



HAL
open science

Etude des interactions entre la kinésine mitotique humaine Eg5 et ses inhibiteurs

Sebastien Brier

► **To cite this version:**

Sebastien Brier. Etude des interactions entre la kinésine mitotique humaine Eg5 et ses inhibiteurs. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011246

HAL Id: tel-00011246

<https://theses.hal.science/tel-00011246>

Submitted on 20 Dec 2005

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I
CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

présentée par

Sébastien BRIER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie.

**ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA KINESINE MITOTIQUE
HUMAINE Eg5 ET SES INHIBITEURS**

soutenue publiquement le 04 novembre 2005

Composition du jury :

Président: Wim Burmeister
Rapporteurs : Emmanuelle Leize-Wagner
David Hackney
Examineurs : Anne Houdusse
Frank Kozielski
Eric Forest

Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines - Laboratoire des Moteurs Moléculaires
Institut de Biologie Structurale (CEA-CNRS-UJF)

À mes parents

Parce que me supporter n'est pas une mince affaire...mettez vous à leur place !!

Merci de votre soutien et de votre tendresse !! Mieux que vous, ça n'existe pas !!

À ma sœur Aurélie, mon frère Cyril et son fils Thomas,

Ma plus grande fierté !!

REMERCIEMENTS

Ces trois années de thèse se sont déroulées au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'IBS sous la direction de Eric Forest. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe.

Une « grosse » partie de ce travail a également été supervisée par Frank Kozielski du Laboratoire des Moteurs Moléculaires de l'IBS. Mon « piti » Frank, je commence seulement à me rendre compte de la chance que j'ai eu de travailler avec toi. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir considéré comme un membre à part entière de ton équipe. On remet ça quand tu veux !! et où tu veux !!(BBQ compris ☺).

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres de mon jury : Wim Burmeister pour avoir accepté de présider mon jury de thèse ; Emmanuelle Leize-Wagner et David Hackney pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail ; Anne Houdusse pour votre participation à cette thèse.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé avec la complicité permanente de David Lemaire (Mon papy !!). Sans lui, je ne sais pas où je serai à l'heure actuelle, mais certainement pas devant mon clavier d'ordinateur à écrire ces remerciements. Cette thèse est également la sienne et bien plus !! Merci mon gars de graviter dans mon univers de dingue et de me pousser de l'avant, de croire que je suis capable de faire quelque chose et simplement d'être la !! Ce manuscrit marque la fin (provisoire) de notre petite équipe....ici seulement....pour recommencer, je le souhaite, ailleurs (et je vais m'y employer). Comme je le dis si bien, « trop de bar tue le bar » et c'est de même pour le blabla. Remercier les gens qu'on apprécie est chose délicate, surtout quand on les inclut dans son cercle familial !! Une chose est sûre, nos soirées au vin de groseilles ne sont pas terminées... ce n'est que le commencement ☺ !!

Bien évidemment, mon papy et moi avons eu la chance de collaborer avec d'autres personnes de l'Institut. Tout d'abord le chti Salvatore De Bonis, au caractère trempé (c'est comme les tits pimousses au cassis, version italienne !!!). Je ne sais toujours pas comment tu as fais pour me supporter mon pépère. La seule explication que je trouve me fais frissonner : serais je de la même famille que toi ?? nonnnnnnnn !!!! Dans tous les cas, j'ai pris du plaisir à bosser avec toi. Merci de m'avoir aiguiller si délicatement sur les chemins de l'enzymologie. Mais surtout, n'oublis jamais ta devise : arbeit, schnell, drei mal !!! et si tu lis ses mots je n'ai qu'une chose à te dire...retourne bosser !!!

Je tiens également à remercier la miss Delphine Blot, toujours prête à répondre à mes questions (débiles, je sais !!) et d'une aide plus que précieuse en biologie moléculaire et sur-expression de tites protéines recombinantes. Plus compétente que la miss, je n'ai pas encore trouvé !!..et je continue à chercher. Merci de m'avoir épaulé. Grâce à tes conseils, nous avons réussi à « déglinguer » plus qu'il

ne le fallait Eg5 à coup de mutagenèse, un vrai bonheur (sauf pour la prot. !!). Merci également à Isabel Garcia Saez pour toutes ces discussions d'ordre structural. Je dois avouer que j'ai pas tout compris (je suis mono-neuronal !), mais je te promets qu'un jour je pourrais visualiser une structure en stéréo, sans l'aide des lunettes qui me font loucher !!

Mes remerciements s'adressent également à Emmanuelle Neumann du LMES, la miss à la chtroumfite permanente qui tente, avec désespoir, de gagner à l'Euro Millions. Déjà sponsorisée par kleenex, il ne te manquait plus que la française des jeux...et j'ai le plaisir de t'annoncer que tu as gagné à vie !!!! le droit de rejouer chaque semaine ☺. Bonne chance pour la suite de tes travaux avec CENP-E, même si « cte pove chtiotte prot » commence à te sortir par les yeux !!

Je pense également à tous mes autres compères de laboratoire, qui ont participé de près ou de loin à ce travail : David Lascoux, Laetitia Cravello (The Presidente, exilée depuis peu), Armelle Hubert (Ma Petiote, on reste en contact !!) , Ali Tiss (lui aussi exilé), Remy Bonnet (l'informaticien complètement ravagé qui squat mon bureau, et qui rêve de se faire des soirées dignes de l'ambassadeur !!!) et Bernard Dublet.

Enfin, je n'oublis pas tous mes amis Grenoblois et d'ailleurs qui m'ont épaulé et encouragé. Tout d'abord ma belle Flo qui m'a supporté en colocation pendant quelques mois ; je suis heureux de te revoir parmi nous, en France (pour toujours je l'espère !!). Et puis mon Floflo et son compère Romain, mes deux Dupont/Dupond ; j'ai de la chance de vous avoir ici, merci de votre amitié ! Passons au petit Nicolas DiRito, le pro du gâteau d'anniversaire de 1cm d'épaisseur (avis aux amateurs, s'abstenir du repas au préalable avant d'attaquer le dessert...je plaisante) ; merci pour toutes ces petites intentions portées à mon égard, tu es une vrai perle. Et ma miss Agnès, mon petit soleil grenoblois !! voilà maintenant 3 ans que nous nous épaulons mutuellement. C'est un bonheur de te savoir à proximité. Merci d'avoir partagé tous ses bons (et mauvais) moments avec moi...et pour continuer à les partager. J'ai aussi eu la chance de rencontrer Sylvie, Denis, Virginie, Manu...anciens camarades de thèse, je vous remercie pour votre amitié sincère et pour tous ces petits moments partagés ensemble. Enfin, je n'oublis pas mes amis cutsard !!! Ma Laetitia, depuis peu sur Lyon avec son mari, qui compte plus qu'elle ne peut l'imaginer dans ma tite vie ; Isabelle, toujours sur Paris, et tous les autres (désolé de ne pas tous vous nommer).

A tous merci !!!

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
BIBLIOGRAPHIE.....	5
Chapitre I - La kinésine mitotique humaine HsEg5 et la division cellulaire.....	6
I) <u>Le cycle cellulaire</u>	7
II) <u>Fonctions et régulation d'Eg5 au cours du cycle cellulaire</u>	8
2.1) Données structurales	8
2.1.1) Organisation générale	8
2.1.2) Structure du domaine moteur d'Eg5.....	9
2.2) Rôles cellulaires d'Eg5.....	12
2.2.1) Formation des asters mitotiques.....	12
2.2.2) Fonction de bipolarisation cellulaire.....	13
2.2.3) Fonction post-mitotique ?.....	17
2.3) Régulation d'Eg5 au cours du cycle cellulaire.....	18
III) <u>Etude de l'inhibition de la KRP Eg5</u>	19
3.1) Le fuseau mitotique : cible privilégiée dans le traitement des cancers.....	19
3.2) Eg5, nouvelle cible du fuseau mitotique.....	22
3.3) Inhibiteurs du domaine moteur d'Eg5.....	23
3.3.1) Le monastrol.....	23
3.3.2) Dérivés des quinazolinones : cas du composé CK0106023.....	27
3.3.3) Le S-trityl-l-cystéine.....	28
3.3.4) L'adociasulfate-2.....	30
3.3.5) Autres inhibiteurs.....	31
IV) <u>Objectifs des travaux de thèse</u>	32
Chapitre II - La spectrométrie de masse.....	33
I) <u>L'électronébulisation</u>	34
1.1) Principe général.....	34
1.2) Formation des ions en phase gazeuse.....	35
1.2.1) Production des gouttelettes chargées par mécanisme électrophorétique.....	35
1.2.2) Evaporation du solvant et explosions « coulombiennes ».....	36
1.2.3) Mécanismes de formation des ions en phase gazeuse.....	37
II) <u>Les analyseurs de masse</u>	38
2.1) Analyseur de type TOF (Time Of Flight).....	39
2.2) Analyseur de type trappe ionique.....	40
2.2.1) Géométrie de la trappe ionique.....	41

2.2.2) Création du champ quadripolaire – Notions de pseudo puits de potentiel.....	42
2.2.2.1) Expression du champ quadripolaire.....	42
2.2.2.2) Pseudo puits de potentiel.....	44
2.2.3) Comportement des ions dans un champ quadripolaire.....	45
2.2.3.1) Equations du mouvement des ions.....	45
2.2.3.2) Stabilité des ions dans un champ quadripolaire.....	46
2.2.3.2.1) <i>Diagramme de stabilité et fréquences séculaires</i>	46
2.2.3.2.2) <i>Conditions de stabilité – trajectoire des ions piégés</i>	48
2.2.4) Opérations sur la trappe ionique.....	49
2.2.4.1) Méthodes de détection des ions.....	49
2.2.4.1.1) <i>Ejection axiale des ions par modulation de la rf</i>	49
2.2.4.1.2) <i>L'éjection des ions par résonance (modulation axiale)</i>	51
2.2.4.2) Confinement sélectif des ions.....	53
2.2.4.3) Fragmentation des ions par excitation résonante.....	55
III) <u>Expériences de fragmentation par spectrométrie de masse</u>	57
3.1) Principe général.....	57
3.2) Application : réalisation de cartes peptidiques.....	59

Chapitre III - Les échanges hydrogène/deutérium.....61

I) <u>Mécanisme général des échanges isotopiques au sein d'une protéine ou d'un peptide</u>	62
II) <u>Contrôles des échanges hydrogène/deutérium</u>	64
2.1) Contrôle par le pH.....	64
2.2) Contrôle par la température.....	65
III) <u>Etudes structurales des protéines par échanges hydrogène/deutérium</u>	66
3.1) Conditions de digestion enzymatique.....	66
3.2) Applications à l'étude structurale des protéines.....	66
3.2.1) Stabilité et modifications conformationnelles.....	67
3.2.2) Etude des interactions protéine/partenaires.....	67

RESULTATS.....70

Chapitre I - Développement du protocole expérimental H/D-MS – Localisation des zones d'interaction et de modifications conformationnelles entre Eg5 et le S-trityl-l-cystéine.....71

I) <u>Introduction</u>	71
II) <u>Publication : zones d'interaction et de modifications conformationnelles Eg5/STLC</u>	72
III) <u>Conclusions</u>	90

Chapitre II - Etude des mécanismes d'inhibition d'Eg5 par le monastrol et le STLC.....91

I) <u>Introduction</u>	91
------------------------------	----

II) <u>Publication</u> : identification des acides aminés nécessaires à l'inhibition de monastrol et du STLC.....	92
III) <u>Conclusions</u>	122

Chapitre III - Mise en évidence d'un « point chaud d'inhibition » (« Hot-Spot ») sur

le domaine moteur d'Eg5.....	124
I) <u>Introduction</u>	124
II) <u>Publication</u> : identification du « point chaud » d'inhibition.....	125
III) <u>Conclusions</u>	140

Chapitre IV - Etude des interactions Eg5/microtubules et CENP-E/microtubules.....141

I) <u>Introduction</u>	141
II) <u>Résultats</u>	142
2.1) Effet de la fixation de l'AS-2 sur Eg5.....	142
2.2) Effet de la fixation de l'AS-2 sur CENP-E.....	143
2.2.1) Réalisation de la carte peptidique du domaine moteur de CENP-E.....	143
2.2.2) Etude des taux de deutération au niveau des fragments peptidiques.....	144
2.3) Eléments de structure secondaire identifiés sur Eg5 et CENP-E.....	146
III) <u>Discussion – Conclusions</u>	146

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.....151

MATERIELS ET METHODES.....157

Chapitre I - Clonage, expression et purification des protéines – Enzymologie.....158

I) <u>Clonage – expression et purification des protéines</u>	158
1.1) Création et contrôle des vecteurs de sur-expression.....	158
1.1.1) Création des vecteurs pEg5 ₁₋₃₈₆ PB et BE par mutagenèse dirigée.....	159
1.1.2) Création du vecteur pEg5 ₁₋₃₈₆ PB1 par mutagenèse dirigée.....	160
1.1.3) Création des vecteurs pEg5 ₁₋₃₈₆ PB2 à PB6, BE1 à BE5, Nc1 et Nc2.....	160
1.1.3.1) Ouverture et purification des vecteurs pEg5 ₁₋₃₈₆ PB et BE.....	160
1.1.3.2) Reconstitution des inserts – Etape de ligation.....	161
1.2) Transformation bactérienne et contrôle de sur-expression.....	163
1.3) Purification des protéines recombinantes.....	165
II) <u>Etudes enzymologiques</u>	166
2.1) Mesure du $K_{m,ATP}$ par test Cytophos.....	166
2.2) Dosage de l'activité ATPasique basale (avec et sans inhibiteur).....	167
2.2.1) Principe du dosage par test couplé avec régénération d'ATP.....	167
2.2.2) Calcul de l'activité enzymatique et de l'IC ₅₀	167
2.3) Détermination des constantes d'inhibition (K_i).....	168
2.3.1) Cas du monastrol.....	168

2.3.2) Cas du S-trityl-l-cystéine.....	169
--	-----

Chapitre II - Spectrométrie de masse – Echange hydrogène/deutérium.....171

I) <u>Protocole de digestion pepsique</u>	171
II) <u>Réalisation des cartes peptidiques par expérience de fragmentation</u>	171
2.1) Programmes HPLC et colonnes chromatographiques utilisées	171
2.2) Conditions d'acquisition et traitement des données.....	172
III) <u>Expériences de deutération</u>	172
3.1) Préparation des complexes protéine/inhibiteurs.....	172
3.2) Cinétique de deutération sur protéine entière.....	172
3.3) Expériences d'échange H/D sur les fragments peptidiques.....	173

REFERENCES175

Résumé

La kinésine mitotique humaine HsEg5 est essentielle à la division cellulaire. Ce moteur moléculaire permet la séparation des centrosomes et la mise en place du fuseau mitotique, structure nécessaire au partage équitable de l'information génétique. La suppression de la fonction d'HsEg5 bloque les cellules en pré-métaphase avec un fuseau mitotique monoastral caractéristique constitué des deux centrosomes non séparés entourés d'un anneau de chromosomes et de microtubules. Le maintien de ce phénotype peut conduire à la mort cellulaire programmée *via* l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique (transition métaphase-anaphase). HsEg5 est ainsi considérée comme une cible anticancéreuse particulièrement intéressante.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés aux interactions entre le domaine moteur d'HsEg5 et plusieurs inhibiteurs. Les zones d'interaction et de modifications conformationnelles ont été étudiées par échanges hydrogène/deutérium–spectrométrie de masse et mutagenèse dirigée. Cette approche expérimentale nous a permis d'identifier un « point chaud » d'inhibition sur le domaine moteur et de caractériser les mécanismes de deux inhibiteurs : le monastrol et le S-trityl-l-cystéine.

ABSTRACT

The human mitotic kinesin HsEg5 plays an essential role in cell division. This protein is required for the separation of the duplicated centrosomes and the formation of the mitotic spindle. Failure of HsEg5 function blocks centrosome migration and causes cells to arrest midway through mitosis with a characteristic monoastral spindle consisting of a radial array of microtubules surrounded by a ring of chromosomes. This particular phenotype can lead to cell death by the apoptotic pathway. HsEg5 is thus considered as a very promising target for cancer chemotherapy.

In this study, we investigate the binding regions of several inhibitors targeting the motor domain of HsEg5. These studies were carried out by using hydrogen/deuterium exchange – mass spectrometry and mutagenesis. Our experimental approach has been successfully applied to localize a “hot spot” binding region on the motor domain and to characterize the mechanism of HsEg5 inhibition by monastrol and S-trityl-l-cysteine.

Mots clés: Cancer – HsEg5 – Inhibiteurs – échanges H/D – Spectrométrie de masse – Mutagenèse

Keywords: Cancer – HsEg5 – Inhibitors – H/D exchange – Mass spectrometry – Mutagenesis

ABBREVIATIONS

Ac	Alternative current
ACES	<i>N</i> -(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BimC	Blocked in Mitosis C
CD	Circular Dichroism
CENP-E	Centromere-associated Protein E
CID	Collision Induced Dissociation
Dc	Direct current
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
E_c	Energie cinétique
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acid
EGTA	Ethylene Glycol bis (β -aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> tetra-acetic acid
E_i	Energie interne
ESI	Electrospray Ionisation
eV	électron Volt
H/D	Hydrogène / Deutérium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
KeV	kilo électron Volt
K_i	Constante d'inhibition
Km	Constante de Michaélis
kV	kilo Volt
LC	Liquid Chromatography
<i>m/z</i>	masse / charge
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
MDR	Multi Drug Resistance
MHz	Mega Hertz
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry
NCI	National Cancer Institut
NcKHC	Kinésine conventionnelle de <i>Neurospora</i>
PIPES	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2ethanesulfonic acid)
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
rf	radio fréquence
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIS	Select Ion Storage
STLC	S-trityl-L-cysteine
TFA	Trifluoro acetic acid
TOF	Time Of Flight
U	Tension

Introduction

Le cycle cellulaire correspond à l'ensemble des événements à l'origine de la duplication des cellules. Ce phénomène biologique, nécessaire au développement et au maintien des organismes vivants, requiert une régulation précise de manière à assurer l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Il existe ainsi un équilibre entre les cellules en prolifération, les cellules quiescentes et celles en fin de vie. Celui-ci est assuré par l'expression de nombreux gènes dont : **(1)** les proto-oncogènes qui codent pour des effecteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire (récepteurs membranaires, facteurs de croissance etc...) ; **(2)** les anti-oncogènes, ou gènes suppressifs de tumeurs, qui codent pour des protéines inhibitrices de la division cellulaire (cas de la protéine p53 et RB1). Le processus de cancérisation conduit à une altération du cycle cellulaire et permet à la cellule d'échapper à toute régulation. Dans la plupart des cas, ces altérations d'ordre génique touchent les proto-oncogènes. La mutation d'un seul allèle permet la transformation du proto-oncogène en oncogène dont l'activation conduit au développement d'une tumeur. Les oncogènes exercent ainsi un effet dominant au niveau cellulaire puisque une seule copie allélique mutée du proto-oncogène permet la transformation. A l'inverse, une seule mutation au niveau des anti-oncogènes n'est pas suffisante pour induire le développement d'une tumeur, mais permet, néanmoins, de préparer le terrain. Les deux copies alléliques de l'anti-oncogène doivent en effet être mutées pour que l'expression de gène suppressif de tumeur soit inhibée (gènes récessifs). Ces défaillances du cycle cellulaire sont nécessaires au processus de cancérisation mais non suffisantes. Les cellules tumorales peuvent en effet être bénignes c'est-à-dire à croissance lente et progressive, non invasive (mobilité cellulaire limitée) et généralement sans récurrence après exérèse complète. D'autres facteurs doivent donc intervenir pour qu'une cellule tumorale devienne maligne. On distingue ainsi les facteurs majeurs comme l'âge, le tabac ou l'alimentation, des facteurs mineurs comme l'hérédité (5% des cancers environ). La cause du cancer est donc multifactorielle et complexe.

La découverte des mécanismes régulant la division cellulaire a permis d'une part de comprendre le processus de cancérisation et d'autre part d'identifier les cibles thérapeutiques potentielles anti-prolifératives (Crew et Mohan, 2000). De nombreux composés antimitotiques sont employés en chimiothérapies classiques et peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- les agents alkylants, qui altèrent l'ADN et bloquent la réplication,
- les anti-métabolites qui se substituent aux précurseurs des acides nucléiques et bloquent la réplication de l'ADN,

- les inhibiteurs des topoisomérases I et II,
- les « poisons » du fuseau mitotique qui ciblent spécifiquement les éléments constitutifs des microtubules.

Ces « poisons » de la tubuline vont agir sur le processus d'instabilité dynamique des microtubules en inhibant soit l'étape de polymérisation, soit de dépolymérisation. Le fuseau mitotique perd alors ses propriétés cellulaires (ségrégation équitable de l'information génétique) ce qui bloque la division et conduit à l'apoptose. Même si ces « poisons » des microtubules ont une efficacité thérapeutique réelle, certains effets secondaires subsistent et des phénomènes de résistance commencent à émerger. L'étude des différents acteurs du fuseau mitotique a largement contribué au développement de nouvelles approches thérapeutiques visant d'autres composants que les microtubules. Les moteurs moléculaires mitotiques font partie des cibles les plus prometteuses du fuseau.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la kinésine mitotique humaine Eg5. Cette protéine motrice intervient lors des premières étapes de la division et permet la séparation des centrosomes à chaque pôle cellulaire. Cette fonction, dite de bipolarisation, est nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique et au bon déroulement de la division. L'objectif de ces travaux est de caractériser les interactions entre Eg5 et plusieurs inhibiteurs. Ces molécules ciblent spécifiquement le domaine moteur de la kinésine et bloquent le cycle ATPasique. L'inhibition d'Eg5 stoppe alors la prolifération cellulaire et peut conduire à la mort cellulaire programmée. La caractérisation des interactions entre Eg5 et ces molécules représente une étape nécessaire à la compréhension des mécanismes d'inhibition mis en jeu. Ces dernières ont été étudiées par échange hydrogène/deutérium et spectrométrie de masse (H/D-MS).

La première partie de ce manuscrit est consacrée à la kinésine mitotique Eg5 ainsi qu'aux différentes méthodes biophysiques utilisées au cours de ces travaux.

La seconde partie présente les différents résultats obtenus et s'articule autour de quatre chapitres. Nous verrons tout d'abord la validation du protocole expérimental H/D-MS mutagenèse dirigée et l'identification des zones d'interaction et de modifications conformationnelles entre le domaine moteur d'Eg5 et le S-trityl-L-cystéine (STLC). Nous nous sommes par la suite intéressés au mécanisme d'inhibition d'Eg5 par le STLC et le monastrol.

Le troisième chapitre est consacré à l'identification des zones d'interactions entre Eg5 et quatre nouveaux inhibiteurs spécifiques. Enfin, la dernière partie traite de l'interaction entre Eg5 et l'adociasulfate-2 (AS-2). Cette molécule naturelle est un inhibiteur compétitif des microtubules. Celle-ci a donc été utilisée afin d'identifier les zones de contact entre Eg5 et les microtubules par H/D-MS. Cette étude a été également menée sur le domaine moteur d'une autre kinésine mitotique humaine associée aux kinétochores : CENP-E (Centromere-associated protein E).

Bibliographie.

Chapitre I

La kinésine mitotique humaine HsEg5 et la division cellulaire

Les moteurs moléculaires sont des protéines motrices capables de se déplacer le long de filaments en convertissant l'énergie chimique d'hydrolyse de l'ATP en mouvements. On distingue trois types de moteurs au niveau cellulaire : les myosines qui se lient aux filaments d'actines et les dynéines / kinésines qui fixent les microtubules. Les membres de la superfamille des kinésines et des dynéines se distinguent en fonction de leur sens de déplacement le long des microtubules. Ces protéines interviennent aussi bien dans le transport d'organelles et de vésicules que dans certaines étapes du cycle cellulaire (Hirokawa *et al.*, 1998 ; Hirokawa 1998 ; Goldstein, 2001).

Parmi les kinésines, les KRP (Kinesin Related Proteins) constituent une classe à part de moteurs moléculaires. Découvertes au début des années 90, ces protéines motrices s'apparentent aux kinésines par similarités de séquences au niveau de leur domaine moteur mais différent au niveau fonctionnel. Alors que les kinésines sont principalement impliquées dans le transport d'organelles et de vésicules, la plupart des KRP va intervenir dans le cycle cellulaire. Ce premier chapitre est consacré à la présentation de la KRP humaine HsEg5, notée Eg5, de la sous-famille des BimC (Blocked In Mitosis). Les membres de cette sous-famille jouent un rôle capital lors de la division cellulaire en participant à la formation du fuseau mitotique (Kashina *et al.*, 1997). Cette structure complexe, composée en grande partie de microtubules, assure le partage équitable de l'information génétique de la cellule mère aux cellules filles. Le fuseau joue ainsi un rôle clé dans le cycle cellulaire et représente, à ce jour, une des cibles les plus exploitées dans les thérapies anticancéreuses.

Après un bref rappel sur le cycle cellulaire, nous aborderons successivement le rôle et la régulation de Eg5 au cours de la division ainsi que les effets de son inhibition. L'objectif de ce chapitre est de comprendre pourquoi ce moteur moléculaire est considéré, actuellement, comme une des cibles les plus intéressantes dans la lutte contre le cancer.

I) Le cycle cellulaire

Lorsqu'elle ne se divise pas, la cellule est dite en quiescence (phase G0). Ce n'est que sous l'effet de signaux mitogènes qu'elle entame son cycle de division (Meijer, 2003 ; Scholey *et al.*, 2003). Le cycle cellulaire est subdivisé en 4 phases (Figure 1) :

- **la phase G1** (Growth phase 1) : la cellule entre en activité métabolique intense et produit tous les éléments nécessaires à la phase de synthèse S (ARNm, ARNt, ribosomes et autres constituants cytoplasmiques) ;
- **la phase S** (DNA synthesis) : phase la plus longue du cycle pendant laquelle le matériel génétique et les centrosomes sont dupliqués ;
- **la phase G2** (Growth phase 2) : période pendant laquelle la cellule contrôle la qualité de l'ADN dupliqué pendant la phase S et prépare la division cellulaire ;
- et **la phase M** (Mitose / Méiose) au cours de laquelle le matériel génétique dupliqué est réparti équitablement entre les deux cellules filles grâce au fuseau mitotique.

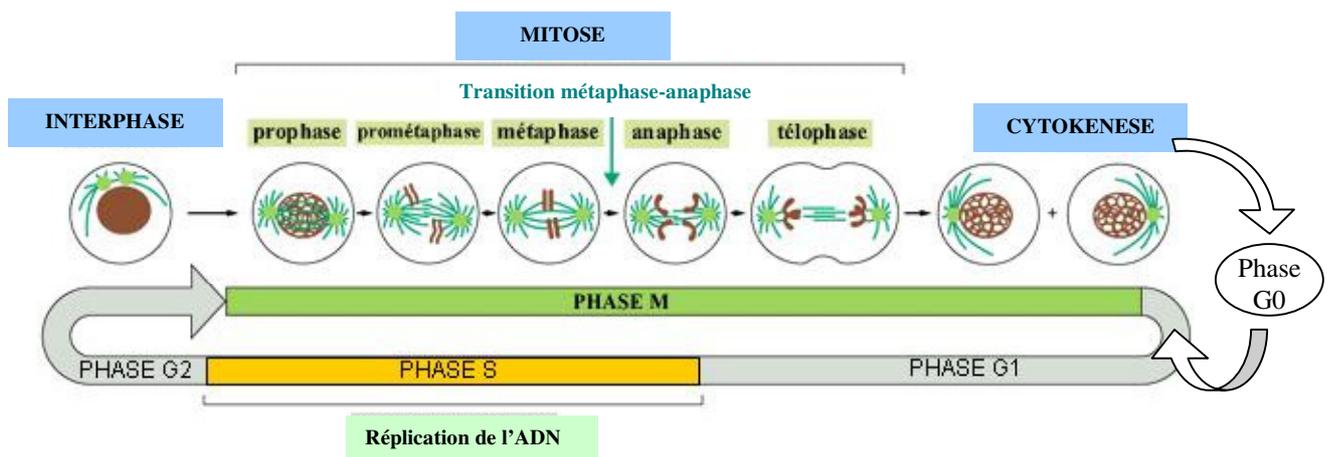


Figure 1 : Vue générale des différentes phases du cycle cellulaire et des principales étapes de la division mitotique (Alberts *et al.*, 1994).

La phase M est découpée en cinq étapes successives : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 1).

Au cours de la prophase / prométaphase, la chromatine se condense et les deux centrosomes s'éloignent et se positionnent aux extrémités de la cellule. On assiste ainsi à une véritable réorganisation des microtubules interphasiques qui rayonnent à partir des centrosomes, appelés asters en raison de leur forme étoilée, pour former la structure indispensable à la division : le fuseau mitotique. Pendant la prométaphase, l'enveloppe nucléaire se fragmente totalement ce qui permet aux microtubules de pénétrer dans le noyau et de capturer les chromosomes. Sous l'effet de la dynamique des microtubules et de moteurs moléculaires, les

chromosomes sont positionnés à l'équateur du fuseau. En métaphase, tous les chromosomes sont alignés et constituent la plaque équatoriale. A ce stade, l'ensemble du système passe par un point de contrôle (phase de transition métaphase-anaphase) et attend le signal requis pour poursuivre le cycle. Lors de l'anaphase, les chromatides de chaque chromosome sont séparés vers les pôles opposés de la cellule sous l'effet de la traction exercée par le fuseau mitotique. Enfin, au cours de la télophase, les membranes nucléaires se reconstituent autour de chaque lot de chromosomes et la cellule se divise progressivement en deux par invagination de sa membrane au niveau de la plaque équatoriale (étape de cytokénèse). Ce processus de constriction se poursuit jusqu'à la formation des deux cellules filles.

L'ensemble de ces événements mitotiques nécessite l'intervention de moteurs moléculaires. A ce jour, 12 moteurs mitotiques humains ont été identifiés et étudiés lors de la division de cellules HeLa (Zhu *et al.*, 2005). Ces protéines permettent de générer les forces motrices nécessaires à la formation du fuseau mitotique (cas de KifC1, Kif2A, et Eg5), aux mouvements des chromosomes (cas de CENP-E, MCAK, Kif14, Kif18 et Kid) et à la cytokénèse (Kif4A, Kif4B, MKLP1 et MKLP2).

II) Fonctions et régulation d'Eg5 au cours du cycle cellulaire

Tous les modèles développés pour comprendre le fonctionnement d'Eg5 au cours du cycle cellulaire sont basés sur la structure particulière de cette KRP. Nous verrons dans un premier temps l'organisation générale de cette protéine motrice en nous focalisant sur la structure du domaine moteur avant d'aborder ses fonctions cellulaires ainsi que sa régulation.

2.1) Données structurales

2.1.1) Organisation générale

L'organisation générale d'Eg5 est commune aux autres KRP de la sous-famille des BimC. Ces protéines disposent d'une structure homotétramérique bipolaire unique (Figure 2). Chaque dimère contient une paire de domaine moteur globulaire en position N-terminale reliée par un « neck-linker », un long domaine central en hélices α organisé en « coiled-coil » et une région « tail » en position C-terminale comportant un motif particulier noté « BimC

box ». Ce motif joue un rôle important dans la régulation d'Eg5 et sa fonction sera abordée ultérieurement. Les dimères s'associent de manière anti-parallèle *via* leur région en « coiled-coil » pour former le tétramère. Cette structure particulière a été démontrée chez certaines KRP de la sous-famille des BimC par études biochimiques et biophysiques (Sawin *et al.*, 1992, Cole *et al.*, 1994 ; Gordon et Roof, 1999). Pour les autres BimC, dont Eg5, cette structure homotétramérique bipolaire est admise car les membres de cette sous-famille partageraient un ancêtre et une évolution commune (Walczak et Mitchison, 1996).

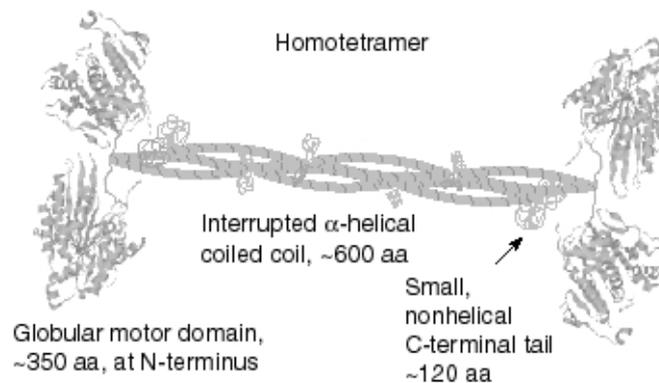


Figure 2 : Organisation générale des KRP de la sous-famille des BimC. Chaque dimère s'associe de manière anti-parallèle au niveau de leur région centrale en « coiled-coil » pour former un homotétramère bipolaire (http://www.proweb.org/kinesin/BE5a_BimC.html).

2.1.2) Structure du domaine moteur d'Eg5

La structure du domaine moteur d'Eg5 a été résolue à 2.1 Å en présence d'ADP-Mg (Turner *et al.*, 2001). Son organisation générale, dite en « pointe de flèche », est commune aux domaines moteurs des kinésines avec 6 feuillets β en position centrale entourés de 6 hélices α et un site de fixation nucléotidique (Figure 3). Les régions « switch I » (motif consensus NxxSSRSH, où x est un acide aminé quelconque) et « switch II » (motif consensus DLAGxE) sont directement impliquées dans la fixation du nucléotide. Lorsque l'ATP se lie, les boucles de ces deux régions interagissent avec le phosphate γ de l'ATP et établissent des interactions entre elles. Les interactions ATP-switch et switch-switch sont à l'origine de mouvements secondaires en cascade au sein du domaine moteur qui permettent d'améliorer l'affinité de la protéine vis-à-vis des microtubules. Dès que l'ATP est hydrolysé en ADP, ces interactions sont perdues. Le moteur retrouve alors sa conformation de départ ce qui diminue son affinité pour les microtubules. La fixation du domaine moteur d'Eg5 sur les microtubules est donc étroitement liée à l'état ATP ou ADP du nucléotide présent dans le site catalytique. Les

régions « switch » vont servir à la fois de point d’ancrage au nucléotide mais également de « relais » à partir desquels les modifications conformationnelles sont transmises au sein de la protéine.

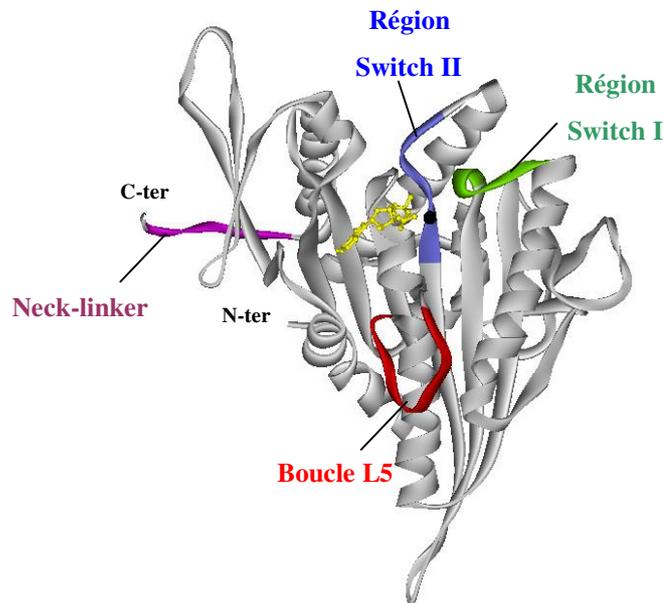


Figure 3 : Structure du domaine moteur d’Eg5 en présence d’ADP (en jaune) et de Mg^{2+} (bille noire). Les deux régions « switch » permettent la fixation de l’ATP au niveau du site catalytique et transmettent les modifications conformationnelles au sein de la protéine. Ces changements structuraux modulent l’affinité du domaine moteur vis-à-vis des microtubules. Figure préparée avec ViewerLite50.

Ces changements conformationnels, nécessaires à l’interaction avec les microtubules, n’ont pas encore été déterminés chez Eg5. A ce jour, seules les structures cristallographiques de la KRP Kif1A ont été résolues en présence de différents analogues nucléotidiques (Kikkawa *et al.*, 2001; Nitta *et al.*, 2004). La comparaison de ces données structurales a permis de localiser et d’identifier 3 zones de changements conformationnels au cours du cycle ATPasique (Figure 4A). Ces modifications vont concerner :

- la région « **switch I** » (boucle L9). En présence d’ADP, cette région adopte une structure en hélice α entourée de deux courtes boucles ; la transition ADP-ATP conduit à la formation d’un feuillet β (Figure 4B);
- la région « **switch II** » et son environnement proche (boucle L11, hélice α_4 , boucle L12, hélice α_5 et boucle L13). La transition ATP-ADP modifie considérablement la structure de la boucle L11. En présence d’ADP, une partie de L11 se structure en hélice α . La taille de l’hélice α_4 est ainsi augmentée et sa position est modifiée de 4 Å par rapport au nucléotide (Figure 4B). Le mouvement de l’hélice α_4 entraîne, simultanément, le déplacement dans l’espace des éléments L12/ α_5 /L13 (Figure 4A);

et la région **neck-linker** (feuillet $\beta 9$). La transition ADP-ATP modifie sa position par rapport à la région centrale de la KRP (Figure 4C).

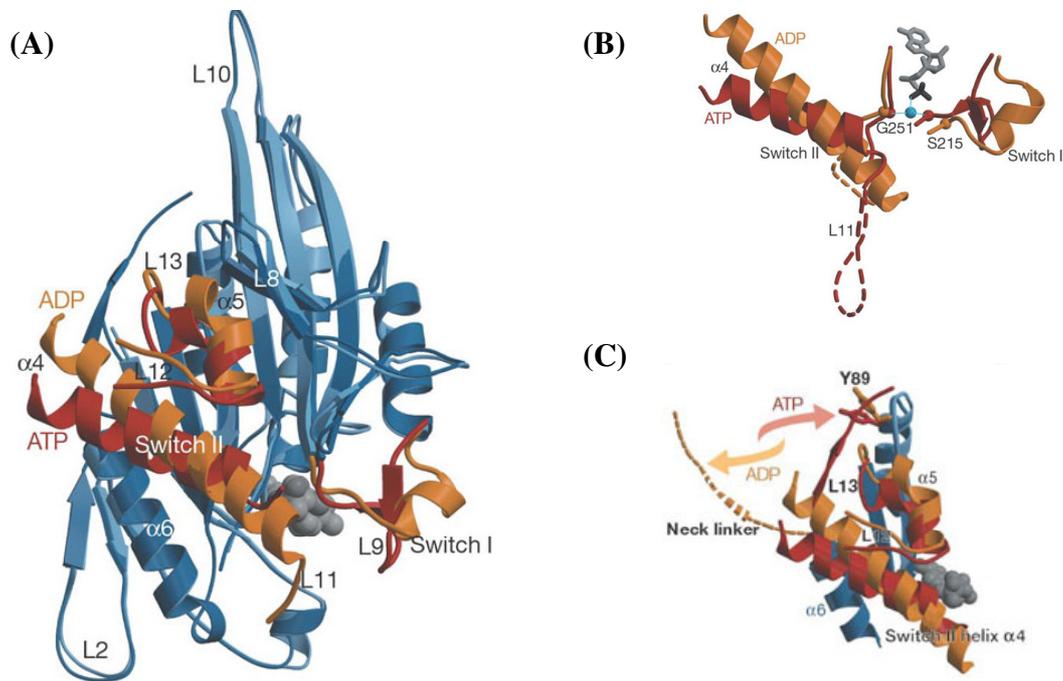


Figure 4 : Analyse structurale des modifications conformationnelles induites chez la KRP Kif1A lors de la transition ATP (rouge) / ADP (jaune). (A). Superposition des structures de Kif1A obtenues en présence d'ADP ou d'ATP. (B-C). Effets des transitions ATP-ADP sur : (B) les régions « switch I » et « switch II » ; (C) sur la position de la région neck-linker (Kikkawa *et al.*, 2001).

Le recoupement des données cristallographiques avec celles obtenues par cryomicroscopie électronique a permis de proposer un modèle d'interaction Kif1A-microtubules (Kikkawa *et al.*, 2000 ; Nitta *et al.*, 2004). Cette KRP utilise successivement les boucles L11 et L12 pour fixer les microtubules et moduler l'interaction lors du cycle ATPasique. Il est tentant d'imaginer que Eg5 contrôle son affinité aux microtubules d'une manière similaire à Kif1A. Cependant, seule la résolution des structures cristallographiques d'Eg5 en présence d'analogues nucléotidiques permettra de confirmer ou non cette hypothèse.

Eg5 dispose également d'une particularité structurale qui la différencie des autres domaines moteurs. Chez toutes les kinésines, l'hélice $\alpha 2$ est interrompue par une boucle de longueur variable (boucle L5). Eg5 dispose de la boucle la plus longue (Figure 3). La fonction de L5 est non connue ; celle-ci pourrait être impliquée dans la régulation du domaine moteur en interagissant avec d'autres protéines (Turner *et al.*, 2001). Enfin, la région « neck-linker » située en partie C-terminale va permettre d'attacher le domaine moteur au « coiled-coil »

(Figures 2 et 3). Cette dernière est arrimée perpendiculairement au domaine moteur d'Eg5 en présence d'ADP-Mg et joue un rôle important lorsque la force motrice est générée (Case *et al.*, 2000 ; Turner *et al.*, 2001).

2.2) Rôles cellulaires d'Eg5

Eg5 est nécessaire à deux événements mitotiques précoces : d'une part l'organisation des asters mitotiques et d'autre part la séparation des centrosomes lors de la formation du fuseau mitotique.

2.2.1) Formation des asters mitotiques

Eg5 participe à la formation des asters en partenariat avec le complexe dynéine-dynactine, la protéine NuMA et une seconde KRP de polarité négative, HSET (ou KifC1). (Gaglio *et al.*, 1996 ; Merdes et Cleveland, 1997 ; Mountain *et al.*, 1999). Lors de la formation des asters, la force générée par la dynéine et HSET est partiellement contrebalancée par Eg5. Les microtubules convergent ainsi de manière dynamique grâce à l'équilibre des forces qui s'établit entre les moteurs de polarité opposée (Figure 5A). Ce modèle proposé par l'équipe de Gaglio en 1996 a été validé *in vitro* grâce à des études d'immunodéplétion. La suppression d'un des trois moteurs modifie l'équilibre des forces antagonistes ce qui perturbe la formation des asters mitotiques. Cependant, les effets des immunodéplétions varient en fonction de la force motrice éliminée. Ainsi, la suppression de l'activité de HSET ou de la dynéine cytoplasmique inhibe complètement la formation des asters (Figure 5B). Inversement, l'immunodéplétion d'Eg5 modifie le degré de focalisation des microtubules au centre de l'aster (Figure 5C). De ce fait, les deux moteurs de polarité négative génèrent la force prédominante nécessaire à la formation des asters *in vitro*. Le rôle antagoniste joué par Eg5 est clairement mis en évidence lorsque la KRP est co-immunodéplétée avec HSET (Mountain *et al.*, 1999). L'élimination simultanée des deux moteurs permet de rééquilibrer la balance des forces nécessaires à la formation des asters (Figure 5D).

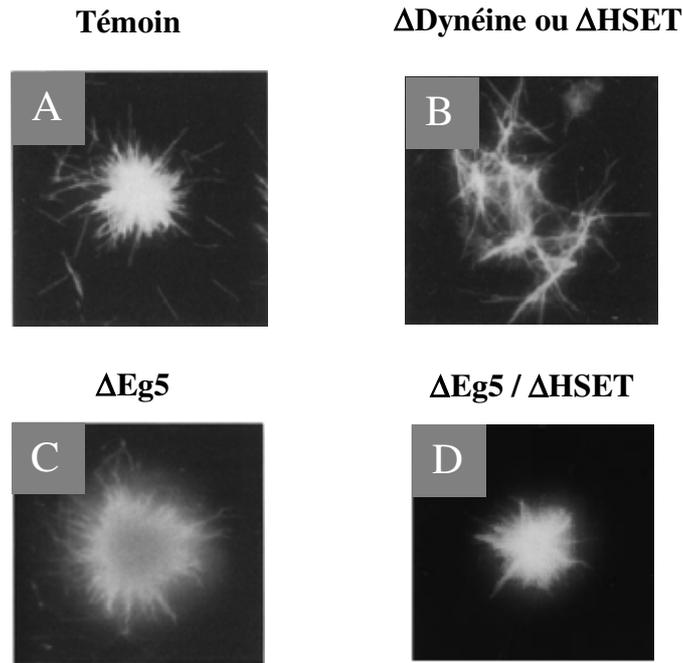


Figure 4 : Etude *in vitro* de la fonction des moteurs Eg5, HSET et de la dynéine cytoplasmique dans la formation des asters. **(A)**. Organisation générale d'un aster mitotique. Les microtubules (en blanc) sont focalisés au même point grâce à l'équilibre des forces qui s'établit entre Eg5, de polarité positive, et HSET/dynéine cytoplasmique de polarité négative. **(B)**. La déplétion de la dynéine ou d'HSET inhibe la formation des asters. **(C)**. En absence d'Eg5, les asters continuent à se former mais le degré de focalisation des microtubules est modifié (Gaglio *et al.*, 1996). **(D)**. La co-immunodéplétion de HSET et Eg5 permet de rééquilibrer les forces nécessaires à l'organisation des asters. (Mountain *et al.*, 1999).

Un tel système requière la synchronisation des différents protagonistes et donc des relations fonctionnelles étroites. Il est probable que ces protéines interagissent entre elles de manière à coordonner leur action. NuMA est ainsi capable de lier le complexe dynéine-dynactine et probablement la KRP HSET (Gaglio *et al.*, 1996; Mountain *et al.*, 1999). De même, Eg5 peut interagir *in vivo* avec la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine (Blangy *et al.*, 1997).

2.2.2) Fonction de bipolarisation cellulaire

Eg5 est également essentielle à la séparation des centrosomes lors de la formation du fuseau mitotique (Blangy *et al.*, 1995 ; Kapoor *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2005). Cette étape, dite de bipolarisation cellulaire, permet la mise en place du fuseau, structure nécessaire au partage équitable de l'information génétique (Wittmann *et al.*, 2001). Le fuseau est constitué de deux éléments structuraux : d'une part les microtubules et d'autre part les chromosomes (Figure 6). Les microtubules s'organisent en réseau antiparallèle avec leurs extrémités négatives accrochées aux centrosomes et leurs extrémités positives dirigées vers les

chromosomes ou le cytoplasme. Trois sous-populations de microtubules co-existent au niveau du fuseau (Figure 6) :

- les microtubules kinétochoriens (1) qui permettent de connecter les chromosomes au fuseau mitotique,
- les microtubules interpolaires (2) qui émergent des deux centrosomes et interagissent de manière antiparallèle afin de stabiliser la bipolarité du fuseau,
- et les microtubules astraux (3) qui, nucléés des centrosomes vers le cytoplasme, permettent d’orienter et de positionner le fuseau au niveau de la cellule.

Les chromosomes participent également à la mise en place du fuseau grâce au complexe protéique kinétochorien qui s’assemble au niveau des centrosomes (Wittmann *et al.*, 2001).

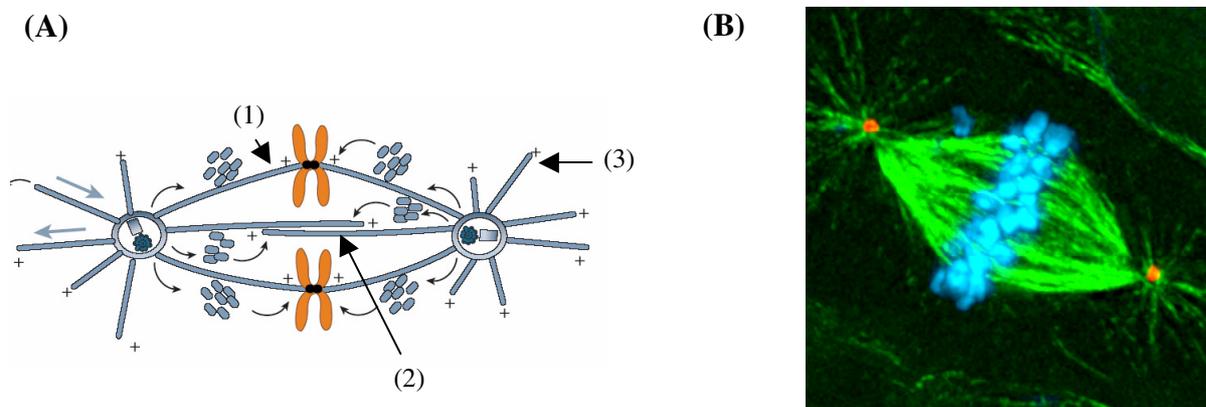


Figure 6 : Organisation générale du fuseau mitotique. (A). Le fuseau contient trois populations de microtubules : (1) les microtubules kinétochoriens associés aux chromosomes, (2) les microtubules interpolaires et (3) les microtubules astraux (Scholey *et al.*, 2003). (B). Cette photo prise en cours de métaphase montre les chromosomes (bleu) alignés au niveau de la plaque équatoriale ainsi que les deux centrosomes (rouge) qui délimitent les pôles cellulaires. Les microtubules (vert) rayonnent à partir des centrosomes et s’organisent pour former le fuseau (http://dms.dartmouth.edu/compton/photos/photos/html/Mitotic_spindle.html).

Le modèle moléculaire proposé pour expliquer la fonction d’Eg5 au cours de la séparation des centrosomes est directement lié à l’organisation générale de cette protéine. De par sa structure homotétramérique bipolaire, Eg5 est capable de fixer deux microtubules interpolaires antiparallèles nucléés à partir des centrosomes et de créer une zone de chevauchement (Figure 7). Grâce à sa polarité positive, Eg5 va faire glisser les deux microtubules en sens opposé. La force motrice, générée par hydrolyse de l’ATP, va permettre de séparer les centrosomes et de délimiter les pôles de la cellule en division (Walczak et Mitchison, 1996 ; Kashina *et al.*, 1997 ; Sharp *et al.*, 2000).

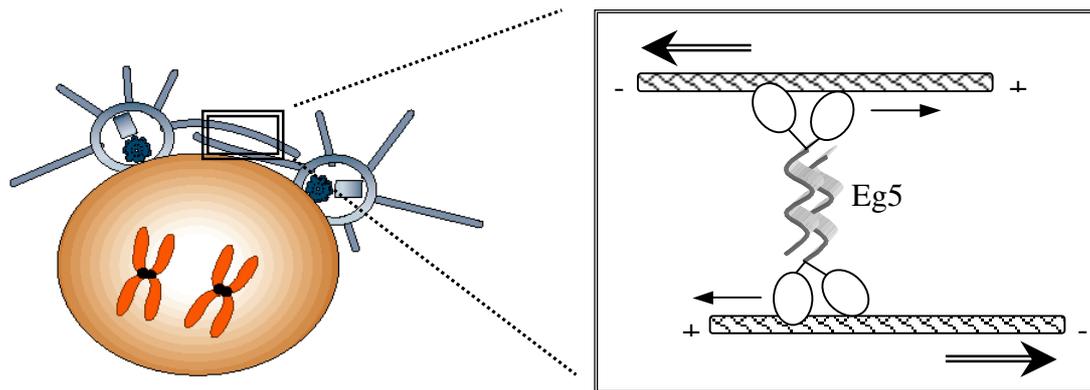


Figure 7 : Modèle moléculaire développé pour expliquer la fonction de bipolarisation de Eg5. La KRP crée une zone de chevauchement en fixant deux microtubules interpolaire antiparallèles nucléés à partir des centrosomes. Légende : sens de déplacement de la KRP le long des microtubules (→) ; sens de déplacement des microtubules interpolaire (⇒) (Kashina *et al.*, 1997 ; Scholey *et al.*, 2003).

Ce modèle moléculaire a été récemment confirmé *in vitro* grâce à des mesures de mobilité par glissement de surface (Kapitein *et al.*, 2005). Cette expérience, réalisée avec Eg5 de *Xenopus laevis*, montre que la kinésine est capable de créer des zones de chevauchement et de mettre en mouvement les microtubules de polarité opposée à une vitesse moyenne de 40 nm par seconde. Ce résultat n'est observé que si la kinésine est sous forme de tétramère ; l'utilisation de formes tronquées en position C-terminale (absence de tétramérisation) ne permet pas les interactions microtubules-microtubules ce qui prouve que la structure d'Eg5 est indispensable à la création des zones de chevauchement.

La KRP Eg5 ne semble pas être le seul moteur moléculaire impliqué dans la bipolarisation cellulaire. Des études menées *in vivo* sur des embryons de *Drosophila* et de *Xénope* révèlent que le mouvement des pôles est orchestré par, au moins, trois types de moteurs mitotiques (Walczak *et al.*, 1998 ; Sharp *et al.*, 1999) :

- un moteur bipolaire de polarité positive, en l'occurrence Eg5, qui crée les zones de chevauchement entre les microtubules,
- un moteur de polarité négative de la famille des KAR3 qui contrebalance la force générée par le moteur bipolaire,
- et un troisième moteur de polarité négative (la dynéine cytoplasmique) qui s'associe au cortex cellulaire grâce à la dynactine afin de positionner et maintenir les pôles *via* ses interactions avec les microtubules astraux.

Il est probable qu'un tel système existe au niveau des cellules de mammifère. La KRP HSET (ou KifC1) est en effet capable de créer des zones de chevauchement entre les microtubules et peut probablement opposer son activité à celle d'Eg5. Néanmoins, la fonction d'HSET est sujette à discussion. Les travaux menés par Mountain *et al.*, penchent en faveur d'une relation antagoniste entre HSET et Eg5 lors de la formation du fuseau (Mountain *et al.*, 1999). L'absence d'HSET *in cellulo* ne perturbe ni la formation, ni la maintenance du fuseau mitotique dans les cellules HeLa. Le même résultat est observé si Eg5 et HSET sont éliminées simultanément alors que l'immunodéplétion d'Eg5, seule, inhibe la séparation des centrosomes. La perte des deux moteurs permet ainsi de rééquilibrer la balance des forces motrices nécessaire à la bipolarisation ; ce résultat sous-entend que la séparation des centrosomes requière une force additionnelle à celle de HSET et Eg5.

Inversement, les travaux de Zhu *et al.*, montrent que HSET n'oppose pas son activité motrice à Eg5 lors de la séparation des centrosomes (Zhu *et al.*, 2005). Contrairement à l'immunodéplétion, l'élimination de HSET par injection d'ARNm antisens perturbe la division des cellules HeLa et conduit à la formation d'un fuseau mitotique multipolaire (Figure 8).

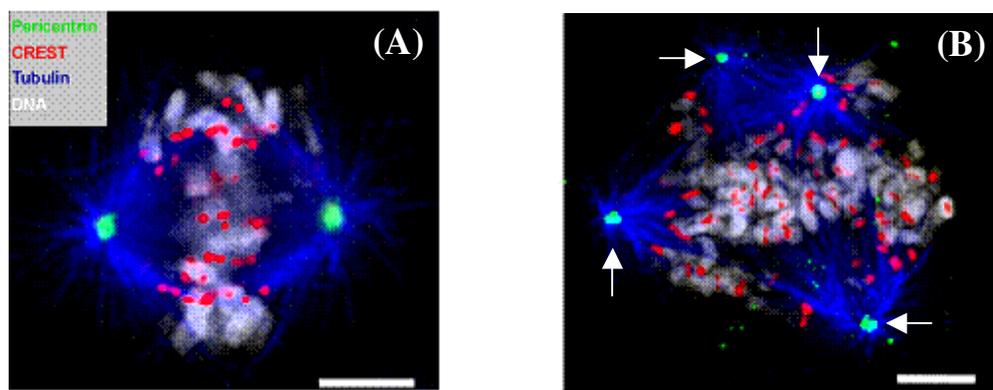


Figure 8 : Effet de la déplétion d'HSET par injection d'ARNm antisens sur la formation du fuseau mitotique. (A). Cellule HeLa non traitée montrant la structure normale du fuseau mitotique bipolaire. Les centrosomes sont colorés en vert, les centromères en rouge, les chromosomes en blanc et la tubuline en bleu. (B). La déplétion d'HSET entraîne la formation d'un fuseau mitotique multipolaire. Quatre pôles distincts sont visualisés au niveau de la cellule HeLa traitée (flèches blanches). L'alignement et la distribution des chromosomes se trouvent également perturbés en absence de HSET (Zhu *et al.*, 2005).

La KRP HSET ne perturbe donc pas l'étape de séparation des centrosomes mais modifie l'organisation des pôles de la cellule. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse suivante : HSET n'exerce pas d'activité antagoniste à Eg5 mais permet de maintenir les interactions microtubules / centrosomes. HSET serait ainsi capable de se déplacer vers l'extrémité

négative des microtubules nucléés à partir des centrosomes afin de stabiliser les pôles du fuseau.

Malgré cette divergence, ces auteurs s'accordent parfaitement sur un point : Eg5 est indispensable à la séparation des centrosomes lors de la mise en place du fuseau mitotique.

2.2.3) Fonction post-mitotique ?

Certaines études suggèrent également une fonction post-mitotique de Eg5. Néanmoins, les rôles joués par Eg5 dans les phases tardives de la mitose sont sujets à discussion. A ce jour, seuls les travaux de Whitehead et Rattner penchent en cette faveur (Whitehead et Rattner, 1998). Pour étayer leurs hypothèses, ces auteurs se basent sur des études d'immunodéplétion ainsi que sur la distribution complexe d'Eg5 au cours du cycle cellulaire. Lors de la division, la KRP est localisée au niveau des centrosomes en prophase, puis au niveau des microtubules du fuseau en prométaphase. En anaphase, la protéine est détectée au niveau de la plaque équatoriale et se trouve incorporée au niveau du pont intracellulaire pendant la télophase. Enfin, lors de la cytokénèse, Eg5 est associée aux microtubules nucléés à partir des centrosomes post-mitotiques (Mack et Rattner, 1993 ; Whitehead *et al.*, 1996). Ainsi, Eg5 participerait à deux évènements post-mitotiques :

- à la **migration des centrosomes**. Avant l'étape de cytokénèse, les centrosomes sont répartis au niveau des cellules filles et se positionnent à proximité du pont intracellulaire. Ce mouvement nécessite la formation d'un réseau microtubulaire, dit 'en queue de comète', au niveau des centrosomes. L'inhibition d'Eg5 (en métaphase) modifie la position des centrosomes dans les cellules filles. Ainsi, Eg5 serait nécessaire à la stabilisation du réseau microtubulaire 'en queue de comète' et donc, indirectement, au mouvement des centrosomes post-mitotiques ;
- au **positionnement de l'appareil de Golgi**. En réalité Eg5 ne serait pas directement impliquée dans la répartition de l'appareil de Golgi. Les études de Whitehead et Rattner montrent que le déplacement du Golgi est étroitement lié à la migration des centrosomes post-mitotiques. L'inhibition de Eg5 interfèrerait ainsi sur la position de l'appareil de Golgi en perturbant la localisation des centrosomes.

2.3) Régulation d'Eg5 au cours du cycle cellulaire

Comme décrit précédemment, la distribution d'Eg5 varie considérablement au cours du cycle cellulaire. Essentiellement cytoplasmique en interphase, Eg5 se localise au niveau des pôles et du fuseau mitotique lors de la division. La localisation d'Eg5 est donc régulée au cours du cycle cellulaire et dépend de l'état de phosphorylation de la région « BimC box » au niveau C-terminal (Blangy *et al.*, 1995, Sawin et Mitchison, 1995 ; Walczak et Mitchison, 1996 ; Drummond et Hagan, 1998). Le « BimC box », long d'une quarantaine de résidus, est commun à l'ensemble des KRP et contient la séquence consensus hautement conservée $^{924}\text{TGxTPxK}^{931}/\text{RR}$ où x est un acide aminé quelconque. Lors de la mitose, la thréonine 927 ($^{924}\text{TGx}\underline{\text{T}}\text{PxK}^{931}/\text{RR}$) est phosphorylée et permet le recrutement d'Eg5 au niveau du fuseau mitotique (Blangy *et al.*, 1995). Cette réaction peut être réalisée *in vitro* par p34^{cdc2} et il est probable que cette kinase joue le même rôle *in vivo*. En effet, la séquence consensus du « BimC Box » contient le motif de phosphorylation reconnu par la kinase p34^{cdc2} (S/TPxK/R).

Trois modèles ont été développés afin de comprendre le rôle de cette phosphorylation sur la distribution *in vivo* d'Eg5 (Walczak et Mitchison, 1996). La phosphorylation permettrait, par exemple, de réguler la tétramérisation de la kinésine (Figure 8A). Dans ce cas de figure, seul le tétramère peut fixer les microtubules et Eg5 existe sous forme de dimère dans le cytoplasme. Autre possibilité : la phosphorylation régule directement l'interaction Eg5 / microtubules en jouant sur la structure des domaines moteurs (Figure 8B). Dans ce modèle, Eg5 est sous forme homotétramérique dans le cytoplasme mais la conformation des 4 domaines moteurs est non favorable à l'interaction avec les microtubules. La phosphorylation du «BimC Box » permettrait ainsi de repositionner les domaines moteurs par le biais de modifications conformationnelles. Dans le dernier modèle, la phosphorylation permettrait de réguler l'interaction entre Eg5 et certains constituants du fuseau mitotique (Figure 8C). La fixation de la kinésine se ferait alors par le biais de « protéines relais » (ou points d'ancrage) associées au fuseau. Eg5 est en effet capable de fixer la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine et cette interaction est favorisée lorsque Eg5 est phosphorylée, *in vitro*, par p34^{cdc2} (Blangy *et al.*, 1997).

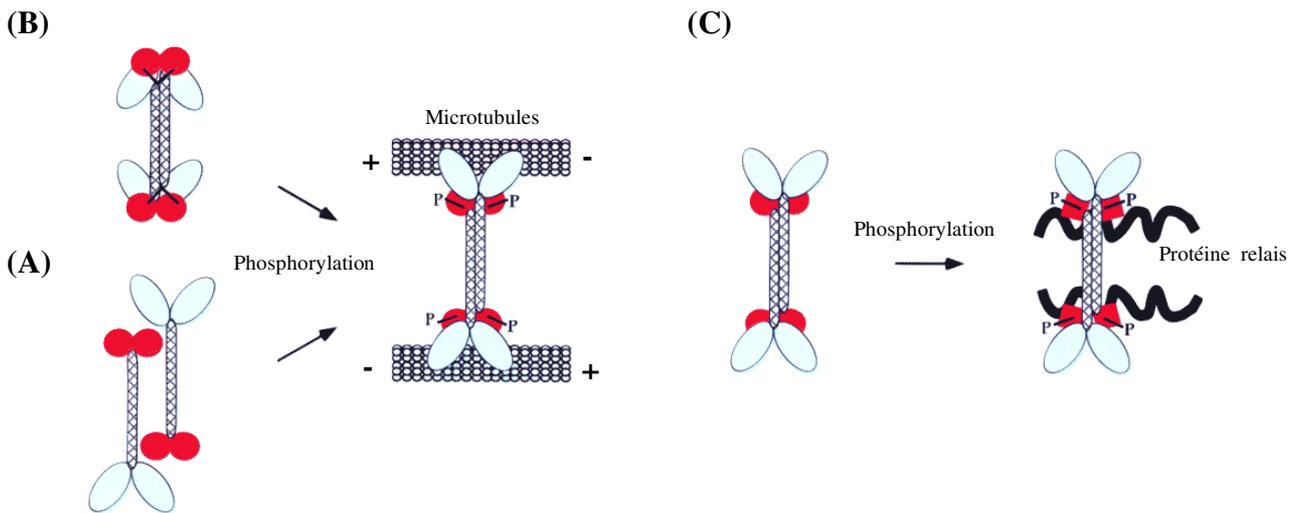


Figure 8 : Modèles proposés pour expliquer la régulation de l'activité d'Eg5 au cours du cycle cellulaire. La phosphorylation de la thréonine 927 du « BimC box » pourrait : **(A)** réguler la tétramérisation ; **(B)** permettre de repositionner les domaines moteurs par le biais de modifications conformationnelles ; **(C)** réguler l'interaction de la kinésine avec des constituants du fuseau (Walczack et Mitchison, 1996).

III) Etude de l'inhibition de la KRP Eg5

3.1) Le fuseau mitotique : cible privilégiée dans le traitement des cancers

Les microtubules constituent avec les chromosomes les éléments structuraux de base du fuseau mitotique. Ces polymères dynamiques de tubuline (α et β) oscillent entre des cycles de polymérisation et de dépolymérisation par ajout ou perte de tubuline à leurs extrémités. Cette propriété d'assemblage-désassemblage hors équilibre, appelée instabilité dynamique, est nécessaire à l'organisation et à la fonction du fuseau mitotique (Arnal *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2004). L'instabilité dynamique des microtubules dépend de la vitesse de polymérisation / dépolymérisation mais également de la fréquence des facteurs « catastrophes » (transition polymérisation-dépolymérisation) et « sauvetages » (transition dépolymérisation-polymérisation). La cellule est capable de moduler son cytosquelette au cours du cycle cellulaire en jouant sur les cinétiques d'assemblage-désassemblage. Ainsi, en interphase (phases G1, S et G2), les microtubules apparaissent longs, stables et servent d'« autoroutes » pour le transport de vésicules, de protéines ou d'organelles. Inversement, l'entrée en mitose s'accompagne d'un réarrangement structural drastique ; les microtubules interphasiques sont démantelés puis réassemblés en réseau microtubulaire plus court et dynamique pour former le fuseau mitotique. Cette propriété d'instabilité hors équilibre est donc indispensable à la

transition interphase / mitose et va permettre l'assemblage et le maintien de la taille du fuseau au cours de la division (Arnal *et al.*, 2002).

Les microtubules sont la cible de nombreux agents antimitotiques. Ces composés interfèrent sur les paramètres d'instabilité dynamique en favorisant soit la polymérisation (agents stabilisateurs), soit la dépolymérisation (agents déstabilisateurs). Les cellules ainsi traitées restent bloquées en mitose car le fuseau mitotique n'est plus capable de se former ou d'assurer sa fonction dans la ségrégation des chromosomes. Un des agents stabilisateurs les plus connus est le Paclitaxel (Taxol®). Découverte en 1971, cette molécule naturelle extraite de l'écorce d'if (*Taxus brevifolia*) favorise la transition dépolymérisation / polymérisation en se fixant sur la tubuline β et stoppe la progression des cellules en prométaphase avec un fuseau mitotique anormal (Snyder *et al.*, 2004). Ce composé est particulièrement efficace dans le traitement clinique des cancers du sein, des ovaires et des poumons. Les agents déstabilisateurs sont également employés dans les thérapies anticancéreuses. Les *vinca*-alcaloïdes, comme la vincristine et la vinblastine, permettent le traitement des leucémies lymphocytaires aiguës. Ces molécules conduisent à une dépolymérisation excessive du fuseau et à un arrêt mitotique (pour revue Altmann, 2001 ; Peterson et Mitchison, 2002 ; Checchi *et al.*, 2003).

Malgré leur succès clinique, deux problèmes font suite à l'utilisation de ces agents thérapeutiques : d'une part l'apparition **d'effets secondaires** et d'autre part l'émergence de **cellules cancéreuses résistantes**. Les microtubules jouent un rôle capital dans les cellules en division mais également dans les cellules quiescentes (phase G0) et les neurones où ils participent au transfert de l'influx nerveux. De ce fait, l'utilisation de ces agents est source de neuropathies périphériques qui entraînent l'arrêt provisoire des traitements (Cavaletti *et al.*, 1997). L'apparition de résistances aux taxanes et *vinca*-alcaloïdes représente, de loin, le problème clinique le plus sérieux. Trois mécanismes de résistance ont été identifiés au niveau des cellules cancéreuses :

- la sur-expression de la protéine MDR (MultiDrug Resistance). Produit du gène de résistance *mdr1*, cette glycoprotéine-P (gp-P) est une pompe transmembranaire de 170 kDa capable d'éjecter du cytoplasme cellulaire aussi bien les taxanes que les *vinca*-alcaloïdes (Krishna et Mayer, 2000) ;

- la mutation des sous-unités α et/ou β de la tubuline. Ces modifications, bien souvent ponctuelles, altèrent les sites de fixation des agents antimitotiques (pour revue Burkhart *et al.*, 2001) ;
- la modification du rapport d'expression des différents isotypes de tubulines. Les sous-unités de la tubuline existent sous de multiples iso-formes et les rapports d'expression varient en fonction des types cellulaires. En modifiant ces rapports, la cellule cancéreuse modifie la composition des microtubules ce qui peut diminuer l'affinité des molécules thérapeutiques.

Pour contrer ces phénomènes d'acquisition de résistance, deux approches alternatives sont actuellement explorées. La première a pour objectif de découvrir de nouvelles molécules et / ou de modifier les agents existants afin de shunter les mécanismes de défense mis en place par la cellule cancéreuse (pour revue Wood *et al.*, 2001). La seconde consiste à changer les cibles thérapeutiques. A ce jour, 3 classes de protéines ont été identifiées (pour revue Miyamoto *et al.*, 2003) : (1) les effecteurs impliquées dans la régulation de l'instabilité dynamique des microtubules (cas du facteur catastrophe Op18) ; (2) les protéines kinases qui contrôlent la progression de la mitose (exemples : Aurora, Bub, Polo) ; (3) les moteurs moléculaires mitotiques (Figure 10).

