

## Marqueurs de spin : des espions au cœur des protéines

**Résumé** Les protéines sont des macromolécules biologiques souvent représentées par leur structure cristallographique. Pourtant, cette représentation statique et rigide peut être trompeuse. En effet, la fonction biologique d'un grand nombre de protéines est gouvernée par leur aptitude à se mouvoir. Cette flexibilité permet aux protéines de s'adapter à leur(s) partenaire(s) physiologique(s) dans le but de remplir des fonctions diverses. La technique de marquage de spin couplée à la spectroscopie RPE est une approche de choix pour comprendre ces processus dynamiques de modification structurale. Cet article présente cette technique et quelques exemples d'applications.

**Mots-clés** Nitroxyde, spectroscopie RPE, marquage de spin, modifications structurales, dynamique.

**Abstract** Spin labels: spies in the heart of proteins

Proteins are biological macromolecules often represented by their crystallographic structure. However, this static and rigid representation can be misleading. Indeed, the biological function of many proteins is governed by their ability to move. This flexibility allows the proteins to adapt to their physiological partner(s) in order to fulfill various functions. The technique of site directed spin labeling coupled to electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) is an approach of choice for understanding these processes of conformational changes in protein. This article describes this technique and some examples of applications.

**Keywords** Nitroxide, EPR spectroscopy, site-directed spin labeling, structural changes, dynamics.

### Les protéines ne sont pas des entités figées

Les protéines sont des macromolécules biologiques essentielles à la vie. Leurs rôles sont variés et concernent le transport de petites molécules, la signalisation, la régulation d'activité protéique ou la catalyse de réactions chimiques (enzymes). Il existe des dizaines de milliers de protéines, qui diffèrent par leurs séquences d'acides aminés et leurs repliements sur elles-mêmes dans l'espace. En solution liquide, les protéines ne sont pas figées et peuvent avoir un caractère dynamique et flexible plus ou moins marqué. Cette dynamique dépend de l'échelle de temps considérée : depuis la vibration des liaisons entre les atomes (de l'ordre de la picoseconde) jusqu'aux changements conformationnels de large ampleur (de la microseconde à la seconde) [1]. Cette flexibilité des protéines permet une modification de l'arrangement spatial de la chaîne polypeptidique, et donc de sa structure tridimensionnelle, facilitant ainsi l'interaction avec d'autres molécules pour assurer le bon fonctionnement du système biologique. Dans les régions dites « intrinsèquement désordonnées », cette flexibilité est particulièrement grande, ce qui est lié en grande partie à la composition en acides aminés [2].

### Les nitroxydes : des spins espions

La compréhension des transitions structurales au niveau moléculaire dans les protéines est une question centrale qui nécessite une méthodologie et des techniques spécifiques. Le marquage de spin couplé à la RPE, introduit par Wayne L. Hubbell dans les années 1980 [3], est une technique de choix pour suivre les changements conformationnels au sein des protéines en solution. Elle permet d'étudier les protéines globulaires ou désordonnées, solubles ou membranaires, la taille du système n'étant pas une limitation, pas plus que la présence d'autres molécules importantes pour la stabilité de la protéine (sels, détergent...). Cette technique est basée sur l'introduction d'une sonde paramagnétique en un

site choisi de la protéine. Les sondes les plus utilisées sont dérivées d'un radical nitroxyde, mais il existe d'autres types de sondes, comme des complexes de gadolinium(III) [4] et des radicaux tryptile [5]. Dans le cas des nitroxydes, une liaison covalente est formée entre le nitroxyde et, en général, la fonction thiol d'une cystéine. Cette dernière peut être naturellement présente dans la protéine étudiée ou introduite par mutagenèse dirigée (figure 1A).

