

## THESIS / THÈSE

### MASTER IN CHEMISTRY PROFESSIONAL FOCUS

Incorporation d'une protéine de transport au sein d'une membrane biomimétique pour la création de nouveaux biomatériaux

Vandevyver, Cyril

*Award date:*  
2022

*Awarding institution:*  
University of Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Université de Namur**

**Faculté des sciences**

Laboratoire de Chimie Physique des  
Biomolécules



**Incorporation d'une protéine de transport au  
sein d'une membrane biomimétique pour la  
création de nouveaux biomatériaux.**

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de Master Chimie « Chimie du Vivant » à finalité Spécialisée

Cyril Vandevyver

Août 2022



## *Table des matières*

# Table des matières

## *Propos liminaire*

<b>I. Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>II. Remerciements .....</b>	<b>ii</b>
<b>III. Liste des abréviations.....</b>	<b>iv</b>

## *Partie 1 - Introduction thématique*

<b>I. Biomatériaux.....</b>	<b>1</b>
<b>III.1 Contexte.....</b>	<b>1</b>
<b>III.2 Membranes cellulaires .....</b>	<b>2</b>
<b>III.3 Liposomes et protéoliposomes.....</b>	<b>3</b>
<b>III.4 Liposomes recouverts de polyélectrolytes .....</b>	<b>4</b>
<b>II. Protéines membranaires Généralités.....</b>	<b>7</b>
<b>II.1 Généralités .....</b>	<b>7</b>
<b>II.2 Surexpression et méthode de renaturation SDS-MPD .....</b>	<b>9</b>
<b>II.3 Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC).....</b>	<b>11</b>
<b>II.3.A Conformation ouverte et fermée des VDACS .....</b>	<b>12</b>
<b>II.3.B Liaison à l'ATP.....</b>	<b>12</b>

## *Partie 2 - Objectif et stratégies*

<b>I. Objectif et stratégies du mémoire .....</b>	<b>14</b>
---	-----------

## *Partie 3 - Résultats*

<b>I. Etude de la stVDAC36 .....</b>	<b>16</b>
<b>I.1 Surexpression et purification.....</b>	<b>16</b>
<b>I.1.A Principes .....</b>	<b>16</b>
<b>I.1.B Premiers résultats de surexpression et purification.....</b>	<b>17</b>
<b>I.1.C Optimisation de la concentration en IPTG .....</b>	<b>18</b>
<b>I.2 Renaturation de la stVDAC36 via la méthode SDS-MPD.....</b>	<b>20</b>
<b>I.2.A Principes .....</b>	<b>20</b>
<b>I.2.B Résultats de dichroïsme circulaire et fluorescence.....</b>	<b>20</b>
<b>I.3 Test de liaison ATP-stVDAC36.....</b>	<b>24</b>
<b>I.3.A Principe.....</b>	<b>24</b>
<b>I.3.B Résultats .....</b>	<b>25</b>

<b>II.</b>	<b><i>Etude des liposomes et protéoliposomes</i></b>	<b>29</b>
II.1	Préparation de liposomes	29
II.2	Préparation de protéoliposomes	29
II.2.A	Optimisation de la méthode de formation des protéoliposomes	30
II.3	Recouvrement de liposomes par des polyélectrolytes	32

*Partie 4 - Conclusions et perspectives*

<b>I.</b>	<b><i>Conclusions</i></b>	<b>34</b>
<b>II.</b>	<b><i>Perspectives</i></b>	<b>35</b>

*Partie 5 - Matériel et méthodes*

<b>I.</b>	<b><i>Surexpression de stVDAC36 dans E. coli</i></b>	<b>36</b>
<b>II.</b>	<b><i>Lyse chimique des culots bactériens</i></b>	<b>37</b>
II.1	Composition des solutions de lyse	37
II.2	Protocole de lyse chimique	37
<b>III.</b>	<b><i>Purification des culots bactériens</i></b>	<b>38</b>
III.1	Conditionnement de la colonne IMAC	38
III.2	Purification	39
III.3	Elimination de l'imidazole	39
<b>IV.</b>	<b><i>Electrophorèse SDS-PAGE</i></b>	<b>40</b>
IV.1	Préparation d'un gel SDS-PAGE	40
IV.2	Préparation des échantillons	41
IV.3	Electrophorèse	41
<b>V.</b>	<b><i>Renaturation de la stVDAC36</i></b>	<b>42</b>
V.1	Méthode SDS-MPD	42
V.2	Caractérisation par dichroïsme circulaire	42
V.3	Caractérisation par spectroscopie de fluorescence	43
<b>VI.</b>	<b><i>Test de liaison ATP-stVDAC36</i></b>	<b>43</b>
<b>VII.</b>	<b><i>Préparation de protéoliposomes</i></b>	<b>44</b>
VII.1	Préparation de liposomes	44
VII.2	Préparation de protéoliposomes	45

VII.3 Analyses par diffusion dynamique de la lumière ..... 46

VII.4 Analyses par mesures du potentiel zêta..... 46

VIII. Préparation de liposomes recouvert de polyélectrolytes ..... 46

*Partie 6 - Bibliographie*

I. Bibliographie ..... 47

## *Propos liminaire*



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

Secrétariat du Département de Chimie

Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR

Téléphone : +32(0)81 72.54.44 – Téléfax : +32(0)81 72.54.40

E-mail : enseignement.chimie@unamur.be - www.unamur.be/sciences

## **Incorporation d'une protéine de transport au sein d'une membrane biomimétique pour la création de nouveaux biomatériaux.**

### **I. Résumé**

Ces dernières années, la confection de protéoliposomes est devenue une thématique importante dans le cadre de la recherche sur de nouveaux biomatériaux. Un protéoliposome consiste en l'incorporation de protéines membranaires au sein de la membrane d'une vésicule phospholipidique appelée liposome. La bicouche phospholipidique de ce dernier en fait un outil idéal pour mimer l'environnement natif d'une protéine membranaire. À titre d'exemple, les liposomes sont aujourd'hui largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme vecteur médicamenteux pour le transport de petites molécules dans l'organisme.

L'objectif de ce travail consiste à produire des protéoliposomes recouverts de polyélectrolytes afin de concevoir un biomatériau efficace dans le transport spécifique de certaines biomolécules.

En effet, les liposomes présentent des problèmes de stabilité comme beaucoup de systèmes colloïdaux. Pour répondre à ce défi, une nouvelle méthode consiste à recouvrir des liposomes chargés en surface par une couche de polyélectrolytes, formant une barrière naturelle au solvant.

La protéine utilisée durant ce mémoire est la stVDAC36 (*solanum tuberosum voltage-dependent anion channel*). Il s'agit d'une protéine en tonneau- $\beta$  localisée dans la membrane externe des mitochondries, et qui permet le passage de différents solutés (allant d'ions à de petites biomolécules) à travers la membrane. La protéine a été surexprimée en bactéries, purifiée et renaturée grâce à la méthode SDS-MPD.

Mémoire de Master en Sciences Chimiques à Finalité Spécialisée

Août 2022

Promoteur : *Eric A. Perpète*

Co-Promoteur : *Catherine Michaux*

Author : *Cyril Vandevyver*

## II. Remerciements

*La rédaction de ce mémoire sonne comme l'aboutissement d'un chapitre important, celui de mon aventure universitaire. Tout au long de ces années, j'ai fait la rencontre de personnes m'ayant accompagné et ayant rendu ce voyage si particulier. Il est donc venu le temps de les en remercier.*

*Premièrement, je tiens à remercier mon promoteur, le Dr. Eric Perpète, et ma co-promotrice, le Dr. Catherine Michaux, pour l'accueil, la confiance et le dévouement dont ils ont fait preuve depuis mon arrivée au sein du laboratoire. Merci Catherine pour l'attention que tu portes à notre travail, l'investissement que tu mets dans notre réussite et l'accompagnement que tu nous offres, le tout avec beaucoup de bienveillance. Merci Eric pour tout ce que tu as fait pour moi. En arrivant au CPB, j'ai découvert un homme au grand cœur, pas avare de bons mots et ayant toujours la volonté de tirer le meilleur de ceux qui l'entourent. Tu n'as jamais hésité à me remettre sur le droit chemin et tu as toujours été de bon conseil. Ta rencontre m'a comblé et ton départ laisse un grand vide.*

*Je tiens également à remercier mes collègues du CPB. Virgile qui a pris de son temps pour me former à mon arrivée. Laurane avec qui j'ai partagé cette aventure en tant que mémorant et, par conséquent, de nombreuses heures au laboratoire. J'ai une pensée également pour les trois autres doctorants : Julien, Blinera et Laurelenn, cette dernière qui m'a été de précieux conseil aussi bien lors de mon mémoire que lors de mon stage. Merci également aux nouveaux mémorants, la nouvelle génération, qui m'ont gentiment accueilli dans leur bureau à mon retour de stage. Parce que cette année aurait été différente sans vous tous, je vous en remercie et j'espère continuer à passer de longues soirées de discussion avec vous au Chapitre.*

*Je remercie également l'Université de Namur, la Faculté des Sciences et le Département de Chimie pour la qualité de la formation qui m'a été donnée. Un département à taille humaine, qui a à cœur la réussite de ses élèves et qui a finalement réussi à faire de moi un chimiste.*

*Mes remerciements vont aussi à l'Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes (URBM) et au Pr. André Matagne du Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) de l'ULiège pour la mise à disposition de leur infrastructure respective dans le cadre de certaines manipulations et mesures.*

*Petite pensée à l'intention de mes amis les plus proches, qui au fil des années ont contribué à construire l'homme que je suis aujourd'hui. Lucas, Julien, Ugo, Simon, Maxence, Géraldine et Mathilde, j'ai la chance d'être bien accompagné et je vous en remercie.*

*Enfin, et plus que tout, je tiens à remercier mes proches, les familles Vandevyver-François-Wargé dans leur ensemble. Plus particulièrement ma mère pour le soutien sans faille et l'intérêt qu'elle a porté à mes études ; ce ne fut pas de tout repos mais on y arrive. Mon beau-père qui a fait naître en moi la soif de connaissances scientifiques, ce qui m'a amené jusqu'ici. Mes frères et grands-parents pour leur accompagnement, leur amour et leur soutien inconditionnel.*

Cyril Vandevyver

15 Aout 2022 Namur

### III. Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
$\bar{D}_h$	Diamètre hydrodynamique moyen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
His-Tag	Etiquette poly-histidine
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>
MLV	<i>Multilamellar vesicle</i>
MPD	2-méthyl-2,4-pentanediol
PLL	Poly-L-Lysine
POPC	1- palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>

*Partie 1 – Introduction thématique*

## I. Biomatériaux

### *I.1 Contexte*

Depuis plusieurs années, les scientifiques du monde entier montrent un intérêt croissant pour les biomatériaux. Faisant appel aussi bien à la biologie, à la physique qu'à la chimie, ce domaine de recherche est très vaste et n'a pas encore trouvé une définition complète. Cependant, les biomatériaux peuvent être définis comme des outils interagissant avec un système biologique afin d'évaluer, soigner ou remplacer une fonction naturelle.<sup>1</sup> Ils sont régulièrement utilisés dans le cadre médical où toutes les interactions avec le corps humain sont étudiées en profondeur. Cela peut aller de l'optimisation de la surface d'une prothèse à la création de nouveaux appareils médicaux ou d'excipients médicamenteux.<sup>2-4</sup>

Un excipient désigne tout élément autre que le principe actif dans un médicament. Il peut s'agir d'un vecteur, tel qu'une vésicule, permettant de délivrer la substance thérapeutique à l'endroit voulu dans le corps humain. Il existe deux principaux types de vésicules utilisés à cette fin : les virus modifiés et les vésicules synthétiques. L'utilisation de virus comme vecteur médicamenteux est un outil de choix pour les thérapies géniques. Le virus est modifié par génie génétique afin de retirer la nature infectieuse de son patrimoine, qui est ensuite remplacé par le gène d'intérêt thérapeutique. Seule la partie structurale du virus est alors conservée (la capside) lui permettant d'infecter une cellule hôte. Ce type de vecteur souffre d'inconvénients majeurs : i) leur production ainsi que leur manipulation sont compliquées et coûteuses, ii) leur utilisation *in vivo* peut entraîner une réaction immunitaire indésirable.<sup>5,6</sup>

Le second type de vésicules appelé « synthétique » a récemment été utilisé dans l'industrie pharmaceutique par Pfizer-BioNTech pour la réalisation de leur vaccin à ARNm contre le Covid-19.<sup>7,8</sup> Ce type de vésicules est divisé en deux grandes familles, les polymériques (polymersomes) et les lipidiques (liposomes) présentant chacun des avantages et inconvénients. L'utilisation de polymères amphiphiles permet par exemple, une épaisseur de membrane plus importante que

les vésicules lipidiques (de par leur longueurs de chaînes). Epaisseur valant entre 5 à 50 nm pour les polymersomes contre 3 à 5 nm pour les liposomes en fonctions des polymères et des lipides utilisés. Les vésicules polymériques assurent donc une plus faible perméabilité de membrane. *A contrario*, les vésicules lipidiques ont une composition et une organisation proches de celle des membranes cellulaires. Par conséquent, elles peuvent servir d'outil d'étude efficace pour les protéines membranaires.<sup>9,10</sup>

## I.2 Membranes cellulaires

Les membranes cellulaires se composent d'une bicouche lipidique au sein de laquelle sont insérées des protéines membranaires. Les lipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire composées d'un groupement hydrophile et d'un groupement hydrophobe. Trois grandes familles de lipides composent ces membranes : les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol.<sup>11</sup> Les phosphoglycérides (famille la plus importante des phospholipides) se composent d'un groupe glycérol lié à une tête polaire par une liaison phosphodiester et à une queue hydrophobe composée de deux acides gras par une liaison ester (Fig.1). Les glycolipides se composent d'un saccharide (mono ou oligosaccharide) relié par une liaison glycosidique à des acides gras. Par la présence du saccharide, les glycolipides sont impliqués dans une large gamme de fonctions biologique.<sup>12</sup> Enfin, le cholestérol est quant à lui un lipide de la famille des stérols, présent uniquement dans les membranes des cellules animales, permettant d'augmenter la fluidité membranaire.<sup>11,13</sup>

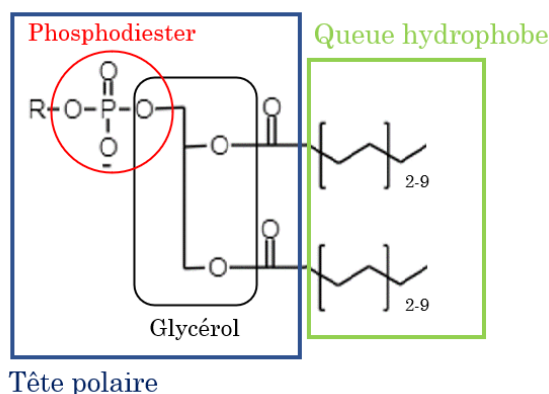


Figure 1 : Structure moléculaire d'un phosphoglycéride type.

