

Étude du polymorphisme des métallothionéines par spectrométrie de masse à source Ion-spray

H. Chassaing et R. Lobinski

CNRS EP 132, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Helioparc, 2 avenue du Président Angot, 64 000 Pau, France

Ion-spray mass spectrometry (IS-MS) is shown to be an attractive technique to identify and to differentiate among the sub-isoforms of metallothioneins (MT). Different modes of application of IS-MS are discussed using the example of MT-2 rabbit liver prepurified by size-exclusion and anion-exchange chromatography. Direct IS-MS mode, microbore HPLC with on-line IS-MS detection of fully cadmiated (Cd_7 -MT isoforms), HPLC with post-column acidification and detection of the apo-MT isoforms by IS-MS, and with post-column acidification and detection of the Cd ion by IS-MS are discussed.

Les métallothionéines (MT) sont un groupe de protéines non enzymatiques de faibles poids moléculaires (6 – 7 Kda, environ 60 acides aminés non aromatiques) capables de fixer des quantités importantes de métaux via les liaisons cystéiniques. Elles se caractérisent par un fort taux de cystéines et l'absence de ponts disulfure, une forte résistance à la coagulation thermique et à la précipitation acide [1,2]. Les MT les plus largement étudiées sont celles issues des mammifères (isolées au niveau du foie, du rein et du cerveau) à cause de leur rôle dans le contrôle homéostatique, le métabolisme et la détoxification d'un certain nombre de métaux tant essentiels (Cu, Zn) que toxiques (Cd, Hg) [1,2].

Chez les mammifères, il a été montré que les MT existent sous différentes isoformes qui sont le produit du polymorphisme génétique caractéristique des gènes MT [3]. Ce polymorphisme se produit lors de l'évolution d'une espèce vivante et se traduit par une variation de la structure primaire des protéines par substitution d'un ou plusieurs acides aminés. Les isoformes présentant des différences mineures tel qu'un seul acide aminé sont des sous-groupes des isoformes majeures et sont appelées sous-isoformes [4]. Si la plupart des isoformes majeures ont pu être séquencées [5], l'absence de données concernant l'identité des sous-isoformes est due à la difficulté de séparation et d'identification de ces dernières.

À l'heure actuelle, la caractérisation du polymorphisme des MT par chromatographie en phase liquide (HPLC) est essentiellement basée sur les temps de rétention des espèces et sur l'intensité du signal d'absorption UV. Ces spéculations engendrent bien entendu des confusions voire des interprétations contradictoires, à cause de l'impossibilité de savoir réellement quelle espèce est détectée. De plus, pour des échantillons de MT de même origine, l'utilisation de techniques analytiques et de conditions opératoires apparemment

identiques ne conduit pas à des résultats similaires [6-8]. Les chromatogrammes obtenus diffèrent non seulement au niveau du profil mais aussi au niveau du nombre de pics observés.

La raison principale de ces observations semble être la présence de pics fantômes dans le chromatogramme. Ces derniers peuvent provenir des produits d'oxydation (dimères ou produits polymérisés), de différentes conformations ou de différentes compositions en métaux des MT (métalloformes). L'identification des métallothionéines éluées en HPLC est alors impossible sans avoir recours à des techniques fastidieuses (isolation et séquençage en ligne), à cause de la pureté insuffisante des étalons et de l'absence de données les concernant. L'électrophorèse capillaire de zone offre apparemment une meilleure résolution que l'HPLC (cf. G. Bordin, ce numéro) mais là encore, la détection spectrophotométrique ne permet pas une identification non ambiguë des formes séparées.

L'ionisation électrospray (et sa version assistée pneumatiquement appelée ion-spray) est une technique de désolvation-ionisation à pression atmosphérique actuellement en pleine expansion. Elle permet de générer des ions multichargés en phase gazeuse à partir de composés labiles de hauts poids moléculaires tels que les polypeptides. Ces ions multichargés peuvent être analysés par un spectromètre de masse à secteur quadripolaire. La corrélation entre le rapport m/z mesuré et l'état de charge (z) permet une détermination rapide et précise des masses moléculaires des protéines [9-11].

Cette étude illustre les potentiels de la technique IS-MS dans le cadre de la caractérisation du polymorphisme des métallothionéines. Il s'agit de déterminer le nombre de sous-isoformes potentiellement présentes dans la MT-2 du foie de lapin et de les caractériser en terme de masses moléculaires.

