant la calmoduline, des bandes sont visibles surtout pour l'échantillon irradié. Ainsi, par une simple analyse d'échantillons *in-vitro*, l'anticorps PA5-80470 peut être exclu pour une utilisation *in-cellulo*. Il est intéressant de noter que l'anticorps ab196554 semble reconnaître plus efficacement le dimère de centrine 2 que le monomère pour l'échantillon oxydé. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce dernier reconnaisse le domaine N-terminal de la centrine 2 et comme l'oligomérisation de celle-ci a lieu *via* la tyrosine C-terminale, les domaines N-terminaux sont disponibles pour la reconnaissance par l'anticorps. Ainsi, sur une molécule de dimère, deux anticorps sont susceptibles d'être fixés ce qui peut expliquer la sensibilité accrue avec l'oligomérisation. Cette sensibilité exaltée de l'anticorps pour le dimère se trouve être un atout de taille pour la recherche de ce dernier dans des échantillons issus d'extractions cellulaires. En effet, au sein de ces échantillons, la centrine 2 est présente à de très faibles concentrations, de l'ordre du  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Or, si un dimère de centrine 2 est formé lors d'une oxydation, sa concentration y sera encore inférieure.

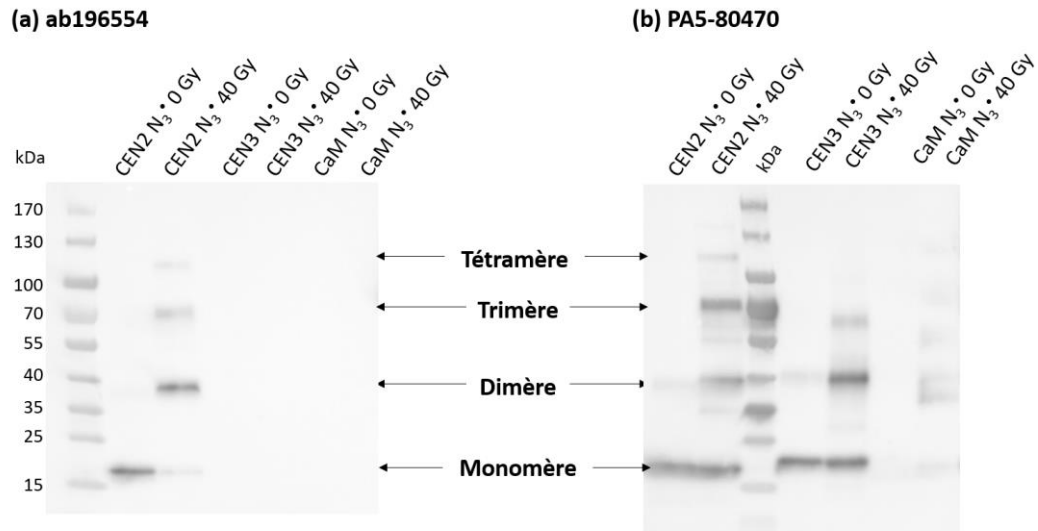


Figure 122: Western-blots d'échantillons *in-vitro* de CEN2, CEN3 et CaM recombinantes irradiées à 0 et 40 Gy ( $N_3^*$ ) et détectés avec deux anticorps anti-centrine 2 polyclonaux (a) ab196554 et (b) PA5-80470 (dilutions 1/1000). Anticorps secondaire : Anti-lapin CST 7074 (dilution 1/5000). Blocage TBST à 5% BSA. Quantités de protéines déposées par piste  $\approx$  150 ng.

L'anticorps anti-centrine 2 ab196554 ayant permis de détecter la centrine 2 recombinante sans pour autant reconnaître des protéines possédant des séquences proches, il a été choisi pour vérifier sa capacité à détecter la centrine 2 au sein d'un extrait cellulaire. Sur une même membrane ont ainsi été déposés des échantillons de centrine 2 *in vitro* irradiée à 0 et 40 Gy ( $N_3^*$ ) et un extrait protéique issu de cellules humaines de cancer du sein (MDA-MB-231). Cette membrane est présentée en Figure 123.

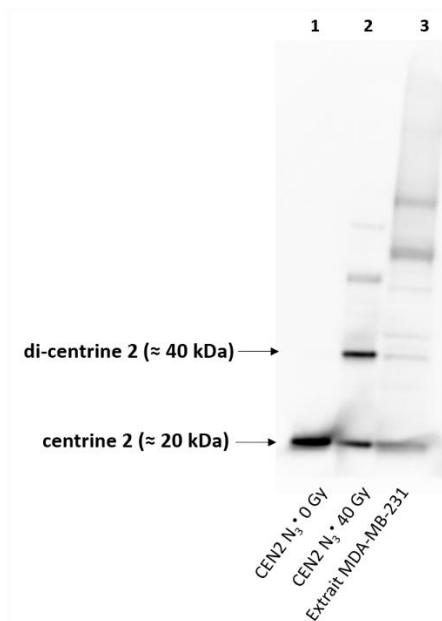


Figure 123: Western-blot d'échantillons *in-vitro* de CEN2 recombinante irradiée à 0 et 40 Gy ( $N_3^*$ ) et d'un extrait protéique provenant d'une culture de cellules MDA-MB-231, extraite avec le tampon d'extraction NP-40. Blocage TBST 5% BSA. Anticorps primaire: ab196554 (dilution 1/500). Anticorps secondaire : Anti-lapin CST 7074 (dilution 1/2000). Quantités de protéines purifiées déposées par piste  $\approx$  45 ng. Quantités de protéines totales déposée pour l'extrait par piste  $\approx$  45  $\mu$ g.



Comme cela avait déjà été observé précédemment, la protéine et ses oligomères sont très bien détectés *in-vitro* (pistes n°1 et 2). Au sein de l'extrait cellulaire également (piste n°3), une bande est bien détectée à la masse de la centrine 2 humaine. L'intensité relative de la bande en regard de celle de la piste n°1 de centrine 2 purifiée permet d'estimer une quantité de centrine 2 dans l'extrait à 15 ng ce qui correspond à environ 0.03 % de la quantité en protéines totales déposées. Sur la piste correspondante à l'extrait, d'autres protéines sont aussi détectées, notamment à des poids moléculaires assez importants. De manière intéressante, à la masse du dimère de centrine 2, une bande est détectée sur la piste de l'extrait cellulaire. Deux hypothèses peuvent être alors envisagées. Soit cette bande correspond effectivement à un dimère de centrine 2 : bien que les cellules n'aient pas été irradiées, comme il s'agit de cellules cancéreuses, il est possible d'envisager que la centrine 2 ait été oxydée et se présente sous formes d'oligomères. La seconde hypothèse est que la bande détectée corresponde à une autre protéine non spécifique dont le poids moléculaire est voisin de celui du dimère de centrine 2. Le Western-Blot de la Figure 123 constituait une expérience préliminaire pour vérifier la capacité de l'anticorps ab196554 à détecter la centrine 2 monomérique *in-cellulo*. Suite à sa détection effective au sein d'un extrait, différents tampons d'extraction des protéines ont été testés dans le but d'optimiser l'extraction de la centrine 2.

Trois tampons d'extraction ont été utilisés pour réaliser l'extraction des protéines dans les cultures de MDA-MB-231 : les tampons NP-40, RIPA et TRITON. Afin de comparer leur efficacité d'extraction de la centrine 2, la membrane sur laquelle ont été déposés les trois différents extraits a été exposée à l'anticorps anti-centrine 2 ab196554. De plus, il a semblé intéressant d'exposer la membrane aux anticorps de deux protéines respectivement exprimées dans le noyau et le cytoplasme de toute cellule : la lamine B2 (anticorps primaire CST D8P3U) et la tubuline (anticorps primaire ab6161). En effet, bien que la centrine 2 soit principalement contenue dans le centrosome, organelle du cytoplasme, dans le contexte de son interaction avec la protéine XPC lors de dommages à l'ADN, elle est susceptible d'être délocalisée au noyau. Il est donc nécessaire de s'assurer que les protéines cytoplasmiques et nucléaires soient extraites dans l'hypothèse où la localisation de la centrine 2 évolue lors de l'irradiation  $\gamma$  par exemple. Sur la Figure 124 sont présentées les trois membranes.

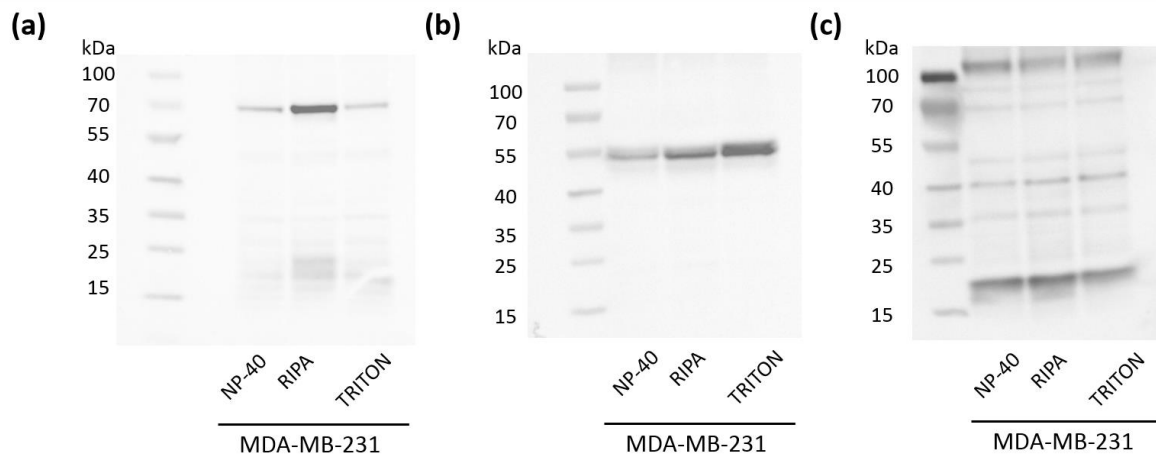


Figure 124: Western-blots d'extraits cellulaires de MDA-MB-231, extraits avec trois tampons différents: NP-40 (87  $\mu$ g de protéines totales déposés), RIPA (82.5  $\mu$ g de protéines totales déposés) et TRITON (67.5  $\mu$ g de protéines totales déposés). Blocage TBST 5% BSA. Anticorps primaires : (a) anti-lamine B2 (CST D8P3U, dilution 1/1000); (b) anti-tubuline (ab6161, dilution 1/3000); (c) anti-centrine 2 (ab196554, dilution 1/1000). Anticorps secondaires : (a,c) anti-lapin (CST 7074 dilution 1/2000) ; (b) anti-rat (Invitrogen A18871 dilution 1/2000).

Sur la Figure 124 (a), une protéine est détectée à environ 70 kDa, et ce sur les trois pistes : il s'agit de la lamine B2, une protéine uniquement localisée dans le noyau. L'intensité de la bande est significativement plus importante lors d'une extraction réalisée avec le tampon RIPA. Ce dernier étant composé de détergents d'une force plus importante que ceux des tampons NP-40 et TRITON, il n'est pas étonnant d'observer une meilleure extraction de la lamine B2 avec le tampon RIPA. Sur la Figure 124 (b), la tubuline est détectée à environ 55 kDa, et ce quel que soit le tampon d'extraction. Néanmoins, la bande observée pour le tampon TRITON est plus intense que celle observée pour le tampon RIPA et d'autant plus que pour le tampon NP-40. La Figure 124 (c) présente finalement la membrane détectée avec l'anticorps anti-centrine 2 ab196554. La bande qui migre entre 15 et 25 kDa est attribuée à la centrine 2. Les intensités relatives des bandes pour les trois tampons d'extraction sont sensiblement équivalentes, bien que le tampon RIPA semble plus efficace à l'extraire. Le choix du tampon d'extraction pour la suite de l'étude se porte ainsi sur le tampon d'extraction RIPA, qui permet la meilleure extraction de la centrine 2 ainsi que des protéines nucléaires représentées ici par la lamine B2. L'extraction des protéines cytoplasmiques modélisées par la tubuline reste largement convenable : le tampon RIPA permet d'extraire la tubuline avec une intensité très proche de celle extraite avec TRITON.

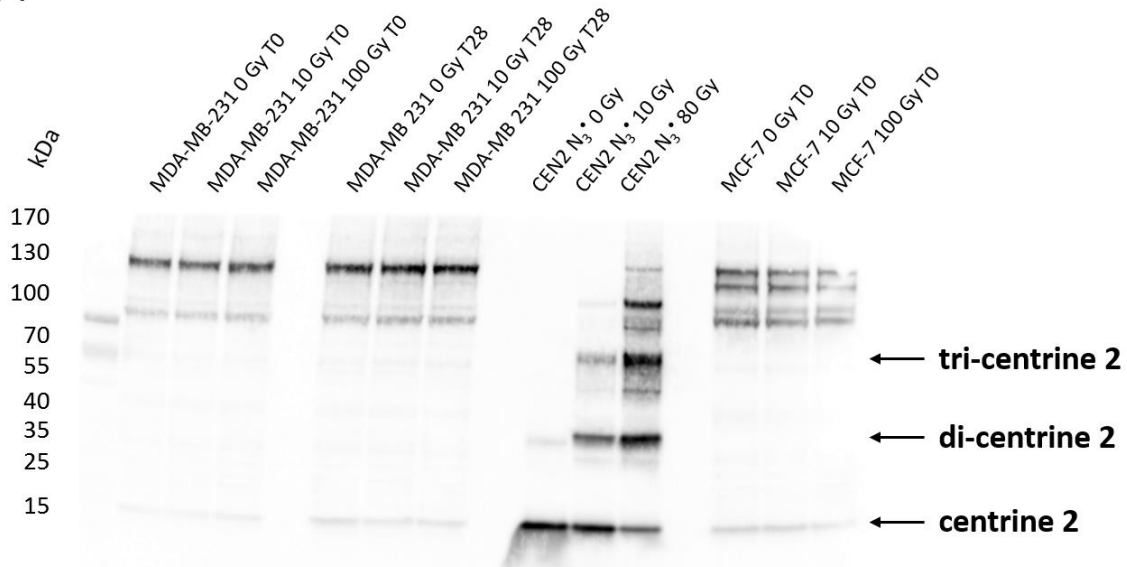
### VIII.3. Irradiation des cellules

#### VIII.3.1. Irradiation pré-extraction

Après avoir vérifié que l'anticorps anti-centrine 2 ab196554 permet effectivement une détection de la protéine au niveau endogène et une fois le tampon d'extraction sélectionné, les cellules ont été soumises à une situation de stress oxydant *via* leur irradiation avec un rayonnement gamma. Dans un premier temps, les cellules ont été irradiées directement dans leur milieu de culture, dans les boîtes de pétri. Les cellules ont été irradiées à des doses de 0, 10 et 100 Gy. Ces doses sont de l'ordre de grandeur des doses utilisées en radiothérapie.

Les cellules sont conservées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> en amont et en aval de l'irradiation. Ensuite, le protocole d'extraction des protéines présenté en Figure 121 est suivi, soit directement après l'irradiation (T0) soit 28 heures (T28) après l'exposition aux rayons gamma. Sur la lignée des MCF-7, seuls les extraits obtenus à T0 après irradiation ont été considérés. Après extraction, les échantillons ont été déposés sur Western-blot et détectés avec l'anticorps anti-centrine 2 ab196554. La membrane correspondante est exposée en Figure 125 (a) : entre 15 et 25 kDa, la centrine 2 monomérique  $\gamma$  est détectée, bien plus difficilement dans les extraits protéiques cellulaires, irradiés ou non que dans les échantillons *in-vitro*. Les bandes de centrine 2 recombinante et celles de ses oligomères sont extrêmement intenses ce qui peut amener à gêner le contraste de bandes d'intensité moindre, comme celles observées dans les extraits. Concernant les extraits issus des cellules MDA-MB-231, que l'extraction ait été réalisée à T0 ou à T28, l'intensité de la bande de centrine 2 semble constante avec la dose d'irradiation. Aucune modification radio-induite n'est détectée sur le Western-Blot. Les protéines de haut poids moléculaire répondant à l'anticorps ab196554 ne semblent pas non plus modifiées par l'irradiation. Cependant, à T28, la bande de centrine 2 apparaît légèrement plus intense que celle observée à T0 mais la différence observée semble peu significative. Dans les extraits de MCF-7, l'intensité de la bande de centrine 2 à 100 Gy semble moins intense que celles à 0 et 10 Gy mais il est à noter qu'il s'agit de la piste en bord de membrane, sujette à une révélation par chimiluminescence moins efficace que les pistes centrales. Cette différence d'intensité n'est donc pas considérée comme significative. Pour une extraction réalisée à T0, les extraits issus des MDA-MB-231 et des MCF-7 peuvent être comparés : la centrine 2 apparaît un peu plus intense dans les extraits de MCF-7, excepté à 100 Gy comme cela vient d'être évoqué. Néanmoins, les différences d'intensité observées sont très subtiles. Il faut ici retenir que la centrine 2 a pu être extraite des cellules de MDA-MB-231 et MCF-7 et qu'elle est aussi présente post-irradiation avec une intensité comparable  $\gamma$  compris pour des doses élevées. Aucune bande d'intensité non négligeable n'a été détectée à la masse du dimère de centrine 2 quelles que soient la lignée cellulaire, la dose ou les conditions d'extraction.

**(a) ab196554**



**(b) CST 2091**

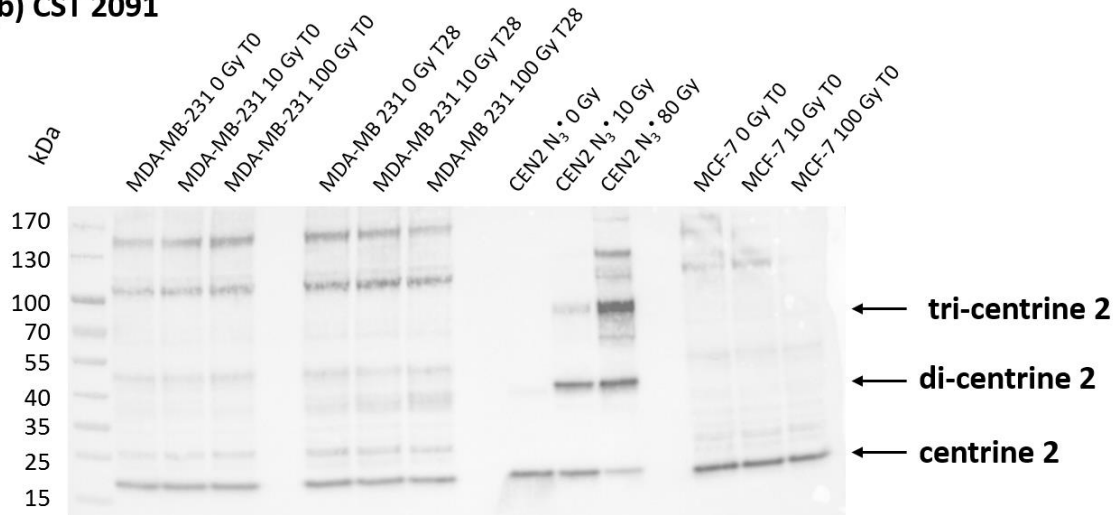


Figure 125: Western-blots d'extraits protéiques issus de cultures cellulaires de MDA-MB-231 et MCF-7 irradiées à 0, 10 et 100 Gy. La CEN2 recombinante irradiée à 0, 10 et 80 Gy (N<sub>3</sub>\*) sert de référence. T0: extraction réalisée directement après irradiation ; T28 : extraction réalisée après 28 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Blocage TBST 5% BSA. Anticorps primaires : (a) ab196554, dilution 1/550 ; (b) CST 2091, dilution 1/550. Anticorps secondaire : anti-lapin (CST 7074 dilution 1/2000). La même membrane a été exposée successivement aux deux anticorps après contact avec une solution de désybridation. Quantités de protéines déposées pas piste ≈ 50 ng pour la CEN2 recombinante et ≈ 20 µg pour les extraits cellulaires.

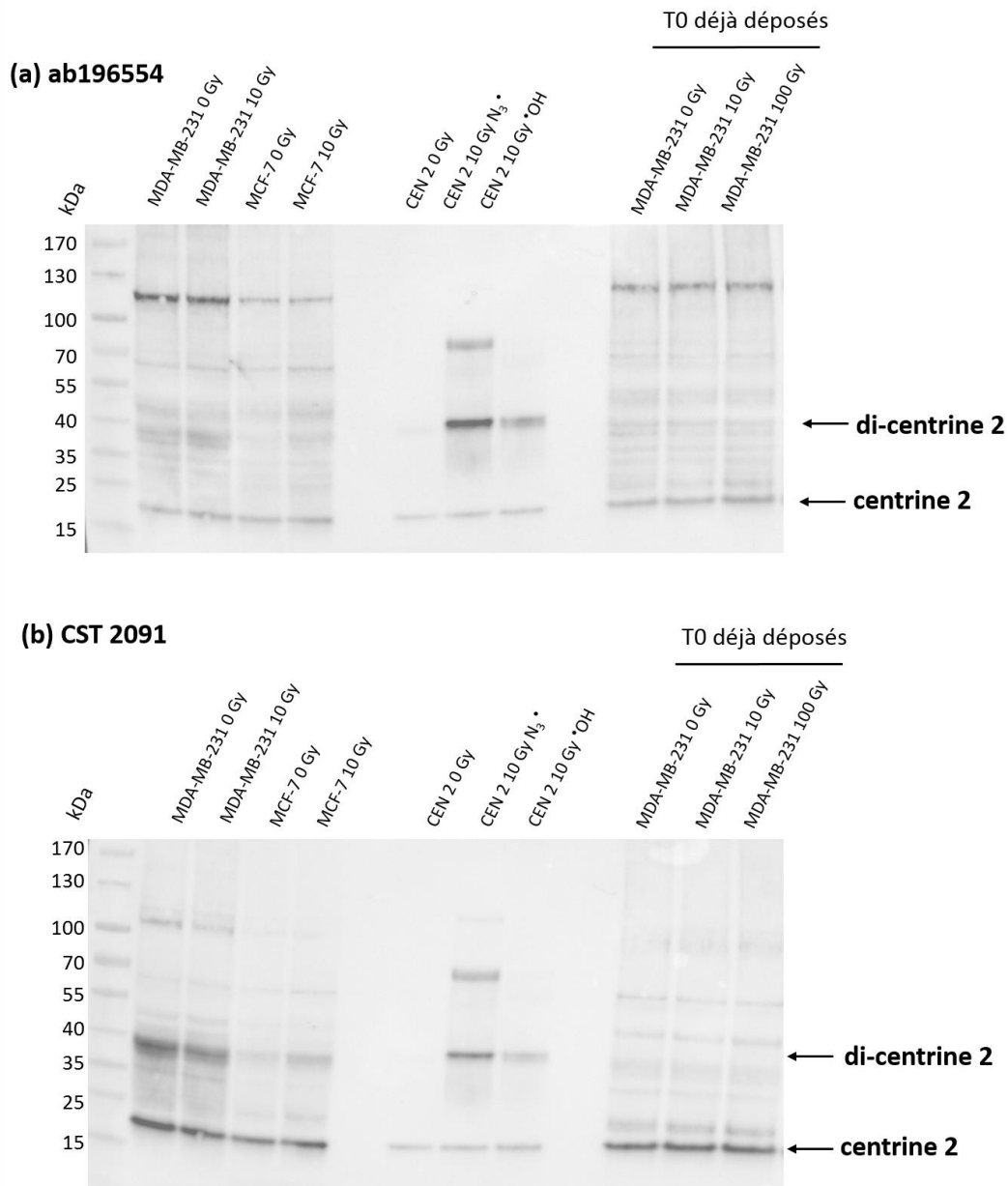


Figure 126: Western-blots d'extraits protéiques issus de cultures cellulaires de MDA-MB-231 et MCF-7 irradiées à 0, 10 et 100 Gy. La CEN2 recombinante irradiée à 0 et 10 Gy ( $\cdot OH$  ou  $N_3^*$ ) sert de référence. Les trois dernières pistes de droite correspondent à des échantillons déjà déposés en Figure 125. T0: extraction réalisée directement après irradiation. Blocage TBST 5% BSA. Anticorps primaires : (a) ab196554, dilution 1/500 ; (b) CST 2091, dilution 1/500. Anticorps secondaire : anti-lapin (CST 7074 dilution 1/2000). La même membrane a été exposée successivement aux deux anticorps après contact avec une solution de déshybridation. Quantités de protéines déposées  $\approx$  50 ng pour la CEN2 recombinante et  $\approx$  20  $\mu g$  pour les extraits cellulaires.