Depuis 50 ans, le modèle de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicholson a servi de base pour décrire le comportement et la structure des membranes cellulaires.<sup>14</sup> La bicouche lipidique composant la membrane est fluide, c'est-à-dire que les lipides sont non liés entre eux et peuvent se mouvoir par translation ou par rotation au sein de l'une des deux couches. Le cholestérol peut quant à lui passer d'une couche à l'autre au sein de la bicouche par un mouvement appelé « *flip flop* » et se trouve en quantité équivalente entre les deux feuillets.<sup>15</sup> La composition en lipides dans chaque feuillet de la bicouche étant différente, il existe une asymétrie de membrane pouvant s'illustrer par des différences de propriétés physiques ou chimiques.<sup>16</sup>

### *1.3 Liposomes et protéoliposomes*

Les vésicules synthétiques créées en laboratoire peuvent prendre différentes formes en fonction des caractéristiques de la molécule amphiphile utilisée. En effet, en solution aqueuse, elles vont s'arranger entre elles de manière à minimiser l'énergie du système. Dans le cas des lipides, la structure va tendre à maximiser le nombre de ponts hydrogène entre les molécules d'eau et la tête polaire.<sup>17</sup> La structure globale de cet autoassemblage dépend de la géométrie du lipide et, suivant son paramètre d'empilement ( $P$ ), il est possible de prédire cette structure. Le paramètre d'empilement est formulé comme suit :

$$P = \frac{V}{al} \quad (1)$$

où  $V$  est le volume de la queue hydrophobe,  $l$  est la longueur de cette queue et  $a$  est la surface du plan de coupe transversale de la tête polaire. La Figure 2 illustre les paramètres d'empilement pour deux types de tensioactifs ainsi que la structure de l'autoassemblage qui leur est associée. Dans le cas des phosphoglycérides, le paramètre d'empilement est généralement compris entre 0.5 et 1 ce qui correspond à la formation d'une bicouche sous forme de vésicules lipidiques sphériques appelées liposomes.<sup>18</sup>



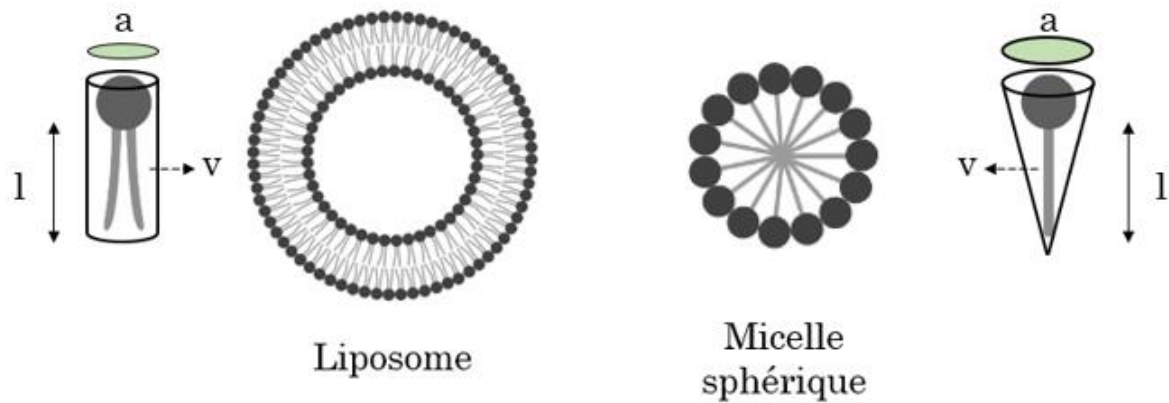


Figure 2 : Paramètres d'empilement et représentation de structures types.

Ces derniers peuvent avoir un diamètre allant de quelques nanomètres (nm) à quelques micromètres ( $\mu\text{m}$ ). On trouve ainsi les SUV (*small unilamellar vesicle*) avec un diamètre inférieur à 100 nm, les LUV (*large unilamellar vesicle*) avec un diamètre compris entre 100 nm et 1  $\mu\text{m}$ , les GUV (*giant unilamellar vesicle*) dont le diamètre est supérieur à 1  $\mu\text{m}$  et les MLV (*multilamellar vesicle*) possédant plusieurs bicouches lipidiques imbriquées. La taille d'un liposome en solution peut être affecté par un stress osmotique si les concentrations osmotiques sont différentes entre les phases internes et externes de la vésicule.<sup>19</sup>

Les liposomes permettent par leur structure d'encapsuler des composés hydrosolubles dans leur cavité interne. La membrane des liposomes étant proche des membranes cellulaires, il est également possible d'y intégrer des protéines membranaires afin de former des protéoliposomes.<sup>20-22</sup> Les protéines membranaires peuvent ainsi être étudiées dans un milieu proche de leur environnement natif. Ce genre de système permet d'adapter la fonction d'une protéine membranaire à la mise en œuvre d'un biomatériau applicable à différents domaines : la filtration de l'eau en utilisant une aquaporine ou le contrôle du transport ionique *via* la protéine transporteur de zinc ZAT1p, par exemple.<sup>23-25</sup>

#### ***1.4 Liposomes recouverts de polyélectrolytes***

Les liposomes présentent cependant certains inconvénients. Ils tendent notamment à s'agréger et précipiter avec le temps, et la membrane est perméable à certains solutés en raison de sa fluidité (cf. modèle de la mosaïque fluide).<sup>9,26</sup> Le

milieu au sein duquel se trouve le liposome peut également exercer une influence sur la stabilité de sa structure *via* deux mécanismes. Premièrement, les acides gras composant les lipides peuvent être oxydés par des espèces réactives de l'oxygène, ce qui entraîne la peroxydation des lipides. Cela a pour conséquence de mener à des modifications dans l'autoassemblage du liposome. Secondement, la liaison phosphodiester du lipide peut être rompue lors d'une hydrolyse, causant la séparation entre la tête polaire et la queue hydrophobe du lipide ce qui résulte en une déstabilisation de la membrane.<sup>9</sup>

Afin de pallier ces inconvénients, les liposomes peuvent être recouverts de couches de polyélectrolytes afin de les isoler du milieu externe.<sup>27</sup> Un polyélectrolyte est un polymère dont le monomère est un groupement chimique globalement chargé en fonction de son pKa et du pH de la solution. Par conséquent, en fonction de la nature des lipides composant le liposome (la tête polaire peut être globalement neutre, chargée positivement ou négativement) des polycations ou des polyanions peuvent être adsorbés à la surface du liposome afin de former la première couche. Une seconde couche de polyélectrolytes de charge opposée à la première peut ensuite être adsorbée à la nouvelle surface et ainsi de suite jusqu'à déposer le nombre de couches adéquat de polymère.<sup>28,29</sup> La structure d'un liposome recouvert de polyélectrolytes de charge opposée est schématisée à la Figure 3.

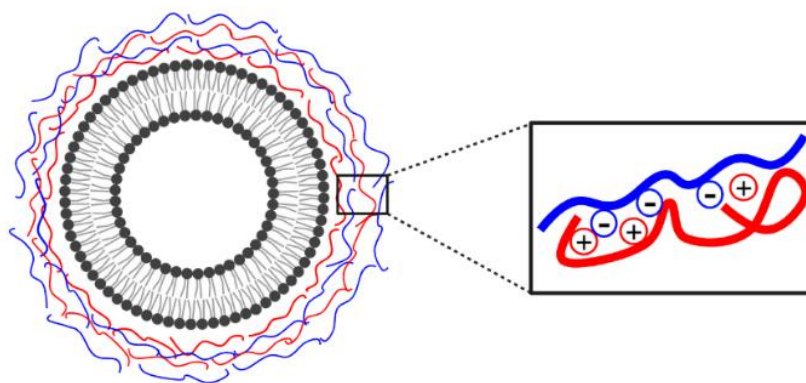


Figure 3 : Représentation d'un liposome recouvert de couches de polyélectrolytes chargés positivement et négativement.

Il est important de noter que la qualité du recouvrement du liposome peut dépendre de différents paramètres tels que la masse moléculaire du polymère, sa

concentration en solution ou encore le rapport de charge avec le liposome ; l'ensemble de ces paramètres pouvant entraîner un risque d'agrégation des vésicules.<sup>30,31</sup> La Figure 3 schématise la structure d'un liposome recouvert de polyélectrolytes de charge opposée. Ce type de système a déjà été réalisé expérimentalement et une meilleure perméabilité du systèmes a été confirmée dans le cadre du relargage de fluorophores.<sup>32,33</sup>

## II. Protéines membranaires Généralités

### *I.1 Généralités*

Les protéines sont des macromolécules présentes dans les organismes vivants. Elles se composent d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques, constituées d'un ensemble d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons covalentes dites peptidiques. Ces chaînes polypeptidiques possèdent à l'une de leurs extrémités un groupement carboxylique non lié (extrémité carboxy ou C-terminale) et à l'autre un groupement amine non lié (extrémité amino ou N-terminale). Il existe différents niveaux de structure protéique (Fig.4). La structure primaire correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés. L'arrangement conformationnel d'une partie de la chaîne polypeptidiques (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , ...) indique la structure secondaire. La structure tertiaire renvoie à l'organisation spatiale complète de la protéine. Dans le cas d'une protéine multimérique, l'organisation spatiale des différents monomères entre eux correspond à la structure quaternaire.<sup>34</sup>

La conformation d'une protéine définie par sa structure tertiaire (voire quaternaire) a une influence sur sa fonction. La conformation d'une protéine lui permettant d'assurer sa fonction au sein de la cellule est dite native. Cette conformation est obtenue lors de la synthèse de la protéine au sein du ribosome. Lorsqu'une protéine perd sa conformation native et n'est par conséquent plus capable d'assurer sa fonction, elle peut retrouver, au sein de la cellule, sa structure initiale grâce à des protéines appelées chaperonnes.

Les protéines peuvent être divisées en trois grandes catégories en fonction de leur structure tertiaire (et quaternaire) et de leur fonction. Il existe i) les protéines globulaires (enzymes, hormones, ...) généralement solubles en milieu aqueux, ii) les protéines fibreuses (kératine, collagène, ...) qui ont une fonction structurelle et sont insolubles en milieu aqueux, iii) et les protéines membranaires, qui se retrouvent au sein des membranes cellulaires de par leurs propriétés lipophiles.<sup>34</sup>

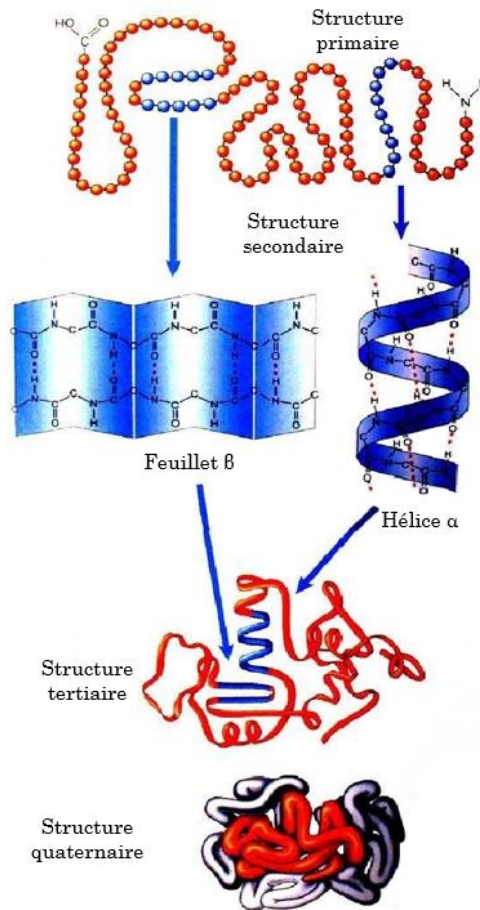


Figure 4 : Illustration des différents niveaux de structure protéique. (adapté du Campbell <sup>34</sup>)