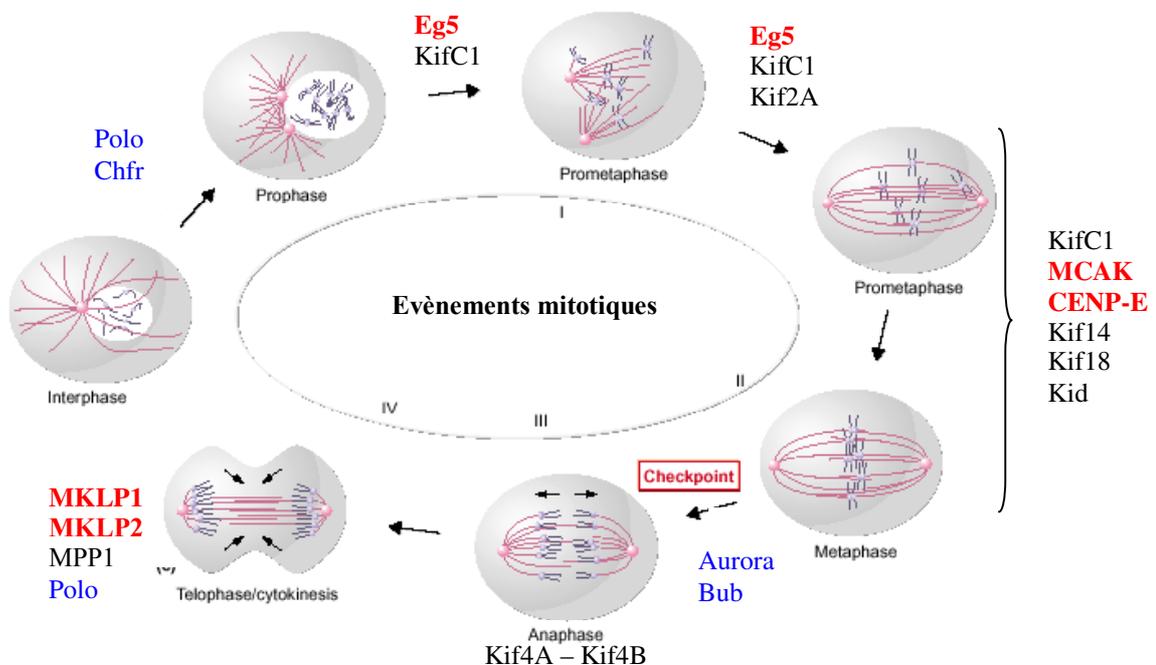


Figure 10 : Identification des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles du cycle cellulaire. Les kinésines qui bloquent la progression mitotique lors de leur inhibition sont indiquées en rouge. Les protéines kinases nécessaires au contrôle du cycle sont en bleu (Figure adaptée de Wood *et al.*, 2001).

3.2) Eg5, nouvelle cible du fuseau mitotique

Les kinésines participent activement à l'ensemble des événements mitotiques et représentent une alternative potentielle pour lutter contre la prolifération cellulaire (Figure 10). Parmi ces moteurs mitotiques, Eg5 est la cible la plus étudiée du fait de sa fonction dans la formation du fuseau mitotique et de la découverte d'inhibiteurs spécifiques. Comme décrit précédemment, cette KRP joue un rôle fondamental dans la bipolarisation cellulaire. La suppression de la fonction d'Eg5 bloque les cellules en pré-métaphase avec un fuseau monoastral caractéristique constitué des deux centrosomes non séparés entourés d'une rosette de chromosomes et de microtubules (Figure 11) (Blangy *et al.*, 1995). Le maintien de ce phénotype provoque alors l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique (transition métaphase-anaphase : vérification de l'alignement des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale) et conduit à la mort cellulaire programmée (Leizerman *et al.*, 2004 ; Tao *et al.*, 2005).

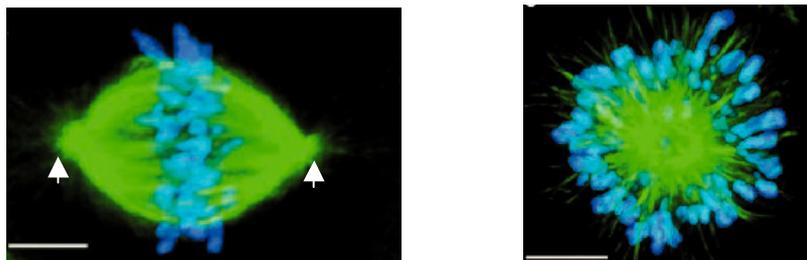


Figure 11 : Effet de la suppression de l'activité d'Eg5 sur la formation du fuseau mitotique. **(A)**. Organisation générale du fuseau mitotique lors de la métaphase. Les deux centrosomes (flèches blanches) délimitent les pôles de la cellule en division. Les chromosomes (bleu) sont alignés au niveau de la plaque équatoriale; les microtubules du fuseau sont colorés en vert. **(B)**. L'inhibition d'Eg5 perturbe la séparation des centrosomes et bloque les cellules en pré-métaphase avec un fuseau mitotique monoastral caractéristique. Le maintien de ce phénotype déclenche le cycle apoptotique (Mayer *et al.*, 1999).

Eg5 est également régulée au cours du cycle cellulaire par le biais de phosphorylations / déphosphorylations au niveau du « BimC box ». Cette protéine est uniquement activée dans les cellules en division et son inhibition n'affecte pas les cellules quiescentes. De même, Eg5 est absente des neurones post-mitotiques du système nerveux central humain (Sakowicz *et al.*, 2004) ; contrairement aux agents qui ciblent la tubuline, la perte de Eg5 ne doit pas perturber le passage de l'influx nerveux (absence d'effets secondaires de type neuropathies périphériques). Cependant, des études récentes montrent que la KRP Eg5 est exprimée au niveau des neurones post-mitotiques de rat et de souris. Son inactivation accélère *in vitro* la vitesse de croissance des axones et des dendrites sans autres effets notoires, contrairement aux taxanes et *vinca*-alcaloïdes (Haque *et al.*, 2004 ; Yoon *et al.*, 2005). De plus, la suppression

de l'activité d'Eg5 permet de lever *in vitro* la résistance au taxol induite par la sur-expression de la protéine MDR (Marcus *et al.*, 2005).

Eg5 est donc une cible particulièrement intéressante qui permet de stopper la prolifération cellulaire tout en s'affranchissant des problèmes cliniques rencontrés avec les inhibiteurs des microtubules.

3.3) Inhibiteurs du domaine moteur d'Eg5

A ce jour, une dizaine d'inhibiteurs d'Eg5 ont été identifiés par criblage phénotypique et/ou d'activité (pour revue Bergnes *et al.*, 2005). Ces molécules ciblent spécifiquement le domaine moteur de la kinésine et bloquent aussi bien l'activité ATPasique basale que stimulée par les microtubules. Cette partie est consacrée aux différents inhibiteurs d'Eg5 et à leur mode d'action. Une de ces molécules (l'ispinesib) identifiée par les laboratoires Cytokinetics, est actuellement en phase d'essais cliniques II.

3.3.1) Le monastrol

Premier inhibiteur spécifique d'Eg5 découvert par criblage phénotypique (Mayer *et al.*, 1999), le monastrol est un hétérocycle de la famille des dihydropyrimidines obtenu par cyclo-condensation de Biginelli (Figure 12). Cette molécule chimique bloque les cellules en pré-métaphase avec un fuseau mitotique monoastrol caractéristique, sans affecter la réplication des centrosomes, l'organisation de l'appareil de Golgi et le transport cellulaire (Kapoor *et al.*, 2000). Ces caractéristiques observées *in cellulo* ont immédiatement présenté Eg5 comme la cible potentielle du monastrol.

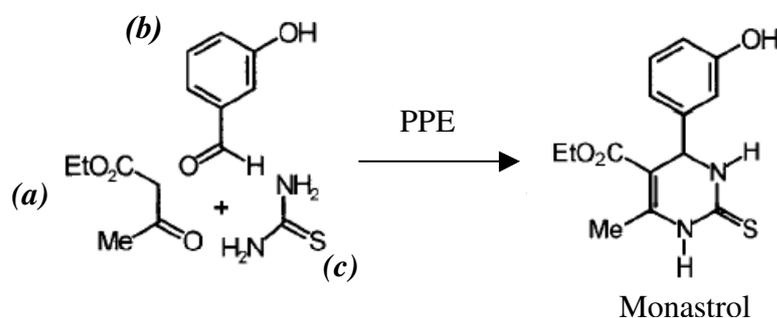


Figure 12 : Synthèse chimique du monastrol par cyclo-condensation de Biginelli à partir : (a) d'acétoacétate d'éthyl, (b) de 3 hydroxybenzaldéhyde et (c) de thiourée. PPE : Polyphosphate ester (Kappe *et al.*, 2000).

Le monastrol interagit spécifiquement avec le domaine moteur d'Eg5 (DeBonis *et al.*, 2003) et inhibe aussi bien l'activité ATPasique basale ($K_i = 5.0 \mu\text{M}$) que stimulée (Maliga *et*

al., 2002 ; Cochran *et al.*, 2005). Les études réalisées par Luo *et al.*, montrent que l'inhibition est incompétitive par rapport à l'ATP et de type mixte « competitive-like » par rapport aux microtubules (Luo *et al.*, 2004). La fixation du monastrol sur Eg5 est améliorée d'un facteur 30 lorsque la kinésine est complexée aux microtubules. L'inhibition de l'activité ATPasique stimulée est donc indirectement liée à la force ionique puisque l'interaction Eg5-microtubules est dépendante de la concentration en sel. De même, l'affinité du monastrol est modulée en fonction du nucléotide présent dans le site catalytique. L'inhibiteur se fixe préférentiellement sur le complexe Eg5-ADP en présence ou en absence de microtubules (Luo *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données montre que le monastrol dispose de son propre site de fixation sur Eg5. Ce résultat a été confirmé *via* la résolution à 1.9 Å de la structure cristallographique du complexe ternaire Eg5-ADP-monastrol (Yan *et al.*, 2004). La fixation du monastrol induit la formation d'une poche allostérique entre les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et la boucle L5 (Figure 13A). La création de ce site situé à 12 Å du site catalytique nécessite un mouvement important de L5 ; la chaîne latérale du résidu Trp127 est déplacée de 10 Å vers le cœur de la protéine afin de verrouiller la poche allostérique en partenariat avec les résidus Arg119 et Tyr211 (Figures 13B,C).

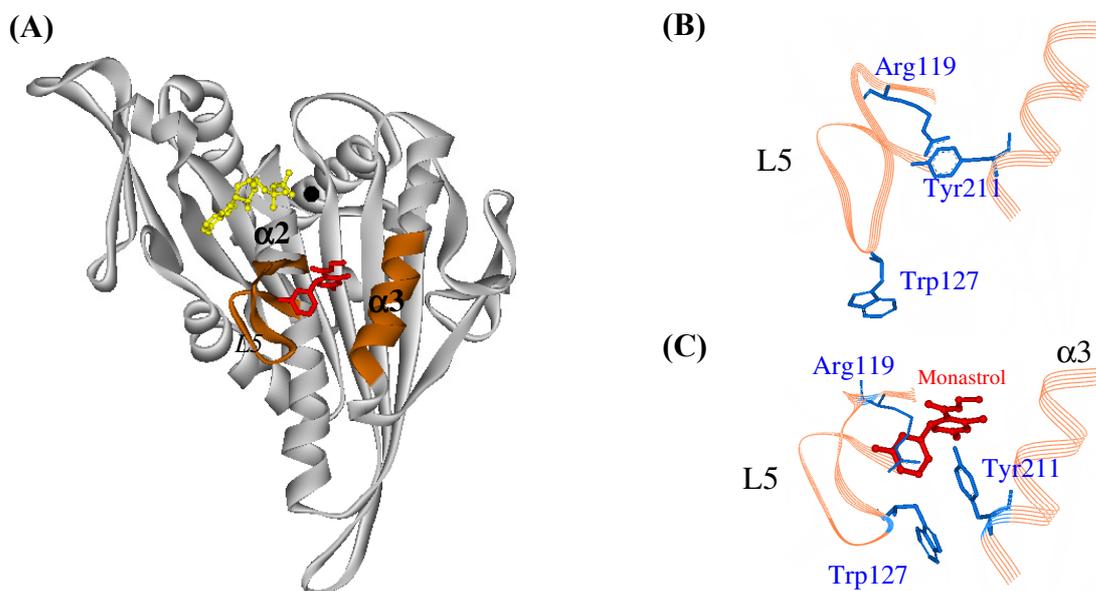


Figure 13 : Structure cristallographique du complexe ternaire Eg5-ADP-monastrol résolue à 1.9 Å. (A). La fixation du monastrol (en rouge) induit la formation d'une poche allostérique (orange) localisée à 12 Å du site ATPasique. La molécule d'ADP est colorée en jaune (Yan *et al.*, 2004). (B,C). La création de la poche modifie la position de la boucle L5. Le mouvement de la chaîne latérale du résidu Trp127 permet de verrouiller le site de l'inhibiteur avec les résidus Arg119 et Tyr211. Figures préparées avec ViewerLite50. Le mouvement des chaînes latérales des résidus Arg119 et Tyr211 permet également d'accommoder l'espace pour l'inhibiteur au sein du site allostérique. Ces modifications conformationnelles ne se limitent pas au lieu de fixation de l'inhibiteur mais vont également

concerner les régions « switch I », « switch II », et le neck-linker. En présence de monastrol, la structure de la région « switch I » passe d'une boucle à une courte hélice α et opère un déplacement de 6 Å en direction du site allostérique (Figure 14). De même, l'espace en « V » délimité par les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de la région « switch II » est ouvert de 20° par déplacement de l'hélice $\alpha 4$. L'espace ainsi créé permet au neck-linker de se positionner contre l'hélice $\alpha 5$ via une rotation de 120° (Figure 14).

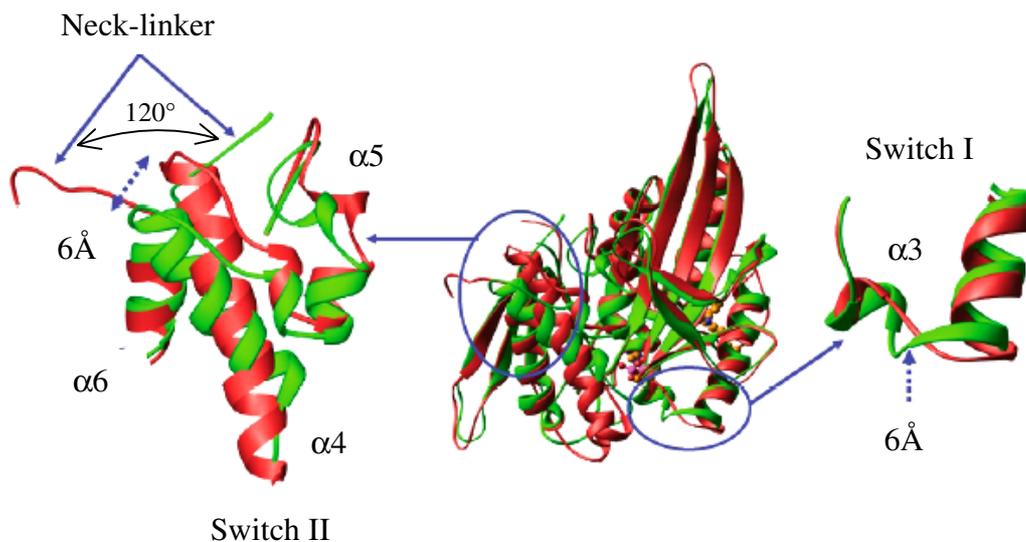


Figure 14 : Comparaison des conformations adoptées par les régions « switch I », « switch II » et le neck-linker en absence (rouge) et en présence (vert) de monastrol (Yan *et al.*, 2004).

Néanmoins le mécanisme d'inhibition d'Eg5 par le monastrol reste à élucider. Les études réalisées par « Mant-ADP release » révèlent que le monastrol bloque l'activité ATPasique en séquestrant l'ADP au niveau du site catalytique (Maliga *et al.*, 2002 ; DeBonis *et al.*, 2003). Cependant la fixation du monastrol n'altère pas la conformation du site ATPasique même si les régions « switch » sont modifiées (Yan *et al.*, 2004). Comment le monastrol est-il capable d'inhiber l'activité ATPasique sans interférer directement sur le site catalytique ? Un des éléments de réponse provient de la structure cristallographique du complexe ternaire. En absence de monastrol, la boucle L5 est une des parties les plus flexibles d'Eg5 ; inversement, cette boucle devient inflexible après fixation de l'inhibiteur (Figures 13B,C). Ainsi le monastrol induit la formation d'une poche allostérique rigide, ce qui modifie localement la flexibilité conformationnelle du domaine moteur. Les transitions ATP-ADP nécessaires au cycle ATPasique requièrent certaines modifications structurales. Il est supposé que le monastrol bloque Eg5 dans une conformation non favorable à la libération de l'ADP en modifiant localement le degré de rigidité de la protéine. La stabilisation du complexe Eg5-

ADP par le monastrol devrait également modifier l'affinité de la kinésine pour les microtubules car : (1) la forme Eg5-ADP est la moins favorable à l'interaction kinésine-microtubules ; (2) la région « switch II » est supposée être impliquée dans la fixation des microtubules (Kikkawa *et al.*, 2001). Paradoxalement, le monastrol ne dissocie pas le complexe Eg5-microtubules (Kapoor *et al.*, 2000) et ne semble pas empêcher cette interaction *in vitro*. Toutefois la force de cohésion qui s'établit entre la kinésine et les microtubules est diminuée lorsque l'inhibiteur est présent (Crevel *et al.*, 2004).

Les études récentes publiées par l'équipe de Cochran *et al.*, modifient les données précédemment établies sur l'inhibition d'Eg5 par le monastrol (Cochran *et al.*, 2005). D'après leurs résultats, la fixation du monastrol n'inhibe pas la libération d'ADP du site catalytique mais la ralentit. Le modèle moléculaire d'inhibition qu'ils proposent est assez surprenant. La fixation du monastrol stabiliserait la conformation Eg5-ATP en favorisant la re-synthèse d'ATP juste après son hydrolyse. Il est ainsi supposé que la conformation adoptée par Eg5 en présence du monastrol est thermodynamiquement favorable à la re-synthèse de l'ATP bien que ce mécanisme ne soit pas clairement compris.

Depuis sa découverte, le monastrol a été utilisé afin d'étudier les mécanismes de formation du fuseau mitotique *in cellulo* (Kapoor *et al.*, 2000) et d'évaluer le potentiel d'Eg5 en tant que cible anti-cancéreuse (Leizerman *et al.*, 2004 ; Haque *et al.*, 2004 ; Yoon *et al.*, 2005). La spécificité du monastrol vis à vis de cette KRP semble provenir de la boucle L5 qui est, de par sa longueur, une caractéristique unique de Eg5 (DeBonis *et al.*, 2003, Yan *et al.*, 2004). De même, l'énantiomère (S) du monastrol apparaît plus actif que la forme (R) (DeBonis *et al.*, 2003) et la position de la fonction hydroxyle portée par le noyau phénolique joue un rôle important dans l'interaction Eg5-monastrol (Kapoor *et al.*, 2000). Cette fonction permet d'établir un pont hydrogène avec le groupement carboxylique de la liaison peptidique du résidu Glu118 (Cox *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données a permis le développement d'analogues du monastrol plus performants comme le diméthylénastrolone (Gartner *et al.*, 2005). Ce composé est 100 fois plus efficace *in vitro* et *in cellulo* que le monastrol et peut-être considéré comme un agent thérapeutique potentiel.

3.3.2) Dérivés des quinazolinones : cas du composé CK0106023

Les quinazolinones ont été identifiées par la société pharmaceutique Cytokinetics comme des inhibiteurs potentiels de Eg5 (Finer *et al.*, 2001). L'optimisation chimique de ces molécules a permis de développer des dérivés extrêmement performants comme le composé CK0106023 (Sakowicz *et al.*, 2004) (Figure 15A). Cette molécule inhibe *in vitro* l'activité ATPasique d'Eg5 avec un K_i de 12 nM (pour référence $K_{i, \text{monastrol}} = 5.0 \mu\text{M}$) et bloque la progression des cellules HeLa en pré-métaphase avec un fuseau mitotique monoastral (Figure 15B).

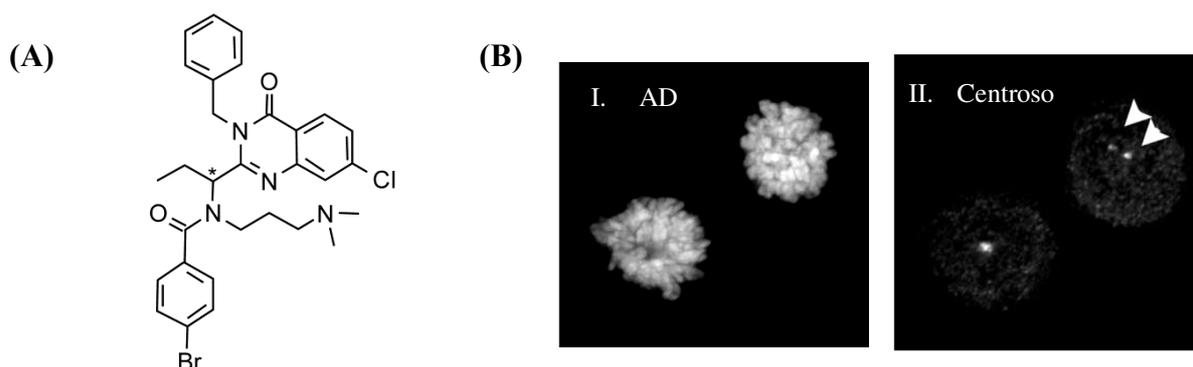


Figure 15 : (A). Structure du composé CK0106023. Le centre chiral est indiqué par l'astérisque. (B). Effet du composé CK0106023 sur la division de cellules HeLa. Le traitement des cellules avec $1\mu\text{M}$ de CK0106023 pendant 24h bloque les cellules en pré-métaphase avec un fuseau monoastral. Les centrosomes (pointes blanches) ne sont pas séparés et s'entourent d'une rosette de chromosomes caractéristique (Sakowicz *et al.*, 2004).

Le composé CK0106023 inhibe spécifiquement l'activité d'Eg5 en ralentissant la libération d'ADP sans perturber l'hydrolyse de l'ATP, la libération de phosphate inorganique et la formation du complexe Eg5-microtubules (Sakowicz *et al.*, 2004). Bien que le site de fixation de cet inhibiteur ne soit toujours pas identifié, les résultats de cette étude suggèrent que CK0106023 dispose de son propre site d'interaction sur le domaine moteur (inhibiteur allostérique). Ce dérivé est en effet incompétitif par rapport à l'ATP et non-compétitif par rapport aux microtubules. Au même titre que le monastrol, CK0106023 possède un centre chiral (Figure 15A). Parmi ces deux énantiomères la forme (R) est plus active *in vitro* (facteur 1000) et *in cellulo* (facteur 100) que la forme (S), à l'inverse du monastrol.

CK0106023 dispose également d'une forte activité anti-mitotique *in vitro* vis-à-vis de lignées cellulaires cancéreuses humaines et permet d'inhiber efficacement la prolifération de plusieurs cellules tumorales multi-résistantes (Tableau 1). Ces résultats ont conduit aux essais *in vivo* de ce composé sur des souris nudes portant des xénogreffes de carcinome ovarien

humain SKOV3. Une dose de 25 mg/kg de CK0106023, correspondant à la moitié de la dose maximale tolérée (DMT), induit une réponse similaire au paclitaxel lorsque ce dernier est utilisé à sa DMT (inhibition de 71% de la croissance des tumeurs). Les analyses histologiques des tumeurs traitées révèlent que l'inhibition de la croissance cellulaire est principalement due à la perte de la fonction de Eg5 ; les cellules cancéreuses stoppées en pré-métaphase ont toutes un fuseau mitotique monoastral.

Tableau 1 :
Inhibition de la prolifération de lignées cellulaires tumorales humaines par le composé CK0106023 (Sakowicz *et al.*, 2004).

Lignées cellulaires	¹ GI ₅₀ (nM)	Type de tumeur/cellules
SKOV3	126 ± 26	Carcinome ovarien
A27080	191 ± 47	Carcinome ovarien
A549	238 ± 77	Carcinome pulmonaire
HT29	533 ± 135	Carcinome du colon
SF-268	297 ± 51	Système nerveux central
A2780ADR	517 ± 127	Carcinome ovarien multi-résistant
NCI/ADR-RES	582 ± 73	Cellules multi-résistantes
HCT15	295 ± 68	Carcinome du colon multi-résistant

¹ GI₅₀ : concentration nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire.

A l'heure actuelle, les dérivés des quinazolinones sont considérés comme les inhibiteurs les plus prometteurs d'Eg5. Ainsi le composé SB-715992 (Ispinesib) est actuellement en phase d'essais clinique II pour les cancers du sein, des ovaires et du poumon ; cette molécule est également en phase d'essais clinique I en association avec la capecitabine (analogue nucléotidique utilisé dans le traitement des cancers multi-résistants). De même, un autre dérivé des quinazolinones, noté SB-743921, vient d'entrer en phase d'essais cliniques I aux Etats-Unis (<http://www.clinicaltrials.gov>).

3.3.3) Le S-trityl-cystéine

Le S-trityl-l-cystéine (STLC) a été identifié par analyse informatique grâce à l'algorithme COMPARE (Paull *et al.*, 1992). L'étude a été réalisée sur 7000 molécules sélectionnées et classées par le NCI en fonction de leurs effets sur la prolifération cellulaire de 60 lignées tumorales humaines. Le criblage 'virtuel' de cette banque, basé sur la comparaison des profils d'inhibition des 7000 molécules avec ceux de 9 agents anti-mitotiques référencés, a permis de sélectionner 12 composés anti-mitotiques potentiels dont le STLC (Figure 16A). La cible du STLC n'a été identifiée que récemment par criblage d'activité et études *in cellulo*

(DeBonis *et al.*, 2004). Au même titre que le monastrol, le STLC inhibe de manière réversible l'activité ATPasique basale et stimulée de Eg5 en bloquant l'étape de libération de l'ADP (Skoufias *et al.*, 2005). Les cellules HeLa traitées au STLC stoppent leur progression en pré-métaphase avec un fuseau mitotique monoastral ; aucun effet n'est observé au niveau des cellules en interphase (Figure 16B).

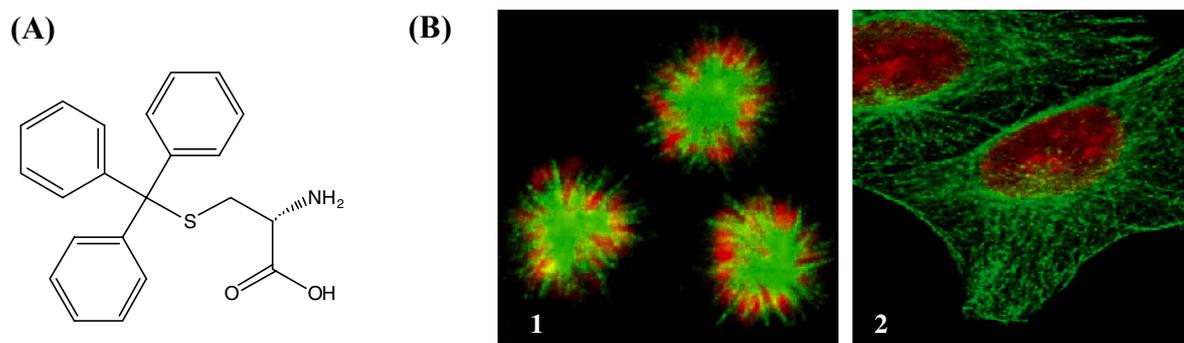


Figure 16 : (A). Structure du S-trityl-L-cystéine. (B). Effet du S-trityl-L-cystéine sur la prolifération des cellules HeLa. (1) Le STLC induit la formation de fuseau mitotique monoastral ; (2) aucun effet n'est observé sur le réseau microtubulaire des cellules en interphase. Les chromosomes sont colorés en rouge ; les microtubules en vert (DeBonis *et al.*, 2004).

Contrairement au monastrol et au composé CK0106023, les énantiomères du S-trityl-cystéine (STLC et STDC) disposent du même potentiel d'inhibition *in vitro* et *in cellulo* (Skoufias *et al.*, 2005). Néanmoins, ces deux molécules n'obéissent pas aux cinétiques Michaéliennes classiques des inhibiteurs réversibles. Le S-trityl-cystéine est un inhibiteur à forte fixation ou de type « tight-binding ». De ce fait, la valeur des IC₅₀ est dépendante de la concentration en protéine testée, contrairement aux inhibiteurs classiques. Les études menées par Skoufias *et al.*, montrent également que le STLC s'associe 8 fois plus rapidement sur Eg5 que le monastrol. Cet énantiomère est 30 fois plus actif *in vitro* que le monastrol ($K_i^{app} < 150$ nM) et dispose d'une activité anti-proliférative vis à vis de certaines lignées cancéreuses humaines (GI₅₀ de 1.3 µM ; valeur moyenne estimée à partir des 60 lignées tumorales du NCI). Le potentiel antitumoral du STLC a également été testé *in vivo* sur plus d'une vingtaine de tumeurs modèles ; cette molécule inhibe la prolifération des cellules cancéreuses à des doses non létales pour les souris (Grever *et al.*, 1992). Depuis l'identification de la cible cellulaire, le STLC est à nouveau considéré comme un candidat intéressant pour le développement de nouveaux agents antitumoraux.

3.3.4) L'adociasulfate 2

L'adociasulfate-2 (AS-2) est le premier inhibiteur non spécifique des kinésines mitotiques à avoir été identifié (Sakowicz *et al.*, 1998). Cette molécule naturelle (Figure 17A), extraite de l'éponge marine *Haliclona* sp. (ou *Adocia*), inhibe de manière réversible l'activité ATPasique stimulée en empêchant la fixation des microtubules sur le domaine moteur.

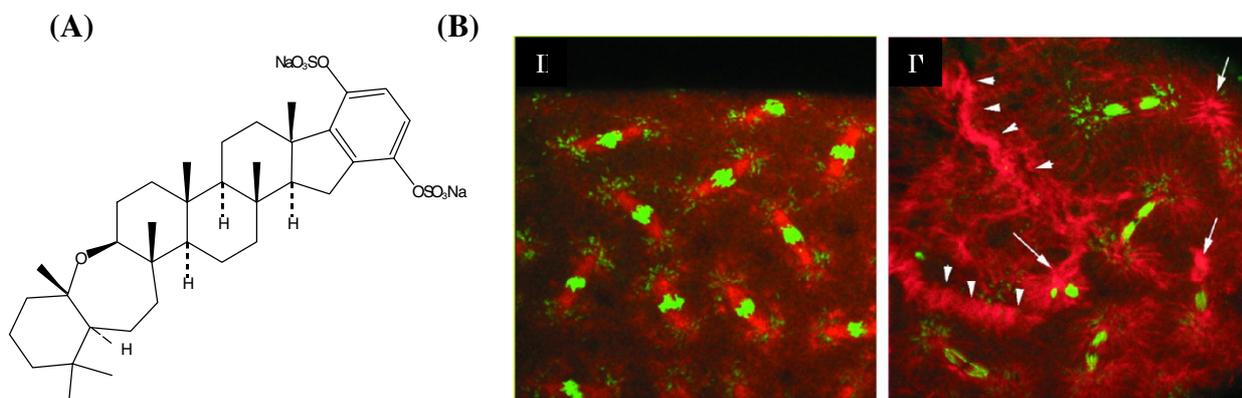


Figure 17 : (A). Structure de l'adociasulfate-2 (AS-2). (B). Effets de l'AS-2 sur le développement embryonnaire de blastodermes de *Drosophila melanogaster*. (1). Cellules embryonnaires non traitées en cours de division. La formation du fuseau (rouge) et la séparation des chromosomes (vert) se déroulent normalement jusqu'à la fin de l'embryogenèse. (2). L'injection d'AS-2 affecte l'organisation des microtubules et des chromosomes. Plusieurs asters sans chromosomes (flèches blanches) apparaissent au niveau des sites d'injection de l'inhibiteur ainsi que des amas de microtubules (pointes blanches) non associée aux chromosomes (Sakowicz *et al.*, 1998).

L'activité ATPasique basale des kinésines n'est pas inhibée par l'AS-2 mais au contraire stimulée à forte concentration *via* le même mécanisme que les microtubules (augmentation de la vitesse de libération de l'ADP). Cette molécule naturelle est donc un inhibiteur compétitif des microtubules qui mime leur activité une fois fixée sur le domaine moteur.

Les effets *in cellulo* de l'AS-2 ont été étudiés dans un premier temps au niveau de cellules HeLa, sans aucun résultat sur la prolifération. La taille de l'AS-2 (739 Da) mais également la présence des deux groupements chargés (-OSO₃Na) ne favorisent pas le passage de la molécule au travers des membranes cellulaires. Pour pallier à ce problème, l'AS-2 a été directement injecté au niveau d'embryon de *Drosophila melanogaster*. Au point d'injection, les cellules stoppent immédiatement leur cycle cellulaire et présentent diverses anomalies phénotypiques suggérant l'inhibition simultanée de plusieurs moteurs moléculaires mitotiques (Figure 17B). D'autres adociasulfates (noté de 1 à 6) ont également été isolés de l'éponge *Haliclona* sp. (Blackburn *et al.*, 1999). Ces molécules inhibent toutes l'activité ATPasique stimulée des kinésines et l'AS-6 dispose de la même efficacité *in vitro* que l'AS-2.

3.3.5) Autres inhibiteurs

D'autres inhibiteurs spécifiques d'Eg5 ont également été répertoriés comme le terpendole E (Figure 18-1). Cette molécule naturelle, isolée d'une souche fongique, bloque la progression des cellules HeLa avec un fuseau monoastrol et inhibe de manière réversible l'activité basale ($IC_{50} = 14.6 \mu M$) et stimulée ($IC_{50} = 23 \mu M$) de Eg5 (Nakazawa *et al.*, 2003). Le terpendole E n'est pas le seul inhibiteur spécifique d'Eg5 comportant un noyau indole. Hotha *et al.*, a récemment identifié la monastroline (Figure 18-2) parmi 16 000 composés (Hotha *et al.*, 2003). Au même titre que le terpendole E, la monastroline inhibe spécifiquement l'activité ATPasique basale d'Eg5 ($IC_{50} = 800 \text{ nM}$) et est capable de stopper la prolifération de cellules tumorales résistantes au taxol (Marcus *et al.*, 2005). Les dihydropyrazoles (Figure 18-3) font partie de la nouvelle génération d'inhibiteurs d'Eg5 (Cox *et al.*, 2005). Un dérivé en particulier (X = Cl, Y = OH) partage le même site de fixation que le monastrol et semble induire des changements conformationnels similaires au sein du domaine moteur. Enfin, l'équipe de F. Kozielski a également identifié 7 nouveaux inhibiteurs spécifiques de l'activité d'Eg5 (DeBonis *et al.*, 2004). Parmi ces composés se trouvent 2 analogues des phénothiazines (Figure 18-4) et le flexeril (Figure 18-5) ; ces trois molécules ciblent spécifiquement le domaine moteur de la kinésine et inhibent aussi bien l'activité ATPasique basale que stimulée. L'ensemble de ces données permet de souligner la diversité structurale rencontrée parmi les inhibiteurs spécifiques de Eg5.

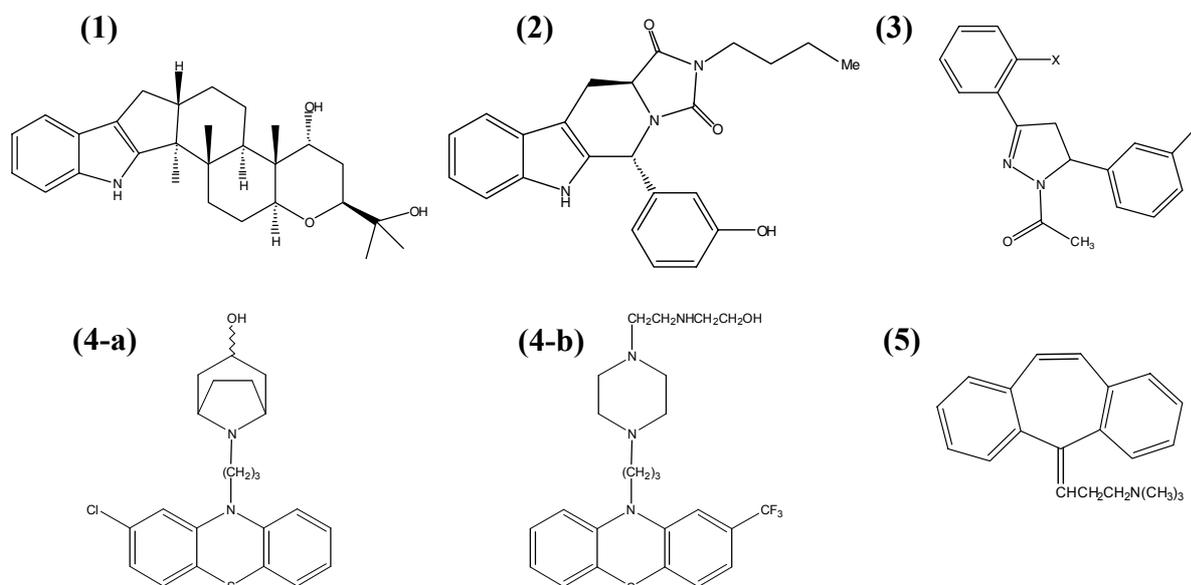


Figure 18 : Structures de différents inhibiteurs spécifiques de Eg5 : (1) terpendole E (Nakazawa *et al.*, 2003) ; (2) HR22C16 ou monastroline (Hotha *et al.*, 2003) ; (3) 3,5-Diaryl-4,5-dihydropyrazole (Cox *et al.*, 2005) ; (4) dérivés des phénothiazines : (4-a) NSC 59349, (4-b) NSC 169676 et (5) flexeril (DeBonis *et al.*, 2004).

IV) Objectifs des travaux de thèse

Eg5 joue un rôle essentiel au cours des premières étapes de la division en permettant la bipolarisation de la cellule et la formation du fuseau mitotique. L'inhibition de cette kinésine stoppe la progression des cellules en pré-métaphase avec un phénotype particulier et peut conduire à la mort cellulaire par apoptose. Depuis la découverte d'inhibiteurs spécifiques de l'activité d'Eg5, cette kinésine est devenue la cible la plus intéressante du fuseau mitotique. La publication des travaux de Sakowicz *et al.*, et de Marcus *et al.*, ont permis de renforcer cette idée : l'inactivation d'Eg5 permet d'inhiber *in vivo* la prolifération de cellules tumorales et de shunter les mécanismes de défense développés par les cellules cancéreuses à l'encontre des inhibiteurs des microtubules (Sakowicz *et al.*, 2004 ; Marcus *et al.*, 2005).

L'objectif de ce travail est de caractériser les interactions entre le domaine moteur d'Eg5 et plusieurs inhibiteurs spécifiques, dont le STLC. La localisation des zones d'interaction et de modifications conformationnelles représente une étape nécessaire à la compréhension du mécanisme d'inhibition. Cette étude structurale a été menée par spectrométrie de masse et échange hydrogène / deutérium (H/D-MS). La technique des échanges isotopiques est une méthode éprouvée dans l'étude des dynamiques conformationnelles et la caractérisation de zones de contact entre une protéine et ses partenaires. La première étape a été de mettre au point et valider l'approche expérimentale H/D-MS en utilisant le monastrol comme référence d'interaction. Ce protocole a été appliqué au STLC puis à d'autres inhibiteurs afin d'identifier les zones impliquées dans l'interaction avec Eg5 et les modifications conformationnelles générées par ces molécules. Par la suite, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'inhibition d'Eg5 par le monastrol et le STLC en utilisant la technique H/D-MS et une approche plus 'biologique' combinant à la fois la mutagenèse dirigée et l'enzymologie. Enfin, nous avons étudié l'interaction Eg5/Adociasulfate-2 (AS-2) de manière à identifier les zones d'interaction entre le domaine moteur et les microtubules. Cette étude a été réalisée en parallèle sur un autre moteur moléculaire mitotique humain CENP-E (Centromere-associated protein E).

Comme décrit ci-dessus, la spectrométrie de masse et les échanges isotopiques ont été utilisés pour l'ensemble de ces travaux de thèse. Le prochain chapitre est ainsi consacré aux différents spectromètres de masse utilisés et à leur fonctionnement ; la technique des échanges hydrogène / deutérium sera abordée dans le dernier chapitre de cette partie.

Chapitre II

La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet l'étude d'objets isolés en phase gazeuse. Les champs d'application sont vastes à partir du moment où le corps à étudier peut-être volatilisé mais également ionisé et s'étendent de la protéomique jusqu'à l'analyse de roches lunaires ou de particules cosmiques. Un spectromètre de masse est constitué de trois parties distinctes : une source d'ionisation qui assure la production des ions en phase gazeuse, un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur qui transforme le courant ionique en signal mesurable (en général conversion ion-électron). Les caractéristiques et les propriétés analytiques d'un spectromètre de masse vont être fonction de la source d'ionisation mais également du type d'analyseur. Les sources de type MALDI (matrix-assisted laser desorption-ionisation) et ESI (electrospray ionisation) sont les plus couramment employées en biologie. Ces méthodes, dites « douces », sont utilisées afin d'ioniser en phase gazeuse des composés de haut poids moléculaire comme les protéines ou les oligonucléotides.

Au cours de ce travail, trois types d'analyseur associés à une source ESI ont été utilisés : un triple quadripôle (API III+, Perkin Elmer-Sciex), une trappe ionique (ESQUIRE 3000+, Bruker Daltonics) et un Q-TOF micro (Waters). La première partie de ce chapitre est consacrée à l'ionisation electrospray. Nous aborderons par la suite très brièvement le fonctionnement de l'analyseur de type TOF (time of flight) avant de voir, plus en détail, celui de la trappe ionique.

I) L'électronébulisation

1.1) Principe général

Développée au début des années 80 par l'équipe de Fenn, la technique d'ionisation par électronébulisation permet le transfert des ions produits en solution vers la phase gazeuse (Yamashita et Fenn, 1984 ; Whitehouse *et al.*, 1985). L'échantillon est introduit dans une source à pression atmosphérique au moyen d'un capillaire au niveau duquel est appliqué un potentiel de plusieurs kV (Figure 19). Cette tension permet l'électrolyse du milieu et la formation des espèces chargées en solution. Le procédé de nébulisation (formation de gouttelettes) de la solution en sortie de capillaire est assuré à la fois par le champ électrique local mais également par un flux co-axial d'azote chaud. Celui-ci va également faciliter le processus de désolvatation des espèces chargées. Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue et leur densité de charge augmente. Lorsque les répulsions électrostatiques atteignent la tension superficielle de la gouttelette, cette dernière explose pour donner des gouttelettes de seconde génération, plus petites (Figure 19). Ce processus est réitéré jusqu'au passage des espèces chargées en phase gazeuse (pour revues Kebarle et Tang, 1993 ; Gaskell, 1997 ; Cole, 2000).

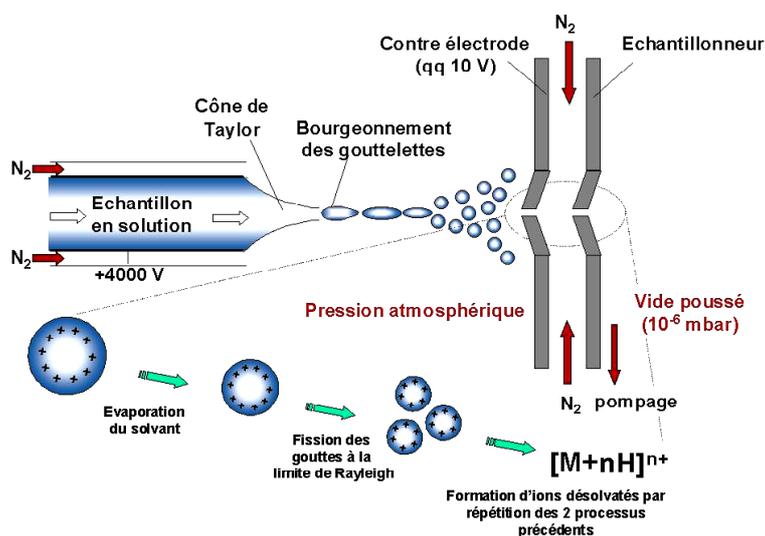


Figure 19 : Principe général de l'ionisation électrospray. Le champ électrique crée à l'interface de la source ESI permet l'émission de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire. L'évaporation progressive du solvant augmente la densité de charge au sein des gouttelettes et conduit à leur explosion. Ce mécanisme se répète jusqu'au passage des ions de la solution vers la phase gazeuse (<http://www.cjms.espci.fr/esi1.jpg>).

1.2) Formation des ions en phase gazeuse

La production des ions en phase gazeuse par électronébulisation comporte trois étapes : **(1)** la production de gouttelettes chargées en sortie de capillaire (mécanisme électrophorétique) ; **(2)** l'évaporation progressive du solvant au sein des gouttelettes qui conduit à leur fission par explosions « coulombiennes » ; **(3)** le mécanisme de transfert des ions de la solution vers la phase gazeuse.

1.2.1) Production des gouttelettes chargées par mécanisme électrophorétique

L'application d'un potentiel de 2-3 kV (voire 8 kV) à l'extrémité du capillaire métallique distant de 1 à 3 cm d'une contre-électrode permet de générer un fort champ électrique E_c de l'ordre de 10^6 V/m. La valeur de ce champ est fonction à la fois des dimensions du capillaire mais également de sa position par rapport à la contre-électrode et peut-être estimée par l'équation suivante (Kearle et Tang, 1993) :

$$E_c = (2 \times V_c) / (r_c \times \ln(4 \times d / r_c))$$

où V_c représente la différence de potentiel capillaire/contre-électrode, r_c le rayon de capillaire et d la distance capillaire/contre-électrode.

Le champ électrique E_c pénètre partiellement la solution à l'extrémité du capillaire ce qui provoque la migration des entités chargées. Si le capillaire est considéré comme une cathode, les charges positives migrent vers l'extrémité du ménisque et les charges négatives en sens inverse jusqu'à ce que la redistribution ionique contrebalance le champ électrique au sein de la solution. Cette accumulation de charges positives combinée aux effets de répulsion déstabilisent la surface du ménisque qui adopte la forme d'un cône, dit de Taylor (Taylor, 1964). Lorsque le champ électrique est suffisamment important, le cône devient instable et un jet de fines gouttelettes chargées est émis (Figure 20). La redistribution ionique qui s'opère à l'extrémité du capillaire sous l'effet du champ E_c peut-être comparée à un mécanisme électrophorétique. La source ESI est ainsi considérée comme une cellule électrolytique où se produisent des réactions d'oxydo-réduction entre le capillaire et la contre-électrode (Blades *et al.*, 1991).

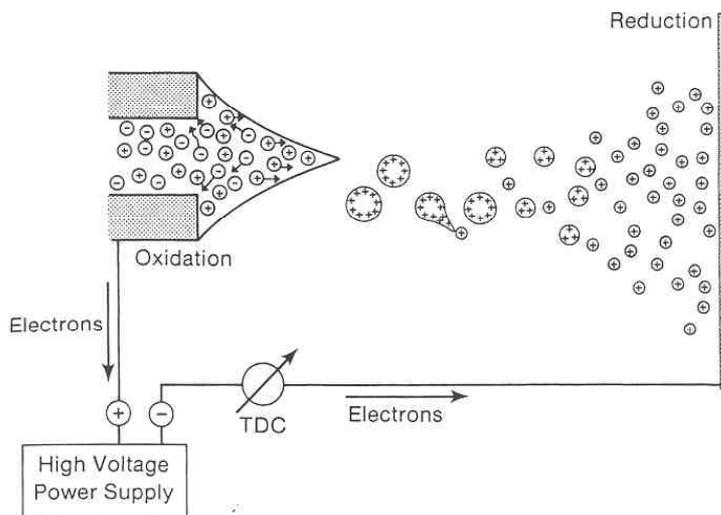


Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme électrophorétique qui se produit au niveau d'une source electrospray (Kearle et Tang, 1993).

1.2.2) Evaporation du solvant et explosions « coulombiennes »

Les gouttelettes chargées sont formées et migrent vers l'entrée du spectromètre de masse à pression atmosphérique. Lors de ce parcours, celles-ci entrent en collision avec le gaz ambiant (qui peut-être chauffé) ce qui augmente leur énergie interne et conduit à l'évaporation progressive du solvant. La charge globale des gouttelettes est considérée comme constante ; l'évaporation progressive du solvant diminue ainsi leur rayon ce qui augmente considérablement le phénomène de répulsion électrostatique jusqu'à ce que la limite de Rayleigh définie par l'équation suivante soit atteinte :

$$q_{Ry} = 8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}$$

avec q_{Ry} la charge de la gouttelette, R le rayon, ϵ_0 la permittivité du vide et γ la tension de surface de la gouttelette. L'équation de Rayleigh fournit les conditions pour lesquelles les forces électrostatiques sont égales aux forces de cohésion de la gouttelette (Lord Rayleigh, 1882). Lorsque l'égalité est atteinte, la gouttelette devient instable et subit une fission dite « coulombienne » pour donner des gouttelettes plus petites jusqu'au transfert des ions en phase gazeuse (Figure 21).

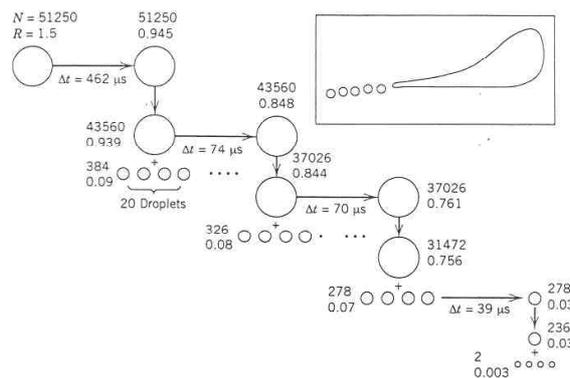


Figure 21 : Représentation schématique du procédé de fission « coulombienne » des gouttelettes formées par ionisation electrospray. Légende : N = nombre de charges, R = rayon de la gouttelettes et Δt = temps nécessaire pour que l'évaporation du solvant amène la gouttelette jusqu'à la limite de stabilité de Rayleigh (Kearle et Tang, 1993).

1.2.3) Mécanismes de formation des ions en phase gazeuse

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le phénomène de transfert des ions de la phase liquide à la phase gazeuse : le modèle de Dole et celui d'Iribarne et Thomson. Le modèle de Dole, dit de la « goutte sèche », repose sur la formation de gouttelettes ne renfermant plus qu'un seul ion. L'évaporation progressive du solvant par effet collisionnel avec le gaz ambiant augmente la densité de charge jusqu'à la limite de Rayleigh ce qui entraîne la fission de la gouttelette. Si la solution est suffisamment diluée, la succession d'explosions « coulombiennes » aboutira à la formation d'une gouttelette de très faible rayon (~ 1 nm) ne contenant plus qu'une seule entité chargée (Figure 22) (Dole *et al.*, 1968).

Le second mécanisme, proposé par Iribarne et Thomson, admet que les ions solvatés peuvent être émis directement par un phénomène analogue à la désorption de champ à partir du moment où le rayon de la gouttelette chargée atteint une taille suffisamment petite (Iribarne et Thomson, 1976). Dans ce cas, la gouttelette n'a pas besoin de contenir une seule entité chargée pour permettre l'émission en phase gazeuse. Le modèle d'Iribarne et Thomson est basé sur un phénomène de compétition entre la fission par explosion « coulombienne » et l'évaporation des ions par désorption de champ. Lorsque la taille de la gouttelette atteint un diamètre critique, c'est-à-dire avant la limite de Rayleigh, le champ électrique à la surface de la goutte devient suffisamment important et permet l'émission des ions solvatés en phase gazeuse (Figure 22). Selon Iribarne et Thomson les gouttelettes chargées passent par un état

de transition au cours duquel la densité de charge à leur surface favorise la désorption des ions en présence de quelques molécules de solvant.

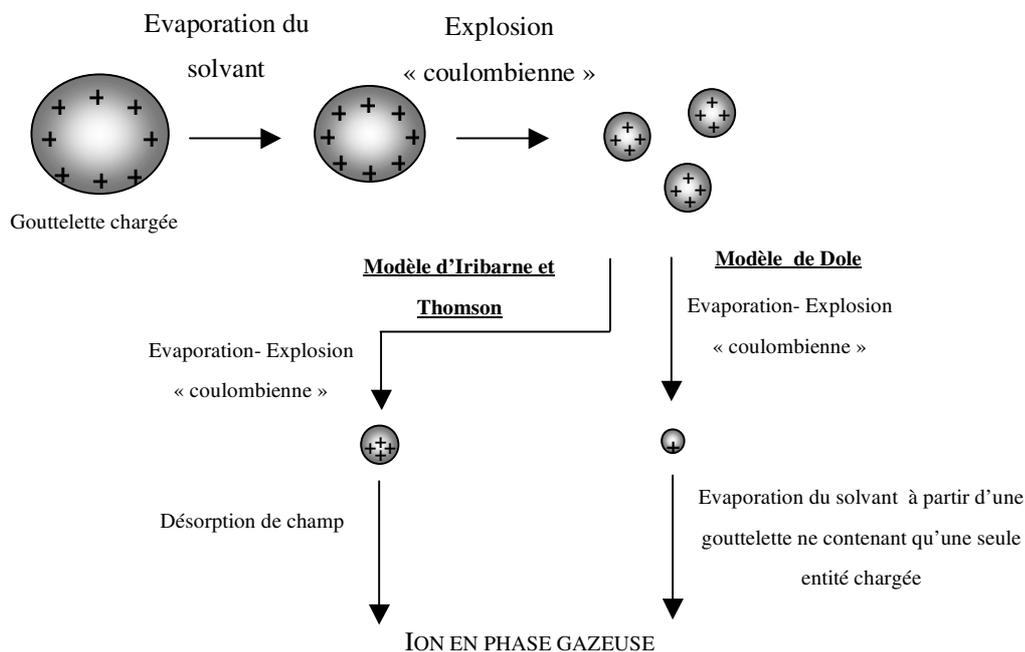


Figure 22 : Présentation des deux mécanismes de transfert des ions en phase gazeuse.

Ces deux modèles ont été tour à tour privilégiés ou non en fonction des études réalisées. Par exemple, le modèle d'Iribarne et Thomson semble peu adapté d'un point de vue énergétique aux macromolécules biologiques de type protéines ou acides nucléiques. Fenn a ainsi montré que le modèle de la goutte sèche (ou apparenté) semblait le plus probable pour les macromolécules de haut poids moléculaires, tant sur le plan énergétique que cinétique (Fenn, 1993).

II) Les analyseurs de masse

Au cours de ce travail, trois types d'analyseur ont été utilisés : un TOF, un quadripôle et une trappe ionique. La trappe ionique est souvent considérée comme un cas particulier du quadripôle linéaire, voire même d'homologue en trois dimensions. Les bases théoriques de fonctionnement de ces deux analyseurs sont ainsi très proches à un degré de liberté près. Dans cette partie, seule la trappe ionique sera détaillée. Nous aborderons de manière beaucoup plus succincte le fonctionnement de l'analyseur de type TOF.

2.1) Analyseur de type TOF (Time Of Flight)

Développé dans les années 50 par Wiley et McLaren, le principe de l'analyseur de type TOF est basé sur les écarts de temps de vol entre des ions de rapport m/z distincts mais d'énergie cinétique similaire (Wiley et McLaren, 1955 ; pour revues Guilhaus, 1995 ; Weickhardt *et al.*, 1996). L'énergie cinétique d'un ion est exprimée sous la forme :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = qVs$$

avec m la masse de l'ion, v sa vitesse, q sa charge et V_s la différence de potentiel qui permet son accélération au niveau de la source. Sachant que $v = d/t$, le temps t nécessaire à l'ion pour parcourir la distance d qui le sépare du détecteur s'écrit sous la forme :

$$t = \left(\frac{m}{q}\right)^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{d}{(2Vs)^{\frac{1}{2}}}$$

En fixant le potentiel V_s (tout comme d), l'ensemble des ions subira la même accélération et leur énergie cinétique sera similaire. Dans ces conditions le temps nécessaire à l'ion pour atteindre le détecteur est uniquement fonction de son rapport m/z . Plus le rapport m/z sera faible, plus la vitesse de l'ion sera importante et inversement. Ainsi des ions de rapports m/z éloignés (et donc de vitesses distinctes) ne mettront pas le même temps pour parcourir la distance qui les sépare du détecteur et ce à énergie cinétique équivalente.

L'analyseur TOF linéaire, décrit ci dessus, est assez peu résolutif à cause de la dispersion en énergie cinétique des ions en sortie de source. Cette dispersion peut être compensée en retardant l'extraction des ions et/ou en utilisant des miroirs électrostatiques (appelés « réflectrons »). L'extraction retardée permet de compenser les différences de dispersion spatiale des ions au niveau de la source d'ionisation. Dans ce cas, les ions sont formés dans un premier temps puis, après un délai approprié, accélérés grâce à un gradient de potentiel. L'accélération subie par l'ion lorsque le gradient de potentiel est formé sera fonction de sa position au niveau de la source. Plus ce dernier est proche de l'entrée du TOF, moins il sera accéléré et inversement. Ainsi deux ions rigoureusement identiques de position différentes ne subiront pas la même accélération ce qui permettra au plus éloigné de rattraper son retard.

Cette dispersion énergétique peut également être corrigée en utilisant un miroir électrostatique à l'extrémité du tube de vol (Figure 24). Le principe est de ralentir les ions d'énergie différente grâce à un champ électrique de décélération, puis de les réfléchir en direction du détecteur. Plus l'énergie de l'ion est importante, plus ce dernier pénétrera profondément dans le champ du « réflectron » et perdra de temps par rapport à un ion de plus faible énergie. Par conséquent, deux ions de masse identique mais de vitesse légèrement différente n'auront pas la même excursion au sein du champ du « réflectron ». Ceci permet de compenser l'avance de l'ion le plus rapide par rapport au plus lent et ainsi diminuer le phénomène de dispersion énergétique. On distingue deux types de « réflectron » : ceux à un seul étage c'est à dire à un seul champ électrique et les miroirs électrostatiques à deux étages.

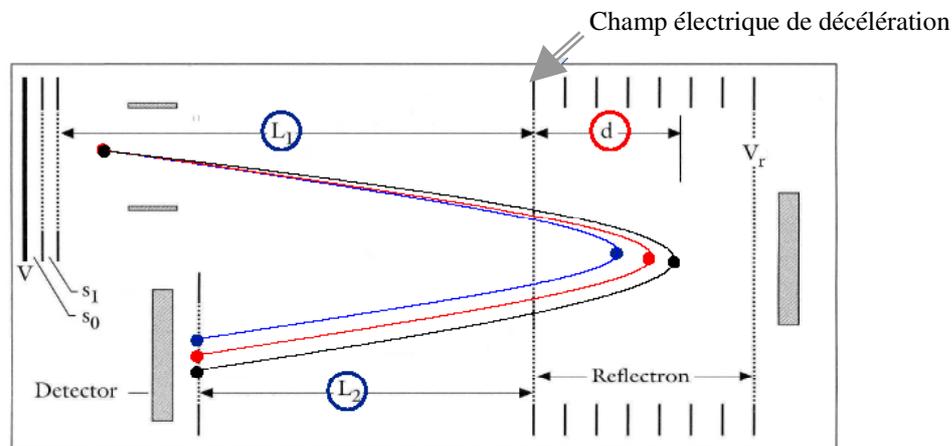


Figure 24 : Schéma d'un analyseur TOF avec un miroir électrostatique à un étage. Le « réflectron » permet de compenser la dispersion en vitesse de deux ions de même masse. L'ion le plus rapide pénètre plus profondément dans le champ électrique du « réflectron » et perd ainsi plus de temps par rapport à son homologue de plus faible énergie.

2.2) Analyseur de type trappe ionique

La trappe ionique (ou piège à ions) fut inventée en 1960 par Paul et Steinwedel (Paul et Steinwedel, 1960 ; Stattford, 2002). Cependant, les bases sur lesquelles repose le fonctionnement de la trappe sont bien antérieures à sa création. En effet, c'est en 1868 que Mathieu énonça le principe mathématique permettant d'exprimer les équations différentielles du mouvement d'un corps chargé soumis à un champ quadripolaire. Dans cette partie, nous aborderons d'une part les principes théoriques relatifs à la formation du champ quadripolaire et aux comportements des ions et d'autre part les différentes opérations réalisables sur le piège à ions. L'objectif est ici de cerner au mieux les processus permettant à la trappe de se comporter à la fois comme un piège à ions mais également comme un

analyseur (pour revues March, 1992 ; McLuckey *et al.*, 1994 ; Jonscher et Yates, 1997 ; Wong et Cooks, 1997 ; March, 2000).

2.2.1) Géométrie de la trappe ionique

La trappe ionique est constituée de 3 électrodes (Figure 25A) : 2 calottes hémisphériques appelées « end-cap » et une électrode circulaire (March, 1997 ; March 2000). Les deux « end-cap », de géométrie hyperbolique, sont *quasi* identiques et se distinguent uniquement par le nombre de perforations présentes en leur centre. La « end-cap » en entrée de trappe contient une seule ouverture permettant l'accès des ions générés à partir d'une source externe. La seconde « end-cap » comprend plusieurs ouvertures facilitant ainsi le passage des ions vers le détecteur. L'électrode circulaire est également de géométrie hyperbolique et se place de manière symétrique entre les deux « end-cap ». La position des électrodes, tout comme la géométrie de leur surface interne, ont été choisies de manière à générer un champ quadripolaire idéal lorsqu'un potentiel électrique est appliqué. Pour un champ quadripolaire « parfait », l'électrode circulaire doit être positionnée entre les deux « end-cap » de telle sorte que $r_0^2 = 2z_0^2$, avec r_0 le rayon de l'électrode circulaire et $2z_0$ la distance qui sépare les deux « end-cap ». Ainsi, la pente des asymptotes créées par la superposition des 3 électrodes est égale à $1/\sqrt{2}$ (Figure 25B).

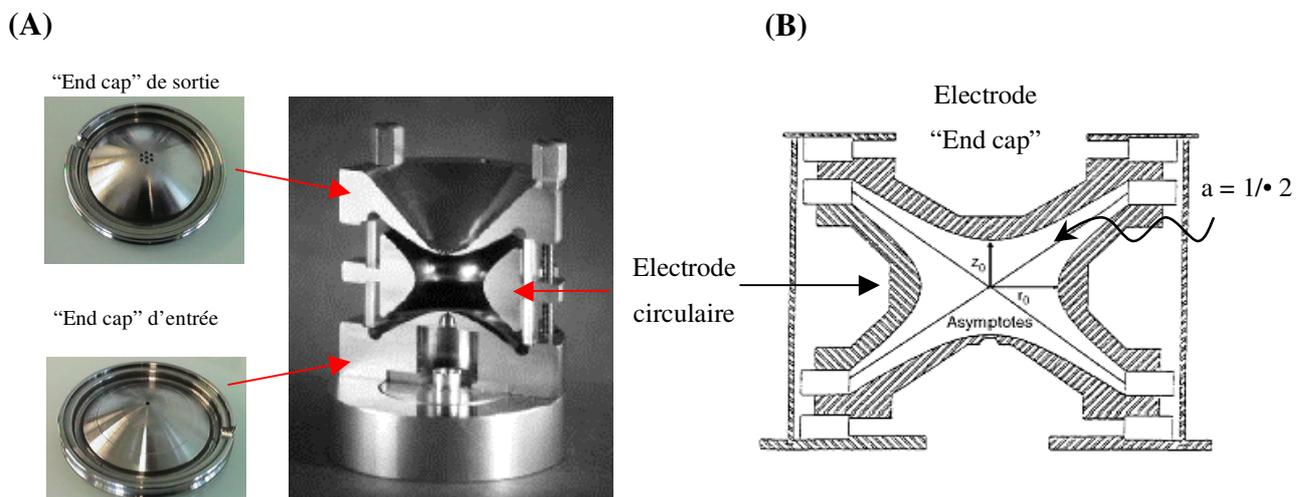


Figure 25 : Représentations de la trappe ionique. (A). Photographie en coupe longitudinale d'une trappe ionique avec les deux électrodes « end-cap » en entrée et sortie du piège ainsi que l'électrode circulaire. (B). Représentation schématique d'une trappe ionique de géométrie idéale montrant les asymptotes de pente $1/\sqrt{2}$ et les dimensions radiales (r_0) et axiales (z_0) (March, 2000).

Cependant, la surface interne des électrodes n'est pas de géométrie parfaite ce qui induit la formation de multipôles et modifie l'expression du champ quadripolaire (March, 2000). De ce fait, la valeur z_0 des trappes commerciales a été augmentée de manière à compenser l'apparition des multipôles à la surface des électrodes. En augmentant z_0 , la pente des asymptotes est modifiée et la relation entre r_0 et z_0 n'est plus respectée. Néanmoins, Knight a démontré qu'il n'y avait pas de contraintes réelles entre les paramètres r_0 et z_0 (Knight, 1983). Par conséquent, l'expression du champ quadripolaire et des paramètres de stabilité des ions reste valable pour toutes valeurs de r_0 et z_0 .

2.2.2) Création du champ quadripolaire – Notions de pseudo puits de potentiel

2.2.2.1) *Expression du champ quadripolaire*

La création du champ quadripolaire nécessite l'application d'un potentiel ϕ_0 défini par l'équation suivante :

$$\phi_0 = U + V \cos \Omega t$$

où U est la composante continue du potentiel, V la composante alternative de la radiofréquence (rf) et Ω la fréquence angulaire (de valeur $2\pi f$). Le potentiel ϕ_0 est ici exprimé comme la combinaison d'une radiofréquence (rf = $V \cos t$) et d'un potentiel dc (U). Dans la majeure partie des cas, la composante continue (dc) n'est pas utilisée pour créer le champ quadripolaire ce qui simplifie l'expression du potentiel à une radiofréquence (March, 1997). Nous verrons par la suite que la composante continue de ϕ_0 peut-être utilisée lors des étapes de sélection d'ion de rapport m/z donné.

L'expression du champ quadripolaire varie en fonction du mode de fonctionnement de la trappe. En mode I, le champ est créé par superposition d'un potentiel ϕ_0 sur l'électrode circulaire et $-\phi_0$ sur les « end-cap ». Cette configuration est toujours employée pour créer le champ dans les analyseurs de type quadripôle. En mode II, les deux « end-cap » sont reliées à la masse et le potentiel ϕ_0 n'est appliqué qu'au niveau de l'électrode circulaire. Le mode de fonctionnement III, introduit par Bonner, est particulier puisqu'il requiert la séparation spatiale du potentiel ϕ_0 : la composante continue ($-U$) est appliquée sur les deux « end-cap » et la radiofréquence sur l'électrode circulaire (Bonner, 1977).

Au niveau des trappes commerciales, le champ quadripolaire est généré en faisant fonctionner l'appareil en mode II. Dans ce cas de figure, l'expression du champ quadripolaire $\phi_{(r,z)}$ est de la forme

$$\phi_{(r,z)} = \frac{\phi_0}{r_0^2 + 2z_0^2} [r^2 - 2(z^2 - 2z_0^2)]$$

avec $r = x$ ou y , $r_0 =$ rayon interne de l'électrode circulaire et $z_0 =$ distance séparant le centre de la trappe des électrodes « end-cap ». Le champ quadripolaire crée (ou potentiel de surface) adopte la forme d'une « selle de cheval » (Figure 26). Comme la rf oscille de manière sinusoïdale à une fréquence élevée de l'ordre de 1 MHz, le champ est périodiquement inversé et suit un mouvement en vague qui permet de créer les pseudo puits de potentiel paraboliques nécessaires pour piéger les ions.

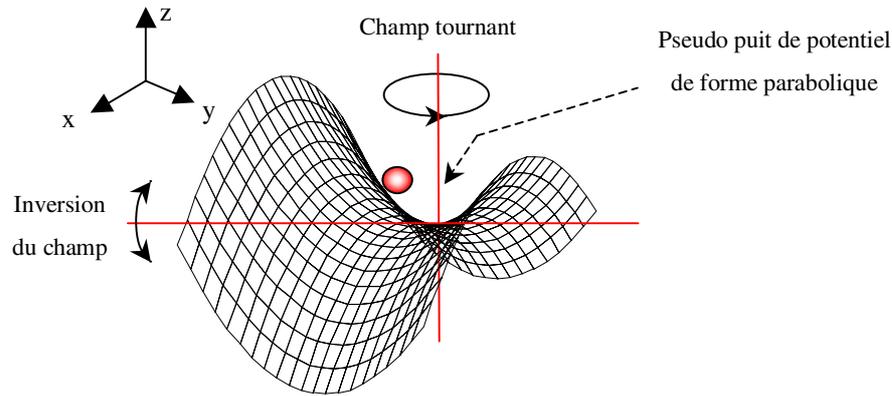


Figure 26 : Représentation d'un champ quadripolaire pur. Le mouvement en vague adopté par le champ lorsque le potentiel ϕ_0 est appliqué sur l'électrode circulaire permet de créer les pseudo puits de potentiel en axial et en radial nécessaires pour piéger les ions (bille rouge).

Cependant, la surface interne des électrodes n'est pas de géométrie parfaite ce qui sous-entend que le champ quadripolaire n'est pas pur et ce, même si la valeur z_0 des trappes commerciales est ajustée de manière à atténuer ces imperfections. Le champ $\phi_{(r,z)}$ créé lorsque le potentiel ϕ_0 est appliqué sur l'électrode circulaire (et les « end cap » sont à la masse) est multipolaire et s'écrit sous la forme suivante :

$$\phi_{(r,z)} = C_0^0 + C_1^0 z + C_2^0 \left(\frac{1}{2} r^2 - z^2 \right) + C_3^0 z \left(\frac{3}{2} r^2 - z^2 \right) + C_4^0 \left(\frac{3}{8} r^4 - 3r^2 z^2 + z^4 \right) + \dots$$

où les coefficients C_n^0 correspondent aux différents composants du champ multipolaire : $n = 0$ pour le monopole, $n = 1$ pour le dipôle, $n = 2$ pour le quadripôle, ..., $n = 4$ pour l'hexapôle et ainsi de suite. De même, les ouvertures au niveau des deux « end cap » sont également à l'origine de perturbations au niveau du champ quadripolaire (addition d'un champ octopolaire négatif) (Stattford, 2002).

2.2.2.2) Pseudo puits de potentiel

Comme décrit précédemment, l'inversion périodique du champ quadripolaire permet de créer des pseudo puits de potentiel paraboliques dans les directions axiales et radiales de profondeurs respective D_z et D_r (avec $D_z \approx 2D_r$). Ces pseudo puits permettent de confiner les ions au centre de la trappe et leur profondeur représente une mesure de l'énergie cinétique (potentiels de **Dehmelt**) requise pour permettre à la fois de piéger et d'éjecter les ions (Figure 27).