Afin de croiser les informations pouvant être obtenues à travers l'utilisation de différents anticorps, la membrane présentée en Figure 125 (a) a été mise en contact avec un autre anticorps anti-centrine 2, le CST 2091 (la membrane résultante est exposée en Figure 125 (b)). Tout comme observé pour l'anticorps ab196554, la centrine est détectée au sein des échantillons *in-vitro* et des extraits protéiques des cellules soumises ou non à une irradiation gamma. A l'échelle de la membrane entière

et en comparaison avec l'anticorps ab196554, l'anticorps CST 2091 semble plus spécifique de la centrine 2 que des protéines de haut poids moléculaire également reconnues (entre 100 et 170 kDa). Sur la membrane présentée, le contraste est tel que la centrine 2 *in-vitro* et ses oligomères possèdent des bandes d'intensité moindre par rapport au cas de l'anticorps ab196554, ce qui facilite sans doute la visualisation de certaines bandes pour lesquelles le contraste était insuffisant. L'anticorps CST 2091 semble en revanche reconnaître des protéines de poids moléculaires plus proches de celui de la centrine 2 (entre 25 et 55 kDa) que l'ab196554 ne reconnaissait pas. Quel que soit l'anticorps considéré, ses bandes qui migrent entre 100 et 170 kDa sont détectées : soit elles correspondent à des protéines reconnues par l'anticorps qui n'est pas spécifique, soit elles sont pertinentes biologiquement. Les gels effectués étant dénaturants, il n'existe pas de raison que la centrine soit détectée à un plus haut poids moléculaire même si elle interagit non covalamment avec d'autres protéines dans les cellules. Sur les extraits protéiques de MDA-MB-231, la comparaison entre les extractions réalisées à T0 et T28 est plus riche en informations dans le cadre de l'utilisation de l'anticorps CST 2091. En effet, à T28, des bandes qui migrent entre 35 et 40 kDa (masse approximative du dimère de centrine 2) peuvent être décelées alors qu'elles ne l'étaient pas à T0. Pour autant, quel que soit le délai pré-extraction, aucune différence n'est observée avec l'irradiation. Pour les extraits issus des MCF-7, la bande de centrine 2 est clairement la bande la plus intense détectée sur les pistes, ce qui justifie à nouveau de la spécificité de cet anticorps. Néanmoins, comme pour les extraits de MDA-MB-231, aucune différence avec la dose n'est constatée.

Afin d'appuyer les observations faites sur la Figure 125, d'autres cultures de MDA-MB-231 et de MCF-7 ont été irradiées, à 0 et 10 Gy. Les extraits protéiques ont été déposés sur Western-Blot, visible en Figure 126. Les concentrations totales de protéines déposées sont identiques pour chacune des pistes du western. Les deux mêmes anticorps anti-centrine 2 que sur la Figure 125 ont été utilisés (ab196554 et CST 2091). Les échantillons de MDA-MB-231 extraits à T0 déjà déposés sur le Western-Blot de la Figure 125 sont à nouveau déposés, permettant une comparaison de la réponse inter-western. Les pistes correspondantes à ces extraits sont les trois les plus à droite et quel que soit l'anticorps primaire anti-centrine 2 utilisé, la conclusion est la même que pour le western de la Figure 125 : la centrine 2 est détectée et aucune différence n'est observée à la suite de l'irradiation. La comparaison des deux membranes en Figure 126 (a) et (b) permet de confirmer la meilleure spécificité de l'anticorps CST 2091 pour la centrine 2 humaine endogène. Concernant les extraits de MDA-MB-231 encore non déposés (pistes de gauche), des bandes migrant vers 40 kDa sont détectées et ce d'autant plus intensément que l'anticorps CST 2091 est utilisé. Pour les extraits de MCF-7, ces bandes sont également devinées mais c'est surtout leur différence d'intensité entre les échantillons extraits à 0 Gy et 10 Gy qui est à noter: une augmentation de l'intensité liée à l'irradiation est soulignée.

L'intensité de la bande du monomère de centrine 2 reste quant à elle inchangée quelles que soient les conditions.

Ainsi, pour résumer ce qui a été mis en évidence sur les membranes des Figure 125 et Figure 126, les deux anticorps considérés permettent de détecter la centrine 2, aussi bien dans les échantillons *in-vitro* que dans les extraits cellulaires. Les oligomères de la centrine 2 *in-vitro* irradiée y sont plus sensibles que le monomère. Sur la membrane de la Figure 125, l'unique différence notable est la présence de faibles bandes entre 35 et 40 kDa pour les extraits de MDA-MB-231 (T28) lors d'une détection avec l'anticorps CST 2091. Aucune différence liée à l'irradiation n'a pu être nettement décelée. Les conditions d'oxydation sont ici assez différentes de celles utilisées lors de l'étude *in-vitro*. Bien que l'ordre de grandeur des doses utilisées soit le même, les oxydations induites le sont *via*  $\cdot\text{OH}$ , qui est ici produit mais avec un rendement moindre que celui obtenu sous une atmosphère de  $\text{N}_2\text{O}$ . De plus, les cellules sont irradiées à l'air donc en présence d'oxygène. Enfin, les cellules ne sont évidemment pas uniquement constituées de centrine 2, les autres protéines sont susceptibles d'être oxydées. Toutes ces raisons pourraient expliquer qu'aucun dimère de centrine 2 ne soit détecté dans ces conditions. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : i) il n'y a pas de dimère(s) de centrine 2 formé(s) sous irradiation  $\gamma$  ; ii) le(s) dimère(s) de centrine 2 ne sont pas détectés par les anticorps ab196554 et CST 2091 car leur concentration ne le permet pas, il faudrait augmenter la dose d'irradiation ou enrichir la fraction protéique en centrine 2 ; iii) la formation de dimère(s) de centrine 2 est inhibée par la présence du milieu de culture par exemple. En effet, le milieu de culture est riche en sels et en acides aminés, espèces susceptibles de capter les radicaux oxydants produits lors d'une irradiation gamma. Toutefois, sur la membrane de la Figure 126, des bandes migrant vers 40 kDa ont été détectées et semblent apparaître sous irradiation pour les MCF-7. Bien qu'elles possèdent une masse proche de celle du dimère de centrine 2 recombinante, comme cela a déjà été discuté, il n'est pas possible grâce aux Western-Blots de certifier qu'il s'agisse effectivement de dimère(s) formés par l'oxydation radio-induite de la centrine 2. Des méthodes d'identification complémentaires sont donc indispensables pour progresser dans l'étude de l'oxydation de la centrine 2 *in-cellulo*. Des anticorps anti-di-tyrosine (MA5-27566 (Invitrogen) et ab243067 (abcam)) ont notamment été utilisés mais les Western-Blots révélés avec ces anticorps n'ont jamais permis de rendre compte de la formation des dimères de centrine 2 même sur les échantillons de protéine purifiée irradiée, pour laquelle il n'existe aucun doute sur la nature de la bande de dimère formée. Les membranes correspondantes ne sont pas présentées ici mais l'absence de réponse de ces anticorps pour des échantillons contenant des dimères de tyrosine avérés amène à s'interroger sur leur légitimité à détecter la bi-tyrosine dans des échantillons biologiques.



### VIII.3.2. Irradiation post-extraction

L'une des hypothèses faites précédemment est que la présence du milieu de culture cellulaire, riche en sels et acides aminés notamment, agisse comme un obstacle à l'oxydation des protéines contenues dans les cellules d'intérêt puisqu'en compétition pour la capture des radicaux oxydants formés. Pour vérifier si la présence du milieu a un impact sur le devenir de la centrine 2 *in-cellulo* lors d'une irradiation  $\gamma$ , les protéines ont été extraites des cellules puis les extraits protéiques dialysés ont été irradiés.

A ce stade de l'étude, les nouveaux lots des anticorps utilisés jusqu'alors n'ont plus du tout répondu avec la même spécificité et n'ont pas permis d'identifier la centrine 2, même au sein d'échantillons *in-vitro* pour certains. C'est la raison pour laquelle un nouvel anticorps anti centrine 2 a été utilisé pour la suite des expériences, bien que sa spécificité soit à nuancer par rapport aux Western-Blots précédents. Il s'agit de l'anticorps ab229538, dont la réponse a été testée sur des échantillons de centrine 2 recombinante et d'extraits (MDA-MB-231 et de MCF-7) non irradiés. La Figure 127 présente la membrane correspondante. La centrine 2 *in-vitro* et ses oligomères sont bien reconnus par l'anticorps et une bande correspondante à la masse de la centrine 2 est bien observée au sein des extraits cellulaires. Néanmoins la spécificité de cet anticorps n'est définitivement pas comparable à celle des premiers lots d'ab196554 et CST 2091. Cet anticorps semble aussi plus sensible aux oligomères de centrine 2 qu'à son monomère, ce qui serait en accord avec sa reconnaissance du domaine N-terminal de la protéine. La révélation des deux pistes d'échantillons protéiques de MDA-MB-231 (extraits 1 et 2) est extrêmement similaire du point de vue de l'intensité de la bande de centrine 2 comme de la détection d'autres protéines. Pourtant, ces extraits proviennent bien de deux extractions distinctes. Pour les échantillons provenant des MCF-7, l'extrait n°1 ne présente pas le même profil de migration et de détection que les extraits n°2 et 3 : ceci s'explique par l'utilisation d'une référence de boîtes de pétri différente, sur lesquelles les cellules ont difficilement adhéré. Pour autant, les extraits n°2 et 3 présentent des profils de détection quasi-identiques, ce qui permet de confirmer que le protocole permet une extraction relativement reproductible. Ainsi, l'anticorps ab229538 permet de détecter la centrine 2 *in-vitro* et au sein d'extraits cellulaires mais l'intensité de la bande en regard des autres bandes détectées est très faible. Pour vérifier que les bandes non spécifiques détectées ne provenaient pas d'une reconnaissance par l'anticorps secondaire anti-lapin, la membrane a été mise en contact avec ce dernier sans anticorps primaire. Aucune bande n'a été détectée, confirmant que c'est l'anticorps primaire ab229538 qui n'est pas spécifique de la centrine 2. Des cellules ont donc été cultivées, les protéines extraites et c'est l'extrait protéique dialysé (contre H<sub>2</sub>O) qui a ensuite été irradié à 0, 10 et 900 Gy. Pour les mêmes raisons que celles précédemment évoquées, une dose typique de l'étude de cellules sous irradiation a été considérée (10 Gy) et une dose beaucoup



plus importante (900 Gy) pour tenter de favoriser la formation de dimères de centrine 2 notamment. La quantité totale en protéines irradiées est la même pour les trois doses, l'extrait ayant simplement été réparti dans trois contenants. L'extrait irradié aux différentes doses a été déposé sur Western-Blot (Figure 128).

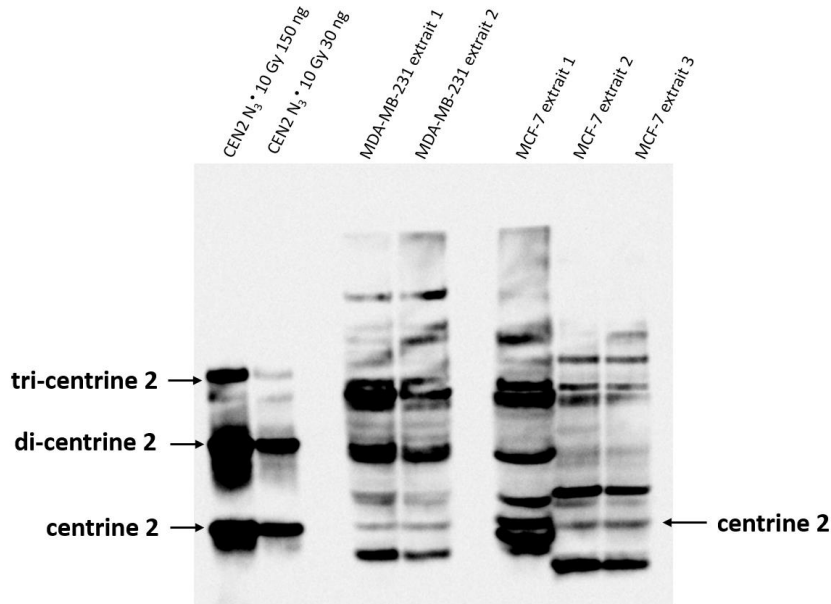


Figure 127: Western-blot d'échantillons de CEN2 recombinante irradiée à 10 Gy (N<sub>3</sub>\*) et d'extraits protéiques issus de cultures de MDA-MB-231 et MCF-7 non irradiées. La piste contenant l'extrait 1 de MCF-7 correspond à une culture réalisée dans des boîtes de pétri d'une référence inhabituelle. Blocage TBST 5% lait. Anticorps primaire: ab229538, dilution 1/2000. Anticorps secondaire : anti-lapin CST 7074, dilution 1/2000. Quantité en protéines totales déposée pour les extraits cellulaires ≈ 20 µg.

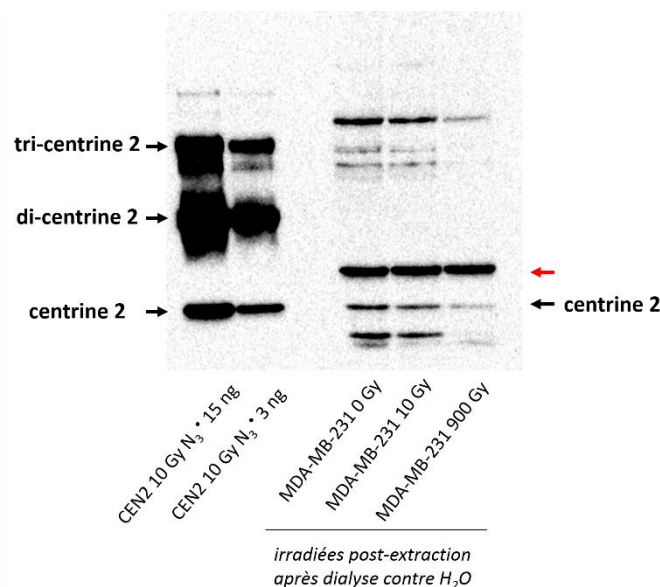


Figure 128: Western-blot d'échantillons de CEN2 recombinante irradiée à 10 Gy (N<sub>3</sub>\*) et d'extraits protéiques issus de cultures de MDA-MB-231 irradiées à 0, 10 et 900 Gy post-extraction. Blocage TBST 5% lait. Anticorps primaire : ab299538, dilution 1/5000. Anticorps secondaire : anti-lapin CST 7074, dilution 1/10000. Quantité en protéines totales déposée pour les extraits cellulaires ≈ 20 µg.

La centrine 2 est bien détectée au sein des extraits et l'intensité de sa bande semble diminuer avec la dose d'irradiation. Sur la piste correspondante à une irradiation de 900 Gy, l'intensité de toutes les bandes déjà détectées à 0 Gy semble avoir diminuée exceptée celle qui migre entre la masse du monomère et celle du dimère de centrine 2, identifiée sur la Figure 128 par une flèche rouge. La diminution de toutes les bandes détectées pourrait s'expliquer par une dégradation homogène de toutes les protéines pour une telle dose d'irradiation ou encore par une précipitation des protéines à la suite de l'irradiation. La présence à la même intensité de la bande indiquée par la flèche rouge semble indiquer qu'il ne s'agit pas d'un problème de révélation par chimiluminescence. La centrine 2 mais également les autres protéines semblent donc avoir été suffisamment endommagées pour que leur détection par Western-Blot atteste d'un changement d'intensité de leurs bandes. Bien que la centrine 2 semble avoir été endommagée lors de l'irradiation post-extraction, après élimination du milieu de culture et extraction des protéines, aucune bande de dimère de centrine 2 n'est détectée. Il est possible que la présence du milieu de culture ait inhibé la dégradation de la centrine 2 dans le cadre de l'irradiation directe des cellules mais son absence n'est pas pour autant corrélée à la détection de bande de dimère. Ainsi, soit aucun dimère de centrine 2 n'est formé soit leur détection n'est pas assurée par les anticorps utilisés car les concentrations auxquelles ils sont produits sont en deçà de la limite de détection.

L'utilisation d'anticorps commerciaux pour assurer la détection de la centrine 2 et de ses potentiels oligomères suite à une irradiation  $\gamma$  atteint ses limites : le dimère de centrine 2, s'il est formé *in-cellulo*, est attendu à des concentrations extrêmement faibles puisqu'il s'agit d'un produit d'oxydation. Les doses d'irradiation utilisées lors des études *in-vitro* (dizaines de Gy) sont ici appliquées à un mélange très complexe dont la centrine 2 ne représente qu'un infime pourcentage et donc ses produits de dégradation un pourcentage encore moindre. Si les anticorps ne sont pas assez sensibles pour détecter leur formation dans ce contexte, il peut être intéressant d'envisager un enrichissement des extraits en centrine 2. De plus, une détection par une technique orthogonale, la spectrométrie de masse, a été envisagée. En effet, les connaissances acquises sur les peptides tryptiques de la centrine 2 (TLSY et KTSLY) et leur dimérisation pourraient être un atout pour la détection de la centrine 2 et ses potentiels produits d'oxydation (oligomères) *in-cellulo* à la suite d'une étape de digestion tryptique des extraits cellulaires. Classiquement, pour une analyse en spectrométrie de masse, des étapes de précipitation des protéines (à l'acétone, à l'acide trichloracétique (TCA) ou au sulfate d'ammonium) ou une séparation sur gels d'électrophorèse 2D peuvent être par exemple réalisées en amont de la digestion à la trypsine pour purifier le milieu. Ainsi, dans le cadre de cette thèse et de l'étude de la CEN2 par Western-Blot et par spectrométrie de masse, deux approches d'enrichissement des extraits protéiques ont été envisagées : l'immunoprécipitation et la précipitation au sulfate d'ammonium.

#### VIII.4. Vers un enrichissement en centrine 2 des extraits cellulaires

##### VIII.4.1. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est une méthode de purification de protéines. Elle consiste en l'utilisation de billes magnétiques greffées avec une protéine (protéine A/G dans ce cas) capable de reconnaître la région constante des anticorps. Fixés par leur chaîne lourde sur la bille magnétique, les anticorps sont capables de reconnaître l'antigène d'intérêt au niveau de leur région variable. Les propriétés magnétiques des billes permettent d'isoler à l'aide d'un aimant les protéines censées être reconnues par l'anticorps des autres protéines ou contaminants contenus dans le milieu complexe. La Figure 129 est une représentation schématique du protocole d'immunoprécipitation utilisé dans le cadre de l'extraction de centrine 2. Premièrement, le mélange complexe que constitue l'extrait protéique est mis en contact avec un anticorps anti-centrine 2, pour former le complexe antigène/anticorps. Ensuite, ce complexe est exposé aux billes magnétiques greffées de la protéine A/G : la partie commune des anticorps doit alors se lier à la protéine A/G, elle-même accrochée à la bille. A l'aide d'un aimant, les billes magnétiques sont retenues sur l'une des parois du contenant utilisé et le surnageant restant est retiré : c'est la fraction dite non retenue, elle est censée contenir toutes les protéines et/ou contaminants ne possédant pas d'affinité avec l'anticorps. Plusieurs lavages sont effectués, le même principe d'isolement des billes avec l'aimant est utilisé. Enfin, un tampon d'éluion est ajouté sur les billes lavées : il a pour objectif de délier l'anticorps de la protéine A/G greffée sur la bille et l'antigène de l'anticorps. Les billes sont isolées *via* l'aimant et le surnageant résultant doit être composé de l'antigène d'intérêt ainsi que de l'anticorps.

En amont d'une potentielle utilisation de l'immunoprécipitation sur des échantillons d'extraits cellulaires, il a convenu de vérifier la faisabilité du processus avec des échantillons de centrine 2 purifiée. Pour mener à bien les expériences d'immunoprécipitation, un anticorps anti-centrine 2 doit donc être utilisé. Les premiers essais ont été réalisés avec l'anticorps anti-centrine 2 CST 2091. Bien que cet anticorps soit commercialisé pour une utilisation en Western-Blot, sur la base du principe de l'immunoprécipitation, si c'est la partie constante qui est reconnue par les billes magnétiques, cela ne devrait pas entraver la formation d'une liaison entre celles-ci et l'anticorps. Le risque est plutôt de ne pas former de liaison entre l'anticorps et la centrine 2. Les échantillons correspondants aux différentes étapes (Figure 129) sont ensuite déposés sur Western-Blot et c'est également l'anticorps anti-centrine 2 CST 2091 qui a servi à la détection. La mise au point étant réalisée sur la centrine 2 *in vitro*, l'utilisation d'anticorps pour la détection n'est pas censée poser de problèmes de spécificité.

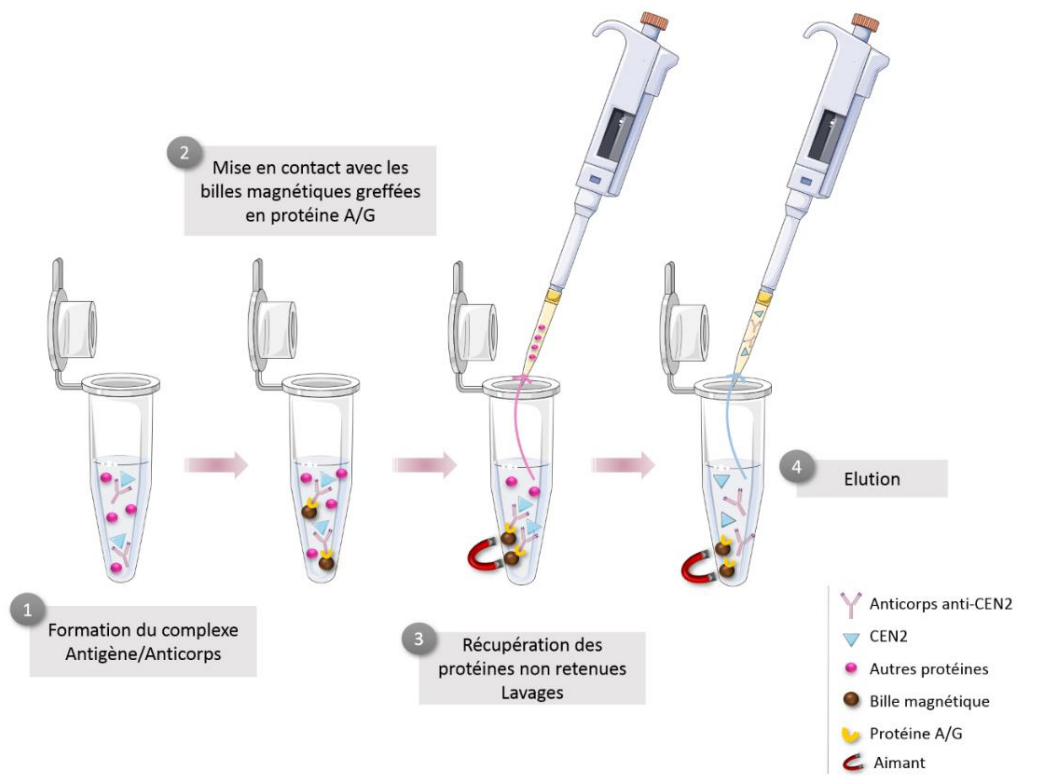


Figure 129: Représentation schématique de l'immunoprécipitation (IP) réalisée avec des billes magnétiques greffées avec la protéine A/G.

