

## La complexomique : étude de la machinerie cellulaire

- Les protéines n'agissent pas indépendamment dans les organismes, elles interagissent entre elles.
- Le terme complexomique représente donc **l'interaction de ces différentes protéines pour réaliser leur fonction biologique.**

L'étude par spectrométrie de masse intervient à deux niveaux.

- Tout d'abord, la spectrométrie de masse peut, après purification d'un complexe protéique (colonne d'affinité) identifier les partenaires qui interagissent avec la protéine d'intérêt, et donc de caractériser le complexe.
- Dans un deuxième temps, la spectrométrie de masse supramoléculaire, qui permet de garder les interactions non covalentes à l'intérieur du spectromètre de masse peut donner des informations sur les interactions protéine/protéine protéine/ligand, protéine/métal...

## La spectrométrie de masse supramoléculaire

**Définition: c'est la spectrométrie de masse des complexes non covalents = Spectrométrie de masse native**

- La volatilisation / ionisation se fait en préservant en phase gazeuse les interactions spécifiques qui existaient en solution entre des molécules. Cette approche permet d'étudier des complexes spécifiques en déterminant: la spécificité et la stoechiométrie et l'affinité du complexe en solution (expériences de compétition en solution) et en phase gazeuse (expériences de dissociation en phase gazeuse)

## Les interactions non-covalentes impliquées dans les complexes supramoléculaires

Les interactions non-covalentes sont essentielles :

- Maintenir la structure tridimensionnelle des macromolécules
- Stabiliser les structures secondaires et tertiaires des protéines
- Permettre les interactions de type enzyme-substrat, anticorps-anticorps, protéine-ligand....
- impliquées dans de nombreux processus biologiques dans lesquels des macromolécules se lient spécifiquement mais transitoirement à d'autres molécules

Il existe quatre types d'interactions non-covalentes communément admises:

**Les interactions électrostatiques:**

- o interactions ioniques
- o forces de van der Waals
- o liaisons hydrogène

**Les interactions hydrophobes**

La spectrométrie de masse supramoléculaire, ou MS native, s'effectue en conditions non dénaturantes et a pour objectif de garder intacts lors du transfert en phase gazeuse des complexes non-covalents qui préexistaient en solution.

Dans les années 1990, deux groupes américains ont mené des études pionnières sur un complexe récepteur/ligand et sur l'interaction **globine/hème** de la myoglobine, respectivement, et montré que des interactions non-covalentes spécifiques **protéine/ligand** peuvent **survivre** au processus de l'ionisation **ESI**. Du coup, l'utilisation d'ESI-MS pour des complexes non-covalents (protéine/protéine, protéine/ligand, protéine/métal, protéine/ARN, protéine/ADN, ...) croît de façon exponentielle

Dans le cas de l'analyse de complexes non-covalents, la meilleure méthode d'ionisation est l'*ESI* car elle permet de travailler avec des échantillons liquides. Sous réserve d'utilisation de tampons compatibles avec la MS et avec la conservation de la forme native de la protéine, tels que les tampons ammonium, les analytes peuvent donc être transférés de la solution à la phase gazeuse de la façon la plus douce qui soit pour préserver les interactions non-covalentes.

## L'interface

### **Principe de la transmission des ions**

Après leur ionisation et leur désorption, les ions sont dirigés vers l'analyseur du spectromètre de masse sous l'action combinée de champs électriques et de gradients de pressions.

La zone du spectromètre de masse appelée « **interface** » joue ce rôle très important. En effet, l'interface sépare la zone de production des ions à pression atmosphérique de l'analyseur (vide poussé  $\approx 1.10^{-6}$  mbar). Il règne dans cette zone une pression intermédiaire. Cette pression intermédiaire est suffisamment faible pour que les ions acquièrent une énergie cinétique importante et suffisamment élevée pour entraîner des collisions entre les ions et les molécules de gaz (N<sub>2</sub>), convertissant ainsi l'énergie cinétique en énergie interne.