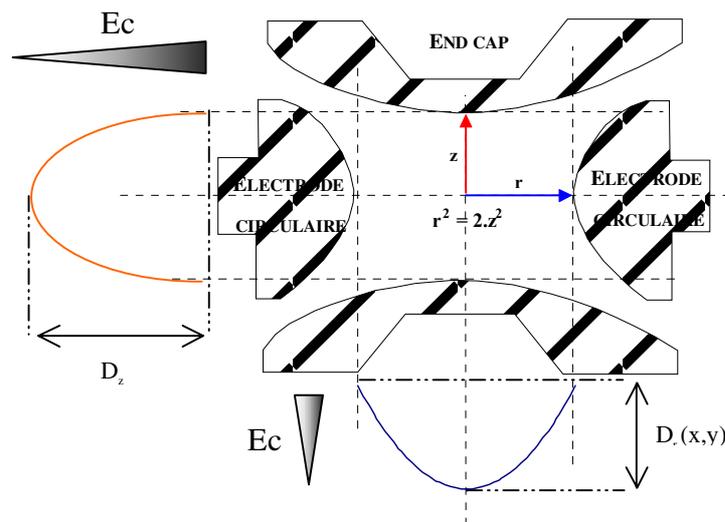


Figure 27 : Représentation schématique des pseudo puits de potentiel de trappe générés par inversion périodique du champ quadripolaire. Les profondeurs D_r et D_z (potentiels de Dehmelt) représentent une mesure de l'énergie cinétique (E_c) nécessaire pour permettre aux ions d'échapper au piège. Figure préparée avec Microsoft drawing.

Cet aspect énergétique influe sur la répartition des populations d'ions au centre de la trappe. Ainsi les ions de faibles rapports m/z colonisent les régions les plus basses du pseudo puit de potentiel en raison de leur faible énergie cinétique et vont avoir l'excursion la plus faible par rapport au centre de la trappe (March, 1997). Inversement, les ions de rapports m/z plus élevés occupent des régions d'énergie cinétique supérieure et vont parcourir un chemin plus important depuis le centre du piège. L'espace occupé par les ions est donc dépendant de leur rapport m/z et cette répartition conduit à une stratification des populations ioniques depuis le

centre de la trappe en fonction de leur énergie cinétique. Cette distribution n'est pas sans conséquence lors des étapes d'éjection « masse sélective », notamment par instabilité axiale (Stafford *et al.*, 1984). En effet, dans ce mode d'éjection, les ions de faibles rapports m/z qui sont les plus proches du centre du piège doivent traverser l'espace occupé par les espèces ioniques de rapport m/z supérieur avant de sortir de la trappe. Ceci conduit à des effets d'espace de charge et à une perte de résolution des ions de faibles m/z (Jonscher et Yates, 1997). Nous verrons par la suite que ce problème peut être contourné en changeant le mode d'éjection «masse sélective» des ions (cas de l'éjection par résonance).

2.2.3) Comportement des ions dans un champ quadripolaire

2.2.3.1) *Equations du mouvement des ions*

Dans toute cette partie, on considérera d'une part que $r_0^2 \neq 2z_0^2$ et d'autre part que le champ quadripolaire est obtenu en faisant fonctionner la trappe ionique en mode II. L'expression $\phi_{(r,z)}$ du champ quadripolaire (lorsque celui-ci est considéré comme pur) permet de remonter aux équations de mouvement des ions. La force F_u subit par un ion de masse m et de charge e en n'importe quel point u ($u = x, y$ ou z) du champ quadripolaire est donnée par la relation :

$$F_u = m.a = m \frac{d^2 u}{dt^2} = -e \frac{\partial \phi_u}{\partial u}$$

avec a l'accélération subie par l'ion et ϕ_u le potentiel électrique. Cette relation traduit la force électrique qui s'applique sur un ion en n'importe quel point r (x ou y) et z du champ quadripolaire et permet d'accéder rapidement aux équations différentielles du second ordre décrivant le mouvement d'un ion de la forme :

$$\frac{d^2 r}{dt^2} + \frac{2.e}{m.(r_0^2 + 2z_0^2)} [U + V \cos \Omega t] r = 0 \quad ; \quad \frac{d^2 z}{dt^2} - \frac{4.e}{m.(r_0^2 + 2z_0^2)} [U + V \cos \Omega t] z = 0$$

La substitution du paramètre Ωt par 2ξ (paramètre adimensionnel) permet de regrouper les équations de mouvement sous la forme générale de **l'équation différentielle de Mathieu** :

$$\frac{d^2 u}{dt^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi) u = 0$$

avec $u = r$ (x ou y) et z , coordonnées radiales et axiales et a_u, q_u les paramètres adimensionnels de stabilité (ou de trappe) définis par les relations suivantes :

$$a_z = -2a_r = -\frac{16.eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad q_z = -2q_r = \frac{8.eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

Les paramètres adimensionnels de trappe a_u et q_u représentent les solutions de l'équation différentielle de Mathieu. Ces derniers correspondent aux coordonnées x, y et z d'un ion de rapport m/z donné soumis au champ quadripolaire $\phi_{(r,z)}$. D'une manière générale, les paramètres de trappe définissent à la fois les trajectoires stables et instables adoptées par les ions et permettent d'établir le diagramme de stabilité.

2.2.3.2) Stabilité des ions dans un champ quadripolaire

2.2.3.2.1) Diagramme de stabilité et fréquences séculaires

Comme décrit précédemment, les solutions de l'équation de Mathieu a_u et q_u décrivent à la fois les trajectoires stables et instables d'un ion soumis au champ quadripolaire dans les trois directions de l'espace. Il existe ainsi plusieurs régions de stabilité (et d'instabilité) radiale et axiale au sein du champ quadripolaire. La superposition de ces régions permet d'établir le diagramme de stabilité de Mathieu ($a_z = f(q_z)$) et de connaître les régions au niveau desquelles la trajectoire des ions sera stabilisée simultanément dans les directions r et z (Figure 28). Il existe deux zones de stabilité au niveau des trappes ioniques (notées A et B) et pour le moment seule la zone A est utilisée (la zone B reste à explorer). Par analogie, les analyseurs de type quadripolaire contiennent quatre zones de stabilité (De Hoffmann *et al.*, 1994).

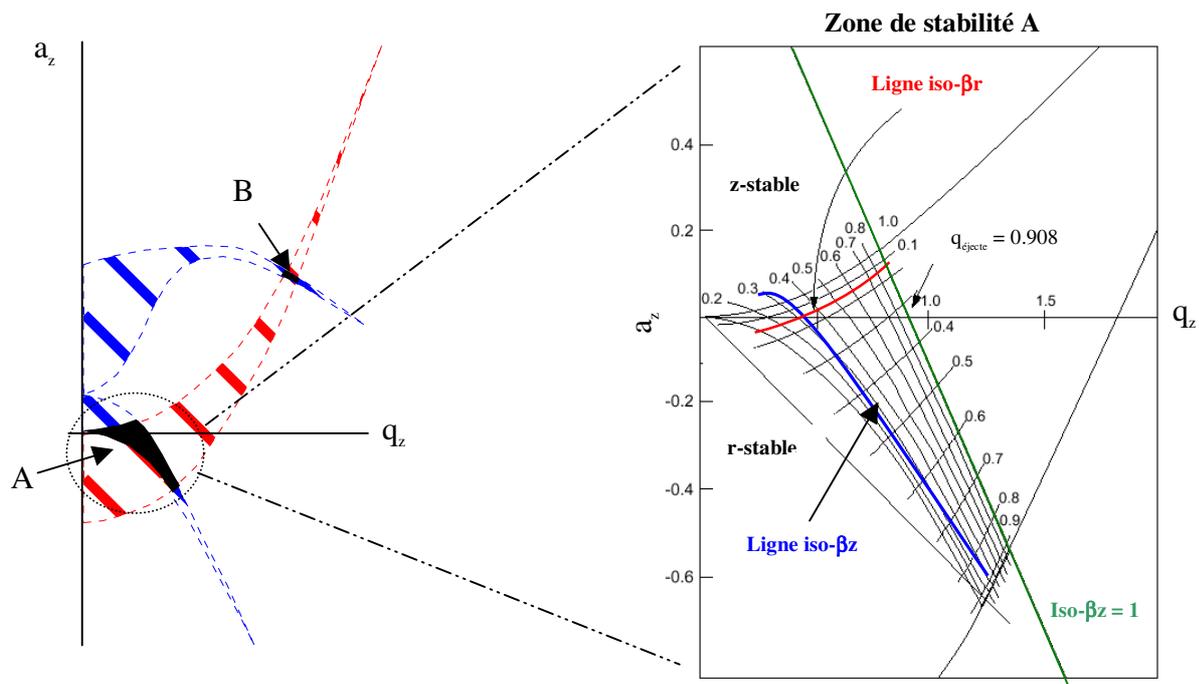


Figure 28 : Diagramme de stabilité de Mathieu $a_z = f(q_z)$ dans une trappe ionique. La superposition des zones de stabilité axiale (hachurée en bleu) et radiale (hachurée en rouge) permettent de visualiser les deux zones, notées A et B, au niveau desquelles la trajectoire des ions est stabilisée dans les trois directions de l'espace (March, 2000). La zone de stabilité axiale et radiale est délimitée par les lignes iso- β_r et iso- β_z . Le paramètre de trappe β_u (avec $u = x$ ou r) est une fonction de a_u et q_u et ses valeurs correspondent aux spectres de fréquences des ions de trajectoire stable. Chaque ion piégé, de rapport m/z donné, dispose de ses propres fréquences radiales et axiales (notées $\omega_{u,n}$) qui constituent sa signature au sein du champ quadripolaire. Ces fréquences sont des composantes du mouvement séculaire de l'ion qui adopte une trajectoire en courbe de Lissajous lorsque ce dernier est stabilisé dans les trois directions de l'espace (et donc piégé) au sein du champ quadripolaire. La valeur $q_{\text{ejecte}} = 0.908$ correspond à une des limites de stabilité définies par les lignes iso- β_u . Passés la ligne iso- $\beta_z = 1$ (lorsque $a_z = 0$, cas où le champ quadripolaire $\phi_{(r,z)}$ n'est généré que par la composante rf du potentiel ϕ_0), les ions sont éjectés de la trappe par déstabilisation axiale mais leur trajectoire reste stable radialement.

Les paramètres de trappe a_u et q_u sont respectivement proportionnels à la composante continue (U) et à la radiofréquence ($V\cos\Omega t$) du potentiel électrique ϕ_0 . De ce fait, il est possible de changer la position des ions au sein du diagramme de stabilité et de modifier la zone de travail de la trappe. La superposition des zones de stabilité permet également de faire apparaître un nouveau paramètre de trappe, noté β_u , qui est une fonction complexe de a_u et q_u . Les valeurs de β_u en un point donné du diagramme de stabilité correspondent aux spectres de fréquences des trajectoires stables des ions (lignes iso- β_u) (Figure 28). Etant donné que la position d'un ion piégé est fonction de son rapport m/z ainsi que de la zone de travail explorée au niveau de la trappe, les valeurs prises par β_u seront spécifiques à chaque ion piégé et peuvent être considérées comme leur signature au sein du champ $\phi_{(r,z)}$. Chaque entité ionique

aura ses propres fréquences séculaires radiales ($\omega_{r,n}$) et axiales ($\omega_{z,n}$) exprimées sous la forme générale :

$$\omega_{u,n} = \left| (2.n + \beta_u) \frac{\Omega}{2} \right|$$

avec n l'ordre de la fréquence ($-\infty \leq n \leq +\infty$) et β_u équivalant à :

$$\beta_u \approx \sqrt{\left(a_u + \frac{q_u^2}{2} \right)}$$

lorsque $q_r < 0.2$ et $q_z < 0.4$. Cette approximation est connue sous le nom d'approximation de Dehmlet. Les fréquences séculaires dites « fondamentales » sont obtenues lorsque $n = 0$. Dans ce cas de figure, les fréquences séculaires axiales et radiales s'écrivent sous la forme $\beta_z \Omega / 2$ et $\beta_r \Omega / 2$.

2.2.3.2.2) Conditions de stabilité-trajectoire des ions piégés

Un ion de rapport m/z donné sera piégé au centre de la trappe si ses coordonnées (a_u , q_u) tombent dans le diagramme de stabilité de Mathieu, c'est-à-dire si sa trajectoire est stabilisée simultanément dans les directions axiales et radiales. Sous ces conditions, l'ion évolue dans les pseudo puits de potentiel générés par l'inversion périodique du champ quadripolaire. Cependant, l'énergie cinétique de l'ion doit également être considérée comme une condition nécessaire à sa stabilisation. Comme décrit précédemment, la profondeur des pseudo puits correspond à une mesure du potentiel de Dehmelt. Ainsi l'énergie cinétique de l'ion ne doit pas excéder celle des pseudo puits de potentiel. En général, les ions sont refroidis en entrée de trappe de manière à diminuer leur énergie cinétique et augmenter l'efficacité du piège. Pour cela, de l'hélium est introduit dans la trappe à une pression de 10^{-3} Torr (March, 1992 ; March 2000). Les collisions avec les atomes de gaz neutre permettent de refroidir énergétiquement les ions et de les focaliser au centre de la trappe. Nous verrons par la suite que l'hélium permet également de contrôler l'excursion radiale des ions déstabilisés lors de leur éjection « masse sélective ».

Lorsque l'ion est piégé, celui-ci adopte une trajectoire particulière de 8 en trois dimension appelée courbe de Lissajous (Figure 29) (Nappi *et al.*, 1997 ; Forbes *et al.*, 1999). Cette courbe est composée des deux fréquences $\omega_{r,n}$ et $\omega_{z,n}$ du mouvement séculaire sur lesquelles se

superpose une ondulation due à la valeur élevée de l'oscillation de la rf (de l'ordre du MHz) du potentiel ϕ_0 . La projection du mouvement de l'ion sur les axes x et y donne naissance à une ligne droite ; la trajectoire de l'ion est donc restreinte à un seul plan (Figure 29).

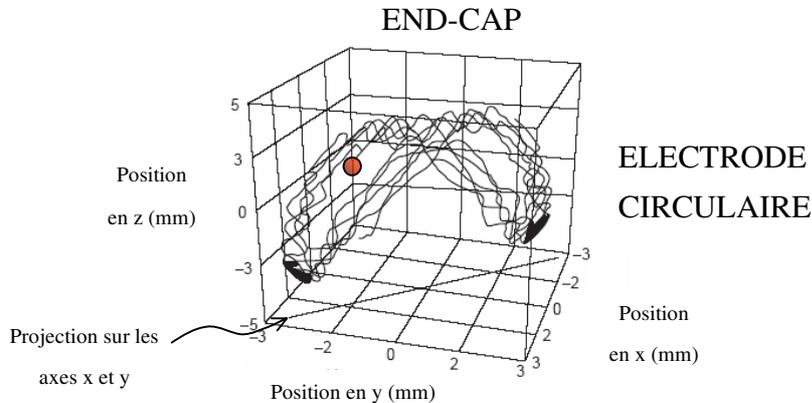


Figure 29 : Représentation de la trajectoire stable d'un ion piégé dans le champ quadripolaire. L'ion (en rouge) adopte un mouvement de 8 tridimensionnel appelé courbe de Lissajous qui se compose à la fois des fréquences axiales et radiales du mouvement séculaire et d'une ondulation supplémentaire introduite par la valeur élevée de la rf. L'ion évolue dans le plan z car la projection de sa trajectoire sur les axes y et x forme une unique ligne droite. La simulation de cette trajectoire en courbe de Lissajous est obtenue en considérant que la vitesse initiale de l'ion piégée est nulle dans les trois directions de l'espace (Nappi, 1997).

2.2.4) Opérations sur la trappe ionique

2.2.4.1) *Méthodes de détection des ions*

2.2.4.1.1) *Ejection axiale des ions par modulation de la rf*

Ce mode d'éjection « masse sélective » consiste à déstabiliser le mouvement des ions axialement en jouant sur l'amplitude de la rf du potentiel ϕ_0 au niveau de l'électrode circulaire (Londry et Hager, 2003). La composante continue de ϕ_0 n'est généralement pas utilisée pour créer le champ quadripolaire $\phi_{(r,z)}$ ce qui simplifie l'expression de potentiel électrique à une simple radiofréquence. Dans ces conditions, le paramètre de trappe a_z est nul puisque ce dernier est proportionnel à la composante continue de ϕ_0 . Les coordonnées des ions piégés (a_z, q_z) sont de la forme $(0, q_z)$ et la position des ions peut être modifiée au niveau du diagramme de stabilité en jouant uniquement sur q_z qui est proportionnel à la rf (Figure 30). Plus le rapport m/z de l'ion piégé est important, plus la valeur de q_z est faible et plus le voltage nécessaire à son éjection sera élevé. En effet, lorsque q_z atteint la valeur 0.908 ($q_{\text{éjecte}}$), les ions sortent du diagramme de stabilité pour entrer dans une région d'instabilité axiale. La rampe rf

a donc pour objectif d'amener les ions au point de coordonnée $(0, q_{\text{éjecte}})$ de manière à les défocaliser axialement vers les « end cap » et à leur fournir l'énergie cinétique suffisante pour échapper aux pseudo puits de potentiel.

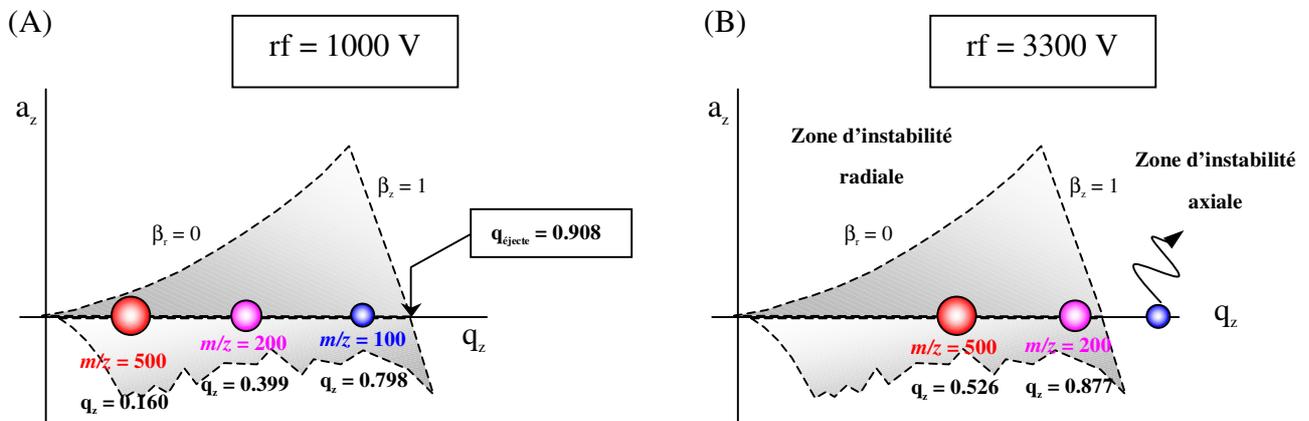


Figure 30 : Principe de l'éjection «masse sélective» des ions par modulation de la rf. **(A)**. Lorsque la $rf = 1000$ V, les ions piégés sont répartis au niveau du diagramme de stabilité en fonction de leur rapport m/z . Plus ce rapport est important, plus la valeur q_z de l'ion piégé sera faible et son énergie cinétique élevée. **(B)**. En augmentant l'amplitude du voltage de la rf, la valeur q_z de chaque ion est augmentée jusqu'au seuil critique ($q_{\text{éjecte}} = 0.908$) à partir duquel leurs coordonnées se situent dans la zone d'instabilité axiale. A ce moment, les ions sont défocalisés axialement vers les « end cap » ce qui leur permet de sortir des pseudo puits de potentiel (gain en énergie cinétique).

Pour que l'ion soit éjecté du piège, son excursion radiale ne doit pas excéder le diamètre des perforations présentes sur la « end cap » de sortie. Il est donc nécessaire de restreindre le déplacement radial de l'ion lors de sa déstabilisation axiale. La présence d'hélium à une pression d'environ 10^{-3} Torr permet de contrôler la trajectoire radiale des ions déstabilisés par les biais de collisions (principe du refroidissement énergétique) (March, 1992).

La gamme de masse explorée avec ce type d'éjection est étroitement liée à la puissance du générateur. En effet les ions de rapport m/z important ont des q_z faibles ; la rampe rf doit atteindre des valeurs élevées pour amener les ions au point $(0, q_{\text{éjecte}})$ et permettre leur détection. Au niveau des trappes commerciales, la puissance des générateurs est limitée ce qui conduit à jouer sur la fréquence angulaire Ω du potentiel ϕ_0 pour moduler la gamme de masse. Diminuer Ω revient à décroître la valeur de q_z ce qui augmente la gamme de masse, et inversement. Il existe une autre possibilité pour améliorer la gamme de masse : forcer les ions à sortir du piège à une valeur inférieure à $q_{\text{éjecte}} = 0.908$ (éjection par résonance) (Kaiser *et al.*, 1989). Ce mode d'éjection permet également de s'affranchir de l'effet d'espace de charge (lié à l'éjection) à l'origine de la perte de résolution en basse masse.

2.2.4.1.2) L'éjection par résonance (modulation axiale)

L'éjection par résonance permet de déstabiliser la trajectoire des ions avant le point $(0, q_{\text{éjecte}})$ en appliquant un potentiel oscillant supplémentaire (ac) d'une centaine de mV sur les électrodes « end cap ». A l'origine, le terme « modulation axiale » représentait uniquement l'éjection résonante des ions à une fréquence de 485 kHz et une valeur q_z légèrement inférieure à $q_{\text{éjecte}}$ (Sika *et al.*, 1988). Ce mode d'éjection, dit dipolaire, introduit des zones d'instabilité à l'intérieur même du diagramme de Mathieu. Pour que l'ion soit éjecté avant $q_z = 0.908$, ce dernier doit gagner rapidement l'énergie cinétique (E_c) nécessaire pour s'échapper des pseudo puits de potentiel. Le mouvement des ions est caractérisé par ses fréquences séculaires axiales ($\omega_{(z,0)} = \beta_z \Omega / 2$) et radiales ($\omega_{(r,0)} = \beta_r \Omega / 2$). Lorsque le potentiel ac appliqué sur les « end-cap » atteint la valeur $\omega_{(u,0)}$, avec $u = r$ ou z , l'ion entre en résonance et gagne ainsi l' E_c nécessaire pour sortir du piège (Figure 31).

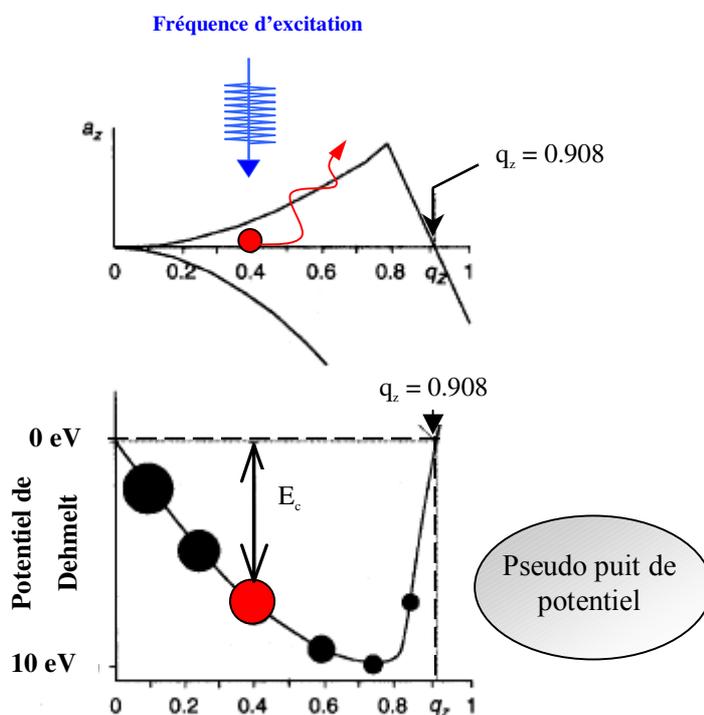


Figure 31 : Principe général de l'éjection par résonance. L'application du potentiel oscillant sur les « end-cap » introduit une zone d'instabilité au niveau du diagramme de Mathieu. Lorsque la valeur de l'onde irradiante (ou fréquence d'excitation) atteint celle de la fréquence axiale du mouvement séculaire de l'ion ($\omega_{(z,0)}$), ce dernier entre en résonance et gagne rapidement l'énergie cinétique nécessaire (notée E_c) pour échapper au pseudo puits de potentiel. Dans ces conditions, l'éjection se produit à une valeur de q_z inférieure à $q_{\text{éjecte}} = 0.908$ (Figure adaptée de Jonscher et Yates, 1997).

De manière conceptuelle, ce mode d'éjection par résonance va créer un 'trou' dans la zone de stabilité axiale et radiale à la valeur q_z correspondant à la fréquence de l'onde irradiante

appliquée sur les « end-cap » (Wong et Cooks, 1997). Il est ainsi possible d'amener les ions de rapport m/z différents à avoir la même fréquence de résonance en modifiant leurs coordonnées par modulation de la rf (Figure 32A). L'éjection par résonance peut également être réalisée sans modifier la rf appliquée sur l'électrode circulaire. Dans ce cas de figure, la fréquence de l'onde irradiante est modulée par paliers successifs (Figure 32B) ou de manière continue par bande de ac (Figure 32C) afin d'explorer le maximum de valeurs q_z au cours de l'éjection.

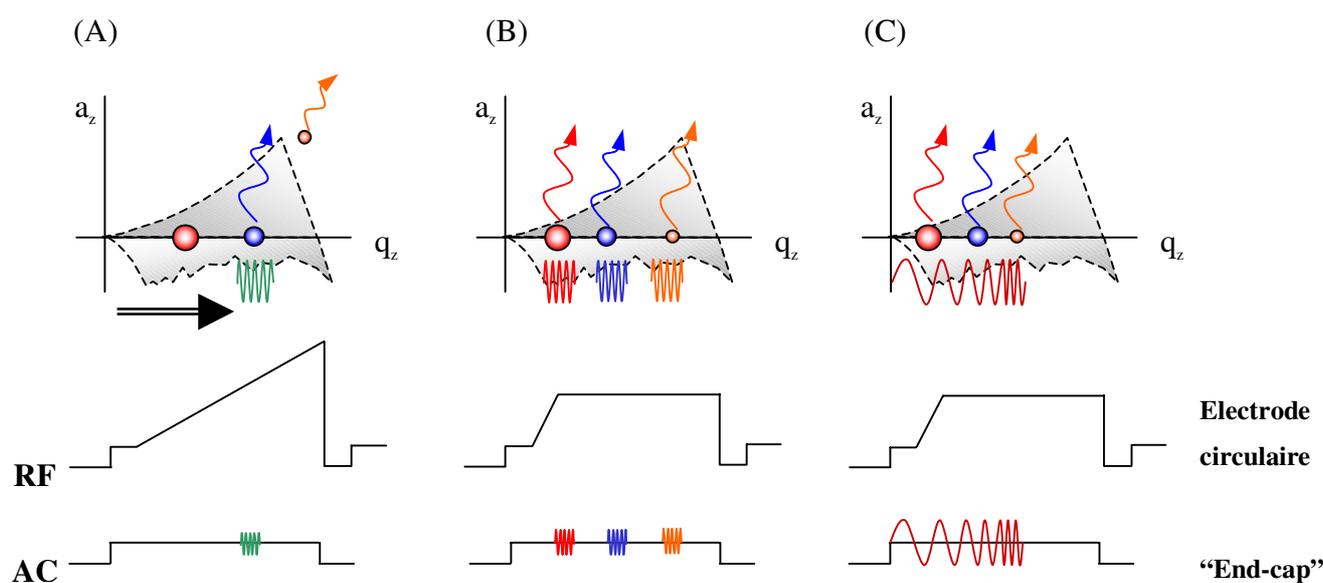


Figure 32 : Méthodes de détection des ions par éjection résonante combinée ou non à une rampe rf. **(A)**. Une seule fréquence de résonance est appliquée sur les « end-cap » et les ions sont amenés jusqu'à ce point d'instabilité grâce à la rampe rf. **(B)**. La fréquence de résonance est modifiée par paliers au cours de l'éjection de manière à balayer plusieurs valeurs de q_z . La tension de confinement, c'est-à-dire la rf, reste fixe lors de l'éjection « masse sélective ». **(C)**. Une bande de ac est appliquée sur les « end-cap » avec une tension de confinement fixe de manière à explorer le maximum de fréquence d'excitation.

Le gain rapide d'énergie cinétique obtenue par résonance est considéré comme linéaire si le champ quadripolaire est pur et uniforme. Hors ce dernier est multipolaire ce qui sous-entend que le champ quadripolaire n'augmente pas forcément de manière linéaire lorsque l'on s'éloigne du centre de la trappe. Dans ces conditions, des zones de résonance non linéaire apparaissent au sein du diagramme de stabilité et permettent aux ions de gagner encore plus rapidement l'énergie requise pour s'échapper du piège (Franzen, 1993).

2.2.4.2) Confinement sélectif des ions

Le confinement sélectif des ions (mode SIS : Select Ion Storage) intervient lors des expériences de fragmentation et consiste à isoler spécifiquement une population d'ions de rapport m/z donné au sein du champ quadripolaire. Plusieurs méthodes de confinement ont été développées utilisant des combinaisons de type modulation de la rf / éjection résonante, modulation de la rf / composante continue (dc) du potentiel ϕ_0 ou alors simple modulation de la rf par balayage rapide (March *et al.*, 1992 ; March *et al.*, 1993). Nous aborderons dans cette partie deux exemples de confinement sélectif des ions.

La première méthode utilise la combinaison rf / dc (Strife et Keller, 1988). L'espèce ionique à isoler est amenée par augmentation de la rf au dessous de l'apex (coordonnée (0, 0.78)) formé par le croisement des lignes $\text{iso-}\beta_r = 0$ et $\text{iso-}\beta_z = 1$ (Figure 33). Cette opération permet d'éliminer de la trappe une grande partie des ions de rapports m/z inférieurs à l'espèce à isoler. L'application d'une tension $-U$ sur l'électrode circulaire augmente le paramètre a_z (jusqu'à la valeur 0.15) des ions piégés. L'ion à isoler se trouve alors au niveau de l'apex du diagramme de stabilité c'est à dire proche de la valeur critique du paramètre a_z à partir de laquelle l'ion est défocalisé. Parallèlement, les ions voisins de l'espèce à isoler voient leurs coordonnées passer hors du diagramme de stabilité. Ceux de rapports m/z supérieurs coupent la ligne $\text{iso-}\beta_r = 0$ et sont défocalisés radialement. Au contraire les ions de rapport m/z inférieurs sont éjectés du pseudo puit de potentiel axialement. Au terme de cette opération, seule l'espèce présente à l'apex du diagramme de Mathieu reste confinée dans la trappe. Par la suite, la dc est coupée tout comme la rampe rf afin de replacer l'ion isolé dans sa configuration originale, c'est à dire à son niveau énergétique le plus stable. Il est également possible d'associer à la rampe de rf une modulation axiale (sur les « end-cap ») à une fréquence supérieure ou égale à 485 kHz de manière à faciliter l'éjection des espèces de m/z inférieurs à l'ion à isoler.

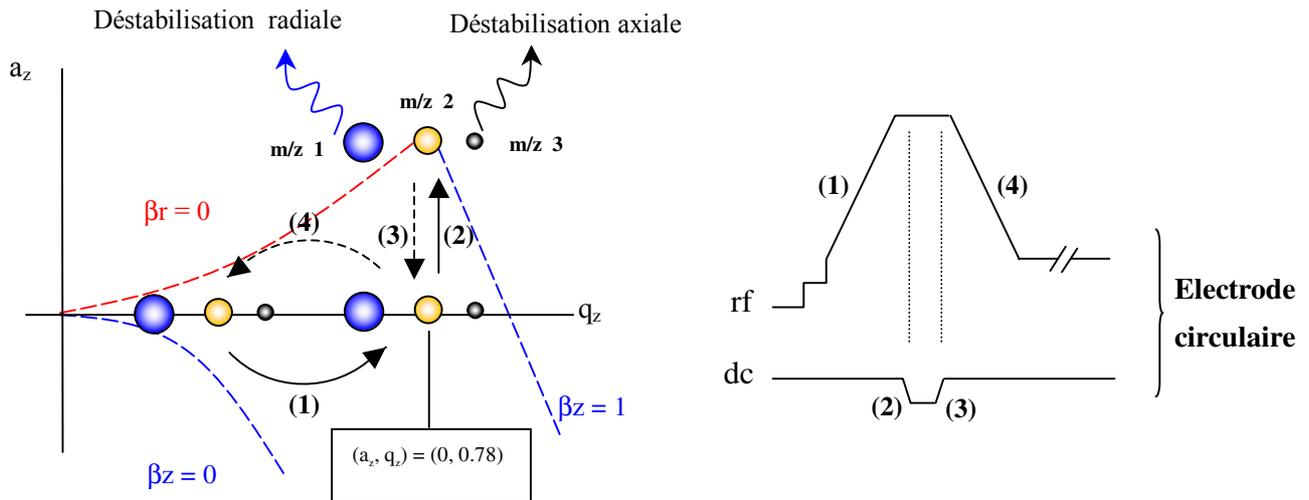


Figure 33 : Méthode de confinement des ions par application d'une rf et d'une composante continue (dc) sur l'électrode circulaire. **(1)** La rampe rf permet de positionner l'espèce à isoler (en jaune, m/z 2) au dessous de l'apex du diagramme de stabilité $[(a_z, q_z) = (0, 0.78)]$. **(2)** L'application de la tension négative jusqu'à la valeur $a_z = 0.15$ positionne l'ion d'intérêt au niveau de l'apex (coordonnées $(0.15, 0.78)$). Lors de cette opération, les ions de rapports m/z supérieurs (en bleu, m/z 1) sont éjectés du pseudo puit de potentiel par défocalisation radiale ; ceux de m/z inférieurs (en gris, m/z 3) subissent une défocalisation axiale. **(3)** Le potentiel dc est coupé afin de repositionner l'ion au dessous de l'apex. **(4)** La rf est diminuée progressivement ; l'ion confiné retrouve ses coordonnées initiales au niveau du diagramme de stabilité.

La seconde méthode SIS combine la modulation de la rf et la déstabilisation par résonance (Figure 34). L'espèce ionique à confiner est amenée par balayage de la rf, jusqu'à la valeur limite de stabilité $q_{\text{éjecte}} = 0.908$; les ions de rapports m/z inférieurs sont ainsi éliminés par déstabilisation axiale. La valeur de la rf est par la suite ajustée et permet de diminuer la valeur q_z de l'ion d'intérêt ce qui améliore sa stabilité et modifie la fréquence de son mouvement séculaire. Les ions de rapport m/z supérieurs sont éjectés de la trappe par résonance. Un balayage en fréquence (bande de ac) est appliqué sur les « end-cap » ; ce dernier est stoppé juste avant d'atteindre la valeur de la fréquence séculaire radiale ($\omega_{(r,n)}$) de l'ion à confiner. Enfin, la rf est diminuée progressivement et l'ion retrouve ses coordonnées initiales au niveau du diagramme de stabilité. La rampe rf peut également être associée à une modulation axiale de fréquence supérieure ou égale à 485 kHz.

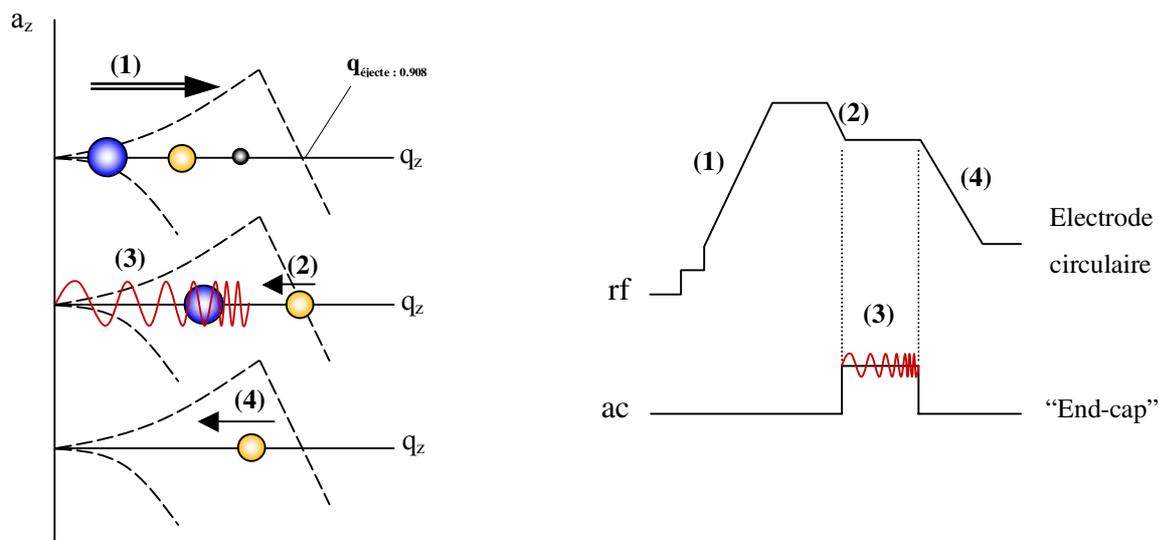


Figure 34 : Sélection d'un ion par combinaison rf / résonance. (1) L'ion à isoler (en jaune) est amené jusqu'à la valeur critique $q_{\text{éjecte}} = 0.908$ par augmentation de la rf ; les ions de rapport m/z inférieurs (en gris) sont éliminés. (2) Ajustement de la valeur de la rf ; l'ion d'intérêt voit son paramètre de trappe q_z diminuer et sa fréquence propre modifiée. (3) Ejection résonante des ions de rapports m/z supérieurs. (4) La rf est diminuée progressivement jusqu'au point de fonctionnement initial.

2.2.4.3) Fragmentation des ions par excitation résonante

Le principe de résonance peut être utilisé aussi bien pour l'éjection des ions de la trappe que pour les expériences de fragmentation (pour revues March *et al.*, 1989, March *et al.*, 1990 ; March *et al.*, 1991 ; Alfred *et al.*, 1993 ; March, 2000). Dans les deux cas, l'objectif est d'augmenter l' E_c des ions selon le même principe mais dans des proportions différentes. Lors de la phase d'éjection, l'amplitude du potentiel oscillant appliqué sur les « end-cap » permet un gain d' E_c rapide et supérieur à la barrière énergétique représentée par la hauteur du pseudo puit de potentiel. Cette opération déstabilise suffisamment la trajectoire de l'ion et lui permet de sortir du piège. Dans le cas de l'excitation par résonance, l'amplitude de l'onde irradiante tout comme sa durée d'application sont modérées de manière à limiter l'absorption d' E_c par l'ion (Alfred *et al.*, 1993). Sous ces conditions, l'ion en résonance voit son E_c augmenter progressivement sans jamais dépasser celle du potentiel de Dehmelt et reste ainsi confiné dans le pseudo puit de potentiel. Lors de cette excitation, l'ion prend de la vitesse et ses excursions radiales et axiales s'amplifient depuis le centre de la trappe (Figure 35). Les études de simulation de déplacement d'ions lors de l'excitation montrent qu'un phénomène de compétition s'instaure : d'un coté l'onde irradiante augmente l' E_c et le déplacement de l'ion depuis le centre du piège, de l'autre les collisions répétées avec les atomes d'hélium tendent à diminuer cette énergie et à refocaliser la trajectoire de l'ion vers le centre de la trappe (March

et al., 1989). Au cours de ces collisions, une partie de l' E_c de l'ion est transformée en énergie interne (E_i) jusqu'à un point de rupture. A ce stade, l'ion se fragmente et donne naissance à des ions fils. Ce procédé appelé « dissociation induite par collisions » ou CID (Collision-induced dissociation) est couramment utilisé lors des expériences de spectrométrie de masse tandem (voire chapitre suivant).

L'excitation par résonance peut également être utilisée pour d'autres expériences comme les réactions ions / molécules en phase gazeuse ou encore la détection *in situ* des ions sans éjection (March, 2000). Cette méthode de détection particulière permet une mesure non destructive du rapport m/z de l'ion confiné. L' E_c de l'ion est augmentée jusqu'à ce que sa trajectoire soit le plus proche possible des électrodes « end-cap » de manière à générer une « image électrique » détectable.

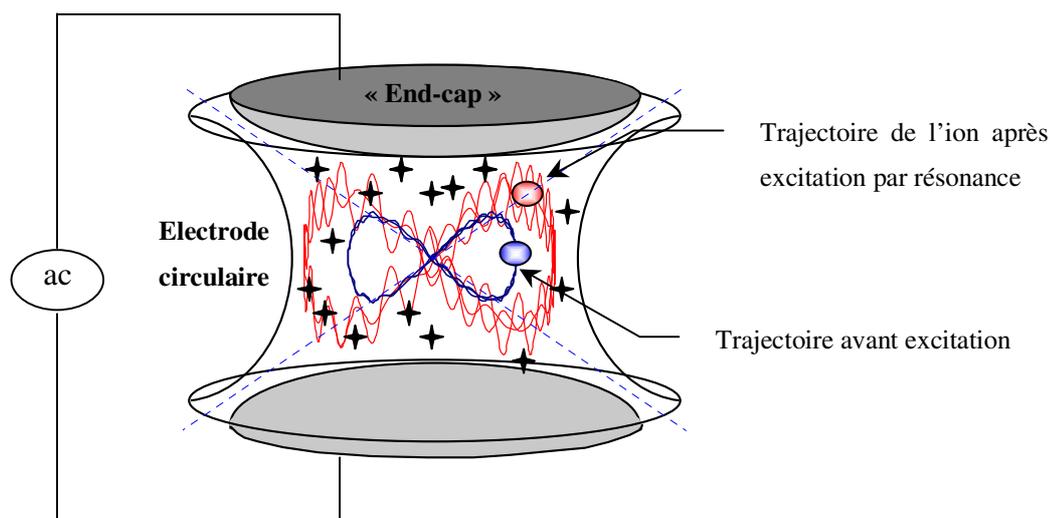


Figure 35 : Effet de l'excitation par résonance sur la trajectoire d'un ion préalablement isolé. La trajectoire de l'ion avant l'application de l'onde irradiante est représentée en bleu au même titre que l'ion. Lorsque le potentiel ac est appliqué sur les « end-cap », l' E_c de l'ion en résonance (en rouge) augmente progressivement sans atteindre la valeur du potentiel de Dehmelt. Parallèlement ses excursions axiales et radiales (trajectoires en rouge) s'amplifient tout comme le nombre de collisions avec les atomes d'hélium environnant (représentés par des étoiles noires). Une partie de l' E_c de l'ion est transformée en énergie interne (E_i) jusqu'au point de fragmentation : l'ion se dissocie pour donner naissance à des ions « fils » (principe de la dissociation induite par collisions successives).

III) Expériences de fragmentation par spectrométrie de masse

Comme décrit dans le chapitre précédent, il est possible d'isoler une espèce ionique, de la fragmenter en augmentant son énergie interne et de détecter les ions « fils » générés. Ce procédé est appelé spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS. Suivant les appareils utilisés, on distingue deux types de MS/MS :

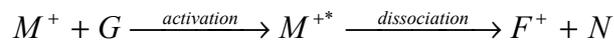
- la MS/MS « spatiale » : plusieurs analyseurs de masse sont couplés (cas du triple quadripôle API III+) ; le premier (MS_1) sert à la sélection de l'ion précurseur ou parent, le second va être utilisé comme cellule de collision et le dernier (MS_2) va permettre d'analyser les fragments générés. Dans ce cas de figure, le nombre de MS^n , avec $n =$ nombre d'expériences, est directement lié à la quantité d'analyseurs couplés ;
- la MS/MS « temporelle » : dans ce cas, un seul analyseur est utilisé et l'ensemble des opérations (isolation, fragmentation et analyse) se déroule au même endroit à des intervalles de temps spécifiques. Les ions générés par dissociation peuvent à leur tour subir une étape d'isolation, de fragmentation et ainsi de suite ce qui donne accès à la MS^n . Ce type de MS/MS se rencontre au niveau des trappes ioniques (Louris *et al.*, 1990) et des analyseurs à résonance cyclotronique.

Toutes les expériences de fragmentation réalisées au cours de ce travail ont été menées sur la trappe ionique. Cet analyseur offre deux avantages en mode MS/MS. Premièrement, la trappe ionique fonctionne en mode pulsé ce qui lui permet d'accumuler au cours du temps les ions de m/z à fragmenter. Dans ces conditions, le rapport signal sur bruit peut être maintenu constant au cours de l'expérience. Deuxièmement, la trappe permet d'accéder aux voies de fragmentation de faibles énergies. Il est cependant possible d'accéder à des voies de fragmentation de plus hautes énergies d'activation en alternant successivement les périodes d'excitation par résonance et de refroidissement énergétique par collisions. Etant donné que l' E_i diminue moins rapidement que l' E_c lors du refroidissement, la quantité d' E_i s'accumule progressivement au cours des excitations successives jusqu'à atteindre plusieurs eV (March, 2000). Dans cette partie, deux points seront abordés : d'une part le principe général de la fragmentation par collision et d'autre part l'application de ce procédé à la réalisation de cartes peptidiques.

3.1) Principe général

Le principe de transfert d'énergie cinétique en énergie interne est régi par les lois de collisions entre un objet mobile (l'ion) et une cible statique (le gaz de collision). Au cours de

ces collisions, supposées inélastiques, l'ion (M^+) voit son énergie interne augmenter jusqu'à sa dissociation en fragments F^+ et en espèces neutres (N) :



avec G le gaz de collision et M^{+*} l'ion dans un état excité. La transformation d'énergie cinétique en énergie interne (vibrationnelle et/ou électronique) fait passer le niveau énergétique de l'ion de E à E + Q ce qui lui permet de franchir la barrière d'énergie d'activation E_0 . Lors de l'étape de dissociation, l'excès d'énergie interne est en partie perdu sous la forme d'énergie cinétique (Figure 36).

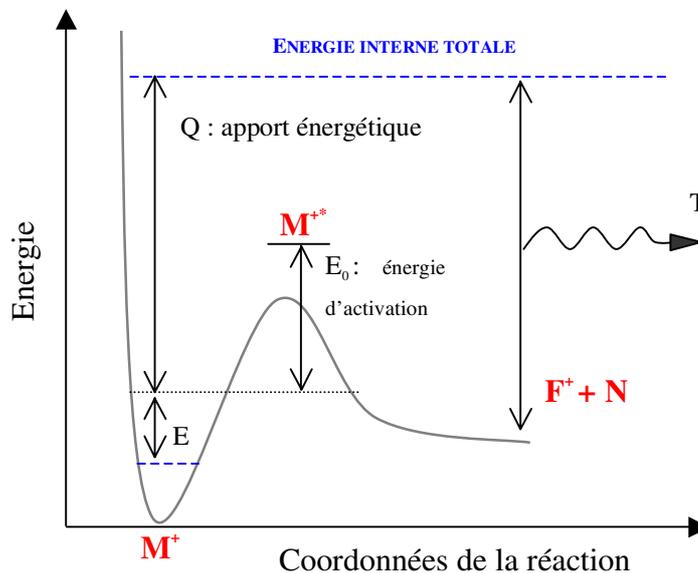


Figure 36 : Chemin réactionnel du procédé de dissociation par collision. Sous l'effet des collisions répétées avec les atomes de gaz neutre, l'énergie interne initiale de l'ion M^+ (E) passe au niveau $M + Q$ ce qui lui permet de passer la barrière énergétique d'activation E_0 et de se fragmenter. Au cours de la dissociation, l'excès d'énergie interne est perdu sous forme d'énergie cinétique (T).

L'énergie cinétique qui peut être transformée en énergie interne est dite de centre de masse (E_t), et se calcule au moyen de l'équation suivante :

$$E_t = E_c \frac{m}{m + M}$$

avec m la masse du gaz de collision, M la masse de l'ion et E_c son énergie cinétique dans le référentiel considéré (De Hoffmann *et al.*, 1994). D'après cette équation, plus la masse de

l'ion à fragmenter est importante, plus l'énergie de centre de masse diminue et donc l'efficacité des collisions. Il est toutefois possible d'améliorer le rendement des collisions en augmentant la masse du gaz jusqu'à un certain point. En effet, plus la taille du gaz est augmentée, plus les dispersions angulaires des ions fragments seront élevées ce qui est défavorable à leur focalisation (et donc leur détection). Ainsi les gaz les plus utilisés sont l'hélium, l'argon voire le xénon. Au niveau de la trappe ionique ESQUIRE 3000+ utilisée lors des expériences de fragmentation, le gaz de collision présent dans l'analyseur est de l'hélium à une pression de $\sim 4.10^{-6}$ mbar.

3.2) Application : réalisation de cartes peptidiques

Dans le cas de notre étude, les expériences de fragmentation au sein de la trappe ionique ont été réalisées afin d'obtenir la carte peptidique d'Eg5 et de CENP-E après digestion enzymatique par une protéase aspécifique. Les régimes de collisions au sein de la trappe sont de basse énergie ce qui implique que l' E_c de l'ion précurseur est inférieure au keV. Cette donnée énergétique nous informe sur les mécanismes possibles de dissociation des peptides. La nomenclature proposée par Roepstorff et Fohlman puis complétée par Biemann permet de caractériser les différents fragments susceptibles d'être générés après rupture d'une ou deux liaisons peptidiques (Roepstorff et Fohlman, 1984 ; Biemann, 1988). Lorsque la charge est portée par la partie N-terminale du fragment, les ions sont de type a_n , b_n et c_n où n représente le nombre d'acide aminé ; lorsque la charge est présente du côté C-terminale on parle alors d'ions de type x_n , y_n et z_n (Figure 37). Cette nomenclature tient également compte de la nature de la liaison clivée. La rupture de la liaison peptidique peut s'effectuer à trois niveaux distincts : entre $C_\alpha - C$ (ions a_n et x_n), entre $C - N$ (ions b_n et y_n) et entre $N - C_\alpha$ à l'origine des ions c_n et z_n . On distingue également deux autres types de fragments qui résultent du clivage d'au moins deux liaisons peptidiques internes à la chaîne polypeptidique. Le premier type est appelé fragment interne car ce dernier a perdu simultanément les parties N et C-terminales initiales (Figure 37). Les fragments internes sont en général produits par un double clivage de type b et y (on parle alors d'ion amino-acylium). Néanmoins, ces derniers peuvent également être formés par un double clivage de type a et y ; dans ce cas de figure le fragment interne généré est de type amino-immonium. Le second type de fragment est appelé ion immonium. Ces ions, qui résultent de clivages multiples du polypeptidique, ne contiennent qu'une seule chaîne latérale (Figure 37).

Ces voies de fragmentation vont ainsi permettre de déterminer la séquence en acides aminés du peptide en analysant les différences de masse des ions consécutifs provenant de sa fragmentation par collisions.

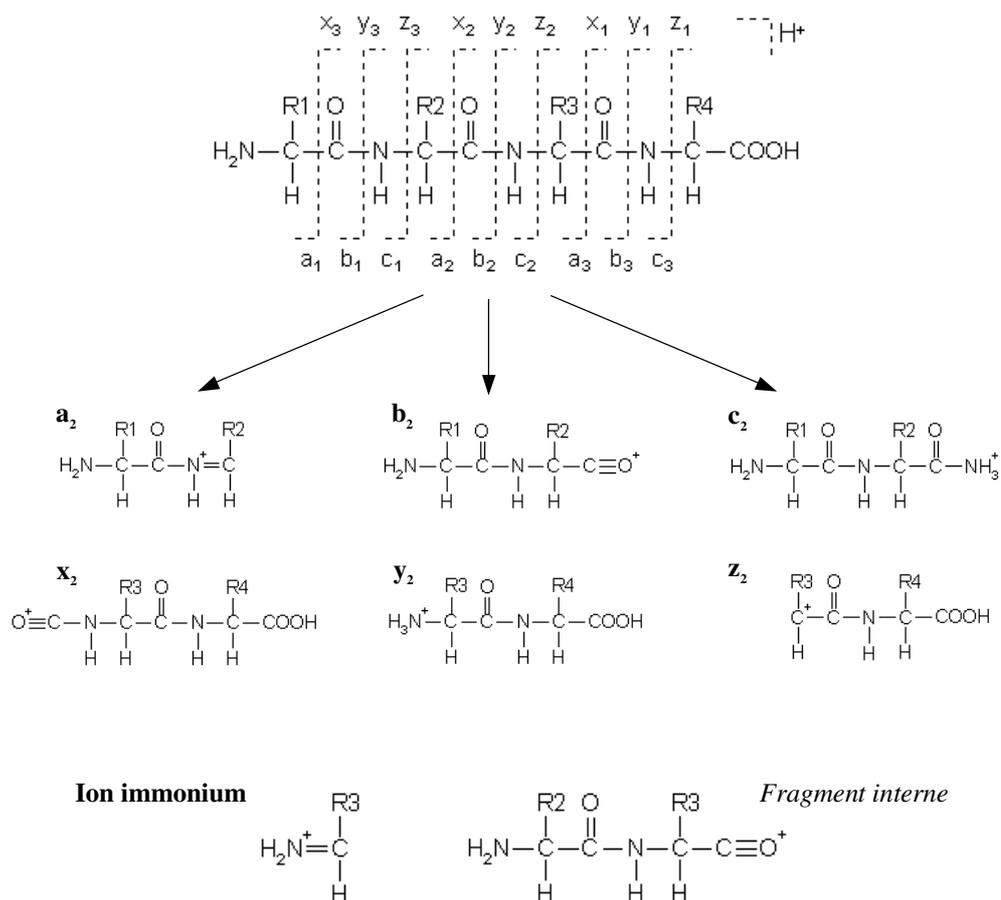


Figure 37 : Principales voies de fragmentation par CID des peptides proposées par Roepstorff et Fohlmann. Lorsque la charge est retenue par la partie N-terminale, les ions obtenus sont notés a_n, b_n et c_n ; lorsque cette dernière est du côté C-terminal, les ions sont appelés x_n, y_n et z_n. La dénomination des ions tient compte de la nature de la liaison clivée. La rupture d'au moins deux liaisons peptidiques donnent naissance à deux fragments supplémentaires en faible abondance : les fragments internes et les ions immoniums (http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html).

Chapitre III

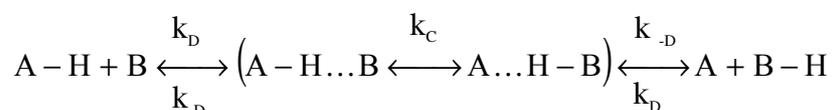
Les échanges hydrogène/deutérium

Les échanges hydrogène/deutérium (H/D) sont utilisés depuis plus de 40 ans afin d'étudier la structure et la dynamique des protéines. La vitesse d'échange isotopique d'un hydrogène est en effet dépendante de son accessibilité au solvant mais également de son implication dans des liaisons hydrogène. Ainsi, les hydrogènes exposés à la surface d'une protéine s'échangeront plus rapidement que ceux enfouis à cœur ou participant à la stabilisation des structures secondaires (hélices α et feuillets β). Différentes techniques physiques peuvent être employées pour quantifier l'échange H/D comme la spectroscopie infrarouge, ultraviolet ou la résonance magnétique nucléaire. Ce n'est que depuis une quinzaine d'années que l'échange H/D est couplé à l'analyse en spectrométrie de masse. La première association échanges H/D – spectrométrie de masse (H/D-MS) pour l'étude structurale de protéine a été réalisée par Katta et Chait (Katta et Chait, 1991). Ces auteurs ont utilisé le couplage H/D-MS afin de caractériser les modifications conformationnelles générées sur l'ubiquitine bovine par un acide et un alcool. Les applications de ce couplage se sont depuis étendues à l'analyse de la stabilité structurale des protéines, à l'identification des intermédiaires de dépliement/repliement, mais également à la localisation des zones de contact protéine/partenaires.

Au cours de ce chapitre, nous aborderons successivement le mécanisme physico-chimique des échanges H/D au sein d'une protéine ainsi que les moyens permettant de contrôler les vitesses d'incorporation. La dernière partie sera consacrée aux différentes applications de cette technique en biologie structurale, dont l'étude des interactions protéines/partenaires.

I) Mécanisme général des échanges isotopiques au sein d'une protéine ou d'un peptide

On distingue trois types d'hydrogène au sein d'une protéine : les hydrogènes liés de manière covalente à un carbone, non concernés par les échanges isotopiques ; les hydrogènes labiles des chaînes latérales qui s'échangent (et se ré-échantent) trop rapidement pour être mesurés par la plupart des techniques analytiques ; et les hydrogènes des liaisons peptidiques dont la vitesse d'échange est suffisamment « lente » pour être mesurée. Le mécanisme d'échange se fait par deux procédés chimiques distincts faisant intervenir soit le catalyseur H_3O^+ soit le catalyseur OH^- selon l'équation réactionnelle suivante (Englander et Kallenbach, 1984) :



ou A-H représente le donneur de proton et B l'accepteur. En solution, les phénomènes de collision limitée par diffusion entre donneur et accepteur ainsi que la formation de la liaison A-H...B se produisent avec une constante de vitesse du second ordre notée k_D . Une fois le complexe A-H...B formé, l'échange se produit rapidement jusqu'à atteindre l'état d'équilibre caractérisé par la constante $k_c = 10^{\Delta pK}$, avec $\Delta pK = pK_B - pK_A$. A ce stade, deux possibilités de dissociation du complexe : soit vers la gauche, dans ce cas on retourne à l'état initial A-H + B ; soit vers la droite ce qui correspond à un transfert positif. Ce mécanisme réactionnel tient compte de la non-homogénéité de l'environnement des hydrogènes amidiques rencontrée au sein d'une protéine et intègre ainsi deux composantes essentielles :

- un paramètre structural représentatif des dynamiques de dépliement/repliement de la protéine ; cette dynamique est caractérisée par la constante de vitesse notée k_D ;
- un facteur chimique (k_c) représentatif de la vitesse d'échange des hydrogènes complètement exposés au solvant deutéré au sein de zones non structurées.

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer le phénomène de « levée » des barrières structurales à l'origine du ralentissement des échanges isotopiques au sein d'une protéine. Les premières impliquent la pénétration du solvant au sein même des parties enfouies à cœur ou très structurées ; les autres font intervenir des modifications conformationnelles locales ou non qui permettent de modifier l'accessibilité du solvant deutéré (Woodward *et al.*, 1982 ; Englander et Kallenbach, 1984 ; Miller et Dill, 1995). A

l'heure actuelle, il est admis que l'échange isotopique peut se produire de deux manières : soit directement au contact du solvant (Figure 38A), soit après dépliement de la protéine (Figure 38B) (Engen et Smith, 2000).

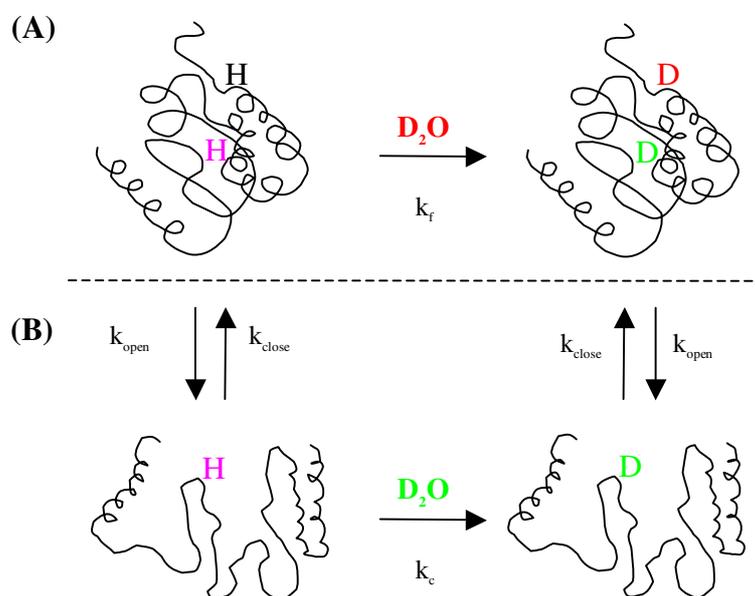


Figure 38 : Représentation schématique des deux modèles d'échange H/D admis au sein d'une protéine. L'hydrogène amidique directement exposé au solvant deutéré est coloré en bleu, celui enfoui à cœur de la protéine en mauve. **(A)**. L'hydrogène amidique localisé à la surface de la protéine est directement échangé contre du deutérium, sans dépliement, avec une constante de vitesse k_r . **(B)**. Le dépliement transitoire de la protéine (qui peut être localisé ou global) permet d'exposer au solvant deutéré les hydrogènes amidiques situés à cœur de la protéine. Les constantes de vitesse de dépliement/repliement sont désignées par k_{open} et k_{close} , respectivement. La constante k_c (facteur chimique) correspond à la vitesse d'échange des hydrogènes complètement exposés au solvant deutéré après modification de la structure de la protéine.

D'après ces modèles, les échanges directs ne concernent que les hydrogènes amidiques présents à la surface de la protéine et non impliqués dans les interactions hydrogène. A l'inverse, les hydrogènes impliqués dans le maintien des structures secondaires ou localisés à cœur de la protéine nécessitent une modification structurale de la protéine. Ce phénomène de dépliement en solution, qui peut être local ou global, permet d'accroître l'accessibilité des ces hydrogènes amidiques au solvant deutéré mais nécessite une rupture transitoire des liaisons intramoléculaires. On distingue ainsi deux types de cinétiques d'échange H/D : les EX1 et les EX2 (Smith *et al.*, 1997). On parle de cinétique EX1 lorsque la vitesse de deutération est supérieure à la vitesse de repliement de la protéine ($k_c \gg k_{close}$). Dans ce cas, la *quasi* totalité des hydrogènes amidiques sont échangés avant le repliement. Lorsque l'échange suit une cinétique de type EX2, la constante d'échange est cette fois-ci inférieure à la constante de repliement ($k_c \ll k_{close}$). Le remplacement de l'ensemble des hydrogènes amidiques par des

deutériums nécessitera donc plusieurs cycles successifs de dépliage/repliage. Ces deux types de cinétique sont facilement identifiés par spectrométrie de masse grâce à leurs profils caractéristique de deutération au cours du temps.

II) Contrôles des échanges hydrogène/deutérium

La vitesse d'échange isotopique d'un hydrogène amidique est fonction à la fois de son accessibilité mais également de son environnement proche. Les chaînes latérales des acides aminés voisins vont en effet modifier les vitesses de deutération par effet inductif. Ce phénomène a été mis en évidence sur des dipeptides modèles (Bai *et al.*, 1993 ; Connelly *et al.*, 1993). Deux autres paramètres vont également moduler les échanges H/D : le pH et la température. Ces derniers représentent les seuls moyens de contrôle des échanges et ré-échanges au niveau expérimental.

2.1) Contrôle par le pH

Le pH est certainement le paramètre le plus influant sur la vitesse d'échange. Comme décrit précédemment, le mécanisme d'échange isotopique se fait à la fois par catalyse acide et basique. Ainsi, la constante de vitesse d'échange des hydrogènes amidiques, notée k_{ex} , peut être exprimée de la manière suivante (Smith *et al.*, 1997) :

$$k_{ex} = k_H [H^+] + k_{OH} [OH^-]$$

où k_H et k_{OH} représentent les constantes de vitesse d'échange en milieu acide et basique avec $k_H \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $k_{OH} \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Englander et Kallenbach, 1984). Les fluctuations de la constante de vitesse d'échange k_{ex} en fonction du pH ont été étudiées sur un peptide modèle de type polyalanine (Bai *et al.*, 1993). Lorsque le pH est supérieur à 3, la vitesse d'échange isotopique est principalement conditionnée par la catalyse basique ; inversement, lorsque le pH est inférieur à 2, $k_{OH}[OH^-]$ devient négligeable devant $k_H[H^+]$ et la vitesse d'échange isotopique est fonction, principalement, de la catalyse acide (Figure 39).

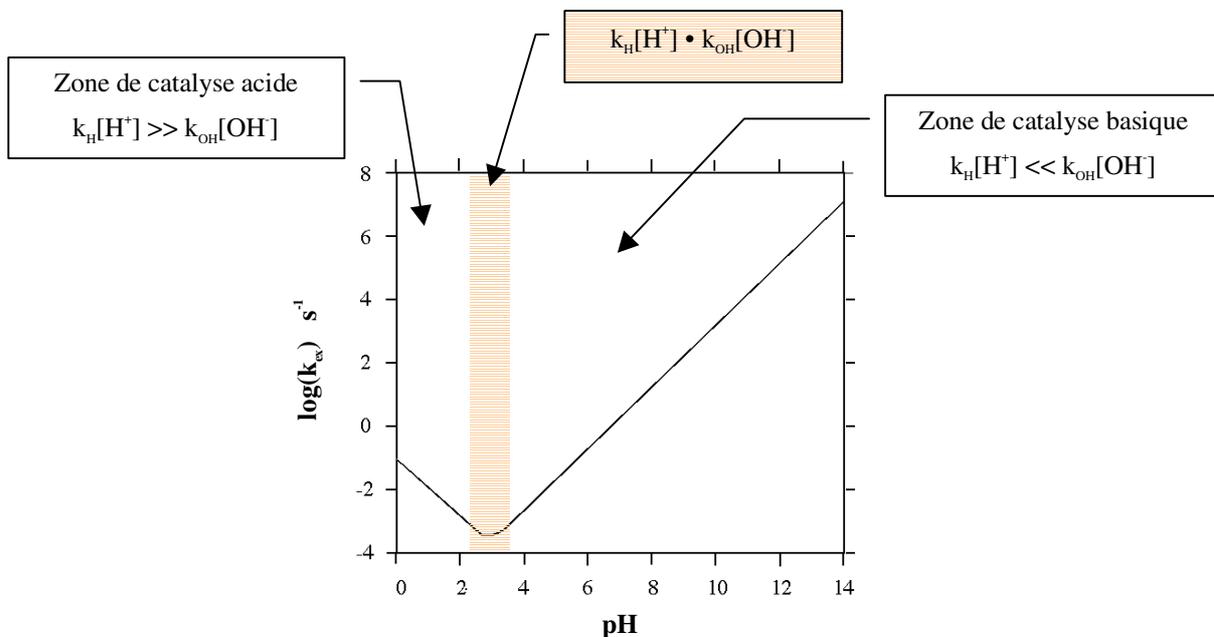


Figure 39 : Effet du pH sur la constante de vitesse d'échange isotopique k_{ex} dans un peptide modèle de type polyalanine. Lorsque le pH est inférieur à 2, la catalyse est principalement acide. A l'inverse, lorsque le pH est supérieur à 3, la catalyse basique devient prédominante. La constante d'échange isotopique atteint sa valeur minimale lorsque le pH est compris entre 2 et 3 (Bai *et al.*, 1993).

Le minimum d'échange est observé lorsque la vitesse de catalyse basique est équivalente à la catalyse acide ($k_H[H^+] \cdot k_{OH}[OH]$), c'est à dire dans la zone de pH 2-3 (Figure 39). En dehors de cette fenêtre, chaque variation d'une unité de pH modifie d'un facteur 10 la vitesse d'échange isotopique (Bai *et al.*, 1993).

2.2) Contrôle par la température

La température représente le second paramètre de contrôle des échanges isotopiques (Smith *et al.*, 1997). Ce dernier a moins d'impact sur la constante de vitesse d'échange par comparaison au pH. L'étude réalisée par Bai *et al.*, sur des peptides modèles montre que la constante d'échange est modifiée d'un facteur 3 quand la température est changée par palier de 10°C (Bai *et al.*, 1993). Ainsi, la vitesse d'échange (et de ré-échange) peut être diminuée d'un facteur 6 lorsque la température de l'échantillon est amenée rapidement 0°C (en considérant que l'échange isotopique est réalisé au départ à une température ambiante de 20°C). La diminution simultanée du pH et de la température permet de ralentir au maximum les échanges isotopiques et de « figer », momentanément, le système dans un état de deutération donné.

III) Etudes structurales des protéines par échanges hydrogène/deutérium

L'étude de la structure et de la dynamique des protéines par H/D-MS nécessite une étape dite de « quenching ». Celle-ci permet de ralentir au maximum les vitesses de ré-échange en dehors des périodes de marquage. En effet, les étapes qui suivent la deutération (notamment le dessalage sur chaîne HPLC) sont effectuées dans des solvants hydrogénés d'où un risque important de perte d'information par ré-échange des deutériums contre les hydrogènes du solvant. Le « quenching » va donc consister à diminuer très rapidement le pH et la température (**2 • pH • 3 ; 0°C**) et à maintenir ces conditions après la période de marquage afin de « figer », de façon transitoire, le système dans un état de deutération donné.

3.1) Conditions de digestion enzymatique

L'analyse structurale de la dynamique de protéines par H/D peut être réalisée soit sur protéine entière, soit après digestion enzymatique de cette dernière (Rosa et Richards, 1979 ; Englander *et al.*, 1985 ; Zhang et Smith, 1993). L'analyse des variations d'incorporation au niveau de fragments peptidiques va permettre :

- d'augmenter la sensibilité de la méthode H/D-MS; il est en effet plus facile de visualiser les faibles modifications d'échange isotopique sur de petits fragments peptidiques plutôt que sur la protéine entière ;
- de localiser plus précisément les zones de la protéine concernées par les modifications structurales.

La digestion enzymatique doit être réalisée juste après l'étape de marquage isotopique, c'est à dire dans les conditions de « quenching ». Peu de protéases fonctionnent dans ces conditions expérimentales à l'exception de la pepsine. Cette enzyme est capable de travailler à 0°C et son activité est maximale à pH 2-3. Bien que peu spécifique, la taille et le nombre des fragments générés après action de cette enzyme peuvent être contrôlés, de manière très reproductible, *via* le temps de digestion.

Récemment, deux autres protéases capables de fonctionner dans les conditions de « quenching » ont été identifiées : la protéase de type XIII d'*Aspergillus saitoi* et la protéase de type XVIII de *Rhizopus* species. Ces enzymes ont été utilisées en combinaison avec la pepsine de manière à affiner la localisation des zones deutérées et d'améliorer le taux de recouvrement des cartes peptidiques de la PBP-2X (Penicillin Binding Protein) et de la créatine kinase et (Cravello *et al.*, 2003 ; Mazon *et al.*, 2005).