L'immunoprécipitation a été effectuée sur un échantillon de centrine 2 *in-vitro* irradiée à 10 Gy en présence de  $N_3^{\bullet}$ , ce qui permet de considérer le comportement simultané du monomère de la protéine et de ses oligomères. Lors d'expériences d'IP menées sur des extraits cellulaires, il est recommandé par les fournisseurs du kit de mettre en contact entre 500 et 1000  $\mu$ g de protéines totales avec 2 à 10  $\mu$ g d'anticorps. Dans le cadre de tests sur la centrine 2 *in-vitro*, une quantité moindre de protéine purifiée sera considérée : 50  $\mu$ g de CEN2 irradiée ont été mis en contact avec 5  $\mu$ g d'anticorps. Sur la Figure 130 sont présentées deux membranes de Western-Blots sur lesquelles les échantillons correspondants aux différentes étapes de l'IP ont été déposés.

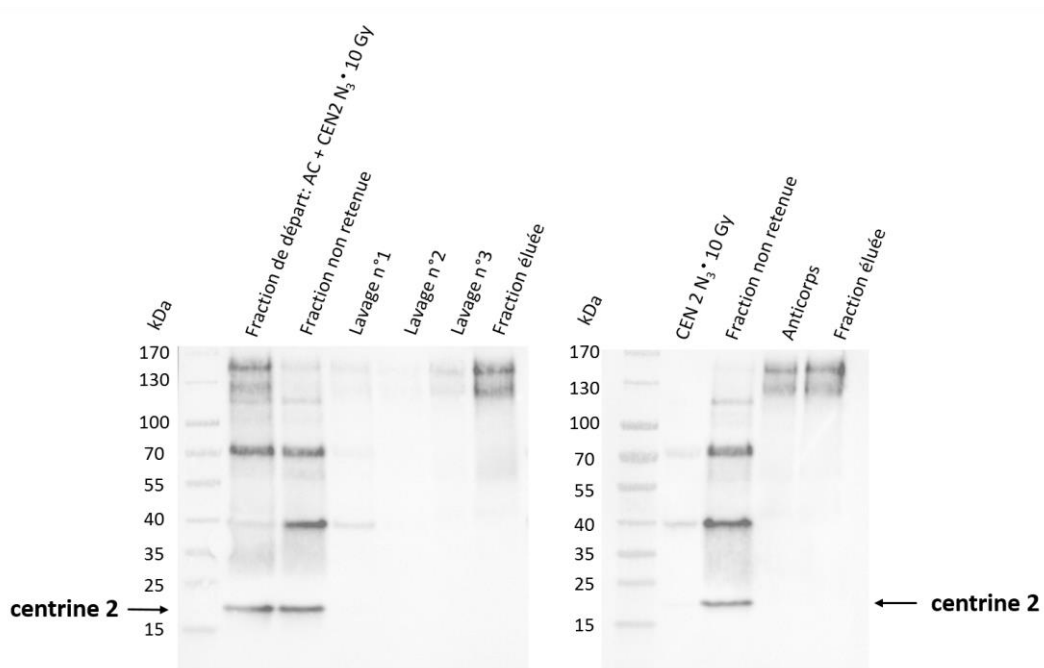


Figure 130: Western-blots des échantillons de CEN2 recombinante irradiée à 10 Gy ( $N_3^*$ ) immunoprécipités. IP : anti-centrine 2 CST 2091 (dilution 1/100 : 50  $\mu$ g de protéine ont été mis en contact avec 5  $\mu$ g d'anticorps). Blocage TBST 5% BSA. Anticorps primaire WB : CST 2091 (dilution 1/1000). Anticorps secondaire : anti-lapin CST 7074 (dilution 1/2000). Quantité de CEN2 déposée dans la piste contrôle  $\approx$  50 ng.

La centrine 2 et ses oligomères sont détectés dans la fraction non retenue et non pas dans la fraction éluee, comme attendu. Deux hypothèses peuvent alors être faites : l'anticorps n'étant pas dédié à l'immunoprécipitation, il ne s'est pas fixé correctement à la protéine A/G de la bille magnétique. L'autre possibilité est que la centrine 2 et ses oligomères ne soient pas reconnus par l'anticorps dans ce contexte d'IP. La première solution est rapidement évincée : en effet, l'anticorps CST 2091 est quant à lui détecté dans la fraction éluee : il a donc bien été retenu par les billes. Comme soupçonné, il semblerait que le lien entre l'anticorps et l'antigène (la centrine 2) soit à l'origine du problème rencontré. Il existe certainement une différence entre la capacité d'un anticorps de reconnaître un antigène sur une surface figée telle qu'une membrane en nitrocellulose et la capacité à former un complexe au sein d'une solution. De plus, suite à la migration sur le gel d'électrophorèse, la centrine 2 est dénaturée lors de la reconnaissance par l'anticorps sur le Western-Blot alors qu'en solution, lors du processus d'IP, elle est structurée. Un anticorps commercialisé pour des expériences d'immunoprécipitation a donc spécifiquement été acquis: l'anticorps anti-centrine 2 sc293192. C'est toujours la centrine 2 *in vitro* irradiée à 10 Gy en présence de  $N_3^*$  qui a été considérée et les membranes sur lesquelles les échantillons des différentes étapes de l'IP ont été déposés sont exposées en Figure 131. La concentration en protéine purifiée a ici été diminuée à 5  $\mu$ g pour 5  $\mu$ g d'anticorps. La membrane (a) correspond à une détection avec l'anticorps anti-centrine 2 ab229538 qui permet de

rendre compte de la présence de la centrine 2 et de ses oligomères dans les fractions et la membrane (b) avec l'anticorps sc293192 qui permet de rendre compte de la localisation de l'anticorps utilisé lors de l'IP. Comme aussi observé sur la membrane de la Figure 130, la centrine 2 et ses oligomères sont détectés dans la fraction non retenue de la Figure 131 (a). Sur la membrane (b) de la Figure 131, l'anticorps sc293192, reconnu par l'anticorps secondaire anti-souris, est identifié majoritairement dans la fraction éluée. L'utilisation d'un anticorps validé pour une utilisation en IP ne semble donc pas avoir permis de résoudre le problème de reconnaissance anticorps/antigène. Néanmoins, sur les membranes des Figure 130 et Figure 131, une faible proportion de centrine 2 ou à minima de son dimère est détectée dans les fractions de lavage et une infime fraction du dimère décelée dans la fraction éluée. Cela signifie-t-il que l'anticorps qui sert à l'immunoprécipitation est saturé en centrine 2 ? Il existe une réelle nécessité de s'intéresser à la formation du complexe antigène/anticorps.

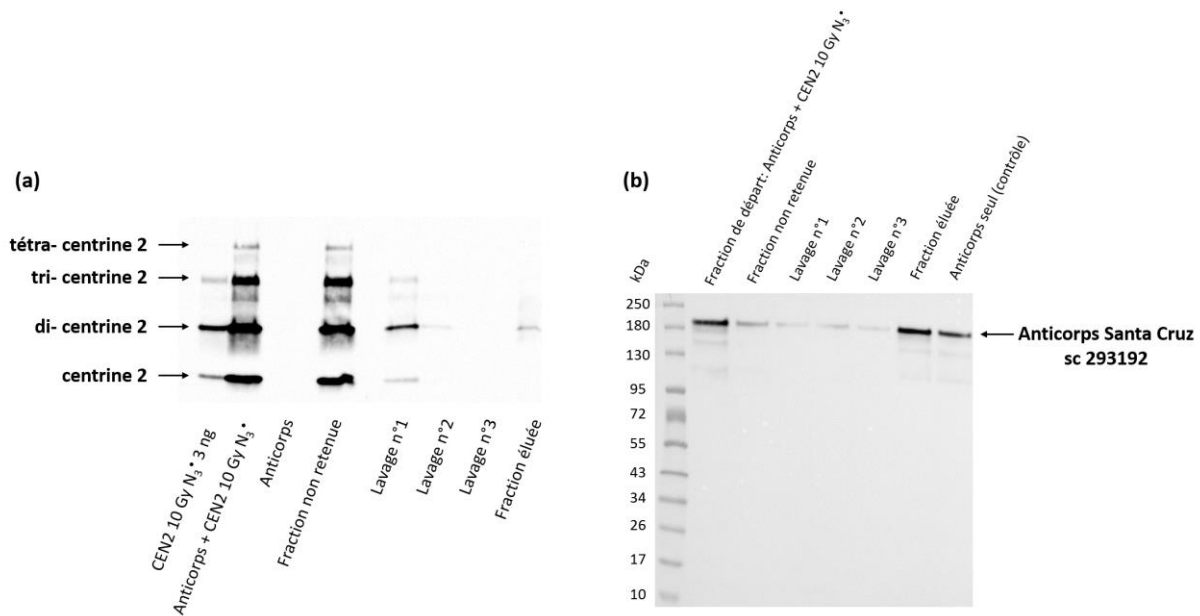


Figure 131: Western-blots des échantillons de CEN2 recombinante irradiée à 10 Gy (N<sub>3</sub>\*) immunoprécipités. IP : anti-centrine 2 sc293192 (dilution 1/100) : 5 µg de protéine ont été mis en contact avec 5 µg d'anticorps. Blocage TBST 5% lait. Anticorps primaires WB : (a) ab229538 (dilution 1/5000) et (b) sc293192 (dilution 1/500). Anticorps secondaires : (a) l'anti-lapin CST 7074 (dilution 1/10000) et (b) anti-souris Invitrogen G21040 (dilution 1/10000). Quantité en CEN2 déposée dans le puits contrôle ≈ 3 ng.

Une autre hypothèse qui permettrait d'expliquer la présence de la centrine 2 dans la fraction non retenue est que le tampon utilisé pour l'immunoprécipitation déstabilise les liaisons antigène/anticorps ou les limite. C'est dans ce contexte qu'un tampon différent de celui proposé dans le kit d'IP (tampon de lyse pouvant directement servir à l'extraction des cellules) a été considéré et utilisé pour réaliser ces expériences.

L'utilisation d'un tampon plus doux que le tampon commercial dit de « lyse » a été envisagée : le tampon PBS (Phosphate Buffer Solution) supplémenté en EDTA (5 mmol·L<sup>-1</sup>) et en NaN<sub>3</sub> (0.02 %), pH 7.4. En effet, les recommandations du fournisseur de l'anticorps sc293192 consistent en l'utilisation d'un tampon RIPA (composition extrêmement proche du tampon commercial de « lyse ») ou d'un tampon PBS. Les échantillons des différentes fractions récupérées dans le cadre de l'utilisation des deux tampons pour l'IP ont été déposés sur Western-Blot et sont présentés en Figure 132. La concentration en protéine purifiée a ici encore été diminuée à 500 ng pour 5 µg d'anticorps

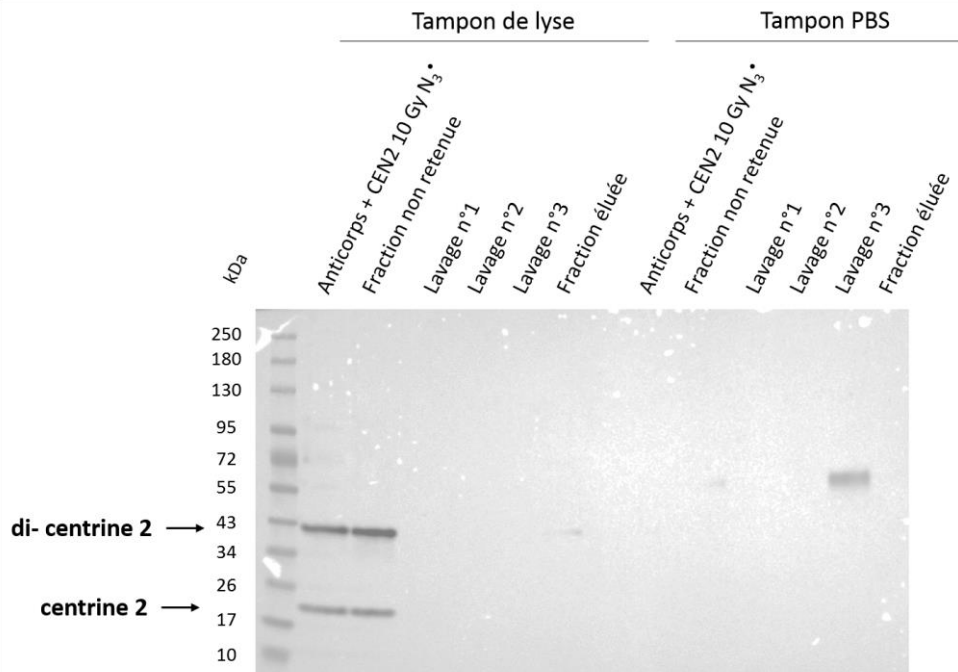


Figure 132: Western-blots des échantillons de CEN2 recombinante irradiée à 10 Gy (N<sub>3</sub>•) immunoprécipités dans les tampons de lyse (kit IP) ou PBS. IP : anti-centrine 2 sc293192 (dilution 1/100, 500 ng de protéine ont été mis en contact avec 5 µg d'anticorps). Blocage TBST 5% lait. Anticorps primaire : anti-centrine 2 ab229538 (dilution 1/5000). Anticorps secondaire : anti-lapin CST 7074 (dilution 1/10000).

L'utilisation du tampon PBS apparaît totalement inadaptée aux expériences d'IP : il a été difficile d'homogénéiser les échantillons et les billes magnétiques ont difficilement été récupérées par l'aimant, elles semblent adhérer au plastique des parois du contenant et/ou comme complètement dispersées dans le tampon. Ceci est en accord avec le fait que sur le Western-Blot de la Figure 132, aucune bande de centrine 2 ne soit détectée lors de l'utilisation du tampon PBS. Une bande d'une masse d'environ 55 kDa est visible dans la fraction de lavage n°3 mais elle correspond certainement à une contamination. Pour les pistes correspondantes aux échantillons immunoprécipités avec le tampon de lyse commercial, la centrine 2 et son dimère sont toujours détectés dans la fraction non retenue. Une très légère bande peut être devinée à la masse du dimère de centrine dans la fraction éluée, comme cela a déjà été évoqué pour les précédents Western-Blots.



#### VIII.4.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

En parallèle des essais réalisés en immunoprécipitation, une seconde approche d'enrichissement en centrine 2 a été envisagée. Une des techniques classiquement utilisées est la précipitation différentielle des protéines par un sel. Les protéines étant plus ou moins solubles en solution, en faisant varier la force ionique de cette dernière, il est possible de les séparer par leur capacité à rester en solution ou bien à précipiter. Le sel communément utilisé est le sulfate d'ammonium (*Wingfield, 1998*).

Tout d'abord, des expériences préliminaires ont été réalisées sur des échantillons de centrine 2 *in-vitro*, ne serait-ce que pour s'assurer de la présence de cette dernière dans la fraction soluble à la suite de l'ajout du sulfate d'ammonium. En effet, lors de la purification de la centrine 2 recombinante suite à sa production, une étape de précipitation au sulfate d'ammonium ( $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) est justement utilisée pour la faire précipiter. En se plaçant à des concentrations en sulfate d'ammonium inférieures, la centrine 2 est attendue dans la fraction soluble. La centrine 2 purifiée (5 ng) irradiée à 0 et 10 Gy ( $\text{N}_3^*$ ) a été mise en contact avec du sulfate d'ammonium ( $C_f=1.65 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) puis le mélange a été centrifugé. Les surnageants en résultant sont déposés sur Western-Blots, présentés en Figure 133. La centrine 2 et ses oligomères sont résistants à la précipitation au sulfate d'ammonium, ils sont bien détectés dans le surnageant post-précipitation avec des intensités relatives quasi-identiques à la fraction de départ (Figure 133 (a)). La résistance de la centrine 2 à la précipitation au sulfate d'ammonium va permettre d'éviter une étape de resolubilisation des protéines précipitées, qui n'est souvent pas triviale à réaliser. Il est à noter que les pistes correspondantes à des échantillons ayant été en contact avec le sulfate d'ammonium semblent élargies car les protéines diffusent dans le gel. De plus, la présence de sulfate d'ammonium n'est pas souhaitée pour une potentielle analyse ultérieure en UPLC-MS. Une étape de dialyse entre la précipitation et l'introduction en UPLC-MS va ainsi être ajoutée. Le schéma des étapes nécessaires à la réalisation de la précipitation au sulfate d'ammonium est présenté en Figure 134. Les dialyses ont d'abord été effectuées contre de l'eau, l'objectif étant « uniquement » de s'affranchir de la présence du tampon RIPA et du sulfate d'ammonium pour la seconde dialyse. Puis, les dialyses ont finalement été réalisées contre du tampon phosphate ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.0) qui a semblé permettre une meilleure conservation de la centrine 2. Concernant la précipitation au sulfate d'ammonium en elle-même, cette étape induisant une dilution inévitable de l'échantillon, la quantité de sel introduite a été optimisée de manière à faire précipiter les protéines y étant sensibles tout en limitant la dilution imposée à cette étape. La concentration optimale finale dans l'échantillon est de  $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .



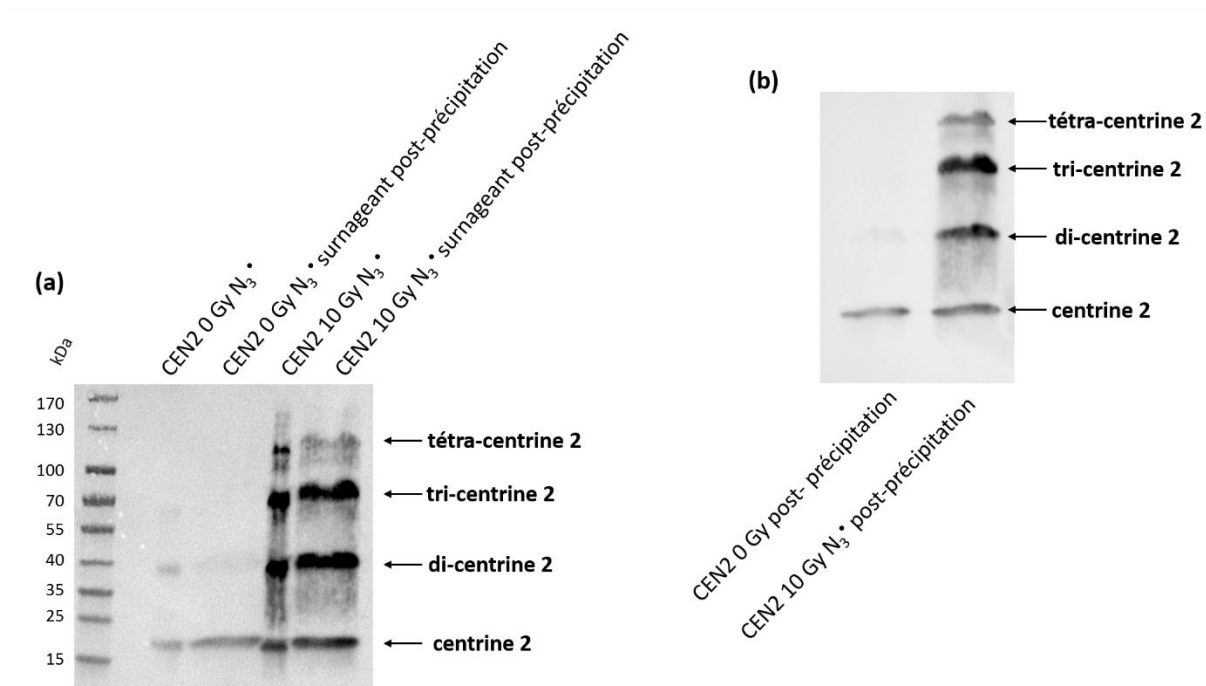


Figure 133: Western-Blots des surnageants issus de la centrifugation des échantillons de CEN2 recombinante irradiée à 0 et 10 Gy ( $N_3^*$ ), soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium. Blocage TBST 5% lait. Anticorps primaires : (a) ab196554 (dilution 1/500) ; (b) CST 2091 (dilution 1/500). Anticorps secondaire : anti-lapin CST 7074 (dilution 1/2000). 5 ng de protéine purifiée ont initialement été mis en contact avec le sulfate d'ammonium.

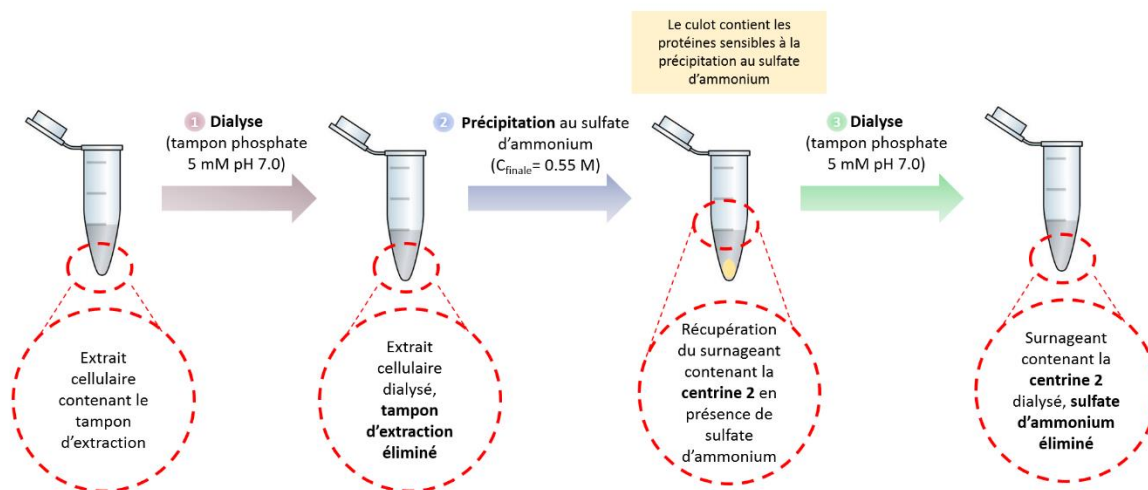


Figure 134: Schéma du protocole proposé de préparation des échantillons: dialyse n°1, précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse n°2.

Un extrait protéique issu d'une culture de MDA-MB-231 a subi les trois étapes précédemment évoquées. Une partie de l'échantillon a été dopée avec de la centrine 2 *in vitro* irradiée (22  $\mu$ g). A chaque étape, quelques microlitres de l'échantillon sont conservés pour le dépôt sur Western-Blot et pour effectuer le dosage de la concentration totale en protéines (dosage BCA). La coloration au rouge

Ponceau de la membrane, présentée en Figure 135 permet une visualisation de toutes les protéines. Sur les pistes correspondantes aux dépôts initiaux et à la suite de la première dialyse, des protéines sont détectées sur toute la hauteur de la membrane. Dès l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium, la quantité de protéines totales diminue drastiquement et les pistes sont quasiment indétectables avec la coloration au rouge Ponceau.