Analyse directe des MT par spectrométrie de masse à source Ion-spray (IS-MS)

Les conditions de pH acides sont responsables de la perte progressive des métaux, conduisant ainsi aux formes apo des métallothionéines (dépourvues de métaux). Des études ont montré que le cadmium était perdu à pH 2.0 (apo-MT). Dans la gamme de pH 3.0 – 5.0, les formes Cd_4 -MT sont présentes, tandis qu'au delà de pH 5.0, on a formation des complexes Cd_7 -MT [12]. Pour les valeurs de pH intermédiaires, des formes partiellement métallées (Cd_5 -MT, Cd_6 -MT) peuvent se former. Par conséquent, l'analyse directe des MT par IS-MS doit s'accompagner d'un contrôle précis du pH de la solution.

La figure 1 montre l'évolution du spectre IS-MS reconstruit de la métallothionéine MT-2 avec le pH (pour 3 valeurs de pH : 1.8, 4.0 et 6.0). On peut observer une perte de résolution et de sensibilité (diminution du rapport signal/bruit) lorsque le degré de métallation augmente. A pH 1.8, 5 sous-isoformes différentes de la forme apo-MT-2 sont observées, dont 4 ont été séquencées (MT-2a, MT-2b, MT-2c et MT-2d) [5]. A pH 4.0, les formes métallées Cd₄-MT-2 apparaissent, la forme MT-2d étant cependant noyée dans le bruit de fond. A pH 6.0, il n'est plus possible d'identifier les signaux individuels des sous-isoformes de MT-2. Dans le spectre reconstruit, une enveloppe assez large dans la gamme de masses 6800 – 7000 indique uniquement la présence du complexe Cd₇-MT-2.

L'analyse directe des MT par IS-MS avec contrôle de pH permet de déterminer le nombre d'atomes de Cd incorporés par molécule de MT. Les profils identiques des spectres des formes apo-MT-2 et Cd₄-MT-2 (correspondance entre les pics d'une même sous-isoforme dans les deux spectres séparés de 442.0 Da) confirme la présence de sous-isoformes et non d'artéfacts.

HPLC en phase inverse des formes Cd₇ – MT avec détection par IS-MS

L'analyse des MT par chromatographie en phase inverse en condition acide (par exemple avec 0.1% TFA) pose deux problèmes majeurs : la durée importante des chromatogrammes des formes apo (jusqu'à 120 min) [13] et la faible ionisation des espèces au niveau de la source Ion-spray, due à la présence du TFA. La métallation des MT diminue l'hydrophobicité des espèces chromatographiées, réduisant ainsi le temps d'analyse. L'équilibre de complexation du cadmium par les MT étant fortement dépendant du pH, le contrôle du pH de la phase mobile est primordial. Le choix de la solution tampon doit notamment assurer que la spéciation des complexes Cd_x-MT n'est pas altérée lors de leur passage sur la colonne chromatographique. Dans la gamme de pH 3.0 – 5.5, aucune condition d'élué de la forme Cd₄-MT pure (non accompagnée d'autres complexes Cd_x-MT) n'a pu être trouvée, tandis que le complexe Cd₄-MT-2 est observé en analyse directe. Par conséquent, le pH a été choisi tel qu'il assure la présence des isoformes sous formes de complexes Cd₇-MT. Un pH plus élevé n'améliore pas la qualité de la séparation et entraîne d'autre part une dégradation des conditions d'ionisation dans la source et donc une perte importante de sensibilité.

Un chromatogramme de MT-2 obtenu à pH 6.0 en chromatographie microbore est présenté en figure 2. Ce chromatogramme comprend deux pics majeurs 1 et 2, précédés par trois pics mineurs. Les spectres de masse pris au maximum des pics 1 et 2 permettent une détermination précise des masses moléculaires des espèces éluées (Fig. 3a). Ces spectres sont relativement complexes et présentent des profils différents pour chacun des pics 1 et 2, d'où la difficulté d'interprétation à ce niveau d'étude. Seules les masses des formes Cd₇-MT-2 (MT-2a, MT-2b et MT-2c) sont facilement identifiables.

