HAL
open science

Interaction ligand – proteine : la sensation d'astringence sous les rayons VUV de DESIRS

Francis Canon

To cite this version:

Francis Canon. Interaction ligand – proteine : la sensation d'astringence sous les rayons VUV de DESIRS. Rayon de Soleil, 2013, Novembre 2013 (N° 23), pp.4-6. hal-02642251

HAL Id: hal-02642251

https://hal.inrae.fr/hal-02642251

Submitted on 28 May 2020

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.

INTERACTION LIGAND - PROTEINE

La sensation d'astringence sous les rayons VUV de DESIRS

L'astringence est la sensation d'assèchement et de rugosité à l'intérieur de la bouche qui accompagne la consommation de produits d'origine végétale, tels que le vin ou le thé, ou certains fruits peu mûrs. Les tanins, métabolites secondaires des végétaux, sont à l'origine de cette sensation, qui reste encore mal caractérisée. Une nouvelle approche utilisant la spectrométrie de masse couplée au rayonnement VUV, développée sur les lignes DESIRS et DISCO, a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène d'astringence.

Le piège à ion sur son châssis mobile (à droite), ici installé sur la ligne DISCO, tel qu'il était connecté à la ligne DESIRS pour les expériences sur la protéine IB5.

L'un des acteurs de la sensation d'astringence serait une famille de protéines salivaires, appelée protéines riches en proline (PRP), qui font partie des « protéines intrinsèquement désordonnées » -c'est-à-dire flexibles. Les PRP ont une forte affinité pour les tanins, molécules produites au niveau de l'écorce, des racines, des feuilles ou des fruits des végétaux. Ces protéines salivaires piègent les molécules de tanin auxquelles elles se lient (réf 1). Elles sont particulièrement abondantes dans la salive des mammifères soumis à un régime riche en tanins : cette fonction aurait été sélectionnée afin de protéger l'organisme des effets anti-nutritionnels des tanins. En effet, les tanins vont également se lier à des enzymes participant à la digestion, ce qui a pour conséquence de rendre ces enzymes inactives et a des répercussions sur la digestion.

Étudier les PRP : un casse-tête

Comme pour les autres protéines intrinsèquement désordonnées, l'absence de structure 3D bien définie et les nombreuses séquences répétées des PRP rend difficile leur étude et celle de leurs interactions par les techniques de biologie structurale classiques, telles que la cristallographie ou la résonance magnétique nucléaire.
Cependant, l'utilisation d'approches

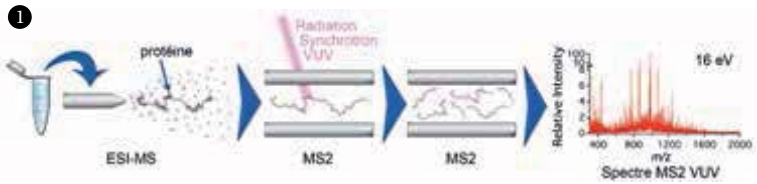

Figure 1 : Schéma de la technique MS/MS basée sur l'activation par rayonnement synchrotron dans le VUV.

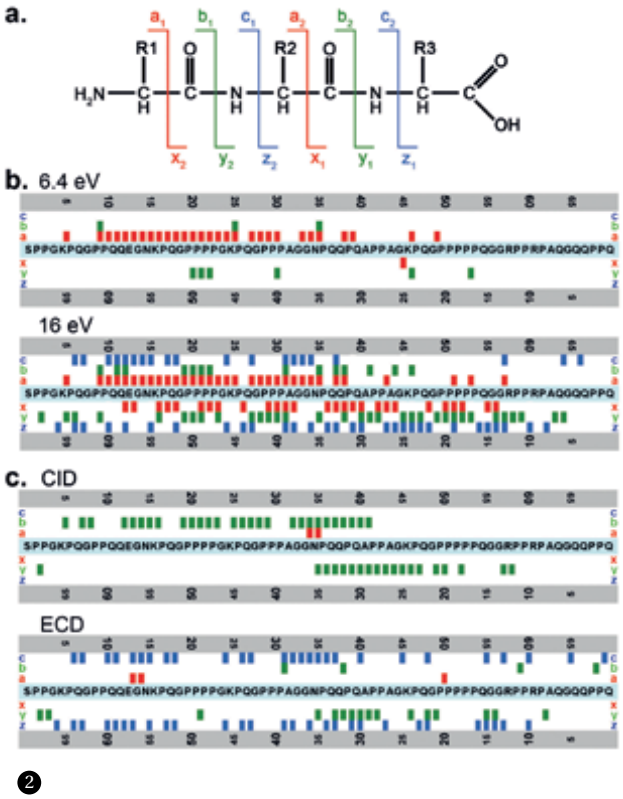

Figure 2 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en MS/MS (a). Patterns de fragmentation de la protéine salivaire IB5^{7+} après activation à 6,4 et 16 eV (b), par CID et par ECD (c).