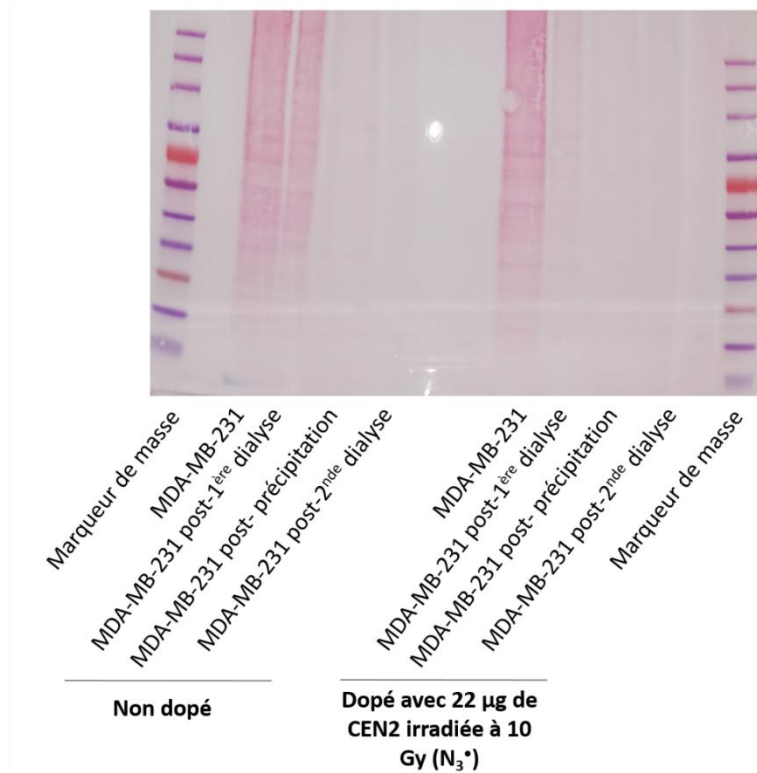


Figure 135: Coloration au rouge Ponceau de la membrane.

L'histogramme de l'évolution de la concentration en fonction des étapes du protocole est présenté en Figure 136 et montre que la concentration totale en protéines a été divisée par quatre environ entre l'échantillon non dopé déposé et celui récupéré post précipitation. Pour l'extrait dopé, la Figure 136 permet de rendre compte d'un phénomène de dilution observé lors de la première dialyse. Ce phénomène a très souvent été observé lors de la réalisation du protocole dialyses/précipitation et constitue une réelle limitation. Cet effet est aussi visible sur la membrane colorée au rouge Ponceau (Figure 135). Enfin, la membrane du Western-Blot est présentée en Figure 137. Que l'extrait ait été dopé ou non en centrine 2 recombinante, cette dernière est bien détectée et ce à chaque étape du processus. La précipitation au sulfate d'ammonium et les deux dialyses ont donc permis de conserver la centrine 2 dans l'extrait protéique final. Comme déjà observé sur les Figure 135 et Figure 136, suite à la précipitation, un nombre important de protéines a été éliminé.

Vers une analyse in-cellulo de la dimérisation oxydative de la centrine 2 humaine

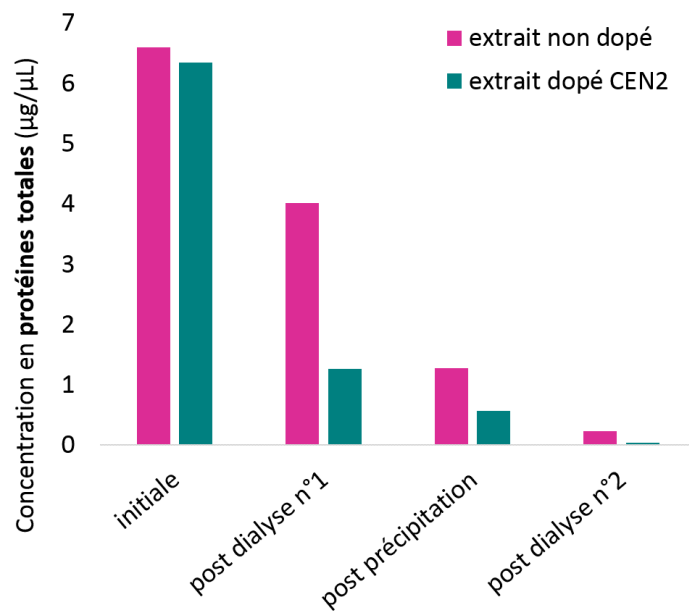


Figure 136: Evolution de la concentration totale en protéines dosée par BCA dans les extraits de MDA-MB-231 dopé et non dopé en CEN2 au cours des quatre étapes de préparation d'échantillons.

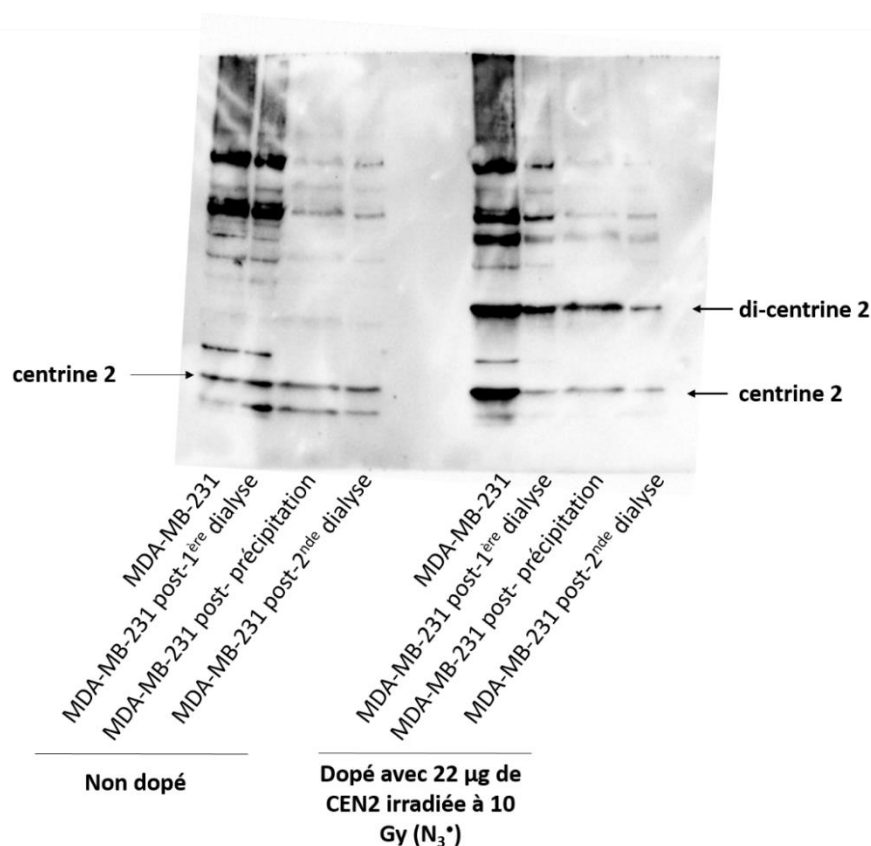


Figure 137: Western-blot des échantillons de MDA-MB-231 (extrait dopé ou non) prélevées à chaque étape du processus de précipitation au sulfate d'ammonium ( $C_{\text{finale}} = 0.55 \text{ M}$ ). Dialyses réalisées contre le tampon phosphate 5 mM pH 7.0. Blocage TBST 5% lait. Anticorps primaire anti-centrine 2: ab229538 (dilution 1/5000). Anticorps secondaire : anti-lapin CST 7074 (dilution 1/10000). Quantité de protéines totales dans l'extrait initial  $\approx 100 \mu\text{g}$ .

Ceci se traduit par la disparition ou la diminution de l'intensité de plusieurs bandes sur toute la hauteur de la membrane et surtout pour les hauts poids moléculaires. La bande qui migre juste au-dessus de la masse du monomère de centrine a également disparu. L'objectif de s'affranchir de la présence de protéines sensibles à la précipitation au sulfate d'ammonium est atteint et permet donc de purifier l'extrait protéique et de l'enrichir en centrine 2. Sur l'extrait non dopé (partie gauche de la membrane), l'intensité de la bande de centrine 2 est sensiblement constante au cours des différentes étapes, ce qui permet de valider le protocole proposé. Néanmoins, sur l'extrait dopé (partie droite de la membrane), l'intensité de la bande de centrine 2 est largement impactée lors de la première dialyse : cette observation corrèle la dilution précédemment évoquée. Néanmoins, suite à la première dialyse et jusqu'à la seconde, l'intensité de la bande de centrine 2 reste quasi-constante. Ainsi, lorsque les dialyses n'induisent pas de dilution de l'échantillon, le protocole proposé permet : i) de faire précipiter un grand nombre de protéines ; ii) de conserver la centrine 2 en solution ; iii) de s'affranchir du sulfate d'ammonium en vue de l'analyse par spectrométrie de masse.

### VIII.4.3. Vers une analyse par UPLC-MS

Parmi les deux méthodes d'enrichissement en centrine 2 considérées pour permettre une analyse par UPLC-MS, les expériences de précipitation au sulfate d'ammonium sont celles ayant permis d'éliminer un grand nombre de protéines autres que celle d'intérêt. Ce sont donc sur des échantillons précipités au sulfate d'ammonium que les analyses par UPLC-MS ont été réalisées. Suite à la seconde dialyse, une étape de digestion enzymatique est indispensable avant l'introduction sur la colonne UPLC. Par analogie avec les expériences réalisées sur la centrine 2 *in-vitro*, cette étape de digestion a été réalisée avec la trypsine, à 37°C pendant 4 heures. La Figure 138 résume les étapes clés de la culture des cellules à l'analyse des protéines par UPLC-MS.

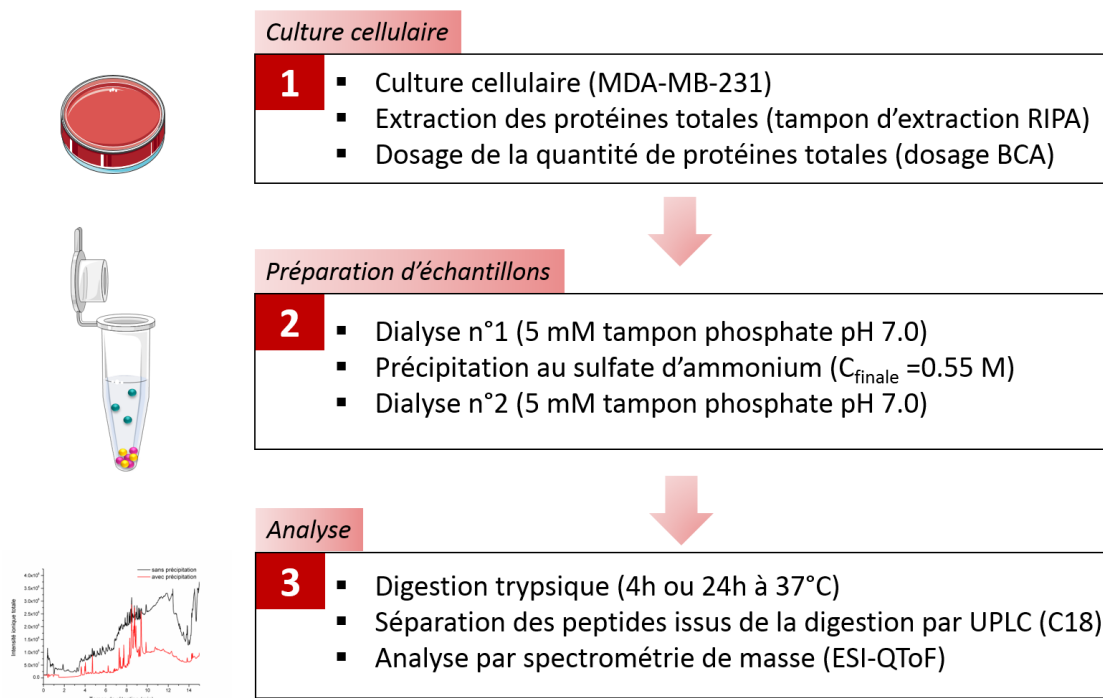


Figure 138: Représentation schématique des étapes nécessaires de la culture cellulaire à l'analyse par UPLC-MS.

L'objectif de l'analyse par UPLC-MS est de mettre en évidence la présence de centrine 2, dont la concentration au sein de tels extraits a pu être estimée à une dizaine de  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  au maximum. La centrine 2 recombinante irradiée à 10 Gy ( $\text{N}_3^*$ ) a donc été diluée à  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  puis digérée à la trypsine pendant 4 heures à 37°C et introduite en UPLC-MS. Ce même échantillon a été dilué par dix puis par cent pour estimer la limite de détection des peptides trypsiques d'intérêt de la centrine 2. L'un des peptides issus de la digestion trypsique de la centrine 2, déjà largement évoqué dans ce manuscrit est  $^{169}\text{TSLY}^{172}$ . En Figure 139 sont présentés les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z 483.25 \pm 0.05$  (TSLY) pour la protéine à 1, 0.1 et 0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . A 1 et 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , le peptide TSLY est détecté sans difficultés. A 0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , le signal du peptide TSLY est toujours détecté mais l'intensité du signal se rapproche de celle du bruit. A 0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , l'intensité du signal est environ trois à quatre fois l'intensité du signal du bruit. Ainsi, en considérant que l'intensité du signal doit être au moins trois fois égale à celle du bruit pour que l'espèce soit détectée, la limite de détection du peptide TSLY issu de la digestion de la centrine 2 est donc estimée à 0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  soit 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Or, il a été estimé sur le Western-Blot de la Figure 122 par exemple que la centrine 2 endogène soit présente à une concentration d'environ 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  c'est-à-dire du même ordre de grandeur que la limite de détection estimée.

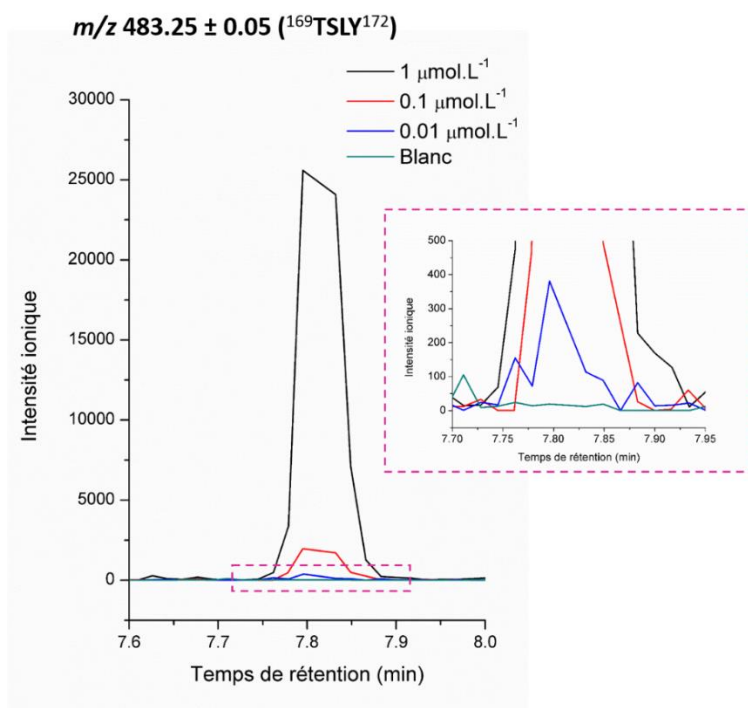


Figure 139: Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  483.25  $\pm$  0.05 (TSLY) pour des échantillons de CEN2 *in vitro* digérée à la trypsine et dilués à 1, 0.1 et 0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  avant injection en UPLC-MS. L'insert en pointillés correspond à l'agrandissement du signal observé à 0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Gradient chromatographique n°16 (Tableau 38).

L'estimation de la limite de détection effectuée sur le peptide tryptique TSLY issu de la digestion de la CEN2 *in-vitro* indique qu'en théorie, si de la centrine 2 a été extraite des cellules et digérée de manière à former le peptide TSLY, ce dernier est attendu à une intensité ionique proche de la limite de détection. De plus, les différentes dialyses nécessaires au processus d'enrichissement des échantillons en centrine 2 induisent une dilution qui risque de mener à des concentrations non détectables par UPLC-MS. Une étape de concentration des échantillons pourrait être considérée *via* l'utilisation de concentrateurs sous-vide.

Des extraits cellulaires ont tout de même été injectés en UPLC-MS, notamment pour visualiser l'effet matrice induit et confirmer l'importance de l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium. La Figure 140 (a) expose les chromatogrammes ioniques totaux d'un échantillon d'extrait protéique issu d'une culture de MDA-MB-231. Ce dernier a été injecté soit directement après la dialyse n°1 (absence de précipitation) ou après la dialyse n°2 (précipitation effective). La différence d'intensité du signal ionique total entre les deux conditions explicitées est sans appel : comme cela a été observé sur les Western-Blots, la précipitation au sulfate d'ammonium permet bien de s'affranchir de la contribution de nombreuses protéines. Sur des extraits protéiques similaires (un ayant été précipité et pas l'autre), le peptide synthétique KTSLY (autre peptide contenant la tyrosine terminale issu de la digestion tryptique de la centrine 2) a été ajouté juste avant l'injection en UPLC-MS à une concentration de 1

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z\ 611.35 \pm 0.05$  (KSTLY) sont visibles en Figure 140 (b) : dans le cas de l'extrait protéique n'ayant pas été précipité, le peptide KSTLY n'est pas détecté. Il y a un effet de suppression d'ions, dû à la trop grande quantité d'espèces et donc d'ions formés et détectés en même temps sur le détecteur. Ainsi, à travers ce dopage *in-situ* en peptide KSTLY, c'est la nécessité de la précipitation au sulfate d'ammonium qui est confirmée. En effet, dans le cas où l'extrait a subi l'étape de précipitation, le peptide KSTLY est détecté correctement.

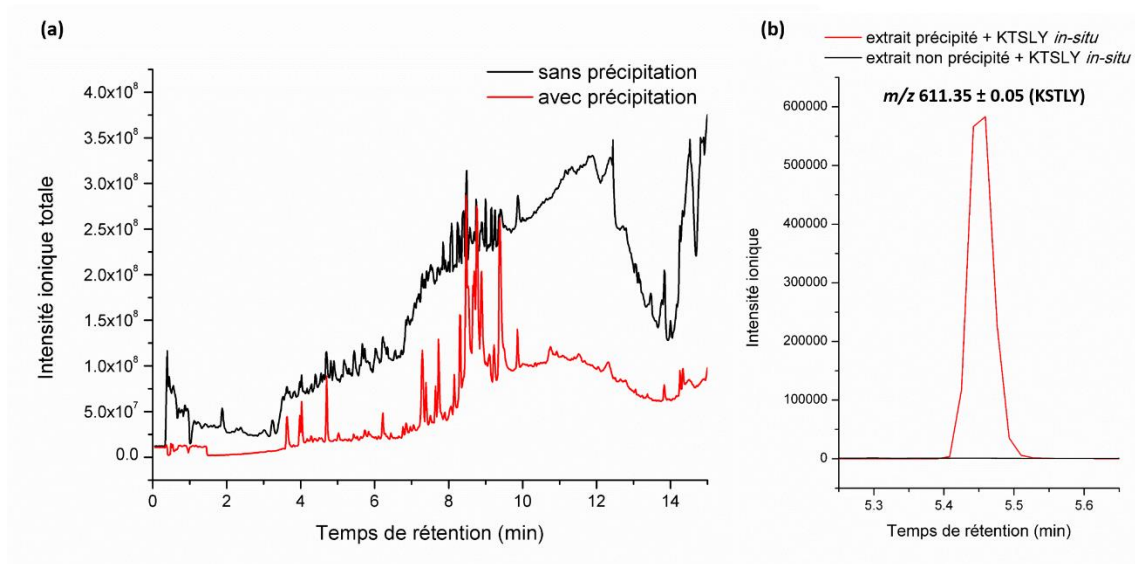


Figure 140: (a) Chromatogrammes ioniques totaux des extraits de MDA-MB-231 digérés à la trypsine (4 heures à 37°C) et ayant subi ou non une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium. Gradient chromatographique n°17 (Tableau 38). (b) Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z\ 611.35 \pm 0.05$  pour les extraits de MDA-MB-231 digérés et ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium ou non, dopés en KSTLY synthétique ( $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) avant l'UPLC-MS. Gradient chromatographique n°16 (Tableau 38).

Cette suppression ionique peut être confirmée par la visualisation du signal de leucine-enképhaline ( $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z\ 556.2766$ ) introduite en infusion à intervalles réguliers lors de l'analyse des échantillons protéiques pour corriger le signal en  $m/z$ . En Figure 141 sont présentés les chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z\ 556.27 \pm 0.05$  pour quatre échantillons différents : un blanc (pas d'extrait introduit, injection d'acide formique à 0.1% dans l'eau), un extrait protéique suite à une précipitation au sulfate d'ammonium, le même extrait non précipité, et ce dernier suite à une dilution par un facteur deux. Sur le chromatogramme correspondant au blanc, un signal ionique est observé à intervalle régulier avec une intensité quasi-constante : il s'agit de la leu-enképhaline, qui est introduite de manière orthogonale au spray issu de l'UPLC. Lorsque c'est l'extrait ayant subi la précipitation au sulfate d'ammonium qui est introduit, le signal ionique de la leu-enképhaline est légèrement modifié entre 10 et 15 minutes : cette fenêtre temporelle est riche en ions et le phénomène de suppression ionique apparaît.



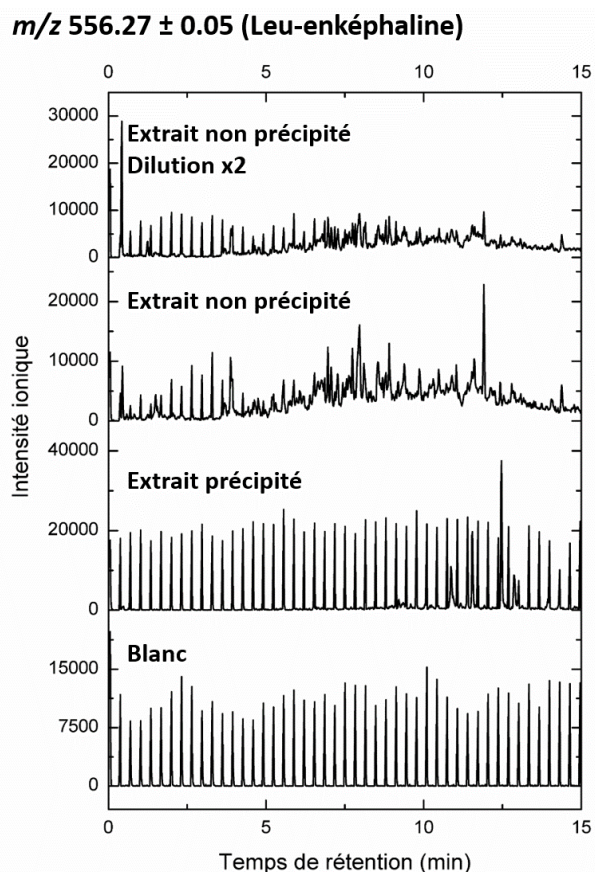


Figure 141 : Chromatogrammes ioniques extraits à  $m/z$  556.27  $\pm$  0.05 (leu-enk) pour un échantillon dit « blanc » (phase mobile), un échantillon protéique issu d'un extrait cellulaire ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium, le même échantillon protéique n'ayant pas subi la précipitation et ce dernier suite à une dilution par 2. Gradient chromatographique n°16 (Tableau 38).