## Rôle de l'interface dans la conservation des complexes non-covalents

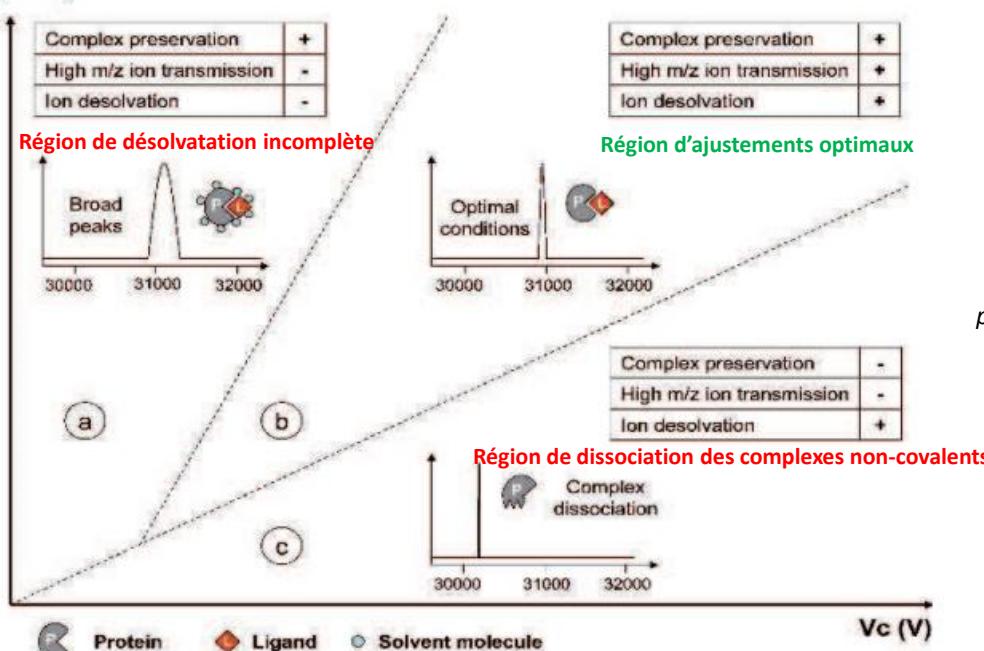
Il faut optimiser les paramètres du spectromètre de masse qui contrôlent l'énergie communiquée aux ions dans l'interface.

Deux paramètres sont particulièrement importants et nécessitent d'être optimisés pour chaque nouveau système:

1- **La pression** au niveau de cette interface, elle affecte l'efficacité des collisions.

2- **La tension** d'accélération, elle contrôle l'énergie cinétique transmise aux ions de la source.