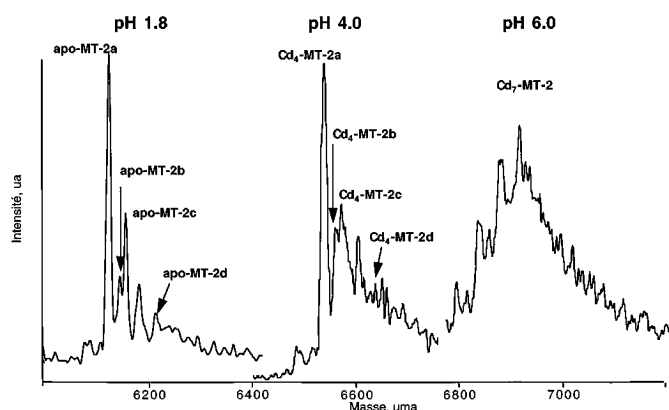


Figure 1. Evolution du spectre de masse IS-MS de la métallothionéine MT-2 du foie de lapin en fonction du pH. Analyse directe de solutions de MT-2 à 100 µg mL⁻¹ à pH 1.8 (25 mmol L⁻¹ HCl 0.1M dans CH₃OH/H₂O, 30/70), pH 4.0 (5 mmol L⁻¹ de tampon acétate d'ammonium dans CH₃OH/H₂O, 30/70) et pH 6.0 (5 mmol L⁻¹ de tampon acétate d'ammonium dans CH₃OH/H₂O, 30/70).

HPLC en phase inverse des formes Cd₇-MT avec acidification post-colonne et détection des formes apo-MT par IS-MS

L'analyse des formes Cd₇-MT offre un double avantage. La durée d'analyse est considérablement réduite (environ 50 min) comparée à la séparation des formes apo-MT. Elle permet d'autre part l'obtention d'une bonne résolution des différentes sous-isoformes et la détermination des masses moléculaires des complexes Cd₇-MT, qui par soustraction de la contribution en masse du Cd, permet l'attribution d'un pic à une forme apo-MT.

L'analyse à pH 6.0 présente cependant des inconvénients. On observe une perte considérable en sensibilité à cause des conditions d'ionisation médiocres au niveau de la source Ion-spray. De plus la complexation du Cd peut ne pas être un simple échange de protons (échange de 14 H⁺ pour

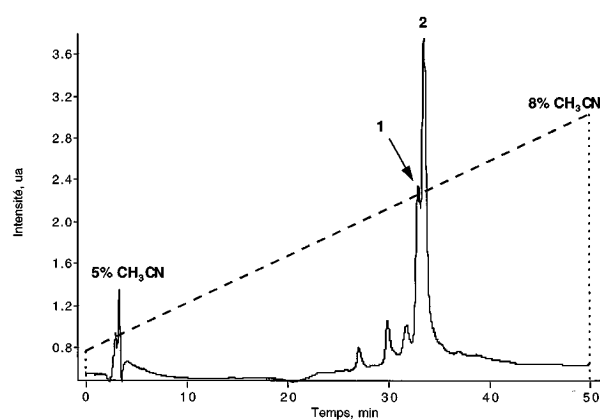


Figure 2. Chromatogramme de la métallothionéine MT-2 obtenu en HPLC en phase inverse avec détection IS-MS. Milieu tampon acétate d'ammonium 5 mmol L⁻¹ pH 6.0. Colonne: Vydac C₈ 15 cm × 1 mm × 5 µm. Injection: 1 µg MT-2. Gradient: 0 – 50 min: 5 – 8% CH₃CN.

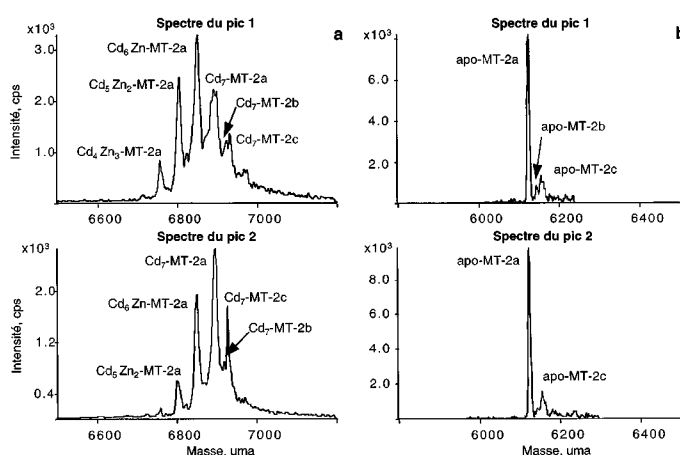


Figure 3. Spectres de masse IS-MS pris au maximum des pics 1 et 2 du chromatogramme de MT-2 (cf. Fig. 2) a) sans acidification post-colonne, b) avec acidification post-colonne (avec HCOOH/CH₃OH, 30/70, soit un pH final de 1.9).

former Cd₇-MT), d'où le problème de l'attribution d'un pic à une forme apo-MT. Enfin, les espèces détectées à ce pH peuvent contenir d'autres métaux que le cadmium (principalement Cu et Zn), le calcul de la stoechiométrie des métaux pouvant n'être qu'une simple spéculation.