Dans le cadre de l'extrait n'ayant pas été précipité au sulfate d'ammonium, ce phénomène de suppression des ions est exalté : le signal initial de la leu-enképhaline est à peine visible sur le chromatogramme extrait, il est pollué par la détection simultanée d'ions issus de l'extrait protéique, extrêmement riche. L'étape de précipitation au sulfate d'ammonium apparaît donc indispensable à l'analyse de ces échantillons en UPLC-MS.

### VIII.5. Bilan et perspectives

En conclusion de l'ensemble des Western-Blots présentés, plusieurs questions se posent. Du dimère de centrine 2 a-t-il réellement été détecté *in-cellulo*? Sur plusieurs membranes, une bande a été détectée à sa masse moléculaire (Figure 123, Figure 125 (b), Figure 126) alors que sur d'autres aucun signal n'y a été détecté (Figure 125 (a), Figure 128). Une hypothèse est que l'état redox des cellules en culture ne puisse pas être contrôlé et que lors de certaines extractions, la centrine 2 ait été oxydée par un dérèglement de la balance redox. Cela expliquerait également la présence de cette bande dans des échantillons non irradiés. L'absence de spécificité de certains des anticorps et la



dépendance inter-lots pourraient aussi expliquer sa détection aléatoire. L'utilisation d'anticorps anti-bi-tyrosine, comme déjà évoqué, aurait pu permettre de croiser les informations et potentiellement de discriminer ces bandes s'il s'agit effectivement de dimère de centrine 2. Malheureusement, même du dimère de centrine 2 recombinante n'a pas pu être détecté avec ces anticorps. Les quelques équipes s'étant intéressées à la détection de centrine 2 en cellules ont tous travaillé avec des anticorps produits à façon (*Salisbury et al., 2002; Acu et al., 2010; Renaud et al., 2011*). Il pourrait être envisagé d'en faire fabriquer un pour gagner en spécificité. Toutefois, il est important de noter que leurs Western-Blots ne sont pas présentés en entier, la bande à la masse de la centrine 2 est très souvent isolée et que ces équipes ne se sont pas intéressés à la question de la dimérisation. Il n'est donc pas possible de comparer la potentielle présence de dimère *in-cellulo* dans d'autres études. Une autre solution serait de taguer la centrine 2 et d'utiliser des anticorps dirigés contre le tag choisi. La centrine 2 a déjà été taguée avec une protéine fluorescente, la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et il a pu être montré que la présence du tag ne gêne pas la culture des cellules ni ses fonctions au niveau des centrioles (*D'Assoro et al., 2001; Ying et al., 2014*). La GFP est une protéine de 27 kDa : son utilisation dans le cadre de la dimérisation de la centrine 2 (19 kDa) impliquerait de vérifier que sa présence ne gêne i) ni la formation de dimères ; ii) ni son interaction avec XPC dans le cadre du NER ; iii) ni sa délocalisation vers le noyau dans certaines conditions. De plus, le risque est que cette protéine tag, qui possède des résidus aromatiques, réagisse lors de l'irradiation gamma et forment des oligomères. Une étude menée l'oxydation de la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) lors d'irradiations gamma n'a pas montré d'oligomérisation pour des doses jusqu'à 400 Gy. Toutefois, il n'est pas à exclure que la centrine 2 et la GFP ou la CFP puissent se lier covalamment lors d'une exposition à des radicaux oxydants (*Alvarez et al., 2010*). Ainsi, il s'avérerait plus prudent d'envisager un tag de plus faible poids moléculaire et ne possédant pas de résidus aromatiques dans l'idéal. Deux peptides répondent à ces critères: V5 (GKPIPPLLGLDST) et Rho1D4tag (TETSQVAPA). Néanmoins, Rho1D4tag est généralement greffé au domaine C-terminal des protéines, ce qui pourrait gêner la dimérisation de la centrine 2. Une dernière solution à proposer pour progresser sur la nature des bandes observées à la masse moléculaire du dimère de centrine 2 serait de considérer des petits ARN interférents contre la centrine 2. En comparant les bandes du poids moléculaire d'intérêt sur le Western-blot pour des cellules qui expriment la centrine 2 et d'autres pour lesquelles son expression est « éteinte », il devrait être possible de statuer sur l'implication de la centrine 2 dans ces espèces. Pour tenter d'expliquer la détection aléatoire des bandes correspondantes à la masse du dimère, il faut aussi s'interroger sur la répétabilité des extractions réalisées. Si du dimère de CEN2 est présent dans les cellules même à 0 Gy, peut-être est-il plus difficile à extraire que la centrine 2 monomérique ? Quel qu'ait été l'anticorps utilisé, dans les extraits cellulaires, aucun n'a présenté une unique bande à la masse de la centrine 2. D'autres bandes sont détectées, souvent à des poids moléculaires assez importants (> 100 kDa).

Connaissant l'extrême réactivité de la centrine 2 à la présence de radicaux oxydants, est-il possible d'imaginer qu'*in-cellulo*, elle soit liée de manière covalente à des protéines de haut poids moléculaire ? Ces bandes pourraient-elles correspondre à des oligomères « signature » de la centrine 2 ? L'utilisation parallèle d'anticorps anti-XPC, partenaire cellulaire identifié de la centrine 2 est à envisager, dans l'objectif d'identifier ces bandes aux hautes masses. A propos des partenaires cellulaires de la centrine 2, il est évident que la recherche de pontages covalents *in-cellulo* ne se limite pas aux dimères de centrine 2. Au sein du complexe CEN2-XPC, des liaisons covalentes se forment-elles lors d'un phénomène de stress oxydatif dans les cellules ?

Concernant une détection par UPLC-MS, bien qu'à ce stade de l'étude, aucune expérience n'ait permis de rendre compte de la détection de la centrine 2 au sein d'extraits protéiques, la démarche a progressé. Pour les expériences futures, l'enrichissement des extraits cellulaires en centrine 2 doit être amélioré. Il apparaît indispensable de procéder à l'étape de précipitation des protéines au sulfate d'ammonium. Elle permet de réduire de plus de 50 % la concentration en protéines totales tout en conservant la centrine 2 humaine dans la fraction soluble résultante. Avant l'introduction de l'extrait enrichi en UPLC-MS, il est indispensable de vérifier par Western-Blot et par dosage BCA que les étapes de dialyses et de précipitation permettent effectivement cet enrichissement en centrine vis-à-vis des protéines totales. La durée de la digestion à la trypsine pourrait aussi être un paramètre à moduler. Si elle est réalisée pendant une durée de quatre heures, la centrine 2 recombinante est digérée efficacement mais d'autres protéines risquent de ne pas l'être. Ceci peut être un avantage, si, sur la gamme des temps de rétention pour laquelle sont attendus les peptides tryptiques de la centrine 2, moins de peptides issus d'autres protéines sont élués. Au contraire, en supposant que la centrine 2 endogène nécessite une durée de digestion supérieure, cela pourrait limiter la probabilité de détecter ses fragments tryptiques.

Pour améliorer cet enrichissement en centrine 2 dans les extraits cellulaires, il est possible d'imaginer une mise en contact avec une surface d'or. En effet, il est assez bien connu que l'or effectue des liaisons quasi-covalentes Au-S avec les atomes de soufre. Les résidus cystéines qui possèdent un atome de soufre sont alors susceptibles de se lier à l'or. Une grande majorité des protéines possèdent au moins un résidu cystéine dans leur séquence mais pas la centrine 2 humaine. Pour optimiser la surface de contact avec l'or, ce sont des nanoparticules d'or qui pourraient être mises en contact avec l'extrait cellulaire. Le principe de cette proposition repose sur la formation d'une liaison entre les protéines contenant des résidus cystéines accessibles en surface et les nanoparticules d'or. Les nanoparticules, potentiellement liées à certaines protéines sont ensuite précipitées par centrifugation et les protéines restées solubles, comme la centrine 2 humaine, devraient donc pouvoir être récupérées dans le surnageant. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un pré-traitement classique pour l'analyse

en UPLC-MS d'extraits cellulaires, l'équipe d'accueil de ma thèse possède une expertise en synthèse et caractérisation de nanoparticules d'or. Même si la centrine 2 est susceptible d'interagir avec les nanoparticules *via* des liaisons faibles électrostatiques et de Van der Waals (*Brun et al., 2009*), si des protéines contenant des cystéines accessibles sont présentes, elles devraient se lier préférentiellement à celles-ci. L'influence de la taille des nanoparticules utilisées pourrait être intéressante à considérer. En effet, au plus les nanoparticules possèdent un faible diamètre, au plus leur surface spécifique de contact est élevée. Une autre approche pourrait être de considérer une mise en contact avec une surface d'or plane (lame) pour éviter une dilution des échantillons à cette étape mais cela limiterait la surface de contact effective.

## IX. CONCLUSION GENERALE

---

Ce travail de thèse avait initialement trois objectifs. Le premier était d'étudier l'oxydation de la centrine 2 humaine, et plus précisément sa dimérisation sous l'effet des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{N}_3\cdot$  et d'en proposer une comparaison. Le second objectif consistait à considérer la centrine 2 humaine en présence d'un partenaire cellulaire identifié, la XPC. Cet axe visait à étudier l'oxydation du complexe formé des deux protéines, et de répondre notamment à la question de la persistance de dimérisation de la centrine 2. Enfin, le troisième objectif était de s'intéresser à l'oxydation de la centrine 2 en milieu cellulaire.

Très tôt dans le projet, l'étude de la dimérisation de la centrine 2 humaine a amené à observer une diversité en nombre des dimères formés. Dans ce contexte, ce travail a connu trois temps, correspondant à peu de choses près aux trois objectifs initiaux. Dans un premier temps, la mise en évidence d'un nombre d'isomères de bi-tyrosine supérieur à deux a amené à s'interroger sur la nature des structures formées et par extension, sur celle des mécanismes de dimérisation impliqués. Dans un second temps, au-delà de l'investigation structurale, la question de la pluralité des dimères dans d'autres protéines que la centrine 2 humaine s'est posée. Aussi, bien que les pontages covalents soient très souvent étudiés à l'échelle d'une protéine isolée, il a convenu d'investiguer par ailleurs la formation de dimères liés covalamment entre deux protéines identifiées comme partenaires *in-vivo*. Enfin, dans un troisième temps, ce travail a consisté en l'exploration de dimères de centrine 2 humaine à l'échelle cellulaire.

La stratégie d'investigation des structures de dimères a impliqué de considérer des systèmes de complexité croissante : de l'acide aminé isolé à la cellule. L'étude de la dimérisation de la tyrosine libre a permis d'identifier une nouvelle famille de dimères. Une nouvelle méthodologie basée sur des expériences d'UPLC-MS combinées au marquage isotopique et à l'échange H/D a prouvé l'implication du radical tyrosyle localisé en *para* dans la formation de ces isomères. Sa recombinaison avec le radical localisé en *ortho* conduit à une sous-structure de type cyclohexadiénone sur laquelle ont lieu deux additions de Michael intramoléculaires. Les dimères ainsi générés sont multicycliques. La nature des fonctions chimiques à l'origine de ces additions a été étudiée à travers la dimérisation de tyrosines protégées et de peptides. Les atomes d'azote impliqués dans les liaisons peptidiques semblent être à même de s'additionner et de nombreux diastéréoisomères semblent formés. A l'échelle suivante, celle des protéines, la diversité des dimères de tyrosine a aussi été mise en exergue, tout comme celle de dimères impliquant également les résidus tryptophane. Puis, deux complexes protéiques impliquant

la centrine 2 humaine ont été étudiés. Pour la première fois, la formation de liens covalents induits lors d'une oxydation a été identifiée entre les deux partenaires. La dernière étape sur l'échelle croissante en complexité est celle de la recherche de dimères de centrine 2 humaine *in-cellulo*. Leur investigation a été menée à travers l'utilisation d'anticorps couplée à un enrichissement des extraits cellulaires et à une approche par UPLC-MS. Les conditions d'enrichissement comme de détection de ces pontages restent à optimiser pour statuer quant à leur formation *in-cellulo*.

La stratégie générale mise en place dans cette thèse pour l'identification de dimères de tyrosine au sein de protéines a été basée sur l'étude i) du système le plus simple qui puisse être considéré dans ce contexte, l'acide aminé libre, qui a permis d'identifier plus précisément les mécanismes et les atomes à l'origine des pontages ; ii) d'un peptide synthétique de séquence choisie et correspondante à un fragment tryptique attendu de la digestion de la protéine d'intérêt, qui a permis de confirmer la pluralité des structures à une échelle supérieure et de rendre compte de la coexistence d'intermédiaires et de produits finaux de dimérisation; iii) de ce même peptide, cette fois issu de digestion à la trypsine de la protéine. Dans le cas de la centrine 2 en particulier, les expériences menées sur le peptide modèle ont été cruciales pour rendre compte de la nature des pontages formés à l'échelle protéique. La philosophie de cette stratégie est donc de travailler à l'échelle de l'acide aminé pour éclaircir les positions impliquées, notamment *via* des marquages isotopiques puis à l'échelle de peptides de séquences choisies judicieusement. En effet l'objectif est qu'ils permettent une analogie directe avec la digestion protéique.

Au-delà de la stratégie générale qui s'appuie sur la considération de systèmes de complexité croissante, c'est la stratégie analytique en tant que telle qui a permis de progresser dans l'élucidation structurale des pontages covalents impliquant des acides aminés aromatiques. Tout d'abord, c'est l'excellente résolution qu'offre l'UPLC qui permet de rendre compte de la pluralité des structures formées. La détection par spectrométrie de masse est également fondamentale, elle offre une très bonne sensibilité. Sous réserve que les produits de dégradation formés en solution suite à l'oxydation puissent être ionisés et suffisamment stables en source, ils peuvent être détectés par spectrométrie de masse. L'attribution de la nature des oligomères formés (dimères, trimères...) est rendue possible par identification du profil isotopique en comparaison à des valeurs théoriques calculées. La possibilité de réaliser des expériences de fragmentation MS/MS est également très informative pour identifier les résidus impliqués dans les pontages à l'échelle de peptides et de protéines. L'utilisation d'une autre technique de détection en substitution à la spectrométrie de masse apparaît délicate à envisager. Les détecteurs en absorption et en fluorescence en complément de celle en spectrométrie de masse ont permis l'apport d'informations complémentaires. Toutefois, elles n'ont pas permis une aussi bonne sensibilité de détection, d'autant plus que plusieurs des isomères ont montré un signal de fluorescence

nul. Une dimension de détection supplémentaire peut aussi être apportée par la spectrométrie de mobilité ionique, qui permet de rendre compte de la formation de diastéréoisomères. L'UPLC-MS, l'UPLC-MS/MS et l'UPLC-IMS/MS peuvent être appliquées à toutes les tailles de systèmes considérés, de l'acide aminé à la protéine à condition qu'elle ait subi une digestion enzymatique. Les expériences de marquage isotopique pourraient être adaptées à n'importe quel acide aminé. A l'inverse, les expériences d'échange H/D sont spécifiques à l'analyse de sous-structures de dimères impliquant un équilibre céto-énolique. Néanmoins, l'étude de pontages tyrosine-tryptophane a également pu bénéficier de cette approche et tout type de lien impliquant la tyrosine le pourrait pareillement. Cette méthodologie pourrait être appliquée à d'autres protéines ou peptides d'intérêt biologique évident comme le peptide  $\beta$ -amyloïde. Impliqué dans la formation d'agrégats associée à la maladie d'Alzheimer, des ponts bi-tyrosine de ce dernier ont été mis en évidence *in-vitro* (Galeazzi et al., 1999; Yoburn et al., 2003).

*In fine*, les trois axes d'investigation formulés au commencement du projet ont tous été explorés. L'étude de la dimérisation de la centrine 2, menée à travers la considération d'intermédiaires de complexité croissante a permis d'enrichir la littérature à propos de la diversité structurale des pontages covalents d'acides aminés aromatiques. La comparaison \*OH/N<sub>3</sub>\* à propos des autres produits d'oxydation pourra être prolongée à court terme. Des pontages covalents issus de l'oxydation ont été identifiés au sein de deux complexes impliquant la centrine 2 et des fragments de la XPC, dont la formation avait préalablement été caractérisée. La recherche de dimères de centrine 2 en milieu cellulaire a été initiée, les conditions optimales de détection investiguées mais cet axe du projet reste à approfondir.

A court terme, l'aspect suivant à investiguer est l'efficacité de dimérisation de la centrine 2 humaine. Il a été montré que lors d'une oxydation par les radicaux azoture, la dimérisation est stœchiométrique, et ce pour des doses de l'ordre du Gray (Brun et al., 2010). Parmi les propositions faites pour tenter d'expliquer cette efficacité, la prédisposition de la centrine 2 sous forme de dimère non covalent en solution a été évoquée ainsi que l'importance de la séquence et de la structure tridimensionnelle de la protéine. En effet, Et Taouil et al. ont montré une corrélation entre la perte de structure (analysée par dichroïsme circulaire) et la diminution du rendement de dimérisation (Et Taouil et al., 2014). Afin de déterminer la séquence minimale en acides aminés nécessaire pour attester de cette efficacité, une approche de quantification du processus de dimérisation est envisagée. Par analogie avec l'approche menée sur le dénombrement et l'investigation structurale des dimères, l'étude quantitative est proposée sur des systèmes de complexité moléculaire croissante : tyrosine libre, peptides de taille croissante contenant la tyrosine terminale, partie C-terminale de la centrine 2, centrine 2  $\Delta$ 25, centrine 2 entière. La difficulté de cette étude quantitative réside dans la

nécessité d'utiliser une méthode commune de quantification pour tous les systèmes considérés. Comme cela a déjà été évoqué, la détection par spectrométrie de masse est possible pour toutes ces échelles moléculaires mais la quantification l'est beaucoup plus difficilement. Aussi, la mise en évidence de plusieurs isomères de bi-tyrosine pour chacun des systèmes complexifie l'approche. Une quantification par absorption UV-visible à 285 nm suite à une séparation par UPLC apparaît comme la méthode adaptée à l'ensemble des tailles de systèmes. Toutefois, l'intensité du signal d'absorption pour certains isomères n'est pas suffisante et la connaissance des coefficients d'extinction molaire de chacun des dimères reste essentielle. Une autre démarche pour investiguer l'efficacité à dimériser en fonction de la séquence en acides aminés est de s'intéresser au radical tyrosyle. En effet, c'est sa recombinaison qui est à l'origine de la formation de bi-tyrosine. Est-il possible d'expliquer l'efficacité de dimérisation de la centrine 2 par une formation facilitée du radical tyrosyle à l'échelle de la protéine ? Ou bien est-ce la recombinaison radicalaire qui est plus efficace ? Des expériences de radiolyse pulsée ont débuté au Laboratoire de Radiolyse Pulsée de l'Université de Notre-Dame (Etats-Unis) et vont être poursuivies. La formation et la disparition du radical tyrosyle seront suivies par absorption UV-visible. Leurs constantes de vitesse pourront être déterminées pour chacun des systèmes moléculaires considérés. De plus, sur les systèmes protéiques, l'influence de la perte de structure tridimensionnelle sera étudiée en augmentant la température lors des irradiations.

A plus long terme, la formation de dimères covalents du complexe CEN2-XPC pourrait être étudiée *in-vitro* en présence d'un plasmide ou d'un brin d'ADN. En considérant des irradiations avec des rayonnements UV et  $\gamma$ , qui induisent différents types de lésions à l'ADN, une comparaison des pontages formés pourrait être effectuée. Puis, à l'échelle *in-cellulo*, il serait extrêmement intéressant de pouvoir irradier spécifiquement chaque compartiment cellulaire (noyau, cytoplasme) et d'étudier la localisation subcellulaire de la centrine 2 résultante. En effet, la XPC et la centrine 2 ont été observées comme colocalisées au noyau lors d'un dommage induit à l'ADN par irradiation UV intégrale des cellules, mais qu'en est-il si la centrine 2 cytoplasmique n'est pas directement dans la zone d'oxydation ? Sa fraction nucléaire augmente-t-elle tout de même par rapport au cas où l'ADN n'est pas lésé ? Ces expériences pourraient être effectuées à l'aide de microfaisceaux d'ions. Certaines installations permettent à la fois de cibler une zone d'irradiation submicrométrique, de l'ordre de grandeur des structures subcellulaires tout en offrant la possibilité d'effectuer des expériences d'imagerie et de microscopie sur les cellules d'intérêt très rapidement après l'irradiation et jusqu'à plusieurs heures en aval (Drexler et al., 2015).

# X. METHODES EXPERIMENTALES

## X.1. Protéines, peptides et acides aminés

Les protéines utilisées dans le cadre de cette thèse (centrine 2, centrine 2  $\Delta$ 25, calmoduline et XPC3 humaines) ont été produites dans *E. Coli* et purifiées selon des protocoles mis au point par notre collaboratrice Patricia Duchambon à l'Unité U1196 Inserm. La production et la purification des centrines 2 entière et  $\Delta$ 25 ont été décrites par Blouquit et al. (*Blouquit et al., 2007*). La production et la purification de la calmoduline a été décrite par Gibrat et al. et celles de la XPC3 dans Miron et al. (*Gibrat et al., 2008; Miron et al., 2008*). Pour chacune des protéines considérées, la purification a été effectuée *via* des dépôts successifs sur des colonnes de chromatographie échangeuse d'ions, d'interactions hydrophobes et par gel filtration. Les peptides KTSLY et KTSLYG ont été produits par Proteomic solutions (Saint Marcel, France) et le peptide P17XPC (NWKLLAKGLLIRERLKR) par Proteogenix (Schiltigheim, France). La L-tyrosine (pureté > 99%), le L-tryptophane (pureté > 99%), la L-tyrosine-(phenyl-3,5-d<sub>2</sub>) (98% D), le L-tryptophane-(indole-d<sub>5</sub>) (97% D) et la N-acétyl-L-tyrosine (pureté > 99%) proviennent de chez Sigma-Aldrich. L'ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine (sous sa forme monohydratée, pureté 97%) provient de chez Alfa Aesar et la L-tyrosine O-méthylée (pureté 98%) de chez Acros Organics.

## X.2. Irradiations gamma

Les solutions mères des protéines, peptides et acides aminés ont été préparées dans l'eau ultrapure (18.2 M $\Omega$ .cm) et leurs concentrations déterminées d'après absorption UV-visible à 280 nm. Leurs coefficients d'extinction molaire sont présentés dans le Tableau 35.

Espèce	$\epsilon$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ) à 280 nm
Centrine 2 humaine	1490
Centrine 2 humaine $\Delta$ 25	1490
Calmoduline	2980
XPC3	17790
P17XPC	5500
KTSLYG	1490
KTSLY	1490
L-tyrosine, L-tyrosine-(phenyl-3,5-d <sub>2</sub> ), L-tyrosine O-méthylée, N-acétyl-L-tyrosine et ester éthylique de N-acétyl-L-tyrosine	1280
L-tryptophane, L-tryptophane-(indole-d <sub>5</sub> )	5500

Tableau 35: Coefficients d'extinction molaire à 280 nm des protéines, peptides et acides aminés utilisés.