**Pi (mbar)**

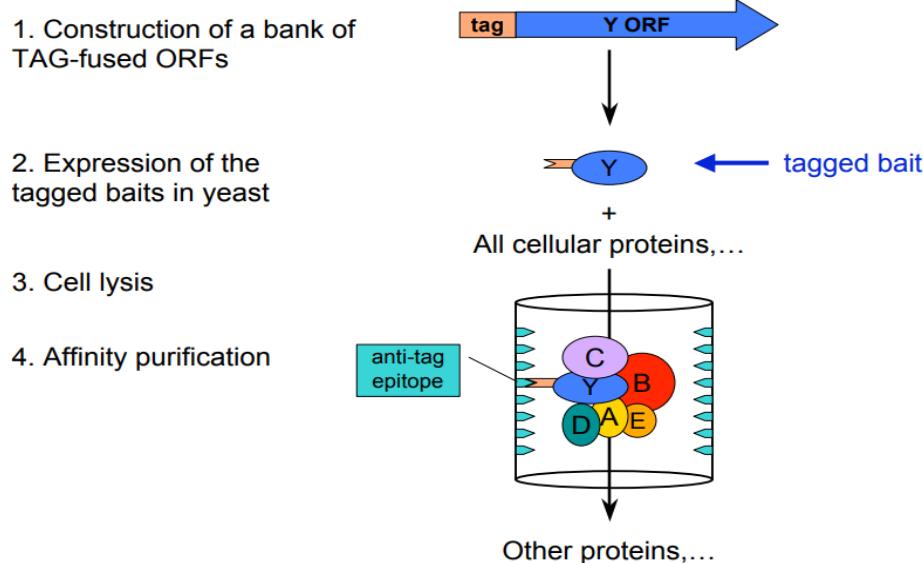


## Identification à haut débit des interactions protéine–protéine

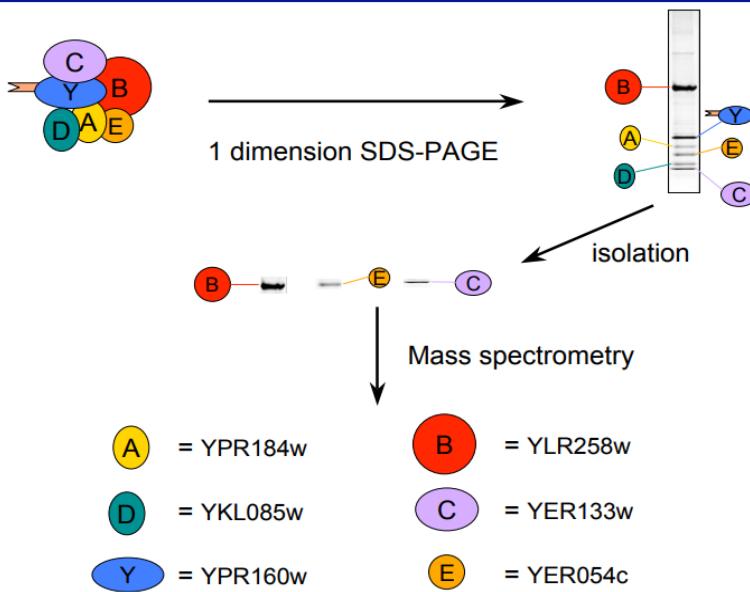
### Méthodes d'affinité couplées à la spectrométrie de masse

De manière générale, une protéine reconnaissant une étiquette ou un épitope est fixée sur un support solide. Un lysat cellulaire est élué sur ce support et les protéines spécifiques s'y accrochent. Généralement, les protéines isolées par purification sont séparées par SDS-PAGE, digérées par une enzyme puis analysées par LC-ESI-MS ou encore LC-MS-MS. Les listes de masses des peptides observés permettent de remonter aux protéines impliquées en comparant avec des bases de données.