Les protéines membranaires correspondent à approximativement 30 % du protéome de *Escherichia coli* (*E.coli*).<sup>35</sup> On distingue deux types de protéines membranaires : les périphériques et les transmembranaires. Les protéines périphériques ne sont liées que partiellement à la membrane biologique au contraire des protéines transmembranaires qui la traversant entièrement. Ces dernières possèdent une structure tertiaire sous forme d'hélices- $\alpha$  ou sous forme de tonneau- $\beta$  (par exemples, respectivement l'aquaporine Z et les canaux sodiques voltage dépendants). Ces structures tertiaires particulières permettent d'isoler les acides aminés polaires de l'environnement lipidique de la membrane. Les protéines transmembranaires peuvent avoir différentes fonctions, allant du transport de solutés au travers des membranes cellulaires (porines, canaux ioniques,...) jusqu'au rôle de récepteurs transmembranaires (comme les récepteurs couplés aux protéines G).<sup>36,37</sup>

## *I.2 Surexpression et méthode de renaturation SDS-MPD*

Lorsque l'on cherche à étudier *in vitro* les protéines, il est généralement admis que la quantité de protéine d'intérêt dans les cellules est insuffisante pour permettre de réaliser des études biochimiques ou structurales. Il est dès lors nécessaire de passer par une étape de surexpression de la protéine pour l'obtenir en plus grandes quantités. Le génie génétique permet l'incorporation d'un vecteur plasmidique codant pour une protéine au sein d'une cellule hôte. Différents supports peuvent être utilisés tels que des levures, des champignons, des cellules animales ou encore des bactéries.<sup>38</sup> Les bactéries, et plus particulièrement *E. coli*, sont les supports les plus répandus au sein desquels des méthodes d'expression de gène recombinant ont été développées. En effet, *E. coli* présente de nombreux avantages : une croissance et une densité de culture élevées, un rendement protéique important ainsi qu'une expression de l'ADN relativement rapide.<sup>39</sup>

Les protéines membranaires se trouvent à l'état natif dans les membranes lipidiques de la cellule et ne sont pas solubles en solution aqueuse. Leur surexpression *in vitro* résulte généralement en la formation d'agrégats insolubles biologiquement inactifs appelés corps d'inclusion. Ces derniers peuvent être facilement isolés par centrifugation.<sup>40</sup> Bien que les protéines produites de cette manière-là soient protégées de la protéolyse et généralement en grande quantité, elles sont dénaturées et donc non fonctionnelles.

Afin de réaliser des études structurales et biochimiques sur la protéine membranaire surexprimée, il est donc nécessaire de lui restituer sa conformation native. Pour ce faire, il existe différentes méthodes de renaturation. La plus courante est la solubilisation des corps d'inclusion en présence d'une concentration importante en agent dénaturant (urée ou guanidinium), qui est ensuite diminuée petit à petit en même temps qu'un détergent est ajouté au milieu pour simuler l'environnement membranaire.<sup>41,42</sup> Il arrive cependant que les protéines s'agrègent lorsque la concentration en agent dénaturant diminue. Cette méthode peut donc demander un nombre d'essais important pour arriver à retrouver la conformation native de la protéine. Toutefois, ces méthodes ont essentiellement

fait leurs preuves pour les protéines globulaires et ne permettent pas assurément de retrouver la conformation native des protéines membranaires.<sup>43</sup>

Une technique associant un détergent anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS) et un cosolvant, le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD), permettant la renaturation efficace de protéines membranaires a été développée au sein du laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules (CPB).<sup>44</sup> En effet, il a été démontré que l'ajout de MPD à une solution protéique dénaturée dans du SDS induit un changement de conformation de la dite protéine lui permettant de retrouver sa forme native.<sup>44-46</sup> Cette méthode, dépendant des rapports de concentration entre le détergent et le cosolvant, a fait ses preuves pour différents types de protéines membranaires possédant différentes structures et propriétés. À titre d'exemple, des tonneaux- $\beta$  monomériques, tels que PagP et VDAC, ainsi que des oligomères tels que l'Omp2a ou l'hémolysine heptamérique, ont été renaturés correctement en utilisant la méthode SDS-MPD.<sup>41</sup> L'efficacité de cette dernière a également été démontrée par des analyses structurales sur des cristaux de lysozyme de blanc d'œuf renaturé. Il en ressort que la conformation native de la protéine est conservée.<sup>47</sup> De plus, l'avantage de cette méthode consiste également en sa compatibilité avec l'utilisation d'autres techniques d'analyse telles que le dichroïsme circulaire, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la fluorescence des acides aminés aromatiques.<sup>44,45</sup>

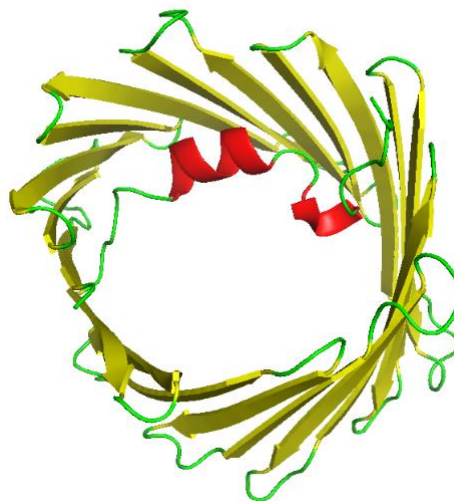
Le SDS est un agent dénaturant capable de solubiliser des protéines aussi bien à faible qu'à haute concentration, c'est-à-dire inférieure ou supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Les effets hydrophobes entre les chaînes alkyles du détergent et les acides aminés hydrophobes (glycine, alanine, valine, leucine et isoleucine) de la protéine permettent d'empêcher la formation d'agrégats protéiques et, par conséquent, d'assurer la solubilisation de la protéine. Par ailleurs, l'écrantage des charges positives de certains acides aminés (lysine, arginine et histidine) par les charges négatives du SDS joue un rôle dans la dénaturation de la protéine.<sup>46</sup>

Dans la méthode de renaturation SDS-MPD, les valeurs de concentration efficaces du détergent anionique et du cosolvant sont respectivement de l'ordre du millimolaire (mM) et du molaire (M). Le mécanisme de renaturation de la protéine

n'est pas connu avec exactitude mais différentes études mettent en exergue l'importance du cosolvant pour diminuer le caractère dénaturant du SDS. Des résultats de DLS et de dynamique moléculaire (MD) indiquent que les molécules de SDS sont solvatées par les molécules de MPD, entraînant la déstabilisation des micelles de détergent. Des liaisons hydrogène s'établissent entre les atomes d'oxygène du sulfate du SDS et les atomes d'hydrogène des alcools du MPD. Par effet hydrophobe, la chaîne alkyle du détergent est solvatée par le MPD de manière à avoir les groupements alcools exposés vers le milieu aqueux et les groupements alkyles le long de la chaîne du SDS.<sup>46,48</sup>

### *I.3 Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC)*

Les VDACs sont des protéines membranaires faisant partie de la famille des porines se trouvant dans la membrane externe des mitochondries. Ce sont des protéines de transport sous forme de tonneau- $\beta$  et possédant une hélice  $\alpha$  en position N-terminale (Fig.5).<sup>49</sup> Leur fonction consiste à réguler le flux d'ions et de métabolites entre le cytosol et l'espace intermembranaire des mitochondries. Ces métabolites peuvent être, entre autres, le NADH, l'adénosine triphosphate (ATP) et l'ARNt.<sup>50,51</sup>



*Figure 5 : Représentation de la stVDAC36 modélisée. Les feuillets- $\beta$  sont en jaune, l'hélice- $\alpha$  en rouge et les «  $\beta$ -turn » en vert.<sup>52</sup>*

De manière générale, les VDACs possèdent une faible sélectivité de transport. Il est principalement contrôlé par la taille du pore ainsi que par le potentiel de



membrane.<sup>53</sup> La VDAC utilisée au cours de ce travail est la stVDAC36 provenant de *solanum tuberosum* ayant déjà fait l'objet d'étude antérieure au sein du laboratoire CPB.

### **I.3.A Conformation ouverte et fermée des VDACs**

Il a été démontré que, pour une VDAC incorporée au sein d'une membrane artificielle, des variations de conductance sont observées en fonction du potentiel électrique imposé au système. Dans une gamme de potentiel comprise entre -10 mV et +10 mV, il ressort une conductance élevée et, à l'inverse, pour un potentiel supérieur à 40 mV la conductance est plus faible.<sup>54,55</sup> Il apparaît donc des transitions entre états de conductance faible (dit fermé) ou élevée (dit ouvert) en fonction du potentiel appliqué. Cela impliquerait une modification de la conformation de la protéine en fonction du potentiel de membrane.

Différents modèles ont été proposés pour décrire la transition entre l'état ouvert et fermé. Le premier implique le mouvement d'un domaine senseur qui passerait d'un côté à l'autre du tonneau- $\beta$  en fonction du signe du potentiel de membrane.<sup>53,56</sup> Le second, le plus proposé, se base sur un déplacement de l'hélice- $\alpha$  se trouvant au sein du tonneau- $\beta$ . Cependant, les mécanismes impliquant ce mouvement ne font pas encore consensus.<sup>57,58</sup> Le troisième modèle propose un affaissement du tonneau- $\beta$  lorsque le potentiel est élevé, entraînant le changement de conformation de la protéine vers une forme elliptique.<sup>59</sup>

### **I.3.B Liaison à l'ATP**

De par leur rôle au sein de la cellule, il est nécessaire pour les mitochondries de réguler leur flux d'ions et de biomolécules avec le cytosol. Pour ce faire, elles possèdent différentes protéines membranaires remplissant cette fonction, dont les VDACs. L'un des rôles des mitochondries dans la cellule consiste à synthétiser l'ATP par une phosphorylation oxydative. Le transport et la liaison des VDACs avec cette biomolécule ont été largement étudiés. Il apparaît qu'en fonction de l'état ouvert ou fermé de la protéine, le flux d'ATP varie jusqu'à tendre vers 0 à l'état fermé.<sup>60</sup> Des études structurales (cristallographie et résonance magnétique nucléaire) ainsi que de MD mettent en avant l'importance de l'hélice- $\alpha$  dans la liaison à l'ATP.<sup>61–63</sup> La présence d'acides aminés basiques tels que la lysine et

l'arginine au centre du pore permet des interactions avec les groupements phosphate de l'ATP chargé négativement.<sup>52,60,64</sup> À titre d'exemple, la Figure 6 montre les acides aminés basiques Lys13, Lys14, Arg16, Arg21 et Lys28 présents au sein du pore de la stVDAC36 qui seraient responsables de l'interaction ATP-VDAC.

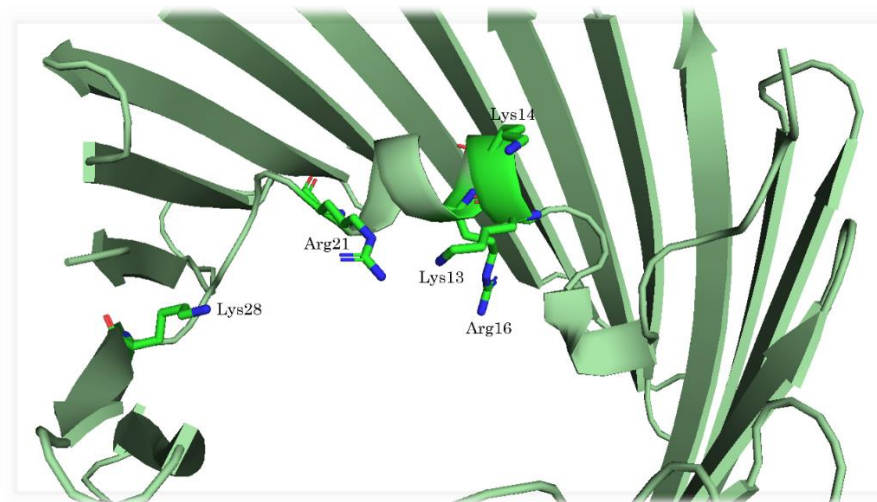


Figure 6 : Représentation modélisée de la stVDAC36. Mise en évidence des acides aminés chargés positivement dans l'hélice- $\alpha$ .<sup>52</sup>

## *Partie 2 – Objectif et stratégies*

## I. Objectif et stratégies du mémoire

L'objectif général de ce travail consiste à réaliser des protéoliposomes recouverts d'une couche de poly-L-Lysine (PLL) en incorporant la stVDAC36 au sein de la membrane des liposomes.

La stratégie suivie au cours de ce mémoire se divise en trois parties distinctes (Fig. 7). Dans un premier temps, la stVDAC36 sera surexprimée dans *E. coli* et purifiée en condition dénaturante sur une colonne d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC). La pureté des échantillons récoltés sera vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Après purification, la stVDAC36 se trouvera dans une solution de SDS dénaturante. Il sera donc nécessaire de la renaturer. Pour ce faire, la méthode SDS-MPD sera utilisée. Différentes concentrations en détergent et en cosolvant seront testées afin de trouver les paramètres optimaux à la renaturation de la protéine. Celle-ci sera caractérisée par dichroïsme circulaire (CD) et fluorescence intrinsèque du tryptophane (ITF). Afin de vérifier la conservation de sa fonction de liaison à l'ATP, la théorie de Stern-Volmer sera appliquée aux données de fluorescence et permettra de donner une valeur de constante d'association ( $k_a$ ) ainsi qu'un nombre de sites de liaison entre la protéine et l'ATP.

La deuxième partie se concentre sur la réalisation de liposomes. Ils seront préparés en associant deux phospholipides, à savoir le 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG) et le 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC). POPG est un phospholipide dont la tête polaire est chargée négativement à pH physiologique. *A contrario*, POPC a lui une tête polaire globalement neutre à pH physiologique. La préparation de liposomes sera réalisée en suivant la technique d'hydratation de films lipidiques. Les liposomes formés à partir de différents ratios molaires en ces deux lipides seront analysés par DLS et mesures de potentiel zêta.