Afin d'effectuer les irradiations gamma, les solutions sont diluées à  $50 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dans  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de tampon phosphate (pH 7.0) ainsi qu'en présence de  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  d'azoture de sodium dans les cas où l'oxydation est réalisée par les radicaux azoture. Les échantillons sont ensuite dégazés sous un flux de  $\text{N}_2\text{O}$  pendant 40 minutes afin d'obtenir une saturation complète des solutions.

### X.2.1. Source panoramique et débits de dose

Les échantillons ont été irradiés avec une source d'irradiation gamma panoramique au  $^{60}\text{Co}$  (Figure 142). Elle se situe dans une pièce au sein de laquelle la position relative des échantillons par rapport à la source peut être modulée ce qui permet de faire varier le débit de dose ( $\text{Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ ). La dose reçue par les échantillons est donc calculée en déterminant le débit de dose de la position à laquelle ils sont irradiés par rapport à la source de cobalt et en tenant compte du temps d'irradiation. Le débit de dose classiquement utilisé lors des irradiations est de  $10 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ . Pour des doses inférieures à 10 Gy, un débit de dose de 2 ou  $5 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$  a pu être utilisé.

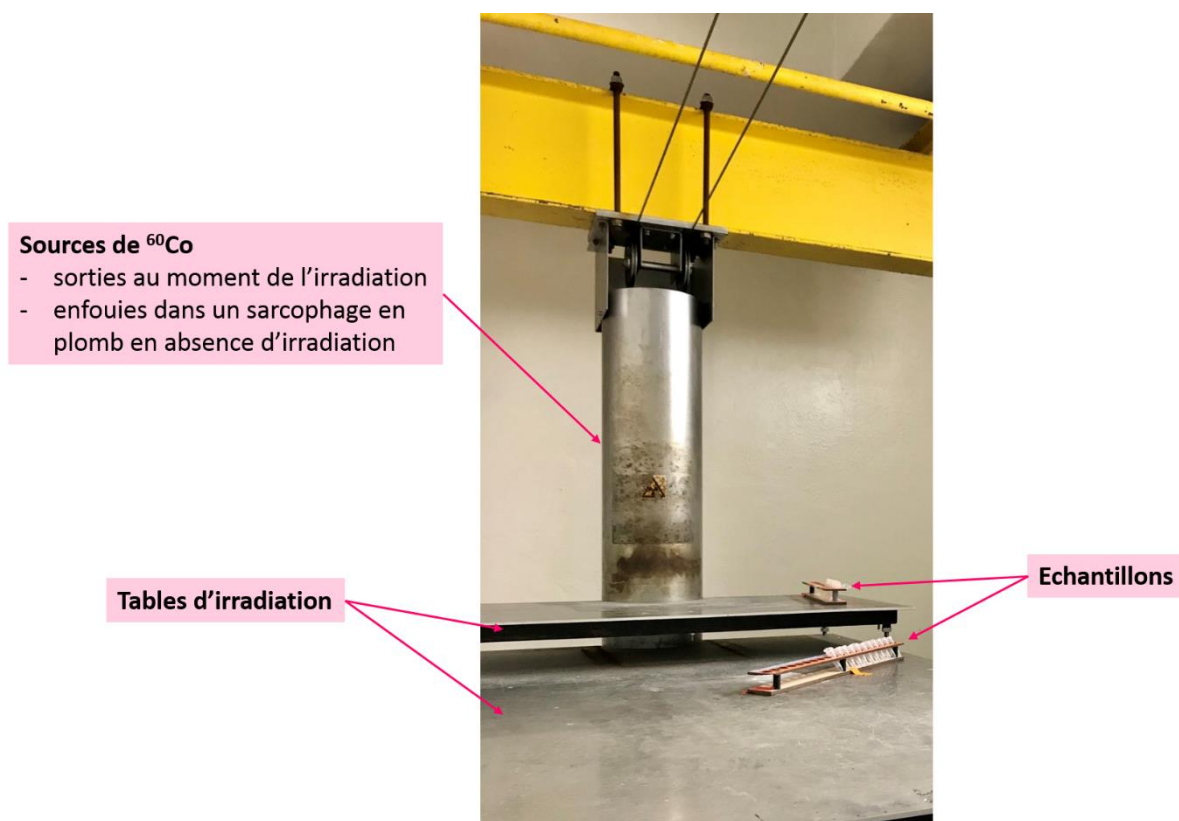


Figure 142: Photographie de la source d'irradiation gamma.

### X.2.2. Dosimétrie de Fricke

Les débits de dose sont mesurés avec un dosimètre chimique, le dosimètre de Fricke. Son principe repose sur l'oxydation de l'ion fer (II) en ion fer (III) en milieu acide aéré (en présence d'oxygène) par

certaines produits de la radiolyse de l'eau (*Spinks & Woods, 1990*): les réactions chimiques qui s'y produisent sont exposées en Figure 143 ainsi que le rendement radiolytique résultant de l'ion  $Fe^{3+}$ .

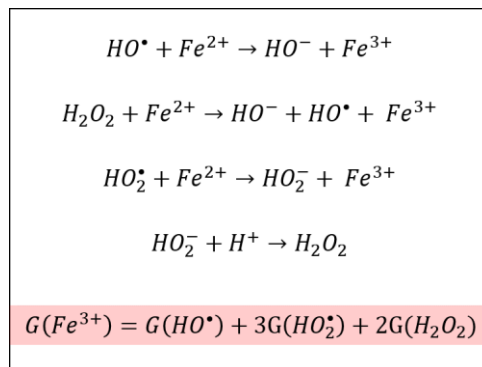


Figure 143: Oxydation radiolytique du fer (II) en fer (III): principe de la dosimétrie de Fricke.

La formation de l'ion  $Fe^{3+}$  est suivie par absorption UV-visible puisque ce dernier absorbe à 304 nm, longueur d'onde à laquelle le coefficient d'absorption molaire de l'ion  $Fe^{2+}$  est négligeable. La dose est finalement calculée grâce à l'Equation 3 :

$$D = \frac{\Delta A}{G(Fe^{3+}) * \epsilon * \rho * l} \text{ (Equation 3)}$$

où  $\Delta A$  est la différence d'absorbance à 304 nm entre échantillons irradié et non irradié,  $\epsilon$  le coefficient d'absorption molaire de l'ion fer (III) à 304 nm ( $2196 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $\rho$  la masse volumique de la solution ( $1024 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) et  $l$  le chemin optique parcouru en cm.

La solution de Fricke est composée de Fe(II) sous forme de sel de Mohr ( $6\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en milieu acide sulfurique ( $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et en présence de chlorure de potassium ( $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cette solution est préparée plusieurs heures avant utilisation et laissée agitée à l'air pour assurer une saturation en dioxygène.

### X.2.3. Expériences d'échange H/D avec le solvant

Dans le cadre des expériences d'échange H/D avec  $D_2O$ , les échantillons sont préparés similairement à ce qui a été décrit en amont mais en diluant les solutions mères ainsi que le tampon phosphate et l'azoture de sodium dans  $D_2O$  (Sigma-Aldrich, > 99.9% D). Des conditions différentes de conservation des échantillons ont été appliquées : i) « T0 », pour laquelle les échantillons ont été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  directement après irradiation et ii) « TX », les échantillons ont été maintenus à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant X heures avant d'être également congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### X.3. Gels d'électrophorèse SDS-PAGE

Les expériences d'électrophorèse ont été réalisées sur deux types de gels Criterion TGX (BioRad, Marne la Vallée, France) à 12% d'acrylamide-bisacrylamide ou avec un gradient de 4 à 15% d'acrylamide-bisacrylamide en tampon Tris-Glycine. Les protéines ont été dénaturées par chauffage à 100°C pendant 5 minutes en présence d'un tampon dit « de charge », concentré en SDS. Comme les protéines considérées ne possèdent aucune cystéine, les échantillons ont été déposés dans des conditions non réductrices (absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol). Les protéines recombinantes ont été déposées à  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  par piste ( $V_{\text{dépôt}} = 15 \mu\text{L}$ ). La migration est effectuée à un voltage de 170 V pendant 50 minutes. Les gels sont successivement colorés au bleu de Coomassie (12 heures) puis décolorés par mise en contact de deux solutions successives (4 heures puis 1 heure). Les compositions des tampons et des solutions de coloration/décoloration sont exposées dans le Tableau 36.

	<b>Composition</b>
<b>Tampon de charge</b>	62.5mM Tris 25% Glycérol 2% SDS 0.17 g·L <sup>-1</sup> Bleu Brillant G-250
<b>Tampon Tris-Glycine</b>	190 mM Glycine 25 mM Tris 0.1% SDS
<b>Solution de coloration</b>	0.1 g·L <sup>-1</sup> Bleu de Coomassie 1 g·L <sup>-1</sup> Sulfate de cuivre 150 mL·L <sup>-1</sup> Ethanol 190 mL·L <sup>-1</sup> Acide Acétique
<b>Solution de décoloration n°1</b>	0.025 g·L <sup>-1</sup> Bleu de Coomassie 1 g·L <sup>-1</sup> Sulfate de cuivre 145 mL·L <sup>-1</sup> Ethanol 190 mL·L <sup>-1</sup> Acide Acétique
<b>Solution de décoloration n°2</b>	100 mL·L <sup>-1</sup> Ethanol 100 mL·L <sup>-1</sup> Acide Acétique

Tableau 36: Composition des tampons et solutions de coloration/décoloration des gels d'électrophorèse.

### X.4. Spectroscopie de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre Fluorolog 3 (Horiba) dans des cuves avec quatre faces en quartz et de chemin optique 1 cm dans le même tampon que celui ayant servi à l'irradiation. Les échantillons ont été dilués à  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La largeur des fentes pour l'excitation et l'émission est fixée à 2 nm et le temps d'intégration à 1 s. Les longueurs d'onde d'excitation et la gamme de détection d'émission sont décrites dans le Tableau 37.

$\lambda_{\text{excitation}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{émission}} \text{ (nm)}$
<b>280</b>	[295:530]
<b>285</b>	[300:530]
<b>315</b>	[330:530]
<b>320</b>	[335:530]

Tableau 37: Longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

### X.5. Titration calorimétrique isotherme

L'affinité existante entre deux partenaires moléculaires est classiquement étudiée par microcalorimétrie : ce sont les échanges de chaleur provoqués par la réaction chimique qui sont mesurés. Plus précisément, la titration calorimétrique isotherme (ITC) est utilisée pour caractériser les interactions entre biomolécules. La constante d'équilibre d'association ( $K_a$ ) qui rend compte de l'affinité et la stœchiométrie ( $n$ ) de la réaction sont accessibles à travers la mesure de la chaleur libérée ou reçue lors de l'ajout progressif d'un des réactifs sur l'autre.

Les mesures de titration calorimétrique isotherme ont été réalisées sur un appareil Nano IC (TA Instruments). Les solutions de protéines et de peptides sont dégazées à 400 mmHg pendant 20 minutes sous agitation magnétique dans le but de prévenir la formation de bulles. Dans la cellule de référence est introduite une solution de tampon phosphate 10 mM en présence de  $\text{NaN}_3$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $V=1\text{ mL}$ ). La solution titrée (la centrine 2, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $V=1\text{ mL}$ ) est placée dans la cellule de mesure et la solution titrante (le peptide P17XPC, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $V_{\text{total}}=200\ \mu\text{L}$ ) est ajoutée *via* 25 injections automatiques de 8  $\mu\text{L}$  à l'aide d'une seringue de 250  $\mu\text{L}$  toutes les 320 secondes. Avant le début des injections automatiques, le système nécessite un temps d'équilibration jusqu'à ce que l'échange de chaleur mesuré soit stable, environ à -164  $\mu\text{W}$  dans le cas de l'étude du complexe CEN2-P17XPC. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel NanoAnalyze (TA Instruments) en utilisant un ajustement indépendant.

### X.6. Digestion enzymatique

Les protéines, qu'elles soient purifiées ou issues d'une extraction de culture cellulaire, ont été digérées à la trypsine (trypsine traitée avec la cétone L-1-tosylamido-2-phényléthyl chlorométhyl (TPCK), Worthington, USA). Un rapport 1:50 en masse (trypsine:protéines totales) a été respecté et la digestion effectuée à 37°C pendant 4 heures puis les échantillons directement congelés à -20°C.

### X.7. Chromatographie liquide ultra-haute performance (UPLC)

Les séparations chromatographiques ont été réalisées en utilisant le système Acquity I-Class de chez Waters, sur une colonne chromatographique C18 Waters Acquity CSH (2.1\*100 mm,  $\varnothing_{\text{particules}}=1.7\ \mu\text{m}$ ), maintenue dans un four à 30°C. Les gradients d'élution, les phases mobiles ainsi que le débit ont

été adaptés à chaque système considéré. Pour autant, les phases mobiles sont toujours constituées d'une phase A constituée à 100% d'eau avec x% d'acide formique (AF) (Tableau 38) et d'une phase B composée de 90% d'acétonitrile et à 10% d'eau avec le même pourcentage d'acide formique que la phase A. Le Tableau 38 présente les gradients d'élution, les % d'acide formique ainsi que les débits utilisés. Les échantillons sont maintenus à 8°C sur un portoir d'échantillons avant l'injection et le volume injecté est de 10 µL. Différentes méthodes de détection ont été utilisées suite aux séparations chromatographiques. Les conditions de détection en spectrométrie de masse sont décrites en X.8. Lorsque la détection a été assurée en absorption UV-visible et par spectroscopie de fluorescence, voir les paragraphes X.8.3 et X.8.6.

n°	Echantillon	% AF	Débit (mL·min <sup>-1</sup> )	Gradient d'éluion
1	Tyrosine/Tyrosine-d <sub>2</sub>	0.2	0.5	0 min 0% B, 3 min 0 %B, 13 min 10 %B, 15 min 20 %B, 17 min 20 %B
2	Tyrosine O-méthylée	0.2	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 15 min 70 %B, 16 min 100 %B
3	Tyrosine N-acétylée	0.2	0.5	0 min 10 %B, 1 min 10 %B, 10 min 35 %B, 16 min 100 %B
4	Ester éthylique de Tyrosine N-acétylée	0.2	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 15 min 70 %B, 16 min 100 %B
5	KSTLY	0.1	0.6	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 13 min 15 %B, 16 min 50 %B, 18 min 100 %B
6	KSTLY	0.1	0.6	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 3 min 5 %B, 13 min 20 %B, 16 min 50 %B, 18 min 100 %B
7	KSTLY KTSLYG	0.1	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 13 min 15 %B, 16 min 50 %B, 18 min 100 %B
8	CEN2 ou CEN2Δ25 digérée à la trypsine	0.1	0.5	0 min 0 %B, 2 min 0 %B, 6 min 12 %B, 12 min 50 %B, 15 min 100 %B
9	CEN2 ou CEN2Δ25 digérée à la trypsine	0.1	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 13 min 15 %B, 16 min 50 %B, 18 min 100 %B
10	CEN2 ou CEN2Δ25 digérée à la trypsine	0.2	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 13 min 15 %B, 16 min 50 %B, 18 min 100 %B
11	CaM digérée à la trypsine	0.1	0.5	0 min 0 %B, 2 min 0 %B, 4 min 12 %B, 16 min 50 %B, 19 min 100 %B
12	XPC3 digérée à la trypsine	0.4	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 21 min 50 %B, 22 min 100 %B
13	CEN2-P17XPC digéré à la trypsine	0.4	0.5	0 min 0 %B, 1 min 0 %B, 13 min 15 %B, 16 min 50 %B, 18 min 100 %B
14	Tyrosine-Tryptophane	0.4	0.5	0 min 0 %B, 3 min 0 %B, 13 min 10 %B, 15 min 50 %B, 17 min 100 %B
15	CEN2-XPC3 digéré à la trypsine	0.4	0.6	0 min 0 %B, 3 min 5 %B, 13 min 15 %B, 18 min 25 %B, 21 min 100 %B
16	Extraits cellulaires	0.1	0.5	0 min 0 %B, 2 min 0 %B, 27 min 50% B, 37 min 100 %B
17	Extraits cellulaires	0.1	0.5	0 min 0 %B, 2 min 0 %B, 6 min 12 %B, 12 min 50 %B, 15 min 100 %B

Tableau 38: Conditions UPLC utilisées lors d'une séparation sur la colonne C18.

### X.8. Spectrométrie de masse

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un instrument SYNAPT G2-Si HDMS (Waters Compagny, Manchester, UK) dont un schéma est proposé en Figure 144. Il est équipé d'une source d'ionisation par électrobulbation (ESI pour ElectroSpray Ionization). L'analyseur est constitué d'un Quadripôle à temps de vol (Q-ToF). Toutes les expériences ont été réalisées en mode

positif (ESI<sup>+</sup>) et en mode « résolution ». Les paramètres de l'appareil ont été optimisés pour assurer une résolution supérieure ou égale à 17000, calculée sur le signal d'une solution de référence de leucine enképhaline à  $m/z$  556.2766 ([M+H]<sup>+</sup>).

La calibration en masse est effectuée avec du trifluoroacétate de sodium (TFA-Na). Une tolérance de  $\pm 50$  ppm est acceptée pour l'interprétation des données. Pour l'analyse des échantillons issus d'extractions cellulaires, une correction interne a été réalisée *via* la co-infusion en ligne d'une référence, la leucine enképhaline. La solution est infusée en continue ( $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) et son spectre de masse est enregistré toutes les 20 secondes, pendant 1 seconde. Le signal est moyenné sur trois scans consécutifs, le décalage en  $m/z$  mesuré par rapport à la valeur de référence ([M+H]<sup>+</sup> leu-enk  $m/z$  556.2766) et un facteur correctif est alors appliqué pour l'ensemble des  $m/z$  mesurés.

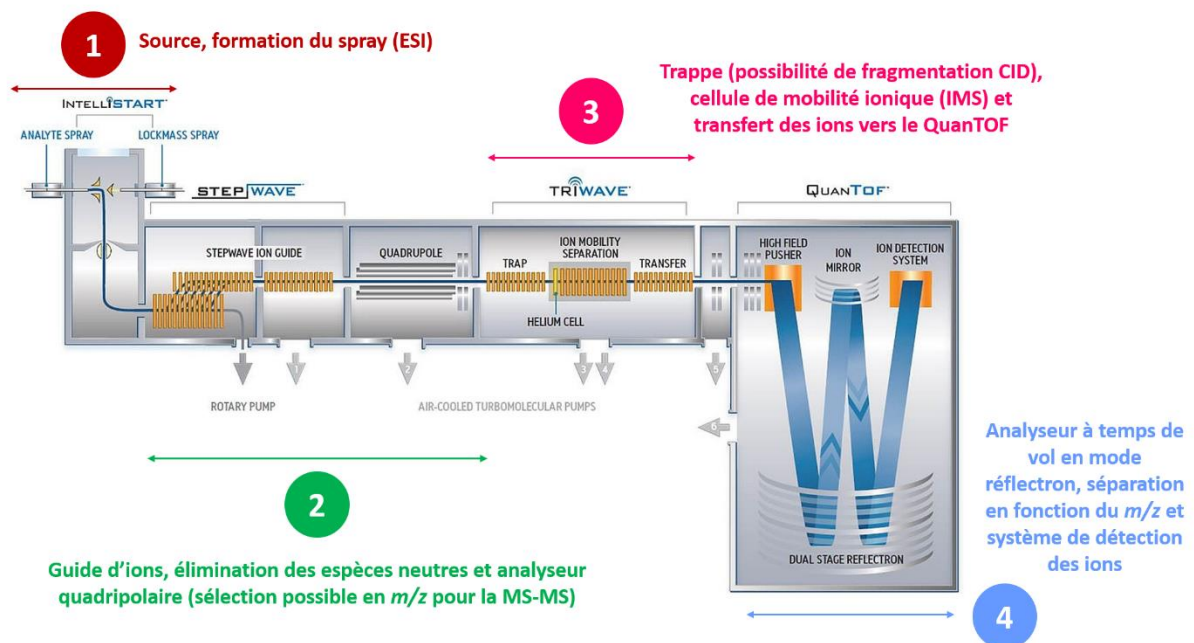


Figure 144: SYNAPT G2-Si.

### X.8.1. Conditions natives

Les expériences de spectrométrie de masse dans des conditions dites « natives » ont été réalisées en infusion directe de l'échantillon (pas de séparation chromatographique en amont) à un débit de  $300 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Les solutions de protéines ont été diluées en présence de  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acétate d'ammonium. Les paramètres de formation des ions dans la source ESI ainsi que les gammes de  $m/z$  et de calibration sont précisés dans le Tableau 39.

Paramètres	Conditions natives
Tension du capillaire (kV)	2.5
Température de la source (°C)	40
Flux de N <sub>2</sub> dans la source (L·h <sup>-1</sup> )	0
Température de désolvatation (°C)	75
Flux de gaz dans le cône (L·h <sup>-1</sup> )	0
Flux de N <sub>2</sub> de désolvatation (L·h <sup>-1</sup> )	50
Flux de gaz du nébuliseur (bars)	5
Gamme de <i>m/z</i>	[500:4000]
Gamme de calibration ( <i>m/z</i> )	[566.839:3692.989]

Tableau 39: Paramètres MS pour les expériences menées en conditions natives.

### X.8.2. Couplage UPLC-MS

Pour les expériences d'UPLC-MS, deux familles de paramètres (conditions 1 et 2) ont été utilisées lors d'une détection à la suite d'une séparation chromatographique. Les paramètres de formation des ions dans l'ESI et les gammes de *m/z* et de calibration sont présentés dans le Tableau 40.

Paramètres	Conditions 1	Conditions 2
Tension du capillaire (kV)	1.2	1.2
Température de la source (°C)	100	150
Flux de N <sub>2</sub> dans la source (L·h <sup>-1</sup> )	0	0
Température de désolvatation (°C)	450	600
Flux de gaz dans le cône (L·h <sup>-1</sup> )	0	100
Flux de N <sub>2</sub> de désolvatation (L·h <sup>-1</sup> )	600	1200
Flux de gaz du nébuliseur (bars)	4	4
Gamme de <i>m/z</i>	[50:2000]	[50:2000]
Gamme de calibration ( <i>m/z</i> )	[158.988:1926.365]	[158.988:1926.365]

Tableau 40: Paramètres MS pour des expériences menées en UPLC-MS.

### X.8.3. Fragmentation MS/MS

Le gaz de collision utilisé pour la « CID » (Collision Induced Dissociation) est l'argon. L'énergie de collision dans la trappe a été adaptée à chacun des cas étudiés, cette valeur étant généralement comprise entre 20 et 30 eV. Le *m/z* choisi pour la fragmentation est sélectionné à  $\pm 1$ .

### X.8.4. Spectrométrie de mobilité ionique (IMS)

Le gaz utilisé pour les expériences de spectrométrie de mobilité ionique est un mélange hélium/diazote introduit à un débit de 90 mL·min<sup>-1</sup>. La vitesse des vagues du TWIMS est de 1100 m·s<sup>-1</sup>, leur hauteur de 40 V et leur retard de 1000  $\mu$ s.



#### X.8.5. Couplage UPLC-UV

La détection par absorption UV-visible suite à la séparation en UPLC a été effectuée de  $\lambda = 210$  nm à 400 nm avec le système WatersAcquity PDA, sur le même instrument que celui sur lequel la détection par spectrométrie de masse a été effectuée.