### *Isolement du complexe protéique*



## Identification des partenaires par Spectrométrie de masse



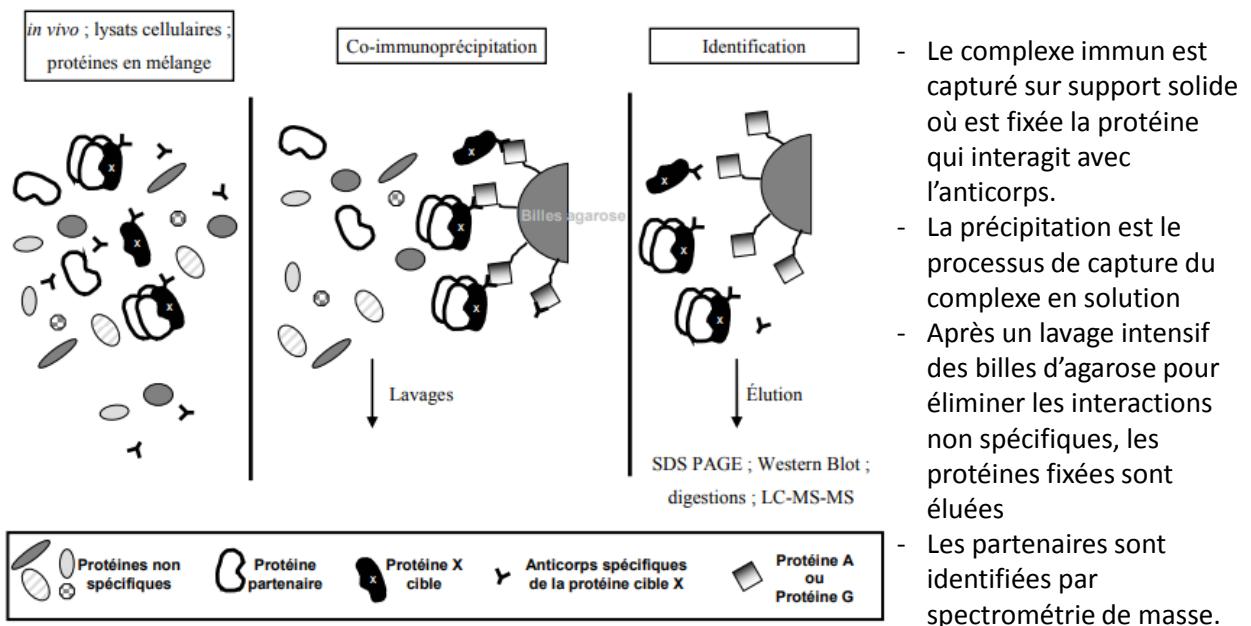
### 1- La co-immunoprécipitation

Consiste à isoler les complexes protéiques formés *in vivo*, en réalisant une co-immunoprécipitation avec un anticorps reconnaissant la protéine cible.

**Avantage:** purifier rapidement dans des conditions physiologiques les protéines concernées et leurs partenaires associés

#### **Inconvénients:**

- Nécessité d'avoir un anticorps de bonne qualité pour chaque protéine testée
- Apparition des faux positifs quand des protéines autres que l'immunogène réagissent avec l'anticorps immobilisé ou se fixent non spécifiquement sur la résine.
- Les lavages successifs pour diminuer cette dernière difficulté risquent de décrocher les protéines partenaires qui présentent de faibles affinités.



- Le complexe immun est capturé sur support solide où est fixée la protéine qui interagit avec l'anticorps.
- La précipitation est le processus de capture du complexe en solution
- Après un lavage intensif des billes d'agarose pour éliminer les interactions non spécifiques, les protéines fixées sont élues
- Les partenaires sont identifiées par spectrométrie de masse.

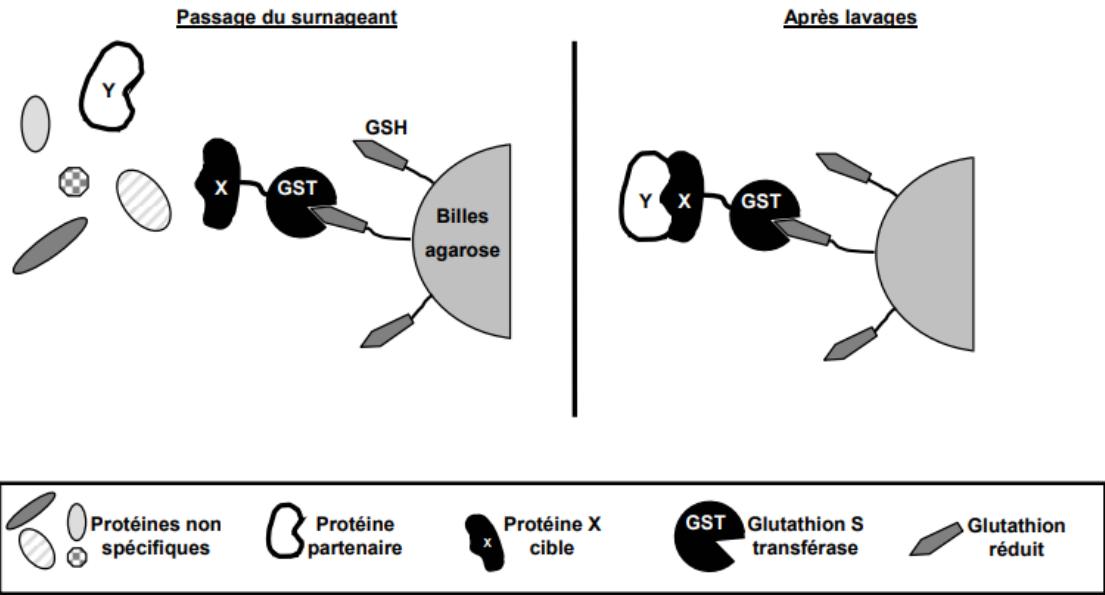
*Principe de la co-immunoprécipitation.*

## 2- Purification par affinité par l'intermédiaire d'étiquettes

La purification par affinité consiste à fixer sur un support la protéine cible par l'intermédiaire de son étiquette ou épitope (His, Flag, Myc, biotine, GST ...) Par exemple, une protéine X de fusion avec la Glutathion S transférase (GST) est accrochée sur des billes d'agarose supportant du Glutathion réduit (GSH). Les partenaires issus d'un extrait cellulaire interagissent avec la protéine X alors que les autres sont éliminés lors de lavages. Le complexe ainsi isolé est ensuite éluté avec de la GST libre puis analysé par spectrométrie de masse.