3.2) Applications à l'étude structurale des protéines

3.2.1) Stabilité et modifications conformationnelles

Le couplage H/D-MS peut être employé pour évaluer la stabilité et l'hétérogénéité conformationnelles d'une protéine en solution. Cette application a été démontrée par Wang et Tang en utilisant l'apomyoglobine comme système témoin (Wang et Tang, 1996). Au cours de cette étude, la stabilité de la protéine a été déterminée à la fois par dichroïsme circulaire (CD) et H/D-MS. Les résultats obtenus par échanges isotopiques ont permis de compléter ceux observés par dichroïsme circulaire.

Il est également possible d'évaluer les effets de mutations ponctuelles (ou de zone) sur la structure des protéines grâce aux échanges isotopiques (Remigy *et al.*, 1997 ; Jaquinod *et al.*, 1996 ; Codreanu *et al.*, 2005). L'analyse peut être réalisée : **(1)** soit sur la protéine entière afin d'estimer les effets de la mutation sur l'ensemble de la structure ; **(2)** soit après digestion enzymatique de manière à visualiser les éventuelles modifications structurales introduites localement par la mutation. L'association H/D – digestion enzymatique permet ainsi d'accéder à des informations structurales plus détaillées et d'identifier les zones d'une protéine au niveau desquelles les vitesses d'incorporation diffèrent dans les mêmes conditions d'étude (Dharmasiri et Smith, 1996 ; Engen *et al.*, 1997).

La technique des échanges H/D-MS est également employée pour étudier les mécanismes de dépliement/repliement des protéines. Des intermédiaires de dépliement ont été identifiés au niveau de plusieurs protéines comme l'aldolase (Deng et Smith, 1998), la protéine CRABP-1 (Eyles *et al.*, 2000), où encore le lysozyme et l'apomyoglobine grâce à la technique de « quench flow » qui permet d'analyser les phénomènes de dépliement/repliement sur des temps très courts (Tsui *et al.*, 1999 ; Matagne *et al.*, 2000).

3.2.2) Etudes des interactions protéine/partenaires

Le couplage H/D-MS peut être utilisé afin d'identifier les zones de contact entre une protéine et ses partenaires (pour revue Ehring, 1999 ; Garcia *et al.*, 2004). L'interaction protéine/partenaire ralentit les vitesses d'échange isotopique au niveau des zones de contact par exclusion stérique du solvant deutéré. On obtient ainsi un effet de masquage : les hydrogènes localisés dans la zone d'interaction sont protégés grâce à la réduction de leur

accessibilité (Figure 40). Cette méthode a permis de caractériser les zones de contact entre les différents monomères de l'aldolase (Zhang *et al.*, 1996), entre la protéine kinase PKA et un inhibiteur protéique (Mandell *et al.*, 1998), entre la papaine et la cystatine (Akashi et Takio, 2000) où encore un antigène et un anticorps (Yamada *et al.*, 2002).

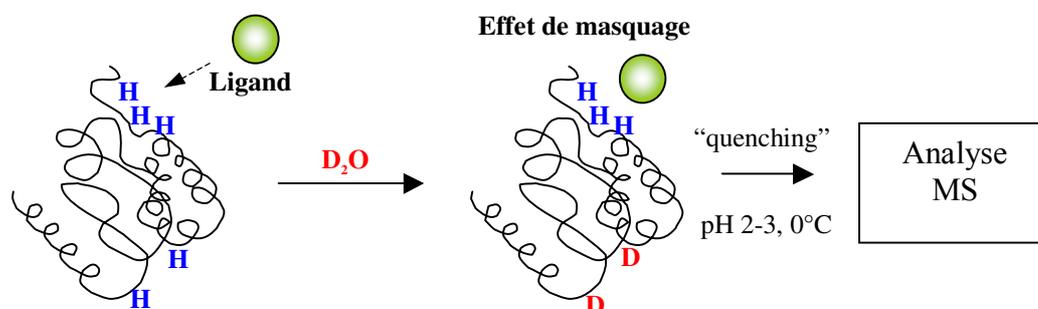


Figure 40 : Identification des zones de contact protéine/partenaire par H/D-MS. La fixation du ligand (en vert) sur la protéine diminue l'accessibilité au solvant deutéré au niveau de la zone de contact. Par conséquent, les hydrogènes amidiques présents au sein de la zone d'interaction ne seront pas échangés contre du deutérium grâce à l'effet de masquage du ligand.

Les exemples d'interaction cités ci-dessus sont de type protéine/protéine. Dans ce cas de figure, les zones concernées par les effets de masquage sont importantes et facilement identifiables par H/D-MS. Les interactions protéines/petites molécules sont plus délicates à visualiser car moins d'hydrogènes amidiques sont protégés par le ligand. Plusieurs études ont été réalisées par H/D-MS en utilisant des modèles d'interaction connus (Wang *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998a ; Wang *et al.*, 1998b ; Ceccarelli *et al.*, 2004). Cependant, dans la majeure partie des cas, la fixation d'un ligand sur une protéine s'accompagne de modifications structurales locales ou diffuses (Anand *et al.*, 2002). Ces changements conformationnels peuvent modifier les vitesses d'incorporation en deutérium. Il devient alors difficile de faire la distinction entre effet de masquage et modifications conformationnelles lorsque la structure cristallographique du complexe étudié n'est pas résolue.

Les interactions Eg5/partenaires étudiées dans cette thèse sont de type protéine/petites molécules ce qui nous confronte d'entrée à ce problème de différenciation. De ce fait, il est nécessaire d'associer à la méthode H/D-MS une seconde approche expérimentale afin de valider ou non les zones identifiées par échange isotopique. La première partie de ce travail a donc été de développer le protocole H/D-MS et de déterminer cette méthode complémentaire.

Nous avons ainsi confirmé les résultats d'échange isotopique par une approche plus « biologique » combinant à la fois mutagenèse dirigée et enzymologie.

Résultats

Chapitre I

Développement du protocole expérimental H/D-MS

Localisation des zones d'interaction et de modifications conformationnelles entre Eg5 et le S-trityl-l-cystéine.

I) Introduction

La première partie de ce travail est orientée vers la validation du protocole H/D-MS nécessaire à l'étude des interactions Eg5/inhibiteurs. Au cours de cette étude, les différentes conditions expérimentales de deutération et d'interaction ont été sélectionnées et la carte peptidique du domaine moteur a été réalisée par LC/ESI/MS/MS après digestion pepsique à 0°C et pH 2.2 (conditions de « quenching »). Les deux premiers inhibiteurs testés sont le monastrol (Mayer *et al.*, 1999) et le S-trityl-l-cystéine (DeBonis *et al.*, 2004). Ces deux molécules inhibent spécifiquement l'activité ATPasique basale et stimulée d'Eg5. Au début de ce travail, aucune structure cristallographique d'Eg5 en présence d'un inhibiteur n'était résolue. Il a donc été nécessaire d'associer à la méthode H/D-MS une seconde approche expérimentale afin de différencier les modifications conformationnelles des effets de masquage liés à la fixation des inhibiteurs.

Cette seconde approche, plus « biologique », combine à la fois mutagenèse dirigée et analyse enzymatique. Les régions d'Eg5 identifiées par H/D-MS ont ainsi été remplacées par les séquences équivalentes provenant de la kinésine conventionnelle de *Neurospora crassa* (NcKHC). NcKHC partage de nombreuses similitudes structurales avec Eg5 (Song *et al.*, 2001). Cependant le monastrol n'exerce aucun effet sur l'activité ATPasique de cette kinésine (DeBonis *et al.*, 2003) ; ainsi les faibles différences structurales qui existent entre ces deux domaines moteur sont suffisantes pour expliquer la spécificité du monastrol. Par conséquent, si les zones identifiées par H/D-MS participent à l'interaction avec le monastrol, leur modification doit abolir son effet sur l'activité ATPasique d'Eg5. Le monastrol a donc été utilisé pour valider l'approche expérimentale H/D-MS mutagenèse dirigée et confirmer les résultats d'échange obtenus avec le S-trityl-l-cystéine.

Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication dans le journal « *Biochemistry* ».

II) Publication : zones d'interaction et de modifications conformationnelles Eg5/STLC

Identification of the Protein Binding Region of S-Trityl-L-cysteine, a New Potent Inhibitor of the Mitotic Kinesin Eg5[†]

Sébastien Brier,[‡] David Lemaire,[‡] Salvatore DeBonis,[§] Eric Forest,^{*,‡} and Frank Kozielski,^{*,§}

Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP) and Laboratoire de Microscopie Electronique Structurale (LMES), Institut de Biologie Structurale (CEA-CNRS-UJF), 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France.

Received April 14, 2004; Revised Manuscript Received July 15, 2004

ABSTRACT: Human Eg5, a mitotic motor of the kinesin superfamily, is involved in the formation and maintenance of the mitotic spindle. The recent discovery of small molecules that inhibit HsEg5 by binding to its catalytic motor domain leading to mitotic arrest has attracted more interest in Eg5 as a potential anticancer drug target. We have used hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry and directed mutagenesis to identify the secondary structure elements that form the binding sites of new Eg5 inhibitors, in particular for S-trityl-L-cysteine, a potent inhibitor of Eg5 activity *in Vitro* and in cell-based assays. The binding of this inhibitor modifies the deuterium incorporation rate of eight peptides that define two areas within the motor domain: Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227. Replacement of the Tyr125-Glu145 region with the equivalent region in the *Neurospora crassa* conventional kinesin heavy chain prevents the inhibition of the Eg5 ATPase activity by S-trityl-L-cysteine. We show here that S-trityl-L-cysteine and monastrol both bind to the same region on Eg5 by induced fit in a pocket formed by helix α 3-strand β 5 and loop L5-helix α 2, and both inhibitors trigger similar local conformational changes within the interaction site. It is likely that S-trityl-L-cysteine and monastrol inhibit HsEg5 by a similar mechanism. The common inhibitor binding region appears to represent a "hot spot" for HsEg5 that could be exploited for further inhibitor screening.

The mitotic spindle plays a crucial role in cell division and is thus an important target in cancer chemotherapy. Antimitotic tubulin agents, such as the vinca alkaloids and the taxanes, interfere with the polymerization / depolymerization process of microtubules leading to cell cycle arrest in mitosis (1). However, these microtubule poisons display several undesirable side effects, such as neurotoxicity, due to the disruption of tubulin function in non-dividing cells (2). In addition, resistance to the current tubulin-binding drugs during prolonged treatments has also been reported (3). Consequently, there is clearly a need to explore alternative approaches in order to achieve mitotic spindle inhibition. Although several strategies have been proposed for the development of less toxic tubulin poisons, an interesting alternative is to target proteins that are directly involved in cell division such as the check point proteins or the mitotic kinesins (1). Many of these proteins are very specialized and are only active at specific phases of the cell cycle. We might thus expect that their inhibition will produce fewer side effects in non dividing cells than those observed with the current tubulin drugs.

The BimC members of the kinesin superfamily are involved in mitotic spindle dynamics in a wide variety of organisms (4, 5). The human member of this subfamily (called Eg5 throughout the text) is essential for the formation of the bipolar spindle *in vivo*. Eg5 is required for centrosome separation during prophase / prometaphase (6). The localization of Eg5 during the cell cycle is complex and depends on the phosphorylation state of a short 40 amino acid stretch in the tail domain referred to as the BimC box (6, 7). This box is highly

conserved within the BimC family and contains a potential p34^{cdc2} phosphorylation site (8). The inhibition of Eg5 function by microinjection of antibodies against the C-terminal tail domain blocks centrosome migration and causes HeLa cells to arrest in mitosis with a characteristic monoastrol spindle comprised of a radial array of microtubules surrounded by a ring of chromosomes (6). This inhibition only occurs before the metaphase stage. Eg5 thus appears as a potential protein target for anti-mitotic drugs (9). The first small molecule inhibitor of Eg5, named monastrol, was identified using a phenotype-based screen (10). This cell permeable compound blocks mitosis in *Xenopus laevis* by binding reversibly to Eg5 without further effect through S and G2 phases of the cell cycle (11). As a result, cells arrest midway throughout mitosis with monoastrol spindles. Recent studies have shown that the minimal monastrol binding domain in Eg5 is located within the motor domain (12, 13). In addition, several novel classes of molecules such as terpendole E (isolated from a fungal strain) and quinazolinones have been recently identified as inhibitors of Eg5 function (14, 15). One of these quinazolinones analogues appears to have a broad spectrum activity against murine and human solid tumour models.

Here we use hydrogen / deuterium (H/D)¹ exchange experiments associated with protein digestion / mass spectrometry (16, 17) and directed mutagenesis for the determination of the binding region of different inhibitors targeting Eg5. The rate at which hydrogens located at peptide amide linkages undergo isotopic exchange is highly dependent on their environment and depends on whether the hydrogens are participating in intramolecular

hydrogen bonding as well as on the extent to which the hydrogens are shielded from the solvent (18). In addition, the binding of ligands to a protein may also affect amide hydrogen exchange (19). Therefore, analysis of the H/D exchange rate represents a sensitive tool for studying protein structure and dynamics as well as protein surfaces involved in inhibitor binding. H/D exchange in association with mass spectrometry has been extensively used to characterise the tertiary structure of proteins (17, 20-22) and conformational changes upon ligand binding (23-26).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs. The QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit was from Stratagene. Competent XL-10 and BL21 (DE3) pLysS cells were obtained from NOVAGEN. HighTrap chromatographic column was purchased from Amersham Pharmacia Biotech. TFA, PIPES, ATP, D₂O, lysozyme, pepsin and kanamycin were all obtained from Sigma-Aldrich. IPTG was purchased from ICN. Acetonitrile (CH₃CN) was obtained from SDS. Racemic monastrol was purchased from BIOMOL Feinchemikalien. Chemicals for Eg5 ATPase assays were from sources indicated by Hackney and Jiang (30).

Pepsin digestions. All protein digestions were performed in an ice bath at 0°C. A pepsin solution (2.1 µg/µL) was prepared in 0.1 M H₃PO₄, pH 1.6, and precooled to 0°C using an ice bath. Eg5 constructs were digested for 2 min at pH 2.2 in 1 mM PIPES buffer with a protease / substrate ratio of 1/1 (w/w).

Sequence assignments. The peptide fragments of nondeuterated Eg5 constructs were separated on a reverse phase C18 Interchrom column (1 mm x 100 mm) by using a linear gradient from 5 % to 60 % CH₃CN / H₂O (9/1 - v/v), 0.03 % TFA (solvent B) over a run time of 60 min at a flow rate of 50 µL/min. Prior to the injection, the column was equilibrated with 95 % solvent A (water with 0.03 % TFA) and 5 % solvent B for 20 min. Peptide assignments were performed by direct MS-MS analysis.

Preparation of Eg5 - inhibitor complexes. Both monastrol and S-trityl-L-cysteine solutions (50 mM in DMSO) were diluted in 1 mM PIPES buffer, pH 7.3. The protein-inhibitor complexes were formed by using 3 different Eg5 / inhibitor ratios (mole / mole) : 1/4, 1/13 and 1/20, respectively. The mixtures were incubated for 1 min at room temperature to allow complex formation.

Kinetics of H/D exchange. 244 pmol of Eg5 constructs with or without inhibitor were diluted 25 fold in 1 mM deuterated PIPES buffer (pD 7.3) and incubated for several minutes at 0°C. Isotopic back-exchange was quenched by addition of a precooled 0.1 M H₃PO₄ solution, pH 1.6, in order to decrease the pD of the mixture from 7.3 to 2.2. Samples were loaded on a C4 Protein MacroTrap cartridge (Michrom) and desalted with H₂O supplemented with 0.1 % TFA. To limit isotopic back-exchange during the analysis, the column was precooled and maintained at 0°C in an ice bath. Proteins were eluted with 60 % of CH₃CN / H₂O (9/1 - v/v), 0.1 % TFA and analyzed by ESI-MS. The percentage of incorporated deuterium (%D) was calculated by using equation 1, where m , $m_{x\%}$ and $m_{100\%}$

represent the average molecular mass of the protein obtained by analysis of nondeuterated, partially deuterated and fully deuterated samples, respectively.

$$\%D = [(m_{x\%} - m) / (m_{100\%} - m)] \times 100 \quad (1)$$

$m_{100\%}$ was estimated from the amino-acid sequence of the protein (number of exchangeable peptide amide hydrogens except proline residues). For Eg5 constructs, the maximum number of exchangeable amide hydrogens was calculated to be 380.

H/D exchange experiments of peptide fragments. 290 pmol of Eg5 constructs in the presence or absence of inhibitor were diluted 50 fold in deuterated buffer (1 mM PIPES, pD 7.3). Deuteration was performed at 0°C for 5 min in order to exchange all accessible amide hydrogens of the protein by deuterium. Isotopic back-exchange was quenched by the addition of 6 µL of precooled pepsin solution, pH 1.6. After pepsin digestion, deuterated peptide fragments were rapidly concentrated and desalted on a C4 Peptide MacroTrap cartridge (Michrom) at a flow rate of 300 µL/min. Deuterated peptides were separated on a reverse phase C18 Interchrom column (1 mm x 100 mm) by using a linear gradient from 5 % to 100 % CH₃CN / H₂O (9/1 - v/v), 0.03 % TFA over a run time of 35 min at a flow rate of 50 µL/min. To limit isotopic back-exchanges, the column was precooled in an ice bath and maintained at 0°C. The deuterated peptides were analyzed by ESI-MS.

ESI-MS and ESI-MS-MS analysis. Kinetics of H/D exchange were performed on a API III+ triple quadrupole mass spectrometer equipped with an ionspray source (PE Sciex). The electrospray probe tip was held at 5 kV and the declustering voltage was set at 80 V. Data were processed using Masspec 3.3 software and the reconstructed molecular mass profiles were obtained by using a deconvolution algorithm from the m/z mass spectrum containing multiple charge states.

Sequence assignment and H/D exchange experiments on peptide fragments were performed on a quadrupole ion trap mass spectrometer ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics) equipped with an ionspray source. MS and MS-MS experiments were carried out with a capillary voltage set at 4 kV and an end plate off set voltage at 500 V. The gas nebulizer (N₂) pressure was set at 10 psi and the dry gas flow (N₂) at 8 L/min at a temperature of 250°C. Mass spectra were analyzed using DataAnalysis 3.0 and Biotoools 2.1 software.

Mass spectra of Eg5 proteins were obtained on a Q-TOF Micro mass spectrometer (Waters) equipped with a Z-spray ion source operating with a needle voltage of 3 kV. Sample Cone and Extraction Cone voltage were 30 V and 4 V, respectively. Prior to analysis, samples were desalted on a C4 Protein MacroTrap cartridge (Michrom) with H₂O supplemented with 0.1 % TFA. Proteins were eluted with 60 % of CH₃CN / H₂O (9/1 - v/v), 0.1 % TFA and collected. Samples were then infused continuously at a flow rate of 7 µL/min and the mass spectra were recorded in the 500 - 2000 m/z . Spectra were acquired and processed with MassLynx 4.0.

Cloning of the Eg5 mutant. The construction of the Eg5 expression plasmid pEg5₂₋₃₈₆ used for mutagenesis experiments (coding for residues 1 to 386 of the motor domain and named Eg5) has been described recently (13). Two unique restriction sites (*Pml* I and *Bst* BI) were introduced by silent mutagenesis upstream and downstream of the pEg5₂₋₃₈₆ plasmid in the region coding

for the potential monastrol binding sites identified by H/D exchange / mass spectrometry using the program DNA Strider (31). The following forward and reverse primers were used for the *Pml* I restriction site (position 5445) : 5'-AAT GAA GAG TAC ACG TGG GAA GAG GAT CCC-3' and 5'-GGG ATC CTC TTC CCA CGT GTA CTC TTC ATT-3', and for the *Bst* BI restriction site (position 5500) : 5'-CCA CGT ACC CTT CAT CAA ATT TTC GAA AAA CTT ACT GAT-3' and 5'-ATC AGT AAG TTT TTC GAA AAT TTG ATG AAG GGT ACG TGG-3'. The PCR was performed on the entire expression plasmid to produce daughter plasmids with the desired mutation and the parental template was digested with *Dpn* I. After transformation into competent XL-10 cells, the resulting clones were tested on agarose gel for the presence of *Pml* I and *Bst* BI restriction sites.

The two new restriction sites inserted into pEg5_{2,386} delimit the main domain to be modified within the Eg5 motor domain. This domain was replaced by the equivalent nucleic acid sequences coding for residues 101 to 121 of *Neurospora crassa* conventional kinesin by restricting the expression plasmid with *Pml* I and *Bst* BI and insertion of the the following forward and reverse primers : 5'-G ATA GAT GAC CCT GAT GGC AGA GGT GTT ATT CCA AGA ATC GTC GAG CAA ATC TT-3' and 5'-C GAA GAT TTG CTC GAC GAT TCT TGG AAT AAC ACC TCT GCC ATC AGG GTC ATC TAT C-3'. After ligation and transformation, the resulting clones were tested for the presence of the expected insert using *Pml* I restriction enzyme. The *Pml* I restriction site is lost by insertion of the *N. crassa* sequence. The correctness of the cloning strategy was confirmed by DNA sequencing.

Expression and purification of recombinant Eg5 and Eg5-Nc constructs. Eg5 was expressed and purified as described recently (13). The pEg5 expression construct containing the *Neurospora crassa* kinesin heavy chain insertion (named Eg5-Nc) was transformed into competent BL21 (DE3) pLysS *E. coli* host cells for protein expression. Cells were grown overnight at 37°C in a 500 mL flask supplemented with kanamycin (50 µg/mL). 150 mL were transferred into 3 L of 2xYT medium containing 50 µg/mL kanamycin and grown at 37°C until an OD₆₀₀ between 1.0 and 1.3 was reached. Recombinant Eg5 protein expression was induced by adding 0.5 mM IPTG into the cell culture. Cells were grown at room temperature for 20-24 h, harvested by centrifugation, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

The following steps were performed at 4°C. The cells were resuspended in 60 mL of buffer A (20 mM PIPES, pH 7.3, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) supplemented with 1 mM PMSF and 1 mg/mL lysozyme. The resuspended cells were incubated 40 min, disrupted by three rapid freezing and defreezing cycles using liquid nitrogen. The solution was then incubated with 7 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP, 40 µL DNase I (20 mg/mL) for 30 min and centrifuged for 40 min at 18 000 rpm, 4°C (Beckmann rotor JA20).

Purification was performed on a ÄKTA FPLC equipped with a Frac-950 collector system (Amersham Bioscience). The supernatant was loaded onto a 5 mL Ni-charged HiTrap column previously equilibrated with buffer A. Bound Eg5 protein was eluted by using a step gradient of imidazole at a flow rate of 1 mL/min. Fractions of 1 mL were collected. Column fractions containing the recombinant protein were analyzed by SDS-PAGE, N-terminal sequencing and mass

spectrometry. The protein concentration of each fraction was estimated using the Bradford reagent (32). The most concentrated fractions were aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Measurement of basal ATPase steady-state kinetics. All experiments were performed at room temperature. Basal ATPase activities were measured using the pyruvate kinase / lactate dehydrogenase coupled assay in buffer A25A (25 mM ACES / KOH at pH 6.9, 2 mM magnesium acetate, 2 mM potassium EGTA, 0.1 mM potassium EDTA and 1 mM β-mercaptoethanol) (30). The protein concentrations were 2.6 µM for Eg5 and 3.2 µM for Eg5-Nc. Activity was measured in the presence of various amounts of NaCl (up to 800 mM) or in presence of monastrol or S-trityl-L-cysteine. For optimal inhibitor solubility, the assays were carried out in the presence of up to 2.2% DMSO. The data were analyzed using Kaleidagraph 3.0 (Synergy Software).

RESULTS

All H/D exchange experiments presented here were initiated by diluting the Eg5 motor domain into 1 mM deuterated PIPES buffer, pD 7.3. The protein was incubated in an ice bath and the isotopic exchange reaction was quenched by decreasing the pD to 2.2. Samples were then subjected to either MS analysis or pepsin digestion followed by LC-MS analysis. On-line desalting as well as HPLC separation of deuterated samples were carried out with nondeuterated solvents so that all deuteriums located on the side chains and on the N- and C- termini of proteins or peptides are completely back-exchanged to hydrogen since the H/D exchange rates at these positions are several orders of magnitude faster than those of peptide amide linkages (17, 33). As a result, the observed increase in the molecular weight of samples is due only to the incorporation of deuterium at peptide amide positions.

Global hydrogen / deuterium exchange studies. The H/D exchange behaviour for the Eg5 motor domain alone and in the presence of a 4-fold molar excess of monastrol or of S-trityl-L-cysteine is shown in Figure 2. After 5 min, deuterium incorporation in Eg5 is around 52 % corresponding to an exchange of ~ 200 amide hydrogens out of a possible 380. Subsequently, the deuterium incorporation rate is much slower. After 30 min, the percentage of deuterium incorporated reaches a value around 62 %. A comparable percentage was obtained after 120 min deuteration (data not shown) suggesting that most accessible amide hydrogens located on the surface of the Eg5 motor domain were exchanged during the first 5 min.

The presence of monastrol reduces the deuterium incorporation rate of the Eg5 motor domain (Figure 2). After 5 min, deuterium incorporation is 45 %. Interestingly, a similar result was observed for S-trityl-L-cysteine with 44 % deuterium incorporation. As shown in Figure 2, the kinetic curves obtained in the presence of the two inhibitors can be superimposed. Binding of these inhibitors reduces the amount of deuterium incorporation into the Eg5 motor domain by ~ 8 % corresponding to a solvent accessibility reduction of ~ 30 backbone amide hydrogens. This decrease obtained after 5 min deuteration was estimated to be sufficient for monitoring the effects

of inhibitor binding on the deuterium exchange rate in peptide fragments.

Hydrogen / deuterium exchange studies of Eg5 peptide fragments. The peptides obtained after 2 min pepsin digestion of the Eg5 motor domain were identified by LC-ESI-MS-MS. Pepsin was used to digest the protein because this protease is active under conditions required for slowing amide hydrogen exchange (pH 2-3, 0°C). 91 proteolytic fragments were assigned leading to a sequence coverage of the entire motor domain (Figure 3). The experiment was repeated after 5 min deuteration by LC-ESI-MS in order to estimate the deuterium content of each peptide fragment identified and using HPLC conditions optimised for speed in order to minimise isotopic back-exchange. Under these conditions, deuteration can lead to overlapping mass peaks for co-eluting peptides. Furthermore, the signals for deuterated peptides are in general lower than those of the corresponding non-deuterated peptides, due to non-homogeneous deuteration which creates several species for a given peptide. As a result, the signal for some deuterated peptides may be lower than the noise level. After analysis, 59 deuterated peptide fragments were found allowing 86 % of the Eg5 motor domain to be covered (Figure 3). The following fragments were not recovered and are mainly located in the core region : residues Asn18-Leu30 (β 1), residues Ser240-Glu254 (β 6 and loop 10) and residues Thr317-Ile333 (α 5 and part of β 8).

H/D exchange was then studied in the presence of a 4-fold molar excess of monastrol or of S-trityl-L-cysteine. Monastrol binding reduces deuterium incorporation in 8 peptide fragments from two regions within the Eg5 motor domain : Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227. The other 51 peptide fragments show no difference in deuterium incorporation. Results obtained for peptide fragments Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227 are shown in the mass spectra in Figure 4A. Structurally, the fragment Tyr125-Glu145 includes part of loop L5 and helix α 2 and the fragment Ile202-Leu227 covers strand β 5 and helix α 3 (Figure 5A). Moreover for the Eg5 / S-trityl-L-cysteine complex, the deuterium incorporation rate of the same two peptides is modified and it is notable that the variations observed in the mass spectra are similar for both inhibitors (Figure 4A). The H/D exchange experiment on Eg5 peptide fragments was also carried out in the presence of 13 fold and 20 fold molar excess of inhibitors (data not shown). The results were the same as for a 4-fold molar excess suggesting that no additional non-specific binding to Eg5 occurs for these two molecules.

Characterisation of Eg5 and mutated Eg5-Nc constructs. The recombinant Eg5-Nc protein was used to confirm the results obtained by H/D exchange in the presence of inhibitors. Region Tyr125-Glu145 of the Eg5 motor domain was replaced by the equivalent region in the *Neurospora crassa* conventional kinesin heavy chain (NcKHC) (Figure 6). We chose NcKHC because this kinesin is not inhibited by monastrol and shares structural similarities to Eg5 (13, 34). The modification of this region is expected to change the molecular mass of the Eg5 motor domain by 96 Da. The measured molecular mass of Eg5 and mutated Eg5-Nc proteins is $44, 128 \pm 2$ Da and $44, 030 \pm 2$ Da, respectively. (data not shown) The experimental mass difference is 98 Da, very close to

the theoretical value, confirming that the region Tyr125-Glu145 of the Eg5 protein was correctly replaced.

This result was also confirmed after 2 min pepsin digestion at 0°C followed by LC-ESI-MS analysis. The same peptide mapping was obtained for both Eg5 proteins. The only difference was found in the region modified within the mutated Eg5-Nc protein. In spite of the inserted modification, the length of this peptide (fragment Tyr125-Glu145) was not changed after pepsin digestion allowing the molecular mass of the two peptide fragments to be compared. The measured molecular mass of fragment Tyr125-Glu145 was 2398.4 Da and 2302.4 Da for Eg5 and mutated Eg5-Nc proteins, respectively (data not shown). This 96 Da mass difference clearly indicates that the mutated Eg5-Nc protein contains the NcKHC insert.

Basal ATPase activity. The basal ATPase activities of Eg5 and mutated Eg5-Nc proteins were compared in order to check the activity of the mutated protein. The assays were carried out at various NaCl concentrations (up to 800 mM). The ATPase activity for both proteins increases with increasing amounts of NaCl, up to 350 mM. At higher salt concentrations, the ATPase activity decreases (Figure 7A). Eg5-Nc shows a ~ 2 fold-decrease of the ATPase activity with a maximum velocity (V_{max}) 0.055 s^{-1} compared to 0.087 s^{-1} for Eg5. The basal ATPase activity was sufficiently conserved to allow the effects of inhibitors on the mutated protein to be monitored.

Measurement of the ATPase activity in the presence of variable amounts of inhibitors. The IC_{50} values (median inhibitory concentration) were determined by measuring the basal ATPase activity of both Eg5 and Eg5-Nc proteins in the presence of increasing monastrol or S-trityl-L-cysteine concentrations. As illustrated in Figures 7B-C, both monastrol and S-trityl-L-cysteine inhibit the basal ATPase activity of the Eg5 protein. The IC_{50} values for the inhibition of Eg5 by monastrol and S-trityl-L-cysteine are $9.1 \mu\text{M}$ and $1.0 \mu\text{M}$, respectively. In contrast, these two inhibitors have no effect on the mutated Eg5-Nc protein. The basal ATPase activity remains unaffected by increasing amounts of both inhibitors (Figures 7B-C) confirming that the region Tyr125-Glu145 is essential for binding both monastrol and S-trityl-L-cysteine.

Hydrogen / deuterium exchange studies of Eg5-Nc peptide fragments. The studies of H/D exchange on Eg5-Nc peptide fragments were carried out in the presence of a 4-fold molar excess of monastrol or of S-trityl-L-cysteine. After deuteration and pepsin digestion, the same 59 peptide fragments as obtained for the Eg5 motor domain (Figure 3) were found by LC-ESI-MS allowing to cover 86 % of the Eg5-Nc sequence. The global fold of native and mutated Eg5 was compared by using H/D exchange – MS analysis. After 5 min incubation, the deuteration pattern of the Eg5-Nc peptide fragments shows no significant difference compare to Eg5 fragments (data not shown). This means that the solvent accessibility is comparable for both proteins indicating that the *N. crassa* insert does not induce dramatic changes in the structure of the mutated Eg5-Nc protein.

As shown in Figure 4B, the deuterium incorporation is unchanged within the modified region Tyr125-Glu145 of Eg5-Nc in the presence or in the absence of both inhibitors. The same result is obtained for the second potential inhibitor binding region Ile202-Leu227

identified (Figure 4B) as well as for the other 51 peptide fragments. Therefore, the presence of the NcKHC sequence prevents the solvent accessibility reduction induced by inhibitor binding within regions Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227.

DISCUSSION

We have identified the binding regions of small inhibitors targeting the human Eg5 motor domain using H/D exchange in association with protein digestion / mass spectrometry analysis (16, 17) and directed mutagenesis. We tested the efficiency of our approach for determining the binding site of new Eg5 inhibitors using monastrol, a small cell permeable inhibitor of Eg5 activity, to compare our results with those obtained by X-ray crystallography of the ternary monastrol-ADP-Eg5 complex (27).

Monastrol binding decreases the H/D exchange rate of the Eg5 motor domain by ~ 8 % after 5 min deuteration corresponding to a reduction in the solvent accessibility of about 30 backbone amide hydrogens. Because of the small size of monastrol (292 Da), the large overall decrease in H/D exchange observed here cannot be uniquely due to a masking effect. A possible explanation is that the interaction of monastrol with Eg5 leads to conformational changes within the protein. Two regions with reduced incorporation rates after Eg5 / monastrol complex formation were identified using the protein digestion / MS method. The first region covers part of loop L5 and helix $\alpha 2$ (residues Tyr125-Glu145) and the second region is composed of strand $\beta 5$ and helix $\alpha 3$ (residues Ile202-Leu227). In order to determine if the secondary structure elements identified were involved or not in monastrol binding, the region corresponding to residues Tyr125-Glu145 was replaced by the equivalent region from *Neurospora crassa* conventional kinesin heavy chain (NcKHC). NcKHC is not inhibited by monastrol (13) in spite of structural similarities to the human Eg5 motor domain. This implies that the small sequence differences in the conserved motor domain observed between NcKHC and human Eg5 are sufficient to explain the specificity of monastrol. The *N. crassa* protein sequence exchanged for the corresponding one in Eg5 is not expected to induce major changes in the structure of the mutated Eg5-Nc protein. The inserted NcKHC sequence modifies 11 residues with 5 being highly similar and only 6 different (Figure 6) and the deuteration patterns of the Eg5-Nc peptide fragments are similar to those obtained for the Eg5 fragments. The main difference concerns loop L5. The length of this loop is variable among kinesin family members and is the longest in the human Eg5 motor domain (35), and should be slightly reduced in the Eg5-Nc protein. Despite this modification, the basal ATPase activity of the mutated Eg5-Nc was only 2-fold lower than that measured for Eg5 (Figure 7A). Monastrol does not inhibit the basal ATPase activity of mutated Eg5-Nc. The region Tyr125-Glu145 is thus directly implicated in monastrol binding. We conclude that monastrol binding mainly involves loop L5-helix $\alpha 2$ and that strand $\beta 5$ and helix $\alpha 3$ should also be implicated. We are currently modifying the second region of the human Eg5 motor domain but the results of the second mutation are not necessary for the conclusions presented here.

The results described above were compared to the recently published crystal structure of the ternary monastrol-ADP-Eg5 complex (27) (Figure 5). Binding of monastrol occurs in an induced-fit pocket located 12 Å away from the ATP binding site of the protein. The inhibitor pocket is situated between helix $\alpha 3$ and loop L5. The creation of this pocket required local structural changes. The side-chains of residues Arg119 (on helix $\alpha 2$), Trp127 (on loop L5) and Thr211 (on helix $\alpha 3$) are relocated in order to cap the entrance of the cavity and to accommodate space for the inhibitor. As a result, helix $\alpha 3$ shifts along its axis (by 1 Å) whereas helix $\alpha 2$ remains unaltered by the conformational modifications. The formation of this inhibitor pocket explains in part the ~ 8 % solvent accessibility reduction which occurs upon monastrol binding on the two regions identified by H/D exchange and mutational analysis (Figure 5A). There are 20 residues lining the monastrol pocket and surrounding the inhibitor for which the solvent accessibility may be altered in the ternary complex due to both ligand protection and conformational changes (Figure 5B). In addition, Yan and colleagues (27) have shown that monastrol triggers distal structural changes throughout the Eg5 motor domain. These rearrangements take place within switch-1 (Asn229-Arg234), switch-2 (Asp265-Glu270) and in the neck linker regions (Asn358-Pro363). Switch-1 is found at the end of helix $\alpha 3$ and consists of a loop in Eg5 (35). This loop becomes a short helix upon monastrol binding leading to a shift of switch-1 by ~ 6 Å. This modification was not identified with our method although a change in the secondary structure of switch-1 should result in modification of the H/D exchange rate. The peptide fragment corresponding to switch-1 does not exhibit differences in the extent of deuterium incorporation after monastrol binding (Figure 8A). Similar results were obtained for switch-2 (Figure 8B). The deuteration time used (5 min) was sufficient to allow complete isotopic exchange within these two regions in the presence or absence of monastrol. The other conformational changes concern the neck linker. The structural changes triggered in this region upon monastrol binding is difficult to estimate with our method due to non-homogeneous deuteration of peptide Tyr352-Glu377 (Figure 8C).

As for monastrol, the formation of the Eg5 / S-trityl-L-cysteine complex induces a ~ 8 % decrease of the deuteration rate after 5 min incubation. Because of the size of this molecule (363 Da), the overall variation observed can only be due to both a masking effect and conformational changes within the motor domain. Interestingly, S-trityl-L-cysteine modifies the same two regions implicated in monastrol binding. This result is surprising because these two inhibitors vary considerably in their structure (Figure 1). In addition, the decrease in deuterium incorporation observed in regions Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227 is similar for both inhibitors. This means that the solvent accessibility reduction concerns the same number of amide peptide linkages. Incubation of S-trityl-L-cysteine with the mutated Eg5-Nc does not affect the basal ATPase activity whereas a strong inhibition is observed with Eg5. The region Tyr125-Glu145 is thus directly involved in S-trityl-L-cysteine binding since no inhibition occurs when this domain is modified. We conclude that S-trityl-L-cysteine binds to the same region in human Eg5 as monastrol. This

raises the question of how these molecules inhibit Eg5 ATPase activity? We know that monastrol inhibits ADP release by forming a ternary complex (12, 13) and residues Trp127, Asp130, Leu132 and Ala133 seem to play a major role since the basal Eg5 ATPase activity is no longer inhibited when we mutate these four amino-acid residues in our Eg5—construct to Trp127Ile, Asp130Pro, Leu132Gly and Ala133Arg (Figure 6). It seems likely that replacing residue Trp127 by Ile prevents the formation of the induce-fit pocket and thus the relocation of the side chains of Arg119 (on helix α 2) and Tyr211 (on helix α 3) which are known to accommodate space for the inhibitor. Hence, the local and distal structural changes throughout the motor domain do not occur as well as the formation of the ternary complex since no variation of deuterium incorporation is observed within the mutated Eg5-Nc protein in the presence of both inhibitors (Figure 4B).

The approach described here can thus be used to probe rapidly the interaction between other small molecules and Eg5. The combination of H/D exchange experiments / mass spectrometry and directed mutagenesis allows the regions within the protein involved in ligand binding and / or conformational changes to be pin-pointed. This method will be useful for the rapid identification of other Eg5 inhibitor binding regions prior to X-ray structure determination, since once the peptide mapping is in hand, the identification of the interacting site for other Eg5 inhibitors only takes about one week. However, one should always keep in mind that it is likely that ligand binding induces local conformational changes within the interaction site and major long distance changes to other sites throughout the protein (36). In this case, the discrimination between the masking effect and the conformational changes is difficult especially when the ligand is small. For the Eg5 motor domain, binding of both inhibitors trigger major structural changes within the interaction site. As a result, the variation of the H/D exchange rate monitored corresponds to both a masking effect and conformational changes.

The recent studies of the Eg5 mRNA expression pattern in normal human tissues by Sakowicz *et al.* (15) have demonstrated the interest to target this mitotic kinesin for the discovery of novel antimetabolic cancer drugs. Eg5 appears to be most abundant in proliferating tissues and absent in postmitotic human central nervous system neurons. These results, taken together, suggest that the inhibition of the Eg5 function will only occur in proliferating cells (including cancerous cells). We showed here that S-trityl-L-cysteine and monastrol bind to the same region on HsEg5 by induced-fit in a pocket formed by helix α 3 – strand β 5 and loop L5 - helix α 2. Both inhibitors trigger local conformational changes within the interaction site and it seems likely that they share a similar inhibition mechanism of Eg5-ATPase activity. S-trityl-L-cysteine is about 40 times more effective *in vitro* and in cell-based assays than monastrol and is able to induce mitotic arrest in HeLa cells without any visible effect on interphase cells (29). In conclusion, S-trityl-L-cysteine leads to tumour growth inhibition as shown in the NCI 60 tumour cell line screen ($GI_{50} = 1.3 \mu\text{M}$) and the identification of the binding region on Eg5 is a first step in understanding its mechanism of action.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-Pierre Andrieu for N-terminal sequencing of Eg5 constructs. We also thank the Drug Synthesis & Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis for providing us with S-trityl-L-cysteine. The authors thank Dr. Richard Wade (IBS) and Dr. James Conway (IBS) for helpful discussions.

This work has been funded by grants from ARECA (Alliance des Recherches sur le Cancer), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer, contract number 5197) and the Rhône-Alpes region (contract number : 03 013690 02; 03 013690 01). Sébastien Brier is supported by a PhD grant from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique).

FOOTNOTES

¹ The abbreviations used are : ACES, *N*-(2-Acetamido)-2-aminoethane sulfonic acid; Da, Dalton; DMSO, Dimethyl sulfoxide; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, Ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid; H/D, Hydrogen / Deuterium; IPTG, Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; ESI, electrospray ionisation; LC-MS, Liquid chromatography – Mass Spectrometry; MS, Mass Spectrometry; MS-MS, Mass Spectrometry-Mass Spectrometry; m/z, mass to charge ratio; PIPES, Piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid); PMSF, Phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TFA, Trifluoroacetic acid.

REFERENCES

1. Wood, K. W., Cornwell, W. D., and Jackson, J. R. (2001) Past and future of the mitotic spindle as an oncology target, *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 370-377.
2. Rowinski, E. K., Chaudhry, V., Cornblath, D. R., and Donehower, R. C. (1993) Neurotoxicity of Taxol, *J. Natl. Cancer Inst.* 15, 107-115.
3. Cole S. P., Sparks K. E., Fraser K., Loe D. W., Grant C. E., Wilson G. M., and Deeley, R. G. (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells, *Cancer Res.* 54, 5902-5910.
4. Walczak, C. E., and Mitchison, T. J. (1996) Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation, *Cell* 85, 943-946.
5. Kashina, A. S., Rogers, G. C., and Scholey, J. M. (1997) The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1357, 257-271.
6. Blangy A., Lane H. A., d'Herin P., Harper M., Kress M., and Nigg, E. A. (1995) Phosphorylation by p34^{cdc2} regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo, *Cell* 83, 1159-1169.
7. Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1995) Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 4289-4293.
8. Blangy, A., Arnaud, L., and Nigg, E. A. (1997) Phosphorylation by p34^{cdc2} protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150, *J. Biol. Chem.* 272, 19418-19424.
9. Miyamoto, D. T., Perlman, Z. E., Mitchison, T. J., and Shirasu-Hiza, M. (2003) Dynamics of the mitotic spindle – potential therapeutic targets, *Progress in Cell Cycle Research* 5, 349-360.
10. Mayer T. U., Kapoor T. M., Haggarty S. J., King R. W., Schreiber S. L., and Mitchison, T. J. (1999) Small molecule

inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen, *Science* 286, 971-974.

11. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000) Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, *J. Cell Biol.* 150, 975-988.
12. Maliga Z., Kapoor T. M., and Mitchison, T. J. (2002) Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, *Chem. Biol.* 9, 989-996.
13. DeBonis S., Simorre J. P., Crevel I., Lebeau L., Skoufias D. A., Blangy A., Ebel C., Gans P., Cross R., Hackney D. D., Wade R. H., and Kozielski, F. (2003) Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5, *Biochemistry* 42, 338-349.
14. Nakazawa J., Yajima J., Usui T., Ueki M., Takatsuki A., Imoto M., Toyoshima Y. Y., and Osada, H. (2003) A novel action of terpendole E on the motor activity of mitotic Kinesin eg5, *Chem. Biol.* 10, 131-137.
15. Sakowicz, R., Finer, J. T., Beraud, C., Crompton, A., Lewis, E., Fritsch, A., Lee, Y., Mak, J., Moody, R., Turincio, R., Chabala, J. C., Gonzales, P., Roth, S., Weitman, S., and Wood, K. W. (2004) Antitumor activity of a kinesin inhibitor, *Cancer Res.* 64, 3276-3280.
16. Englander, J. J., Rogero, J. R., and Englander, S. W. (1985) Protein hydrogen exchange studied by the fragment separation method, *Anal. Biochem.* 147, 234-244.
17. Zhang, Z., and Smith, D. L. (1993) Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci.* 2, 522-531.
18. Smith, D. L., Deng, Y., and Zhang, Z. (1997) Probing the non-covalent structure of proteins by amide hydrogen exchange and mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 32, 135-146.
19. Dharmasiri, K., and Smith, D. L. (1996) Mass spectrometric determination of isotopic exchange rates of amide hydrogens located on the surfaces of proteins, *Anal. Chem.* 68, 2340-2344.
20. Zhang, Z., Post, C. B., and Smith, D. L. (1996) Amide hydrogen exchange determined by mass spectrometry: application to rabbit muscle aldolase, *Biochemistry* 35, 779-791.
21. Wang, F., and Tang, X. (1996) Conformational heterogeneity of stability of apomyoglobin studied by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry *Biochemistry* 35, 4069-4078.
22. Milne, J. S., and Mayne, L. (1998) Determinants of protein hydrogen exchange studied in equine cytochrome c, *Protein Sci.* 7, 739-745.
23. Mandell, J. G., Falick, A. M., and Komives, E. A. (1998) Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 14705-14710.
24. Ehring, H. (1999) Hydrogen exchange/electrospray ionization mass spectrometry studies of structural features of proteins and protein/protein interactions, *Anal. Biochem.* 267, 252-259.
25. Akashi, S., and Takio, K. (2000) Characterization of the interface structure of enzyme-inhibitor complex by using hydrogen-deuterium exchange and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Protein Sci.* 9, 2497-2505.
26. Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Latour, J. M., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (2001) Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor, *J. Mol. Biol.* 310, 83-91.
27. Yan, Y., Sardana, V., Xu, B., Homnick, C., Halczenko, W., Buser, C. A., Schaber, M., Hartman, G. D., Huber, H. E., and Kuo, L. C. (2004) Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences, *J. Mol. Biol.* 335, 547-554.
28. Paull, K. D., Lin, C. M., Malspeis, L., and Hamel, E. (1992) Identification of novel antimetabolic agents at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data, *Cancer Res.* 52, 3892-900.
29. DeBonis, S., Skoufias, D. A., Lebeau, L., Robin, G., Margolis, R., Wade, R. H., and Kozielski, F. (2004) In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin, Eg5, with antimetabolic and antitumor activity, *Molecular Cancer Therapeutics*, in press.
30. Hackney, D. D., and Jiang, W. (2001) Assays for kinesin

microtubule-stimulated ATPase activity, *Methods Mol. Biol.* 164, 65-71.

31. Marck, C. (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers, *Nucleic Acids Res.* 16, 1829-1836.
32. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
33. Thevenon-Emeric, G., Kozlowski, J., Zhang, Z., and Smith, D. L. (1992) Determination of amide hydrogen exchange rates in peptides by mass spectrometry, *Anal Chem* 64, 2456-2458.
34. Song, Y. H., Marx, A., Muller, J., Woehlke, G., Schliwa, M., Krebs, A., Hoenger, A., and Mandelkow, E. (2001) Structure of a fast kinesin: implications for ATPase mechanism and interactions with microtubules, *EMBO J.* 20, 6213-6225.
35. Turner J., Anderson R., Guo J., Beraud C., Fletterick R., and Sakowicz, R. (2001) Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker, *J. Biol. Chem.* 276, 25496-25502.
36. Anand, G. S., Hughes, C. A., Jones, J. M., Taylor, S. S., and Komives, E. A. (2002) Amide H/2H exchange reveals communication between the cAMP and catalytic subunit-binding sites in the R(I)alpha subunit of protein kinase A, *J. Mol. Biol.* 323, 377-386.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chemical structures of the Eg5 inhibitors (A) monastrol and (B) S-trityl-L-cysteine.

Figure 2. Deuterium incorporation time courses for Eg5 motor domain alone (×) and in the presence of either 4 fold molar excess of monastrol (□) or S-trityl-L-cysteine (○). These experiments were carried out in 1 mM deuterated PIPES, pD 7.3. Eg5 and Eg5 / inhibitor complexes were incubated several minutes at 0°C. Isotopic back-exchange was quenched by decreasing the pD of each sample from pD 7.3 to pD 2.2.

Figure 3. Protein sequence of the Eg5 motor domain showing the 91 pepsin-cleaved fragments identified by LC-ESI-MS-MS. Arrows below the sequence indicate the position of each assigned proteolytic fragment. The 32 peptic fragments which were not recovered after 5 min deuteration are presented in dotted arrows and their corresponding amino-acid sequences are colored in red. Secondary structural elements determined by X-ray crystallography (34) are shown above the sequence.

Figure 4 . Effect of monastrol and S-trityl-L-cysteine (STLC) binding on the deuterium level of peptide fragments Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227 of : (A) Eg5; (B) Eg5-Nc. The formation of both Eg5 / inhibitor complexes decreases the extent of deuterium incorporation by changing the solvent accessibility. No variation of deuterium incorporation is observed within the mutated Eg5-Nc protein in the presence of both inhibitors. Each mass spectrum compare nondeuterated peptide fragment (—) with peptide fragment without inhibitor, in presence of monastrol and in presence of S-trityl-L-cysteine after 5 minutes deuteration, respectively.

Figure 5. Ribbon representations of the Eg5 motor domain showing the inhibitor binding regions identified with our approach (A) and the monastrol binding site obtained by the recent structure determination of the ternary monastrol-ADP-Eg5 complex (B) by Yan *et al.* (27). Mg-ADP is represented as a ball-and-stick model (yellow and black) (A) Regions identified by H/D experiment on peptic fragments in the presence 4-fold molar excess inhibitors. Binding of monastrol or S-trityl-L-cysteine reduces the amount of deuterium incorporated into the same two regions. The first domain (blue colored) is composed of part of loop L5 and helix $\alpha 2$ (peptic fragment Tyr125-Glu145); the second one (purple colored) comprises part of

strand $\beta 5$ and helix $\alpha 3$ (peptic fragment Ile202-Leu227). **(B)** Monastrol binding site identified by X-ray crystallography. Binding of monastrol occurs in an induced-fit pocket located between loop L5 and helix $\alpha 3$. The residues involved in monastrol binding are colored in green. Monastrol (colored in red) is represented as a ball-and-stick model. The figures were prepared using ViewerLite50.

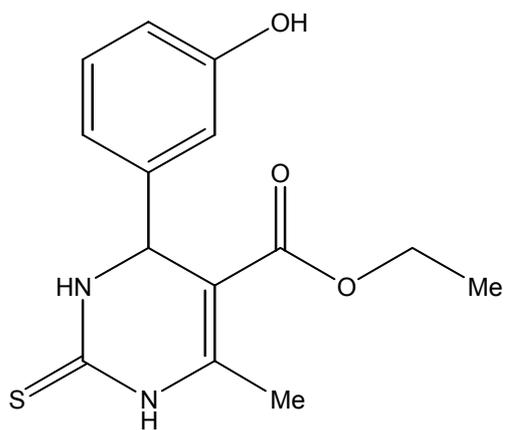
Figure 6. Comparison of the deleted Eg5 sequence (Tyr125-Glu145) and the inserted NcKHC sequence. Replacement of region Tyr125-Glu145 (21 residues) by the equivalent NcKHC region modifies 11 amino-acids in the mutated Eg5-Nc protein. Legend : highly similar, weakly similar and identical amino-acid are colored in green, blue and red, respectively. Non similar residues are dark colored.

Figure 7. Measurement of the basal ATPase activity of Eg5 (\square) and mutated Eg5-Nc (o) proteins. **(A)** Basal ATPase activity of Eg5 and Eg5-Nc in the presence of increasing NaCl concentrations. The insert of *N. crassa* induces a ~ 2 fold-decrease of the ATPase activity with a V_{max} of 0.087 s^{-1} and 0.055 s^{-1} for Eg5 and Eg5-Nc, respectively. **(B-C)** Inhibition of the basal ATPase activity of Eg5 and Eg5-Nc motor domain. **(B)** Monastrol inhibits the basal ATPase activity of Eg5 motor domain with an IC_{50} value of $9.1 \mu\text{M}$; no inhibition is observed with the mutated Eg5-Nc protein. **(C)** As for monastrol, formation of the Eg5 / S-trityl-L-cysteine complex leads to the inhibition of the basal ATPase activity with an IC_{50} value of $1.0 \mu\text{M}$. Again, no inhibition is observed for the mutated Eg5-Nc protein where the basal ATPase activity remains constant with increasing amounts of S-trityl-L-cysteine.

Figure 8. Effect of monastrol binding on the deuterium level of three peptide fragments : **(A)** fragment Met228-Phe239 (switch-1 region); **(B)** fragment Ser264-Leu292 (containing the switch-2 region); **(C)** fragment Tyr352-Glu377 (neck-linker). Each mass spectrum compare nondeuterated peptide fragment (—) with peptide fragment without inhibitor, in presence of monastrol and in presence of S-trityl-L-cysteine after 5 minutes deuteration, respectively.

Figure 1

A Monastrol



B S-trityl-L-cysteine

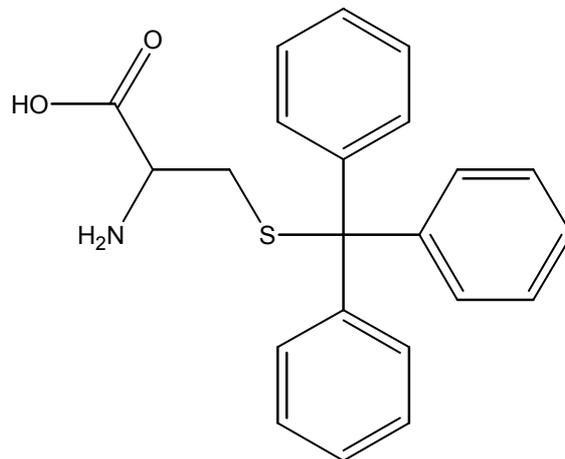


Figure 2

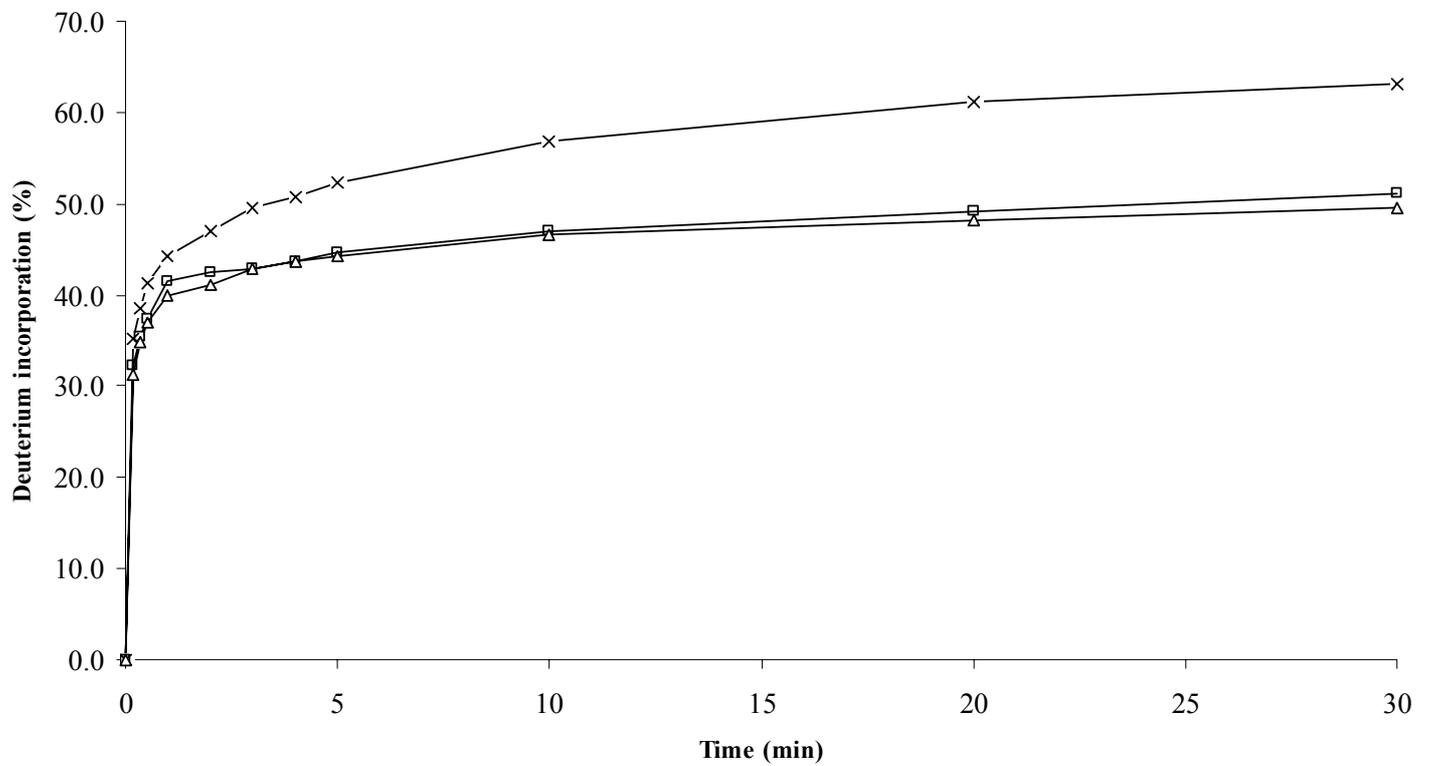


Figure 3

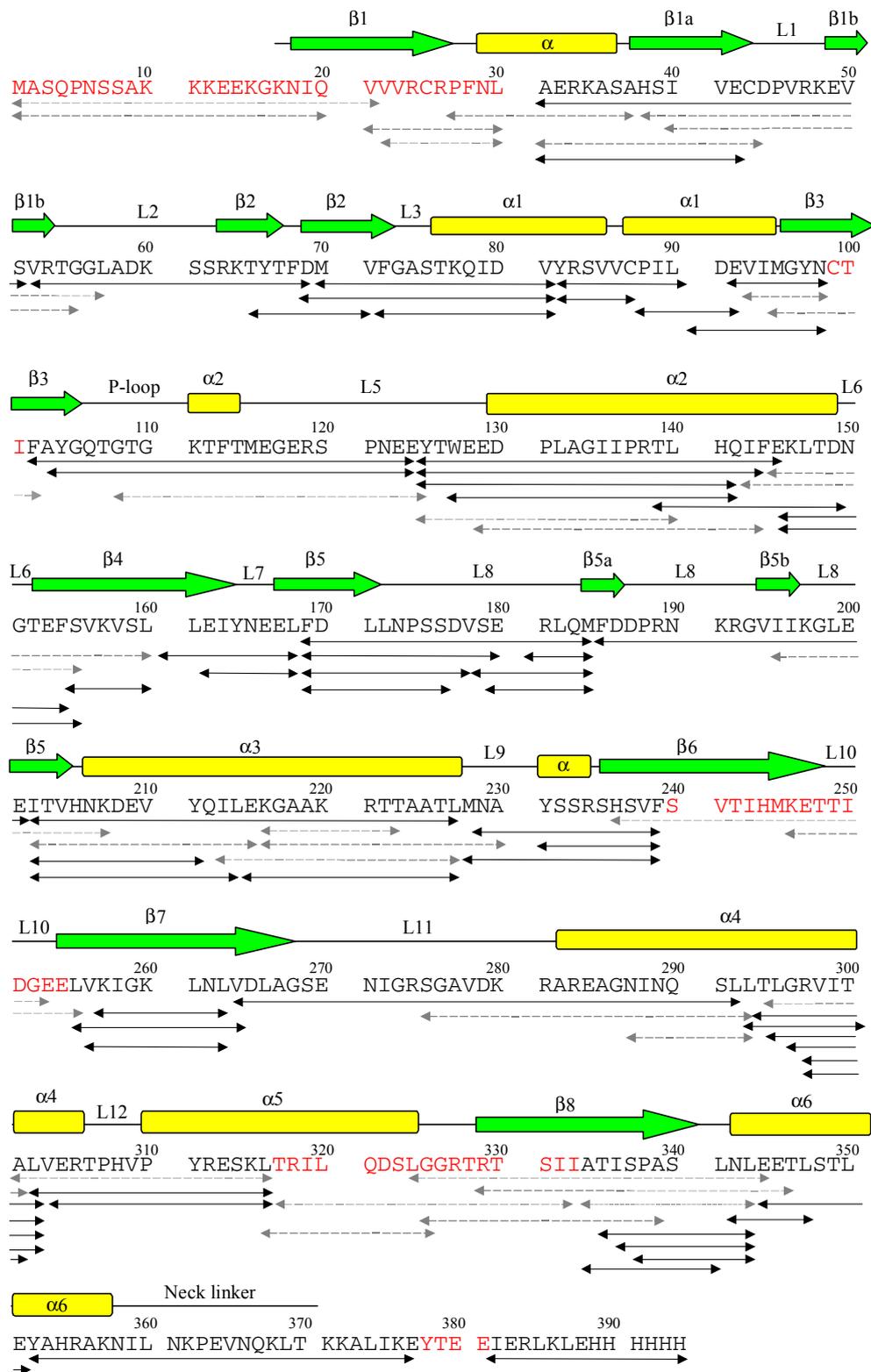
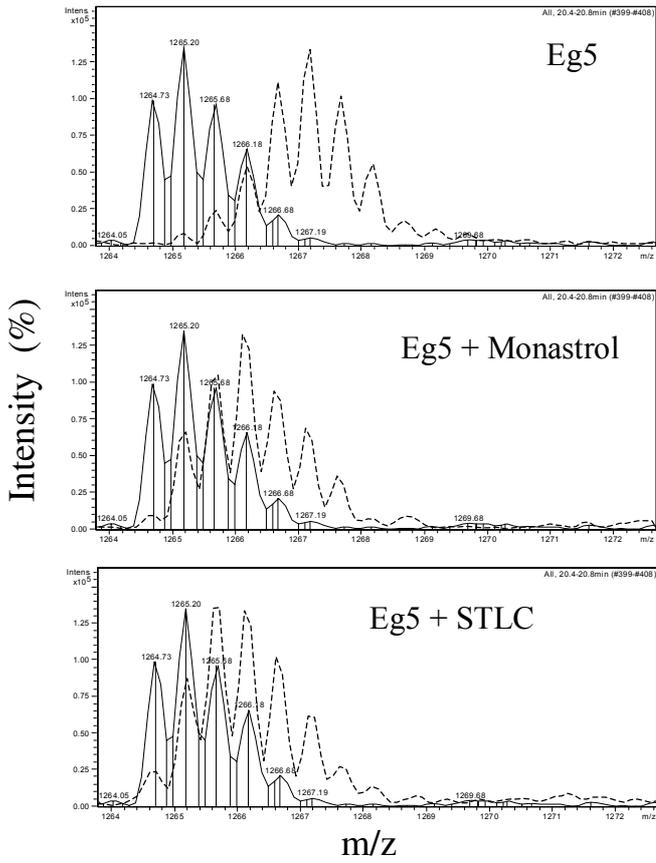


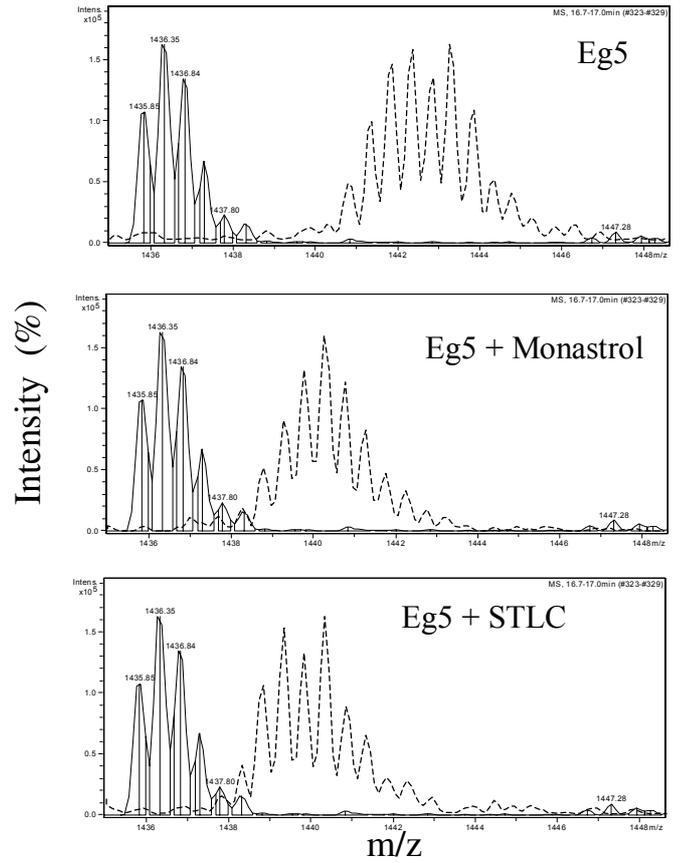
Figure 4

A Eg5

Tyr125-Glu145

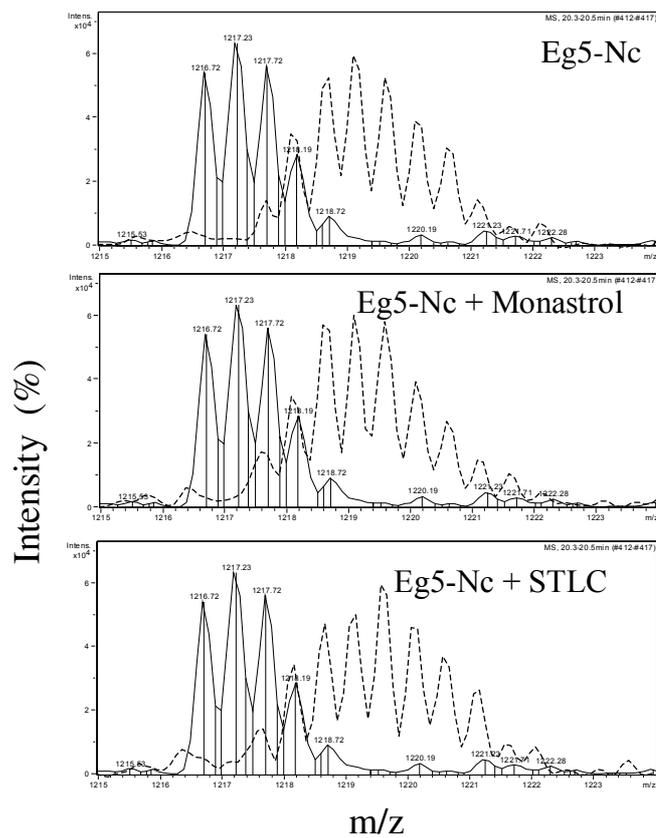


Ile202-Leu227



B Eg5-Nc

Tyr125-Glu145



Ile202-Leu227

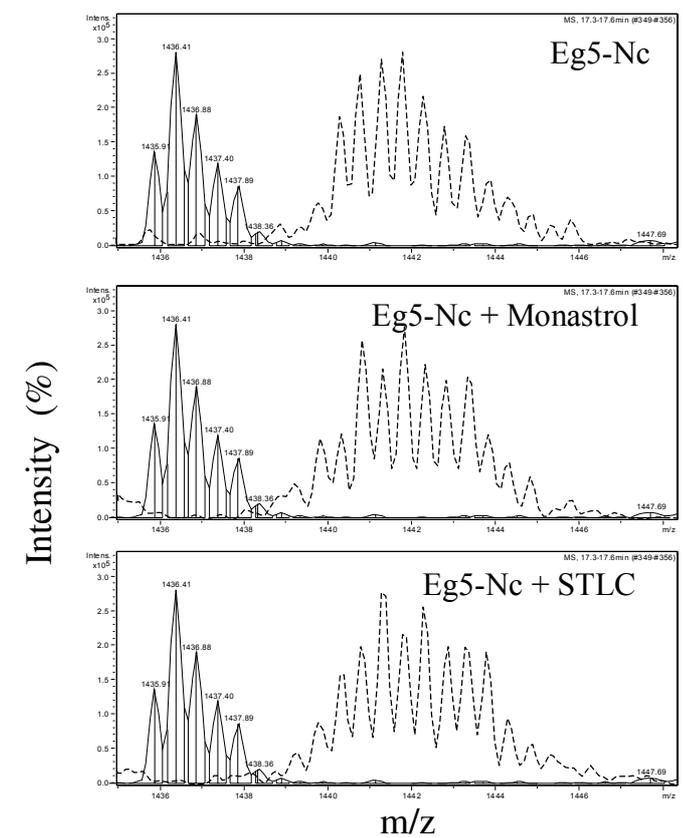
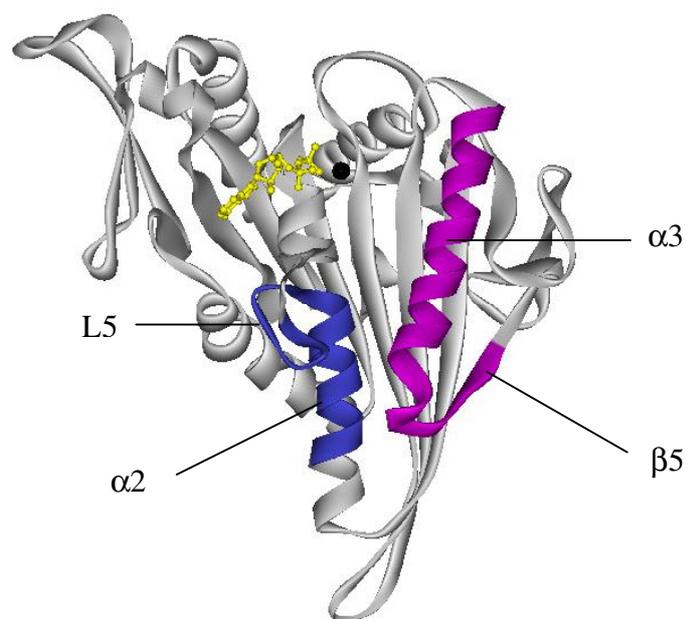