alternatives a permis d'obtenir un certain nombre d'informations sur ces interactions. Ainsi, l'utilisation de la technique de diffusion des rayons X au petits angles (SAXS) sur la ligne SWING a permis de mieux caractériser la conformation de ces protéines (réf 2), ainsi que les objets supramoléculaires formés lors de leurs interactions avec les tanins (réf 3).
Grâce à la spectrométrie de masse, les stœchiométries des complexes PRP•tanin (réf 4) ont été déterminées, et le couplage de cette technique à la mobilité ionique a montré que la fixation des tanins sur les PRP induit une modification de la conformation des PRP (réf 5).
Néanmoins, la localisation des sites d'interaction des tanins sur les PRP n'avait pas pour l'instant pu être précisément déterminée. Une nouvelle approche utilisant la spectrométrie de masse couplée au rayonnement VUV, développée sur les lignes DESIRS et DISCO, a permis de répondre à cette question (réf 6).

Spectrométrie de masse et fragmentation... raisonnée

Cette technique est basée sur le couplage d'un spectromètre de masse commercial, de type trappe d'ions, et du rayonnement synchrotron (réf 7) (figure 1). Le développement des sources d'ionisation douce tel que l'électrospray (ESI), qui permet d'ioniser et de désolvater des objets biologiques moléculaires et supramoléculaires sans les fragmenter, fait qu'aujourd'hui la spectrométrie de masse (MS) est un outil puissant pour l'étude des objets biologiques. En effet, la MS est une technique rapide, sensible, spécifique, mais aussi capable d'apporter des informations sur la structure des molécules. Ces informations peuvent être générées par des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) dans lesquelles une molécule ionisée cible est sélectionnée, puis activée et dissociée en fragments qui sont analysés et identifiés dans une dernière étape. La technique classique d'activation des ions, appelée « collision induced dissociation » (CID) et implantée sur la grande majorité des spectromètres de masse commerciaux, fait intervenir un chauffage lent des ions par le biais de collisions avec un gaz. Cette méthode n'est pas applicable pour localiser des interactions non covalentes entre une protéine et un autre objet. Afin de localiser les sites d'interactions d'un ligand sur une protéine, il faut une méthode d'activation permettant de fragmenter la chaine polypeptidique tout en y conservant le ligand lié à son site d'interaction. La technique qui a été développée active la molécule cible à l'aide d'un rayonnement énergétique dans le domaine de l'ultraviolet sous vide (VUV) (figure 1).

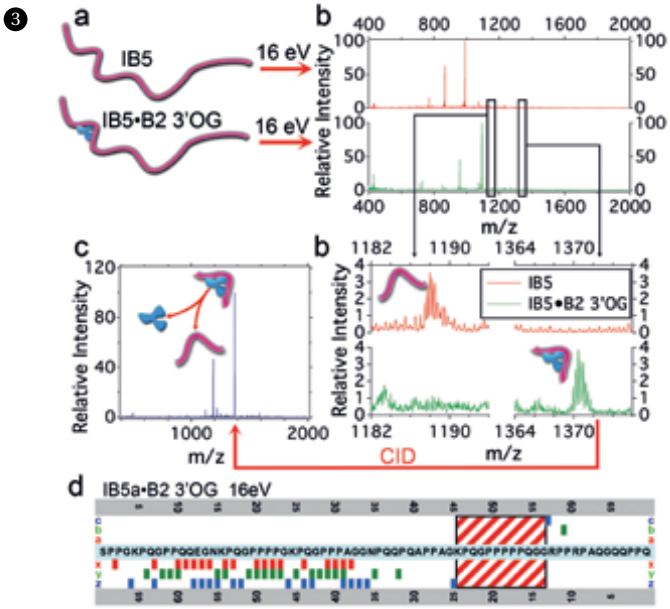

Figure 3 : localisation du site de fixation du tanin B2 3'OG sur la protéine salivaire IB5. Les objets IB5^{7+} et IB5•B2 3'OG^{7+} ont été sélectionnés et irradiés par des photons de 16 eV (a). La comparaison des spectres MS/MS VUV 16 eV a permis d'identifier des fragments spécifiques au spectre de fragmentation de IB5•B2 3'OG^{7+} et dont le rapport m/z présente une différence de masse correspondant à celle de B2 3'OG^{7+} par rapport à des fragments présents sur le spectre de fragmentation de IB5^{7+} (b). L'activation par CID des fragments identifiés a permis de confirmer la présence du ligand (c). La carte des fragments porteurs de B2 3'OG a permis d'identifier la séquence 'KPQGPPPPPQGG' comme étant un site de fixation de ce tanin sur IB5.

Comment fragmentent les VUV ?