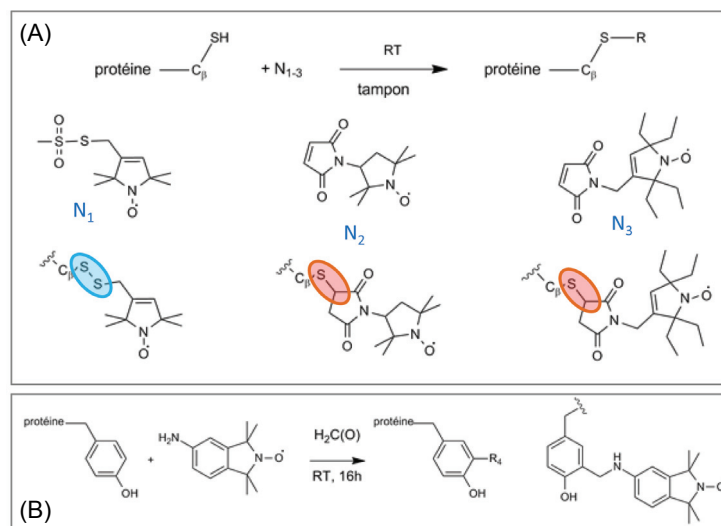


Figure 1 - Réaction chimique du marquage (A) des cystéines par les nitroxydes MTSL (N<sub>1</sub>), proxyl (N<sub>2</sub>) et M-TETPO (N<sub>3</sub>), et (B) des tyrosines par le nitroxyde NOX. RT : « room temperature ».

Les nitroxydes sont des radicaux très stables grâce à la présence des groupements encombrants en  $\alpha$  de l'atome d'azote, empêchant une réaction de dismutation radical-radical et limitant l'accès aux composés réactifs qui pourraient « neutraliser » le radical [6]. Ils sont de plus résistants aux variations de pH (entre 4 et 9). Le spectre, dont la structure résulte de l'interaction hyperfine entre le spin électronique de l'électron ( $S = 1/2$ ) et le spin nucléaire du noyau d'azote  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ),