La dernière partie de ce mémoire consiste à préparer des protéoliposomes en incorporant la stVDAC36 aux liposomes préalablement réalisés, à vérifier par DLS et CD si la protéine s'est bel et bien renaturée, et si les résultats sont comparables

à la renaturation de la protéine *via* la méthode SDS-MPD. Enfin, les liposomes seront recouverts par une couche de PLL et les techniques DLS (variation du diamètre hydrodynamique du liposome) et mesures de potentiel zêta (inversion de la valeur absolue du potentiel) permettront de rendre compte du recouvrement de la vésicule.

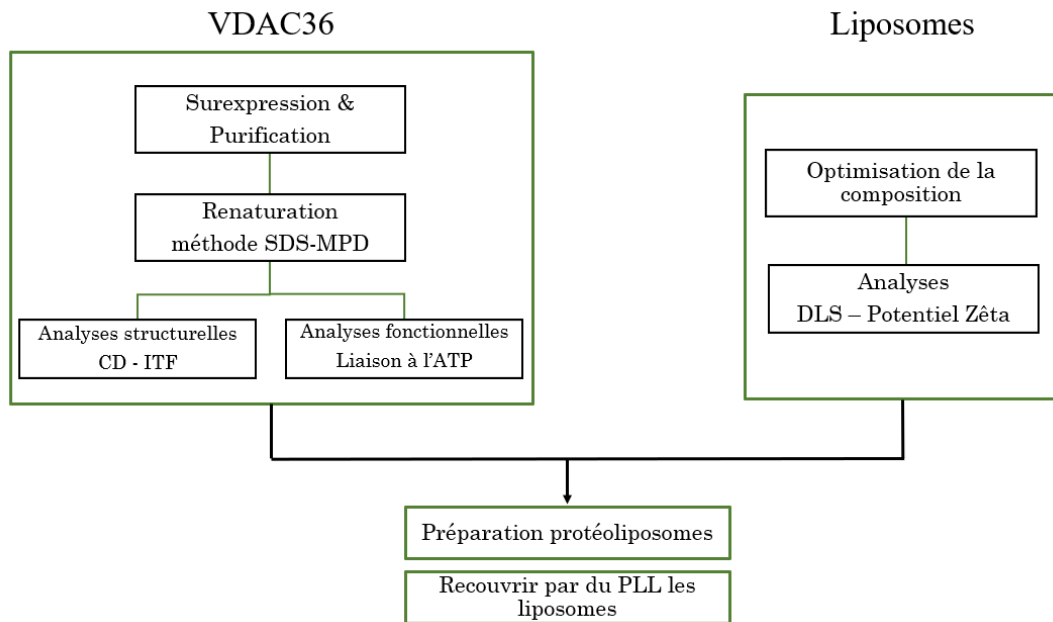


Figure 7 : Représentation schématique de la stratégie suivie au cours de ce mémoire.

## *Partie 3 - Résultats*

## I. Etude de la stVDAC36

### I.1 Surexpression et purification

#### I.1.A Principes

La production d'une protéine hétérologue se fait sur base de la modification du génome d'une bactérie type. Dans le cadre de ce travail des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) sont modifiées à l'aide d'un plasmide comportant le vecteur pQE60 codant pour la stVDAC36 avec une étiquette poly-histidine (His-tag). Lors de la surexpression bactérienne, il est donc important d'induire la surexpression de la protéine à l'aide d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fig.8). Il s'agit d'une molécule analogue de l'allolactose. En absence d'IPTG ou d'allolactose un répresseur va se lier à l'opérateur du gène Lac I et empêcher l'ARN polymérase de transcrire le gène de la protéine recombinante. L'IPTG va se lier à ce répresseur et empêcher son interaction avec l'opéron, et donc *a contrario* permettre la transcription du gène recombinant.<sup>65</sup> La machinerie cellulaire prend ensuite le relais et permet de surexprimer la protéine.

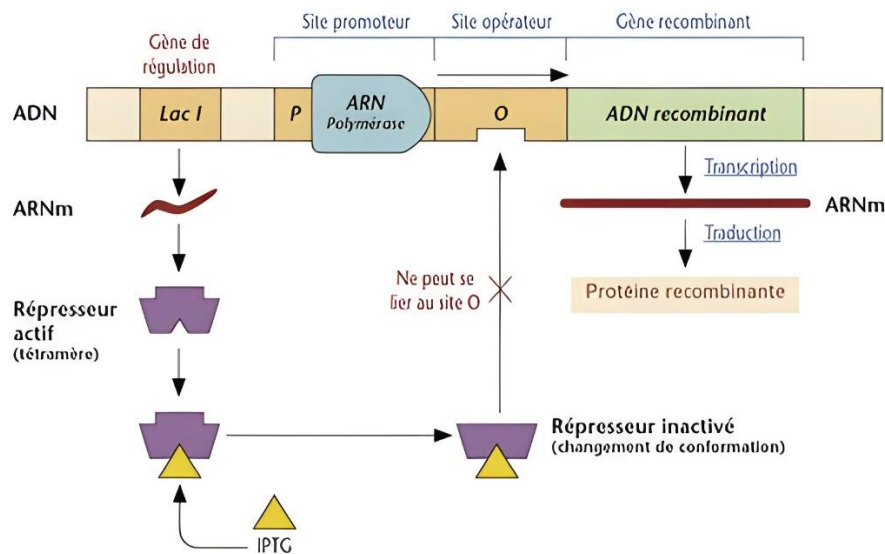


Figure 8 : Schéma de fonctionnement de l'induction à l'IPTG.<sup>66</sup>

La stVDAC36 a été surexprimée sous forme de corps d'inclusion solubilisés dans une solution dénaturante contenant du SDS 1% (w/v). Cette protéine portant un His-tag en position C-terminale, il est possible de la purifier via la

chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). Les histidines vont se complexer avec les atomes de nickel immobilisés sur la colonne chromatographique. Afin de décrocher la protéine fixée sur la colonne, un gradient de concentration en imidazole est utilisé pour entrer en compétition avec l'His-tag de la protéine, entraînant son élution.

### I.1.B Premiers résultats de surexpression et purification

Une première surexpression, partant de 250 mL de culture, avec 1mM IPTG, suivie d'une étape de purification, a été réalisée (Fig. 9). Le chromatogramme montre deux bandes d'absorption importantes due à l'élution des protéines ne s'étant pas fixée sur la colonne (nommée FT pour *flow-through*), et une légère augmentation de l'absorbance (encadrée au point C) qui stagne jusqu'à la fin de la purification.

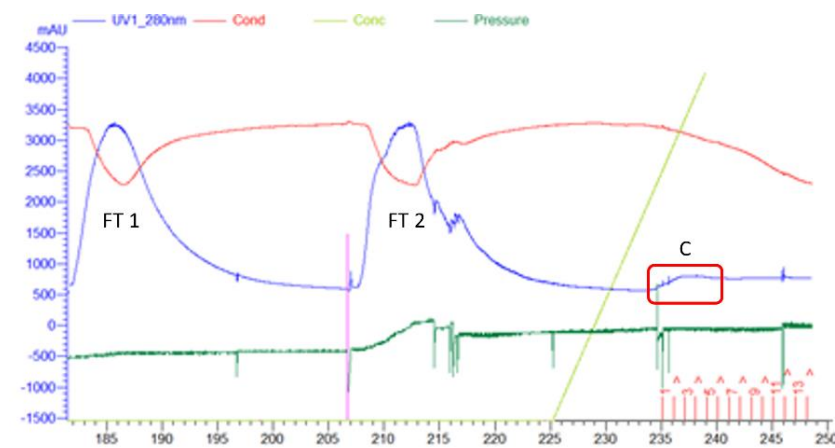


Figure 9 : Chromatogramme de la purification de la stVDAC36 dans la première condition de surexpression. La purification est suivie par l'absorbance à 280 nm.

Le lysat (avant purification), les deux FTs ainsi que les échantillons de la bande d'élution ont été déposés sur gel SDS-PAGE (Fig. 10). On observe la présence de protéines dans le lysat et les FT, mais aucune bande ne ressort dans les fractions éluées au niveau de la masse moléculaire attendue de la VDAC36 (30 kDa).<sup>52</sup> Il n'y aurait donc pas ou peu de protéines dans ces échantillons. La légère augmentation d'absorbance qui apparaît dans le cadre C pourrait être due à l'imidazole (composé présent dans la solution d'élution) connu pour absorber à 280 nm.<sup>67</sup>



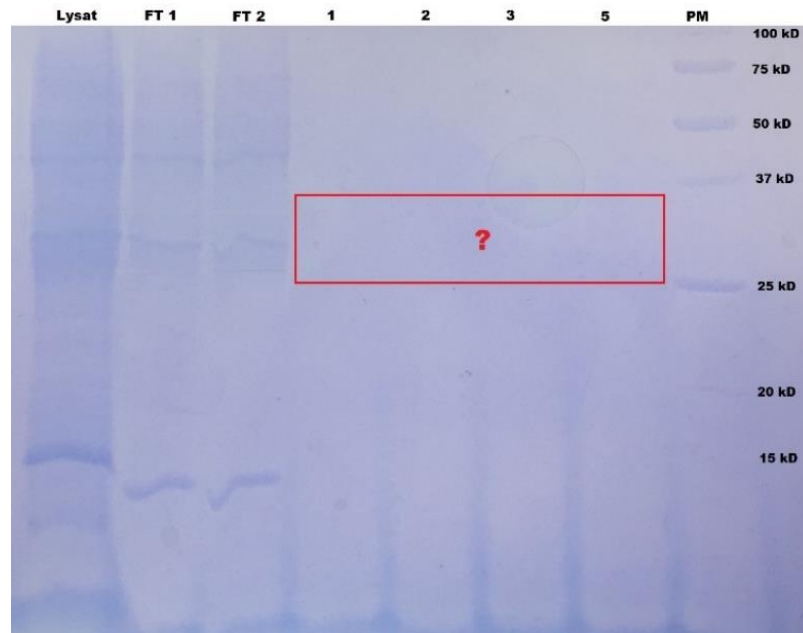


Figure 10 : Gel SDS-PAGE réalisé après la surexpression et la purification de la stVDAC36 dans les premières conditions de surexpression. A et B correspondent aux échantillons avant et après induction à l'IPTG, PM correspond au marqueur de masse moléculaire.

Sur base de ces premiers résultats, il a été décidé de modifier le mode opératoire et de chercher à optimiser la concentration en IPTG, l'inducteur utilisé pour l'expression de la protéine hétérologue.

### **I.1.C Optimisation de la concentration en IPTG**

Des concentrations de 0.2, 0.5 et 0.7 mM en IPTG pour les mêmes volumes de cultures ont été utilisées afin de les comparer avec les résultats obtenus précédemment. En observant sur gel SDS-PAGE les échantillons avant et après induction, on peut tirer comme première information que lors d'une induction avec 0.2 mM IPTG l'intensité de la bande correspondant à la stVDAC36 (entre 25 et 37 kDa) est la plus faible de toutes les concentrations testées. Ce sont les inductions avec 0.5 et 0.7 mM IPTG qui semblent produire le plus de protéines. Ces culots bactériens sont donc lysés et purifiés en suivant la même méthode et les mêmes conditions que pour les premiers échantillons obtenus au point IV.1.B.

De manière générale, on constate, pour les deux conditions, d'une part qu'une bande d'éluion plus intense que précédemment est observée sur le chromatogramme, et d'autre part, qu'une seule bande majoritaire est visible sur gel SDS-PAGE. Les figures 11 et 12 illustrent ces résultats pour la condition avec 0.5 mM IPTG.

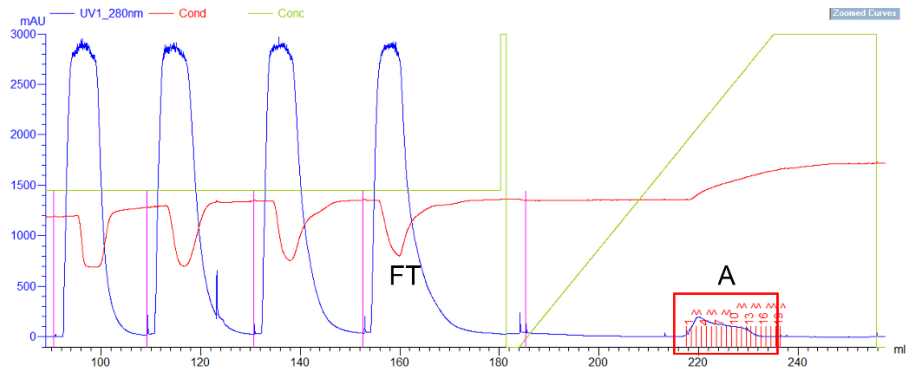


Figure 11 11: Chromatogramme obtenu lors de la purification de la stVDAC36 induite avec 0.5 mM en IPTG.

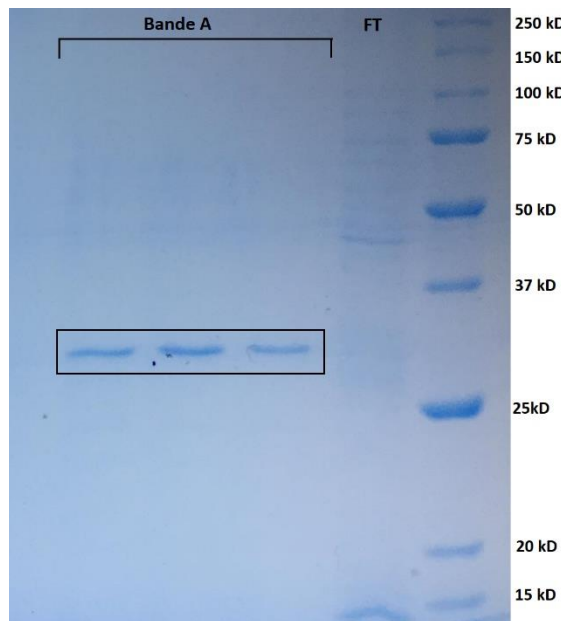


Figure 12 12: Gel SDS-PAGE des échantillons obtenus lors de la purification de la stVDAC36 induite par 0.5 mM IPTG.