Figure 5

A



B

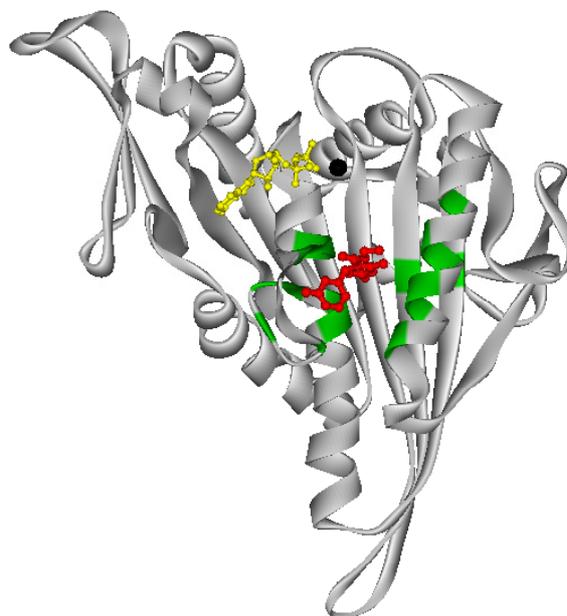


Figure 6

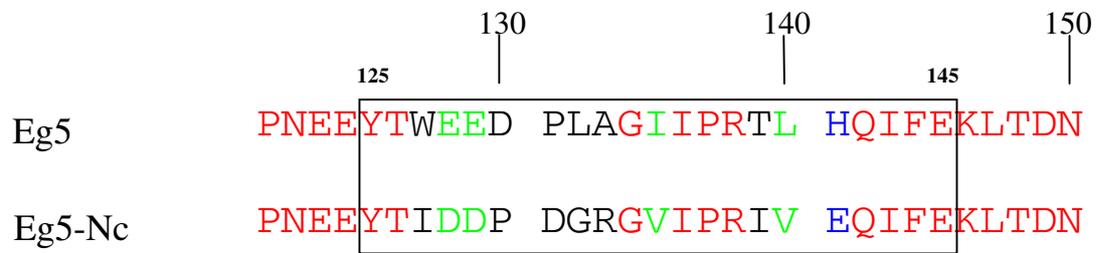
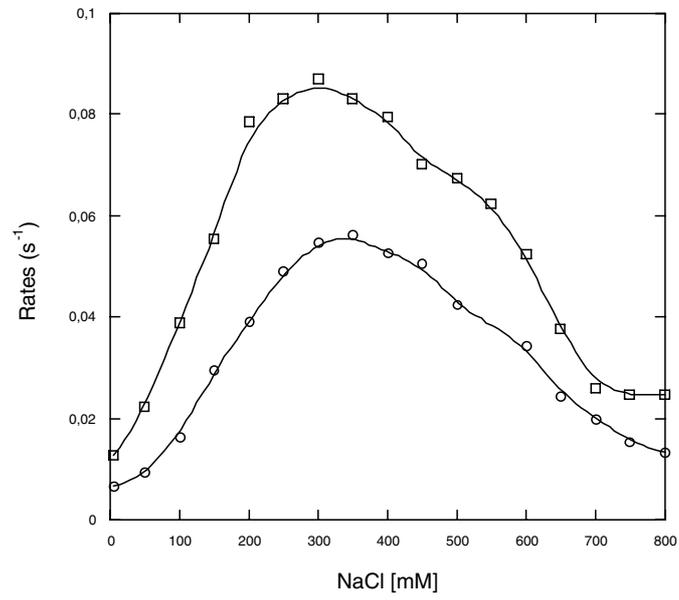
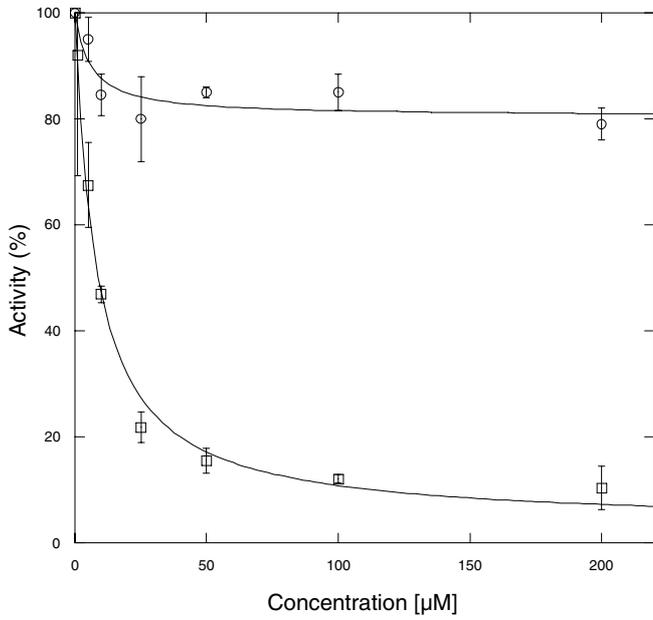


Figure 7

A



B



C

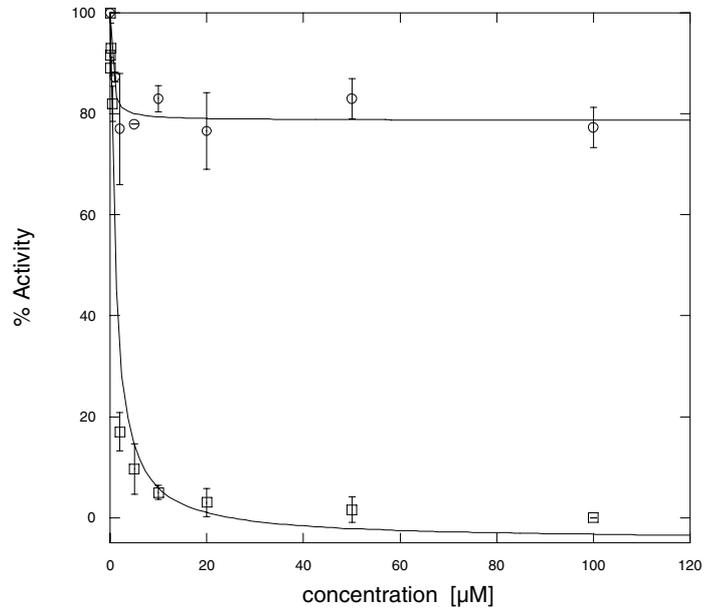
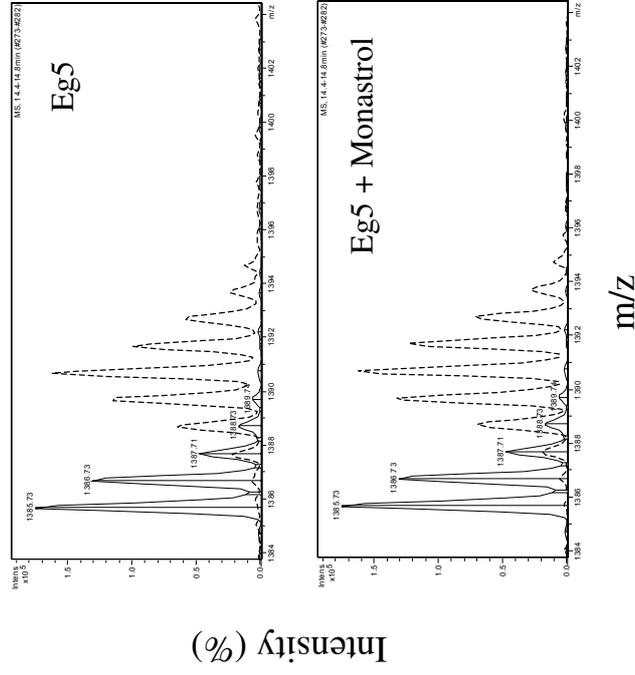
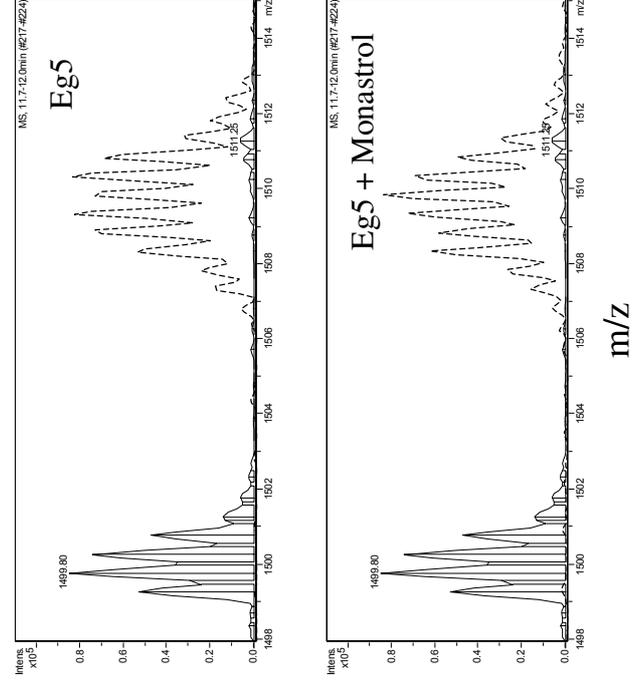


Figure 8

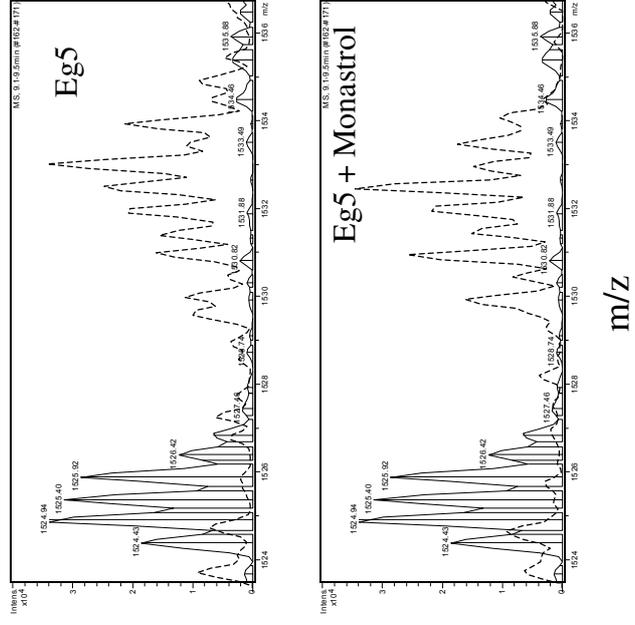
A Peptide Met228-Phe239
(switch 1)



B Peptide Leu293-Tyr300
(switch 2)



C Peptide Tyr352-Glu377
(neck linker)



III) Conclusions

Ce premier travail nous a permis : (1) de mettre en place le protocole expérimental nécessaire à l'étude des interactions Eg5/inhibiteurs, (2) de valider les résultats d'échange *via* la mutagenèse dirigée en utilisant le monastrol comme référence d'interaction, (3) de localiser les zones d'interaction et de modifications conformationnelles entre Eg5 et le S-trityl-L-cystéine. La formation du complexe Eg5/monastrol diminue le taux d'incorporation en deutérium de deux régions du domaine moteur : la région Tyr125-Glu145 qui contient une partie de la boucle L5 et la fin de l'hélice $\alpha 2$; la région Ile202-Leu227 composée du feuillet $\beta 5$ et de l'hélice $\alpha 3$. Le remplacement de la zone 125-145 par la séquence homologue de NcKHC lève l'inhibition de l'activité ATPasique basale par le monastrol, confirmant ainsi que cette dernière participe à l'interaction Eg5/monastrol. Ce résultat a été comparé avec la structure cristallographique du complexe ternaire Eg5-ADP-monastrol publiée quelques semaines avant nos résultats (Yan *et al.*, 2004). Le monastrol induit la formation d'une poche allostérique entre la boucle L5 et l'hélice $\alpha 3$ située à 12Å du site ATPasique. Les données expérimentales obtenues avec notre approche corrélient donc avec la structure cristallographique du complexe ternaire. La fixation du S-trityl-L-cystéine modifie également le taux d'incorporation en deutérium des régions Tyr125-Glu145 et Leu202-Ile227 ; de même la mutation de la zone 125-145 permet de lever l'inhibition de l'activité ATPasique basale par le S-trityl-L-cystéine. Par conséquent, ces deux inhibiteurs partagent un site de fixation commun sur Eg5 localisé entre les éléments de structure secondaire L5- $\alpha 2$ et $\beta 5$ - $\alpha 3$. Les variations d'incorporation en deutérium observées dans cette zone sont identiques en présence des deux inhibiteurs. Ainsi, la fixation du monastrol et du S-trityl-L-cystéine s'accompagne de modifications structurales similaires localisées principalement au niveau du site d'interaction. Il est donc probable que le S-trityl-L-cystéine induise la formation d'une poche allostérique semblable à celle induite par le monastrol d'un point de vue structural.

Le monastrol et S-trityl-L-cysteine ont peu d'homologie structurale en commun mais partagent un site de fixation identique sur Eg5 et occasionnent, probablement, les mêmes modifications conformationnelles pour former la poche allostérique. Cependant est-ce que le mécanisme d'inhibition est semblable pour ces deux composés ? Interagissent-ils avec les mêmes résidus pour former la poche allostérique. De manière à mieux comprendre l'inhibition d'Eg5 par ces deux molécules, nous nous sommes intéressés à la fonction des acides aminés présents au sein de leur site d'interaction commun.

Chapitre II

Etude des mécanismes d'inhibition d'Eg5 par le monastrol et le STLC.

I) Introduction

L'association H/D-MS / mutagenèse a permis de localiser les zones d'interaction et de modifications conformationnelles du monastrol et du STLC sur Eg5. Ces deux molécules partagent le même site allostérique situé entre les éléments de structure secondaire L5- α 2 et β 5- α 3 et induisent des modifications conformationnelles similaires. De manière à mieux cerner leur mécanisme d'inhibition, onze acides aminés localisés dans le site allostérique ont été modifiés par mutagenèse dirigée : 6 au niveau de la région Tyr125-Glu145 (Arg119, Trp127, Asp130, Pro131, Leu132 et Ile136) ; les 5 autres dans la zone Ile202-Leu227 (Val210, Tyr211, Leu214, Glu215 et Arg221). Les chaînes latérales de ces résidus sont principalement orientées vers le site d'interaction à l'exception de la leucine 132 et de l'acide glutamique 215 (Figure 41). Ces derniers ont été utilisés comme témoins afin de valider l'approche expérimentale de mutagenèse dirigée.

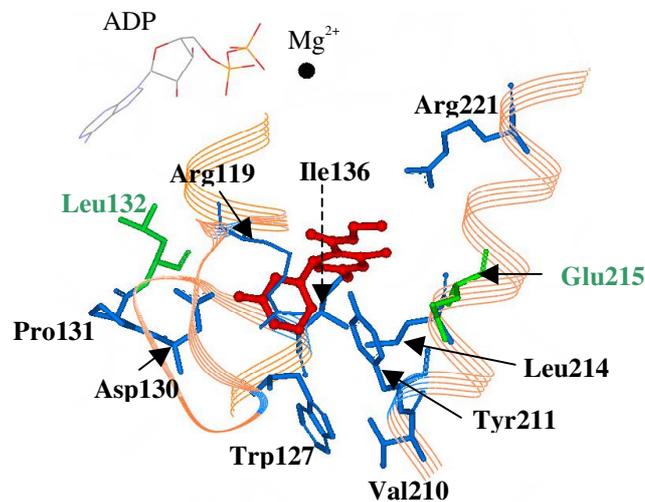


Figure 41 : Position des onze acides aminés modifiés au niveau de la poche allostérique. Les deux résidus colorés en vert correspondent aux mutations utilisées comme témoin. Le monastrol est coloré en rouge. Figure préparée avec ViewerLite50.

Au cours de cette étude, l'effet de chaque mutation ponctuelle sur le monastrol et le STLC a été étudié à la fois par analyses enzymatiques et par H/D-MS. Contrairement au monastrol, le

STLC n'obéit pas aux cinétiques Michaéliennes classiques des inhibiteurs réversibles. Ce dernier a été récemment caractérisé comme un inhibiteur à forte fixation de type « tight-binding » (Skoufias *et al.*, 2005). Ainsi, la formation du complexe Eg5/STLC entraîne la variation simultanée des concentrations en inhibiteur et en protéine dans le milieu réactionnel au cours du temps. Cette fluctuation va considérablement compliquer le traitement des données enzymologiques et le calcul des paramètres cinétiques d'inhibition. En effet, il n'est pas possible d'utiliser les modèles d'inhibition classique puisque ces derniers ne tiennent pas compte du phénomène de déplétion. Les paramètres d'inhibition du STLC ont donc été déterminés en se basant sur les modèles proposés par Morrison et Cha (Morrison, 1969 ; Cha, 1975).

L'ensemble des résultats obtenu au cours de cette étude a fait l'objet d'une seconde publication, soumise.

II) Publication : identification des acides aminés nécessaires à l'inhibition du monastrol et du STLC

Molecular dissection of the inhibitor binding pocket of mitotic kinesin Eg5 reveals mutants that confer resistance to antimitotic agents

Sébastien Brier[‡], David Lemaire[‡], Salvatore DeBonis[§], Eric Forest[‡], Frank Kozielski[§]

[‡]Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP) and [§]Laboratoire des Moteurs Moléculaires (LMM), Institut de Biologie Structurale (CEA-CNRS-UJF), 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France.

Running title :

Site-directed mutagenesis of the Eg5 inhibitor binding pocket.

Address correspondence to:

Frank Kozielski, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France.

Tel. 0033-4-3878-4024; Fax. 0033-4-3878-5494.

E-mail: Frank.Kozielski@ibs.fr

The mitotic kinesin Eg5 plays a major role in establishing the bipolar spindle. Recently, several antimitotic inhibitors have been shown to share a common binding region on Eg5. Considering the importance of Eg5 as a potential drug target for cancer chemotherapy it is essential to understand the molecular mechanism, by which these inhibitors block Eg5 activity, and to determine the “key residues” crucial for inhibition. 11 residues in the inhibitor binding pocket were mutated and the effects were monitored by kinetic analysis and mass spectrometry. Mutants R119A, D130A, P131A, I136A, V210A, Y211A and L214A abolish the inhibitory effects of monastrol. Results for W127A and R221A are less striking, but inhibitor constants are still considerably modified compared to Eg5. Only one residue, Leu214, was found to be essential for inhibition by STLC. W127A, D130A, V210A lead to increased K_i^{app} values, but binding of STLC is still tight. R119A, P131A, Y211A and R221A convert STLC into a classical rather than a tight-binding inhibitor with increased inhibitor constants. These results demonstrate that monastrol and STLC interact with different amino-acids within the same binding region, suggesting that this site is highly flexible to accommodate different types of inhibitors. The drug specificity is due to multiple interactions not only with loop L5, but also with residues located in helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$. These results suggest that tumour cells might develop resistance to Eg5 inhibitors, by expressing Eg5 point mutants that retain the enzyme activity, but prevent inhibition, a feature that is observed for certain tubulin inhibitors.

During cell division, the duplicated genomic information is equally segregated between the two daughter cells by the mitotic spindle, a self-organizing bipolar apparatus composed of microtubules (MTs) and associated proteins. Kinesin related proteins (KRP) play a major role in establishing and maintaining the mitotic spindle. HsEg5 (called Eg5 throughout the text), a member of the kinesin-5 subfamily, is required for the separation of the

duplicated centrosomes (1, 2) and probably forms a bipolar homotetramer with two motor domains at both ends of a central rod (3-5). Eg5 crosslinks and slides antiparallel MTs in opposite directions using the energy from ATP hydrolysis to generate the outward force required for centrosome migration (6-8). This crucial role has identified Eg5 as a promising target for cancer chemotherapy (For review 9-11). Failure of Eg5 function blocks centrosome migration, leads to cell cycle arrest with a characteristic monopolar mitotic spindle (1, 12, 13), and eventually to apoptotic cell death.

Several inhibitors targeting the motor domain of Eg5 have been identified using both cell-based and *in vitro* assays. Among these are monastrol (Figure 1A), the first molecule discovered (12, 14); terpendole E, a compound isolated from a fungal strain (15); CK0106023, a quinazolinone analogue (16); HR22C16, an indole β -carboline (17, 18); certain phenothiazine analogues and S-trityl-L-cysteine (STLC) (Figure 1B) (19). Recently, chemically optimised Eg5 inhibitors were also reported such as the 3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazoles (20) and a series of monastrol analogues (21). The mechanism by which monastrol inhibits Eg5 has been investigated recently by both kinetic analysis and crystallization of the ternary Eg5-ADP-monastrol complex (14, 22-27). Monastrol is a classical, reversible inhibitor which is uncompetitive with respect to ATP. The binding occurs by induced-fit in a pocket located 12 Å away from the nucleotide-binding site. The formation of the inhibitor binding site requires both local and distal conformational changes which still allows ATP binding but locks Eg5 in a conformation not suitable for ADP release. Monastrol does not disrupt Eg5-MTs interactions (24-25). The ternary Eg5-ADP-monastrol complex might be able to bind MTs in a low-friction mode without productive ATP hydrolysis and coupled conformational changes (25). In addition, the long-term effects of monastrol on two human cell lines from gastric and colon carcinomas have also been reported (28). Monastrol and several other inhibitors lead to apoptotic cell death, making these molecules a promising starting point for the development of more potent drugs (18-19).

STLC is a new potent antimetabolic Eg5 inhibitor. This molecule is far more effective *in vitro* and in cell-based assays than monastrol (19) and displays tumour growth inhibition activity as shown in the NCI 60 tumour cell line screen. STLC was recently characterized as a reversible tight-binding inhibitor (estimated $K_i^{app} < 100$ nM) which inhibits both basal and microtubule-stimulated ATPase activities in a not competitive manner with respect to ATP (29). In addition, we have lately demonstrated that STLC and monastrol share a common induced-fit binding region on Eg5 formed by helix $\alpha 3$ /strand $\beta 5$ and loop L5/helix $\alpha 2$. Hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry experiments (H/D-MS) indicate that both inhibitors might trigger similar local conformational changes within the interaction site (30).

The aim of the work reported here is to determine the function of selected residues in the mechanism of Eg5 inhibition by monastrol and STLC. Eleven residues located in the inhibitor binding pocket were mutated against alanine and the effects of each point mutation on the inhibition by monastrol or STLC were monitored using both kinetic analysis and H/D-MS (31-33). L214A represents the only mutant that completely abolishes the inhibition of Eg5 activity by monastrol and STLC whereas the other mutations display different effects on both inhibitors. These observations lead us to suppose that monastrol and STLC use distinct amino-acids within their common binding-region.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs. The QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit was from Stratagene. Competent XL-10 and BL21(DE3)pLysS cells were obtained from NOVAGEN. HisTrap chromatographic columns were purchased from Amersham Pharmacia Biotech. TFA, PIPES, ATP, D₂O, lysozyme, pepsin and kanamycin were obtained from Sigma-Aldrich. IPTG was purchased from ICN. Acetonitrile (CH₃CN) was obtained from SDS. Racemic monastrol was purchased from BIOMOL

Feinchemikalien and STLC was from the NCI or Novabiochem. Chemicals for Eg5 ATPase activity assays were from sources indicated by Hackney and Jiang (34). Cytophos (malachite-green based reagent) for end-point assays was obtained from Cytoskeleton.

Plasmid construction. Plasmids and primers used in this study are listed in table S1 and S2, supplementary materials, respectively. The construction of plasmids pEg5₁₋₃₈₆ (coding for residues 1 to 386 of the HsEg5 motor domain) and pEg5₁₋₃₈₆ PB (containing *PmlI* and *BstBI* restriction sites) has been described previously (22, 30). Two additional unique restriction sites (*BsaI* and *EagI*) were introduced in the pEg5₁₋₃₈₆ PB plasmid by silent mutagenesis upstream and downstream of the region coding for the second potential inhibitor binding site (strand $\beta 5$ / helix $\alpha 3$) identified by H/D-MS to generate plasmid pEg5₁₋₃₈₆ BE.

The pEg5₁₋₃₈₆ BE and pEg5₁₋₃₈₆ PB vectors were used to create the plasmids containing the desired point mutations. 11 residues were selected for mutagenesis based on the crystal structure of the ternary Eg5-ADP-monastrol complex (23) and results obtained by H/D-MS (30) (Figure 2A). Two residues, adjacent to the inhibitor binding pocket but not directly implicated in monastrol binding were selected as controls. The others were implicated either in inhibitor binding or in the formation of the inhibitor pocket. The pEg5₁₋₃₈₆ BE plasmids were cloned by inserting the primers containing the desired point mutations between the *BsaI* and *EagI* restriction sites. These primers also contain a new unique restriction site subsequently used to control the presence of the insert: *BsiWI* for pEg5₁₋₃₈₆ BE1 to 4 and *BsrGI* for pEg5₁₋₃₈₆ BE5 (Table S1).

Plasmids pEg5₁₋₃₈₆ PB2 to PB6 were created by inserting primers with the desired point mutations between *PmlI* and *BstBI* restriction sites. These primers also provide a unique *SacII* restriction site as a silent mutation to control the presence of the insert. Plasmid pEg5₁₋₃₈₆ PB1 was generated by site-directed mutagenesis using primers that also contain a new unique *AgeI* restriction site. After transformation into competent *E. coli* XL-10 cells, the resulting clones were tested for the presence of the

desired restriction sites. The correctness of the cloning strategy was confirmed by DNA sequencing.

Expression and purification of Eg5 constructs. All Eg5 mutants were expressed and purified as described previously for Eg5 (22, 30). Eg5 constructs were analysed by SDS-PAGE, N-terminal protein sequencing and mass spectrometry. The effect of each mutation on the global fold of the Eg5 proteins was investigated by H/D exchange – MS analysis.

Kinesin end-point assay for $K_{m,ATP}$ measurements.

Measurement of inorganic phosphate (P_i) generated during ATP hydrolysis was carried out using the Cytophos Phosphate Assay (35). Experiments were performed in buffer A25 (25 mM ACES / KOH at pH 6.9, 2 mM magnesium acetate, 2 mM potassium EGTA, 0.1 mM potassium EDTA and 1 mM β -mercaptoethanol) supplemented with 150 mM NaCl and ATP (up to 300 μ M). Reactions were initiated by addition of Eg5 proteins in A25 buffer (final volume of 300 μ L). Protein concentrations used were optimised for each mutant. The reactions were incubated at room temperature and assayed for P_i production every minute by diluting 30 μ L of the mixture in 70 μ L of Cytophos reagent. The reactions were incubated for 10 min and the absorbance determined at 650 nm. For each protein the ATP affinity ($K_{m,ATP}$) was determined using the Lineweaver-Burk representation.

Determination of inhibitor constants for monastrol and STLC.

All experiments were performed in triplicate at room temperature. Basal ATPase activities were measured using the pyruvate kinase / lactate dehydrogenase coupled assay in buffer A25 (34). Kinetics were monitored using a 96-well Sunrise photometer (TECAN, Maennedorf, Switzerland). The final DMSO concentration in all cases was 2.4 % in a constant volume of 200 μ L. Data were analysed using Kaleidagraph 3.0 (Synergy Software).

Measurements of inhibition of basal Eg5 ATPase activity by monastrol was initiated by diluting 5 μ L of Eg5 in 195 μ L of buffer A25 supplemented with 150 mM NaCl and 2

mM ATP, to guarantee that the substrate is present in large excess. The protein concentrations were optimized individually for each Eg5 mutant as follows: 0.93 μ M for Eg5, 4.75 μ M for both R119A and W127A, 0.41 μ M for D130A, 0.67 μ M for P131A, 0.87 μ M for L132A, 1.34 μ M for I136A, 6.22 μ M for V210A, 7.5 μ M for Y211A, 0.78 μ M for L214A, 0.57 μ M for E215A and 0.65 μ M for R221A. IC_{50} values for monastrol inhibition of basal Eg5 ATPase activity were determined by fitting the data to the binding isotherm equation 1

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}} \right)^n} \quad (\text{Eq. 1})$$

where v_i is the reaction velocity at different monastrol concentrations $[I]$, v_0 is the initial velocity in the absence of inhibitor, and n represents the number of monastrol molecules bound to Eg5 (in our case $n = 1$). The inhibitor constant for monastrol ($K_{i,Max}$) was estimated from the Dixon representation (for uncompetitive inhibition) at saturating substrate concentration (36) (Eq. 2 and 3)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max} \times K_i} \times [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

$[S] \gg K_m :$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max} \times K_i} \times [I] + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Eq. 3})$$

where v , V_{max} , K_m , $[I]$ and $[S]$ represent the initial velocity, maximal velocity, the Michaelis-Menten constant, the monastrol concentration and the concentration of ATP, respectively.

Inhibition measurements of basal Eg5 ATPase activity by STLC were initiated by diluting 30 μ L of a pre-incubated Eg5 / STLC solution in 170 μ L of A25 buffer supplemented with 300 mM NaCl and 1 mM ATP. For each experiment, 6 different protein concentrations were incubated at room temperature for 20 min with increasing

amounts of STLC. The data were fit using the Morrison equation (37, 38)

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (\text{Eq. 4})$$

where [E] is the active enzyme concentration, [I] is the total inhibitor concentration, K_i^{app} is the apparent dissociation constant, v_i is the initial reaction velocity at inhibitor concentration [I], and v_0 is the initial velocity in the absence of inhibitor. The apparent inhibitor constant $K_i^{app}_{STLC}$ was estimated using either Eq. 4 or the following equation (39, 40).

$$IC_{50} = K_i^{app} + \frac{[E_t]}{2} \quad (\text{Eq. 5})$$

where K_i^{app} represents the apparent inhibitor constant of STLC and [E]_t the total enzyme concentration. In our case, Eq. 5 can be used for all inhibition mechanisms since the enzyme is pre-incubated with the tight-binding inhibitor. As a result, the observed IC_{50} values are independent of the substrate concentration regardless of the inhibition mechanism (41). The inhibition of MT-stimulated Eg5 ATPase activity by monastrol or STLC was performed as previously described (22, 29).

Pepsin digestions. All protein digestions were performed in an ice bath at 0°C. A pepsin solution (2.1 µg/µL) was prepared in 0.1 M H₃PO₄, pH 1.6, and precooled to 0°C. Eg5 constructs in 1 mM PIPES buffer were digested for 2 min at pH 2.2 with a protease / substrate ratio of 1/1 (w/w).

Preparation of Eg5 – inhibitor complexes. Inhibitor stock solutions (50 mM in DMSO) were diluted in 1 mM PIPES buffer, pH 7.3. The protein-inhibitor complexes were obtained after 1 min incubation at room temperature (Eg5 / inhibitor molar ratio tested : 1/4).

H/D exchange experiments on peptide fragments. 290 pmol of Eg5 proteins in the presence or absence of

inhibitor were diluted 50 fold in deuterated buffer (1 mM PIPES, pD 7.3). Deuteration was performed at 0°C for 5 min in order to exchange all accessible amide hydrogens of the protein by deuterium (30). Isotopic back-exchange was quenched by the addition of precooled pepsin solution, pH 1.6. After pepsin digestion, the deuterated peptides were rapidly concentrated and desalted on a C4 Peptide MacroTrap cartridge (Michrom) at a flow rate of 300 µL/min. Subsequently, they were separated on a reverse phase C18 Interchrom column (1 mm x 100 mm) by using a linear gradient from 5 % to 100 % CH₃CN / H₂O (9/1 - v/v), 0.03 % TFA over a run time of 35 min at a flow rate of 50 µL/min. To limit isotopic back-exchanges, the injector and column were precooled and maintained in an ice bath at 0°C. Finally, the deuterated peptides were analyzed by ESI-MS. (Eq. 5)

ESI-MS analyses. MS analyses were performed on a Q-TOF Micro mass spectrometer (Waters) equipped with a Z-spray ion source operating with a needle voltage of 3 kV. Sample Cone and Extraction Cone voltages were 30 V and 4 V, respectively. Prior to analysis, samples were desalted on a C4 protein MacroTrap cartridge (Michrom) with H₂O supplemented with 0.1% TFA. Proteins were eluted with 60 % of CH₃CN / H₂O (9/1 – v/v), 0.1% TFA and collected. Samples were then infused continuously at a flow rate of 5 µL/min. Spectra were acquired and processed with MassLynx 4.0.

H/D exchange experiments on peptide fragments were performed on a quadrupole ion trap mass spectrometer ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics) equipped with an ionspray source. MS experiments were carried out with a capillary voltage set at 4 kV and an end plate off set voltage at 500 V. The gas nebulizer (N₂) pressure was set at 10 psi and the dry gas flow (N₂) at 8 L/min at a temperature of 250°C. Mass spectra were analyzed using DataAnalysis 3.0 and Biotoools 2.1 software.

RESULTS

Characterization of Eg5 mutants. The side chains of amino-acids selected for mutagenesis are mainly oriented towards the inhibitor except for residues Trp127, Leu132

and Glu215 (Figure 2B). Trp127 is not directly implicated in inhibitor binding but its side chain is required to cap the entrance of the cavity (23). Mutations L132A and E215A are not expected to modify the inhibition of Eg5 by monastrol or STLC, since their side chains point away from the binding region (Figure 2B). Both mutations were used as controls.

The presence of each point mutation was confirmed by ESI-MS analysis comparing the measured molecular mass with the average molecular weight calculated from the mutated protein's primary sequence. The experimental results are very close to the theoretical ones (with deviations between 0.3 Da and 4.5 Da) confirming the presence of the desired point mutation (Table 1). Furthermore, the localization of each point mutation was investigated by digesting the Eg5 mutants with pepsin and subsequent LC-ESI-MS analysis. The three peptides Ala103-Glu124 (for R119A), Tyr125-Glu145 (for W127A, D130A, P131A, L132A and I136A) and Leu202-Ile227 (for V210A, Y211A, L214A, E215A and R221A) located within the inhibitor-binding pocket were further used to verify the presence of the desired point mutation. The differences between the calculated and measured peptide masses clearly confirm the presence of the mutations in the inhibitor-binding pocket (Table 1).

The global fold of wild type (named Eg5 throughout the text) and mutated Eg5 proteins was compared by H/D-MS analysis. After deuteration and pepsin digestion, the deuteration pattern of mutated Eg5 peptides shows no significant difference compared to Eg5 (data not shown). Therefore, the solvent accessibility is comparable for all Eg5 proteins indicating that their global folds are not significantly altered by the point mutations.

Mutants were also assayed for basal and MT-stimulated ATPase activities with Eg5 as a control. D130A, L132A, I136A, Y211A, L214A, E215A and R221A display very similar k_{cat} values for basal ATPase activity compared to Eg5 (Table 2). R119A, W127A and P131A show a 4 to 5-fold decrease in their k_{cat} values and V210A has a 8-fold reduction. Interestingly, mutations with a 4 to 5 fold decrease are located in loop L5 whereas the mutation with a 8 fold decrease is found in helix $\alpha 3$. All mutants display normal or very close to normal $K_{m,ATP}$ values

(varying less than a factor 2 from Eg5) suggesting that they do not significantly affect the affinity for ATP. The differences between the mutants are less pronounced when measuring the MT-stimulated ATPase activity. The k_{cat} values for mutants D130A, P131A, L132A, I136A, L214A, E215A and R221A differ by less than a factor two, whereas mutants R119A, W127A, V210A and Y211A show a 3 to 6 fold decrease. A similar overall tendency is observed for $K_{0.5,MT}$ values.

Effects of L132A and E215A control mutations on monastrol and STLC inhibition. Mutations L132A and E215A are not expected to affect the inhibition by monastrol or STLC and were used to further validate the experimental approach. Both mutants do not significantly affect the inhibition of basal or MT-stimulated ATPase activity by monastrol (Table 3) compared to Eg5 and have similar IC_{50} and $K_{i,MS}$ values of 3.1 and 8.5 μM for Eg5, 4.5 and 8.6 μM for L132A and 3.4 and 9.4 μM for E215A (Figures 3A,B). The effects of L132A and E215A mutations were also investigated by H/D-MS. The observed reduction of the deuterium incorporation rate in peptides of the inhibitor binding pocket remains unaltered with respect to Eg5 (Table 3). Therefore, the formation of the ternary Eg5-ADP-monastrol complex as well as the conformational changes induced upon monastrol binding are not significantly affected by these mutants.

STLC does not obey the kinetics of a classical reversible inhibitor. The IC_{50} values for the inhibition of basal ATPase activity rise with increasing amounts of Eg5 (29) a characteristic feature of tight-binding inhibition (38, 39). To determine whether or not L132A and E215A modify the tight-binding behaviour of STLC compared to Eg5, the IC_{50} values and estimations of the apparent inhibitor constants ($K_i^{app,STLC}$) were determined. The result obtained with Eg5 is in good agreement with a previous report and the IC_{50} values are still dependent on the enzyme concentration with a $K_i^{app,STLC}$ of 26 nM (Figures 3C,F) (29). Neither L132A nor E215A affect the inhibition by STLC compared to Eg5 with a $K_i^{app,STLC}$ of 24 nM for L132A (Figures 3D,F) and 14 nM for E215A (Figures 3E,F). Ackermann-Potter plots of the steady state velocity against total enzyme concentration at

different STLC concentrations (Figure 4A) are concave-up curves with asymptote confirming that tight-binding is occurring (39-40). On the other hand, the Ackermann-Potter representation for monastrol gives rise to straight lines (Figure 4B). Interestingly, the presence of MTs turns STLC into a classical reversible inhibitor (Figure 4C). As reported for monastrol, neither L132A nor E215A modify the inhibition of the MT-stimulated ATPase activity by STLC with $K_i^{app}_{STLC}$ values of 0.5 μM for Eg5, 0.4 μM for L132A and 0.5 μM for E215A (Table 4). Ackermann potter plots also confirm that the STLC behaviour is unchanged with L132A (data not shown) or E215A (Figures 4D,E), in the presence or absence of MTs. In addition, the reduction of the deuterium incorporation rates observed in peptides of the inhibitor binding site remains unaltered with respect to Eg5 (Table 4). As observed for monastrol, the formation of the ternary Eg5-ADP-STLC complex is unaffected by both mutations. Collectively, these results show that the control mutations do not modify the effects of monastrol or STLC inhibition when compared to Eg5.

Effects of point mutations on monastrol inhibition. All other mutants investigated modify the effect of monastrol on the basal or MT-stimulated Eg5 activities (Table 3). Mutants R119A, D130A, V210A, Y211A and L214A completely abolish the inhibition by monastrol (Figure 5A). Their basal ATPase activities remain unaltered with increasing amounts of monastrol. In the presence of MTs, very similar results are obtained; monastrol either does no longer inhibit MT-stimulated Eg5 ATPase activity, leads to partial inhibition (Y211A) or considerably increases the IC_{50} value and the inhibitor constant (V210A) (Table 3). Mutants W127A, P131A, and I136A also significantly increase the inhibitor constant for monastrol and lead to a partial inhibition with high K_i values for the basal Eg5 activity (Figure 5B). The presence of MTs does not modify the effect of W127A on monastrol whereas mutants P131A and I136A completely abolish its inhibitory effect (Table 3). The smallest effect was observed for R221A (Figure 5C) with a 3 fold increase of both IC_{50} and $K_{i,Mst}$ values ($IC_{50,R221A} = 9.7 \mu\text{M}$ and $K_{i,Mst,R221A} = 27.8 \mu\text{M}$) and 4 fold increase for the inhibition of MT-

stimulated Eg5 activity (Figure 5D). It is noteworthy that R221A is also the most distant mutant from the inhibitor binding pocket.

The absence of inhibition by monastrol could be due to a failure of the inhibitor to bind to Eg5. A second possibility is that the inhibitor is still able to interact with the mutated protein but its binding does not sufficiently affect the conformational rigidity of the motor domain induced by monastrol. Indeed the insertion loop L5 of helix $\alpha 2$ is one of the most flexible portions of Eg5 in the absence of inhibitor and becomes well-defined and inflexible after monastrol binding (23). These inhibitor-dependent conformational changes thus create a rigid binding pocket and lock Eg5 in a conformation unsuitable for ATP hydrolysis. To further address this question, we studied the effects of the mutations using H/D exchange-MS experiments investigating the rates of deuterium incorporation in Eg5 peptides of the inhibitor binding pocket. In Eg5, monastrol binding reduces the deuterium incorporation rate in fragments Tyr125-Phe144 and Ile202-Leu227 (Figure 6A). In contrast, the amount of incorporated deuterium remains unchanged for D130A, Y211A or L214A suggesting that monastrol no longer binds to Eg5 (Figure 6B, Table 3). On the other hand, V210A does not prevent the monastrol binding. Fragment Leu202-Ile227 shows an increase of solvent accessibility compared to Eg5 suggesting an alteration of the rigidity of the inhibitor-pocket (data not shown). The effects of monastrol binding to R119A were only visualized on fragment Tyr125-Glu145 (Table 3). Fragments Leu202-Ile227 and Glu215-Leu227 could not be recovered after 5 min incubation in deuterated buffer. In the case of R119A it is not possible to discriminate between the two inhibition models described above. Thus, we conclude that Arg119, Asp130, Val210, Tyr211 and Leu214 are essential residues for the inhibition of Eg5 by monastrol. Residues Asp130, Tyr211 and Leu214 completely abolish the inhibitor binding whereas monastrol still interacts with V210A but does not longer inhibit its basal ATPase activity.

As observed for V210A, monastrol is still able to interact with W127A, P131A, I136A and R221A mutants (Figures 6C,D) (Table 3). Compared to Eg5, the

deuterium incorporation rate is enhanced in the fragments forming the inhibitor binding pocket. These mutants appear to increase the inhibitor constant for monastrol by altering the rigidity of the induced-fit pocket. We conclude that the effects of residues Trp127, Pro131, Ile136 and Arg221 are less striking than residue Val210 but nevertheless play a role in the stabilization of the induce-fit pocket in the absence of MTs.

H/D-MS experiments were not performed in the presence of MTs. The use of MTs adds a very high degree of complexity to the analysis since the pepsin digestion will generate too many peptide fragments. The identification of the Eg5 peptide fragments appears thus much more difficult especially after the deuteration step. Consequently, it is not possible to conclude on the function of the mutated residues in the presence of MTs. The observed failure of monastrol inhibition with R119A, D130A, P131A, I136A and L214A mutants can either be due to an absence of interaction or a modification of the inhibitor-dependent conformational changes (Table 3).

Effects of point mutations on the inhibition by STLC. In contrast to monastrol, only one mutant, L214A, completely prevents inhibition by STLC. Eg5 basal and MT-stimulated activities remain unaltered with increasing amounts of STLC (Figures 7A,B). When compared to Eg5, the deuterium incorporation rate is slightly reduced in fragment Ile202-Leu227, indicating that STLC is still able to interact with the protein (Figures 8A,B). L214A, located in helix $\alpha 3$ (Figure 2B), is the only mutant able to totally abolish the inhibition of Eg5 activity by both, monastrol or STLC, and shows the importance of other additional secondary structure elements than loop L5, involved in inhibitor binding.

Interestingly, I136A shows no effect on STLC inhibition in the absence of MTs when compared to Eg5. The IC_{50} values are still dependent on the enzyme concentration (Figure 7C) and the $K_i^{app}_{STLC}$ is similar to Eg5 with a value of 24 nM (Figure 7F, Table 4). Furthermore, no alteration of the deuterium incorporation rate is observed in fragments located in the binding pocket with respect to Eg5 (Figures 8C). Therefore, residue Ile136, situated at the onset of helix $\alpha 2$ following loop L5 (Figure 2B) does

not play an essential role in the inhibition of the basal ATPase activity by STLC. In contrast, the presence of MTs induces a 3 fold increase of the STLC inhibitor constant compare to Eg5 with a $K_i^{app}_{STLC}$ of 1,4 μ M (Table 4).

Mutants W127A, D130A, V210A significantly modify the affinity of STLC for Eg5 and the tight-binding behaviour remains unaffected (Figure 7E) whereas the apparent inhibitor constants increase by 4-19 fold with a $K_i^{app}_{STLC}$ of 406 nM, 505 nM, and 112 nM for W127A, D130A, and V210A, respectively (Figure 7F). H/D-MS reveals a modification of the deuterium incorporation rate in the inhibitor pocket for W127A (Figure 8D), D130A and V210A (Table 4). These mutations do not directly interfere with the binding of the inhibitor and seem to affect inhibition by altering the rigidity of the inhibitor-pocket (Table 4). Remarkably, R119A, P131A, Y211A and R221A change the kinetic behaviour of STLC in the absence of MTs. Variations of the IC_{50} values with total enzyme concentration are no longer observed as shown in the dose response-curves for R119A (Figure 9A) and R221A (Figure 9B). Ackermann-Potter plots for these mutants yield straight lines (Figures 9C,D) similarly to monastrol. STLC now behaves as a classical rather than a tight-binding inhibitor. The same results were observed with P131A and Y211A (data not shown). Mutants Arg119, Pro131, Tyr211 and Arg211 can be considered as critical residues for STLC tight-binding behaviour. To further characterize the effects of these mutations, we estimated the inhibitor constants using the Dixon plot (assuming uncompetitive inhibition). Interestingly, the Dixon representations yield concave-down curves for R119A (Figure 9E), Y211A, and P131A (data not shown). In these cases, a residual ATPase activity is observed at saturating concentrations of STLC (and low enzyme concentrations). Therefore the enzyme-inhibitor complex remains active but at a lower efficiency, a feature of hyperbolic inhibition (40). In contrast, the inhibition was linear for R221A (Figure 9F) and the K_i^{app} increased 35-fold with a value of 910 μ M.

DISCUSSION

The mitotic kinesin Eg5 is essential for centrosome separation and its inhibition leads to cell cycle arrest with monopolar spindle formation (1) and cell death. The abundant expression of Eg5 in human proliferating tissues and its absence in postmitotic neurones (16) demonstrate the interest in targeting this kinesin for the discovery of novel antimitotic cancer drugs. Monastrol and STLC are specific Eg5 inhibitors that block both basal and MT-stimulated ATPase activities by preventing ADP release (19, 22, 26, 29), but not ATP binding (26). We previously reported that monastrol and STLC share a common inhibitor binding region on Eg5 (30) that is also targeted by dihydropyrazoles and a quinazolinone analogue (*Ispinesib*), two other classes of Eg5 inhibitors (20,42). All four types of inhibitors bind to an induced-fit pocket formed by loop L5/helix α 2 and strand β 5/helix α 3.

In this study, eleven residues located in the inhibitor binding pocket were mutated against alanine and the effects of monastrol and STLC inhibition were monitored using kinetic analysis and H/D-MS. We show that the results obtained with our mutation study agree very well with the binding mode of S-monastrol revealed by the atomic structure of the monastrol-Eg5-ADP ternary complex (23). We also show that, although both inhibitors bind to the same cavity in Eg5, the residues in the inhibitor binding region play different roles for monastrol and for STLC. Consequently, we propose that monastrol and STLC use distinct residues within their common binding site to create a binding pocket by induced fit. It is also tempting to suggest that both inhibitors may use a common mechanism to lock Eg5 in a conformation not suitable for ADP release.

Residues Arg119, Asp130, Pro131, Ile136, Val210, Tyr211 and Leu214 are essential for monastrol inhibition. The alanine substitution of Asp130, Val210 and Leu214 prevent the binding of monastrol to Eg5. The crystal structure of the ternary Eg5-ADP-monastrol complex (23) reveals that Asp130, Val210 and Tyr211 do not directly interact with the inhibitor. They rather seem to play a role in the formation of the monastrol-binding pocket either by stabilizing the inhibitor-dependent conformational changes or by accommodating space for

the inhibitor, as reported for residue Tyr211 (23). The side chain of Arg119 is also known to accommodate space for the inhibitor and seems to interact directly with the phenolic hydroxyl group of monastrol. In contrast, V210A completely abolishes the inhibitory effects of monastrol without preventing its binding to Eg5. The alanine substitution of Trp127 appears insufficient to completely abolish the inhibition of Eg5 activity by monastrol. This result is surprising since this residue is directly involved in the formation of the inhibitor pocket. Upon monastrol binding, the side chain of Trp127 relocates inward by $\sim 10 \text{ \AA}$ in order to cap the entrance of the induce-fit cavity together with Arg119 and Tyr211 (23). The substitution of residue Trp127 by alanine decreases the affinity of monastrol by ~ 10 -fold. - interactions may occur between the tryptophan indol ring and the phenol group of Tyr211 in order to stabilize loop L5. Thus, the contact between Trp127 and Tyr211 helps to stabilize the conformational changes triggered by monastrol on loop L5. Our results also indicate that residues Pro131 (at the end of loop L5) and Ile136 (at the onset of helix α 2 following loop L5) are required for the stabilization of the inhibitor pocket.

Of the eleven mutations tested, only Leu214 (located at the beginning of helix α 3) was identified as critical for the inhibition by both monastrol and STLC. In contrast to monastrol, L214A completely abolishes the inhibitory effects of STLC without preventing its binding to Eg5. Residue Leu214 might thus play a key role in the stabilization of the STLC binding pocket. In contrast, the other point mutations have different effects on the inhibition by STLC and by monastrol (Tables 3-4). While D130A completely abolishes the inhibitory effects of monastrol by preventing its binding to Eg5, the same mutation modifies the STLC inhibitor constant. In addition, I136A strongly decreases the affinity of monastrol (Figures 5B, 6C) but has no effect on STLC inhibition (Figures 7C, 8C). Furthermore residues Arg119, Pro131, Tyr211 and Arg221 are critical for STLC tight-binding behaviour. Their mutation turns STLC into a classical inhibitor with weaker affinity for Eg5 (Table 4). STLC also acts as a hyperbolic inhibitor when residues Arg119, Pro131 and Tyr211 are alanine-

substituted. The enzyme-inhibitor complex is still able to hydrolyse ATP but at a lower efficiency (38). Collectively, these data clearly show that the residues selected for mutagenesis play different roles for monastrol and for STLC.

The biological consequences of this study are important. New inhibitors of certain mitotic spindle proteins are investigated as alternatives to inhibitors that target microtubules. The aim is to develop drugs that are less toxic than current ones and that hopefully do not induce resistance as shown for several anti-tubulin drugs (44). Several mechanisms are known to confer resistance to cells exposed to antimetabolic drugs, including the expression of different tubulin isoforms and the appearance of tubulin point mutants. Here we show that several single point mutations introduced into the common inhibitor binding cavity on Eg5 can totally abolish the inhibitory effects of these inhibitors with only minor effects on the *in vitro* activity of Eg5, thus probably leaving the protein functionally intact. This study demonstrates the possibility that cells, in analogy to known tubulin drugs, might also develop resistance against future drugs that target mitotic Eg5. Such a mechanism of resistance has just been discovered for the potent Eg5 inhibitor *Ispinesib* (42). *Ispinesib*-resistant cancerous cells were found to harbor a D130V substitution located in loop L5 of Eg5. This new study clearly shows that point mutations in loop L5 of the Eg5 motor domain represents a mechanism of acquired resistance in cancerous cells. Further work will include depletion of Eg5 in HeLa cells and subsequent transfection with human Eg5 carrying the different point mutations investigated here. This should indicate whether these point mutations are capable of inducing inhibitor-resistance in cancer cell-lines (especially for the point mutation L214A), and whether mutated Eg5 proteins are still able to full fill their biological roles in the context of cell division.

REFERENCES

1. Blangy A., Lane H. A., d'Herin P., Harper M., Kress M., and Nigg E. A. (1995). *Cell* 83, 1159-1169.

2. Whitehead, C. M., and Rattner, J. B. (1998). *J. Cell Sci.* 111, 2551-2561.

3. Cole, D. G., Saxton, W. M., Sheehan, K. B., and Scholey, J. M. (1994). *J. Biol. Chem.* 269, 22913-22916.

4. Kashina, A. S., Baskin, R. J., Wedaman, K. P., Saxton, W. M., and Scholey, J. M. (1996). *Nature* 379, 270-272.

5. Gordon, D. M., and Roof, D. M. (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 28779-28786.

6. Kashina, A. S., Rogers, G. C., and Scholey, J. M. (1997). *Biochim. Biophys. Acta.* 1357, 257-271.

7. Sharp, D. J., Rogers, G. C., and Scholey, J. M. (2000). *Nature* 407, 41-47.

8. Kaptein, L. C., Peterman, E. J. G., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M., and Schmidt, C. F. (2005). *Nature* 435, 114-118.

9. Wood, K. W., Cornwell, W. D., and Jackson, J. R. (2001). *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 370-377.

10. Miyamoto, D. T., Perlman, Z. E., Mitchison, T. J., and Shirasu-Hiza, M. (2003). *Progress in Cell Cycle Research* 5, 349-360.

11. Bergnes G., Brejc, K., and Belmont., L. (2005). *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5, 127-145.

12. Mayer T. U., Kapoor T. M., Haggarty S. J., King R. W., Schreiber S. L., and Mitchison, T. J. (1999). *Science* 286, 971-974.

13. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000). *J. Cell Biol.* 150, 975-988.

14. Maliga Z., Kapoor T. M., and Mitchison, T. J. (2002). *Chem. Biol.* 9, 989-996.

15. Nakazawa J., Yajima J., Usui T., Ueki M., Takatsuki A., Imoto M., Toyoshima Y. Y., and Osada, H. (2003). *Chem. Biol.* 10, 131-137.

16. Sakowicz, R., Finer, J. T., Beraud, C., Crompton, A., Lewis, E., Fritsch, A., Lee, Y., Mak, J., Moody, R., Turincio, R., Chabala, J. C., Gonzales, P., Roth, S., Weitman, S., and Wood, K. W. (2004). *Cancer Res* 64, 3276-3280.

17. Hota, S., Yarrow, J. C., Yang, J. G., Garrett, S., Renduchintala, K. V., Mayer, T. U., and Kapoor, T. M. (2005). *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 2379- 2382.

18. Marcus, A. I., Thomas, S. L., Garrett, S., Zelnak, A., Kapoor, T., and Giannakakou, P. (2005). *J. Biol. Chem.* 280, 11569-11577.

19. DeBonis, S., Skoufias, D. A., Lebeau, L., Robin, G., Margolis, R., Wade, R. H., and Kozielski, F. (2004). *Mol. Cancer Ther.* 3, 1079-1090.

20. Cox, C. D., Breslin, M. J., Mariano, B. J., Coleman, P. J., Buser, C. A., Walsh, E. S., Hamilton, K., Huber, H. E., Kohl, N. E., Torrent, M., Yan, Y., Kuo, L. C., and Hartman, G. D. (2005). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 2041-2045.

21. Gartner, M., Sunder-Plassmann, N., Seiler, J., Utz, M., Vernos, I., Surrey, T., and Giannis, A. (2005). *ChemBioChem* 6, 1-6.

22. DeBonis S., Simorre J. P., Crevel I., Lebeau L., Skoufias D. A., Blangy A., Ebel C., Gans P., Cross R., Hackney D. D., Wade R. H., and Kozielski, F. (2003). *Biochemistry* 42, 338-349.

23. Yan, Y., Sardana, V., Xu, B., Homnick, C., Halczenko, W., Buser, C. A., Schaber, M., Hartman, G. D., Huber, H. E., and Kuo, L. C. (2004). *J. Mol. Biol.* 335, 547-554.

24. Luo, L., Carson, J. D., Dhana, D., Jackson, J. R., Huang, P. S., Lee, Y., Sakowicz, R., and Copeland, R. A. (2004). *Biochemistry* 43,15258-15266.

25. Crevel, I. M-T. C., Alonso, M. C., and Cross, R. A. (2004). *Current Biology* 14, R411-R412.

26. Cochran, J. C., Gatial III, J. E., Kapoor, T. M., and Gilbert, S. P. (2005). *J. Biol. Chem.* 280,12658-12667.

27. Rosenfeld, S.S., Xing, J., Jefferson, G.M., King, P.H. (2005). *J. Biol. Chem.* 280, 35684-35695.

28. Leizerman, I., Avunie-Masala, R., Elkabets, M., Fich, A., and Gheber, L. (2004). *Cell Mol. Life Sci.* 61, 2060-2070.

29. Skoufias, D. A., DeBonis, S., Lebeau, L., Crevel, I., Cross, R., Wade, R. H., Hackney, D., and Kozielski, F. (2005). *Submitted.*

30. Brier, S., Lemaire, D., Debonis, S., Forest, E., and Kozielski, F. (2004). *Biochemistry* 43, 13072-13082.

31. Englander, J. J., Rogero, J. R., and Englander, S. W. (1985). *Anal. Biochem.* 147, 234-244.

32. Dharmasiri, K., and Smith, D. L. (1996). *Anal. Chem.* 68, 2340-2344.

33. Garcia, R., A., Pantazatos, D., and Villarreal, F., J. (2004). *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 81-91.
34. Hackney, D. D., and Jiang, W. (2001). *Methods Mol. Biol.* 164, 65-71.
35. Funk, C. J., Davis, A. S., Hopkins, J. A., and Middleton, K. M. (2004). *Anal. Biochem.* 329, 68-76.
36. Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics : Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, pp 100-159, Wiley-Interscience publication.
37. Morrison, J. F. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 185, 269-289.
38. Williams, J. W., and Morrison, J. F. (1979). *Methods Enzymol.* 63, 437-467.
39. Copeland, R. A. (2000) *Enzymes 2nd ed. : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, pp 305-317, Wiley-VCH, New York.
40. Szedlaczek, S. E., and Duggleby, R. G. (1995) Kinetics of slow and tight-binding inhibitors, *Methods Enzymol.* 249, 144-180.
41. Cha, S. (1975). *Biochem. Pharmacol.* 24, 2177-2185.
42. Jackson, J.R., Auger, K.R., Gilmartin, A., Eng, W.K., Luo, L., Concha, N., Parrish, C., Sutton, D., Diamond, M., Giardinieri, M., Zhang, S.Y., and Huang, P. (GlaxoSmithKline) – Wood, K. W., Belmont, L., Lee, Y., Bergnes, G., Anderson, R., Brejc, K., and Sakowicz, R. (Cytokinetics) (2005). Poster Meeting C207, *AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Target in Cancer Therapeutics: Discovery, Biology and Clinical Applications*, November 14-18, Philadelphia.
43. Turner J., Anderson R., Guo J., Beraud C., Fletterick R., and Sakowicz, R. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 25496-25502.
44. Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). *Nature Reviews Cancer* 4, 253-265.

bis(β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid; H/D, Hydrogen / Deuterium; IPTG, Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; ESI, electrospray ionisation; LC-MS, Liquid chromatography – Mass Spectrometry; MS, Mass Spectrometry; MS-MS, Mass Spectrometry-Mass Spectrometry; m/z, mass to charge ratio; MTs, microtubules; NCI, National Cancer Institute; PIPES, Piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid); SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TFA, Trifluoroacetic acid; STLC, S-trityl-L-cysteine.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-Pierre Andrieu for N-terminal sequencing of Eg5 constructs. We also thank the Drug Synthesis & Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis for providing us with S-trityl-L-cysteine. The authors thank Dr. Richard Wade (IBS) for helpful discussions. This work has been funded by grants from SPINE (Structural Proteomics In Europe), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer, contract number 5197) and the Rhône-Alpes region (contract number : 03 013690 02; 03 013690 01). SB is supported by a PhD grant from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique).

FOOTNOTES

The abbreviations used are : ACES, *N*-(2-Acetamido)-2-aminoethane sulfonic acid; ADP, Adenosine 5'-diphosphate; ATP, Adenosine 5'-triphosphate; Da, Dalton; DMSO, Dimethyl sulfoxide; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, Ethyleneglycol-

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chemical structures of the Eg5 inhibitors (A) monastrol and (B) S-trityl-L-cysteine.

Figure 2. (A) Location of the 11 residues targeted for mutagenesis (black asterisks) in the Eg5 primary sequence. The two peptide sequences identified by H/D exchange experiments to form the 3-dimensional inhibitor binding pocket are coloured in red. Secondary structure elements determined by X-ray crystallography (43) are shown below the sequence. (B) Ribbon representation of the ternary Eg5-ADP-monastrol complex (23) showing the position of the 11 residues selected for mutagenesis. Residues used as controls are coloured in blue; the others are coloured in green. ADP and monastrol (red) are represented as ball-and-stick-models. Figure 2B was prepared using ViewerLite50 and Molscript.

Figure 3. Effects of monastrol and STLC on the basal ATPase activities of Eg5, L132A and E215. (A) Substitutions of residues Leu132 (•) or Glu215 (•) by alanine show no effect on the inhibition of basal ATPase activity, compared to Eg5 (•). The IC_{50} values are unchanged with respect to Eg5 (3.1 μ M for Eg5, 4.5 μ M for L132A and 3.4 μ M for E215A). (B) Estimation of the inhibitor constants for monastrol ($K_{i,Mst}$) using Dixon plots at saturating substrate concentration. The $K_{i,Mst}$ value is unaffected for mutants L132A and E215A with respect to Eg5 ($K_{i,Mst,Eg5} = 8.5 \mu$ M ; $K_{i,Mst,L132A} = 8.6 \mu$ M; $K_{i,Mst,E215A} = 9.4 \mu$ M). (C, D, E) Inhibition of basal Eg5, L132A and E215A ATPase activities by STLC. The effect of STLC on the ATPase activity is unchanged for mutants L132A and E215A compared to Eg5. The IC_{50} values increase with increasing amounts of protein confirming the tight-binding behaviour of STLC. Each experiment was realized in triplicate and the data were fit using Eq.4. The protein concentrations used are 0.22 μ M (•), 0.44 μ M (•), 0.89 μ M (•), 1.79 μ M (•), 2.74 μ M (•) and 3.59 μ M (•) for Eg5; 0.26 μ M (•), 0.52 μ M (•), 0.78 μ M (•), 1.04 μ M (•), 1.3 μ M (•) and 1.54 μ M (•) for L132A; 0.27 μ M (•), 0.54 μ M (•), 0.81 μ M (•), 1.08 μ M (•), 1.96 μ M (•) and 3.5 μ M (•) for E215A. (F) Plots of IC_{50} values as a function of enzyme concentration. Data were fit using Eq. 5; the y-intercept of each line is equal to the apparent STLC inhibitor constant. The $K_i^{app}_{STLC}$ values are 26 nM for Eg5 (•), 24 nM for L132A (•) and 14 nM for E215A (•).

Figure 4. Ackermann-Potter representation for the identification of tight-binding behaviour. (A) Eg5 steady state velocity as a function of total protein concentration in the absence (•) or presence 0.9 μ M (•) and 1.5 μ M (•) STLC. Plots are concave-up curves with an asymptote, a diagnostic for tight-binding inhibition. The asymptote intersects the x axis at Eg5 concentration • STLC concentration, indicating that the concentration of STLC required for

Eg5 ATPase inhibition is comparable to the concentration of the enzyme. **(B)** Plots of the velocity against the protein concentration for a non-tight binding inhibitor are linear, as shown for Eg5 in the presence of increasing amounts of monastrol: 0 μM (\bullet), 2 μM (\bullet), 10 μM (\bullet) and 25 μM (\bullet). **(C)** The presence of MTs modifies the STLC tight-binding behaviour. Ackermann-Potter representations yield straight lines in the presence of increasing amounts of STLC: 0 μM (\bullet), 0.25 μM (\bullet), 1 μM (\bullet), 5 μM (\bullet) and 2.5 μM (\bullet). **(D-E)** Mutant E215A does not modify the kinetic behaviour of STLC. The Ackermann-Potter plots give rise to straight lines or concave-up curves with an asymptote in the presence or absence of MTs, respectively. STLC concentrations used are 0 μM (\bullet), 0.9 μM (\bullet) and 1.5 μM (\bullet) in the absence of MTs ; 0 μM (\bullet), 0.25 μM (\bullet), 0.5 μM (\bullet), 1 μM (\bullet) and 5 μM (\bullet) in the presence of MTs. All experiments were realized in triplicate.

Figure 5. Effects of point mutations on the inhibition by monastrol. **(A)** Mutants R119A (\bullet), D130A (\bullet), V210A (\bullet), Y211A (\bullet), and L214A (\bullet) completely prevent the inhibition of Eg5 by monastrol. **(B)** Mutants W127A (\bullet), P131A (\bullet), and I136A (\bullet) lead to partial inhibition of basal ATPase activity. **(C)** The effect of monastrol is slightly modified for mutant R221A (\bullet) compared to Eg5 (\bullet). The point mutation increases by 3-fold the IC_{50} value ($\text{IC}_{50^{\text{Eg5}}} = 3.1 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50^{\text{R221A}}} = 9.7 \mu\text{M}$). **(D)**. Similar results are observed in the presence of MTs. Mutant R221A (\square) also induces a 4 fold increase of the IC_{50} value compared to Eg5 (\bullet) with 41 μM for R221A and 17 μM for Eg5.

Figure 6. Effects of monastrol binding on the deuterium incorporation rates of peptides Tyr125-Phe144 and Ile202-Leu227 for **(A)** Eg5, **(B)** L214A, **(C)** I136A and **(D)** R221A. Each mass spectrum compares the non-deuterated peptide fragment (black) with the deuterated peptide fragment in the absence (blue) or in the presence (red) of 4-fold molar excess monastrol.

Figure 7. Effects of Eg5 point mutations on the inhibition by STLC. **(A)**. Mutant L214A completely prevents the inhibition by STLC. The basal ATPase activity remains unchanged with increasing amounts of inhibitor and proteins. The L214A concentrations tested were 0.75 μM (\bullet), 1 μM (\bullet), 1.2 μM (\bullet) and 1.9 μM (\bullet). **(B)**. The presence of MTs does not modify the effect of L214A on the inhibition by STLC. The MT-stimulated ATPase activity remains unchanged in the presence of increasing amounts of STLC. The L214A concentrations used are 50 nM (\bullet), 100 nM (\blacksquare) and 250 nM (\blacklozenge). **(C)**. Mutant I136A shows no effect on STLC inhibition compared to Eg5. Protein concentrations tested were 0.52 μM (\bullet), 0.78 μM (\bullet), 1.04 μM (\bullet), 1.31 μM (\bullet), 2.61 μM (\bullet) and 3.92 μM (\bullet). **(D)**. In contrast, the presence of MTs

induces a 3-fold increase of the STLC inhibitor constant. The protein concentrations tested are 50 nM (■), 100 nM (◆) and 200 nM (●). (E). Mutant W127A modifies the global shape of the dose response curve when inhibited by STLC. The ATPase activity is not completely inhibited compared to Eg5 at similar STLC concentrations. The W127A concentrations tested were 0.29 μM (●), 0.58 μM (●), 0.87 μM (●), 1.85 μM (●) and 2.8 μM (●). (F). Estimation of the apparent inhibitor constants for STLC for W127A (●), D130A (●), I136A (●) and V210A (●). The measured $K_{i,STLC}^{app}$ values are 406 nM (W127A), 505 nM (D130A), 24 nM (I136A) and 112 nM (V210A).

Figure 8. Effects of STLC binding on the deuterium incorporation rates of peptides Tyr125-Phe144 and Ile202-Leu227 for (A) Eg5, (B) L214A, (C) I136A and (D) W127A. Each mass spectrum compares the non-deuterated peptide fragment (black) with deuterated peptide fragment in the absence (blue) or in the presence (orange) of 4 fold-molar excess STLC.

Figure 9. Mutants that modify the tight-binding behaviour of STLC. For (A) R119A and (B) R221A the IC_{50} values remain constant in the presence of increasing amounts of protein. The protein concentrations used were 0.77 μM (●), 0.54 μM (●), 1.92 μM (●), 2.3 μM (●) and 2.69 μM (×) for R119A; 0.15 μM (●), 0.31 μM (●), 0.47 μM (●) and 0.62 μM (●) for R221A. Ackermann-Potter representations for (C) R119A and (D) R221A show linear lines with increasing amounts of STLC. The STLC concentrations used were 0 μM (●), 0.45 μM (●), 3 μM (●) and 9 μM (●) for R119A; 0 μM (●), 0.3 μM (●), 1.2 μM (●) and 3 μM (●) for R221A. (E). Dixon plots for R119A are hyperbolic suggesting a partial inhibition of the basal ATPase activity, whereas for R221A (F). Dixon plots remain linear at different enzyme concentrations allowing to estimate the apparent inhibition constant ($K_{i,STLC/R221A}^{app} = 0.91 \mu M$). The protein concentrations used were 0.38 μM (●), 1.54 μM (●) and 2.69 μM (●) for R119A; 0.31 μM (●), 0.47 μM (●), 0.62 μM (●) for R221A.

TABLES

Table 1: Mass spectrometry analysis of Eg5 proteins.

Point Mutation	Molecular mass		#Fragments	Molecular mass	
	(Da)			(Da)	
	[†] Calculated	Measured		[‡] Calculated	Measured
None			103-124	2389.0	2389.4
	44119.7	44120.4	125-144	2398.2	2398.6
			202-227	2869.6	2869.6
R119A	44034.6	44034.3	103-124	2304.0	<i>ND</i>
W127A	44004.6	44002.4	125-144	2283.2	2283.3
D130A	44075.7	44073.1	125-144	2354.2	2354.2
P131A	44093.7	44091.7	125-144	2372.2	2372.2
L132A	44077.6	44076.1	125-144	2356.2	2356.2
I136A	44077.6	44080.5	125-144	2356.2	2355.8
V210A	44091.6	44095.7	202-227	2841.5	2841.1
Y211A	44027.6	44030.2	202-227	2777.5	2777.1
L214A	44077.6	44078.4	202-227	2827.5	2826.7
E215A	44061.7	44062.2	202-227	2811.6	2811.1
R221A	44034.6	44038.9	202-227	2784.5	2784.0

[†] Average molecular weight calculated from the protein's primary sequence. The first missing methionine as well as mutations were taken into account.

[‡] Monoisotopic molecular weight.

[#] Peptide fragments obtained after 2 min pepsin digestion on ice.

ND : Not determined. The modified peptide fragment Ala103-Glu124 could not be recovered after LC-ESI-MS analysis.

Table 2: Kinetics parameters of basal and MT-stimulated Eg5 activity.