#### X.8.6. Couplage UPLC-FLD

La détection par spectroscopie de fluorescence suite à la séparation en UPLC a été effectuée sur un autre instrument que celui ayant servi à la détection par spectrométrie de masse et absorption UV-visible. Les expériences ont été menées sur le Shimadzu UHPLC-FD Nexera LC-40. Les séparations chromatographiques ont été réalisées sur la même colonne ainsi qu'avec les mêmes gradients, débits et phases mobiles que sur le système Acquity I-Class de chez Waters. Les spectres d'émission ont été enregistrés entre 305 et 500 nm ( $\pm 10$  nm) lors d'une excitation à  $285 \pm 10$  nm.

#### X.9. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 ont été utilisées (ATCC, Virginia, USA). Les cultures ont été maintenues dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, USA) supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal, 1% pénicilline et 1% streptomycine, sous 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C.

Pour réaliser les extractions, les cellules sont mises en contact avec une solution de trypsine à 0.25% (trypsine-EDTA) qui permet de les décoller du support de culture. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 RPM (1450 g) pendant 3 minutes et le culot résultant est mis en contact avec le tampon de lyse. Trois tampons de lyse ont pu être utilisés, toujours supplémentés en anti-protéases avant utilisation (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche): NP-40, RIPA et TRITON (Tableau 41). La mise en contact est de 30 minutes à 4°C sous agitation (roue). Le mélange est ensuite centrifugé à 12 000 RPM (13 200 g) pendant 20 min à 4°C. Le surnageant résultant qui contient notamment les protéines extraites est récupéré, congelé à -20°C sur la nuit et à nouveau centrifugé à 15 000 RPM (20 630 g) pendant 10 min à 4°C : c'est le surnageant final qui constitue l'extrait total protéique. La quantité en protéines totales est estimée par un dosage BCA en utilisant le kit Pierce BCA Protein Kit Assay (Thermo Scientific).

Tampon de lyse	NP-40	RIPA	TRITON
<b>Composition</b>	150 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl 1.0% NP-40 50 mmol·L <sup>-1</sup> Tris, pH 8.0	150 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl 1.0% NP-40 0.5% déoxycholate de sodium 0.1% SDS (dodécyl sulfate de sodium) 50 mmol·L <sup>-1</sup> Tris, pH 8.0	150 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl 1.0% Triton X-100 20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris, pH 8.0

Tableau 41: Composition des tampons de lyse utilisés pour l'extraction des protéines.

Dans la cadre d'irradiation gamma pré-extraction, les cellules (entre 5 et 12 millions en fonction des expériences) ont été irradiées avec un débit de dose de 10 Gy·min<sup>-1</sup> dans les boîtes de pétri de 21 ou 56 cm<sup>2</sup> ayant servi à la culture. Les boîtes sont empilées les unes sur les autres pour permettre l'accumulation de matériel pour une dose donnée. Elles sont conservées à 37°C et en présence de 5% de CO<sub>2</sub> juste avant irradiation et directement après.

Les western-blots ont été réalisés comme suit. Les échantillons issus des extractions protéiques ont été déposés sur des gels Criterion TGX (Bio-Rad, France) 4-15 % d'acrylamide-bisacrylamide, comme décrit précédemment pour les gels SDS-PAGE. Le transfert a ensuite été effectué sur des membranes en nitrocellulose à l'aide d'un TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad, France). Les membranes ont été bloquées avec une solution de TBS + 0.1% Tween + 5% lait ou BSA pendant une heure à 4°C. La mise en contact avec les anticorps primaires a été réalisée sur la nuit à 4°C dans une solution de TBS + 0.1% Tween + 5% BSA et celle avec les anticorps secondaires pendant une heure à température ambiante dans une solution de TBS + 0.1% Tween + 5% lait ou BSA. Les dilutions des différents anticorps (primaires et secondaires) utilisés sont précisées dans chacune des légendes des figures présentant un Western-Blot. Les membranes ont été révélées par chimiluminescence avec le révélateur ECL RevelBlot Intense (Ozyme) à l'aide d'un imageur (Syngene PXi).

Les expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées avec le kit commercial « Pierce Classic Magnetic IP/Co-IP kit » (ThermoScientific, Massachusetts, USA) constitué:

- de billes magnétiques greffées avec la protéine A/G (10 mg·mL<sup>-1</sup>) ;
- d'un tampon de lyse/lavage (pH 7.4, 0.025 mol·L<sup>-1</sup> Tris, 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.001 mol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1% NP40, 5% Glycérol) ;
- d'un tampon d'élution à pH 2.0 et d'un tampon de neutralisation à pH 8.5 dont les compositions ne sont pas indiquées.

La première étape de l'immunoprécipitation est la préparation du complexe antigène/anticorps. Le complexe est formé par dilution (à 500  $\mu\text{L}$ ) des échantillons (extraits cellulaires (1000  $\mu\text{g}$  de protéines totales) ou protéines purifiées (25  $\mu\text{g}$ )) et de l'anticorps (5  $\mu\text{g}$ ) dans le tampon de lyse/lavage du kit. Ils sont mis en contact pendant une heure à température ambiante sur une roue agitatrice. Ensuite, les billes magnétiques greffées avec la protéine A/G (0.25 mg) sont lavées deux fois avec le tampon de lyse/lavage (175  $\mu\text{L}$  puis 1 mL). Les billes sont collectées avec un aimant avant d'être mises en contact avec le complexe antigène/anticorps précédemment formé pendant une heure à température ambiante sur une roue agitatrice. Le surnageant récupéré suite à l'isolement des billes par l'aimant constitue la fraction non retenue. Deux lavages avec le tampon de lyse/lavage (500  $\mu\text{L}$ ) et un troisième avec de l'eau ultra-pure (500  $\mu\text{L}$ ) sont effectués, les billes étant toujours collectées grâce à l'aimant. L'élution est réalisée à l'aide du tampon d'élution du kit (100  $\mu\text{L}$ ) : la mise en contact est de dix minutes à température ambiante. Après récupération du surnageant, 10  $\mu\text{L}$  d'un tampon de neutralisation sont ajoutés.

Les dialyses ont été réalisées dans des systèmes commerciaux dédiés à la dialyse de faibles volumes (50-800  $\mu\text{L}$ ) : Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Le cut-off de ces tubes de dialyse est de 3.5 kDa. Les tubes sont préalablement rincés avec 800  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure mise en contact avec la membrane pendant 5 minutes. Ensuite, l'échantillon y est déposé puis le tube immergé dans la solution de dialyse (eau ultrapure ou tampon phosphate 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.0) pendant 1 heure à 6°C sous agitation puis dans un nouveau bain pendant la nuit.

Dans le cadre de l'enrichissement des extraits par précipitation des protéines, aux échantillons préalablement dialysés est ajoutée une solution de sulfate d'ammonium ( $C_{\text{mère}} = 3.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) jusqu'à l'apparition visible d'un précipité sur les échantillons d'extraits protéiques. La concentration finale optimale a été déterminée à  $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ils sont ensuite mis en contact pendant quinze minutes dans la glace et centrifugés pendant quinze minutes à 15 000 RPM (20 630 g) à 4°C. Le surnageant récupéré contient les protéines résistantes au sulfate d'ammonium et ce dernier va à nouveau être dialysé pour éliminer le sulfate d'ammonium.

## XI. LISTE DES PUBLICATIONS

---

**Gatin, A.**, Billault, I., Duchambon, P., Van der Rest, G., Sicard-Roselli, C. (2021) Oxidative radicals (HO<sup>•</sup> or N<sub>3</sub><sup>•</sup>) induce several di-tyrosine bridge isomers at the protein scale. *Free Radic Biol Med.*, 162, 461-470. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.324

Musat, R., **Gatin, A.**, & Sicard-Roselli, C. (2021) The OH radical : Friend or foe? *L'Actualité Chimique*, 460 -461, 48-52.

Billault, I., **Gatin, A.**, Van der Rest, G., Sicard-Roselli, C. (2022) Advanced methodology combining UPLC-MS, isotopic labelling and H/D exchanges reveals three tyrosine-tyrosine cross-links induced by oxidative radicals evolving to at least four dimeric structures. *Anal Bioanal Chem*, 414, 1595–1607. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03782-x>

**Gatin, A.**, Duchambon, P., Van der rest, G., Billault, I., Sicard-Roselli, C. (2022) Protein Dimerization via Tyr Residues: Highlight of a Slow Process with Co-Existence of Numerous Intermediates and Final Products. *Int. J. Mol. Sci*, 23, 1174. <https://doi.org/10.3390/ijms23031174>



## XII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### A-B

---

- Abdelrahim, M., Morris, E., Carver, J., Facchina, S., White, A., & Verma, A. (1997). Liquid chromatographic assay of dityrosine in human cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 696(2), 175-182. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00248-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00248-X)
- Acu, I. D., Liu, T., Suino-Powell, K., Mooney, S. M., D'Assoro, A. B., Rowland, N., Muotri, A. R., Correa, R. G., Niu, Y., Kumar, R., & Salisbury, J. L. (2010). Coordination of Centrosome Homeostasis and DNA Repair Is Intact in MCF-7 and Disrupted in MDA-MB 231 Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 70(8), 3320-3328. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3800>
- Adams, G. E., Aldrich, J. E., Bisby, R. H., Cundall, R. B., Redpath, J. L., & Willson, R. L. (1972). Selective Free Radical Reactions with Proteins and Enzymes : Reactions of Inorganic Radical Anions with Amino Acids. *Radiation Research*, 49(2), 278. <https://doi.org/10.2307/3573266>
- Al-Hilaly, Y. K., Biasetti, L., Blakeman, B. J. F., Pollack, S. J., Zibae, S., Abdul-Sada, A., Thorpe, J. R., Xue, W.-F., & Serpell, L. C. (2016). The involvement of dityrosine crosslinking in  $\alpha$ -synuclein assembly and deposition in Lewy Bodies in Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 6(1), 39171. <https://doi.org/10.1038/srep39171>
- Al-Hilaly, Y. K., Williams, T. L., Stewart-Parker, M., Ford, L., Skaria, E., Cole, M., Bucher, W., Morris, K. L., Sada, A., Thorpe, J. R., & Serpell, L. C. (2013). A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 1(1), 83. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-83>
- Alvarez, L., Levin, C. H., Merola, F., Bizouarn, T., Pasquier, H., Baciou, L., Rusconi, F., & Erard, M. (2010). Are the Fluorescent Properties of the Cyan Fluorescent Protein Sensitive to Conditions of Oxidative Stress? *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 55-61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00617.x>
- Andersen, S. O. (1964). The cross-links in resilin identified as dityrosine and trityrosine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 93(1), 213-215. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90289-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90289-2)
- Andringa, G., Lam, K. Y., Chegary, M., Wang, X., Chase, T. N., & Bennett, M. C. (2004). Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 18(7), 932-934. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0829fje>
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., & Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18665-18672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100855200>
- Atwood, C. S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W. D., Ling, K.-Q., Huang, X., Moir, R. D., Wang, D., Sayre, L. M., Smith, M. A., Chen, S. G., & Bush, A. I. (2004). Copper Mediates Dityrosine Cross-Linking of Alzheimer's Amyloid- $\beta$ <sup>+</sup>. *Biochemistry*, 43(2), 560-568. <https://doi.org/10.1021/bi0358824>

- Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P. M., & Brettel, K. (1999). Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(10), 5423-5427. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5423>
- Babu, Y. S., Bugg, C. E., & Cook, W. J. (1988). Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *204*(1), 191-204. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90608-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90608-0)
- Balasubramanian, D., & Kanwar, R. (2002). Molecular pathology of dityrosine cross-links in proteins : Structural and functional analysis of four proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *234 -235*(1-2), 27-38.
- Bhaskar, B., Immoos, C. E., Shimizu, H., Sulc, F., Farmer, P. J., & Poulos, T. L. (2003). A Novel Heme and Peroxide-dependent Tryptophan-tyrosine Cross-link in a Mutant of Cytochrome c Peroxidase. *Journal of Molecular Biology*, *328*(1), 157-166. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00179-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00179-7)
- Bjorksten, J. (1968). THE CROSSLINKAGE THEORY OF AGING. *Journal of the American Geriatrics Society*, *16*(4), 408-427. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1968.tb02821.x>
- Blouquit, Y., Duchambon, P., Brun, E., Marco, S., Rusconi, F., & Sicard-Roselli, C. (2007). High sensitivity of human centrin 2 toward radiolytical oxidation : C-terminal tyrosinyl residue as the main target. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(2), 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.004>
- Boguta, G., & Danciewicz, A. M. (1981). Radiation-induced Dimerization of Tyrosine and Glycyltyrosine in Aqueous Solutions. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, *39*(2), 163-174. <https://doi.org/10.1080/09553008114550181>
- Bohrer, B. C., Merenbloom, S. I., Koeniger, S. L., Hilderbrand, A. E., & Clemmer, D. E. (2008). Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *1*(1), 293-327. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.113001>
- Brun, E., Blouquit, Y., Duchambon, P., Malosse, C., Chamot-Rooke, J., & Sicard-Roselli, C. (2010). Oxidative stress induces mainly human centrin 2 polymerisation. *International Journal of Radiation Biology*, *86*(8), 657-668. <https://doi.org/10.3109/09553001003734584>
- Brun, E., Duchambon, P., Blouquit, Y., Keller, G., Sanche, L., & Sicard-Roselli, C. (2009). Gold nanoparticles enhance the X-ray-induced degradation of human centrin 2 protein. *Radiation Physics and Chemistry*, *78*(3), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2008.11.003>
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., & Ivkova, M. N. (1973). FLUORESCENCE AND THE LOCATION OF TRYPTOPHAN RESIDUES IN PROTEIN MOLECULES. *Photochemistry and Photobiology*, *18*(4), 263-279. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1973.tb06422.x>

---

#### C-D

- Candeias, L. P., Wardman, P., & Mason, R. P. (1997). The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. *Biophysical Chemistry*, *67*(1-3), 229-237. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00052-5)
- Carroll, L., Pattison, D. I., Davies, J. B., Anderson, R. F., Lopez-Alarcon, C., & Davies, M. J. (2017). Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, *113*, 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.020>

- Charbonnier, J.-B., Renaud, E., Miron, S., Le Du, M. H., Blouquit, Y., Duchambon, P., Christova, P., Shosheva, A., Rose, T., Angulo, J. F., & Craescu, C. T. (2007). Structural, Thermodynamic, and Cellular Characterization of Human Centrin 2 Interaction with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein. *Journal of Molecular Biology*, *373*(4), 1032-1046. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.046>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis : DNA Damage and Repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *58*(5), 235-263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, S., & Hoffman, M. Z. (1973). Rate Constants for the Reaction of the Carbonate Radical with Compounds of Biochemical Interest in Neutral Aqueous Solution. *Radiation Research*, *56*(1), 40. <https://doi.org/10.2307/3573789>
- Chen, Z., Leinisch, F., Greco, I., Zhang, W., Shu, N., Chuang, C. Y., Lund, M. N., & Davies, M. J. (2019). Characterisation and quantification of protein oxidative modifications and amino acid racemisation in powdered infant milk formula. *Free Radical Research*, *53*(1), 68-81. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1554250>
- Chrysochoos, J. (1968). Pulse Radiolysis of Phenylalanine and Tyrosine. *Radiation Research*, *33*(3), 465. <https://doi.org/10.2307/3572404>
- Cleaver, J. E. (1968). Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum. *Nature*, *218*(5142), 652-656. <https://doi.org/10.1038/218652a0>
- Colombo, G., Clerici, M., Altomare, A., Rusconi, F., Giustarini, D., Portinaro, N., Garavaglia, M. L., Rossi, R., Dalle-Donne, I., & Milzani, A. (2017). Thiol oxidation and di-tyrosine formation in human plasma proteins induced by inflammatory concentrations of hypochlorous acid. *Journal of Proteomics*, *152*, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.008>
- Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Portinaro, N., Badalamenti, S., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2015). A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1850*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.024>
- Correia, M., Neves-Petersen, M. T., Jeppesen, P. B., Gregersen, S., & Petersen, S. B. (2012). UV-Light Exposure of Insulin : Pharmaceutical Implications upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Disulphide Bond Photolysis. *PLOS ONE*, *7*(12), e50733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050733>
- Craig, T. A., Benson, L. M., Bergen, H. R., Venyaminov, S. Y., Salisbury, J. L., Ryan, Z. C., Thompson, J. R., Sperry, J., Gross, M. L., & Kumar, R. (2006). Metal-binding properties of human centrin-2 determined by micro-electrospray ionization mass spectrometry and UV spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *17*(8), 1158-1171. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.04.029>
- Čudina, I., Josimović, Lj., Cudina, I., & Josimovic, Lj. (1987). The Effect of Oxygen on the Radiolysis of Tyrosine in Aqueous Solutions. *Radiation Research*, *109*(2), 206. <https://doi.org/10.2307/3576947>
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases : The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, *24*(1), 55-99. <https://doi.org/10.1002/mas.20006>
- D'Assoro, A. B., Busby, R., Acu, I. D., Quatraro, C., Reinholz, M. M., Farrugia, D. J., Schroeder, M. A., Allen, C., Stivala, F., Galanis, E., & Salisbury, J. L. (2008). Impaired p53 function leads to centrosome



amplification, acquired ER $\alpha$  phenotypic heterogeneity and distant metastases in breast cancer MCF-7 xenografts. *Oncogene*, 27(28), 3901-3911. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.18>

D'Assoro, A. B., Stivala, F., Barrett, S., Ferrigno, G., & Salisbury, J. L. (2001). GFP-centrin as a marker for centriole dynamics in the human breast cancer cell line MCF-7. *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*, 106(2 Suppl 1), 103-110.

Davies, C. G., Fellner, M., Tchesnokov, E. P., Wilbanks, S. M., & Jameson, G. N. L. (2014). The Cys-Tyr Cross-Link of Cysteine Dioxygenase Changes the Optimal pH of the Reaction without a Structural Change. *Biochemistry*, 53(50), 7961-7968. <https://doi.org/10.1021/bi501277a>

Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805-825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>

Davies, M. J., & Dean, R. T. (1997). *Radical-Mediated Protein Oxidation : From Chemistry to Medicine*. OUP Oxford.

Davies, M. J., Fu, S., Wang, H., & Dean, R. T. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11-12), 1151-1163. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00206-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00206-3)

Depuydt, M., Messens, J., & Collet, J.-F. (2011). How Proteins Form Disulfide Bonds. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), 49-66. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3575>

DiMarco, T., & Giulivi, C. (2007). Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 108-120. <https://doi.org/10.1002/mas.20109>

Drexler, G. A., Siebenwirth, C., Drexler, S. E., Girst, S., Greubel, C., Dollinger, G., & Friedl, A. A. (2015). Live cell imaging at the Munich ion microbeam SNAKE – a status report. *Radiation Oncology*, 10(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0350-7>

### E-F-G

Eickhoff, H., Jung, G., & Rieker, A. (2001). Oxidative phenol coupling—Tyrosine dimers and libraries containing tyrosyl peptide dimers. *Tetrahedron*, 57, 353-364. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00942-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00942-X)

Et Taouil, A., Brun, E., Duchambon, P., Blouquit, Y., Gilles, M., Maisonhaute, E., & Sicard-Roselli, C. (2014). How protein structure affects redox reactivity : Example of Human centrin 2. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 16(44), 24493-24498. <https://doi.org/10.1039/c4cp03536d>

Eyre, D. R., & Wu, J.-J. (2005). Collagen Cross-Links. In J. Brinckmann, H. Notbohm, & P. K. Müller (Éds.), *Collagen* (Vol. 247, p. 207-229). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b103828>

Fang, X., Jin, F., Jin, H., & Sonntag, C. von. (1998). Reaction of the superoxide radical with the N-centered radical derived from N-acetyltryptophan methyl ester. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2, 259-264. <https://doi.org/10.1039/a706979k>

Faraggi, M., DeFelippis, M. R., & Klapper, M. H. (1989). Long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 111(14), 5141-5145. <https://doi.org/10.1021/ja00196a019>

- Feeney, M. B., & Schöneich, C. (2012). Tyrosine Modifications in Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(11), 1571-1579. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4595>
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65(0), 899-910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Figueroa, J. D., Zárate, A. M., Fuentes-Lemus, E., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2020). Formation and characterization of crosslinks, including Tyr–Trp species, on one electron oxidation of free Tyr and Trp residues by carbonate radical anion. *RSC Advances*, 10(43), 25786-25800. <https://doi.org/10.1039/D0RA04051G>
- Fossey, J., Lefort, D., & Sorba, J. (1993). *Les radicaux libres en chimie organique* (MASSON).
- Fu, X., Kao, J. L. F., Bergt, C., Kassim, S. Y., Huq, N. P., d'Avignon, A., Parks, W. C., Mecham, R. P., & Heinecke, J. W. (2004). Oxidative Cross-linking of Tryptophan to Glycine Restrains Matrix Metalloproteinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6209-6212. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300506200>
- Fuentes-Lemus, E., Häggglund, P., López-Alarcón, C., & Davies, M. J. (2021). Oxidative Crosslinking of Peptides and Proteins : Mechanisms of Formation, Detection, Characterization and Quantification. *Molecules*, 27(1), 15. <https://doi.org/10.3390/molecules27010015>
- Fuentes-Lemus, E., Mariotti, M., Häggglund, P., Leinisch, F., Fierro, A., Silva, E., López-Alarcón, C., & Davies, M. J. (2019). Binding of rose bengal to lysozyme modulates photooxidation and cross-linking reactions involving tyrosine and tryptophan. *Free Radical Biology and Medicine*, 143, 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.023>
- Fuentes-Lemus, E., Silva, E., Barrias, P., Aspee, A., Escobar, E., Lorentzen, L. G., Carroll, L., Leinisch, F., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2018). Aggregation of  $\alpha$ - and  $\beta$ - caseins induced by peroxy radicals involves secondary reactions of carbonyl compounds as well as di-tyrosine and di-tryptophan formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 176-188. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.005>
- Fuentes-Lemus, E., Silva, E., Leinisch, F., Dorta, E., Lorentzen, L. G., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2018).  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein aggregation induced by riboflavin-sensitized photo-oxidation occurs via di-tyrosine cross-links and is oxygen concentration dependent. *Food Chemistry*, 256, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.090>
- Galeazzi, L., Ronchi, P., Franceschi, C., & Giunta, S. (1999). In vitro peroxidase oxidation induces stable dimers of  $\beta$ -amyloid (1-42) through dityrosine bridge formation. *Amyloid*, 6(1), 7-13. <https://doi.org/10.3109/13506129908993282>
- Garrison, W. M. (1987). Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, 87(2), 381-398. <https://doi.org/10.1021/cr00078a006>
- Gatin, A., Billault, I., Duchambon, P., Van der Rest, G., & Sicard-Roselli, C. (2021). Oxidative radicals (HO• or N3•) induce several di-tyrosine bridge isomers at the protein scale. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.324>
- Getoff, N. (1992). Pulse radiolysis of aromatic amino acids—State of the art. *Amino Acids*, 2(3), 195-214. <https://doi.org/10.1007/BF00805942>