Au vu de ces résultats, il apparaît que l'induction avec 0.5 et 0.7 mM en IPTG permet d'avoir une meilleure production de stVDAC36 que lors de l'induction avec 1 mM en IPTG. Une étape de purification est par ailleurs suffisante.

La concentration en protéines obtenue lors de ces deux purifications de même volume de culture a ensuite été dosée en mesurant l'absorbance à 280 nm (Fig. 13). Via la loi de Beer-Lambert il est possible de déterminer la concentration de ces échantillons en connaissant le coefficient d'extinction molaire de la protéine (Tableau 1). Ce dernier, prédit à partir de la séquence en acide aminée de la protéine, vaut  $20400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Tableau 1 : Concentrations en stVDAC36 des échantillons obtenus après induction à 0.7 mM et 0.5 mM.

Echantillon	Concentration (mg/mL)
stVDAC36 0.7 mM IPTG	~ 0.17
stVDAC36 0.5 mM IPTG	~ 0.43

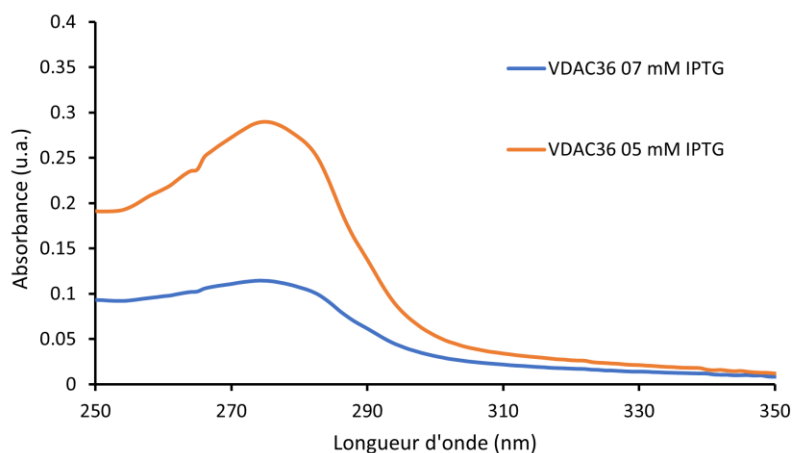


Figure 133 : Absorbance de la stVDAC36 induite avec 0.5 mM et 0.7 mM en IPTG.

En conclusion, il ressort que la stVDAC36 est mieux surexprimée en utilisant une concentration en IPTG de 0.5 mM. Les échantillons obtenus semblent relativement purs.

## I.2 Renaturation de la stVDAC36 via la méthode SDS-MPD

### I.2.A Principes

La stVDAC36 obtenue après purification se trouve dans une solution dénaturante composée d'un tampon phosphate 20 mM pH 8 et de SDS 0.1 % (w/v). Afin d'étudier la structure et la fonction de la protéine, il est donc nécessaire de la renaturer. La méthode SDS-MPD est utilisée. Différentes concentrations en détergent (le SDS) et cosolvant (le MPD) sont testées afin de déterminer les plus adéquates. La renaturation de la protéine est suivie par fluorescence et dichroïsme circulaire.

### I.2.B Résultats de dichroïsme circulaire et fluorescence

La spectroscopie de fluorescence des acides aminés aromatiques est souvent utilisée pour évaluer le changement de conformation d'une protéine. En effet, le

changement d’environnement de ces résidus, lors de la renaturation, implique un changement dans les spectres d’émission. Etant donné qu’il y a 10 résidus tyrosine et 1 résidu tryptophane dans la séquence en acides aminés de la stVDAC36, la longueur d’onde d’excitation utilisée est de 280 nm (excitation simultanée des tyrosines et des tryptophanes). De manière générale, un déplacement bathochrome indique que l’acide aminé se trouve dans un environnement plus polaire, et un déplacement hypsochrome indique à l’inverse un environnement moins polaire pour l’acide aminé impliqué.

Dans un premier temps il apparait que la concentration en SDS dans les échantillons ne semble pas exercer une grande influence dans l’évolution des spectres (Fig.14. A).

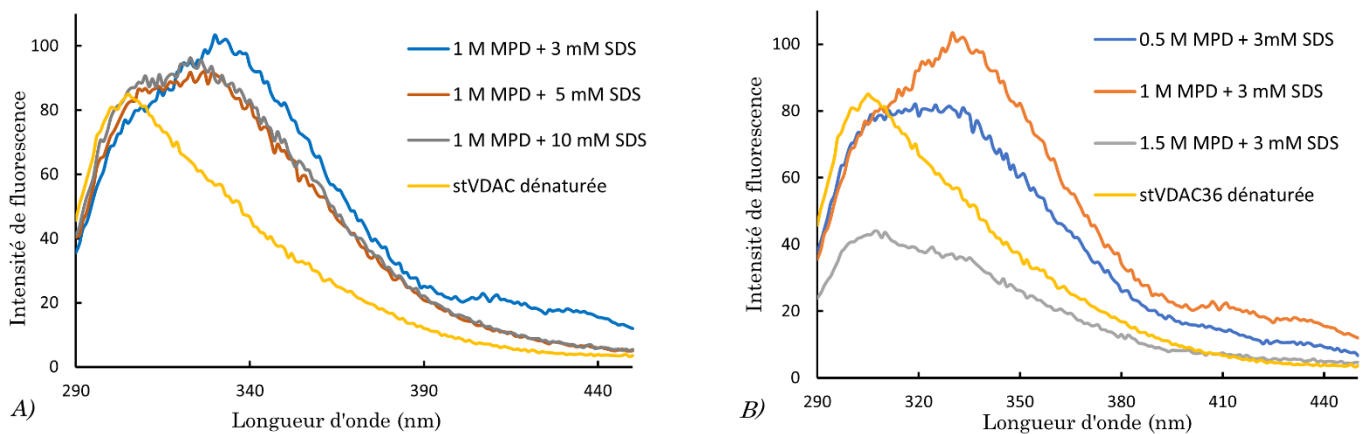


Figure 14 : Spectres de fluorescence ( $\lambda$  excitation = 280nm) de la stVDAC36 en présence de A) 1 M MPD et de différentes concentrations en SDS B) 3 mM SDS et différentes concentrations en MPD.

Il ressort que pour les échantillons ayant une concentration de 0.5 et 1 M MPD un effet bathochrome est observé, ainsi qu’une augmentation de l’intensité de fluorescence pour 1 M MPD (Fig 14.B) La combinaison de ces deux signatures est le signal typique observé lors de la renaturation d’un tonneau- $\beta$ .<sup>44,52</sup> Pour les échantillons possédant une concentration de 1.5 M MPD, on n’observe aucun déplacement bathochrome et une diminution de l’intensité de fluorescence.

Pour compléter ces résultats et confirmer la renaturation de la VDAC36, des mesures de dichroïsme circulaire sont réalisées. Ces dernières donnent un signal typique en fonction de la nature de la structure secondaire de la protéine. Les hélices- $\alpha$  ont un signal qui montre deux bandes négatives, aux alentours de 208 nm et 222 nm. Les feuillettes- $\beta$  ont une bande négative vers 218 nm, alors que les

structures désordonnées ont une bande d'absorbance négative aux alentours de 198 nm (Fig. 15).

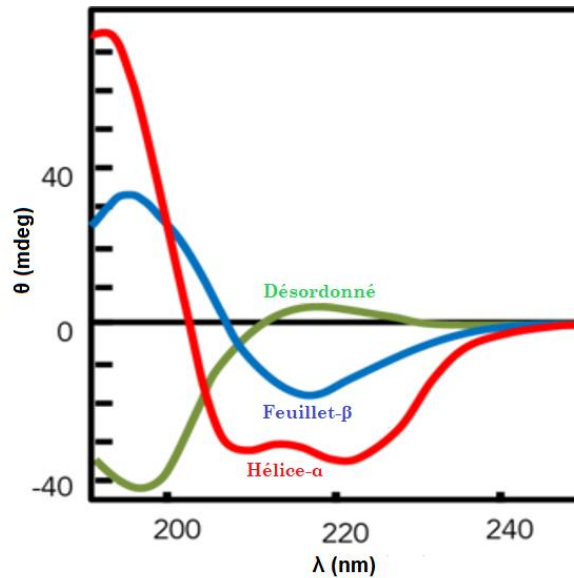


Figure 15 : Spectres CD typiques de différentes structures secondaires.<sup>68</sup>

La Figure 16 reprends les différents spectres CD de la stVDAC36 avec diverses concentrations en MPD et la plus faible concentration en SDS testée (3 mM). Dans l'échantillon de protéine dénaturée dans du SDS, on observe deux bandes négatives aux alentours de 205 nm et 220 nm. Ce signal est typique d'une conformation en hélice- $\alpha$ , ce qui a déjà été observé dans la littérature.<sup>69</sup> Quand 0.5 M MPD est ajouté à l'échantillon, aucune différence marquante n'est observée. La stVDAC36 serait donc toujours sous une forme dénaturée. En revanche, après ajout de 1 M MPD, on note une bande négative aux alentours de 218-220 nm, correspondant à un spectre de feuillets- $\beta$ . Enfin, l'échantillon avec 1.5 M de MPD ne donne qu'une faible intensité de signal.

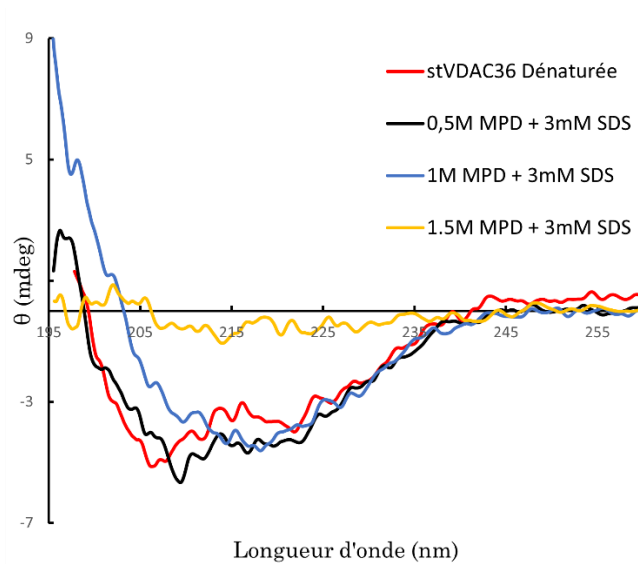


Figure 16 : Spectre CD (spectropolarimètre Jasco J-810) en UV-lointain de la stVDAC36 dans différentes solutions de MPD.

A partir des données de dichroïsme circulaire et de spectroscopie de fluorescence, il ressort donc que les meilleures conditions de renaturation sont en présence de 1 M en MPD, et d'une faible concentration en SDS (entre 3 et 10mM). Il a été choisi de travailler avec la plus faible concentration en SDS afin de limiter les éventuelles interférences de ce détergent avec la suite des expériences.

Des spectres CD mieux résolus (autre appareillage et concentration plus élevée en protéine) de la stVDAC36 dénaturée dans du SDS et renaturée dans les conditions optimisées (3 mM SDS et 1 M MPD) sont illustrés à la Figure 17.

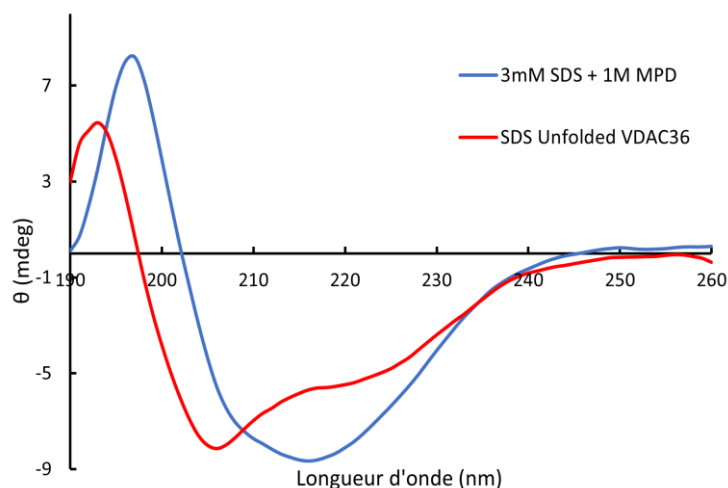


Figure 17 : Spectre CD (spectropolarimètre MOS-500) en UV lointain de la stVDAC36 dénaturée dans du SDS et renaturée dans 3 mM SDS et 1 M MPD.

A partir de ces spectres, il est possible de déterminer le pourcentage de chaque structure secondaire (Tableau 2). Cela est possible au moyen de Dichroweb™, un algorithme se basant sur une banque de données de spectres CD de protéines de référence.<sup>70,71</sup>

On observe que le pourcentage en feuillet bêta augmente lors de la renaturation de la stVDAC36 (passant de 17 à 40 %) alors que celui des hélices alpha diminue (passant de 33 à 7 %). Etant donnée que la stVDAC36 est un tonneau bêta, et que les protéines dénaturées dans du SDS sont connues pour avoir des structures semblables à des hélices alpha, ces données sont cohérentes avec les résultats attendus.