Mutations	Secondary structure elements	Basal ATPase Activity		MT-Stimulated ATPase Activity	
		k_{cat} (s^{-1})	$K_{\text{m,ATP}}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$K_{0.5,\text{MT}}$ (μM)
Eg5		0.060 ± 0.002	~15	5.63 ± 0.53	0.1
R119A	Loop L5	0.012 ± 0.001	~16	1.25 ± 0.06	0.6
W127A	Loop L5	0.015 ± 0.001	~23	2.00 ± 0.05	0.6
D130A	Loop L5	0.082 ± 0.001	ND	5.03 ± 0.60	0.1
P131A	Loop L5	0.016 ± 0.001	~16	2.85 ± 0.04	0.4
L132A	Loop L5	0.070 ± 0.002	~19	5.00 ± 0.18	0.1
I136A	Helix $\alpha 2$	0.027 ± 0.002	~8	3.65 ± 0.44	0.2
V210A	Helix $\alpha 3$	0.008 ± 0.001	~20	1.10 ± 0.12	1.2
Y211A	Helix $\alpha 3$	0.028 ± 0.001	~16	0.96 ± 0.08	0.6
L214A	Helix $\alpha 3$	0.036 ± 0.003	~19	3.30 ± 0.10	0.2
E215A	Helix $\alpha 3$	0.071 ± 0.006	~19	7.60 ± 0.57	0.2
R221A	Helix $\alpha 3$	0.084 ± 0.002	~28	5.01 ± 0.59	0.3

ND : Not determined

Table 3: Summary of the effects of point mutations on the inhibition of Eg5 by monastrol.

MONASTROL							
Mutants	H/D – MS analyses			Kinetic analysis			
	Peptides			Basal ATPase activity		MT-stimulated ATPase activity	
	125-145	215-227	202-227	IC ₅₀ (μM)	K _{i,Mst} (μM)	IC ₅₀ (μM)	K _{i,Mst} (μM)
Eg5	/	/	/	3.1	8.5	17	45.3
R119A	Δ = 0	¹ ND	¹ ND	NI	NI	NI	NI
W127A	Δ = 0	Δ = 0	Δ < C	PI	88	PI	511
D130A	Δ = 0	Δ = 0	Δ = 0	NI	NI	NI	NI
P131A	Δ = 0	Δ < C	Δ < C	PI	47.2	NI	NI
L132A	Δ = C	Δ = C	Δ = C	4.5	8.6	20	49.5
I136A	Δ = 0	Δ = 0	Δ < C	PI	102.5	NI	NI
V210A	Δ = 0	Δ = 0	Δ < C	NI	NI	149	292
Y211A	Δ = 0	Δ = 0	Δ = 0	NI	NI	PI	335
L214A	Δ = 0	Δ = 0	Δ = 0	NI	NI	NI	NI
E215A	Δ = C	Δ = C	Δ = C	3.4	9.4	20	57
R221A	Δ < C	Δ = 0	Δ < C	9.7	27.8	41	101

Δ = 0 : No variation of the deuteration pattern in the presence of inhibitor ; Δ = C and Δ < C : Modification of the deuteration rate equivalent or reduced compared to Eg5.

ND : Not determined - NI : No inhibition – PI : Partial inhibition. Point mutations that prevent the inhibition of Eg5 by monastrol are highlighted in gray.

¹Loss in sequence coverage is mainly due to both non-homogeneous deuteration (creation of several species of a given peptides) and/or the HPLC conditions used to slow down the isotopic back exchange (see experimental procedure). Therefore, the signal for some deuterated peptide may be lower than the noise level.

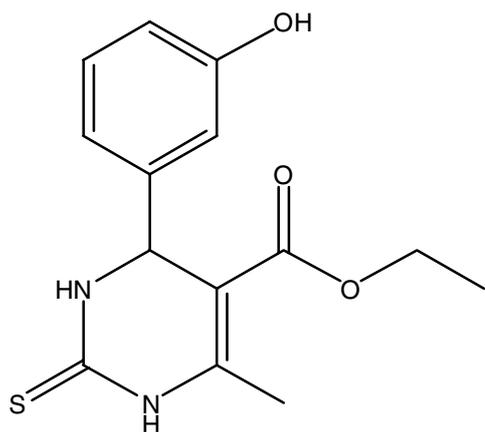
Table 4: Summary of the effects of point mutations on the inhibition of Eg5 by STLC.

Mutants	STLC						
	H/D – MS analyses			Kinetic analysis			
	Peptides			Basal ATPase activity		MT-stimulated ATPase activity	
	125-145	215-227	202-227	$K_i^{app},_{STLC}$ (μ M)	Tight-binding	$K_i^{app},_{STLC}$ (μ M)	Tight-binding
Eg5	/	/	/	0.026	Yes	0.5	No
R119A	$\Delta = 0$	ND	ND	PI	No	9.0	No
W127A	$\Delta = 0$	$\Delta = C$	$\Delta = C$	0.406	Yes	9.5	No
D130A	$\Delta = 0$	$\Delta < C$	$\Delta < C$	0.505	Yes	15.0	No
P131A	$\Delta = 0$	$\Delta = C$	$\Delta = C$	0.753	No	5.6	No
L132A	$\Delta = C$	$\Delta = C$	$\Delta = C$	0.024	Yes	0.4	No
I136A	$\Delta = C$	$\Delta = C$	$\Delta = C$	0.024	Yes	1.4	No
V210A	$\Delta = 0$	$\Delta = 0$	$\Delta < C$	0.112	Yes	4.8	No
Y211A	$\Delta = 0$	$\Delta = 0$	$\Delta < C$	PI	No	10.0	No
L214A	$\Delta = 0$	$\Delta = 0$	$\Delta < C$	NI	---	NI	---
E215A	$\Delta = C$	$\Delta = C$	$\Delta = C$	0.014	Yes	0.5	No
R221A	$\Delta = C$	$\Delta = 0$	$\Delta < C$	0.91	No	2.8	No

$\Delta = 0$: No variation of the deuteration pattern in the presence of inhibitor ; $\Delta = C$ and $\Delta < C$: Modification of the deuteration rate equivalent or reduced compared to Eg5.
 ND : Not determined - NI : No inhibition – PI : Partial inhibition. Point mutations that prevent the inhibition of Eg5 by STLC are highlighted in gray.

Figure 1

(A) Monastrol



(B) S-trityl-L-cysteine

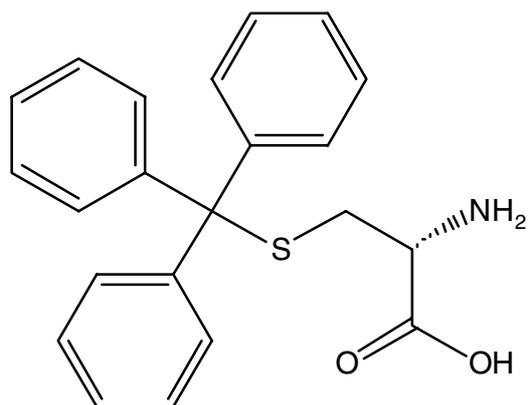
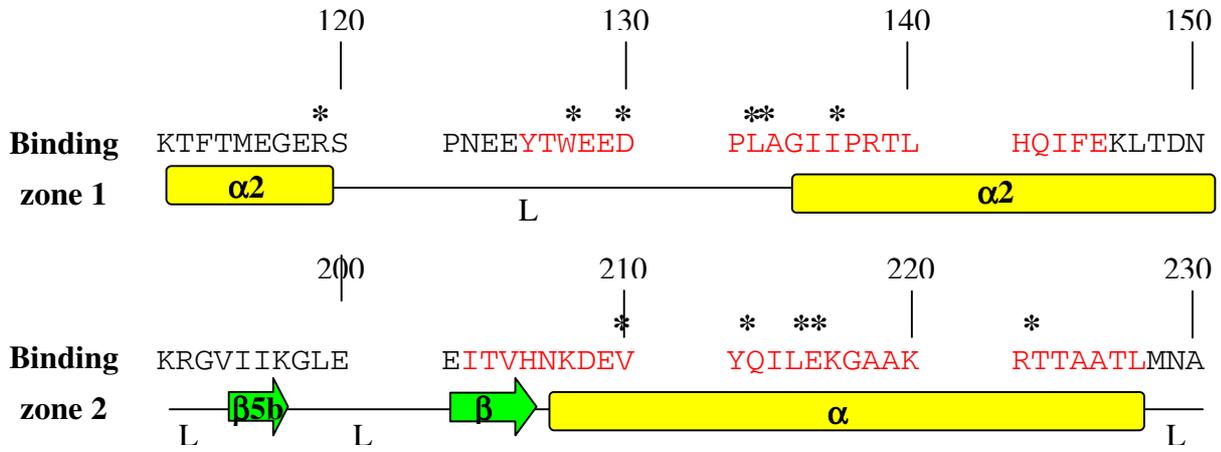


Figure 2

(A)



(B)

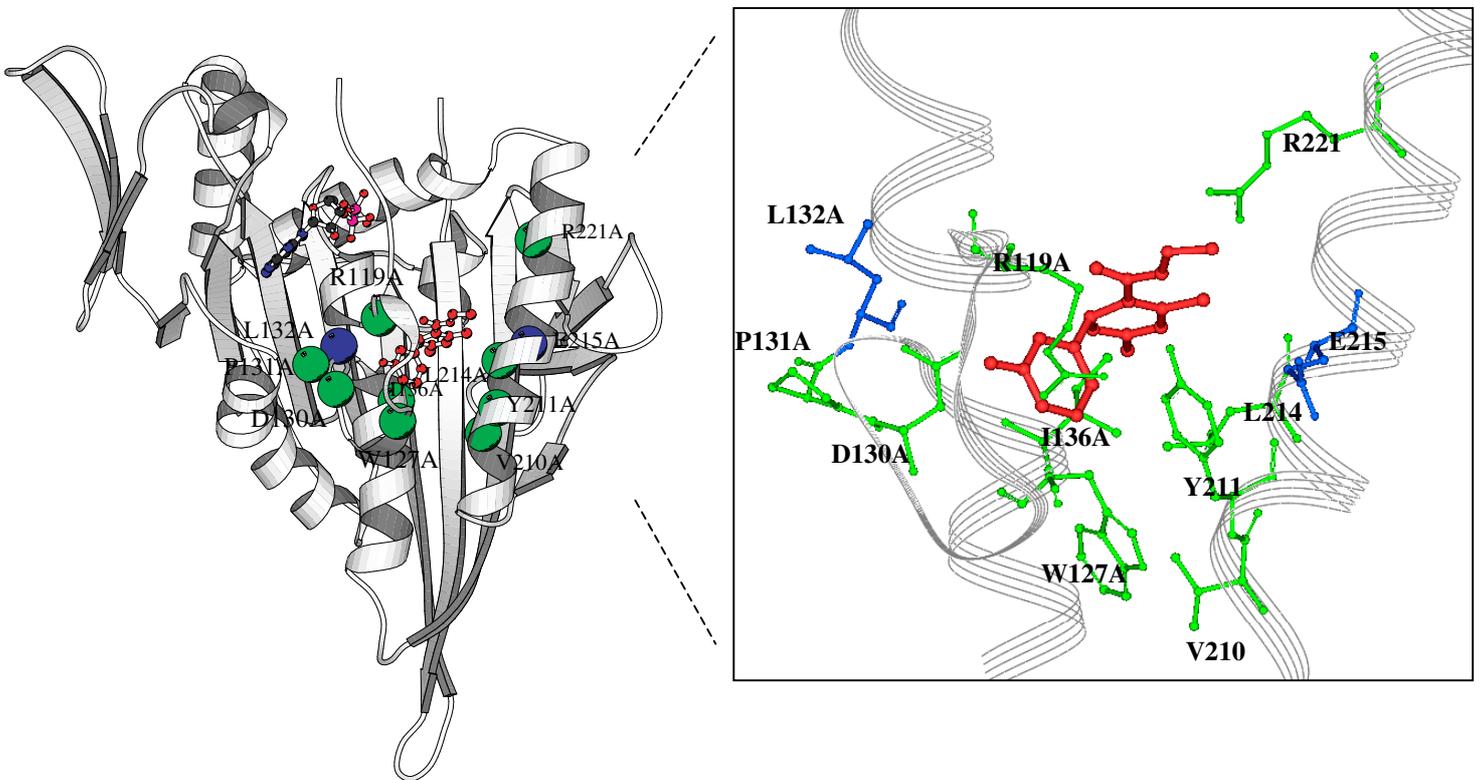


Figure 3

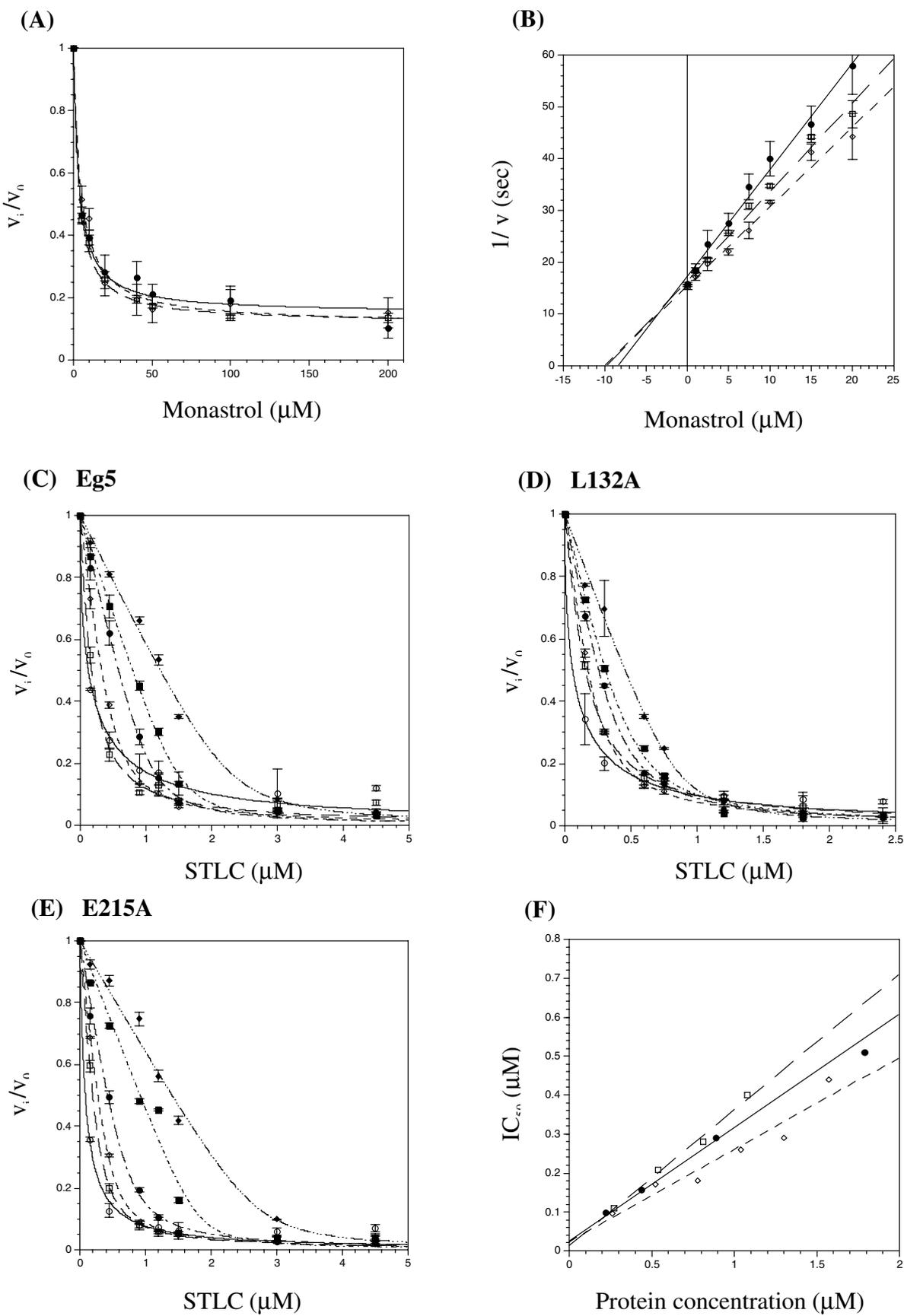


Figure 4

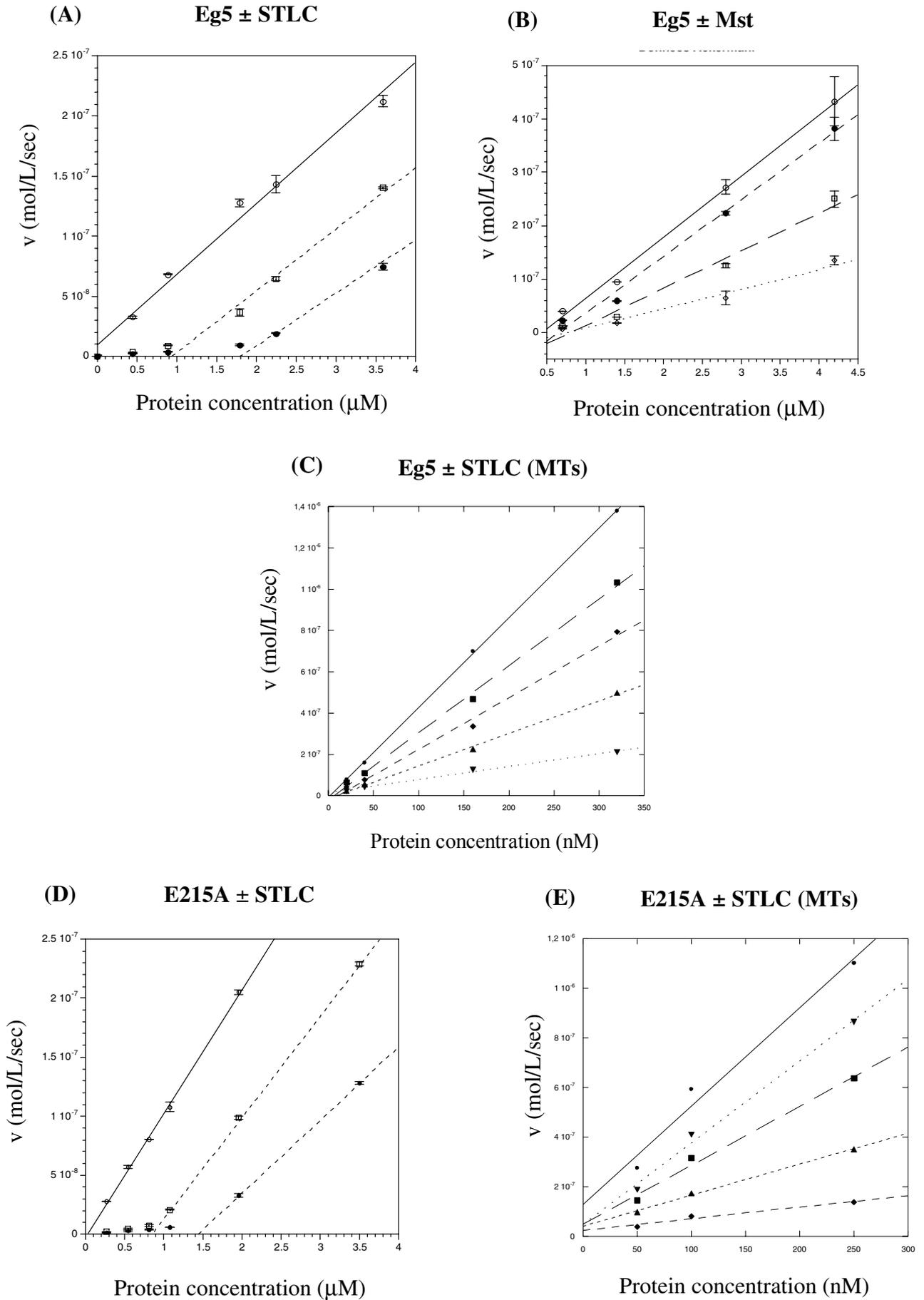


Figure 5

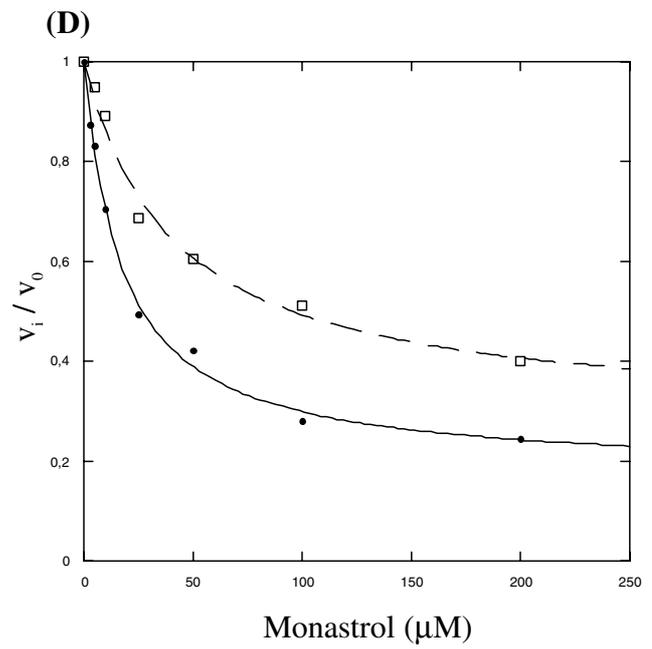
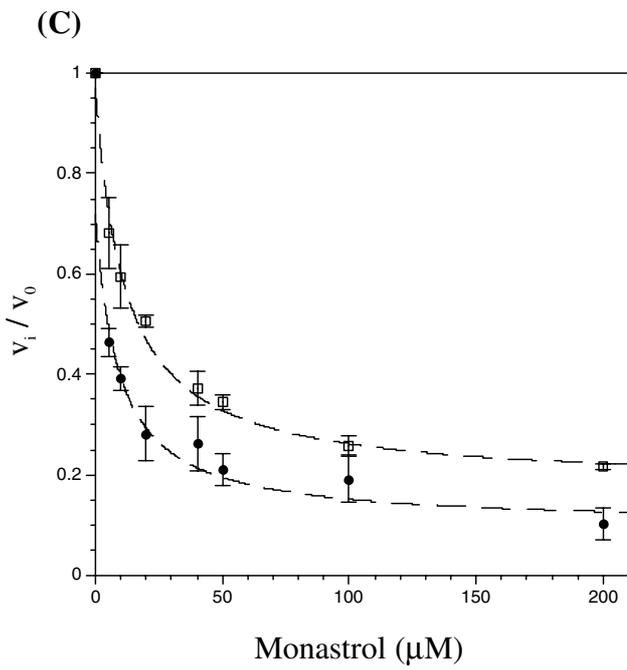
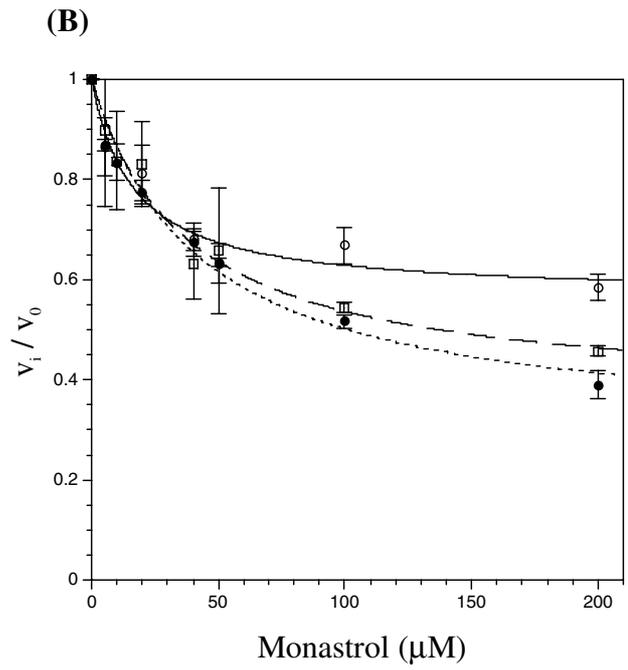
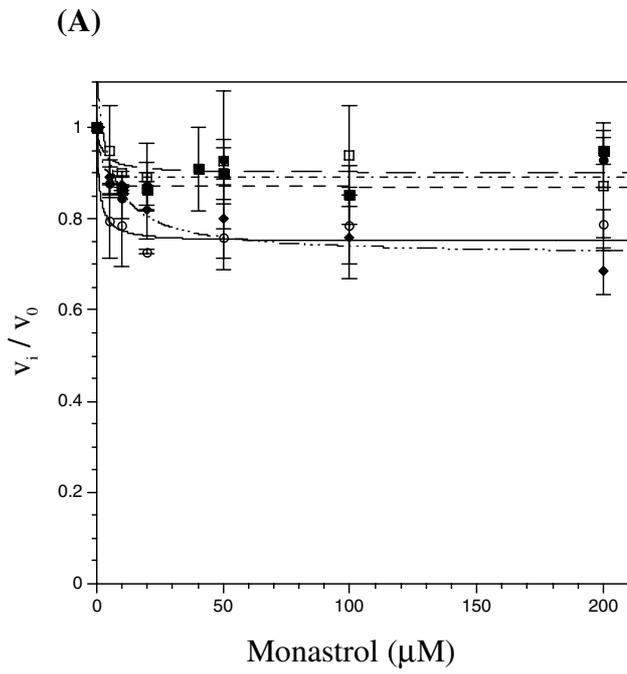


Figure 6

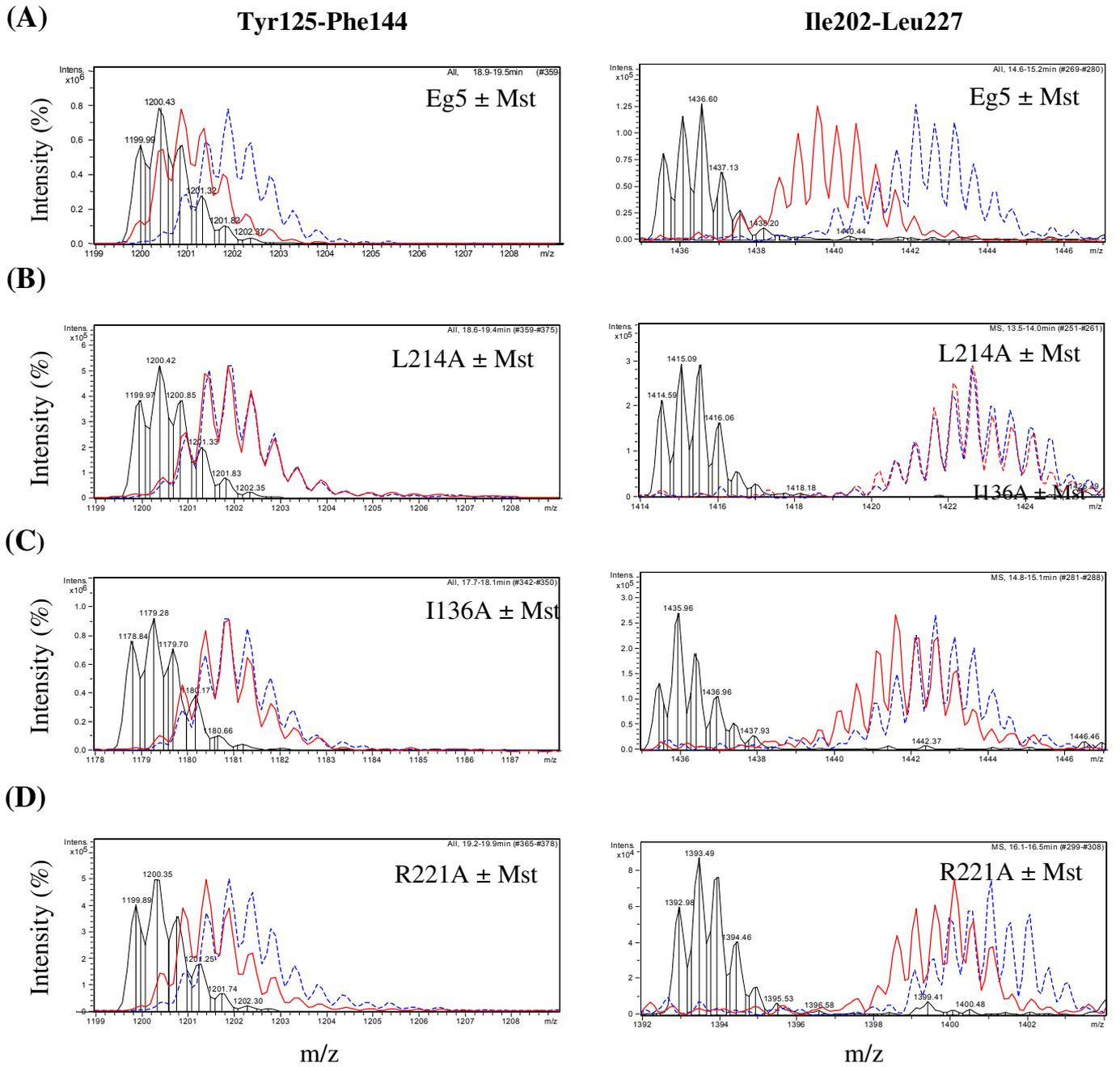


Figure 7

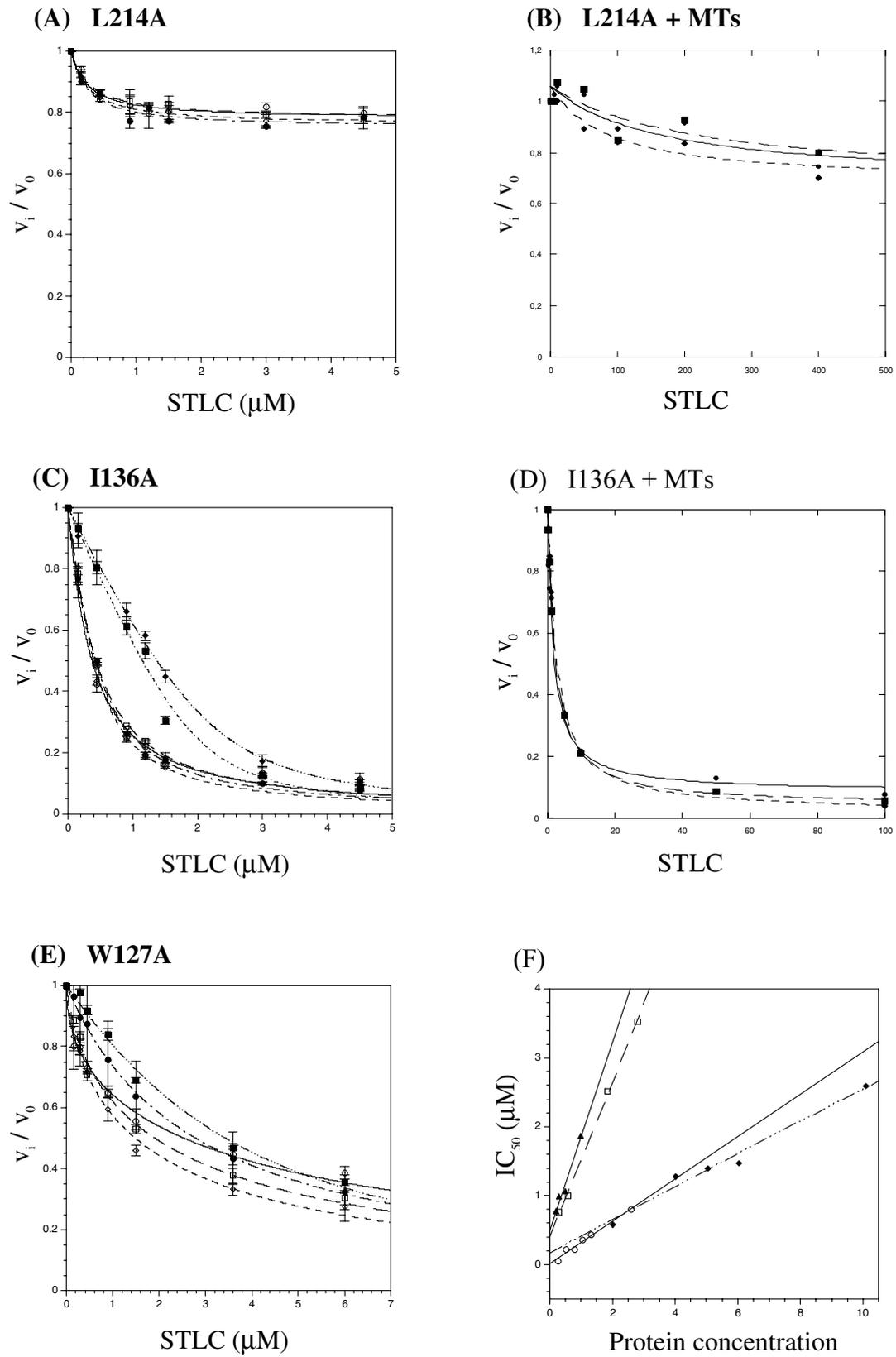


Figure 8

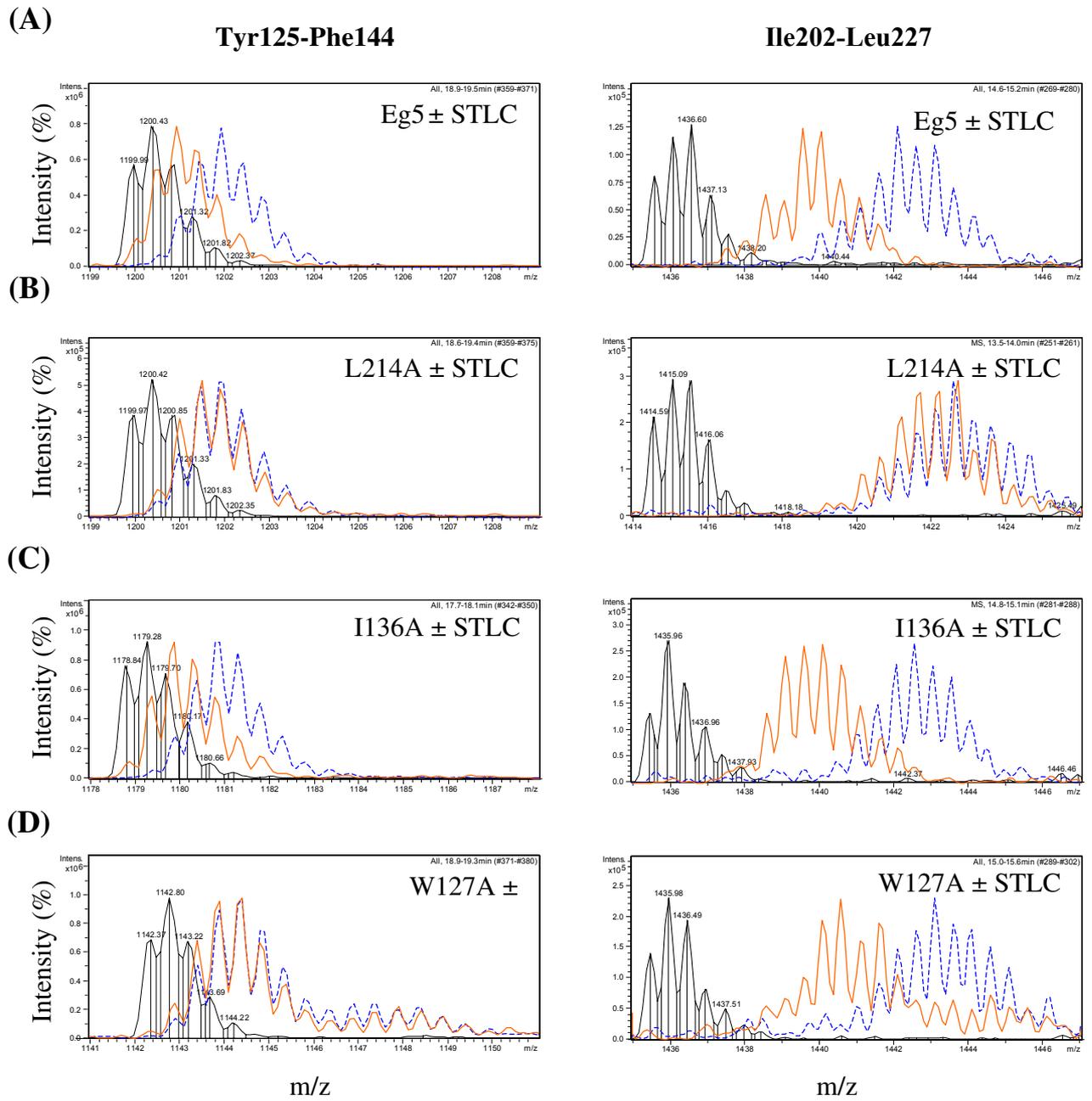
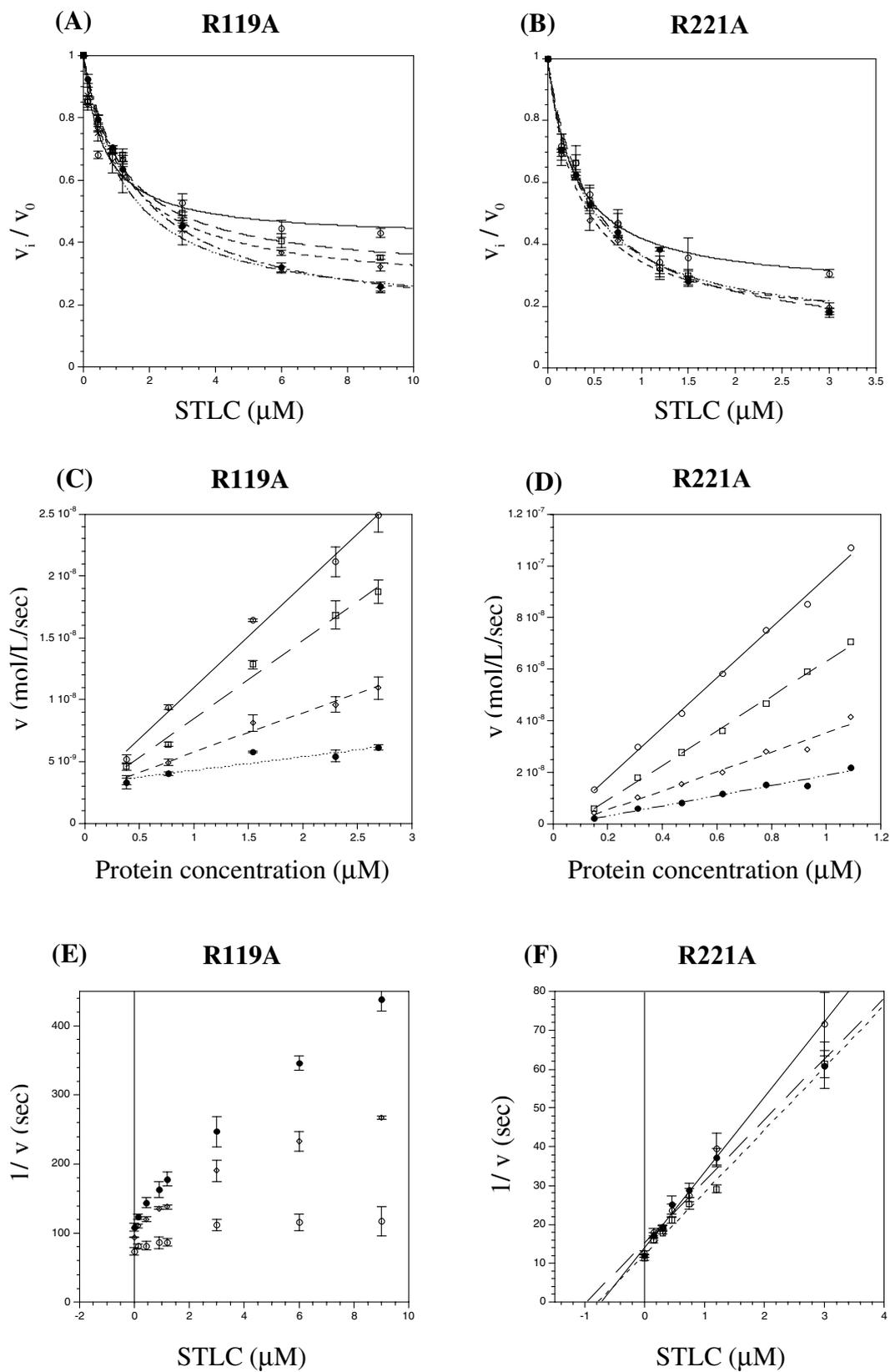


Figure 9



SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1: Plasmid constructs used in this study

Plasmid Name	Description
pEg5 ₁₋₃₈₆	pEt28a + [§] HsEg5 ₁₋₃₈₆ gene
[#] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB	pEg ₁₋₃₈₆ with ^Δ URS <i>Pml</i> I – <i>Bst</i> B I
[◊] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB1	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with R119A mutation
[*] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB2	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with W127A mutation
[*] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB3	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with D130A mutation
[*] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB4	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with P131A mutation
[*] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB5	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with L132A mutation
[*] pEg5 ₁₋₃₈₆ PB6	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with I136A mutation
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB with ^Δ URS <i>Bsa</i> I – <i>Eag</i> I
[◊] pEg5 ₁₋₃₈₆ BE1	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE with V210A mutation
[◊] pEg5 ₁₋₃₈₆ BE2	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE with Y211A mutation
[◊] pEg5 ₁₋₃₈₆ BE3	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE with L214A mutation
[◊] pEg5 ₁₋₃₈₆ BE4	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE with E215A mutation
[◻] pEg5 ₁₋₃₈₆ BE5	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE with R221A mutation

[§]Gene coding for residues 1 to 386 of the HsEg5 motor domain (22).

[#]see (29).

URS: Unique Restriction Sites inserted by silent mutagenesis.

Restriction sites inserted by silent mutagenesis to test the correctness of the cloning strategy:

^ˆ*Age* I ; ^{*}*Sac* II ; ^ˆ*Bsi* W I ; ^ˆ*Bsr* G I.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S2 : Forward and reverse primers designed for the insertion of the desired point mutations.

Mutants	Forward and reverse primers used :
R119A	5'-ACT GGC ACG GGT AAA ACT TTT ACA ATG GAA GGT GAA <u>GCG</u> TCA CCT AAT -3' 5'-ATT AGG TGA <u>CGC</u> TTC ACC TTC CAT TGT AAA AGT TTT ACC CGT GCC AGT -3'
W127A	5'-G <u>GCG</u> GAA GAG GAT CCC TTG GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC CAA GGG ATC CTC TTC <u>CGC</u> C-3'
D130A	5'-G TGG GAA GAG <u>GCG</u> CCC TTG GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC CAA GGG <u>CGC</u> CTC TTC CCA C-3'
P131A	5'-G TGG GAA GAG GAT <u>GCG</u> TTG GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC CAA <u>CGC</u> ATC CTC TTC CCA C-3'
L132A	5'-G TGG GAA GAG GAT CCC <u>GCG</u> GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC <u>CGC</u> GGG ATC CTC TTC CCA C-3'
I136A	5'-G TGG GAA GAG GAT CCC TTG GCT GGT ATA <u>GCG</u> CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG <u>GCG</u> TAT ACC AGC CAA GGG ATC CTC TTC CCA C-3'
V210A	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA <u>GCG</u> TAT CAA ATT TTA GAA AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT TTC TAA AAT TTG ATA <u>CGC</u> TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
Y211A	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC <u>GCG</u> CAA ATT TTA GAA AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT TTC TAA AAT TTG <u>CGC</u> GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
L214A	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC TAT CAA ATT <u>GCG</u> GAA AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT TTC <u>CGC</u> AAT TTG ATA GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
E215A	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC TAT CAA ATT TTA <u>GCG</u> AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT <u>CGC</u> TAA AAT TTG ATA GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'

III) Conclusions

Les résultats de cette étude montrent que les deux inhibiteurs interagissent avec des acides aminés différents pour créer leur site allostérique commun. Parmi les onze mutations testées, seul le résidu Leu214 (localisé sur l'hélice $\alpha 3$) a été identifié comme critique pour le monastrol et le STLC. La substitution de cette leucine par une alanine lève complètement l'effet des deux inhibiteurs sur l'activité ATPasique basale d'Eg5. Néanmoins, le rôle de cette leucine diffère en fonction de l'inhibiteur. Les études H/D-MS montrent en effet que cet acide aminé est essentiel à la fixation du monastrol sur Eg5. En ce qui concerne le STLC, ce résidu semble participer activement à la stabilisation de la poche allostérique mais n'intervient pas dans l'interaction. A l'exception de Leu214, les autres acides aminés modifiés ont des fonctions différentes selon l'inhibiteur testé. Ainsi la mutation I136A (localisée au niveau de la boucle L5) diminue considérablement l'affinité du monastrol alors qu'aucun effet n'est observé pour le STLC. De même, la mutation D130A (boucle L5) abolit uniquement l'effet du monastrol sur l'activité ATPasique d'Eg5 en empêchant sa fixation sur le domaine moteur.

L'effet des mutations R119A, P131A, Y211A et R221A sur le STLC est tout à fait surprenant. La modification de ces quatre résidus module le comportement de l'inhibiteur vis-à-vis d'Eg5. En effet, le STLC n'agit plus comme un inhibiteur de type « tight-binding » en présence de ces mutations. Le calcul des paramètres d'inhibition a également permis de différencier l'effet de ces quatre substitutions sur le STLC. Ainsi, la mutation de l'Arg221 (fin de l'hélice $\alpha 3$) permet au STLC de se comporter comme un inhibiteur réversible classique de type Michaélien (comme le monastrol). A l'inverse, le STLC se comporte comme un inhibiteur de type « hyperbolique » sous l'effet des mutations R119A, P131A et Y211A. Les résidus Arg119, Pro131, Tyr211 et Arg221 sont donc essentiels au comportement de type « tight-binding » du STLC.

Le monastrol et le STLC utilisent donc des résidus distincts au sein de leur site d'interaction commun. Les études de « Mant-ADP release » indiquent que ces deux composés bloquent l'étape de libération de l'ADP au niveau du site catalytique d'Eg5 (Maliga *et al.*, 2002 ; DeBonis *et al.*, 2003 ; Skoufias *et al.*, 2005). La structure du complexe Eg5-ADP-monastrol révèle également que la fixation de l'inhibiteur crée une poche allostérique rigide sans modifier la structure du site nucléotidique (Yan *et al.*, 2004). Quel est alors le mécanisme d'inhibition de ces deux inhibiteurs ? Sachant que ces deux molécules induisent des modifications conformationnelles similaires, il est probable que leur poche allostérique soit

semblable d'un point de vue structural et en terme de rigidité. La fixation du monastrol et du STLC permet ainsi de former une poche rigide qui modifie localement la flexibilité du domaine moteur et empêche les modifications conformationnelles nécessaires aux transitions ATP-ADP. La protéine se trouve alors « bloquée » dans une conformation non favorable au cycle catalytique. Dans ce cas de figure, le STLC et le monastrol partageraient un mécanisme d'inhibition apparenté.

Chapitre III

Mise en évidence d'un « point chaud d'inhibition » (« Hot-Spot ») sur le domaine moteur d'Eg5.

I) Introduction

Le protocole H/D-MS / mutagenèse a été utilisé afin d'étudier l'interaction entre Eg5 et quatre nouveaux inhibiteurs. Au même titre que le monastrol et le STLC, ces molécules ciblent spécifiquement Eg5 et inhibent aussi bien son activité ATPasique basale que stimulée. Trois de ces composés ont été identifiés par l'équipe de F. Kozielski par criblage d'activité *in vitro* de bibliothèques d'agents anti-mitotiques sélectionnés par le National Cancer Institut (NCI) (DeBonis *et al.*, 2004) :

- le flexeril (NSC 78206) : cette molécule, aux propriétés myorelaxantes, inhibe efficacement *in vitro* l'activité ATPasique basale d'Eg5 avec un IC₅₀ de 14 µM (pour comparatif, l'IC₅₀ du monastrol est de 6 µM). De même, cette dernière est capable de passer les membranes cellulaires et de stopper réversiblement la prolifération des cellules HeLa avec un fuseau monoastral ;
- deux analogues des phénothiazines, NSC 59349 et NSC 169676 : ces deux composés sont d'excellents inhibiteurs de l'activité ATPasique basale et stimulée d'Eg5 avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures à 10 µM. Au même titre que le flexeril, ces molécules stoppent la prolifération des cellules HeLa en division.

Le quatrième inhibiteur testé est un dérivé des carbolines appelé HR22C16 (ou monastroline). Cette molécule inhibe spécifiquement l'activité ATPasique basale d'Eg5 avec un IC₅₀ de 800 nM (Hotha *et al.*, 2003) et stoppe, *in vitro*, la prolifération de cellules résistantes au taxol (Marcus *et al.*, 2005). HR22C16 est donc considéré comme un agent anti-mitotique intéressant et sert à l'heure actuelle de base structurale pour la synthèse de dérivés plus efficaces (Sunder-Plassmann *et al.*, 2005).

Au cours de ce travail, les protéines chimériques Eg5-Nc1 (contenant la séquence 101-121 de NcKHC en position 125-145) et Eg5-Nc2 (contenant la séquence 175-188 de NcKHC en position 202-215) ont été utilisées afin de valider l'ensemble des résultats H/D-MS obtenus

sur Eg5 en présence des inhibiteurs. Le monastrol et le STLC ont été utilisés comme molécules témoins.

Ces résultats ont fait l'objet d'une troisième publication acceptée au journal « *Rapid Communication in Mass Spectrometry* ».

II) Publication : identification du « point chaud » d'inhibition

Use of H/D mass spectrometry and mutagenesis as a tool to identify the binding region of inhibitors targetting the human mitotic kinesin Eg5

Sébastien Brier[‡], David Lemaire[‡], Salvatore DeBonis[§], Eric Forest[‡], Frank Kozielski[§]

[‡]Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP) and [§]Laboratoire des Moteurs Moléculaires (LMM), Institut de Biologie Structurale (CEA-CNRS-UJF), 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France.

Running title :

Site-directed mutagenesis of the Eg5 inhibitor binding pocket.

Address correspondence to: Eric Forest, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France, Tel. 0033-4-3878-3403; Fax. 0033-4-3878-5494; E-mail: Eric.Forest@ibs.fr

An experimental procedure associating both hydrogen/deuterium exchange - mass spectrometry (H/D-MS) and mutagenesis was developed to identify the protein binding region of small inhibitors targeting the motor domain of the human mitotic kinesin Eg5. All tested inhibitors decrease the deuterium incorporation rate of the same peptides corresponding to the following secondary structures elements: loop L5/helix α 2 (region Tyr125-Glu145) and strand β 5/helix α 3 (region Ile202-Leu227). Replacement of these two regions by the equivalent ones from *N. crassa* conventional kinesin heavy chain completely abolishes the modification of the deuterium incorporation rate by the inhibitors as well as their effects on the basal ATPase activity. The 6 tested inhibitors thus share a common binding site on Eg5. The strategy reported here allows the regions of a protein involved in ligand binding to be rapidly pinpointed and can be applied to other proteins and used as a general *in vitro* screening procedure to identify compounds targeting specific binding regions.

Hydrogen/deuterium (H/D) exchange experiments represent a powerful technique used for many years to

study the structure and dynamics of proteins. The mechanisms of H/D exchange on proteins have been reviewed extensively¹⁻⁴. The rate at which hydrogens located at peptide amide linkages undergo isotopic exchange is highly dependent in their environment, their solvent accessibility as well as on their participation in intramolecular hydrogen bonding. As a result, solvent-exposed amide hydrogens will be easily replaced by deuterium compared to those excluded from the solvent. In a folded protein, amide hydrogens present on the surface or within unstructured regions exchange within several seconds. In contrast, hydrogens located within hydrophobic regions or involved in hydrogen bonding will only undergo isotopic exchange if structural modifications or transient hydrogen bonding breakdown occur to increase their solvent accessibility. Therefore, the analysis of H/D exchange rates provides information on the structural state of a folded protein.

H/D exchange followed by mass spectrometry measurement (H/D-MS) has been widely used to investigate structural features of intact proteins including peptide binding studies^{5,6} as well as conformational changes⁷. The sensitivity of the method has been improved by digesting the protein after the deuteration step⁸. This approach allows the localization of

hydrogen/deuterium exchange in short protein fragments after HPLC separation. Pepsin is generally used to digest deuterated proteins because this protease is active under the conditions (pH 2-3, 0°C) required to slow down back exchange. Recently, two additional fungal proteases have also been reported capable of working at both low pH and temperature⁹. H/D exchange followed by pepsin digestion and MS analysis has thus been used to measure the effects of mutagenesis on protein structure¹⁰⁻¹², to analyse transient protein folding intermediates¹³⁻¹⁵ or to study conformational changes induced upon ligand binding¹⁶⁻¹⁸.

In this study, we investigate by H/D-MS the binding region of several small inhibitors (Fig 1) targeting the motor domain of the mitotic kinesin Eg5. Eg5 plays an essential role in spindle pole separation during the first stages of mitosis. Eg5 failure blocks centrosome migration and leads to cell cycle arrest with a characteristic monopolar mitotic spindle¹⁹⁻²¹. Thus the crucial function of Eg5 has identified it as a promising target in cancer chemotherapy²²⁻²⁵.

The H/D-MS method has already been used to study protein-protein interfaces²⁶⁻²⁸ as well as molecule interaction sites²⁹. Ligand binding is predicted to decrease, by a masking effect, the solvent accessibility of hydrogens located within the interaction site but can also modify the deuterium incorporation rate by conformational changes within the protein. Hence, H/D-MS results can be ambiguous since the exchange rates for ligand binding resemble those due to conformational changes. The strategy used in this study associates both H/D-MS experiments and mutagenesis in order to discriminate the solvent accessibility reduction due to a masking effect or structural modifications. The putative binding regions identified by H/D-MS in Eg5 were mutated to confirm the results and to validate the experimental approach. We successfully applied this method to identify the secondary structure elements that form the binding site of STLC, a very potent inhibitor of Eg5³⁰. The same experimental approach was then used to study the interaction between Eg5 and four new specific inhibitors. Our results show that these molecules bind to the same region within Eg5. This common inhibitor

binding site could be easily exploited with our strategy for further inhibitor screening.

EXPERIMENTAL

Materials. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs. The QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit was from Stratagene. Competent XL-10 and BL21(DE3)pLysS cells were obtained from NOVAGEN. HisTrap chromatographic columns were purchased from Amersham Pharmacia Biotech. TFA, PIPES, ATP, D₂O, lysozyme, pepsin and kanamycin were obtained from Sigma-Aldrich. IPTG was purchased from ICN. Acetonitrile (CH₃CN) was obtained from SDS. Racemic monastrol was purchased from BIOMOL Feinchemikalien; NSC 59349 and NSC 169676 were from the NCI; Flexeril was purchased from Sigma-Aldrich ; STLC was from the NCI or Novabiochem. Chemicals for Eg5 ATPase activity assays were from sources indicated by Hackney and Jiang³¹.

Plasmid constructions. The construction of plasmids pEg5₁₋₃₈₆ (coding for residues 1 to 386 of the HsEg5 motor domain) pEg5₁₋₃₈₆ PB (containing *PmlI* and *BstBI* restriction sites) and pEg5₁₋₃₈₆BE (containing *BsaI* and *EagI* restriction sites) have been described previously^{30,31,33}. These four unique restriction sites (introduced by silent mutagenesis) are located upstream and downstream of the regions coding for the inhibitor binding site identified by H/D-MS. Cloning of expression plasmid pEg5₁₋₃₈₆ PB-Nc1 coding for the mutated Eg5-Nc1 protein was described in a previous report³⁰. Eg5-Nc1 contains residues 101 to 121 of *Neurospora crassa* conventional kinesin heavy chain (NcKHC₁₀₁₋₁₂₇) in position 125-145. The nucleic acid fragment coding for residues 175 to 188 of NcKHC (NcKHC₁₇₅₋₁₈₈) was inserted between *BsaI* and *EagI* sites to generate the expression plasmid pEg5₁₋₃₈₆ BE-Nc2 (coding for the mutated Eg5-Nc2 protein) using the following forward and reverse primers : 5'-AA GAA ATC TAC GTC TCG AGC GTC CAG GAA GTA TAC GAA GTC ATG CGC AAG GGG GCA GCA AAA AGG ACA AC-3' and 5'-GGC CGT TGT CCT TTT TGC TGC CCC CTT GCG CAT GAC TTC GTA TAC TTC CTG GAC GCT CGA GAC GTA GAT T-3'. This fragment contains an additional *XhoI* restriction site. The success of the cloning

strategy was confirmed by enzymatic digestion and DNA sequencing.

Over-expression and purification of mutated Eg5. Eg5 mutants were expressed and purified as described previously for Eg5^{30,32}. Eg5 constructs were analyzed by SDS-PAGE, N-terminal protein sequencing and mass spectrometry. The effect of each mutation on the global fold of the Eg5 proteins was investigated by H/D exchange – MS analysis.

Preparation of Eg5-Inhibitor complexes. Inhibitor solutions (50 mM in DMSO) were diluted in 1 mM PIPES buffer, pH 7.3. The protein-inhibitor complexes were obtained after 1 min incubation at room temperature (Eg5 / inhibitor molar ratio tested : 1/4).

Pepsin digestions. Protein digestions were performed in an ice bath at 0°C. The pepsin solutions used were prepared in 0.1 M H₃PO₄, pH 1.6, and precooled to 0°C. Eg5 constructs in 1 mM PIPES buffer were digested for 2 min at pH 2.2 with a protease / substrate ratio of 1/1 (w/w).

H/D exchange experiments of peptide fragments. 290 pmol of Eg5 constructs in the presence or absence of inhibitor were diluted 50 fold in deuterated buffer (1 mM PIPES, pD 7.3). Deuteration was performed at 0°C for 5 min³⁰. Isotopic back-exchange was quenched by the addition of precooled pepsin solution, pH 1.6. After pepsin digestion, deuterated peptide fragments were rapidly concentrated and desalted on a C4 Peptide MacroTrap cartridge (Michrom) at a flow rate of 300 µL/min. Deuterated peptides were separated on a reverse phase C18 Interchrom column (1 mm x 100 mm) by using a linear gradient from 5 % to 100 % CH₃CN / H₂O (9/1 - v/v), 0.03 % TFA over a run time of 35 min at a flow rate of 50 µL/min. The elution of all peptides was complete after 17 min. To limit isotopic back-exchange, the injector and column were precooled in an ice bath and maintained at 0°C. Adjustment for back exchange was not performed because all experiments were performed under identical conditions and the same day. The deuterated peptides were analyzed by ESI-MS.

ESI-MS analysis. MS analyses of entire proteins were performed on a Q-TOF Micro mass spectrometer

(Waters) equipped with a Z-spray ion source operating with a needle voltage of 3 kV. Sample Cone and Extraction Cone voltages were 30 V and 4 V, respectively. Prior to analysis, samples were desalted on a C4 protein MacroTrap cartridge (Michrom) with H₂O supplemented with 0.1% TFA. Proteins were eluted with 60 % of CH₃CN / H₂O (9/1 – v/v), 0.1% TFA and collected. Samples were then infused at a flow rate of 5 µL/min. Spectra were acquired and processed with MassLynx 4.0.

H/D exchange experiments on peptide fragments were performed on a quadrupole ion trap mass spectrometer ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics) equipped with an ionspray source. MS experiments were carried out with a capillary voltage set at 4 kV and an end plate off set voltage at 500 V. The nebulizer gas (N₂) pressure was set at 10 psi and the dry gas flow (N₂) at 8 L/min at a temperature of 250°C. Mass spectra were analyzed using DataAnalysis 3.0 and Biotools 2.1 software.

Measurement of basal ATPase steady state kinetics. All experiments were performed at room temperature. Basal ATPase activities were measured using the pyruvate kinase / lactate dehydrogenase coupled assay in buffer A25A (25 mM ACES / KOH at pH 6.9, 2 mM magnesium acetate, 2 mM potassium EGTA, 0.1 mM potassium EDTA and 1 mM β-mercaptoethanol) supplemented with 300 mM NaCl³¹. The protein concentrations tested were 0.7 µM for Eg5 and Eg5-Nc1; 1.5 µM for Eg5-Nc2. The basal ATPase activity was measured in the presence of 1 mM ATP. Kinetics were monitored using a 96-well Sunrise photometer (TECAN, Maennedorf, Switzerland). For optimal inhibitor solubility, the assays were carried out in the presence of up to 2.4 % DMSO. Data were analyzed using Kaleidagraph 3.0 (Synergy Software).

RESULTS AND DISCUSSION

In a previous report, we showed by H/D-MS and kinetic analysis that monastrol and STLC bind to the same region of Eg5 by induced-fit in a pocket formed by the secondary structure elements loop L5/helix α2 and strand β5/helix α3³⁰. These inhibitors trigger similar conformational changes and lock Eg5 in a conformation

unsuitable for ATP hydrolysis. In this present experiments, monastrol (Fig 1(A)) and STLC (Fig 1(B)) were both used as controls. The same experimental procedure was then applied to investigate the interactions of 4 new specific Eg5 inhibitors^{34,35}: two phenothiazine analogues, NSC 59349 (named Ph1) and NSC 169676 (named Ph2) (Fig 1(C-D)); Flexeril (NSC 78206), a commonly prescribed muscle relaxant with weak antimitotic activity (Fig 1(E)); and monastroline (HR22C16) (Fig 1(F)).

The Eg5 peptide map used in this study has already been described in a previous paper³⁰. The effects of each inhibitor on Eg5 were monitored by LC/ESI/MS analysis after 5 min deuteration on ice followed by 2 min pepsin digestion. All tested inhibitors reduce the deuterium incorporation rate of the same peptides fragments corresponding to those previously identified for monastrol and STLC³⁰. The other fragments show no difference in their extent of deuterium incorporation in the presence of all inhibitors. Results obtained for peptide fragments Tyr125-Glu145, Ile202-Leu227 and Glu215-Leu227 are shown in figure 2. When bound to Eg5, monastroline induces similar decreases of the deuterium incorporation rate in peptides Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227 compared to monastrol and STLC. The same number of amide hydrogens is thus protected against the exchange when these molecules interact with Eg5. In contrast to monastroline, the 3 peptide fragments display differences in the extent of deuterium incorporation in the presence of both Flexeril and the two phenothiazine analogues. The solvent accessibility reduction of peptide Tyr125-Glu145 is similar in the presence of Flexeril, Ph1 or Ph2 and slightly increased compared to monastroline. The main difference is observed in peptide fragment Ile202-Leu227 (Fig 2). The formation of the Eg5/Ph2 complex does not modify the solvent accessibility of fragment Glu215-Leu227. Hence, the decrease of solvent accessibility observed with this inhibitor only takes place in the first part of peptide fragment Ile202-Leu227. Concerning Flexeril, a slight decrease of deuterium incorporation is observed in peptide fragment Glu215-Leu227 indicating that the main solvent accessibility reduction also concerns the first part of peptide Ile202-Leu227.

The regions identified by H/D-MS are presented in figure 3(A). The first region covers part of loop L5 and helix $\alpha 2$ (residues Tyr125-Glu145) and the second region is composed of strand $\beta 5$ and helix $\alpha 3$ (residues Ile202-Leu227). The binding of all inhibitors decreases the solvent accessibility of these two regions except for Ph2 which only affects the beginning of helix $\alpha 3$ (Fig 3(B)). At this stage, it is not possible to conclude if these two areas are directly involved in inhibitor binding and/or in conformational changes. To validate our H/D results, regions Tyr125-Glu145 and Leu202-Glu215 were replaced by the equivalent regions from *Neurospora crassa* conventional kinesin heavy chain (NcKHC) to generate Eg5-Nc1 and Eg5-Nc2 proteins, respectively (Fig 4). NcKHC is structurally related to Eg5³⁶, but not inhibited by monastrol³². Consequently, the small structural and sequence differences observed between Eg5 and NcKHC are sufficient to explain the specificity of monastrol. The *N. crassa* peptide replacements in Eg5 are not expected to induce major changes in the structure of both Eg5-Nc1 and Nc2 proteins. The inserted NcKHC sequence in Eg5-Nc1 modifies 11 residues, with 5 being highly similar and 6 different (Fig 4(A)). Concerning Eg5-Nc2, the presence of the NcKHC sequence modifies 9 residues, with 6 being similar and only 3 different (Fig 4(B)). For both mutated proteins, the deuteration patterns of all peptide fragments generated after pepsin digestion remain similar to those obtained for Eg5 (data not shown). The solvent accessibility is thus comparable indicating that the *N. crassa* inserts do not induce major changes in the structure of Eg5-Nc1 and Eg5-Nc2. In addition, the basal ATPase activities of Eg5 and mutated Eg5 proteins were determined and compared to estimate the effect of each mutation. Eg-Nc1 and Eg5-Nc2 proteins show respectively a 2- and 6-fold decrease in the ATPase activity with a maximum velocity (V_{max}) of $0.030 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ for Eg5-Nc1 and $0.010 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ for Eg5-Nc2 compared to a value of $0.060 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ for Eg5. Despite this modification, the basal ATPase activity was sufficiently conserved to allow the effects of inhibitors on each mutated protein to be monitored.

As reported in figures 5(A) and 5(B), no variation of deuterium incorporation is observed within Eg5-Nc1 and Nc2 in the presence of monastrol. Hence, monastrol can no longer bind to Eg5 when regions Tyr125-Glu145 or Ile202-Glu215 are mutated. We thus conclude that the

two modified regions are directly involved in monastrol binding. The effects of each mutation were also investigated by kinetic analysis. We previously reported that replacement of region Thy125-Glu145 was sufficient to prevent the inhibitory effect of monastrol³⁰. The same results is observed with the mutated Eg5-Nc2 protein confirming that region Ile202-Glu215 is also required for monastrol binding (Fig 6(A)). The kinetic data correlate well with H/D-MS measurements and confirm the validity of our strategy. The same experimental approach was then applied to the other inhibitors. The deuterium incorporation remains unchanged within the modified Ile202-Glu215 region of Eg5-Nc2 in the presence or absence of inhibitors (Fig 5(A)). The same result is observed within the unmodified Tyr125-Glu145 region. Therefore, the presence of the NcKHC sequence prevents the formation of the Eg5-Nc2/inhibitor complexes. We thus conclude that the Leu202-Glu215 region was directly involved in inhibitor binding. Similar results were observed with Eg5-Nc1 (Fig 5(B)). The deuterium incorporation rate within the modified Tyr125-Glu145 and the non-mutated Ile202-Leu227 regions is unaffected in the presence of inhibitors, excepted for Ph2. Incubation of this phenothiazine analogue with Eg5-Nc1 decreases the deuterium incorporation rate in fragment Ile202-Leu227 (Fig 5(B)). Hence, Ph2 is still able to interact with Eg5-Nc1. This observation was confirmed by kinetic analysis. The presence of the mutated Tyr125-Glu145 region does not modify the effect of Ph2 on the basal ATPase activity, compared to Eg5 (Fig 6(B)). In contrast, the same mutation completely abolishes the inhibitory effects of the other molecules (data not shown).

The Tyr125-Glu145 region of Eg5 is thus directly involved in the binding of these inhibitors, excepted for Ph2. Region Ile202-Glu215 (strand β 5/beginning of helix α 3) plays an important role in the binding of Ph2 since its replacement prevents the formation of the complex whereas no effect is observed when Tyr125-Glu145 is mutated. It is therefore necessary to study the effects of each inhibitor on the individual mutants to confirm the initial results obtained by H/D-MS.

CONCLUSION

All the inhibitors tested in this study share a common binding region on Eg5 formed by the secondary structure elements L5/ α 2 and β 5/ α 3. This highly flexible pocket seems to adopt distinct conformations to accommodate different types of inhibitors. Recently, the binding regions of the 3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazole³⁷ and *ispinesib*^{38,39} (currently in phase II studies), two additional Eg5 inhibitors, have been identified by X-ray crystallography. Both compounds share the same pocket than the 6 tested inhibitors. Therefore, this common binding region can be considered as a “hot spot” for Eg5. The approach described here can be used to rapidly probe the interaction with other known Eg5 inhibitors. The combination of H/D-MS and mutagenesis allows the regions within Eg5 involved in ligand binding and/or conformational changes to be pinpointed. This method might also serve as an *in vitro* screening procedure to search for compounds specifically targeting this binding pocket.

In addition, results obtained by H/D-MS with the two mutants correlate clearly with kinetic analyses. Hence, the binding regions and the conformational changes can be directly identified by mass spectrometry, without any other additional experiment. This experimental approach might also be useful when the target protein possesses no measurable enzymatic activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-Pierre Andrieu for N-terminal sequencing of mutated Eg5 proteins. We also thank Patricia Amara (Laboratoire de Dynamique Moléculaire - IBS) and Isabel Garcia-Saez (Laboratoire des Moteurs Moléculaires - IBS) for helpful discussions.

REFERENCES

- (1). Englander SW, Kallenbach NR. *Quart. Rev. Biophys.* 1984; 16: 521.
- (2). Smith DL, Deng Y, Zhang Z. *J. Mass. Spectrom.* 1997; 32:135.
- (3). Engen JR, Smith DL. *Anal. Chem.* 2001; 73: 256A.
- (4). Krishna MM, Hoang N, Lin Y, Englander SW. *Methods* 2004; 34: 51.
- (5). Kragelund BB, Robinson CV, Knudsen J, Dobson CM, Poulsen FM. *Biochemistry* 1995; 34: 7217.
- (6). Anderegg RJ, Wagner DS. *J. Am. Chem. Soc.* 1995; 117: 1374.
- (7). Wang F, Tang X. *Biochemistry* 1996; 35: 4069.
- (8). Zhang Z, Smith DL. *Protein Science* 1993; 2: 522.