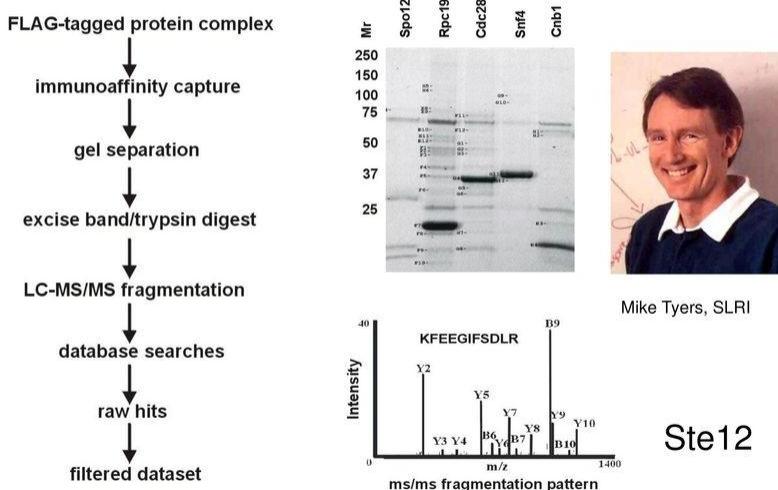
Avantage:

- S'affranchir du problème de production d'anticorps spécifiques de chaque protéine
- Grande reproductibilité



Principe du GST-pulldown

## High-throughput Mass Spectrometric Protein Complex Identification (HMS-PCI)



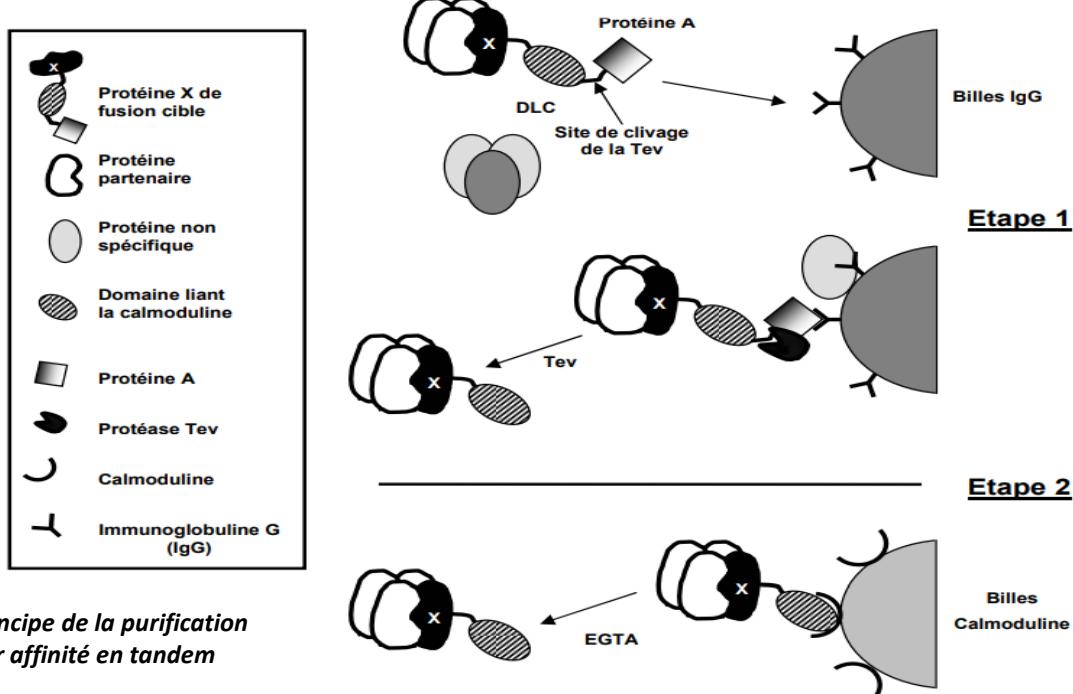
Cette méthode, en utilisant l'étiquette Flag (HMS-PCI), a permis de fournir en 2002 un des deux premiers exemples d'identification à l'échelle du protéome d'interaction protéine-protéine par spectrométrie de masse