Tableau 2: Pourcentages de chaque structure secondaire dans la stVDAC36 dénaturée dans du SDS et renaturée dans 3 mM SDS et 1 M MPD.

Echantillon	Hélice-alpha (%)	Feuillet bêta (%)	Bêta-turn (%)	Désordonnée (%)
stVDAC36 Renaturée	7	40	13	40
stVDAC36 Dénaturée	33	17	15	35

### *I.3 Test de liaison ATP-stVDAC36*

#### **I.3.A Principe**

La stVDAC36 est une protéine qui se trouve à l'état naturel dans la membrane externe des mitochondries. Sachant que les mitochondries sont des organites qui produisent de l'ATP, il a été observé que la stVDAC36 a la capacité de lier cette molécule.<sup>72,73</sup> Afin de déterminer si la stVDAC36 renaturée par la méthode SDS-MPD a récupéré sa capacité à lier l'ATP, un test de liaison a été mis en place. Pour ce faire, la protéine, dénaturée ou renaturée, a été mise en présence de différentes concentrations en ATP et les variations d'intensité de fluorescence des résidus aromatiques ont été mesurées. La théorie de Stern-Volmer (Eq. 2) permet de déterminer la constante d'association  $k_a$  et le nombre de site de liaison  $n$  entre la stVDAC36 et l'ATP. Dans l'équation 2,  $F_0$  correspond au maximum d'intensité de fluorescence avant la liaison à l'ATP,  $F$  est le maximum d'intensité

de fluorescence après la liaison à l'ATP et  $Q$  est la concentration en ATP dans l'échantillon.

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_a + n \log[Q] \quad (2)$$

### I.3.B Résultats

Les spectres d'émission de fluorescence des résidus tryptophane et tyrosine de la stVDAC36 renaturée en présence de différentes concentration en ATP montrent une extinction de fluorescence croissante avec l'augmentation de la concentration en ATP (Fig.18.A).

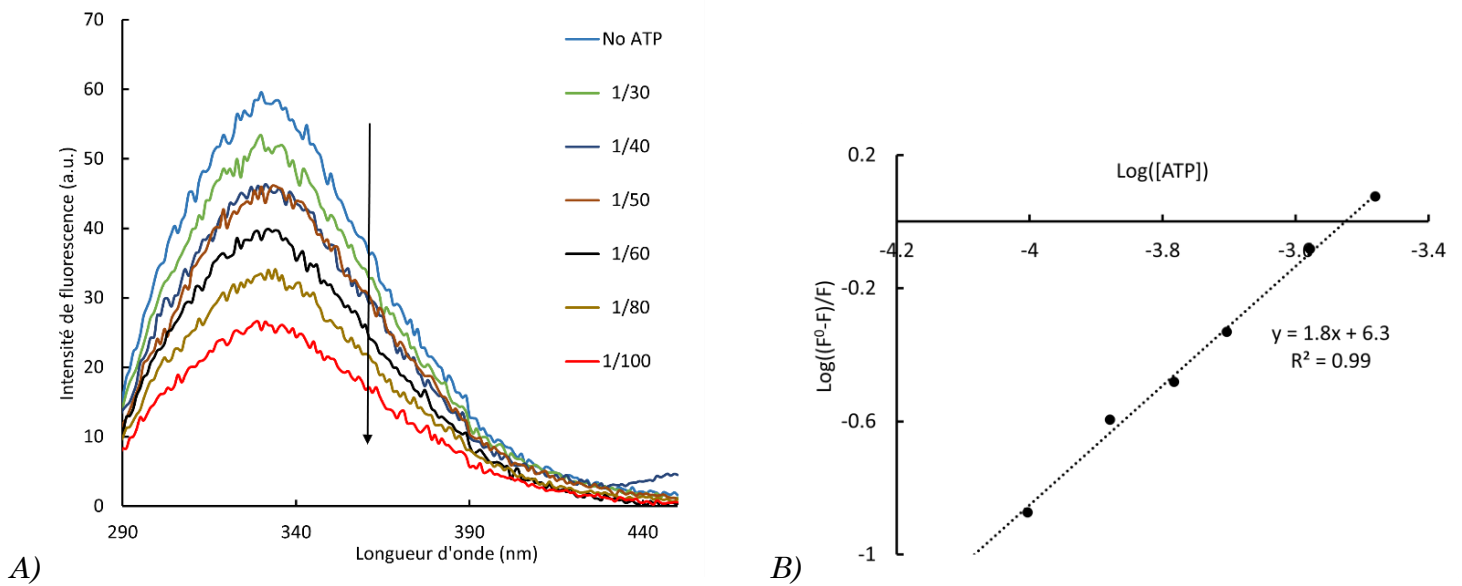


Figure 18 : A) Spectres d'émission de fluorescence de stVDAC36 renaturée en présence de différents ratio stVDAC36/ATP (longueur d'onde d'excitation = 280 nm). B) Equation de Stern-Volmer pour l'interaction de la stVDAC36 renaturée en présence d'ATP.

Ce phénomène pourrait s'expliquer notamment par l'interaction entre l'ATP et l'hélice- $\alpha$  comme expliqué précédemment (voir II.3.B). En effet, cette dernière se trouve au centre du pore et est composée de trois résidus tyrosine (Tyr8, Tyr 20 et Tyr23) qui verraient leur environnement changé à la suite de l'interaction avec l'ATP (Fig. 19).



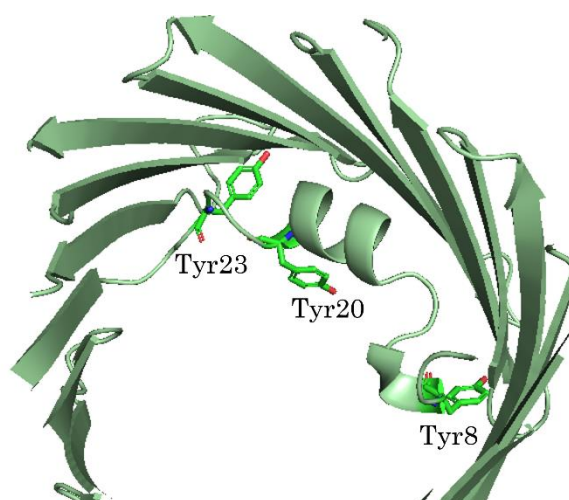


Figure 19 : Modèle de la stVDAC36 et des résidus aromatiques composant l'hélice- $\alpha$ .

À partir de ces données de fluorescence, il est possible via l'équation 2 de déterminer une constante de liaison et le nombre de site de liaison ATP-stVDAC36 (Fig. 18 B. et Tableau 3). En plus de l'hélice- $\alpha$ , l'ATP se lierait à un autre endroit de la protéine (deux sites de liaison sont déterminés). Il existe un site riche en acide aminés chargés positivement se trouvant à proximité d'un résidu tryptophane, il pourrait s'agir d'un autre site de liaison potentiel.

Afin d'analyser l'importance de la conformation native de la protéine dans la liaison à l'ATP, la même étude a été réalisée sur la protéine dénaturée dans une solution de SDS (Fig.20 et Tableau 3). Une extinction de fluorescence est également observée mais la constante de liaison est 25 fois plus petite qu'avec la protéine renaturée. De plus, le nombre de site de liaison passe de 2 à 1 lorsque la stVDAC36 est dénaturée.

Tableau 3 : Valeurs de constantes de liaisons et nombre de sites de liaisons de l'ATP avec la stVDAC36 renaturée et dénaturée.

Echantillon	Constante de liaison ( $K_a$ )	Nombre de site de liaison ( $n$ )
stVDAC36 Renaturée	$199 \times 10^4$	$\sim 2$
stVDAC36 Dénaturée	$7.94 \times 10^4$	$\sim 1$

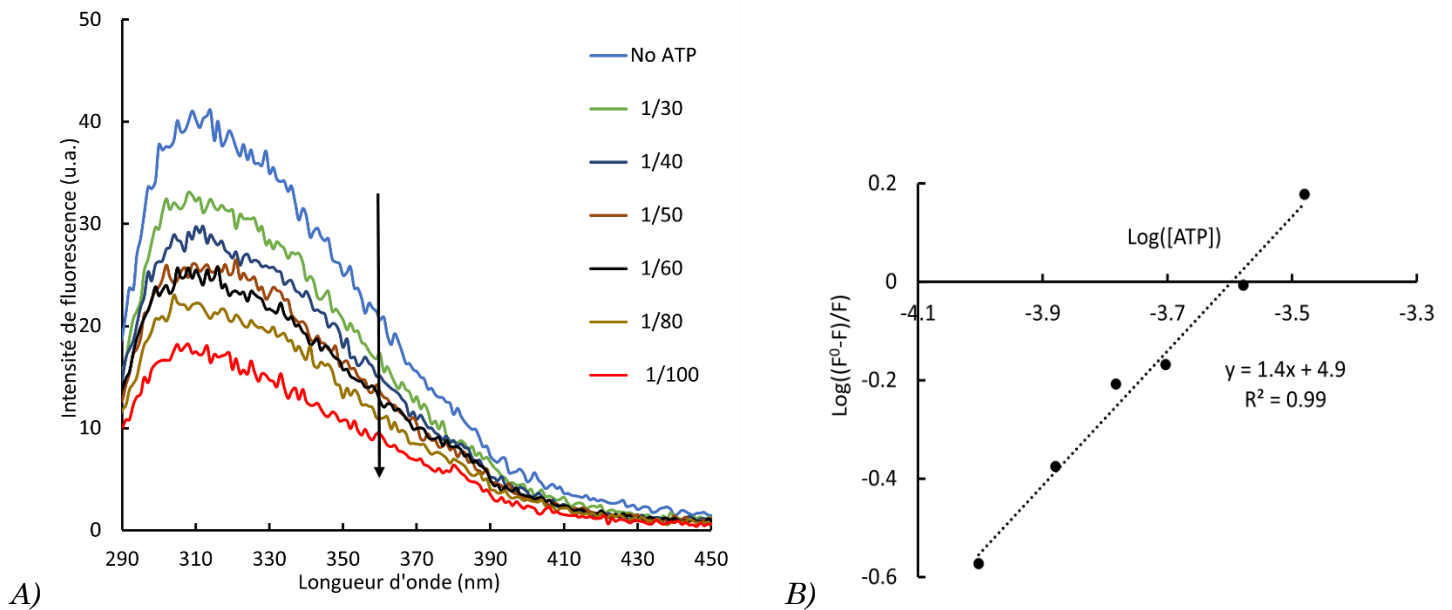


Figure 20 : A) Spectres d'émission de fluorescence de stVDAC36 renaturée en présence de différents ratio stVDAC36/ATP (longueur d'onde d'excitation = 280 nm). B) Equation de Stern-Volmer pour l'interaction de la stVDAC36 dénaturée en présence d'ATP.

Dans le but de vérifier la conformation de la stVDAC36 lors de son interaction avec l'ATP, des mesures CD ont été réalisées (Fig. 21).

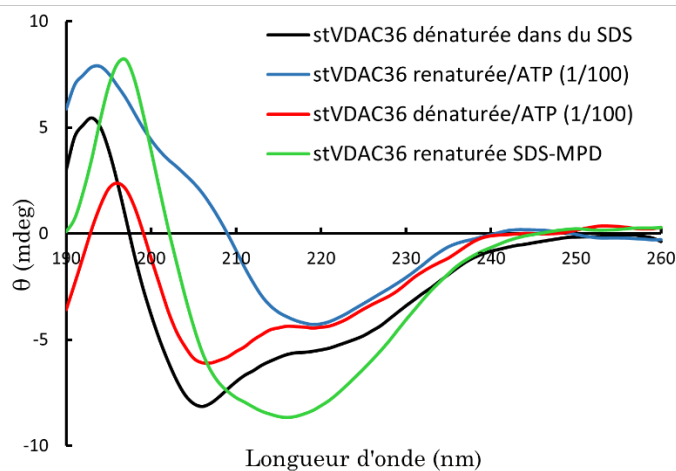


Figure 21 : Spectres de dichroïsme circulaire de la stVDAC36 lors de son interaction avec l'ATP.

Pour la protéine dénaturée, on observe que la présence d'ATP n'influence quasi pas la conformation de la protéine qui reste dénaturée. Dans le cas de la protéine renaturée, on observe la bande typique des feuillets- $\beta$ . Cependant, en comparant avec la protéine renaturée sans ATP, on peut observer des variations de signal entre 190 et 210 nm. La protéine garderait sa structure sous forme de tonneau- $\beta$  mais verrait sa conformation légèrement changée par la présence d'ATP.

Les variations d'intensités s'expliquent par des concentrations différentes en protéines entre les échantillons.

Grâce à ces différentes études, on peut conclure que la renaturation de la stVDAC36 au moyen de la méthode SDS-MPD a permis de retrouver sa fonction de liaison à l'ATP.

## II. Etude des liposomes et protéoliposomes

### II.1 Préparation de liposomes

Des liposomes composés de différents rapports molaires en POPC et POPG ont été préparés. « Lipo » correspond à un liposome composé à 100 % de POPC, « Lipo15 » compte 15 % de POPG et « Lipo30 » en compte 30 %. POPC est un lipide dont la tête polaire est globalement neutre à l'inverse de POPG pour qui elle est négative. Cette étude se fait avec l'ambition de recouvrir ensuite ces liposomes de polyélectrolytes chargés positivement. Ils ont été analysés par DLS et par potentiel zêta afin d'évaluer leurs propriétés (Tableau 4).