- (9). Cravello L, Lascoux D, Forest E. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17: 2387.
- (10). Remigy H, Jaquinod M, Petillot Y, Gagnon J, Cheng H, Xia B, Markley JL, Hurley JK, Tollin G, Forest E. *J. Prot. Chem.* 1997; 16: 527.
- (11). Jaquinod M, Guy P, Halgand F, Caffrey M, Fitch J, Cusanovich M, Forest E. *FEBS Lett.* 1996; 380: 44.
- (12). Guy P, Remigy H, Jaquinod M, Bersh B, Blanchard L, Dolla A, Forest E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218: 97.
- (13). Miranker A, Robinson CV, Radford SE, Alpin RT, Dobson CM. *Science* 1993; 262: 896.
- (14). Bai Y, Sosnick TR, Mayne L, Englander SW. *Science* 1995; 269: 192.
- (15). Simmons DA, Dunn SD, Konermann L. *Biochemistry* 2003; 42: 5896.
- (16). Wang F, Blanchard JS, Tang X. *Biochemistry* 1997; 36: 3755.
- (17). Wang F, Li W, Emmett MR, Hendrickson CL, Marshall AG. *Biochemistry* 1998; 37: 15289.
- (18). Wang F, Scapin G, Blanchard JS, Angeletti RH. *Protein Science* 1998; 7: 293.
- (19). Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. *Cell* 1995; 83: 1159.
- (20). Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty S J, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ. *Science* 1999; 286: 971.
- (21). Kapoor TM, Mayer TU, Coughlin ML, Mitchison T J. *J. Cell Biol.* 2000; 150: 975.
- (22). Wood KW, Cornwell WD, Jackson JR. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001; 1: 370.
- (23). Miyamoto DT, Perlman ZE, Mitchison TJ, Shirasu-Hiza M. *Progress in Cell Cycle Research* 2003; 5: 349.
- (24). Bergnes G, Brejc K, Belmont L. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2005; 5: 127.
- (25). Duhl DM, Renhowe PA. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2005 ; 8: 431.
- (26). Mandell JG, Falick AM, Komives EA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 14705.
- (27). Ehring H. *Anal. Biochem.* 1999; 267: 252.
- (28). Akashi S, Takio K. *Protein Science* 2000; 9: 2497.
- (29). Garcia RA, Pantazatos D, Villarreal FJ. *Assay drug Dev. Technol.* 2004; 2: 81.
- (30). Brier S, Lemaire D, DeBonis S, Forest E, Kozielski F. *Biochemistry* 2004; 43: 13072.
- (31). Hackney DD, Jiang W. *Methods Mol. Biol.* 2001; 164: 65.
- (32). DeBonis S, Simorre JP, Crevel I, Lebeau L, Skoufias DA., Blangy A, Ebel C, Gans P, Cross R, Hackney DD, Wade R H, Kozielski F. *Biochemistry* 2003; 42: 338.
- (33). Brier S, Lemaire D, DeBonis S, Forest E, Kozielski F. *Submitted.*
- (34). Hotha S, Yarrow JC, Yang JG, Garrett S, Renduchintala KV, Mayer TU, Kapoor TM. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 42: 2379.
- (35). DeBonis S, Skoufias DA, Lebeau L, Robin G, Margolis R, Wade RH., Kozielski F. *Mol. Cancer Ther.* 2004; 3: 1079.
- (36). Song YH, Marx A, Muller J, Woehlke G, Schliwa M, Krebs A, Hoenger A, Mandelkow E. *EMBO J.* 2001; 20: 6213.
- (37). Cox CD, Breslin MJ, Mariano BJ, Coleman PJ, Buser CA, Walsh ES, Hamilton K, Huber HE, Kohl NE, Torrent M, Yan Y, Kuo LC, Hartman GD. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15, 2041.
- (38). Sakowicz R, Finer JT, Beraud C, Crompton A, Lewis E, Fritsch A, Lee Y, Mak J, Moody R, Turincio R, Chabala JC, Gonzales P, Roth S, Weitman S, Wood K. W. *Cancer Res* 2004; 64, 3276.
- (39). Jackson JR, Auger KR, Gilmartin A, Eng WK, Luo L, Concha N, Parrish C, Sutton D, Diamond M, Giardiniere M, Zhang SY, Huang P (GlaxoSmithKline, Collegeville, PA) – Wood KW, Belmont L, Lee Y, Bergnes G, Anderson R, Brejc K, Sakowicz R (Cytokinetics Inc, South San Francisco, CA). Meeting Poster, *AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Target in Cancer Therapeutics: Discovery, Biology, and Clinical Applications*, November 14-18, 2005 - Philadelphia.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chemical structures of the tested Eg5 inhibitors : (A) monastrol; (B) S-trityl-l-cysteine (STLC); (C-D) phenothiazine analogues NSC 59349 (Ph1) and NSC 169676 (Ph2), respectively; (E) Flexeril (NSC 78206); (F) monastroline (HR22C16).

Figure 2. Effects of inhibitor binding on the deuterium incorporation rate of peptide fragments Tyr125-Glu145, Ile202-Leu227 and Glu215-Leu227 of Eg5. Monastrol and STLC are both used as controls³⁰. The formation of each Eg5/inhibitor complex decreases the extent of deuterium incorporation by reducing the solvent accessibility. Each mass spectrum compares non-deuterated peptide fragment (—) with deuterated peptide fragment in the absence (·····) or in the presence (-----) of inhibitor.

Figure 3. Ribbon representation of the Eg5 motor domain showing the inhibitor binding region identified by H/D-MS. Mg-ADP is represented in gray as a ball-and-stick model. (A) Binding of monastrol, STLC, NSC 59349 (Ph1), Flexeril and monastroline reduces the deuterium incorporation rate of the same two regions composed of the secondary structures elements loop L5/helix α 2 (Tyr125-Glu145) and strand β 5/helix α 3 (Ile202-Leu227). (B) The phenothiazine analogue NSC 169676 (Ph2) also reduces the deuterium incorporation in loop L5/helix α 3. The solvent accessibility reduction observed in the second region only concerns the beginning of helix α 3 and strand β 5. The figures were prepared using ViewerLite50.

Figure 4. Comparison of the Eg5 sequences (Tyr125-Glu145; Ile202-Glu215) and the NcKHC sequences. (A) Replacement of region Tyr125-Glu145 (21 residues) by the equivalent NcKHC region modifies 11 amino-acids in the mutated Eg5-Nc1 protein. (B) Nine residues are modified in the mutated Eg5-Nc2 compared to Eg5 when region Ile202-Glu215 is exchanged by the equivalent NcKHC sequence. Legend: highly similar residues are underlined; weakly similar and identical residues are colored in gray and black, respectively. Non similar residues are in bold type and colored black.

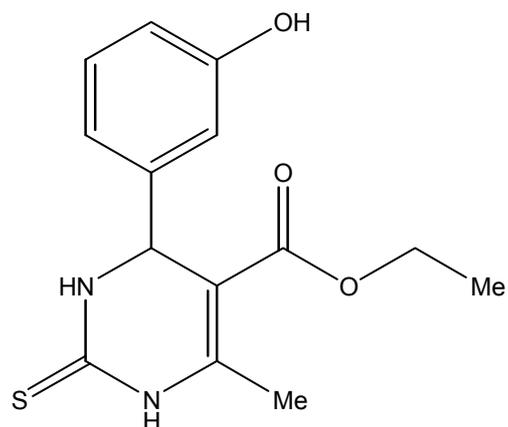
Figure 5. Effects of inhibitor binding on the deuterium incorporation rate of peptide fragments (A) Tyr125-Glu145 and Ile202-Glu209 of Eg5-Nc2, (B) Tyr125-Glu145 and Ile202-Leu227 of Eg5-Nc1. No variation of solvent accessibility is observed when the mutated proteins are incubated with the inhibitors excepted for Eg5-Nc1 and NSC 169676

(Ph2). A slight reduction of the deuteration incorporation rate is observed on peptide fragment Ile202-leu227 indicating that Ph2 is still able to interact with the mutated Eg5-Nc1. Each mass spectrum compares non-deuterated peptide fragment (—) with deuterated peptide fragment in the absence (·····) or in the presence (-----) of inhibitor.

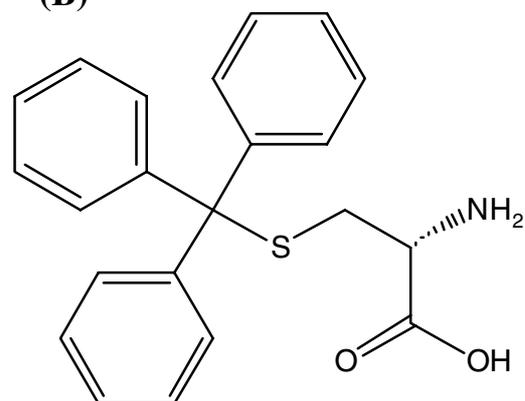
Figure 6. Inhibition of the basal ATPase activity of Eg5 (□), Eg5-Nc1 (○) and Eg-Nc2 (◆). **(A)** Replacement of region Ile202-Glu215 prevents the inhibition by monastrol. The basal ATPase activity of Eg5-Nc2 remains constant with increasing amounts of monastrol whereas a strong inhibitory effect is observed for Eg5. **(B)** The presence of the mutated Tyr125-Glu145 region does not significantly alter the inhibitory effect of Ph2, compared to Eg5. The Eg5-Nc1 activity is still inhibited confirming that the replacement of the region Tyr125-Glu145 is not sufficient to prevent Ph2 binding.

Figure 1

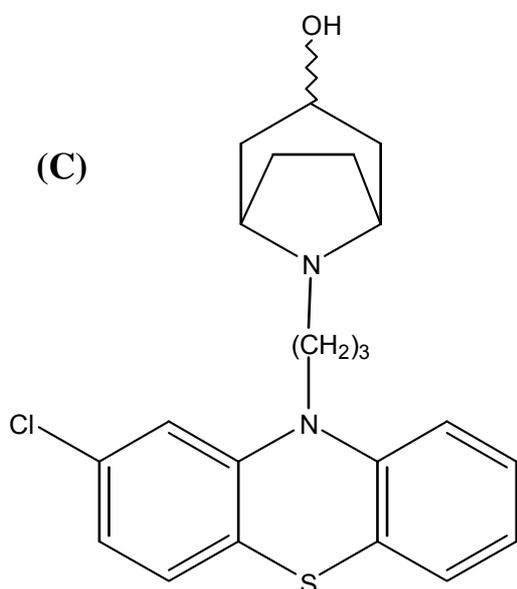
(A)



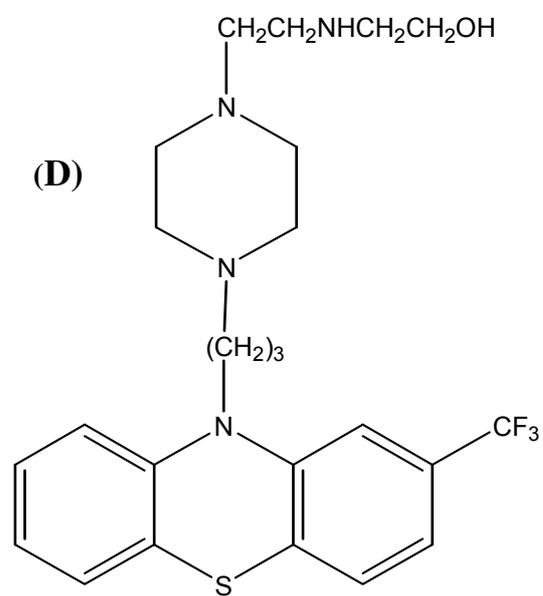
(B)



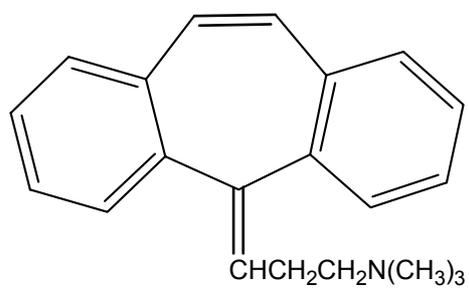
(C)



(D)



(E)



(F)

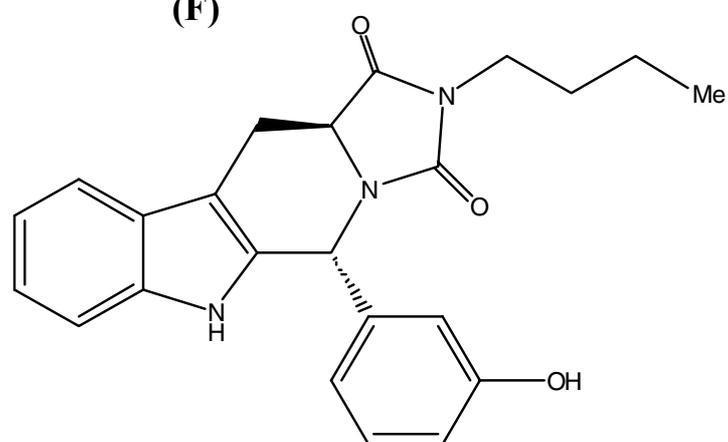
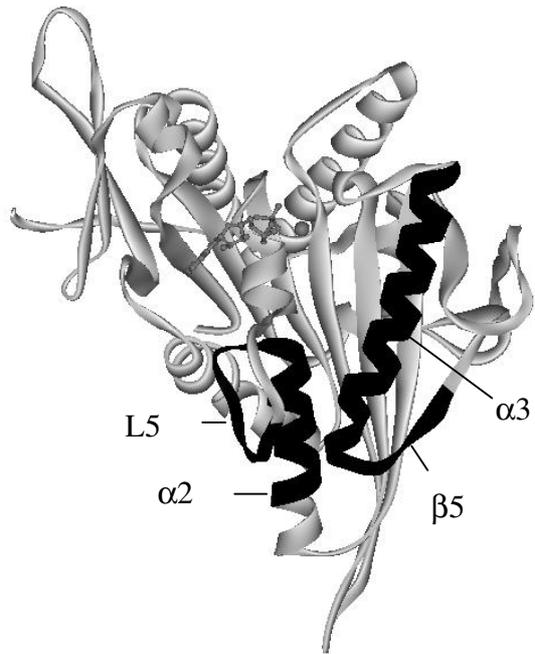


Figure 3

(A)



(B)

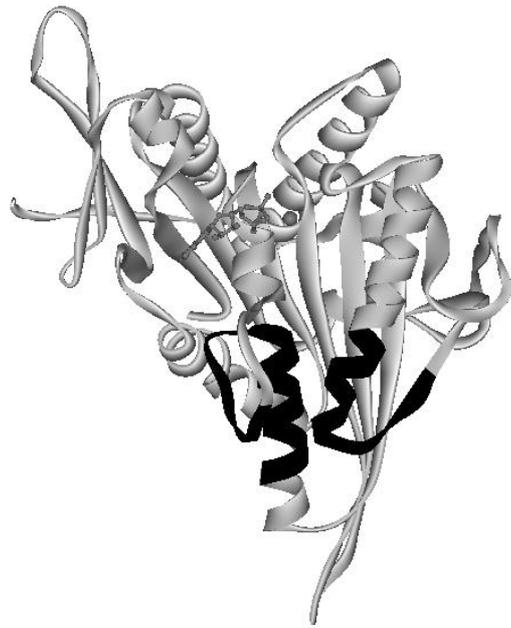
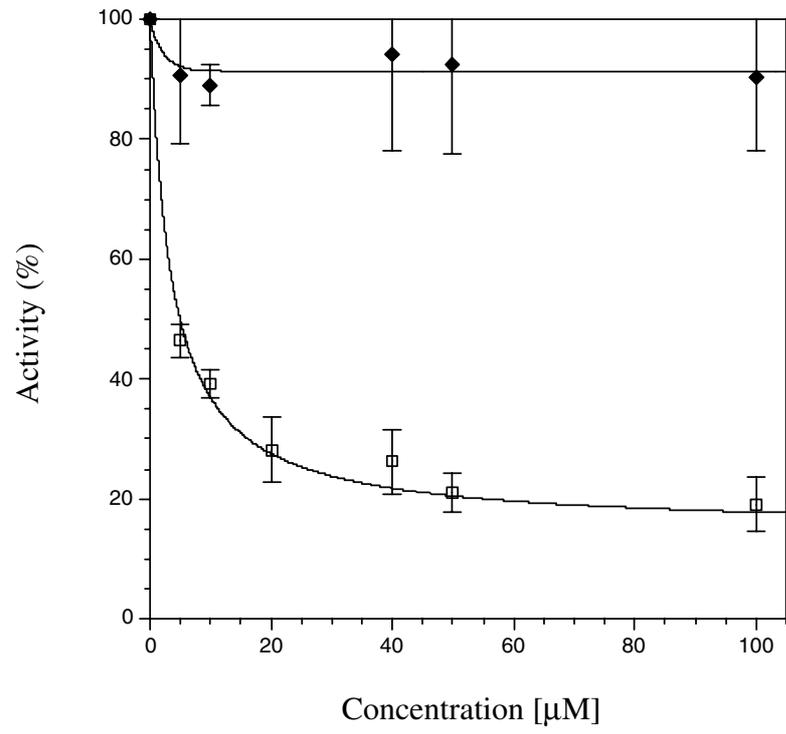
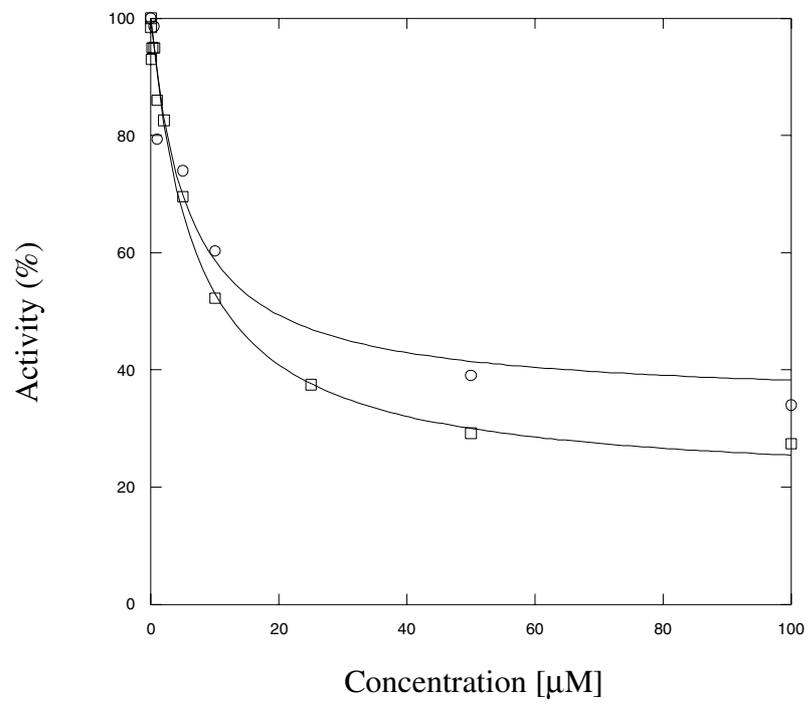


Figure 6

(A)



(B)



III) Conclusions

Les quatre nouvelles molécules testées partagent le même site de fixation que le monastrol et le STLC situé entre les éléments de structures secondaires L5- α 2 et β 5- α 3. La monastroline (HR22C16) semble se comporter comme le monastrol et le STLC. En effet, la formation du complexe Eg5-monastroline occasionne des variations d'incorporation similaires au sein des régions Tyr125-Glu145 et Ile202-Leu227. Il semble donc très probable que la fixation de cet inhibiteur induise la formation d'une poche allostérique semblable, d'un point de vue structural, au monastrol et au STLC. En ce qui concerne les trois autres molécules (Flexeril, NSC 59349 et 169676), la structure du site allostérique diffère de celle de HR22C16. Les variations de deutération sont moins importantes au niveau de la zone Ile202-Leu227, preuve d'une accessibilité au solvant accrue et donc d'une structure moins compacte en présence de ces molécules. La différence la plus marquante est observée au niveau du peptide Glu215-Leu227 qui chevauche la zone Ile202-Leu227. La fixation de NSC 169676 n'induit aucune variation du taux d'incorporation de ce peptide. Par conséquent, ce dérivé des phénothiazines n'altère l'accessibilité au solvant que sur la région Ile202-Glu215. Le flexeril semble également se comporter comme NSC 169676, même si une très légère modification de deutération est enregistrée sur la zone Glu215-Ile227.

La poche allostérique située entre L5- α 2 et β 5- α 3 peut être considérée comme un « point chaud » d'inhibition. En effet, 6 inhibiteurs de structure différente (à l'exception des deux analogues des phénothiazines) sont capables de se fixer dans cette région et d'inhiber le cycle ATPasique d'Eg5. Il est probable que la boucle L5 soit à l'origine de ce « point chaud ». Sa longueur varie considérablement au niveau des kinésines. Eg5 dispose de la boucle la plus longue et celle-ci joue un rôle important lors de la formation du complexe Eg5-Monastrol (Yan *et al.*, 2004). Le mouvement de cette dernière permet en effet de fermer la poche allostérique. Par conséquent, sa longueur doit lui conférer une flexibilité suffisante pour s'adapter à la structure des inhibiteurs et ainsi verrouiller la poche allostérique.

Chapitre IV

Etude des interactions Eg5/microtubules et CENP-E/microtubules.

I) Introduction

La fonction mitotique d'Eg5 est étroitement liée à son organisation générale. Grâce à sa structure homotétramérique bipolaire et son activité ATPasique, Eg5 crée des zones de chevauchement entre les microtubules interpolaires antiparallèles et génère la force motrice nécessaire à la séparation des centrosomes. Il est donc possible d'inhiber la fonction d'Eg5 de deux façons : (1) soit en bloquant son cycle ATPasique (voie la plus explorée à l'heure actuelle) ; (2) soit en empêchant son interaction avec les microtubules.

La localisation des zones de contact Eg5/microtubules est donc un prérequis nécessaire au développement de molécules capables d'interférer avec cette interaction. Nous avons ainsi entrepris d'identifier ces zones par H/D-MS. Cependant, la taille des microtubules (polymères de tubulines α et β) complique lourdement l'analyse. En effet, l'étape de digestion enzymatique du complexe Eg5/microtubules va générer un nombre trop élevé de fragments peptidiques. Pour pallier à ce problème, l'étude a été menée avec un produit naturel isolé d'une éponge marine (*Haliclona* sp.) : l'adociasulfate 2 (Figure 42).

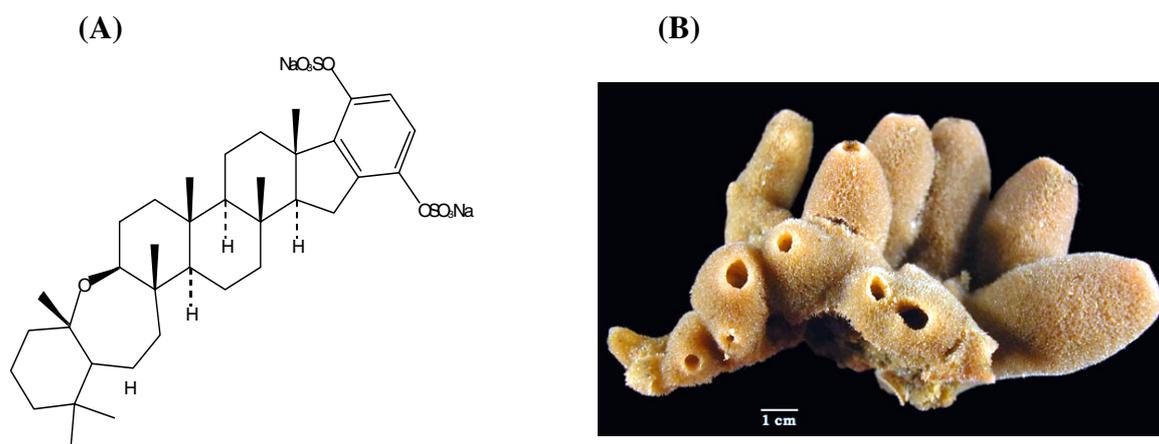


Figure 42 : (A). Structure de l'adociasulfate 2 (AS-2). (B). Photographie de l'éponge marine *Haliclona* sp. (ou *Adocia*).

L'adociasulfate-2 (AS-2), identifiée par l'équipe de Lawrence S.B. Goldstein, est un inhibiteur compétitif des microtubules (Sakowicz *et al.*, 1998). Par conséquent, l'AS-2 interagit avec les mêmes régions que les microtubules. L'ensemble des analyses par H/D-MS a donc été effectué en présence de cet inhibiteur. Les expériences ont été dans un premier temps menées sur Eg5 puis appliquées à une autre kinésine mitotique associée aux kinétochores : CENP-E (centromere-associated protein E). Cette dernière est essentielle au positionnement et à l'alignement des chromosomes en métaphase (Yen *et al.*, 1991 ; Yen *et al.*, 1992 ; Wood *et al.*, 1997) et participe à la transition métaphase-anaphase en interagissant avec la kinase BubR1 (Chan *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999 ; Abrieu *et al.*, 2000). Au même titre que Eg5, l'activité de CENP-E (tout comme sa localisation) est régulée au cours du cycle cellulaire (Yen *et al.*, 1991, Yen *et al.*, 1992, Brown *et al.*, 1996). Son niveau d'expression augmente considérablement en fin de phase G2 et début de mitose pour diminuer en fin de division cellulaire. L'inactivation de cette kinésine dans les cellules de mammifères permet de stopper la division cellulaire ; CENP-E est donc considérée comme une cible thérapeutique potentielle anti-cancéreuse intéressante.

Les résultats obtenus sur ces deux moteurs mitotiques en présence d'AS-2 font l'objet d'une quatrième publication, en préparation.

II) Résultats

2.1) Effet de la fixation de l'AS-2 sur Eg5

L'étude des taux de deutération au niveau des fragments peptidiques a été réalisée en utilisant la carte peptidique d'Eg5 préalablement établie. La fixation de l'AS-2 sur Eg5 modifie le taux d'incorporation en deutérium de 6 fragments peptidiques correspondant à deux régions : Leu161-Arg189 (β 4-L7- β 5-L8- β 5a) et Leu293-Leu316 (α 4-L12- α 5). Les résultats obtenus sur les fragments peptidiques Phe169-Asp177 et Leu293-Leu302 sont présentés en figure 43. La présence de l'inhibiteur augmente sensiblement le niveau de deutération de ces peptides. L'effet le plus marquant est observé au niveau du peptide Leu293-Leu302. Ce peptide correspond à l'hélice α 4 d'Eg5. En absence d'AS-2, cette région incorpore très peu de deutérium puisque la majorité des hydrogènes amidiques participe au maintien de la structure secondaire en hélice. Lorsque le complexe Eg5/AS-2 se forme, ces hydrogènes deviennent accessibles et s'échangent contre les deutériums du solvant (Figure

43B). L'hélice $\alpha 4$ subit donc une forte modification structurale en présence de l'inhibiteur. En ce qui concerne les autres fragments peptidiques d'Eg5, aucune variation d'incorporation n'est observée lorsque le complexe Eg5/AS-2 est formé.

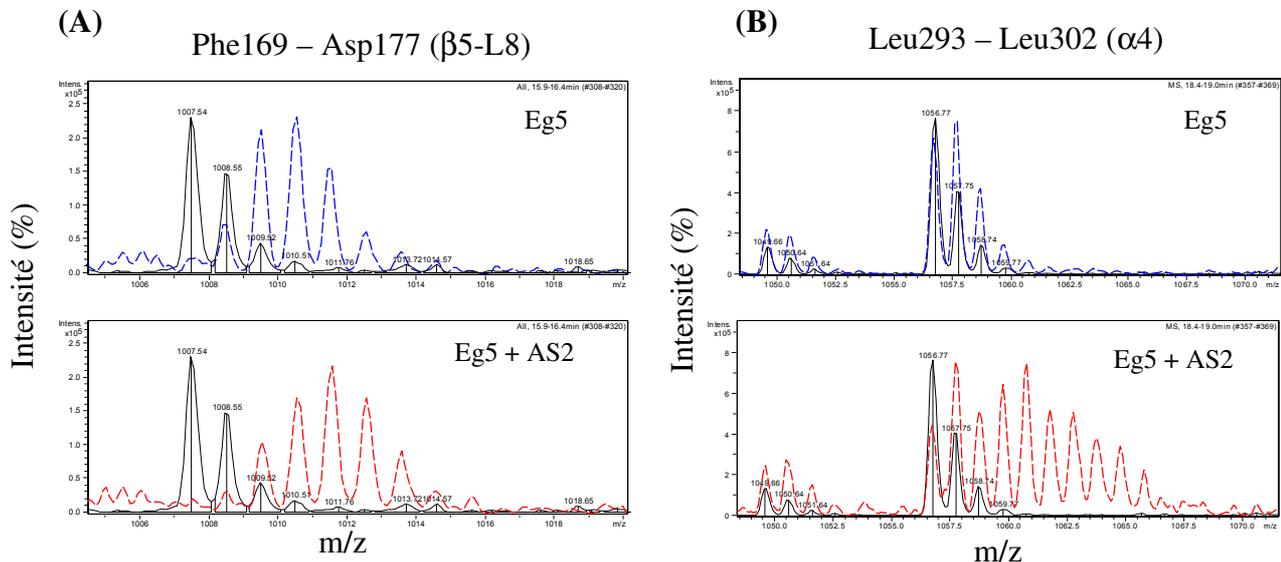


Figure 43 : Effets de la fixation de l'AS-2 sur le taux d'incorporation en deutérium des fragments peptidiques (A) Phe169-Asp177 (feuille $\beta 5$ -boucle L8) et (B) Leu293-Leu302 (hélice $\alpha 4$) d'Eg5. La formation du complexe Eg5/AS-2 augmente l'accessibilité au solvant deutéré des deux fragments peptidiques. Chaque spectre de masse compare les fragments peptidiques non deutérés (noir) avec ceux deutérés 5 min en absence (pointillés bleus) ou en présence (pointillés rouges) de l'inhibiteur.

2.2) Effet de la fixation de l'AS-2 sur CENP-E

2.2.1.) Réalisation de la carte peptidique du domaine moteur de CENP-E

La carte peptidique de CENP-E a été réalisée après 2 min 15 de digestion pepsique dans la glace, pH 2.2. Cent trente trois fragments peptidiques ont été identifiés par analyse LC-ESI-MS-MS permettant de couvrir 96 % de la séquence primaire du domaine moteur. Après séparation HPLC dans les conditions de deutération (système chromatographique dans la glace, gradient HPLC rapide), 93 fragments sont retrouvés par ESI-MS (Figure 44). Les 40 fragments perdus sont localisés dans des zones de la protéine couverte par de nombreux peptides chevauchant (cas de $\alpha 1$ - $\beta 3$ -L4 et $\alpha 2$). L'absence de ces fragment ne modifie pas la couverture peptidique (qui reste de 96%) et seule la région Ala178-Met196 (hélice $\alpha 3$ – boucle L9) n'est pas retrouvée. Après deutération (5 min dans la glace), la couverture diminue légèrement et passe de 96 % à 90 %. Sur les 93 fragments peptidiques, seuls 75 sont retrouvés par LC-ESI-MS. Cette perte d'information est occasionnée à la fois par la deutération non-

homogène de certains fragments mais également par les conditions HPLC. Les 6 % de perte enregistrés concernent la région Asn197-Phe207 (boucle L9-début du feuillet β 6) (Figure 44).

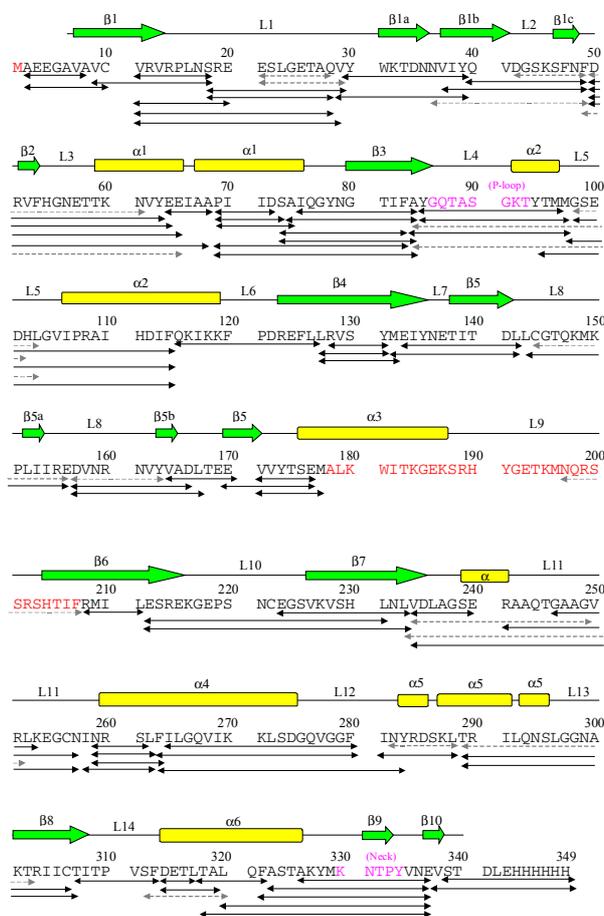


Figure 44 : Carte peptidique du domaine moteur de la kinésine mitotique CENP-E obtenue après 2 min 15 de digestion pepsique dans les conditions de « quenching » (pH 2.2, 0°C). Sur les 133 fragments identifiés par LC-ESI-MS-MS, 93 fragments sont retrouvés après séparation HPLC dans les conditions de deutération (flèches noires au dessous de la séquence primaire) et permettent de couvrir 96 % du domaine moteur. Seule la région Ala178-Met196 n'est pas recouverte. Après 5 min de deutération, la couverture peptidique diminue et passe de 96 à 90 %. Sur les 93 fragments peptidiques, seuls 75 sont retrouvés après LC-ESI-MS. Les fragments perdus sont représentés par des flèches grises en pointillées. Les éléments de structure secondaire de CENP-E sont également reportés au dessus de la séquence primaire (Garcia-Saez *et al.*, 2004).

2.2.2) Etude des taux de deutération au niveau des fragments peptidiques

Les effets de l'AS-2 sur CENP-E ont été étudiés dans les mêmes conditions qu'Eg5. La présence de l'inhibiteur modifie l'accessibilité au solvant deutéré de 13 fragments peptidiques qui délimitent 3 régions distinctes au niveau de CENP-E. Parmi celles-ci, deux sont communes avec Eg5 : Met132-Leu167 (β 4-L7- β 5-L8- β 5a-L8- β 5b) et Ile281-Leu288 (L12- α 5). La troisième région contient les éléments de structure secondaire boucle L11 et début de l'hélice α 4 (peptide Arg241-Phe263). Les résultats obtenus avec les fragments

Met132-Leu143, Ile281-Leu288, Val214-Asn257 et Val214-Glu240 sont présentés en figure 45. Contrairement à Eg5, la présence d'AS-2 n'augmente pas les taux d'incorporation de ces régions mais les diminue. La variation la plus importante est observée au niveau du peptide Val234-Asn257 (Figure 45C). Plusieurs peptides chevauchant couvrent cette zone dont le fragment Val234-Glu240 qui correspond à la région « switch II » de CENP-E (feuillet β -hélice α). La formation du complexe CENP-E/AS-2 ne modifie pas l'accessibilité au solvant deutéré du peptide Val234-Glu240 (Figure 45D). Par conséquent, seule l'accessibilité de la région Arg241-Asn257 (boucle L11) est modifiée en présence de l'inhibiteur. En ce qui concerne les autres fragments peptidiques de CENP-E, aucune variation d'incorporation n'est observée en présence de l'inhibiteur.

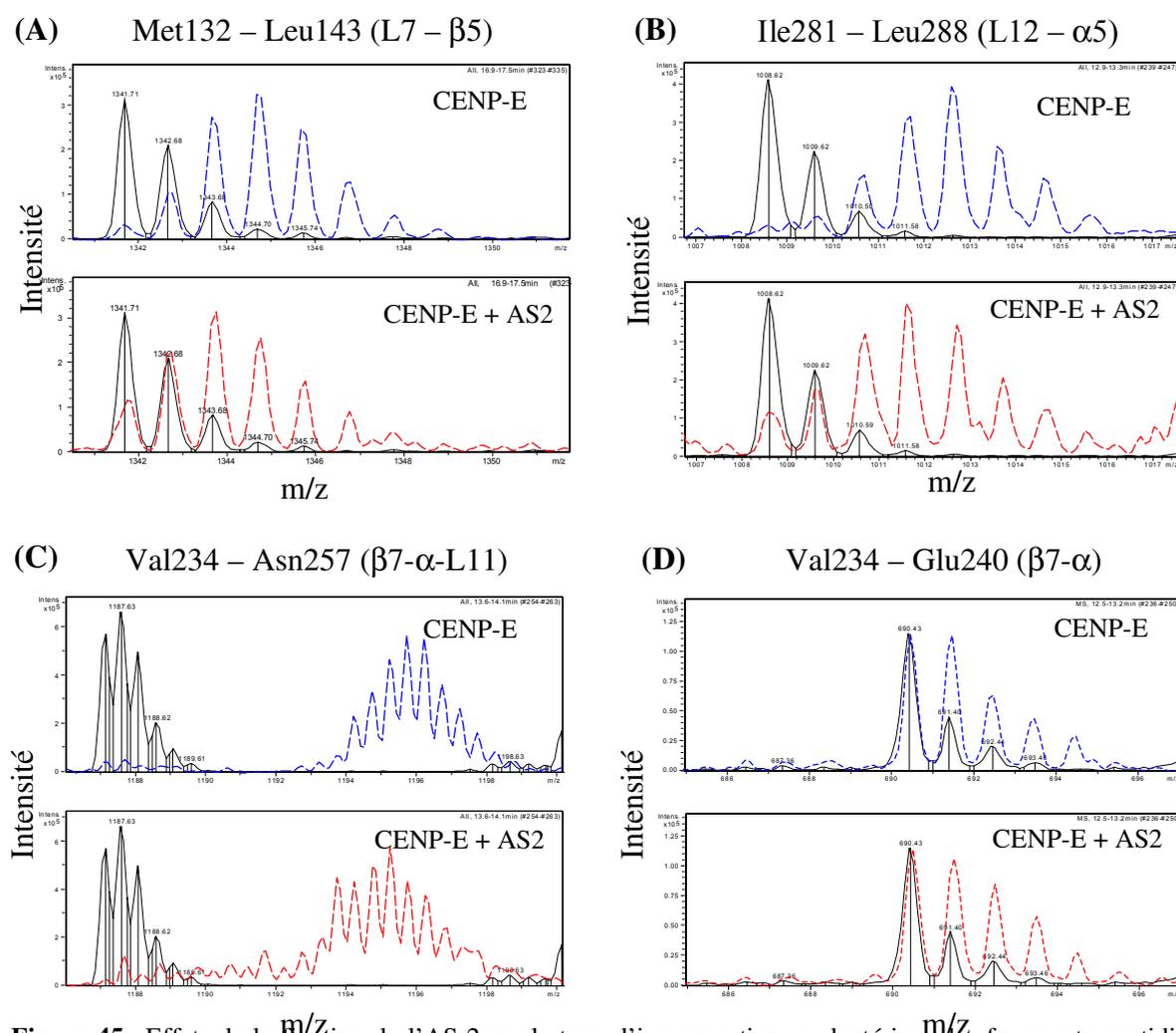


Figure 45 : Effets de la fixation de l'AS-2 sur le taux d'incorporation en deutérium des fragments peptidiques (A) Met132-Leu143 (boucle L7-feuillet β 5), (B) Ile281-Leu288 (boucle L12-hélice α 5), (C) Val234-Asn257 (feuillet β 7-hélice α -boucle L11) et (D) Val234-Glu240 (feuillet β 7-hélice α) de CENP-E. La formation du complexe CENP-E/AS-2 diminue l'accessibilité au solvant deutéré des fragments peptidiques, à l'exception de Val234-Glu240. Chaque spectre de masse compare les fragments peptidiques non deutérés (noir) avec ceux deutérés 5 min en absence (pointillés bleus) ou en présence (pointillés rouges) de l'inhibiteur.

2.3) Eléments de structure secondaire identifiés sur Eg5 et CENP-E

Les régions identifiées par H/D-MS en présence d'AS-2 sont reportées sur les structures de Eg5 et CENP-E en figure 46. La formation du complexe kinésine/AS-2 affecte l'accessibilité au solvant des mêmes régions au niveau de Eg5 et CENP-E. La seule exception provient de la boucle L11 qui n'est identifiée que chez CENP-E (Figure 46B). Ces régions, bien que similaires chez Eg5 et CENP-E, n'ont pas le même comportement face à l'échange. Ainsi en présence d'AS-2, l'accessibilité au solvant de ces dernières est augmentée chez Eg5 et diminuée au niveau de CENP-E. Les changements conformationnels induits par la fixation de l'inhibiteur semblent donc varier entre les deux kinésines.

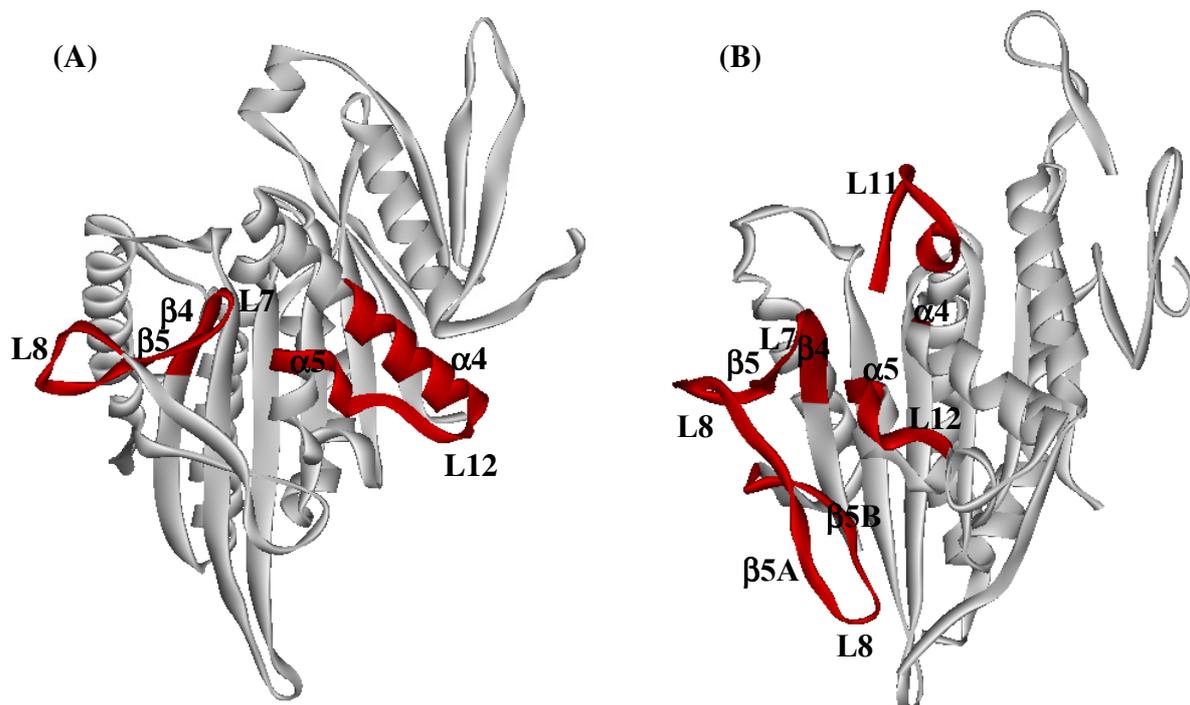


Figure 46 : Localisation des éléments de structure secondaire identifiés par H/D-MS sur (A) Eg5 et (B) CENP-E en présence d'AS-2. (A). La formation du complexe Eg5/AS-2 augmente l'accessibilité au solvant deutéré de deux régions : Leu161-Arg189 ($\beta 4$ -L7- $\beta 5$ -L8) et Leu293-Leu316 ($\alpha 4$ -L12- $\alpha 5$). (B). Inversement, la fixation de l'AS-2 sur CENP-E réduit le niveau de deutérium incorporé dans 3 régions distinctes : Glu133-Leu167 ($\beta 4$ -L7- $\beta 5$ -L8- $\beta 5a$), Ile281-Leu288 (L12- $\alpha 5$) et Arg241-Phe262 (L11- $\alpha 4$). Figures préparées avec ViewerLite50.

III) Discussion - Conclusions

La localisation des zones de contact Eg5/microtubules et CENP-E/microtubules a été réalisée de manière « indirecte » en utilisant l'inhibiteur compétitif AS-2 (Sakowicz *et al.*, 1998). Les régions identifiées par H/D-MS sur Eg5 et CENP-E sont toutes situées sur la face opposée au site de fixation nucléotidique. Cette partie du domaine moteur des kinésines est supposée contenir les zones de contact avec les microtubules. En effet, les premières études menées par Yang *et al.* sur la kinésine de *D. melanogaster* ont permis de situer, de manière

approximative, les régions d'interaction avec les microtubules (Yang *et al.*, 1989). La délétion des 130 premiers acides aminés en position N-terminale de la kinésine n'élimine pas l'interaction avec les microtubules. Ces résidus sont localisés sur la face du domaine moteur contenant le site de fixation nucléotidique. Par conséquent, les zones de contact avec les microtubules doivent se trouver sur la face opposée à ce site.

La fixation de l'inhibiteur altère l'accessibilité au solvant des mêmes régions sur Eg5 et CENP-E constituées des éléments de structure secondaire: **(1)** feuillets $\beta 4$ et $\beta 5$, boucles L7 et L8 ; **(2)** hélice $\alpha 4$ et $\alpha 5$, boucle L12 (Figure 46). La seule exception provient de L11 qui est uniquement identifiée sur CENP-E (Figure 46B). Les zones modifiées en présence d'AS-2 concordent parfaitement avec celles obtenues sur la kinésine conventionnelle. En se basant sur les données établies par Yang en 1989, l'équipe de Vale a entrepris par mutagenèse dirigée de localiser précisément les zones d'interaction entre la kinésine conventionnelle et les microtubules (Woehlke *et al.*, 1997). L'effet de chaque mutation sur l'interaction kinésine/microtubules a été évalué en mesurant respectivement l'activité ATPasique stimulée et l'affinité apparente des microtubules. Cette approche expérimentale par « alanine-scanning mutagenesis » a permis d'identifier certains résidus impliqués dans l'interaction. Ces derniers sont localisés dans 3 régions distinctes: **(1)** boucles L7 et L8, **(2)** boucle L11, **(3)** boucle L12 et hélice $\alpha 5$. Ces éléments de structure secondaire ont été également identifiés sur la kinésine KIF1A (Kikkawa *et al.*, 2001). Les régions en contact avec les microtubules semblent donc communes aux domaines moteurs des kinésines. Néanmoins, certaines variations existent au niveau des éléments de structure secondaire impliqués dans l'interaction. C'est le cas pour L11 qui semble participer aux contacts avec les microtubules chez CENP-E, KIF1A et la kinésine conventionnelle à l'exception de Eg5.

La fixation de l'AS-2 sur Eg5 et CENP-E n'induit pas les mêmes variations d'incorporation en deutérium au sein des régions identifiées. La formation du complexe CENP-E/AS-2 réduit le taux d'incorporation en deutérium des régions Glu133-Leu167 ($\beta 4$ -L7- $\beta 5$ -L8- $\beta 5a$), Ile281-Leu288 (L12- $\alpha 5$) et Arg241-Phe262 (L11- début $\alpha 4$) (Figure 46B). Cette diminution d'accessibilité au solvant reflète à la fois un effet de masquage de l'inhibiteur et certainement des modifications conformationnelles. En ce qui concerne Eg5, la fixation de l'AS-2 augmente le nombre de deutérium incorporé dans les régions Leu161-Arg189 ($\beta 4$ -L7- $\beta 5$ -L8- $\beta 5a$) et Leu293-Leu316 ($\alpha 4$ -L12- $\alpha 5$) (Figure 46A). L'effet le plus

marquant est observé à la fin de l'hélice $\alpha 4$. En absence d'inhibiteur, très peu de deutériums sont incorporés au niveau de cette région puisque les hydrogènes amidiques participent au maintien de la structure. La formation du complexe Eg5/AS-2 augmente très nettement l'accessibilité de ces hydrogènes, preuve d'une modification structurale importante de $\alpha 4$. La fixation de l'AS-2 semble ainsi déstructurer complètement cette région ; les liaisons intramoléculaires nécessaires au maintien de la structure secondaire sont perdues ce qui accroît l'accessibilité des hydrogènes amidiques. Ce phénomène de déstructuration a déjà été reporté par l'équipe de Hirokawa sur la kinésine KIF1A (Nitta *et al.*, 2004). La structure cristallographique du domaine moteur de cette kinésine a été résolue en présence de différents analogues nucléotidiques non hydrolysables. L'affinité du domaine moteur pour les microtubules est en effet reliée à l'état du nucléotide présent au niveau du site catalytique. Ainsi, KIF1A interagit fortement avec la tubuline en présence d'ATP et en absence de nucléotide. De même, l'affinité est réduite lorsque le site nucléotidique est occupé par de l'ADP. Ces états de transition nucléotidique rencontrés au cours du cycle catalytique permettent donc au domaine moteur de moduler son affinité aux microtubules par l'intermédiaire de modifications conformationnelles. Les structures cristallographiques de KIF1A en présence d'analogues non hydrolysables de l'ATP et de l'ADP ont permis d'une part d'identifier les zones impliquées dans l'interaction avec les microtubules et d'autres part de visualiser les changements conformationnels occasionnés au cours du cycle ATPasique. La modification structurale la plus marquante touche à la fois les boucles L11 et L12 ainsi que l'hélice $\alpha 4$. La transition ATP-ADP entraîne une rotation de l'hélice $\alpha 4$ de 20° en direction du site nucléotidique (Figures 47A-B). Ce mouvement s'accompagne également d'une restructuration des boucles L11 et L12 qui encadrent $\alpha 4$. Sous l'effet de l'hydrolyse de l'ATP, une partie de ces boucles se structure en hélice ce qui accroît très sensiblement la taille de $\alpha 4$. Cet état de transition est maintenu jusqu'à ce que le phosphate inorganique (P_i) soit « expulsé » du site catalytique. Une fois le P_i libéré, L12 retrouve sa structure originale à l'exception de la boucle L11. Cette dernière se « déstructure » dès que l'ADP est remplacé par une molécule d'ATP.

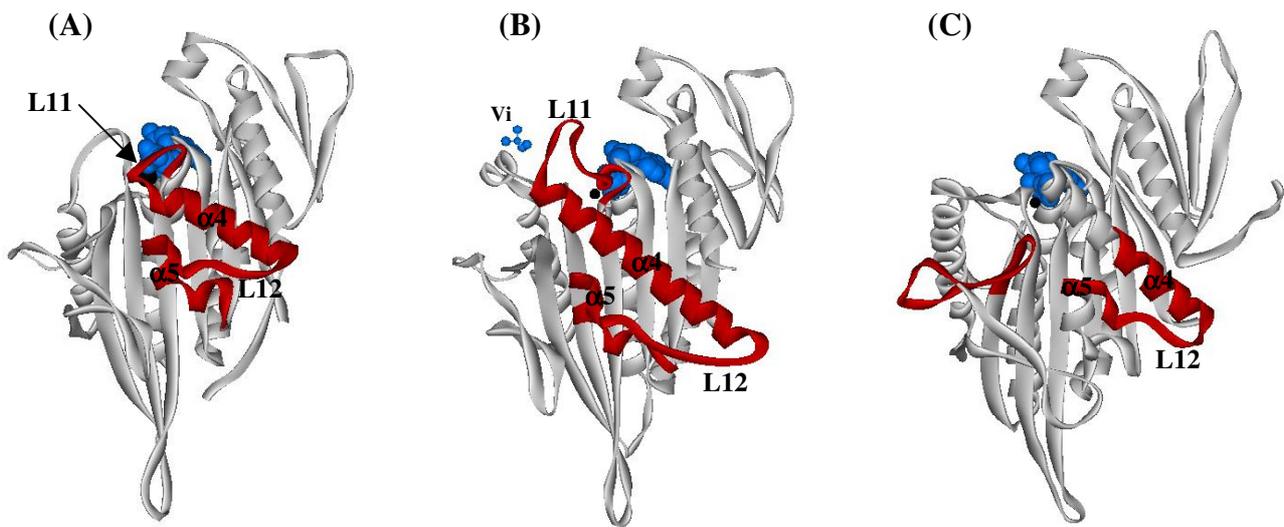


Figure 47 : Structures cristallographiques du domaine moteur de KIF1A en présence (A) d'AMP-PNP (en bleu) et (B) d'ADP-Vanadate (en bleu) (Nitta *et al.*, 2004). L'analogue nucléotidique ADP-Vanadate (Vi) permet de stopper le cycle ATPasique de la kinésine au moment où le P_i (dans ce cas le vanadium) est expulsé du site catalytique. La transition ATP-ADP+P_i réoriente la position de l'hélice $\alpha 4$ par rapport au site catalytique d'environ 20° et permet d'augmenter très sensiblement la taille de l'hélice grâce à la structuration des boucles L11 et L12 qui encadrent $\alpha 4$. (C). La fixation d'AS-2 sur Eg5 engendre des modifications structurales importantes au niveau de l'hélice $\alpha 4$. L'accessibilité au solvant deutéré des hydrogènes amidiques est améliorée en présence de l'inhibiteur indiquant que l'hélice $\alpha 4$ perd sa structure secondaire. L'ADP est coloré en bleu.

Dans le cas de Eg5, la fixation de l'AS-2 déstructure complètement la fin de l'hélice $\alpha 4$ (Figure 47C). A ce stade, il est délicat d'interpréter l'effet de cette modification structurale en présence de l'inhibiteur. Il est nécessaire au préalable de connaître les modifications conformationnelles générées au cours du cycle ATPasique d'Eg5. Néanmoins, ce changement structural permet d'accélérer la libération d'ADP du cycle catalytique. Ainsi, il est probable que l'AS-2 bloque Eg5 dans une conformation de type ATP. Dans ce cas de figure, la modification observée au niveau de l'hélice $\alpha 4$ correspondrait à l'état de transition ADP-ATP et donc à l'état conformationnel le plus favorable à l'interaction avec les microtubules.

Toutes ces études d'interaction ont été réalisées de manière « indirecte » c'est-à-dire en absence de microtubule et ce de manière à « alléger » les contraintes expérimentales. Même si les résultats obtenus par H/D-MS et par cristallographie concordent, ils ne témoignent pas de l'interaction réelle entre le domaine moteur des kinésines et les microtubules. Il est donc probable que des éléments de structure secondaire autres que ceux identifiés par ces deux techniques participent à l'interaction. Les études menées par cryo-microscopie électronique

sur KIF1A en présence de microtubules confortent néanmoins les résultats obtenus *via* ces méthodes « indirectes ». La structure résolue à 15Å de ce complexe permet en effet d'identifier les régions L11, $\alpha 4$, L12 et L8 de KIF1A (Figure 48).

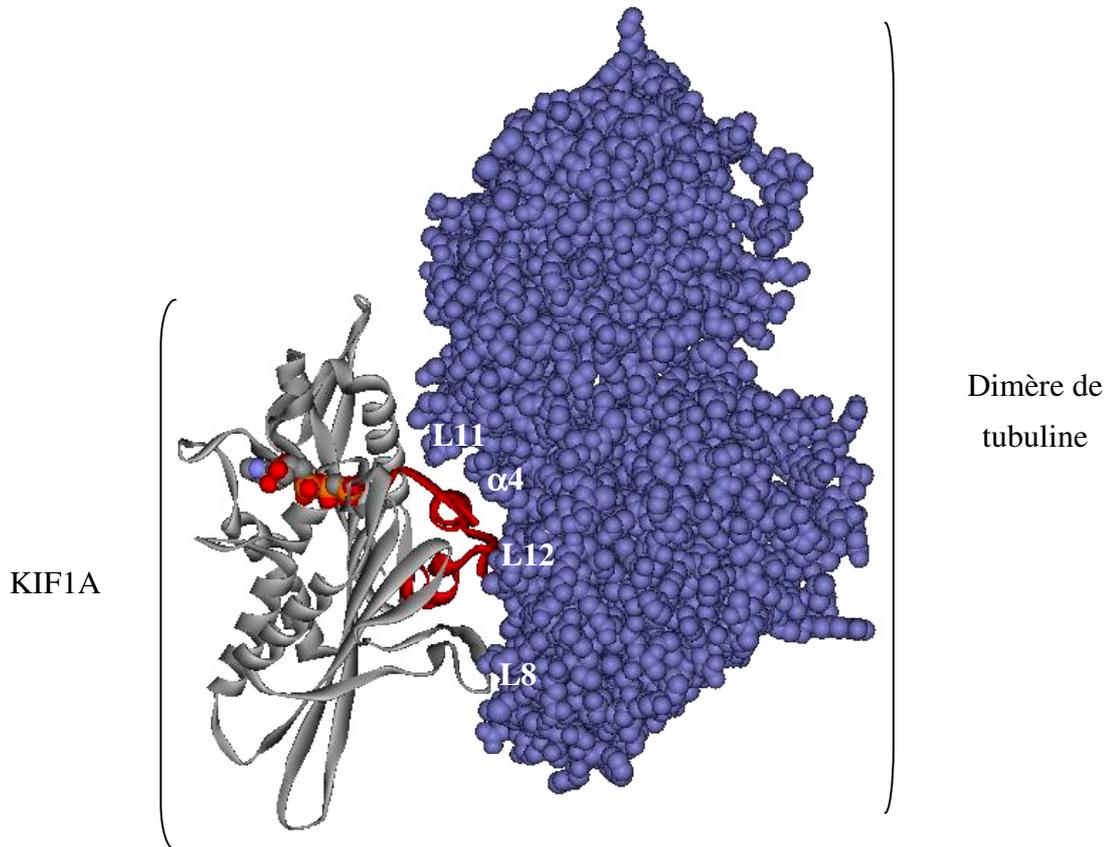


Figure 48 : Structure du complexe KIF1A/microtubule résolue en présence d'ATP à 15Å par cryo-microscopie électronique (Kikkawa *et al.*, 2001). Les éléments de structure secondaire L11, $\alpha 4$, L12 et L8 semblent être en contact direct avec les sous unités de tubuline du microtubule.

La structure du complexe CENP-E/microtubule a été récemment résolue à 19Å par cryomicroscopie électronique (E. Neumann, IBS-LMES, résultats non publiés). Le domaine moteur de cette kinésine semble utiliser les boucles L7, L8, L9 et L11 pour interagir avec les microtubules ce qui confirme les résultats obtenus par H/D-MS avec l'AS-2. Seule la boucle L9 n'est pas identifiée en présence de l'inhibiteur par H/D-MS ; cette région fait en effet partie des zones non couvertes après deutération et séparation HPLC (Figure 44). Les éléments de structure secondaire modifiés par cet inhibiteur correspondent donc aux régions impliquées dans l'interaction avec les microtubules. Ainsi, Eg5 et CENP-E partagent une interface commune avec les microtubules.

Conclusions – Perspectives

L'étude structurale des complexes protéines/partenaires est en général réalisée par cristallographie. Cette technique permet d'identifier, à haute résolution, les sites d'interaction et les zones de modifications conformationnelles. Dans le cadre de ce projet, la cristallographie a été immédiatement envisagée afin de caractériser les complexes Eg5/inhibiteurs. Les premiers travaux ont été initiés sur Eg5 seul de manière à définir les conditions de cristallisation. Cependant, aucun cristal n'a été obtenu lors de ces essais préliminaires. La spectrométrie de masse et les échanges isotopiques ont donc été utilisés afin de pallier ce problème et obtenir rapidement des informations structurales sur les complexes Eg5/inhibiteurs. La technique des échanges hydrogène /deutérium associée à la spectrométrie de masse (H/D-MS) est en effet une méthode éprouvée dans le domaine de la biologie structurale. Cette dernière est couramment utilisée pour l'étude des dynamiques conformationnelles et la caractérisation des zones de contact entre une protéine et ses partenaires.

La première partie de ce travail a été consacrée à la validation du protocole expérimental H/D-MS en utilisant le monastrol comme référence d'interaction (Mayer *et al.*, 1999). De manière à distinguer les effets de masquage des modifications conformationnelles, les zones d'Eg5 identifiées par H/D-MS ont été remplacées par les séquences homologues de la kinésine conventionnelle de *Neurospora crassa* (NcKHC). La kinésine NcKHC est en effet non inhibée par le monastrol et partage de nombreuses similitudes aussi bien structurales que de séquence avec Eg5. Les faibles différences rencontrées au sein de ces deux domaines moteurs sont donc suffisantes pour expliquer la spécificité du monastrol envers Eg5. Deux protéines chimériques ont ainsi été créées pour confirmer les résultats d'échange : Eg5-Nc1, contenant la séquence 101-121 de NcKHC en position 125-145 ; Eg5-Nc2 contenant la séquence 175-188 de NcKHC en position 202-215. La modification de l'une ou l'autre de ces régions abolit l'effet du monastrol sur l'activité ATPasique basale du domaine moteur en empêchant la formation du complexe Eg5/monastrol (absence de variation d'échange H/D sur les deux protéines chimériques). Les deux zones identifiées par H/D-MS, à savoir Tyr125-Glu145 (boucle L5-hélice α_2) et Ile202-Leu227 (feuillet β_5 -hélice α_3), sont donc directement impliquées dans l'interaction ce qui valide notre approche expérimentale H/D-MS / mutagenèse dirigée. Ce protocole a par la suite été appliqué afin de caractériser l'interaction entre Eg5 et plusieurs inhibiteurs: deux analogues des phénothiazines (NSC 59349 et NSC 169676), le flexeril, la monastroline (HR22C16) et le STLC (Hotha *et al.*, 2003 ; DeBonis *et al.*, 2004). Toutes ces molécules inhibent spécifiquement l'activité ATPasique basale et

stimulée d'Eg5 et sont capables de bloquer la prolifération des cellules HeLa. Les résultats d'échange obtenus sur Eg5 et les deux protéines chimériques montrent très clairement que ces 6 molécules partagent le même site de fixation que le monastrol. Ainsi, la poche allostérique située entre L5- α 2 et β 5- α 3 peut être considérée comme un point chaud d'inhibition. En effet, 7 molécules de structure différente sont capables de se fixer dans cette région et de bloquer le cycle ATPasique d'Eg5. Il est très probable que la boucle L5 soit responsable de ce point chaud. L'élément L5 est rencontré chez toutes les kinésines mais la longueur de ce dernier fluctue considérablement. Ainsi, Eg5 dispose de la boucle la plus longue. Lors de la formation du complexe Eg5-monastrol, L5 opère un mouvement important de manière à créer et fermer la poche allostérique (Yan *et al.*, 2004). La longueur de L5 doit certainement lui conférer une flexibilité suffisante pour s'adapter à la structure de chaque inhibiteur.

De manière à mieux cerner les mécanismes d'inhibition d'Eg5, plusieurs mutations ponctuelles ont été introduites au niveau de la poche allostérique. Au total 11 résidus ont été substitués par des alanines et l'effet de chaque mutation a été étudié sur le monastrol et le STLC à la fois par H/D-MS et analyses enzymatiques. Le STLC représente la molécule la plus intéressante que nous ayons identifiée. L'action anti-mitotique de ce composé est connue depuis de nombreuses années mais la cible cellulaire du STLC (en l'occurrence Eg5) n'a été identifiée que très récemment par notre laboratoire (DeBonis *et al.*, 2004). Ce dérivé non naturel des acides aminés ne se comporte pas comme un inhibiteur classique de type Michaélien mais comme un inhibiteur réversible à forte fixation de type « tight-binding » (Skoufias *et al.*, 2005). Contrairement au monastrol, la formation du complexe Eg5-STLC modifie très sensiblement les concentrations en protéine et en inhibiteur libres au cours du temps. Ce phénomène de déplétion constitue la seule différence entre ces deux types d'inhibiteur et la notion de « tight-binding » est bien souvent assimilée à une condition expérimentale : variation de l' IC_{50} en fonction de la concentration en protéine ou encore courbes d'Ackermann-Potter (Vitesse = f[(Concentration en enzyme)]) non linéaires en présence de l'inhibiteur (Williams et Morrison, 1979).

Les analyses enzymatiques réalisées sur les 11 mutants ont permis d'identifier les résidus impliqués dans le comportement de type « tight-binding » du STLC. Ainsi, le STLC se comporte comme un inhibiteur réversible classique lorsque les résidus Arg119 (boucle L5), Pro131 (boucle L5), Tyr211 (hélice α 3) et Arg221 (hélice α 3) sont substitués par une alanine. Les mutations R119A, P131A et Y211A n'interfèrent pas avec la fixation de l'inhibiteur mais modifient à la fois la structure de la poche allostérique et l'inhibition. Le STLC adopte ainsi un comportement dit « hyperbolique » c'est à dire que le domaine moteur conserve son

activité ATPasique, même en présence de l'inhibiteur. Seule l'efficacité de la catalyse est diminuée. Par contre, la mutation de l'Arg221 (fin de l'hélice $\alpha 3$) permet au STLC d'adopter un comportement de type Michaélien. Il est cependant délicat d'interpréter les résultats obtenus en présence de ces 4 mutations. Le comportement dit de « tight-binding » n'est en effet qu'une donnée expérimentale et rien ne permet à l'heure actuelle d'expliquer pourquoi un inhibiteur est de ce type ou non. Néanmoins, ces 4 résidus sont nécessaires à ce type d'inhibition par le STLC.

Sur les 11 mutations testées, seule L214A permet d'abolir complètement les effets du monastrol et du STLC. Cependant, la fonction de ce résidu localisé en plein milieu de l'hélice $\alpha 3$ diffère en fonction de l'inhibiteur. Cet acide aminé est en effet nécessaire à l'interaction du monastrol sur le domaine moteur. En présence de la mutation, le complexe Eg5-monastrol ne se forme plus ce qui explique l'absence d'inhibition. En ce qui concerne le STLC, ce résidu semble participer activement à la stabilisation de la poche allostérique mais n'intervient pas dans l'interaction. Dans ce cas de figure, la levée de l'inhibition par le STLC n'est pas due à une absence d'interaction, mais à une perte de stabilité de la poche allostérique (et donc des modifications conformationnelles induites par le STLC). Contrairement à L214A, l'effet des 10 autres mutations ponctuelles varient en fonction de l'inhibiteur testé. Ainsi, la substitution du résidu Ile136 (localisé au niveau de $\alpha 2$) n'a aucun effet sur le STLC. Cette acide aminé ne participe ni à la formation du complexe Eg5-STLC, ni au maintien de la poche allostérique. Au contraire, ce résidu participe activement à la stabilisation du site d'interaction du monastrol puisque sa mutation diminue l'affinité de l'inhibiteur et augmente l'accessibilité au solvant deutéré. Cette étude montre que le monastrol et le STLC interagissent avec des résidus différents pour créer une poche allostérique similaire du point de vue structural. D'après la structure cristallographique du complexe Eg5-ADP-monastrol, la formation de la poche allostérique altère localement la flexibilité du domaine moteur sans perturber celle du site nucléotidique (Yan *et al.*, 2004). La modification la plus importante est observée au niveau du site de fixation de l'inhibiteur. En présence de l'inhibiteur, le facteur de température de la boucle L5 passe de 39 Å² à 23 Å² ce qui signifie que son degré de rigidité augmente considérablement. Sachant que les transitions ATP-ADP au cours du cycle catalytique s'accompagnent de modifications conformationnelles, la présence de cette zone rigide doit interférer avec ces changements et bloquer le domaine moteur dans un état structural non favorable à la libération d'ADP. Toutes les molécules testées partagent le même site allostérique que le monastrol. Il semble probable que la fixation de ces inhibiteurs modifie également la rigidité de Eg5 afin d'inhiber le cycle ATPasique, mais à des degrés différents.

En effet, les taux d'incorporation en deutérium au sein du site allostérique varient en fonction des inhibiteurs testés. Cette modification pourrait expliquer les différences d'inhibition observées (en terme d'efficacité).

La dernière étude menée au cours de cette thèse concerne l'identification des sites d'interaction aux microtubules des kinésines Eg5 et CENP-E. La fonction cellulaire des moteurs moléculaires est étroitement liée à leur capacité à fixer les microtubules. Il serait donc possible d'inhiber les kinésines en empêchant cette interaction. Les analyses par H/D-MS ont été réalisées en présence d'adociasulfate-2 (AS-2). Cette molécule naturelle, extraite de l'éponge marine *Haliclona* sp., est un inhibiteur compétitif des microtubules (Sakowicz *et al.*, 1998). La fixation de l'AS-2 modifie l'accessibilité au solvant des mêmes régions sur Eg5 et CENP-E constituées des éléments de structure secondaire β 4-L7- β 5-L8 et α 4-L12- α 5. La seule exception provient de la boucle L11 qui n'est identifiée qu'au niveau de CENP-E. Ces régions concordent parfaitement avec celles identifiées sur la kinésine conventionnelle et KIF1A (Woehlke *et al.*, 1997 ; Kikkawa *et al.*, 2001). Les zones en contact avec les microtubules semblent donc communes aux domaines moteurs des kinésines. Néanmoins, les effets de l'AS-2 diffèrent au niveau de Eg5 et CENP-E. La formation du complexe CENP-E/AS-2 réduit le taux d'incorporation en deutérium alors que ce dernier est augmenté chez Eg5. La fixation de l'inhibiteur sur Eg5 déstructure complètement la fin de l'hélice α 4. Ce type de modifications conformationnelles a déjà été reporté chez KIF1A au niveau de α 4 (Nitta *et al.*, 2004). Il semble probable que l'AS-2 bloque Eg5 dans une conformation de type ATP ; dans ce cas, la modification observée au niveau de α 4 correspond à l'état de transition ADP-ATP de la kinésine. Néanmoins, il est nécessaire de connaître les modifications conformationnelles générées au cours du cycle ATPasique d'Eg5 afin de valider nos interprétations. Cette étude structurale pourrait être réalisée par H/D-MS en présence d'analogues nucléotidiques non hydrolysables comme l'AMP-PCP, l'AMP-PNP, l'ADP-Vanadate et l'ADP-AIFx. Chacune de ces molécule permet de « figer » la conformation du domaine moteur à une étape bien précise du cycle ATPasique. Par exemple l'ADP-AIFx bloque le domaine moteur dans l'état de transition ATP-ADP+P_i ; l'ADP-Vanadate stoppe quant à lui le cycle catalytique au moment où le P_i est libéré du site nucléotidique. L'utilisation de ces analogues nous permettrait d'une part de mieux cerner l'effet de l'AS-2 au niveau de Eg5 et CENP-E et d'autre part de comprendre pourquoi la fixation de cette inhibiteur n'altère pas de la même manière les taux d'incorporation en deutérium.

L'étude de ces changements conformationnels apporterait également des éléments de réponse sur les mécanismes d'inhibition du cycle ATPasique. En effet, l'affinité du monastrol est modulée en fonction de l'état nucléotidique et ce dernier se fixe préférentiellement sur le complexe Eg5-ADP (Luo *et al.*, 2004). Il serait donc intéressant de visualiser et comparer par H/D-MS l'effet de la fixation de chaque inhibiteur sur Eg5 en présence de ces différents analogues nucléotidiques.

Pour le moment, les 11 mutations ponctuelles ont été testées sur le monastrol et le STLC. La prochaine étape serait d'analyser les effets de ces substitutions sur les autres inhibiteurs afin d'identifier les résidus : (1) impliqués dans l'interaction ; (2) nécessaires à la stabilisation de la poche allostérique. De même, le résidu Leu214 est nécessaire à l'inhibition *in vitro* de l'activité ATPasique d'Eg5 par le monastrol et le STLC. Nous envisageons de tester l'effet de cette mutation *in cellulo* sur des cellules HeLa. Ce type d'expérience nécessite de dépléter Eg5 des cellules (*via* la technique des ARNm antisens par exemple) et d'introduire par transfection la construction contenant la kinésine entière portant la mutation L214A au niveau de son domaine moteur. Cette étude permettra de visualiser si cette mutation ponctuelle est capable de rendre résistante les cellules HeLa au monastrol et au STLC.

Les résultats présentés dans cette thèse constituent la première caractérisation structurale de complexes kinésines/inhibiteurs par H/D-MS et mutagenèse dirigée. Depuis peu, les problèmes rencontrés avec Eg5 en cristallographie ont été résolus au laboratoire. Une nouvelle construction du domaine moteur, légèrement raccourcie en position C-terminale et sans motif poly-histidine, a été utilisée avec succès pour la cristallogénèse. Il semble cependant assez délicat d'obtenir des cristaux d'Eg5 en présence de ses inhibiteurs. Les essais menés sur le STLC n'ont pour le moment rien donné que ce soit en co-cristallisation ou après trempage du cristal d'Eg5 dans une solution d'inhibiteur. Pour le moment, seul le protocole H/D-MS / mutagenèse dirigée nous permet d'obtenir des informations structurales sur les complexes Eg5/inhibiteurs. Notre approche expérimentale pourrait servir de méthode de criblage afin d'identifier de nouvelles molécules capables d'interagir spécifiquement avec la poche allostérique de Eg5. De même, celle-ci pourrait être appliquée à d'autres systèmes biologiques et en particulier sur des protéines ne possédant aucune activité enzymatique.

Matériels et méthodes.

Chapitre I

Clonage, expression et purification des protéines - Enzymologie

I) Clonage-expression et purification des protéines

1.1) Création et contrôle des vecteurs de sur-expression

Les différents plasmides d'expression créés au cours de cette étude sont listés dans le tableau 2. Tous ces vecteurs dérivent du plasmide pEg5₁₋₃₈₆ codant pour les résidus 1 à 386 du domaine moteur de la kinésine mitotique humaine Eg5 (DeBonis *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Plasmides créés au cours de l'étude.

NOM DES PLASMIDES	DESCRIPTION
pEg5 ₁₋₃₈₆	pEt28a + hsEg5 ₁₋₃₈₆ gene
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB	pEg5 ₁₋₃₈₆ avec ^Δ SUR <i>Pml</i> I – <i>Bst</i> B I
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB1	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec la mutation R119A
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB2	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec la mutation W127A
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB3	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec la mutation D130A
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB4	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec la mutation P131A
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB5	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec la mutation L132A
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB6	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec la mutation I136A
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec ^Δ SUR <i>Bsa</i> I – <i>Eag</i> I
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE1	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE avec la mutation V210A
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE2	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE avec la mutation Y211A
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE3	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE avec la mutation L214A
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE4	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE avec la mutation E215A
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE5	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE avec la mutation R221A
pEg5 ₁₋₃₈₆ PB-Nc1	pEg5 ₁₋₃₈₆ PB avec l'insert [†] NcKHC ₁₀₁₋₁₂₁
pEg5 ₁₋₃₈₆ BE-Nc2	pEg5 ₁₋₃₈₆ BE avec l'insert [‡] NcKHC ₁₇₅₋₁₈₈

SUR : Site unique de restriction ; [†]Insert codant pour les résidus 101 à 121 de la kinésine conventionnelle de *Neurospora crassa* ; [‡] Insert codant pour les résidus 175 à 188 de la kinésine conventionnelle de *Neurospora crassa*.

1.1.1) Création des vecteurs pEg5₁₋₃₈₆ PB et BE par mutagenèse dirigée

Les sites de restrictions uniques *PmlI*, *BstBI*, *BsaI* et *EgaI* ont été introduits dans le vecteur pEg5₁₋₃₈₆ par mutations silencieuses en utilisant le kit de mutagenèse dirigée « QuickChange Site-Directed mutagenesis » (Stratagene). Ces sites encadrent les deux zones d'interaction identifiées par H/D-SM : *PmlI*-*BstBI*, zone 125-145 ; *BsaI*-*EgaI*, zone 202-227. Les amorces oligonucléotidiques proviennent de MWG Biotech AG (Tableau 3).

Tableau 3 : Amorces oligonucléotidiques synthétisées.

Site de restriction	Amorces oligonucléotidiques
<i>PmlI</i>	5'-AAT GAA GAG <u>TAC ACG</u> TGG GAA GAG GAT CCC-3'
	5'-GGG ATC CTC TTC CCA <u>CGT GTA</u> CTC TTC ATT-3'
<i>BstBI</i>	5'-CCA CGT ACC CTT CAT CAA ATT <u>TTC GAA</u> AAA CTT ACT GAT-3'
	5'-ATC AGT AAG TTT <u>TTC GAA</u> AAT TTG ATG AAG GGT ACG TGG-3'
<i>BsaI</i>	5'-GGA GTG ATA ATT AAA GGT <u>CTC</u> GAA GAA ATT ACA GTA CAC-3'
	5'-GTG TAC TGT AAT TTC TTC <u>GAG</u> ACC TTT AAT TAT CAC TCC-3'
<i>EgaI</i>	5'-GCA AAA AGG ACA <u>ACG GCC</u> GCT ACT CTG ATG-3'
	5'-CAT CAG AGT AGC <u>GGC CGT</u> TGT CCT TTT TGC-3'

L'amplification PCR (Polymerase Chain Reaction) est réalisée dans un volume final de 51µL contenant : 39.5 µL d'eau distillée stérile, 0.5 µL de vecteur (~ 1.2 pmole/mL), 5 µL de tampon réactionnel 10X, 1 µL de DNTP mix, 2 µL de chaque amorce nucléotidique conditionnée dans de l'eau distillée stérile à 10 pmol/µL. Ce mélange est placé dans la glace avant d'ajouter 1µL de polymérase *Pfu* Turbo (2.5 U/µL). Le protocole d'amplification PCR est le suivant :

- | | |
|---|-----------|
| 1. Dénaturation à 95°C pendant 30 s | } 16 fois |
| 2. Hybridation des amorces pendant 1 min à 55°C | |
| 3. Elongation pendant 10 min à 68°C | |

Après amplification, le brin parental est éliminé par digestion enzymatique. 1µL de *DpnI* (10 U/µL) est ajouté à chaque produit d'amplification PCR. La digestion est réalisée directement dans le thermocycle pendant 1h à 37°C.

1.1.2) Création du vecteur pEg5₁₋₃₈₆-PB1 par mutagenèse dirigée

Ce vecteur, créé à partir de pEg5₁₋₃₈₆PB contient la mutation R119A. Cette mutation ponctuelle est introduite par mutagenèse dirigée en suivant le protocole expérimental utilisé pour les vecteurs pEg5₁₋₃₈₆PB et EB. Les amorces nucléotidiques synthétisées contiennent le site de restriction unique *NcoI* afin de contrôler la présence de la mutation ponctuelle au niveau du vecteur d'expression (Tableau 4).

Tableau 4 : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour créer le vecteur pEg5₁₋₃₈₆PB1.

Mutation	Amorces oligonucléotidiques
R119A	5'-ACT GGC ACG GGT AAA ACT TTT ACA ATG GAA GGT GAA <u>GCG</u> TCA CCT AAT -3' 5'-ATT AGG TGA <u>CGC</u> TTC ACC TTC CAT TGT AAA AGT TTT ACC CGT GCC AGT -3'

1.1.3) Création des vecteurs pEg5₁₋₃₈₆PB2 à PB6, BE1 à BE5, Nc1 et Nc2

Tous ces vecteurs d'expression sont créés par « système de cassettes » à partir de pEg5₁₋₃₈₆PB ou BE. Ces derniers sont ouverts par digestion enzymatique au niveau de leurs sites de restriction unique. Les vecteurs « ouverts » sont purifiés puis utilisés afin d'incorporer les inserts contenant les mutations ponctuelles ou de zone désirées.

1.1.3.1) Ouverture et purification des vecteurs pEg5₁₋₃₈₆PB et BE

Toutes les enzymes de restrictions proviennent de New England Biolabs. Le vecteur PB est ouvert par digestion avec *PmlI* et *BstBI* ; le vecteur BE par *BsaI* et *EagI*. Les digestions procèdent comme suit :

- 40 µL de vecteur (provenant d'une préparation de type MidiPrep, ~ 1.2 pmole/mL)
- 5 µL de tampon de digestion 10X
- 1 µL d'enzyme de restriction

La digestion est réalisée pendant 3 h à 65°C pour *BstBI*, 50°C pour *BsaI* et 37°C pour *EagI* et *PmlI*. Dans le cas de la digestion par *PmlI*, le tampon réactionnel est au préalable supplémenté avec de la BSA (concentration finale dans le milieu de digestion = 100 µg/mL). Après chaque digestion enzymatique, les vecteurs sont purifiés à l'aide du kit GeneClean Spin Kit. La concentration des vecteurs ouverts est mesurée par dosage UV à 260 nm. Chaque vecteur est digéré par les deux enzymes de restriction en parallèle de manière à vérifier le bon fonctionnement de ces dernières après migration sur gel d'agarose 1% et coloration au bromure d'éthidium (BET) (Figure 49).

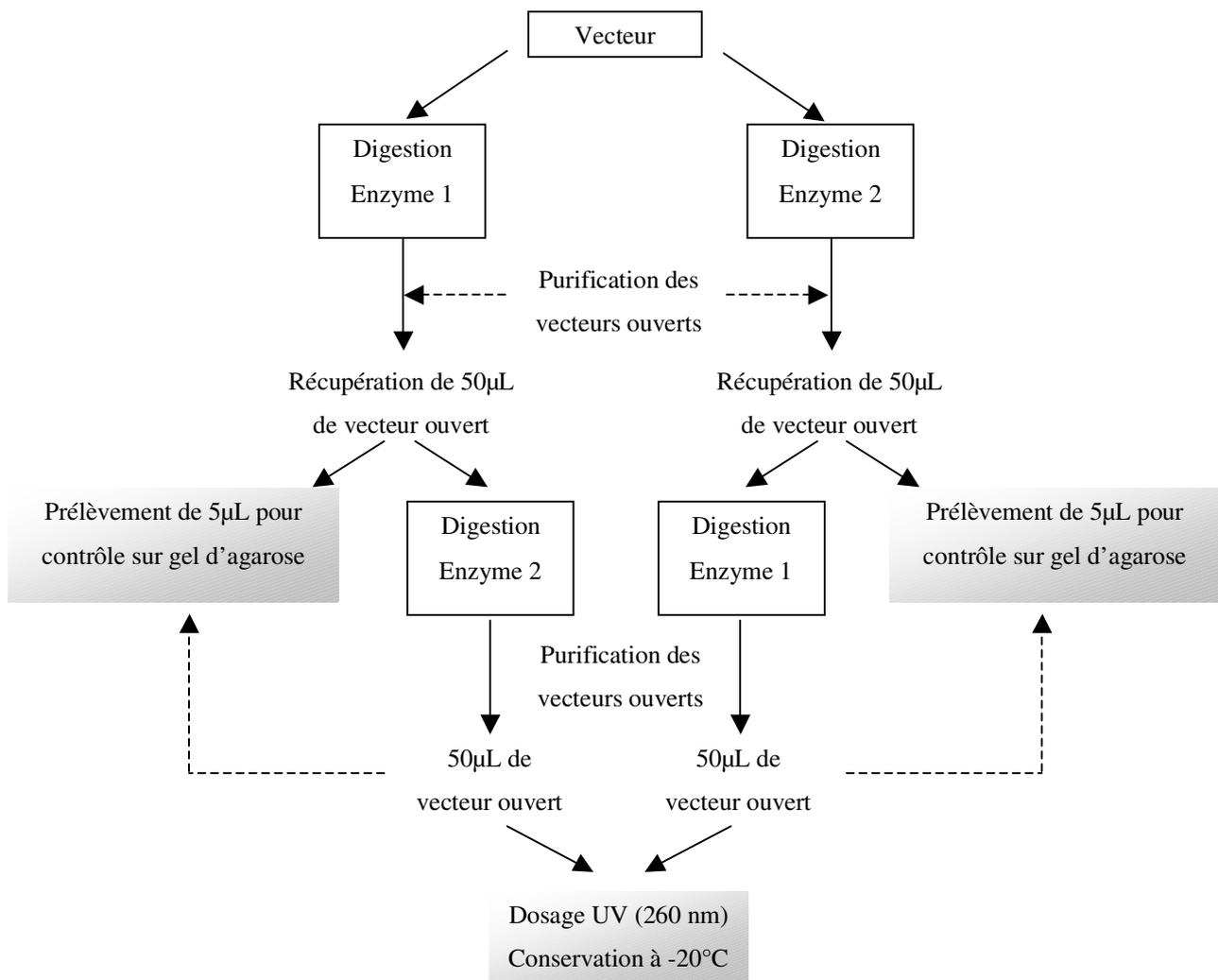


Figure 49 : Plan synoptique du protocole d'ouverture des vecteurs par double digestion enzymatique.

1.1.3.2) Reconstitution des inserts – Etape de ligation

Les inserts proviennent de MWG Biotech AG (Tableau 4). La présence des mutations ponctuelles au niveau des vecteurs est contrôlée grâce à l'insertion de sites de restriction enzymatique uniques par mutations silencieuses : *SacII* pour les plasmides pEg5₁₋₃₈₆ PB2 à PB6 ; *BsiWI* pour les plasmides pEg5₁₋₃₈₆ BE1 à BE4 et *BsrGI* pour pEg5₁₋₃₈₆ BE5. Pour les deux mutations de zone, aucun site de restriction unique n'a été inséré par mutations silencieuses. La présence de l'insert de *N. crassa* en position 125-145 (NcKHC₁₀₁₋₁₂₁) fait disparaître le site de restriction unique *PmlI*. L'insert de *N. crassa* en position 202-227 (NcKHC₁₇₅₋₁₈₈) fait quant à lui apparaître un second site de coupure *XhoI*. Si présence de NcKHC₁₇₅₋₁₈₈, la digestion par *XhoI* ouvre le plasmide et génère un fragment nucléotidique de 547 paires de bases, visualisable après migration sur gel d'agarose 1% et coloration au BET.

Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour générer les plasmides d'expression pEg5₁₋₃₈₆ PB2 à PB6, BE1 à BE5 et Nc1, Nc2. (SUR : site unique de restriction).

Mutations	SUR	Amorces oligonucléotidiques
W127A	<i>SacII</i>	5'-G <u>GCG</u> GAA GAG GAT CCC TTG GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC CAA GGG ATC CTC TTC <u>GCG</u> C-3'
D130A	<i>SacII</i>	5'-G TGG GAA GAG <u>GCG</u> CCC TTG GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC CAA GGG <u>GCG</u> CTC TTC CCA C-3'
P131A	<i>SacII</i>	5'-G TGG GAA GAG GAT <u>GCG</u> TTG GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC CAA <u>GCG</u> ATC CTC TTC CCA C-3'
L132A	<i>SacII</i>	5'-G TGG GAA GAG GAT CCC <u>GCG</u> GCT GGT ATA ATT CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG AAT TAT ACC AGC <u>GCG</u> GGG ATC CTC TTC CCA C-3'
I136A	<i>SacII</i>	5'-G TGG GAA GAG GAT CCC TTG GCT GGT ATA <u>GCG</u> CCG CGG ACC CTT CAT CAA ATT TT-3' 5'-C GAA AAT TTG ATG AAG GGT CCG CGG <u>GCG</u> TAT ACC AGC CAA GGG ATC CTC TTC CCA C-3'
V210A	<i>BsiWI</i>	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA <u>GCG</u> TAT CAA ATT TTA GAA AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT TTC TAA AAT TTG ATA <u>GCG</u> TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
Y211A	<i>BsiWI</i>	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC <u>GCG</u> CAA ATT TTA GAA AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT TTC TAA AAT TTG <u>GCG</u> GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
L214A	<i>BsiWI</i>	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC TAT CAA ATT <u>GCG</u> GAA AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT <u>GCG</u> AAT TTG ATA GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
E215A	<i>BsiWI</i>	5'-AA GAA ATT ACA GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC TAT CAA ATT TTA <u>GCG</u> AAG GGG GCA GCA AAA CGT ACG AC-3' 5'-GGC CGT CGT ACG TTT TGC TGC CCC CTT <u>GCG</u> TAA AAT TTG ATA GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC TGT AAT T-3'
R221A	<i>BsrWI</i>	5'-AA GAA ATT ACT GTA CAC AAC AAG GAT GAA GTC TAT CAA ATT TTA GAA AAG GGG GCA GCA AAA <u>GCG</u> ACA AC-3' 5'-GGC CGT TGT <u>GCG</u> TTT TGC TGC CCC CTT TTC TAA AAT TTG ATA GAC TTC ATC CTT GTT GTG TAC AGT AAT T-3'
NcKHC ₁₀₁₋₁₂₁	/	5' G ATA GAT GAC CCT GAT GGC AGA GGT GTT ATT CCA AGA ATC GTC GAG CAA ATC TT 3' 5' C GAA GAT TTG CTC GAC GAT TCT TGG AAT AAC ACC TCT GCC ATC AGG GTC ATC TAT C 3'
NcKHC ₁₇₅₋₁₈₈	/	5' AA GAA ATC TAC GTC TCG AGC GTC CAG GAA GTA TAC GAA GTC ATG GCG AAG GGG GCA GCA AAA AGG ACA AC 3' 5' GGC CGT TGT CCT TTT TGC TGC CCC CTT GCG CAT GAC TTC GTA TAC TTC CTG GAC GCT CGA GAC GTA GAT T 3'

Les inserts sont reçus lyophilisés et sous forme monocaténaire. Ces derniers sont réhydratés dans de l'eau distillée stérile ; la concentration finale de chaque brin est de 100 pmol/μL. Les inserts bicaténaires sont reconstitués dans un volume de 10 μL, à une concentration de 5 pmole/μL :

- 5 μL de brin monocaténaire 1 (10 pmol/μL dans de l'eau distillée stérile)
- 5 μL de brin monocaténaire 2 (10 pmol/μL dans de l'eau distillée stérile)

La solution est incubée pendant 5 min à 65°C (élimination des éventuelles structures en « épingle à cheveux » présentes au niveau des brins monocaténaires), puis 15 min à température ambiante pour permettre l'hybridation. Les étapes de ligation sont réalisées à l'aide du kit « Rapid DNA Ligation » (Roche).

Protocole:

- 1 µL de vecteur ouvert (X pmol/µL)
 - 1 µL d'insert bicaténaire reconstitué (5 pmol/µL)
 - 6 µL d'eau distillée stérile
 - 2 µL de tampon de dilution de l'ADN à 5X
- 10 MIN** D'INCUBATION A TEMPERATURE AMBIANTE.
- 10 µL de tampon de ligation à 2X
 - 1 µL de T4 DNA ligase (5 U/µL)

15 MIN D'INCUBATION A TEMPERATURE AMBIANTE.

Les vecteurs ainsi reconstitués sont immédiatement amplifiés en système procaryote afin de contrôler la présence des mutations ponctuelles ou de zone : (1) par digestion enzymatique puis migration sur gel d'agarose 1% et coloration au BET ; (2) par séquençage nucléotidique.

1.2) Transformation bactérienne et contrôle de sur-expression

Deux souches bactériennes d'*Escherichia coli* ont été utilisées pour les étapes de transformation : XL10 (NOVAGEN) pour les amplifications plasmidiques (contrôle de la stratégie de clonage par digestion enzymatique et séquençage) ; BL21(DE3)pLysS (NOVAGEN) pour la sur-expression des protéines recombinantes mutées. Le protocole de transformation est identique pour ces deux souches.

Protocole de transformation bactérienne:

- 20 à 25 µL de cellules super-compétentes
- 1 à 2 µL de vecteur (~ 1.2 pmole/mL)

Mélange par agitation ménagée – Incubation **45 min** dans la glace

Puis incubation **45 s à 42°C** exactement suivie de **2 min** dans la glace

- Ajout de 100 µL de milieu LB préchauffé à 42°C

Incubation **1 h à 37°C** sous agitation (180 à 220 rpm)

Au terme de l'incubation, la totalité des échantillons sont déposés et étalés sur géloses LB supplémentées à 0.05 mg/mL en Kanamycine – Incubation 1 nuit à 37°C. Les clones positifs obtenus en XL10 sont remis en culture le lendemain afin de réaliser les MiniPrep ou les MidiPrep. Dans le cas des MiniPrep, les colonies sélectionnées sont mises en culture dans 3 à

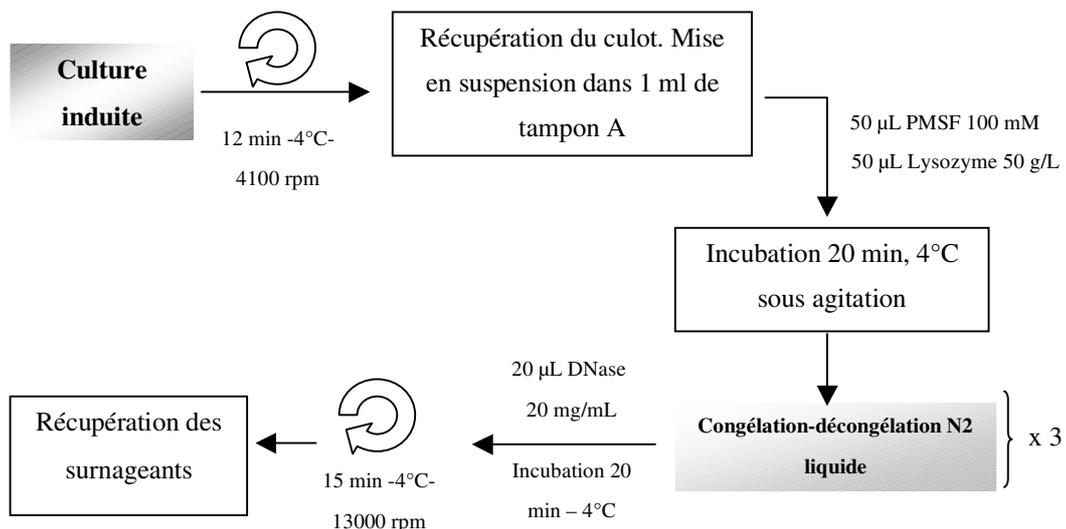
5 mL de milieu LB supplémenté à 0.05 mg/mL de Kanamycine. Pour les MidiPrep, la culture est réalisée dans 100 à 150 mL de LB supplémenté à 0.05 mg/mL de Kanamycine. L'incubation est réalisée une nuit à 37°C sous agitation (entre 180 et 220 rpm). Les MiniPrep sont réalisés avec le kit QIAprep® 96 Turbo (QIAGEN) ; les MidiPrep avec le kit HiSpeed Plasmid MidiPrep (QIAGEN).

Contrôle de sur-expression en cellules BL21(DE3)pLysS.

Les essais de sur-expression sont réalisés sur 4 à 8 clones positifs sélectionnés après transformation bactérienne. Ces clones sont remis en culture dans 4 mL de milieu LB supplémenté à 0.05 mg/mL en Kanamycine à 37°C sous agitation jusqu'à une $Do_{\lambda=600\text{ nm}} \cdot 1.0$ (culture en phase exponentielle de croissance). A ce moment :

1. 150 µL de chaque culture sont prélevés, mélangés immédiatement avec 150 µL de glycérol stérile et congelé dans de l'azote liquide. Ce « souchier » d'expression est conservé à -80°C.
2. la sur-expression est induite par ajout d'IPTG, concentration finale 0.5 mM. L'induction est menée pendant 12 à 16 h, sous agitation et température ambiante.

Le contrôle de la sur-expression et de la solubilité des protéines recombinantes est réalisé par WesternBlot sur membrane de nitrocellulose. Le protocole de lyse cellulaire est le suivant :



Tampon A : 20 mM PIPES, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA.

PMSF : Phenylmethylsulfonylfluoride.

10 à 15 µL de chaque surnageant est déposé sur gel SDS-PAGE 12%. Après migration (150 Volts, 35 mA), le transfert est réalisé sur membrane de nitrocellulose pendant 1 h 30 à 200

Volts – 400 mA dans la glace. Les membranes sont saturées une nuit à 4°C sous agitation à l'aide de tampon TBS (Tris Buffer Saline) contenant au minimum 3% de protéines de lait. La révélation des membranes se fait grâce à des anticorps anti HisTag couplés à la peroxydase de Raifort (dilution au 1/1000 dans du TBS-Tween 20) et au kit Sigma Fast 3,3' Diaminobenzidine Tablet Sets (DAB peroxydase substrate). La réaction est stoppée par passage des membranes sous l'eau distillée et la coloration est fixée (incubation 5 min sous agitation douce) à l'aide d'une solution de TCA à 10% dans de l'eau distillée.

1.3) Purification des protéines recombinantes

Les pré-cultures sont réalisées dans 150 mL de milieu LB supplémenté à 0.05 mg/mL en Kanamycine à partir des souchiers d'expression (volume de l'inoculum = 300 µL). Les bactéries sont incubées une nuit sous agitation à 37°C. La culture principale se fait dans 3 litres de milieu LB (ou YT) supplémenté à 0.05 mg/mL en Kanamycine à partir de la pré-culture (ensemencement de 1%). Lorsque la $Do_{\lambda=600\text{ nm}} \cdot 1.0$, la sur-expression des protéines recombinantes est réalisée par ajout d'ITPG (concentration finale de 0.5 mM). L'induction est menée à température ambiante, sous agitation (250 rpm), pendant 12 à 16 h. Les bactéries sont centrifugées 10 à 15 min, 6000 rpm, 4°C et les culots bactériens sont repris dans 25 mL de tampon A (20 mM PIPES, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) contenant 2.5 mM de PMSF. Les bactéries en suspension sont fragilisées par action de lysozyme (concentration finale 2.5 mg/mL) pendant 40 min, à 4°C sous agitation douce puis soumises à un choc thermique par 3 cycles successifs de congélation à l'azote liquide, décongélation sous eau tiède. Les protéines recombinantes sont stabilisées par ajout d'ATP (~1 mM) et de MgCl₂ (~7.5 mM). L'ADN bactérien est éliminé par action de la DNase (0.04 mg/mL en final) pendant 40 min sous agitation douce à 4°C. Les milieux sont ensuite mis à centrifuger pendant ~30 min, 4°C, 18000 rpm.

La purification est réalisée à 4°C sur une chaîne FPLC ÄKTA équipée d'un système de collection de type Frac-950 (Amersham Bioscience). Le surnageant est chargé sur une colonne de Nickel agarose de 1 mL, haute capacité (HisTrap, Amersham Pharmacia Biotech), préalablement équilibrée avec du tampon A. Les protéines recombinantes sont éluées à l'aide d'un gradient linéaire d'imidazole, à un débit volumique de 1 mL/min. Des fractions de 1 à 2 ml sont collectées. Celles contenant les protéines recombinantes sont analysées par SDS-PAGE sur un gel à 12 %, par séquençage N-terminal et par spectrométrie de masse. L'activité ATPasique basale de chaque protéine recombinante est également déterminée par dosage spectrophotométrique (test couplé). La concentration est déterminée par dosage colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976). Avant congélation dans l'azote liquide et

conservation à -80°C, chaque fraction protéique est stabilisée par ajout d'ATP, concentration finale de 0.5 mM. Les effets de chaque mutation sur la structure des protéines sont étudiés par H/D-MS.

II) Etudes enzymologiques

2.1) Mesure du $K_{m,ATP}$ par test Cytophos

Avant chaque mesure, les protéines sont passées sur colonne de gel filtration P6 (Micro Bio-Spin, Amersham Pharma Biotech) équilibrée en tampon A de manière à éliminer : (1) le phosphate inorganique (Pi) provenant de l'activité ATPasique basale résiduelle ; (2) les 0.5 mM d'ATP ajoutés à la fin de l'étape de purification pour stabiliser les protéines recombinantes. La concentration des protéines en sortie de colonne est à nouveau déterminée par dosage colorimétrique de Bradford. Le Pi généré pendant le cycle ATPasique basal est mesuré par test colorimétrique en utilisant le kit Cytophos (Cytoskeleton). Les essais sont réalisés dans du tampon A25A (25 mM ACES/KOH, pH 6.9, 2 mM d'acétate d'ammonium, 2 mM K-EGTA, 0.1 mM K-EDTA et 1 mM de β -mercaptoethanol) supplémenté avec 150 mM de NaCl et des concentrations variables en ATP (jusqu'à 300 μ M). La réaction est initiée par ajout des protéines recombinantes dans le tampon A25A (volume réactionnel final de 300 μ L). Les concentrations en protéine utilisées ont été optimisées pour chaque construction. Les réactions sont incubées à température ambiante ; chaque minute 30 μ L sont prélevés et mélangés à 70 μ L de réactif Cytophos afin d'estimer la quantité de Pi libérée. L'absorbance à 650 nm est mesurée après 10 min d'incubation à température ambiante. Pour chaque protéine, la constante d'affinité pour l'ATP ($K_{m,ATP}$) est déterminée en utilisant la représentation graphique de Lineweaver-Burk.

2.2) Dosage de l'activité ATPasique basale (avec et sans inhibiteurs)

2.2.1) Principe du dosage par test couplé avec régénération d'ATP

Ce dosage, avec recyclage d'ATP, a été mis au point par Hackney et Jiang (Hackney et Jiang, 2001). La pyruvate kinase (PK) assure la synthèse d'ATP à partir de l'ADP et Pi produits au cours du cycle ; le phosphoénol pyruvate (PEP) est quant à lui transformé en

pyruvate par la PK et sert alors de substrat à la lactate déshydrogénase (LDH). La LDH utilise le couple NADH,H+ / NAD+ comme coenzyme d'oxydo-réduction. Seule la forme réduite de ce coenzyme (forme NADH,H+) absorbe $\lambda = 340$ nm. On enregistre ainsi la décroissance de la Do au cours du temps (Figure 50).

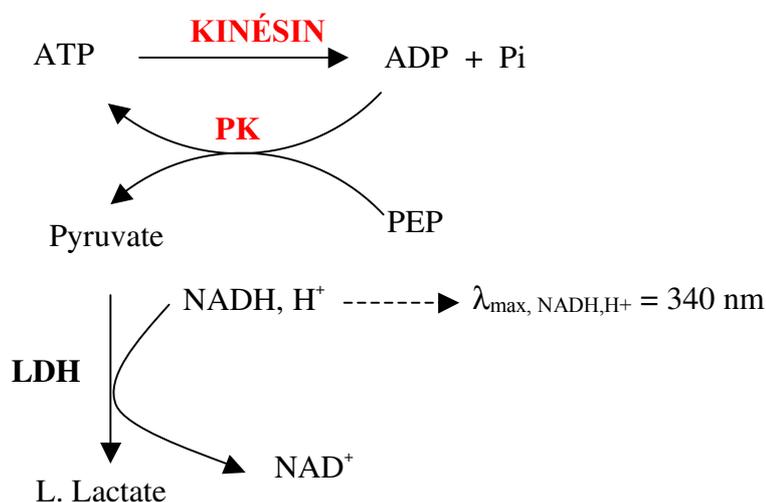


Figure 50 : Principe général du dosage de l'activité ATPasique basale des kinésines par test couplé avec régénération d'ATP (Hackney et Jiang, 2001).

Tampon réactionnel utilisé : 25 mM ACES/KOH, pH 6.9, 2 mM acétate d'ammonium, 2 mM K-EGTA, 0.1 mM K-EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol, x mM MgATP, x mM NaCl, 2 mM PEP, 0.25 mM NADH,H+, entre 3 et 10 μ g/mL de PK, \sim 3 μ g/ μ L de LDH.

2.2.2) Calcul de l'activité enzymatique et de l'IC₅₀

Tous les essais sont réalisés en plaques multi-puits soit de 100 μ L, soit de 200 μ L de volume final. Le trajet optique est identique dans les deux types de plaque. L'activité enzymatique (V en s^{-1}) est exprimée de la manière suivante :

$$V(s^{-1}) = - \frac{\Delta A / \text{min}}{\epsilon_{NADH,H^+} \cdot l \cdot 60 \cdot C_{\text{protéine}}} \times 2$$

avec ϵ_{NADH,H^+} le coefficient d'extinction molaire du NADH,H+ (6220 L/mol/cm), l la longueur du trajet optique en cm, $\Delta A/\text{min}$ la variation d'absorbance à 320 nm par minute et $C_{\text{protéine}}$ la concentration molaire de protéine utilisée au cours de l'essai. Le facteur multiplicatif 2 est un facteur correctif qui permet de considérer que le trajet optique dans les cuves des plaques

multi-puits est de 1 cm. Toutes les cinétiques sont réalisées sur un spectrophotomètre 96 puits Sunrise (TECAN, Maennedorf, Switzerland).

L'IC₅₀ correspond à la concentration en inhibiteur qui permet de réduire de 50% l'activité enzymatique. Les protéines sont incubées dans du tampon A25A supplémenté en ATP et NaCl contenant des concentrations croissantes de l'inhibiteur à tester. Les valeurs des IC₅₀ sont déterminées en utilisant l'équation de fixation suivante :

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^n}$$

avec v_i la vitesse mesurée en présence de différentes concentrations d'inhibiteur, v_0 la vitesse initiale en absence d'inhibiteur, $[I]$ la concentration en inhibiteur et n la stœchiométrie de fixation de l'inhibiteur (dans notre cas $n=1$).

2.3) Détermination des constantes d'inhibition (K_i)

2.3.1) Cas du monastrol

Les constantes d'inhibition pour le monastrol ($K_{i,MST}$) ont été déterminées par la représentation de Dixon (cas des inhibitions incompétitives) à concentration saturante en substrat (Segel, 1975) :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max} \times K_i} \times [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$$

$$[S] \gg K_m :$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max} \times K_i} \times [I] + \frac{1}{V_{max}}$$

avec v la vitesse initiale, V_{max} la vitesse maximale, K_m la constante de Michaelis-Menten, $[I]$ la concentration en inhibiteur et $[S]$ la concentration en substrat. La mesure de l'activité ATPasique basale est initiée en diluant 5 μ L d'enzyme dans 195 μ L de tampon A25A

supplémenté avec 150 mM de NaCl, 2 mM d'ATP (pour garantir l'excès de substrat) et des concentrations croissantes en monastrol (jusqu'à 200 µM). Les concentrations en protéines ont été optimisées pour chaque construction : 0.93 µM pour Eg5, 4.75 µM pour R119A et W127A, 0.41 µM pour D130A, 0.67 µM pour P131A, 0.87 µM pour L132A, 1.34 µM pour I136A, 6.22 µM pour V210A, 7.5 µM pour Y211A, 0.78 µM pour L214A, 0.57 µM pour E215A et 0.65 µM pour R221A. Toutes ces cinétiques sont réalisées à température ambiante avec une concentration finale en DMSO de 2.4% afin d'assurer une solubilité optimale de l'inhibiteur.

2.3.2) Cas du S-trityl-L-cystéine

Le STLC est un inhibiteur réversible à forte affinité ; dans ces conditions ce dernier ne suit pas les cinétiques classiques de type Michaelienne. La mesure de la constante d'inhibition apparente du STLC ($K_i^{app}_{STLC}$) est réalisée avec les mêmes concentrations en protéines que pour le monastrol. Pour chaque expérience, 6 concentrations différentes de chaque protéine ont été incubés à température ambiante pendant 20 min. 30 µL de chaque complexe pré- incubé est ensuite placé dans 170 µL de tampon A25A supplémenté avec 300 mM NaCl et 1 mM ATP. Les cinétiques sont suivies à 320 nm. La valeur de $K_i^{app}_{STLC}$ est estimée en utilisant l'équation suivante (Szedlacsek et Duggleby, 1995 ; Copeland, 2000) :

$$IC_{50} = K_i^{app}_{STLC} + \frac{[E_t]}{2}$$

avec $[E_t]$ la concentration en enzyme totale et IC_{50} la concentration en inhibiteur capable de réduire de 50% l'activité ATPasique basale de la kinésine. Dans notre cas, cette relation peut être utilisée pour tous les types de mécanismes car l'enzyme est pré-incubée avec l'inhibiteur de forte affinité. De ce fait, les valeurs d' IC_{50} observées sont indépendantes de la concentration en substrat et ce quelque soit le type d'inhibition (Cha, 1975).

Chapitre II

Spectrométrie de masse – Echange hydrogène/deutérium

Le TFA (acide trifluoroacétique), D₂O, DMSO (Dimethylsulfoxide) et la pepsine proviennent de Sigma-Aldrich ; l'acétonitrile (ACN) provient de SDS ; les colonnes chromatographiques en phase inverse de type C4 et C18 sont de Michrom et Interchrom, respectivement.

I) Protocole de digestion pepsique

Toutes les digestions sont réalisées à 0°C, dans un bain de glace fondante (conditions de ralentissement des échanges et ré-échanges isotopiques). Les solutions de pepsine sont préparées dans 0.1 M d'H₃PO₄, pH 1.6, et maintenue à 4°C avant utilisation. Les conditions optimales de digestion (temps d'incubation et rapport massique protéine/enzyme) sont déterminées au préalable sur gel SDS-PAGE à 16 % (VLMW : Very Low Molecular Weight). Toutes les digestions sont réalisées dans du tampon PIPES 1 mM, pH 2.2, 0°C, pendant 2 min avec un rapport massique protéine/pepsine = 1/1. Dans le cas du domaine moteur de la kinésine CENP-E, la digestion est menée pendant 2 min 15 s dans les mêmes conditions.

II) Réalisation des cartes peptidiques par expérience de fragmentation

Les cartes peptidiques des domaines moteurs des kinésines mitotiques Eg5 et CENP-E sont réalisées sur la trappe ionique ESQUIRE 3000+ (Bruker Daltonics).

2.1) Programmes HPLC et colonnes chromatographiques utilisées

Les fragments peptidiques sont chargés sur une colonne en phase inverse de type C18 (1 mm x 100 mm, granulométrie de 5µm, Phase INERSTIL ou KROMASIL) préalablement équilibrée avec 95 % de solvant A (eau distillée contenant 0.03 % de TFA) et 5 % de solvant B (ACN/H₂O (9/1 – v/v), 0.03 % TFA). Deux gradients HPLC linéaires sont réalisés :

- un gradient « court » : montée de 5 % à 50 % de solvant B en 25 min ;
- un gradient « long » : montée de 5% à 60 % de solvant B en 60 min.

Le débit pour les deux gradients est de 50 µL/min. Celui en entrée de source ESI est de 20 à 25 µL/min maximum.

2.2) Conditions d'acquisition et traitement des données

La tension du capillaire est fixée à 4000 V, celui de la contre électrode à 3500 V. La pression du gaz de nébulisation (N_2) est de 10 psi ; la température du gaz de séchage (N_2) est de 250°C et son débit de 8L/min. La pression en He au sein de la trappe ionique est maintenue à $\sim 4.10^{-6}$ mbar (soit $\sim 3.10^{-3}$ Torr). Deux programmes d'acquisition sont utilisés pour les expériences de fragmentation :

Programme 1 :

ICC (Ion Charge Control) = 10000 – Moyenne sur 15 spectres

« absolute threshold » = 50000 (mini = 5%)

Nombre de précurseurs sélectionnés par scan MS = 3

Amplitude de fragmentation = 2.0V (départ = 50% - fin = 150%)

Programme 2 :

ICC = 30000 – Moyenne sur 10 spectres « absolute threshold » = 50000 (mini = 5%)

Nombre de précurseurs sélectionnés par scan MS = 3

Amplitude de fragmentation = 1.3V (départ = 30% - fin = 200%)

Dichargés favorisés
ou non au cours de
l'analyse

Les spectres de masse sont analysés à l'aide des logiciels DataAnalysis 3.0 et Biotools 2.1.

III) Expériences de deutération

3.1) Préparation des complexes protéine/inhibiteurs

Tous les inhibiteurs sont fournis à une concentration de 50 mM dans 100 % DMSO. Ces derniers sont dilués dans du tampon PIPES 1 mM, pH 7.3 ; la concentration finale est fonction des rapports molaires à tester. Plusieurs rapports molaire protéine / inhibiteur sont testés : 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/13, 1/17 et 1/20. Chaque complexe est incubé une minute à température ambiante avant l'étape de deutération.

3.2) Cinétique de deutération sur protéine entière

Les cinétiques de deutération sur protéine entière sont réalisées sur deux spectromètres de masse : le triple quadripole API III+ (PE Sciex) et le Q-TOF micro (Waters). Conditions d'acquisition des spectres :

API III + : tension du capillaire = 5000 V ; contre électrode 650 V ; tension d'orifice 80 V.

Q-TOF : tension du capillaire = 3000 V ; Sample cone 30V ; Extraction cone 4V.

Les spectres sont analysés avec les logiciels Masspec 3.3 (pour l'API III+) et MassLynx 4.0 (Q-TOF).

Protocole pour Eg5 : 244 pmoles d'Eg5 en présence ou non d'inhibiteur sont diluées 25 fois dans du tampon PIPES 1 mM deutéré, pD 7.3 et incubées x minutes à 0°C. La réaction est « quenchée » par ajout d'une solution d'H₃PO₄ à 0.1 M maintenue à 0°C de manière à diminuer rapidement le pD de 7.3 à 2.2 afin de minimiser les ré-échanges lors de l'étape HPLC. Les échantillons sont chargés sur une colonne de phase inverse de type C4 (Protein MacroTrap, Michrom) et dessalés à l'aide d'une solution d'eau distillée supplémentée à 0.1 % en TFA. Tout le système chromatographique est maintenue dans un bain de glace fondante (à environ 0°C) afin de limiter au maximum les ré-échanges. L'élution est réalisée avec 60 % d'ACN/H₂O (9/1 : v/v), 0.1 % TFA à 200 µL/min. Le débit en source est de ~18 µL/min pour l'API III+ et 11 µL/min pour le Q-TOF. Le pourcentage de deutérium incorporé (D_q) est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$D_{\%} = \left[\frac{(m_{x\%} - m)}{(m_{100\%} - m)} \right] \times 100$$

avec m la masse de la protéine non-deutérée, m_{100%} la masse théorique de la protéine complètement deutérée (dans notre cas Eg5 peut au maximum incorporer 380 deutériums) et m_{x%} la masse de la protéine deutérée à l'instant t.

3.3) Expériences d'échange H/D sur les fragments peptidiques

~290 pmoles de chaque construction en présence ou absence d'inhibiteur sont diluées 50 fois dans du tampon PIPES deutéré 1mM, pD 7.3 maintenu à 0°C. La deutération est réalisée dans la glace pendant 5 min ; les échantillons sont « quenchés » et digérés simultanément par ajout de pepsine préparée dans 0.1 M H₃PO₄, pH 1.6. Après digestion, les fragments peptidiques deutérés sont rapidement concentrés et dessalés sur une colonne de phase inverse de type C4 (Peptide MacroTrap, Michrom) à un débit de 300 µL/min. Les fragments sont par la suite séparées sur une colonne en phase inverse de type C18 (1 mm x 100 mm, granulométrie de 5µm, phase INERSTIL ou KROMASIL) en utilisant un gradient linéaire passant de 5 % à 100 % de solvant ACN/H₂O (9/1 : v/v), 0.03% TFA en 35 min avec un débit volumique de 50 µL/min. L'ensemble du système HPLC est maintenu dans un bain

de glace fondante afin de limiter les ré-échanges. Le débit en source ESI est maintenu entre 18 et 22 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Références.

- *A* -

Abrieu, A., Kahana, J. A., Wood, K. W., and Cleveland, D. W. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* **102**, 817-826.

Akashi, S., and Takio, K. (2000). Characterization of the interface structure of enzyme-inhibitor complex by using hydrogen-deuterium exchange and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Protein Sci* **9**, 2497-2505.

Alberts, B.B., Lewis, D., Raff, J., Roberts, M., and Watson, K. (1994). *Molecular biology of the Cell*, 3rd ed. Garland.

Alfred, R. L., Londry, F. A., and March, R. E. (1993). Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 4. Theory of quadrupole excitation. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **125**, 171-185.

Altmann, K. H. (2001). Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 424-431.

Anand, G. S., Hughes, C. A., Jones, J. M., Taylor, S. S., and Komives, E. A. (2002). Amide H/2H exchange reveals communication between the cAMP and catalytic subunit-binding sites in the R(I)alpha subunit of protein kinase A. *J Mol Biol* **323**, 377-386.

Arnal, I., Sassoon, I., et Tournébiz, R. (2002). Dynamique du fuseau : vers une cible anti-cancéreuse. *Medecine / Sciences* **18**, 1227-1235.

- *B* -

Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86.

Bergnes, G., Brejc, K., and Belmont, L. (2005). Mitotic kinesins: prospects for antimetabolic drug discovery. *Curr Top Med Chem* **5**, 127-145.

Biemann, K. (1988). Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom* **16**, 99-111.

Blackburn, C. L., Hopmann, C., Sakowicz, R., Berdelis, M. S., Goldstein, L. S., and Faulkner, D. J. (1999). Adociasulfates 1-6, Inhibitors of Kinesin Motor Proteins from the Sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. *J Org Chem* **64**, 5565-5570.

Blades, A. T., Ikonomou, M. G., and Kebarle, P. (1991). Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Anal Chem* **63**, 2109-2114.

Blangy, A., Arnaud, L., and Nigg, E. A. (1997). Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150. *J Biol Chem* **272**, 19418-19424.

Blangy, A., Chaussepied, P., and Nigg, E. A. (1998). Rigor-type mutation in the kinesin-related protein HsEg5 changes its subcellular localization and induces microtubule bundling. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**, 174-182.

Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **83**, 1159-1169.

Bonner, R. F. (1977). Derivations of the field equations and stability parameters for three operating modes of the three-dimensional quadrupole. *Int J Mass Spectrom Ion Phys* **23**, 249-257.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brown, K. D., Wood, K. W., and Cleveland, D. W. (1996). The kinesin-like-protein CENP-E is kinetochore-associated throughout poleward chromosome segregation during anaphase-A. *J. Cell. Science* **109**, 961-969.

Burkhardt, C. A., Kavallaris, M., and Band Horwitz, S. (2001). The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta* **1471**, O1-9.

- C -

Case, R. B., Rice, S., Hart, C. L., Ly, B., and Vale, R. D. (2000). Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. *Curr Biol* **10**, 157-160.

Cavaletti, G., Cavalletti, E., Montaguti, P., Oggioni, N., De Negri, O., and Tredici, G. (1997). Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology* **18**, 137-145.

Ceccarelli, C., Liang, Z. X., Strickler, M., Prehna, G., Goldstein, B. M., Klinman, J. P., and Bahnson, B. J. (2004). Crystal structure and amide H/D exchange of binary complexes of alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into thermostability and cofactor binding. *Biochemistry* **43**, 5266-5277.

Cha, S. (1975) Tight-binding inhibitor – Kinetic behavior, *Biochem. Pharmacol.* **24**, 2177-2185.

Chan, G. K. T., Jablonski, S. A., Sudakin, V., Hittle, J. C., and Yen, T. J. (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cytoplasmic/APC. *J. Cell Biol.* **146**, 941-954.

Chan, G. K. T., Schaar, B. T., and Yen, T. J. (1998). Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J. Cell Biol.* **143**, 49-63.

Checchi, P. M., Nettles, J. H., Zhou, J., Snyder, J. P., and Joshi, H. C. (2003). Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 361-365.

Chen, W., and Zhang, D. (2004). Kinetochore fibre dynamics outside the context of the spindle during anaphase. *Nat Cell Biol* **6**, 227-231.

Cochran, J. C., Gatial, J. E., 3rd, Kapoor, T. M., and Gilbert, S. P. (2005). Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *J Biol Chem* **280**, 12658-12667.

Codreanu, S. G., Thompson, L. C., Hachey, D. L., Dirr, H. W., and Armstrong, R. N. (2005). Influence of the Dimer Interface on Glutathione Transferase Structure and Dynamics Revealed by Amide H/D Exchange Mass Spectrometry. *Biochemistry* **44**, 10605-10612.

Cole, D. G., Saxton, W. M., Sheehan, K. B., and Scholey, J. M. (1994). A "slow" homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. *J Biol Chem* **269**, 22913-22916.

Cole, R. B. (2000). Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **35**, 763-772.

Connelly, G. P., Bai, Y., Jeng, M. F., and Englander, S. W. (1993). Isotope effects in peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 87-92.

Copeland, R. A. (2000) *Enzymes 2nd ed. : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, pp 305-317, Wiley-VCH, New York.

Cox, C. D., Breslin, M. J., Mariano, B. J., Coleman, P. J., Buser, C. A., Walsh, E. S., Hamilton, K., Huber, H. E., Kohl, N. E., Torrent, M., et al. (2005). Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. Part 1: the discovery of 3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazoles as potent and selective inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 2041-2045.

Cravello, L., Lascoux, D., and Forest, E. (2003). Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 2387-2393.

Crevel, I. M., Alonso, M. C., and Cross, R. A. (2004). Monastrol stabilises an attached low-friction mode of Eg5. *Curr Biol* **14**, R411-412.

Crews, C. M., and Mohan, R. (2000). Small-molecule inhibitors of the cell cycle. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 47-53.

- **D** -

DeBonis, S., Simorre, J. P., Crevel, I., Lebeau, L., Skoufias, D. A., Blangy, A., Ebel, C., Gans, P., Cross, R., Hackney, D. D., et al. (2003). Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. *Biochemistry* **42**, 338-349.

DeBonis, S., Skoufias, D. A., Lebeau, L., Lopez, R., Robin, G., Margolis, R. L., Wade, R. H., and Kozielski, F. (2004). In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimitotic and antitumor activities. *Mol Cancer Ther* **3**, 1079-1090.

De Hoffman, E., Charette, J., and Stroobant, V. (1994). Spectrométrie de masse (Masson Ed.).

Deng, Y., and Smith, D. L. (1998). Identification of unfolding domains in large proteins by their unfolding rates. *Biochemistry* **37**, 6256-6262.

Deng, Y., and Smith, D. L. (1998). Identification of unfolding domains in large proteins by their folding rate. *Biochemistry* **37**, 6256-6262.

Dharmasiri, K., and Smith, D. L. (1996). Mass spectrometric determination of isotopic exchange rates of amide hydrogens located on the surfaces of proteins. *Anal Chem* **68**, 2340-2344.

Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., and Alice, M. B. (1968). Molecular beams of macroions. *J Chem Phys* **48**, 2240-2249.

Drummond, D. R., and Hagan, I. M. (1998). Mutations in the bimC box of Cut7 indicate divergence of regulation within the bimC family of kinesin related proteins. *J Cell Sci* **111** (Pt 7), 853-865.

- **E** -

Ehring, H. (1999). Hydrogen exchange/electrospray ionization mass spectrometry studies of structural features of proteins and protein/protein interactions. *Anal Biochem* **267**, 252-259.

Engen, J. R., and Smith, D. L. (2000). Investigating the higher order structure of proteins. Hydrogen exchange, proteolytic fragmentation, and mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **146**, 95-112.

Engen, J. R., Smithgall, T. E., Gmeiner, W. H., and Smith, D. L. (1997). Identification and localization of slow, natural, cooperative unfolding in the hematopoietic cell kinase SH3 domain by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry* **36**, 14384-14391.

Englander, S. W., and Kallenbach, N. R. (1984). Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Quarterly Review of Biophysics* **16**, 521-655.

Englander, J. J., Rogero, J. R., and Englander, S. W. (1985). Protein hydrogen exchange studied by the fragment separation method. *Anal Biochem* **147**, 234-244.

Eyles, S. J., Speir, J. P., Kruppa, G. H., Gierash, L. M., and Kaltashov, I. A. (2000). Protein conformational stability probe by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Am Chem Soc* **122**, 495-500.

- **F** -

Fenn, J. B. (1993). Ion formation from charged droplets : roles of geometry, energy and time. *J Am Soc Mass Spectrom* **4**, 524-535.

Finer, J. T., Bergnes, G., Feng, B., Smith, W. W., and Chabala, J. C. (2001). Methods and compositions utilizing quinazolinones. *PCT Int. Appl.* WO 01/030768: Cytokinetics, Inc.

Forbes, M. W., Sharifi, M., Croley, T., Lausevic, Z., and March, R. E. (1999). Simulation of ion trajectories in a quadrupole ion trap: a comparison of three simulation programs. *J Mass Spectrom* **34**, 1219-1239.

Franzen, J. (1993). The non-linear ion trap. Part 4. Mass selective instability scan with multipole superposition. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **125**, 165-170.

- **G** -

Gaglio, T., Saredi, A., Bingham, J. B., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Schroer, T. A., and Compton, D. A. (1996). Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *J Cell Biol* **135**, 399-414.

Garcia, R. A., Pantazatos, D., and Villarreal, F. J. (2004). Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for investigating protein-ligand interactions. *Assay Drug Dev Technol* **2**, 81-91.

Garcia-Saez, I., Yen, T., Wade, R. H., and Kozielski, F. (2004). Crystal structure of the motor domain of the human kinetochore protein CENP-E. *J Mol Biol* **354**, 1107-1116.

Gartner, M., Sunder-Plassmann, N., Seiler, J., Utz, M., Vernos, I., Surrey, T., and Giannis, A. (2005). Development and Biological Evaluation of Potent and Specific Inhibitors of Mitotic Kinesin Eg5. *Chembiochem* **6**, 1173-1177.

Gaskell, S. J. (1997). Electrospray : principles and practices. *J Mass Spectrom* **32**, 677-688.

Goldstein, L. S. (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol* **11**, 477-482.

Gordon, D. M., and Roof, D. M. (1999). The kinesin-related protein Kip1p of *Saccharomyces cerevisiae* is bipolar. *J Biol Chem* **274**, 28779-28786.

Grever, M. R., Schepartz, S. A., and Chabner, B. A. (1992). The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin Oncol* **19**, 622-638.

Guilhaus, M. (1995). Principles and instrumentation in Time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **30**, 1519-1532.

- **H** -

Hackney, D. D., and Jiang, W. (2001) Assays for kinesin microtubule-stimulated ATPase activity, *Methods Mol. Biol.* **164**, 65-71.

Haque, S. A., Hasaka, T. P., Brooks, A. D., Lobanov, P. V., and Baas, P. W. (2004). Monastrol, a prototype anti-cancer drug that inhibits a mitotic kinesin, induces rapid bursts of axonal outgrowth from cultured postmitotic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 10-16.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526.

Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 60-73.

Hotha, S., Yarrow, J. C., Yang, J. G., Garrett, S., Renduchintala, K. V., Mayer, T. U., and Kapoor, T. M. (2003). HR22C16: a potent small-molecule probe for the dynamics of cell division. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 2379-2382.

- *I* -

Iribarne, J. V., and Thomson, B. A. (1976). On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* **64**, 2287-2294.

- *J* -

Jaquinod, M., Guy, P., Halgand, F., Caffrey, M., Fitch, J., Cusanovich, M., and Forest, E. (1996). Stability study of *Rhodobacter capsulatus* ferrocytochrome c2 wild-type and site-directed mutants using hydrogen/deuterium exchange monitored by electrospray ionization mass spectrometry. *FEBS Lett* **380**, 44-48.

Jonscher, K. R., and Yates, J. R., 3rd (1997). The quadrupole ion trap mass spectrometer--a small solution to a big challenge. *Anal Biochem* **244**, 1-15.

- *K* -

Kaiser, R. E., Louris, J. N., Amy, J. W., and Cooks, R. G. (1989). Extending the mass range of the quadrupole ion trap using axial modulation. *Rapid Commun Mass Spectrom* **3**, 225-229.

Kapitein, L. C., Peterman, E. J., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M., and Schmidt, C. F. (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **435**, 114-118.

Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol* **150**, 975-988.

Kappe, C. O., Shishkin, O. V., Uray, G., and Verdinao, P. (2000). X-ray structure, conformational analysis, enantioseparation, and determination of absolute configuration of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol. *Tetrahedron* **56**, 1859-1862.

Kashina, A. S., Rogers, G. C., and Scholey, J. M. (1997). The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 257-271.

Katta, V., and Chait, B. T. (1991). Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **5**, 214-217.

Kebarle, P., and Tang, L. (1993). From ions in solution to ions in the gas phase, the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* **65**, 972A-986A.

Kikkawa, M., Sablin, E. P., Okada, Y., Yajima, H., Fletterick, R. J., and Hirokawa, N. (2001). Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* **411**, 439-445.

Knight, R. D. (1983). The general form of the quadrupole ion trap potential. *Int J Mass Spectrom Ion Phys* **51**, 127-131.

Krishna, R., and Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* **11**, 265-283.

- *L* -

Leizerman, I., Avunie-Masala, R., Elkabets, M., Fich, A., and Gheber, L. (2004). Differential effects of monastrol in two human cell lines. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2060-2070.

Londry, F. A., and Hager, J. W. (2003). Mass selective axial ion ejection from a linear quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**, 1130-1147.

Lord Rayleigh. (1882). *Philos Mag* **14**, 184-186.

Louris, J. N., Brodbelt-Lustig, J. S., Cooks, R. G., Glish, G. L., Van Berkel, G. J., and McLukey, S. A. (1990). Ion isolation and sequential stage of mass spectrometry in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **96**, 117-137.

Luo, L., Carson, J. D., Dhanak, D., Jackson, J. R., Huang, P. S., Lee, Y., Sakowicz, R., and Copeland, R. A. (2004). Mechanism of inhibition of human KSP by monastrol: insights from kinetic analysis and the effect of ionic strength on KSP inhibition. *Biochemistry* **43**, 15258-15266.

- *M* -

Mack, G., and Rattner, J. B. (1993). Centrosome repositioning immediately following karyokinesis and prior to cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton* **26**, 239-247.

Maliga, Z., Kapoor, T. M., and Mitchison, T. J. (2002). Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem Biol* **9**, 989-996.

Mandell, J. G., Falick, A. M., and Komives, E. A. (1998). Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14705-14710.

Marcus, A. I., Peters, U., Thomas, S. L., Garrett, S., Zelnak, A., Kapoor, T. M., and Giannakakou, P. (2005). Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells. *J Biol Chem* **280**, 11569-11577.

March, R. E. (1992). Ion trap mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **118/119**, 71-135.

March, R. E. (1997). An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **32**, 351-369.

March, R. E. (2000). Quadrupole ion trap mass spectrometer. *Encyclopedia of analytical chemistry* (Meyers R. A. Ed.), 11848-11872.

March, R. E., Londry, F. A., Alfred, R. L., Franklin, A. M., and Todd, J. F. J., (1992). Mass-selective isolation of ions stored in a quadrupole ion trap. A simulation study. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **112**, 247-271.

March, R. E., Londry, F. A., Alfred, R. L., Todd, J. F. J., Penman, A. D., Vedel, F., and Vedel, M. (1991). Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 3. Introduction to the field interpolation simulation method. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **110**, 159-178.

March, R. E., McMahon, A. W., Allinson, E. T., Londry, F. A., Alfred, R. L., Todd, J. F. J., and Vedel, F. (1990). Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 2. Further simulation studies. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **99**, 109-124.

March, R. E., McMahon, A. W., Londry, F. A., Alfred, R. L., Todd, J. F. J., and Vedel, F. (1989). Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 1. A simulation study. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **95**, 119-156.

March, R. E., Tkaczyk, M., Londry, F. A., and Alfred, R. L. (1993). Mass-selective isolation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 2. A simulation study of consecutive isolation. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **125**, 9-32.

Matagne, A., Jamin, M., Chung, E. W., Robinson, C. V., Radford, S. E., and Dobson, C. M. (2000). Thermal unfolding of an intermediate is associated with non-Arrhenius kinetics in the folding of hen lysozyme. *J Mol Biol* **297**, 193-210.

Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., and Mitchison, T. J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**, 971-974.

Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., and Vial, C. (2005). Denaturant sensitive regions in creatine kinase identified by hydrogen/deuterium exchange. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**, 1461-1468.

McLuckey, S. A., Van Berkel, G. J., Goeringer, D. E., and Glish, G. L. (1994). Ion trap mass spectrometry of externally generated ions. *Anal Chem* **66**, 689A-696A.

Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa regulation. *Oncologie* **5**, 311-326.

Merdes, A., and Cleveland, D. W. (1997). Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J Cell Biol* **138**, 953-956.

Miller, D. W., and Dill, K. A. (1995). A statistical mechanical model for hydrogen exchange in globular proteins. *Protein Sci* **4**, 1860-1873.

Miyamoto, D. T., Perlman, Z. E., Mitchison, T. J., and Shirasu-Hiza, M. (2003). Dynamics of the mitotic spindle--potential therapeutic targets. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 349-360.

Morrison, J. F. (1969) Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 269-289.

Mountain, V., Simerly, C., Howard, L., Ando, A., Schatten, G., and Compton, D. A. (1999). The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol* **147**, 351-366.

- \mathcal{N} -

Nakazawa, J., Yajima, J., Usui, T., Ueki, M., Takatsuki, A., Imoto, M., Toyoshima, Y. Y., and Osada, H. (2003). A novel action of terpendole E on the motor activity of mitotic Kinesin Eg5. *Chem Biol* **10**, 131-137.

Nappi, M., Weil, C., Cleven, C. D., Horn, L. A., Wollik, H., and Cooks, R. G. (1997). Visual representations of simulated three-dimensional ion trajectories in an ion trap mass spectrometer. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **161**, 77-85.

Nitta, R., Kikkawa, M., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2004). KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. *Science* **305**, 678-683.

- \mathcal{P} -

Paul, W., Steinwedel, H. (1960). Apparatus for separating charged particles of different specific charges. *German Patent 944,900; US Patent 2,939,952*.

Paull, K. D., Lin, C. M., Malspeis, L., and Hamel, E. (1992). Identification of novel antimetabolic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. *Cancer Res* **52**, 3892-3900.

Peterson, J. R., and Mitchison, T. J. (2002). Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem Biol* **9**, 1275-1285.

- \mathcal{R} -

Remigy, H., Jaquinod, M., Petillot, Y., Gagnon, J., Cheng, H., Xia, B., Markley, J. L., Hurley, J. K., Tollin, G., and Forest, E. (1997). Probing the influence of mutations on the stability of a ferredoxin by mass spectrometry. *J Protein Chem* **16**, 527-532.

Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601.

Rosa, J. J., and Richards, F. M. (1979). An experimental procedure for increasing the structural resolution of chemical hydrogen-exchange measurements on proteins: application to ribonuclease S peptide. *J Mol Biol* **133**, 399-416.

- \mathcal{S} -

Sakowicz, R., Berdelis, M. S., Ray, K., Blackburn, C. L., Hopmann, C., Faulkner, D. J., and Goldstein, L. S. (1998). A marine natural product inhibitor of kinesin motors. *Science* **280**, 292-295.

Sakowicz, R., Finer, J. T., Beraud, C., Crompton, A., Lewis, E., Fritsch, A., Lee, Y., Mak, J., Moody, R., Turincio, R., et al. (2004). Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Res* **64**, 3276-3280.

Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M., and Mitchison, T. J. (1992). Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* **359**, 540-543.

Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1995). Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4289-4293.

Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., and Mogilner, A. (2003). Cell division. *Nature* **422**, 746-752.

Segel, I. H. (1975) Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, pp 100-159, Wiley-Interscience publication.

Sharp, D. J., Brown, H. M., Kwon, M., Rogers, G. C., Holland, G., and Scholey, J. M. (2000). Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell* **11**, 241-253.

Sharp, D. J., Rogers, G. C., and Scholey, J. M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**, 41-47.

Skoufias, D. A., DeBonis, S., Lebeau, L., Hackney, D., Vrevel, I., Cross, R., Wade, R. H., and Kozielski, F. (2005) S-trityl-L-cysteine, a tight-binding inhibitor of the human kinesin motor Eg5, specifically blocks mitotic progression, *Submitted*.

Smith, D. L., Deng, Y., and Zhang, Z. (1997). Probing the non-covalent structure of proteins by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **32**, 135-146.

Snyder, J. P., Nettles, J. H., Cornett, B., Downing, K. H., and Nogales, E. (2001). The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5312-5316.

Song, Y. H., Marx, A., Muller, J., Woehlke, G., Schliwa, M., Krebs, A., Hoenger, A., and Mandelkow, E. (2001) Structure of a fast kinesin: implications for ATPase mechanism and interactions with microtubules, *EMBO J.* **20**, 6213-6225

Stafford, G., Jr. (2002). Ion trap mass spectrometry: a personal perspective. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**, 589-596.

Stafford, G., Jr., Kelley, P. E., Syka, J. E. P., Reynolds, W. E., and Todd, J. F. J. (1984). Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **60**, 85-98.

Striffe, R. J., and Keller, P. E. (1989). Ion trap ionisation mass spectrometry – RF/DC for isolating unique reactant ions. *OMS letters* **24**, 201-204.

Sunder-Plassmann, N., Sarli, V., Gartner, M., Utz, M., Seiler, J., Huemmer, S., Mayer, T.U., Surrey, T., and Giannis, A. (2005). Synthesis and biological evaluation of new tetrahydro- β -carbolines as inhibitors of the mitotic kinesin Eg5. *Bioorg. Med. Chem.* Article In press.

Szedlacsek, S. E., and Duggleby, R. G. (1995) Kinetics of slow and tight-binding inhibitors, *Methods Enzymol.* **249**, 144-180.

- *T* -

Tao, W., South, V. J., Zhang, Y., Davide, J. P., Farrell, L., Kohl, N. E., Sepp-Lorenzino, L., and Lobell, R. B. (2005). Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* **8**, 49-59.

Taylor, G. (1964). *Proc R Soc London A*: **A280**, 383.

Tsui, V., Garcia, C., Cavagnero, S., Siuzdak, G., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (1999). Quench-flow experiments combined with mass spectrometry show apomyoglobin folds through an obligatory intermediate. *Protein Sci* **8**, 45-49.

Turner, J., Anderson, R., Guo, J., Beraud, C., Fletterick, R., and Sakowicz, R. (2001). Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker. *J Biol Chem* **276**, 25496-25502.

- *W* -

Walczak, C. E., and Mitchison, T. J. (1996). Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation. *Cell* **85**, 943-946.

Walczak, C. E., Vernos, I., Mitchison, T. J., Karsenti, E., and Heald, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol* **8**, 903-913.

Wang, F., Blanchard, J. S., and Tang, X. J. (1997). Hydrogen exchange/electrospray ionization mass spectrometry studies of substrate and inhibitor binding and conformational changes of Escherichia coli dihydrodipicolinate reductase. *Biochemistry* **36**, 3755-3759.

Wang, F., Li, W., Emmett, M. R., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G., Zhang, Y. L., Wu, L., and Zhang, Z. Y. (1998a). Conformational and dynamic changes of Yersinia protein tyrosine phosphatase induced by ligand binding and active site mutation and revealed by H/D exchange and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Biochemistry* **37**, 15289-15299.

Wang, F., Scapin, G., Blanchard, J. S., and Angeletti, R. H. (1998b). Substrate binding and conformational changes of Clostridium glutamicum diaminopimelate dehydrogenase revealed by hydrogen/deuterium exchange and electrospray mass spectrometry. *Protein Sci* **7**, 293-299.

Wang, F., and Tang, X. (1996). Conformational heterogeneity of stability of apomyoglobin studied by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **35**, 4069-4078.

Waters, J. C., Cole, R. W., and Rieder, C. L. (1993). The force-producing mechanism for centrosome separation during spindle formation in vertebrates is intrinsic to each aster. *J Cell Biol* **122**, 361-372.

Weickhardt, C., Moritz, F., and Grotemeyer, J. (1996). Time-of-flight mass spectrometry : state of the art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev* **15**, 139-162.

Whitehead, C. M., and Rattner, J. B. (1998). Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle. *J Cell Sci* **111** (Pt 17), 2551-2561.

Whitehead, C. M., Winkfein, R. J., and Rattner, J. B. (1996). The relationship of HsEg5 and the actin cytoskeleton to centrosome separation. *Cell Motil Cytoskeleton* **35**, 298-308.

Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* **57**, 675-679.

Wiley, W. C., and McLaren, I. H. (1955). *Rev Sci Instrum* **26**, 1150.

Wittmann, T., Hyman, A., and Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol* **3**, E28-34.

Woehlke, G., Ruby, A. K., Hart, C. L., Ly, B., Hom-Booher, N., and Vale, R. D. (1997). Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* **90**, 207-216.

Wong, O. S. H., and Cooks, R. G. (1997). Ion trap mass spectrometry. *Bioanal Systems* **16**, 85-92.

Wood, K. W., Cornwell, W. D., and Jackson, J. R. (2001). Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 370-377.

Wood, K. W., Sakowicz, R., Goldstein, L. S. B., and Cleveland, D. W. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* **91**, 357-366.

Woodward, C., Simon, I., and Tuchsén, E. (1982). Hydrogen exchange and the dynamic structure of proteins. *Mol Cell Biochem* **48**, 135-160.

- Y -

Yamada, N., Suzuki, E., and Hirayama, K. (2002). Identification of the interface of a large protein-protein complex using H/D exchange and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**, 293-299.

Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* **88**, 4451-4459.

Yan, Y., Sardana, V., Xu, B., Homnick, C., Halczenko, W., Buser, C. A., Schaber, M., Hartman, G. D., Huber, H. E., and Kuo, L. C. (2004). Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences. *J Mol Biol* **335**, 547-554.

Yang, J. T., Laymon, R. A., and Goldstein, L. S. (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* **56**, 879-889.

Yen, T., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C., and Cleveland, D. W. (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J.* **10**, 1245-1254.

Yen, T., Li, G., Schaar, B. T., Szilak, I., and Cleveland, D. W. (1992). CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature* **359**, 536-539.

Yoon, S. Y., Choi, J. E., Huh, J. W., Hwang, O., Lee, H. S., Hong, H. N., and Kim, D. (2005). Monastrol, a selective inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, induces a distinctive growth profile of dendrites and axons in primary cortical neuron cultures. *Cell Motil Cytoskeleton* **60**, 181-190.

- Z -

Zhang, Z., Post, C. B., and Smith, D. L. (1996). Amide hydrogen exchange determined by mass spectrometry: application to rabbit muscle aldolase. *Biochemistry* **35**, 779-791.

Zhang, Z., and Smith, D. L. (1993). Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci* **2**, 522-531.

Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Leveson, J. D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J. B., Abraham, R. T., and Jiang, W. (2005). Functional Analysis of Human Microtubule-based Motor Proteins, the Kinesins and Dyneins, in Mitosis/Cytokinesis Using RNA Interference. *Mol Biol Cell* **16**, 3187-3199.