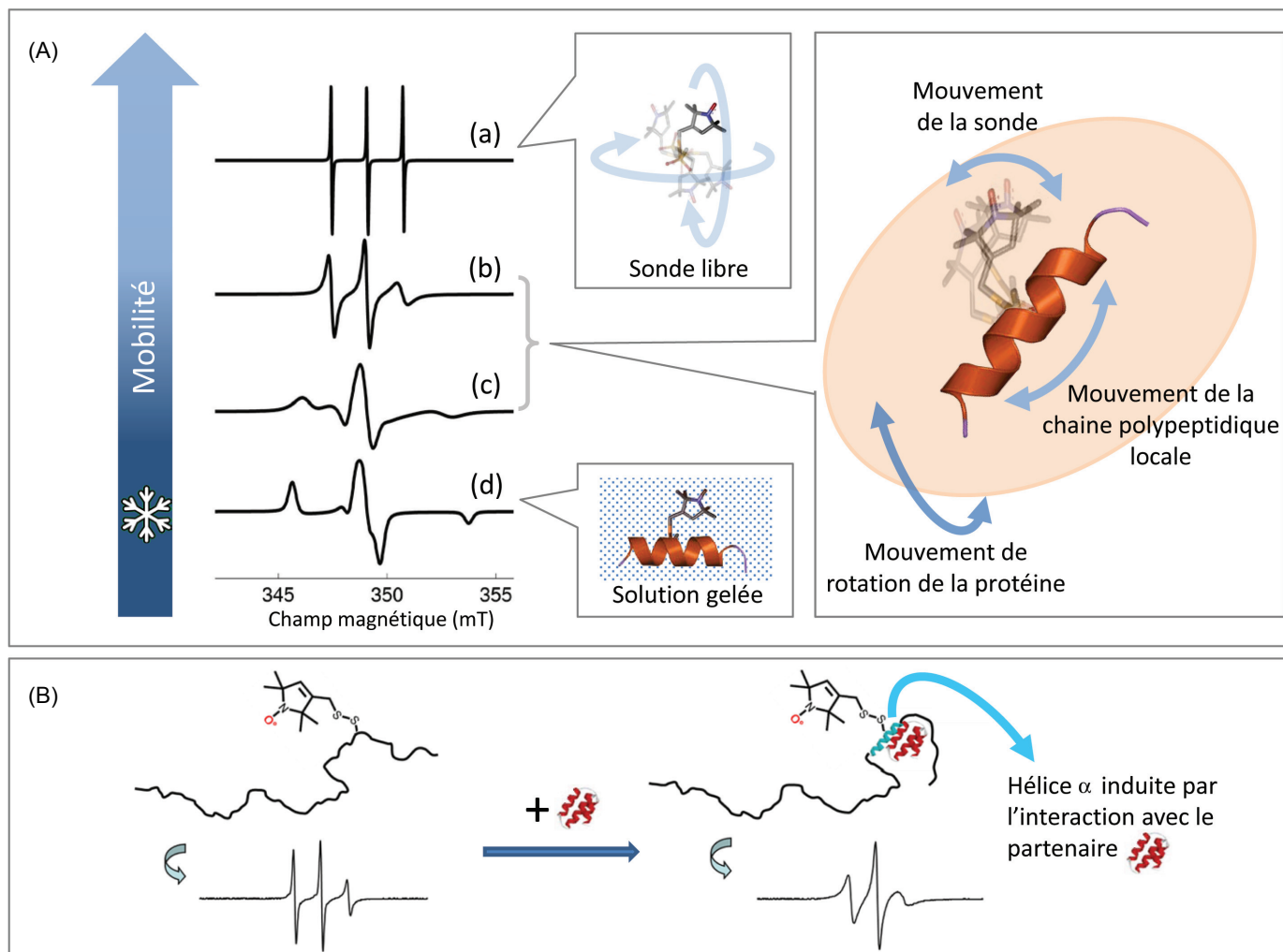


Figure 2 - (A) Modification spectrale d'un radical nitroxyde en fonction de la mobilité de la sonde paramagnétique : sonde libre en solution (a), sonde greffée sur une protéine en solution liquide (b et c) et solution gelée (d). (B) Illustration de la modification spectrale observée lors du repliement local d'une protéine désordonnée induit par son partenaire physiologique (formation d'une hélice indiquée en bleu).

est alors constitué de  $2l + 1 = 3$  raies (figure 2A). Dans le cas d'un nitroxyde, l'interaction hyperfine et le facteur  $g$  sont anisotropes, c'est-à-dire que leurs valeurs dépendent de l'orientation du champ magnétique externe par rapport à la molécule.

La force de la technique réside dans le fait que le spectre RPE du radical nitroxyde dépend fortement de la mobilité de ce dernier. Si les sondes tournent rapidement, les composantes anisotropes des interactions subies par l'électron célibataire sont moyennées sur toutes les orientations de la molécule par rapport au champ magnétique externe. Leurs effets sur les spectres RPE disparaissent, ce qui produit des spectres à structure simple avec des raies étroites. À l'inverse, si la mobilité des sondes diminue, l'anisotropie des paramètres magnétiques décrits par les tenseurs  $g$  et  $A$  est progressivement révélée, jusqu'au cas d'une solution gelée où le spectre RPE a une forme plus complexe avec des raies larges. Cette mobilité résulte à la fois du mouvement de rotation local de la sonde, du mouvement de la chaîne polypeptidique à laquelle elle est liée, et du mouvement brownien de rotation de la protéine sur elle-même (figure 2A). Le spectre RPE reflète ainsi la mobilité de la sonde, et par extension, donne des informations sur son environnement. Une sonde placée en une position exposée vers le solvant aura une plus grande mobilité (donc des raies plus fines) que si elle est placée dans un environnement plus contraint, par exemple dans un site enfoui (donc des raies plus

larges). Par conséquent, des changements structuraux ayant lieu dans l'environnement de la sonde peuvent être détectés. Cette technique est notamment très adaptée pour l'étude de protéines intrinsèquement désordonnées. La figure 2B en donne une illustration : l'étude par RPE d'une telle protéine marquée, soit seule en solution, soit en présence de son partenaire, met en évidence un ralentissement de la sonde nitroxyde (élargissement des raies). La sonde est ici le témoin d'une structuration locale induite par le partenaire. En greffant tour à tour des sondes en différentes positions, il est ainsi possible de cartographier la région d'interaction et de repliement induit [7].