- Ghiladi, R. A., Medzihradzsky, K. F., & Ortiz de Montellano, P. R. (2005). Role of the Met–Tyr–Trp Cross-Link in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) As Revealed by KatG(M255I). *Biochemistry*, 44(46), 15093-15105. <https://doi.org/10.1021/bi051463q>
- Ghisaidoobe, A., & Chung, S. (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins : A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518-22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- Gibrat, G., Assairi, F. L., Blouquit, Y., Craescu, C. T., & Bellissent-Funel, M.-C. (2008). Biophysical Study of Thermal Denaturation of Apo-Calmodulin : Dynamics of Native and Unfolded States. *Biophysical Journal*, 95(11), 5247-5256. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120147>
- Giulivi, C., Traaseth, N. J., & Davies, K. J. A. (2003a). Tyrosine oxidation products : Analysis and biological relevance. *Amino Acids*, 25(3-4), 227-232. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0013-0>
- Giulivi, C., Traaseth, N. J., & Davies, K. J. A. (2003b). Tyrosine oxidation products : Analysis and biological relevance. *Amino Acids*, 25(3), 227-232. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0013-0>
- Gmeiner, B., & Seelos, C. (1989). Phosphorylation of tyrosine prevents dityrosine formation in vitro. *FEBS Letters*, 255(2), 395-397. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81130-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81130-5)
- Gross, A. J., & Sizer, I. W. (1959). The Oxidation of Tyramine, Tyrosine, and Related Compounds by Peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 234(6), 1611-1614. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70059-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70059-8)
- Grossweiner, L. I., & Mulac, W. A. (1959). Primary Processes in the Flash Photolysis of Ovalbumin and Constituents. *Radiation Research*, 10(5), 515. <https://doi.org/10.2307/3570786>
- Grune, T. (2020). Oxidized protein aggregates : Formation and biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 150, 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.014>

---

#### H-I-J

- Hagihara, Y., & Saerens, D. (2014). Engineering disulfide bonds within an antibody. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(11), 2016-2023. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.07.005>
- Houée-Levin, C., Bobrowski, K., Horakova, L., Karademir, B., Schöneich, C., Davies, M. J., & Spickett, C. M. (2015). Exploring oxidative modifications of tyrosine : An update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free Radical Research*, 49(4), 347-373. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1007968>
- Huggins, T. G., Wells-Knecht, M. C., Detorie, N. A., Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1993). Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12341-12347. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31395-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31395-4)
- Hunter, E. P. L., Desrosiers, M. F., & Simic, M. G. (1989). The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(6), 581-585. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90064-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90064-6)
- Jacob, J. S., Cistola, D. P., Hsu, F. F., Muzaffar, S., Mueller, D. M., Hazen, S. L., & Heinecke, J. W. (1996). Human Phagocytes Employ the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide System to Synthesize Dityrosine,

Trityrosine, Pulcherosine, and Isodityrosine by a Tyrosyl Radical-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), 19950-19956. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.19950>

Janata, E., & Schuler, R. H. (1982). Rate constant for scavenging  $eaq^-$  in nitrous oxide-saturated solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(11), 2078-2084. <https://doi.org/10.1021/j100208a035>

Jensen, G. M., Goodin, D. B., & Bunte, S. W. (1996). Density Functional and MP2 Calculations of Spin Densities of Oxidized 3-Methylindole : Models for Tryptophan Radicals. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(3), 954-959. <https://doi.org/10.1021/jp951795c>

Jin, F., Leitich, J., & von Sonntag, C. (1993). The superoxide radical reacts with tyrosine-derived phenoxyl radicals by addition rather than by electron transfer. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 9, 1583. <https://doi.org/10.1039/p29930001583>

Jovanovic, S. V., Harriman, A., & Simic, M. G. (1986). Electron-transfer reactions of tryptophan and tyrosine derivatives. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(9), 1935-1939. <https://doi.org/10.1021/j100400a039>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

---

#### K-L

Kadlcik, V., Sicard-Roselli, C., Mattioli, T. A., Kodicek, M., & Houée-Levin, C. (2004). One-electron oxidation of  $\beta$ -amyloid peptide : Sequence modulation of reactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 881-891. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.015>

Karam, L. R., Dizdaroglu, M., & Simic, M. G. (1984). OH Radical-induced Products of Tyrosine Peptides. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 46(6), 715-724. <https://doi.org/10.1080/09553008414551951>

Kato, Y., Wu, X., Naito, M., Nomura, H., Kitamoto, N., & Osawa, T. (2000). Immunochemical Detection of Protein Dityrosine in Atherosclerotic Lesion of Apo-E-Deficient Mice Using a Novel Monoclonal Antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), 11-15. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3265>

Kim, S., Ayala, I., Steenhuis, J. J., Gonzalez, E. T., Razeghifard, M. R., & Barry, B. A. (1998). Infrared spectroscopic identification of the C–O stretching vibration associated with the tyrosyl Z $\cdot$  and D $\cdot$  radicals in photosystem II Supported by NIH GM 43272 (B.A.B.), NSF MCB 94-18164 (B.A.B.), a graduate minority supplement to NIH GM 43273 (I.A.), a graduate fellowship from Committee on Institutional Cooperation, University of Minnesota (I.A.), and a summer research fellowship from Dupont, Central Research and Development, administered through the University of Minnesota (E.T.G.).2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1366(3), 331-354. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00133-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00133-9)

Kungl, A. J., Visser, A. J., Kauffmann, H. F., & Breitenbach, M. (1994). Time-resolved fluorescence studies of dityrosine in the outer layer of intact yeast ascospores. *Biophysical Journal*, 67(1), 309-317. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80482-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80482-5)

- Land, E. J., & Ebert, M. (1967). Pulse radiolysis studies of aqueous phenol. Water elimination from dihydroxycyclohexadienyl radicals to form phenoxyl. *Transactions of the Faraday Society*, *63*, 1181. <https://doi.org/10.1039/tf9676301181>
- Land, E. J., Porter, G., & Strachan, E. (1961). Primary photochemical processes in aromatic molecules. Part 6.—The absorption spectra and acidity constants of phenoxyl radicals. *Trans. Faraday Soc.*, *57*(0), 1885-1893. <https://doi.org/10.1039/TF9615701885>
- Land, E. J., & Prütz, W. A. (1979). Reaction of Azide Radicals with Amino Acids and Proteins. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, *36*(1), 75-83. <https://doi.org/10.1080/09553007914550831>
- Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., & Eyers, C. E. (2014). The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*, *6*(4), 281-294. <https://doi.org/10.1038/nchem.1889>
- Laoukili, J., Perret, E., Middendorp, S., Houcine, O., Guennou, C., Marano, F., Bornens, M., & Tournier, F. (2000). Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *Journal of Cell Science*, *113*(8), 1355-1364. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.8.1355>
- Leeuwenburgh, C., Rasmussen, J. E., Hsu, F. F., Mueller, D. M., Pennathur, S., & Heinecke, J. W. (1997). Mass Spectrometric Quantification of Markers for Protein Oxidation by Tyrosyl Radical, Copper, and Hydroxyl Radical in Low Density Lipoprotein Isolated from Human Atherosclerotic Plaques. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(6), 3520-3526. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3520>
- Lehrer, S. S., & Fasman, G. D. (1967). Ultraviolet Irradiation Effects in Poly-L-tyrosine and Model Compounds. Identification of Bityrosine as a Photoproduct\*. *Biochemistry*, *6*(3), 757-767. <https://doi.org/10.1021/bi00855a017>
- Leinisch, F., Mariotti, M., Rykaer, M., Lopez-Alarcon, C., Hägglund, P., & Davies, M. J. (2017). Peroxyl radical- and photo-oxidation of glucose 6-phosphate dehydrogenase generates cross-links and functional changes via oxidation of tyrosine and tryptophan residues. *Free Radical Biology and Medicine*, *112*, 240-252. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.025>
- Lenzian, F., Sahlin, M., MacMillan, F., Bittl, R., Fiege, R., Pötsch, S., Sjöberg, B.-M., Gräslund, A., Lubitz, W., & Lassmann, G. (1996). Electronic Structure of Neutral Tryptophan Radicals in Ribonucleotide Reductase Studied by EPR and ENDOR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, *118*(34), 8111-8120. <https://doi.org/10.1021/ja960917r>
- Leo, G., Altucci, C., Bourgoin-Voillard, S., Gravagnuolo, A. M., Esposito, R., Marino, G., Costello, C. E., Velotta, R., & Birolo, L. (2013). Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides : UV laser-induced cross-linking in peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *27*(14), 1660-1668. <https://doi.org/10.1002/rcm.6610>
- Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). MCF-7 : The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, *57*(15), 3071-3078.
- Li, L., Lu, X., Peterson, C., & Legerski, R. (1997). XPC interacts with both HHR23B and HHR23A in vivo. *Mutation Research/DNA Repair*, *383*(3), 197-203. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(97\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(97)00002-5)



Lingle, W. L., Lutz, W. H., Ingle, J. N., Maihle, N. J., & Salisbury, J. L. (1998). Centrosome hypertrophy in human breast tumors : Implications for genomic stability and cell polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2950-2955. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2950>

Lutz, W., Lingle, W. L., McCormick, D., Greenwood, T. M., & Salisbury, J. L. (2001). Phosphorylation of Centrin during the Cell Cycle and Its Role in Centriole Separation Preceding Centrosome Duplication. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20774-20780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101324200>

Lynn, K. R., & Purdie, J. W. (1976). Some pulse and gamma radiolysis studies of tyrosine and its glycylyl peptides. *International Journal for Radiation Physics and Chemistry*, 8(6), 685-689. [https://doi.org/10.1016/0020-7055\(76\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0020-7055(76)90041-3)

---

#### M-N-O

---

Malencik, D. A., & Anderson, S. R. (1994). Dityrosine Formation in Calmodulin : Conditions for Intermolecular Crosslinking. *Biochemistry*, 33(45), 13363-13372. <https://doi.org/10.1021/bi00249a024>

Malencik, D. A., & Anderson, S. R. (2003). Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids*, 25(3-4), 233-247. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0014-z>

Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A., & Anderson, S. R. (1996). Dityrosine : Preparation, Isolation, and Analysis. *Analytical Biochemistry*, 242(2), 202-213. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0454>

Masutani, C., Sugawara, K., Yanagisawa, J., Sonoyama, T., Ui, M., Enomoto, T., Takio, K., Tanaka, K., van der Spek, P. J., & Bootsma, D. (1994). Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *The EMBO Journal*, 13(8), 1831-1843.

Medinas, D. B., Gozzo, F. C., Santos, L. F. A., Iglesias, A. H., & Augusto, O. (2010). A dityryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 1046-1053. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.018>

Miron, S., Duchambon, P., Blouquit, Y., Durand, D., & Craescu, C. T. (2008). The Carboxy-Terminal Domain of Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C Protein, Involved in TFIIH and Centrin Binding, Is Highly Disordered. *Biochemistry*, 47(5), 1403-1413. <https://doi.org/10.1021/bi701863u>

Möller, M. N., Hatch, D. M., Kim, H.-Y. H., & Porter, N. A. (2012). Superoxide Reaction with Tyrosyl Radicals Generates *para*-Hydroperoxy and *para*-Hydroxy Derivatives of Tyrosine. *Journal of the American Chemical Society*, 134(40), 16773-16780. <https://doi.org/10.1021/ja307215z>

Mozumder, A., & Hatano, Y. (Éds.). (2004). *Charged particle and photon interactions with matter : Chemical, physicochemical, and biological consequences with applications*. Marcel Dekker.

Mukherjee, S., Kapp, E. A., Lothian, A., Roberts, A. M., Vasil'ev, Y. V., Boughton, B. A., Barnham, K. J., Kok, W. M., Hutton, C. A., Masters, C. L., Bush, A. I., Beckman, J. S., Dey, S. G., & Roberts, B. R. (2017). Characterization and Identification of Dityrosine Cross-Linked Peptides Using Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 89(11), 6136-6145. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00941>

- Musat, R., Gatin, A., & Sicard-Roselli, C. (2021). The OH radical : Friend or foe? *L'Actualité Chimique*, 460-461, 48-52.
- Nagy, P., Lechte, T. P., Das, A. B., & Winterbourn, C. C. (2012). Conjugation of Glutathione to Oxidized Tyrosine Residues in Peptides and Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26068-26076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371690>
- Nemzow, L., Lubin, A., Zhang, L., & Gong, F. (2015). XPC : Going where no DNA damage sensor has gone before. *DNA Repair*, 36, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.004>
- Neves-Petersen, M. T., Klitgaard, S., Pascher, T., Skovsen, E., Polivka, T., Yartsev, A., Sundström, V., & Petersen, S. B. (2009). Flash Photolysis of Cutinase : Identification and Decay Kinetics of Transient Intermediates Formed upon UV Excitation of Aromatic Residues. *Biophysical Journal*, 97(1), 211-226. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.065>
- Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., & Hanaoka, F. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5664-5674. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5664-5674.2005>
- O' Malley, P. J., MacFarlane, A. J., Rigby, S. E. J., & Nugent, J. H. A. (1995). The geometry and spin density distribution of the tyrosyl radical : A molecular orbital study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1232(3), 175-179. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00102-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00102-6)
- Opillart, S. (2007). *Etude par échange isotopique du radical tyrosyle en solution et dans la catalase bovine* [Phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00361211>

---

#### P-R-S

- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J. L., & Bornens, M. (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *Journal of Cell Science*, 109(13), 3089-3102. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.13.3089>
- Paviani, V., Galdino, G., dos Prazeres, J., Queiroz, R., & Augusto, O. (2017). Dityryptophan Cross-Links as Novel Products of Protein Oxidation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170239>
- Paviani, V., Junqueira de Melo, P., Avakin, A., Di Mascio, P., Ronsein, G. E., & Augusto, O. (2020). Human cataractous lenses contain cross-links produced by crystallin-derived tryptophanyl and tyrosyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 160, 356-367. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.020>
- Pennathur, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., & Heinecke, J. W. (1999). Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine, ortho-Tyrosine, and o,o'-Dityrosine in Brain Tissue of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated Mice, a Model of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34621-34628. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34621>
- Popescu, A., Miron, S., Blouquit, Y., Duchambon, P., Christova, P., & Craescu, C. T. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 40252-40261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302546200>
- Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D., & Daniels, L. M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Research*, 50(3), 717-721.

- Prütz, W. A., Butler, J., Land, E. J., & Swallow, A. J. (1980). Direct demonstration of electron transfer between tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96(1), 408-414. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91230-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91230-9)
- Prütz, W. A., Mönig, H., Butler, J., & Land, E. J. (1985). Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems : Oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243(1), 125-134. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90780-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90780-5)
- Prütz, W. A., Siebert, F., Butler, J., Land, E. J., Menez, A., & Montenay-Garestier, T. (1982). Charge transfer in peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 705(2), 139-149. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90172-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90172-8)
- Puumalainen, M.-R., Rütthemann, P., Min, J.-H., & Naegeli, H. (2016). Xeroderma pigmentosum group C sensor : Unprecedented recognition strategy and tight spatiotemporal regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(3), 547-566. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2075-z>
- Raghavan, N. V., & Steenken, S. (1980). Electrophilic reaction of the hydroxyl radical with phenol. Determination of the distribution of isomeric dihydroxycyclohexadienyl radicals. *Journal of the American Chemical Society*, 102(10), 3495-3499. <https://doi.org/10.1021/ja00530a031>
- Raven, D. J., Earland, C., & Little, M. (1971). Occurrence of dityrosine in Tussah silk fibroin and keratin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 251(1), 96-99. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(71\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(71)90065-1)
- Reid, L. O., Vignoni, M., Martins-Froment, N., Thomas, A. H., & Dántola, M. L. (2019). Photochemistry of tyrosine dimer : When an oxidative lesion of proteins is able to photoinduce further damage. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(7), 1732-1741. <https://doi.org/10.1039/C9PP00182D>
- Renaud, E. (2008). *L'hétérotrimère XPC/Rad23B/centrine2:uncomplexe multifonctionnel dans la réponse cellulaire humaine aux agents génotoxiques.*
- Renaud, E., Miccoli, L., Zagal, N., Biard, D. S., Craescu, C. T., Rainbow, A. J., & Angulo, J. F. (2011). Differential contribution of XPC, RAD23A, RAD23B and CENTRIN 2 to the UV-response in human cells. *DNA Repair*, 10(8), 835-847. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.05.003>
- Rice, L. M., & Agard, D. A. (2002). Centriole Duplication : Centrin in on Answers? *Current Biology*, 12(18), R618-R619. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01133-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01133-8)
- Saeed, S., Gillies, D., Wagner, G., & Howell, N. K. (2006). ESR and NMR spectroscopy studies on protein oxidation and formation of dityrosine in emulsions containing oxidised methyl linoleate. *Food and Chemical Toxicology*, 44(8), 1385-1392. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.03.005>
- Salisbury, J. L. (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(1), 39-45. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80043-3](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80043-3)
- Salisbury, J. L., Baron, A., Surek, B., & Melkonian, M. (1984). Striated flagellar roots : Isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *Journal of Cell Biology*, 99(3), 962-970. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.3.962>
- Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R., & Springett, M. (2002). Centrin-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells. *Current Biology*, 12(15), 1287-1292. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01019-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01019-9)



- Santos, C. X. C., Bonini, M. G., & Augusto, O. (2000). Role of the Carbonate Radical Anion in Tyrosine Nitration and Hydroxylation by Peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377(1), 146-152. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1751>
- Scharer, O. D. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10), a012609-a012609. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>
- Shamovsky, I. L., Riopelle, R. J., & Ross, G. M. (2001). Ab Initio Studies on the Mechanism of Tyrosine Coupling. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(6), 1061-1070. <https://doi.org/10.1021/jp003693e>
- Shi, E., Zhang, W., Zhao, Y., & Yang, B. (2017). Binding of Euplotes octocarinatus centrin to peptide from xeroderma pigmentosum group C protein (XPC). *RSC Advances*, 7(44), 27139-27149. <https://doi.org/10.1039/C7RA03079G>
- Shivji, M. K., Eker, A. P., & Wood, R. D. (1994). DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group C and complementing factor from HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22749-22757. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31709-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31709-X)
- Sjöberg, B. M., Reichard, P., Gräslund, A., & Ehrenberg, A. (1978). The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(19), 6863-6865.
- Solar, S., Solar, W., & Getoff, N. (1984). Reactivity of hydroxyl with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(10), 2091-2095. <https://doi.org/10.1021/j150654a030>
- Sonntag, C. von. (1987). *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis.
- Spinks, J. W. T., & Woods, R. J. (1990). *An introduction to radiation chemistry* (3rd ed). Wiley.
- Stubbe, J. (2003). Radicals with a controlled lifestyle. *Chemical Communications*, 20, 2511. <https://doi.org/10.1039/b307617m>

---

#### T-U-V

- Teale, F. W. J., & Weber, G. (1957). Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal*, 65(3), 476-482. <https://doi.org/10.1042/bj0650476>
- Thompson, J. R., Ryan, Z. C., Salisbury, J. L., & Kumar, R. (2006). The structure of the human centrin 2-xeroderma pigmentosum group C protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18746-18752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513667200>
- Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 151(2), 261-287. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90515-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90515-5)
- Tilquin, B. (2001). *Actions biologique et chimique des rayonnements ionisants : Une introduction*. Nauwelaerts ; Frison-Roche.
- Tommos, C., Tang, X.-S., Warncke, K., Hoganson, C. W., Styring, S., McCracken, J., Diner, B. A., & Babcock, G. T. (1995). Spin-Density Distribution, Conformation, and Hydrogen Bonding of the Redox-Active Tyrosine YZ in Photosystem II from Multiple-Electron Magnetic-Resonance Spectroscopies : Implications for Photosynthetic Oxygen Evolution. *Journal of the American Chemical Society*, 117(41), 10325-10335. <https://doi.org/10.1021/ja00146a017>

- Torosantucci, R., Mozziconacci, O., Sharov, V., Schöneich, C., & Jiskoot, W. (2012). Chemical Modifications in Aggregates of Recombinant Human Insulin Induced by Metal-Catalyzed Oxidation : Covalent Cross-Linking via Michael Addition to Tyrosine Oxidation Products. *Pharmaceutical Research*, 29(8), 2276-2293. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0755-z>
- Tourbez, M., Firanescu, C., Yang, A., Unipan, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., & Craescu, C. T. (2004). Calcium-dependent Self-assembly of Human Centrin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47672-47680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404996200>
- Truscott, R. J. W., & Friedrich, M. G. (2016). The etiology of human age-related cataract. Proteins don't last forever. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(1), 192-198. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.016>
- Tsuboi, M., Ezaki, Y., Aida, M., Suzuki, M., Yimit, A., Ushizawa, K., & Ueda, T. (1998). Raman scattering tensors of tyrosine. *Biospectroscopy*, 4(1), 61-71. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1998\)4:1<61::AID-BSPY7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:1<61::AID-BSPY7>3.0.CO;2-V)
- Uchida, A., Sugasawa, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M., Ohkuma, Y., & Hanaoka, F. (2002). The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. *DNA Repair*, 1(6), 449-461. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00031-9)
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database : Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>

---

**W-X-Y-Z**

---

- Walden, S. E., & Wheeler, R. A. (1996). Distinguishing Features of Indolyl Radical and Radical Cation : Implications for Tryptophan Radical Studies <sup>1</sup>. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(5), 1530-1535. <https://doi.org/10.1021/jp951838p>
- Wedemeyer, W. J., Welker, E., Narayan, M., & Scheraga, H. A. (2000). Disulfide Bonds and Protein Folding. *Biochemistry*, 39(15), 4207-4216. <https://doi.org/10.1021/bi992922o>
- Wensien, M., von Pappenheim, F. R., Funk, L.-M., Kloskowski, P., Curth, U., Diederichsen, U., Uranga, J., Ye, J., Fang, P., Pan, K.-T., Urlaub, H., Mata, R. A., Sautner, V., & Tittmann, K. (2021). A lysine–cysteine redox switch with an NOS bridge regulates enzyme function. *Nature*, 593(7859), 460-464. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03513-3>
- Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, & P. T. Wingfield (Éds.), *Current Protocols in Protein Science* (p. A.3F.1-A.3F.8). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>
- Yamamoto, O., & Okuda, A. (1975). Radiation-Induced Binding of OH-Substituted Aromatic Amino Acids, Tyrosine and Dopa, Mutually and with Albumin in Aqueous Solution. *Radiation Research*, 61(2), 251-260. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/3574043>

- Yang, A., Miron, S., Mouawad, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., & Craescu, C. T. (2006). Flexibility and Plasticity of Human Centrin 2 Binding to the Xeroderma Pigmentosum Group C Protein (XPC) from Nuclear Excision Repair. *Biochemistry*, *45*(11), 3653-3663. <https://doi.org/10.1021/bi0524868>
- Ying, G., Avasthi, P., Irwin, M., Gerstner, C. D., Frederick, J. M., Lucero, M. T., & Baehr, W. (2014). Centrin 2 Is Required for Mouse Olfactory Ciliary Trafficking and Development of Ependymal Cilia Planar Polarity. *Journal of Neuroscience*, *34*(18), 6377-6388. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0067-14.2014>
- Yoburn, J. C., Tian, W., Brower, J. O., Nowick, J. S., Glabe, C. G., & Van Vranken, D. L. (2003). Dityrosine Cross-Linked A $\beta$  Peptides : Fibrillar  $\beta$ -Structure in A $\beta$ (1-40) Is Conducive to Formation of Dityrosine Cross-Links but a Dityrosine Cross-Link in A $\beta$ (8-14) Does Not Induce  $\beta$ -Structure. *Chemical Research in Toxicology*, *16*(4), 531-535. <https://doi.org/10.1021/tx025666g>
- Zamora, R. A., Fuentes-Lemus, E., Barrias, P., Herrera-Morande, A., Mura, F., Guixé, V., Castro-Fernandez, V., Rojas, T., López-Alarcón, C., Aguirre, P., Rivas-Aravena, A., & Aspée, A. (2020). Free radicals derived from  $\gamma$ -radiolysis of water and AAPH thermolysis mediate oxidative crosslinking of eGFP involving Tyr-Tyr and Tyr-Cys bonds : The fluorescence of the protein is conserved only towards peroxy radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, *150*, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.006>