Premièrement, les valeurs de diamètre hydrodynamique moyen ( $\bar{D}_h$ ) de ces liposomes indiquent qu'ils ont été correctement formés et que leur distribution de taille est uniforme. On observe ensuite, qu'aucune différence significative n'apparaît dans la taille des liposomes Lipo15 et Lipo30 ; seul Lipo est plus grand que les autres. Enfin, les valeurs de potentiel-zêta des liposomes augmentent à mesure que la proportion en POPG croît dans leur composition. Cela apparaît logique étant donné la structure de ce lipide.

Tableau 4 : Résultats de DLS et de potentiel-zêta pour Lipo, Lipo15 et Lipo30.

Echantillon	$\bar{D}_h$ (nm)	Potentiel Zêta (mV)
Lipo	171.7 ± 4.6	0.5 ± 1.0
Lipo15	154.5 ± 2.5	-3.5 ± 1.3
Lipo30	151.8 ± 3.7	-14.1 ± 2.3

### II.2 Préparation de protéoliposomes

Une fois la formation de liposomes maîtrisée, celle de protéoliposomes incorporant la stVDAC36 au sein d'un liposome de POPC peut être investiguée. Des mesures CD montrent que la protéine est correctement insérée, au vu de la bande à 218 nm (Fig. 22 A.) typique des tonneaux- $\beta$  et semblable au spectre obtenu lors de la renaturation de stVDAC36 *via* la méthode SDS-MPD.

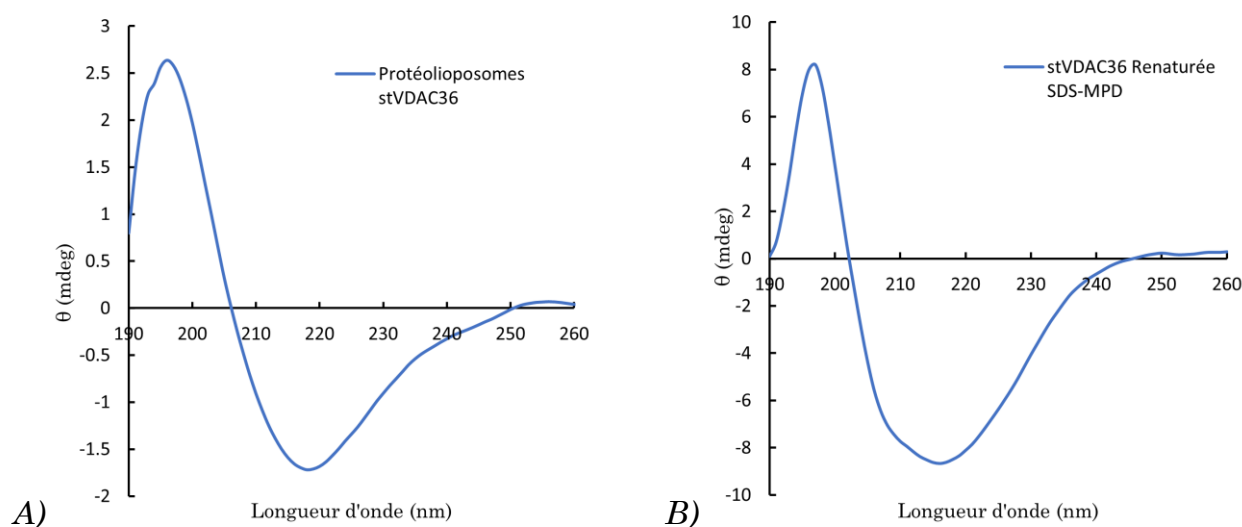


Figure 22 : Spectres CD de la stVDAC36 A) dans un protéoliposome B) de la stVDAC36 renaturée via la méthode SDS-MPD

Des mesures de DLS montrent par ailleurs que le diamètre hydrodynamique moyen du protéoliposome est plus petit que celui du liposome seul (Tableau 5). Cette diminution de taille viendrait directement de l'incorporation de la protéine.

Tableau 5 : Valeurs de diamètre hydrodynamique pour différents échantillons lors de la confection de protéoliposomes.

Echantillon	$\bar{D}_h$ (nm)
Protéoliposomes (stVDAC36)	$115.0 \pm 3.5$
Liposomes POPC	$164.2 \pm 2.6$
Liposomes traité au Triton X-100	$135.7 \pm 3.6$

Lors de la préparation des protéoliposomes, le détergent Triton X-100 est utilisé afin de déstabiliser la membrane lipidique pour faciliter l'incorporation de la protéine. Cet agent est finalement éliminé de la solution. Afin de vérifier son influence sur le changement de taille du protéoliposome observé précédemment, un échantillon témoin de liposome traité au Triton X-100 a été réalisé. La mesure DLS indique également une diminution de la taille du liposome, expliquant en partie la variation de taille entre le protéoliposome et le liposome.

### II.2.A Optimisation de la méthode de formation des protéoliposomes

Quelques pistes ont été abordées afin de faciliter la préparation de protéoliposomes. Dans un premier temps, la nécessité de renaturer la stVDAC36

avant son incorporation au sein du liposome a été étudiée (Fig. 23 A). La protéine pourrait en effet se renaturer directement en présence de la membrane lipidique. Le spectre CD des protéoliposomes de stVDAC36 non renaturée montre un signal proche de celui de la stVDAC36 dénaturée dans du SDS, au contraire de celui des protéoliposomes avec la stVDAC36 préalablement renaturée qui une bande d'absorbance à 218 nm signe d'un tonneau- $\beta$ . Il apparait donc que la renaturation de la protéine avant son incorporation dans le liposome soit une étape indispensable à la confection du protéoliposome.

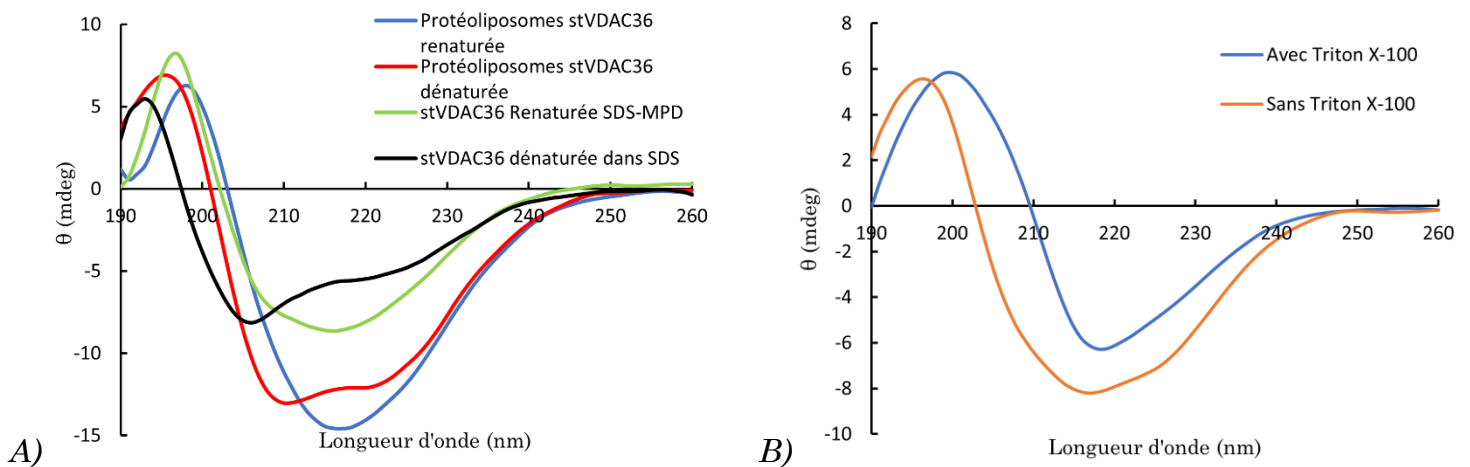


Figure 23 : Spectres CD des protéoliposomes de stVDAC36 A) renaturée ou non avant l'incorporation. B) préparés avec et sans l'utilisation de Triton X-100.

Un second moyen d'optimiser la formation de protéoliposomes est de ne pas utiliser le Triton X-100. En effet, la présence de ce détergent entraîne une modification des propriétés de la membrane lipidique et peut alors fausser les études ultérieures. Il faut également extraire le Triton X-100 à l'aide de Bio-Beads, constituant une étape de manipulation supplémentaire. Il devient alors intéressant de savoir s'il est possible d'incorporer les protéines aux liposomes sans utiliser ce détergent. Les spectres CD des protéoliposomes réalisés avec et sans l'utilisation de Triton X-100 possèdent le même type de signal avec la bande caractéristique vers 218-220 nm (Fig. 23 B). Notons que la variation d'intensité peut s'expliquer par des concentrations différentes en protéines. Cependant, sans utiliser de tensioactif, la bande d'absorbance semble plus large indiquant une conformation légèrement différente.

De plus, des mesures DLS ont été réalisées sur ces échantillons (Tableau 6). Il ressort, contrairement aux résultats précédents (Tableau 5), que l'utilisation du Triton donne des vésicules de plus grande taille.

Tableau 6 : Valeurs de diamètre hydrodynamique pour des protéoliposomes avec et sans l'utilisation de Triton X-100.

Echantillon	$\bar{D}_h$ (nm)
Liposome	164.4 5.9
Protéoliposome avec Triton X-100	192.8 8.0
Protéoliposome sans Triton X-100	160.5 9.5

Des études supplémentaires seront donc nécessaires afin d'approfondir l'importance du détergent dans la préparation de protéoliposomes.

### II.3 Recouvrement de liposomes par des polyélectrolytes

Afin de préparer des liposomes recouverts de polyélectrolytes, des liposomes POPC-POPG 90-10 (w/w) sont préparés. Le polyélectrolyte choisi est la poly-L-lysine étant donné qu'il est chargé positivement à pH 8. La composition du liposome a été choisie suivant les informations données dans la littérature indiquant une plus grande stabilité et de meilleurs résultats pour des liposomes composés de 10 % de POPG et 90 % de POPC.<sup>26,31</sup>

Le Tableau 7 donne les résultats de DLS et de potentiel-zêta obtenus avant et après recouvrement avec le polyélectrolyte. On observe que le diamètre hydrodynamique du liposome recouvert est plus important que le liposome de départ. Cependant, l'écart type semble indiquer une disparité entre les mesures. Il ressort des mesures de potentiel-zêta que celui-ci a diminué en valeur absolue à la suite de l'ajout de polyélectrolytes, ce qui indiquerait que la surface de la vésicule serait modifiée et donc recouverte des dit polyélectrolytes.

Tableau 7 : Résultats de DLS et de potentiel-zêta pour les liposomes recouvert de PLL.

Echantillon	$\bar{D}_h$ (nm)	Potentiel-zêta
Liposomes 10% POPG	127.0 ± 2.5	-15.7 ± 4.6
Liposomes 10% POPG recouvert de PLL	161.9 ± 32	-1.5 ± 0.5

Il s'agit cependant ici de résultats préliminaires, le protocole nécessiterait d'être optimisé afin d'éviter la formation d'agrégats. Continuer cette étude permettrait de vérifier ces résultats encourageants.



## *Partie 4 – Conclusions et perspectives*

## I. Conclusions

L'objectif de ce travail consistait en la réalisation de protéoliposomes comportant la stVDAC36 au sein de sa membrane. Ces protéoliposomes devaient ensuite être recouverts de polyélectrolytes afin de pallier les inconvénients propres à ces systèmes et confectionner un biomatériau amélioré.

Pour ce faire, il était tout d'abord nécessaire de surexprimer en bactérie la stVDAC36 sous forme de corps d'inclusion. La protéine fut ensuite solubilisée dans une solution de SDS et purifiée en une étape de chromatographie IMAC. Différentes concentrations en IPTG ont été testées lors de la culture afin d'optimiser la production de stVDAC36. Il en ressort que la concentration optimale est de 0.5 mM en IPTG.

Il a été ensuite nécessaire de la renaturer au moyen de la méthode SDS-MPD. Un ensemble de conditions ont été testées. Des mesures de fluorescence des résidus aromatiques et de dichroïsme circulaire (CD) ont montré que la protéine était correctement renaturée en présence de 1 M MPD et 3 mM SDS.

Afin de vérifier si la protéine renaturée a retrouvé sa fonction de liaison à l'ATP, elle a été mise en présence de différentes quantités d'ATP et des mesures de fluorescence et CD ont été réalisées. On observe une extinction de fluorescence avec l'ajout d'ATP. La théorie de Stern-Volmer a ensuite permis, à partir de ces données, de calculer le nombre de sites de liaison et la constante de liaison entre la protéine et l'ATP. Il en ressort que la protéine renaturée possède un  $K_a$  25 fois plus important pour l'ATP lorsqu'elle est renaturée que lorsqu'elle est dénaturée. Le nombre de sites de liaison augmente aussi avec la renaturation, passant de  $\sim 2$  à  $\sim 1$ .

Dans un second temps, la formation de liposomes a été investiguée. Il a d'abord été observé que la valeur du potentiel-zêta était de plus en plus négative avec l'augmentation de la proportion en POPG (par rapport au POPC) dans les vésicules. Ensuite, l'intégration de la stVDAC36 au sein des liposomes a été réalisée. La conformation native en tonneau- $\beta$  de la protéine au sein de la membrane a été vérifiée par mesures CD.

Il a ensuite été envisagé d'optimiser la préparation de ces protéoliposomes. L'importance de la renaturation préalable de la protéine a été mise en avant et l'utilisation de Triton X-100 doit être investiguée plus en profondeur.

Enfin, une première tentative de recouvrement de liposomes POPC/POPG (90/10) par le polyélectrolyte PLL chargé positivement a été réalisée. Il a été observé un changement dans le potentiel-zêta du liposome indiquant que la surface a été correctement recouverte.