## À chaque cas son nitroxyde

### Les nitroxydes spécifiques des cystéines

Les sondes commerciales les plus utilisées se greffent de façon spécifique sur les fonctions thiol des résidus cystéine. Le MTSL (S-(2,2,5,5-tétraméthyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)méthylméthanesulfonothionate) se lie aux cystéines via un pont disulfure (figure 1A, N<sub>1</sub>) et le maléimido proxyl ((3-maléimido-2,2,5,5-tétraméthyl-1-pyrrolidinyloxy) (figure 1A, N<sub>2</sub>) via une liaison thioéther. Après greffage sur la protéine, le MTSL présente une chaîne latérale très flexible (figure 1A) due à la présence de cinq liaisons simples autour desquelles des rotations peuvent s'effectuer. En revanche, la présence du cycle

maléimide dans la chaîne latérale du proxyl le rend légèrement plus encombrant et moins mobile que le MTSL. La liaison S-S formée entre le MTSL et la cystéine est sensible à la présence de réducteur dans le milieu qui peut conduire à la libération du marqueur, en plus de l'extinction de son signal. C'est pourquoi des sondes nitroxyde « protégées » vis-à-vis de la bio-réduction, comme le M-TETPO, ont été très récemment proposées afin d'étudier les systèmes biologiques en milieu cellulaire, qui est un milieu réducteur (figure 1A, N<sub>3</sub>) [8].

### Les nitroxydes spécifiques d'autres résidus

Les cystéines pouvant être impliquées dans la fonction ou la structure de la protéine, les muter est parfois délétère pour le système. Ces dernières années, des efforts ont été menés pour pouvoir marquer les tyrosines avec ANINO (4-amino-2,2,5,5-tétraméthyl-3-imidazoline-1-yloxy) ou avec NOX (5-amino-1,1,3,3-tétraméthyl-isoindolin-2-yloxy), via une réaction de type Mannich en solution aqueuse (figure 1B) [6].

L'extension du code génétique a également permis de diversifier et d'enrichir la gamme des sites de marquage par des sondes biophysiques, dont des marqueurs de type nitroxyde. De nouveaux acides aminés comportant des fonctions chimiques différentes de celles des vingt acides aminés naturels ont ainsi été proposés. Cette stratégie implique l'utilisation d'une machinerie biologique spécifique pour incorporer ces acides aminés non naturels dans la protéine comme la *p*-acétyl-L-phénylalanine (*p*AcF) [9]. Un système biologique, pour lequel cette stratégie s'est révélée pertinente, est l'oxydase de l'acide 1-aminocyclopropane carboxylique, ACCO, une enzyme non hémique à Fe(II), qui catalyse la dernière étape de synthèse de l'éthylène. Elle contient quatre cystéines naturelles, parmi lesquelles seules deux sont accessibles au marquage, et dont la modification rend l'enzyme inactive. La stratégie a donc consisté à introduire la *p*AcF dans la partie C<sub>term</sub> de l'enzyme et de la marquer. Le spectre ainsi obtenu rend compte du caractère flexible de la partie C<sub>term</sub> (figure 3A).

### Mesurer des distances entre deux sondes paramagnétiques

Les techniques de RPE impulsionnelle permettent également d'obtenir des informations structurales complémentaires au sein des protéines en mesurant des distances inter-sondes. La gamme des distances accessibles est typiquement comprise entre 1,8 et 6,0 nm, une gamme bien adaptée au suivi des changements conformationnels rencontrés dans les systèmes biologiques. Ces mesures sont basées sur la détermination du couplage dipolaire entre deux spins A et B, qui est proportionnel à  $1/r_{AB}^3$ , où  $r_{AB}$  représente la distance entre ces deux spins [10]. En pratique, on obtient des distributions de distances. Ces mesures de distance nitroxyde-nitroxyde connaissent un succès grandissant depuis une quinzaine d'années et sont à présent couramment utilisées dans de nombreux laboratoires. À titre d'exemple, reprenons l'ACCO, cette fois avec deux marqueurs nitroxyde. La distribution de distance obtenue (figure 3B) montre deux pics, ce qui révèle la présence de deux conformations en solution. Des mesures de distances entre un nitroxyde et un centre métallique ou entre deux centres métalliques sont également possibles [11]. Une illustration en est donnée figure 3C pour l'enzyme ACCO marquée par un nitroxyde et dont l'atome de fer du site actif a été remplacé par un atome de cuivre.