Ho et al. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):180-3

### 3- La purification par affinité en tandem (TAP-TAG)

- La méthode « Tandem Affinity Purification » (TAP) est basée sur l'utilisation séquentielle de deux étiquettes. Une protéine de fusion possédant une **Protéine A**, un site de coupure à la Tev et un peptide affin pour la calmoduline (**DLC**) est exprimée dans la cellule.
- Le complexe formé autour de cette protéine est **purifié une première fois** par l'intermédiaire de la Protéine A qui interagit avec l'immunoglobuline immobilisée sur billes.
- Après lavage puis clivage avec la protéase spécifique Tev, le complexe purifié s'accroche une **deuxième fois** sur des billes où la calmoduline est fixée. Cette deuxième étape permet d'éliminer la Tev et les protéines non spécifiques.
- L'ajout de EGTA permet ensuite de libérer le complexe protéique purifié.
- La détection se fait ensuite par spectrométrie de masse.

Cette méthode permet de sélectionner les complexes dans des conditions quasi physiologiques, de manière hautement reproductible et comparable.



- Cette méthode a été appliquée à l'étude de protéomes à haut débit comme celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae*
- L'utilisation de cette méthode chez les eucaryotes supérieurs reste plus compliquée. Toutefois, la cartographie de 32 protéines connues ou supposées être impliquées dans le chemin de transduction du signal TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B humain a permis de détecter 171 interactions protéine–protéine, et ce dans les conditions physiologiques et tout en conservant leurs modifications post-traductionnelles respectives
- Des séries de modifications de cette technique TAP/MS sont apparues pour notamment améliorer la possibilité d'utiliser cette méthode à haut débit chez les eucaryotes supérieurs

## Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes

Anne-Claud Gavin<sup>1</sup>, Markus Bösch<sup>1</sup>, Roland Krause<sup>1</sup>, Paola Grandi<sup>1</sup>, Marilena Marzioch<sup>1</sup>, Andreas Bauer<sup>1</sup>, Jörg Schultz<sup>1</sup>, Jens M. Rick<sup>1</sup>, Anne-Marie Michon<sup>1</sup>, Cristina-Maria Cruciat<sup>1</sup>, Marita Remor<sup>1</sup>, Christian Höfert<sup>1</sup>, Małgorzata Scheider<sup>1</sup>, Miro Bräjenovic<sup>1</sup>, Heinz Ruppner<sup>1</sup>, Alejandro Merino<sup>1</sup>, Karin Klein<sup>1</sup>, Manuela Hudak<sup>1</sup>, David Dickson<sup>1</sup>, Tatjana Rudi<sup>1</sup>, Volker Gnau<sup>1</sup>, Angela Bauch<sup>1</sup>, Sonja Bastuck<sup>1</sup>, Bettina Huhse<sup>1</sup>, Christian Leutwein<sup>1</sup>, Marie-Anne Heurtier<sup>1</sup>, Richard R. Copley<sup>1</sup>, Angela Edelmann<sup>1</sup>, Erich Querfurth<sup>1</sup>, Vladimir Rybin<sup>1</sup>, Gerard Drewes<sup>1</sup>, Manfred Raida<sup>1</sup>, Tewijs Bouwmeester<sup>1</sup>, Peer Bork<sup>1</sup>, Bertrand Séraphin<sup>1,2</sup>, Bernhard Kuster<sup>1</sup>, Gitte Neubauer<sup>1</sup> & Giulio Superti-Furga<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cellzome AG, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany

<sup>1</sup> European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany

<sup>2</sup> CGGM-CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Gavin et al. (1999). *Nature* 415: 141-147