Une nouvelle approche permettant de résoudre ces différents problèmes peut être l'acidification post-colonne des espèces séparées en chromatographie. L'acidification permet de couper les liaisons avec les métaux (Cd et Zn) et de mesurer le signal IS-MS des formes apo-MT, d'où une analyse plus sensible.

Le chromatogramme de MT-2 obtenu après acidification est identique à celui obtenu à pH 6.0 (cf. Fig. 2). Les spectres de masse pris au maximum des pics 1 et 2 sont ici caractéristiques des formes apo-MT-2 (MT-2a, MT-2b et MT-2c) (Fig. 3b). Les spectres sont considérablement simplifiés par rapport à ceux des formes métallées. Les spectres étant quasiment identiques pour les pics 1 et 2 (excepté l'abondance de MT-2b), on peut en déduire qu'il s'agit de différents complexes métalliques des 3 sous-isoformes MT-2a, MT-2b et MT-2c. Le pic 1 contient des formes mixtes Cd-Zn (Cd₄Zn₃, Cd₅Zn₂, Cd₆Zn) ainsi que les formes Cd₇. Le second pic correspond majoritairement aux complexes Cd₇-MT-2.

HPLC en phase inverse des formes Cd₇-MT avec acidification post-colonne et détection des ions métalliques par IS-MS

Récemment, Leblanc [14] a proposé une méthode d'acidification post-colonne pour couper les liaisons MT-métal et ainsi permettre la détermination des métaux associés par la technique IS-MS utilisée dans le mode élémentaire (SCID :

dissociation induite par collision dans la source). Cette technique offre la possibilité de détecter les métaux complexés par les MT sans avoir recours à l'analyse ICP-MS.

Cette technique est cependant limitée dans la mesure où, pour qu'un ion métallique soit détectable, le complexe doit au préalable être détruit. Cela limite donc son application à l'analyse de Cd et Zn, le cuivre étant plus fortement lié à la métallothionéine et donc non détectable.

Conclusion

Cette étude montre le potentiel considérable de l'IS-MS pour la caractérisation du polymorphisme des métallothionéines et des complexes qu'elles forment avec les métaux. En analyse directe par IS-MS, le contrôle précis du pH de la solution permet de valoriser la qualité et la quantité de l'information obtenue (étude des formes apo, Cd₄ et Cd₇). En ce qui concerne l'analyse chromatographique des formes Cd₇-MT, l'acidification post-colonne permet d'améliorer la sensibilité du signal dans le mode moléculaire et d'attribuer un pic à une forme apo-MT, tandis que le mode élémentaire permet la détermination du métal libéré lors de l'acidification.

Références

- Hayashi, Y.; Winge, D. R. in: *Metallothioneins. Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metalthiolate Complexes*, Stillman, M. J.; Shaw, C. F.; Suzuki, K. T. Eds., VCh, New York, 1992, Chap. 12.
- Stillman, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 461-511.
- Hamer, D. H. in: *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications, Molecular genetics of metallothioneins*, Suzuki, K. T.; Imura, N.; Kimura, M. Eds., Birkhauser, Boston, 1993.
- Suzuki, K. T. in: *Metallothioneins. Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metalthiolate Complexes*, Stillman, M. J.; Shaw, C. F.; Suzuki, K. T. Eds., VCh, New York, 1992, Chap. 2.
- Kägi, J. H. R. in: *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications, Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins*, Suzuki, K. T.; Imura, N.; Kimura, M. Eds., Birkhauser, Boston, 1993.
- Klauser, S.; Kägi, J. H. R.; Wilson, K. J. *Biochem. J.* **1983**, *209*, 71-80.
- Richards, M. P.; Steele, N. C. *J. Chromatogr.* **1987**, *402*, 243-256.
- Bordin, G.; Cordeiro Raposo, F.; Rodriguez, A. R. *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 1238-1245.
- Mann, M.; Meng, C. K.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1702.
- Smith, R. D.; Loo, J. A.; Edmonds, C. G.; Barinaga, C. J.; Udseth, H. R. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 882-889.
- Hofstadler, S. A.; Bakhtiar, R.; Smith, R. D. *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, A82-A89.
- Yu, X. L.; Wojciechowski, M.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1355-1359.
- Richard, M. P. *Meth. Enzym.* **1991**, *205*, 217-238.
- LeBlanc, J. C. Y. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, *12*, 525-530.