La pertinence d'une technique MS/MS est liée à la richesse en informations qu'elle peut générer et donc au nombre de fragments produits, ainsi qu'à la qualité de l'information qu'ils portent. La première étape de validation de cette méthode a donc porté sur la comparaison des motifs de fragmentation obtenus par irradiation VUV avec ceux obtenus avec les techniques de dissociation classique par collision avec un gaz neutre (CID) ou par capture d'électron (ECD). Pour cela, la protéine salivaire humaine IB5, sous l'état de charge +7 (IB5^{+7}), a été activée par 4 longueurs d'onde d'irradiation différentes, et par deux techniques de laboratoires (CID et ECD). La figure 2 présente les motifs de fragmentation obtenus pour deux énergies de photon (6,4 et 16 eV), ainsi que pour les expériences de CID et d'ECD. La comparaison des motifs de fragmentation montre que sous le seuil d'ionisation de la protéine (6,4 eV) les fragments majoritaires sont formés par la rupture de la liaison C-C (type a-), alors qu'au dessus du seuil d'ionisation (16 eV) tous les types de fragments sont présents. Cette observation confirme l'existence de 2 régimes de fragmentation différents. Au-dessous du seuil d'ionisation, les fragments générés résultent de la photodissociation de l'ion précurseur, alors que l'apparition des cations radical $[M+7H]^{\bullet 8+}$ et $[M+7H]^{\bullet\bullet 9+}$ conduit majoritairement à un mécanisme de photoionisation dissociative. Ce mode de fragmentation est le plus riche en information et requiert l'utilisation d'énergie de photons dans le VUV. Ainsi, grâce au rayonnement synchrotron, une couverture de séquence de 91% a été obtenue alors qu'elle n'a été que de 58% par CID et 68 % par ECD.

Tanin et fragments de PRP restent liés

Dans une seconde étape, l'étude a porté sur les interactions entre la protéine IB5 et un tanin modèle, B2 3'OG. Le complexe non-covalent IB5•tanin^{7+} a été conservé lors de l'étape d'ionisation puis a été sélectionné et irradié par le faisceau synchrotron. La figure 3b présente la comparaison des spectres MS/MS VUV 16 eV de IB57+ et IB5•tanin^{7+}. Cette comparaison a permis d'identifier une quarantaine de pic présents uniquement sur le spectre de fragmentation d'IB5•tanin^{7+} et donc potentiellement porteur du ligand. Cette analyse a également permis de vérifier la présence des fragments sans tanin correspondants sur le spectre de fragmentation de la protéine seule. Une étape supplémentaire de MS/MS (MS^3) a ciblé les fragments porteurs du ligand, mais cette fois, les a activés par CID, permettant de décrocher le tanin fixé et de confirmer l'identité des fragments. La figure 3c présente le spectre MS^3 d'un fragment porteur d'un tanin. Sur cette figure, deux pics principaux sont présents, correspondant à l'ion parent sélectionné et à un ion fragment ayant une masse inférieure, correspondant à la perte du tanin. L'identification de ces fragments a finalement permis de mettre en évidence que la séquence 'KPQGPPPPPQGG' comporte le site d'interaction privilégié du tanin sur la protéine IB5 (Figure 3d). Au sein de cette séquence, l'agrégat de 5 prolines adopte probablement un début de structure secondaire de type hélice polyproline I ou II formant un élément rigide, qui fournit un point d'encrage initial à la fixation du tanin (réf 8).

Cette étude a démontré la potentialité du couplage de la spectrométrie de masse avec le rayonnement VUV pour l'étude structurale des protéines flexibles comme les IDP et de leurs assemblages supramoléculaires. La technique pourrait être appliquée à d'autres types de protéines, mais est également transposable à l'étude de nombreux autres objets biologiques tel que les sucres, les lipides, l'ADN et l'ARN... À l'échelle moléculaire et supramoléculaire. En effet, cette technique pourrait également générer des fragmentations spécifiques en fonction de la structure de l'objet étudié suivant qu'il soit replié ou complètement dénaturé et révéler ainsi la structure tertiaire ou quaternaire des protéines en plus de leur séquence primaire.

Références :
[1] F. Canon et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010,** 398, 815-822.
[2] H. Boze et al. *Biophys. J.* **2010,** 99, 656-665.
[3] F. Canon et al. *Langmuir* **2013,** 29, 1926-1937.
[4] F. Canon et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009,** 395, 2535-2545.
[5] F. Canon et al. *Am. Chem. Soc.* **2011,** 133, 7847-7852.
[6] F. Canon et al. *Angewandte Chemie* **2013,** 52, 8377-8381.
[7] A. R. Milosavljevic et al. *J. Sync. Rad.* **2012,** 19, 174-178.
[8] M. Fuxreiter et al. *J. Mol. Biol.* **2004,** 338, 1015-1026.