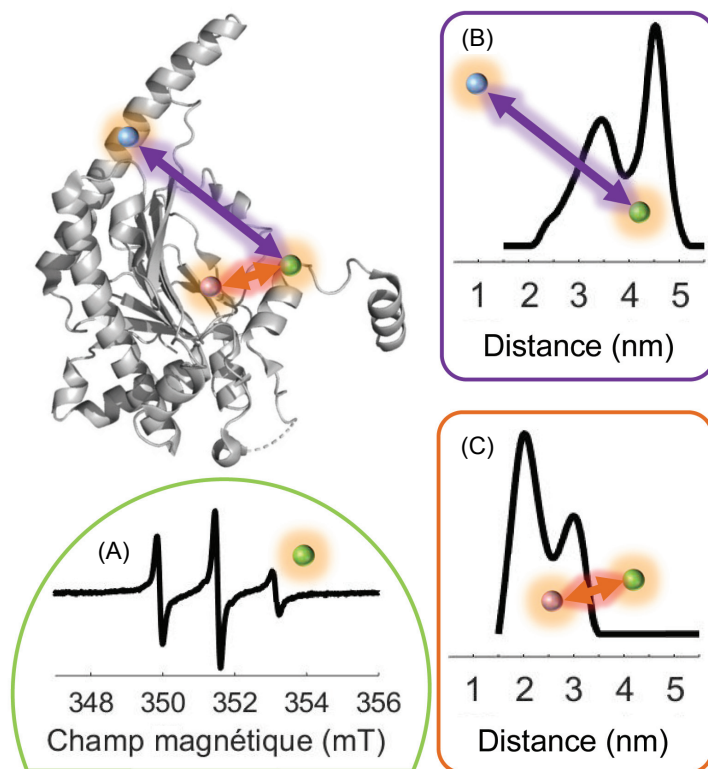


Figure 3 - Représentation structurale de l'enzyme ACCO. La sphère rouge représente un atome de cuivre introduit dans le site actif, les sphères verte et bleue la position des sondes nitroxyde. (A) Spectre RPE en onde continue de la protéine marquée sur un acide aminé non naturel ; (B et C) Distributions de distances obtenues par RPE impulsionnelle : (B) distances entre les deux nitroxydes (protéine doublement marquée) ; (C) distances entre le cuivre et le nitroxyde (protéine mono-marquée).

### Le défi ?

La technique de marquage de spin couplé à la RPE est une technique de choix pour suivre la dynamique des protéines en solution. Ainsi, des informations structurales et dynamiques lors d'interactions protéine-protéine ou protéine-ligand peuvent être obtenues en combinant judicieusement RPE en onde continue et RPE impulsionnelle, permettant une meilleure compréhension des systèmes biologiques. Pour élargir les domaines d'application de cette technique, les recherches actuelles se focalisent notamment sur la modification de la nature des sites de greffage ou de la nature chimique des nitroxydes utilisés [6]. Mais l'un des plus grands défis actuels est l'obtention d'informations de dynamique structurale directement dans les cellules !

[1] Teilmann K., Olsen J.G., Kragelund B.B., Functional aspects of protein flexibility, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2009**, 66, p. 2231.

[2] Habchi J., Tompa P., Longhi S., Uversky V.N., Introducing protein intrinsic disorder, *Chem. Rev.*, **2014**, 114, p. 6561.

[3] Hubbell W.L., Lopez C.J., Altenbach C., Yang Z.Y., Technological advances in site-directed spin labeling of proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2013**, 23, p. 725.

[4] Collauto A., Feintuch A., Qi M., Godt A., Meade T. et al., Gd(III) complexes as paramagnetic tags: evaluation of the spin delocalization over the nuclei of the ligand, *J. Magn. Reson.*, **2016**, 263, p. 156.

[5] Joseph B., Tormyshev V.M., Rogozhnikova O.Y., Akhmetzhanov D., Bagryanskaya E.G. et al., Selective high-resolution detection of membrane protein-ligand interaction in native membranes using trityl-nitroxide PELDOR, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2016**, 55, p. 11538.

[6] Martinho M., Fournier E., Le Breton N., Mileo E., Belle V., Nitroxide spin labels: fabulous spy spins for biostructural EPR applications, in *Electron Paramagnetic Resonance*, V. Chechik, D. Murphy (eds), Royal Society of Chemistry, **2019**, p. 66.

[7] Belle V., Rouger S., Costanzo S., Liquière E., Strancar J. et al., Mapping  $\alpha$ -helical induced folding within the intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus



