

*Mots-clés : interactions biomoléculaires – développement de nouvelles méthodes analytiques*

## Proposition de sujet de thèse 2018

### Apport du couplage CE/ICP-MS dans l'étude des protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives touchent plus près de 50 millions de personnes dans le monde, sont en croissance constante avec le vieillissement de la population et les traitements disponibles sont pour l'instant uniquement à visée symptomatique. La bibliographie fournit cependant de nombreuses preuves de l'implication des métaux de transition dans ces maladies, notamment via leurs interactions avec des protéines intrinsèquement désordonnées, même si le rôle précis de ces métaux est encore incertain.

Dans ce contexte, le couplage entre l'électrophorèse capillaire (CE) et la spectrométrie de masse à ionisation par plasma (ICP/MS) est une technique particulièrement intéressante de par ses capacités à cribler des complexes protéine/métal et ce, à partir de petits volumes d'échantillons.

Nous avons précédemment montré l'intérêt de ce couplage dans l'étude des métalloprotéines ou de protéines présentant des affinités élevées pour les métaux (de l'ordre du nanomolaire). Il permet en effet la mise en évidence des complexes protéine/métal en milieu complexe ainsi que la formation d'espèces ternaires, impliquant plusieurs protéines ou une protéine et un anion synergique.

Cependant, pour des espèces de plus faible affinité et/ou labiles, la méthode actuelle se heurte à la problématique de la dissociation lors de la séparation, entraînant une distorsion de l'image réelle d'un échantillon. La cartographie des complexes protéine/métal reste donc encore un défi important d'un point de vue analytique.

Pour répondre à cette problématique, nous nous proposons d'axer notre étude sur différentes protéines interagissant avec le cuivre et impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives : métalloprotéines (e.g. superoxyde dismutase), protéines de transport (albumine, céruloplasmine) ou intrinsèquement désordonnées ( $\alpha$ -synucléine, A $\beta$  1-43). Ces protéines présentent des sites d'interaction avec ce métal très variables en termes d'affinités.

Pour la plupart de ces protéines, leur changement de conformation, et en particulier la formation de fibrilles induite par les métaux, semble être une cause avérée des différentes pathologies (Alzheimer, Parkinson, maladie de Charcot).

Il s'agira dans un premier temps d'élaborer une méthodologie CE-ICP/MS permettant la détermination des constantes d'affinité de ces protéines pour le cuivre et l'extraction de données cinétiques. Les résultats seront comparés à ceux obtenus sur des supports chromatographiques miniaturisés originaux développés au sein de l'équipe recherche et fonctionnalisés par des protéines, afin d'appréhender l'effet de l'immobilisation des protéines sur les interactions métal-protéine, ouvrant ainsi le champ d'application à des protéines difficilement solubles en milieu aqueux.

Dans un second temps, ces données physico-chimiques seront exploitées afin d'établir une répartition réelle des métaux dans les monomères et les fibrilles.

Les capacités de l'électrophorèse capillaire seront mises à profit dans la séparation des différents oligomères et fibrilles. De plus, les capacités de détection multi-élémentaire de l'ICP/MS permettront de s'intéresser au rôle combiné d'autres métaux dans ces maladies, zinc et fer en particulier.

**Contact:** Agnès Hagege ([agnes.hagege@isa-lyon.fr](mailto:agnes.hagege@isa-lyon.fr))

*Key words : biomolecular interactions– development of new analytical methods*

## PhD Research proposal 2018

Contribution of hyphenated CE / ICP-MS in the study of proteins involved in neurodegenerative diseases

Neurodegenerative diseases affect more than 50 million people worldwide and are growing steadily with the aging of the population. The treatments available are not curative but only symptomatic. The literature provides a large evidence for the involvement of transition metals in these diseases, particularly through their interaction with intrinsically disordered proteins, but the precise role of these metals is still uncertain.

In this context, the coupling between capillary electrophoresis (CE) and inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP/MS) is particularly interesting because of its ability to screen protein / metal complexes from small sample volumes.

We have already shown the interest of this coupling in the study of metalloproteins or proteins with high affinities for metals (of the order of nanomolar). It allows the detection of relevant protein / metal complexes in complex media as well as the formation of ternary species, involving several proteins or a protein and a synergistic anion. However, for labile species, the current method still has to face the problem of dissociation during separation, leading to the distortion of the actual image of a sample. The screening of protein / metal complexes thus remains an important challenge.

To answer this question, we propose to focus our study on different proteins that interact with copper and are involved in several neurodegenerative diseases: metalloproteins (e.g. superoxide dismutase), transport proteins (albumin, ceruloplasmin) or intrinsically disordered ( $\alpha$ -synuclein, A $\beta$  1-43). These proteins have interaction sites with copper of very different affinity.

For most of these proteins, their conformational change, and in particular the formation of fibrils induced by metals, is likely a cause of various pathologies (Alzheimer's, Parkinson's, Charcot's disease).

We will first develop a new CE-ICP/MS based-methodology to determine the constants of affinity of these proteins for copper and extract kinetic data from the electropherograms. This method will be compared with the results obtained by affinity chromatography, on original miniaturized supports modified by proteins, in order to understand the effect of protein immobilization, thus opening the application field to proteins hardly soluble in an aqueous medium.

In a second step, these physicochemical data will be exploited in order to establish a real distribution of the metals between the monomers and fibrils.

The capabilities of capillary electrophoresis will be exploited in the separation of different oligomers and fibrils. In addition, the multi-element detection capabilities of the ICP / MS will explore the combined role of other metals in these diseases, particularly zinc and iron.

**Contact:** Agnès Hagege ([agnes.hagege@isa-lyon.fr](mailto:agnes.hagege@isa-lyon.fr))