### Tandem Affinity Purification (TAP)

CELLZONE: 232 complexes

## Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry

Yuen Ho<sup>1</sup>, Albrecht Gruhler<sup>1</sup>, Adrian Heilbut<sup>1</sup>, Gary D. Bader<sup>1,2</sup>, Lynda Moore<sup>1</sup>, Sally-Lin Adams<sup>1</sup>, Anna Millar<sup>1</sup>, Paul Taylor<sup>1</sup>, Keiryn Bennett<sup>1</sup>, Kelly Boutilier<sup>1</sup>, Lingyun Yang<sup>1</sup>, Cheryl Wolting<sup>1</sup>, Ian Donaldson<sup>1</sup>, Søren Schandorff<sup>1</sup>, Juanita Shewnarane<sup>1</sup>, Mai Vo<sup>1,3</sup>, Joanne Taggart<sup>1,4</sup>, Marilyn Goudreault<sup>1,4</sup>, Brenda Muskat<sup>1</sup>, Cris Alfarano<sup>1</sup>, Danièle Dewar<sup>1</sup>, Zhen Lin<sup>1</sup>, Katerina Michalickova<sup>1,2</sup>, Andrew R. Willem<sup>1,5</sup>, Holly Sassi<sup>1</sup>, Peter A. Nielsen<sup>1</sup>, Karina J. Rasmussen<sup>1</sup>, Jens R. Andersen<sup>1</sup>, Lone E. Johansen<sup>1</sup>, Lykke B. Hansen<sup>1</sup>, Hans Jespersen<sup>1</sup>, Alexandre Podtelejnikov<sup>1</sup>, Eva Nielsen<sup>1</sup>, Janne Crawford<sup>1</sup>, Viboke Poulsen<sup>1</sup>, Birgitte D. Sørensen<sup>1</sup>, Jesper Matthiesen<sup>1</sup>, Ronald C. Hendrickson<sup>1</sup>, Frank Gleeson<sup>1</sup>, Tony Pawson<sup>1,6</sup>, Michael F. Moran<sup>1</sup>, Daniel Durocher<sup>1,5</sup>, Matthias Mann<sup>1</sup>, Christopher W. V. Hogue<sup>1,7</sup>, Daniel Pfegeys<sup>1</sup> & Mike Tyers<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> MDS Proteomics, 251 Attwell Drive, Toronto, Canada M9W 7H4, and Staernsgaardsvej 6, DK-5230 Odense M, Denmark

<sup>1</sup> Programme in Molecular Biology and Cancer, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University Avenue, Toronto, Canada, M5G 1X5

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, University of Toronto, 1 Kings College Circle, Toronto, Canada M5S 1A8

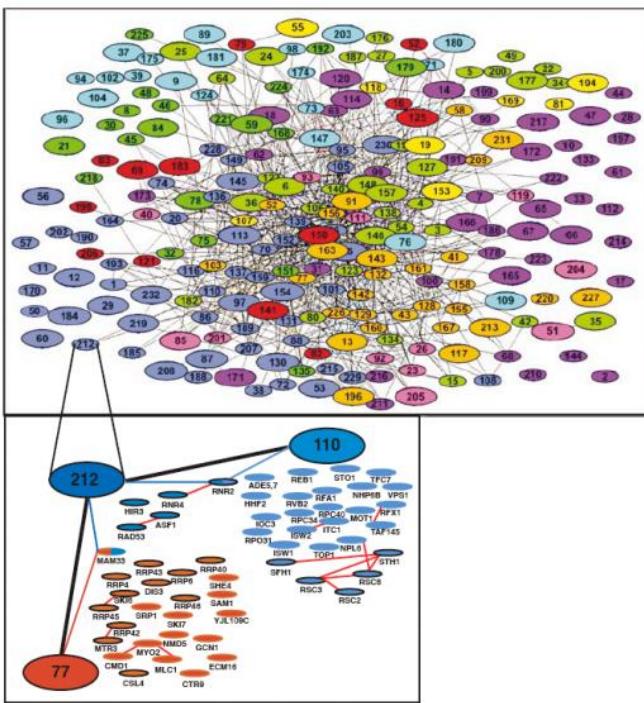
<sup>3</sup> Department of Medical Genetics and Microbiology, University of Toronto, 1 Kings College Circle, Toronto, Canada M5S 1A8

Ho et al. (1999). *Nature* 415: 180-183

## High-throughput mass-spectrometric protein complex identification (HMS-PCI)

MDS proteomics

493 complexes



Gavin et al. (1999). *Nature* 415: 141-147