## **II. Perspectives**

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées à l'issue de ce travail. Premièrement, la surexpression et la purification de la stVDAC36 peuvent être améliorées afin d'obtenir de meilleurs rendements. Parmi les paramètres pouvant être optimisés sont retrouvés : le type de souche bactérienne, le temps d'incubation lors de l'induction à l'IPTG, la composition des solutions de lyse chimique ainsi que les solutions d'élution lors la purification IMAC.

Le test de liaison de l'ATP à la stVDAC36 pourrait être appliqué lorsque la protéine est insérée dans les liposomes. On pourrait ainsi confronter ces résultats à ceux obtenus sur la protéine renaturée par la méthode SDS-MPD. De plus, un autre moyen de vérifier que les protéoliposomes permettent de conserver la structure de la protéine serait de réaliser un test de gonflement des protéoliposomes suite au flux de solutés à travers la protéine.<sup>52,74,75</sup>

Le protocole de recouvrement des liposomes par des polyélectrolytes nécessite également d'être approfondi afin de le rendre facilement reproductible et d'éviter la formation d'agrégats. Ensuite, l'ajout couche par couche de polyélectrolytes chargés positivement et négativement pourra être vérifié par la variation du potentiel-zêta et l'augmentation du diamètre hydrodynamique en DLS.

Le recouvrement de protéoliposomes POPC/POPG (90/10) par ces polyélectrolytes serait l'étape finale de ce projet. Des études structurales sur les vésicules et la protéine seraient alors nécessaires. Il sera également intéressant de vérifier que la protéine garde sa fonction de transporteur à travers la membrane malgré le recouvrement de la vésicule par des polyélectrolytes.

## *Partie 5 – Matériels et méthodes*

## I. Surexpression de stVDAC36 dans *E. coli*

La surexpression d'une protéine recombinante par culture bactérienne est réalisée en quatre étapes distinctes : la préculture, la culture, l'induction à l'IPTG et la récupération des culots bactériens. Lors des trois premières étapes, il est important de travailler en conditions stériles. L'ensemble des manipulations sont donc réalisées à la flamme dans un rayon de 30 cm.

Dans un premier temps, 1 litre de solution de culture lysogène Lennox™ (LB Lennox™ pour *lysogeny broth*) d'une concentration de 20 g/L est préparé. Cette solution est stérilisée à l'étuve.

Pour la préculture, 50 mL du milieu LB Lennox™ sont versés dans un erlenmeyer avec chicanes de 250 mL. Une souche de *E. coli* transformée avec le gène de la stVDAC36 est ajoutée au milieu à l'aide d'une boucle d'inoculation. De l'ampicilline et du chloramphénicol sont ajoutés au milieu afin d'obtenir une concentration finale en antibiotiques valant respectivement 0.1 mg/mL et 0.02 mg/mL. L'erlenmeyer est placé à incuber sous agitation à 37 °C durant approximativement 16 h.

L'étape suivante correspond à la culture bactérienne. 250 mL de milieu de culture LB Lennox™ sont versés dans un erlenmeyer avec chicanes de 1 L. Des solutions d'ampicilline et de chloramphénicol sont ajoutées à ce milieu afin d'obtenir les mêmes concentrations finales en antibiotiques que lors de l'étape de préculture. Après addition de 5 mL de préculture aux 250 mL de LB, la culture est incubée pendant 1 h à 37 °C. L'évolution de la croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique (D.O.) de la solution à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Thermo Spectronic Genesys 8. Cette longueur d'onde est utilisée afin de rendre compte de la turbidité du milieu. Dès que la D.O. atteint une valeur comprise entre 0.5 et 0.8, l'étape d'induction peut être réalisée.

À cet effet, l'IPTG est utilisé en tant qu'analogue du lactose et permet l'expression de la protéine hétérologue dans la machinerie bactérienne. À partir d'un stock d'IPTG 1 M, un volume défini est ajouté aux 250 mL de culture afin d'obtenir la concentration voulue en IPTG. Ce milieu est incubé pendant 3 h sous

agitation à 37 °C. Il est souvent utile de récupérer un échantillon du milieu de culture avant et après induction afin d'effectuer une analyse rapide sur gel SDS-PAGE.

L'étape finale correspond à la récupération des culots bactériens et de la protéine d'intérêt produite. Le milieu de culture induit est divisé dans un nombre paire de flacons de centrifugation de 250 mL. Les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 2900x g à 4 °C à l'aide d'une centrifugeuse Eppendorf™ 5804 R. Les surnageants sont jetés et les culots sont resolubilisés dans 10 mL de milieu LB Lennox™ et sont versés dans des tubes Falcon™ qui sont centrifugés à nouveau pendant 15 minutes à 2900 x g et à 4 °C. Les surnageants sont à nouveau retirés et les culots bactériens conservé à -20 °C.

## II. Lyse chimique des culots bactériens

### *II.1 Composition des solutions de lyse*

Différentes solutions doivent être préparées afin de réaliser la lyse chimique des culots bactériens. Premièrement, une solution stock de 25 mM en fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF, un inhibiteur de sérine protéase) dans de l'isopropanol est conservée à 4 °C. Secondement, le tampon de lyse se compose de Tris-HCl 50 mM à pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 17 mM, Triton X-100 1 % (v/v) et de lysozyme 1 mg/mL. Troisièmement, le tampon de lavage est composé de Tris 20 mM à pH 8, NaCl 500 mM et de Triton X-100 2 % (v/v). Enfin, le tampon de solubilisation est un tampon phosphate 20 mM à pH 8 et SDS 1 % (w/v).

### *II.2 Protocole de lyse chimique*

Les culots sont décongelés à température ambiante et 8 mL de tampon de lyse y sont ajoutés pour solubiliser les culots. Le PMSF est ajouté à la solution afin d'avoir une concentration finale de 1 mM. Une masse de 32 mg de désoxycholate de sodium ainsi que 2 mg de DNase1 sont également ajoutés à la solution incubée pendant 2 h à 37 °C. Les flacons sont récupérés et centrifugés pendant 10 minutes à 9000 rpm et 4 °C avec une centrifugeuse VWR Mega Star 600. Le surnageant est

éliminé et le culot est ensuite resolubilisé dans 10 mL de tampon de lavage. Ce mélange est remis à centrifuger pendant 10 minutes à 5000 rpm et 4 °C. La resolubilisation du culot dans un tampon de lavage et la centrifugation de ce mélange sont répétés trois fois. Le surnageant est éliminé, le culot solubilisé dans 10 mL de tampon de solubilisation et mis sous agitation à température ambiante pendant approximativement 16 h.

### III. Purification des culots bactériens

L'étiquette 6xHis de la protéine solubilisée dans le SDS permet son interaction avec une colonne d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). La colonne est reliée à une FPLC (*fast protein liquid chromatography*) (Äkta Prime plus) et le programme Unicorn permet de générer le chromatogramme. L'ensemble des solutions utilisées avec la FPLC doivent être préalablement dégazées et filtrées.

#### *III.1 Conditionnement de la colonne IMAC*

La colonne IMAC utilisée est une colonne pré-packée HiTrap™ FF (GE healthcare). Il est nécessaire de charger cette colonne avec des ions Ni<sup>2+</sup>. Pour ce faire, la colonne et le système sont rincés à l'eau déminéralisée à un débit de 2 mL/min. Une fois l'ensemble des paramètres (UV à 280 nm, conductivité et pression) stabilisés au cours du temps, on peut opérer à un changement de solution dans le système. Une solution de tampon phosphate 20 mM à pH 7.4, 500 mM NaCl et 50 mM éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est passée sur la colonne à un débit de 1 mL/min. après plusieurs volumes de colonne, cette dernière doit être blanche. La colonne est relavée à l'eau déminéralisée. Le programme est mis en mode LOAD afin que la boucle d'injection soit isolée du système et 5 mL d'une solution 0.1 M NiSO<sub>4</sub> sont injectés. Le programme mis en mode INJECT, la colonne obtient une coloration bleue homogène. Le système et la colonne sont rincés à l'eau et à l'éthanol 20 % (v/v). La colonne se conserve à 4 °C dans l'éthanol 20 %.

### ***III.2 Purification***

Les culots resolubilisés sont passés à travers un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  en polyéthersulfone. Deux solutions de tampon phosphate sont préparées : i) le tampon de fixation composé de phosphate 20 mM à pH 8, 100 mM NaCl et 0.1 % SDS, ii) le tampon d'élution composé de phosphate 20 mM à pH 8, 100 mM NaCl, 0.1 % SDS et 250 mM imidazole. Il est important d'ajouter le SDS en solution après le dégazage car il entraîne la formation de mousse (de par sa nature de détergent).

Le système et la colonne sont rincés à l'eau déminéralisée et équilibrés avec le tampon de fixation. Plusieurs volumes de colonne doivent passer afin d'obtenir des paramètres stables. Un volume de 5mL d'échantillon protéique est injecté dans la boucle (le système doit être en mode LOAD). Un débit de 0.8 mL/min est appliqué et le *flow through* (FT) est récupéré. Un gradient de concentration de 0 à 100 % sur 20 mL de tampon d'élution est passé à travers le système. Les échantillons correspondant à la bande d'élution de la protéine sont récupérés et migrés sur gel SDS-PAGE. En fin de purification, le système et la colonne sont rincés à l'eau déminéralisée ainsi qu'à l'éthanol 20 % et la colonne est stockée à 4 °C dans l'éthanol 20 %.

### ***III.3 Elimination de l'imidazole***

Les échantillons protéiques récupérés après purification contiennent de l'imidazole qui absorbe en UV dans la même gamme de longueur d'onde que les acides aminés aromatiques. Pour éliminer l'imidazole, une colonne PD Minitrap™ G-10 est fixée sur un statif, le capuchon en est retiré et l'extrémité inférieure est coupée afin de retirer le liquide de stockage. Premièrement, la colonne est équilibrée en faisant passer 7.5 mL de tampon phosphate 20 mM à pH 8, 100 mM NaCl et 0.1 % SDS. Deuxièmement, un volume de 300  $\mu\text{L}$  d'échantillon protéique est déposé sur la colonne et le FT est récupéré. Dernièrement, 500  $\mu\text{L}$  de tampon d'équilibration utilisé préalablement sont versés sur la colonne afin de faire éluer la protéine. La colonne est lavée avec 7.5 mL d'eau déminéralisée et l'opération est répétée tant qu'il reste des échantillons protéiques à faire passer. La colonne est conservée à 4 °C dans l'eau déminéralisée.



## IV. Electrophorèse SDS-PAGE

### *IV.1 Préparation d'un gel SDS-PAGE*

La préparation d'un gel SDS-PAGE se fait sous hotte en utilisant des gants en nitrile suivant les consignes de sécurité sur la manipulation de l'acrylamide. Tout le matériel servant à manipuler l'acrylamide est considéré comme potentiellement contaminé et doit rester sous hotte ou être jeté dans une poubelle adéquate.

Un gel SDS-PAGE typique se divise en deux parties : le *stacking gel* (ou gel de concentration) et le *running gel* (ou gel de séparation). La composition de ces gels est donnée dans le Tableau 8. Les solutions des gels sont préparées dans un Falcon™ et le tétraméthyléthylènediamine (TEMED), l'amorceur de la polymérisation, est ajouté au dernier moment. Le *running gel* est versé en premier dans une cassette Novex Life Technologies™ jusqu'à en remplir 75 % du volume. De l'éthanol 20 % est versé par-dessus le *running gel* le temps de la polymérisation. Une fois le *running gel* polymérisé, l'éthanol est retiré et le *stacking gel* peut être versé jusqu'à la limite de la cassette. Un peigne comportant le nombre de puits adéquat est ajouté par-dessus. Lorsque la polymérisation du *stacking gel* est terminée les cassettes peuvent être conservées à 4 °C pendant plusieurs jours après avoir été emballées dans du papier imbibé d'eau.

Tableau 8 : Composition pour la préparation de 2 gels SDS-PAGE de 12 % en polyacrylamide. SDS 10 % signifie dodécylsulfate de sodium 10 % (w/v) et APS 10 % signifie persulfate d'ammonium 10 % (w/v). L'acrylamide est une solution commerciale de 30 % d'acrylamide et de bis-acrylamide.

<i>Stacking gel</i>		<i>Running gel</i>	
Composé	Volume (mL)	Composé	Volume (mL)
Eau distillée	5.085	Eau distillée	3.000
Acrylamide	5.940	Acrylamide	0.660
Tampon Tris-HCl 1.5M pH 8.8	3.750	Tampon Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.260
SDS 10 %	0.150	SDS 10 %	0.050
APS 10 %	0.075	APS 10 %	0.025
TEMED	0.0075	TEMED	0.005

#### *IV.2 Préparation des échantillons*

La préparation des échantillons se fait de la manière suivante : dans des aliquots, 10  $\mu$ L d'échantillon protéique et 10  $\mu$ L de tampon de charge sont mélangés. Un volume de 10 ou 15  $\mu$ L de cette solution est déposé à la micropipette dans les puits du gel SDS-PAGE. Le tampon de charge se compose d'un tampon Tris-HCl à pH 6.8, glycérol 20 % (w/v), SDS 2 % (w/v), bleu de bromophénol 0.02 % (w/v) et  $\beta$ -mercapto-éthanol 0.07 M.

#### *IV.3 Electrophorèse*

Un tampon de migration est utilisé lors de l'électrophorèse. Il se compose d'un tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 200 mM et SDS 0.1 % (w/v).

La cellule électrophorèse utilisée (Novex Life Technologies™ XCell SureLock™) se compose de deux cassettes qui se font face et entre lesquelles 1 L de tampon de migration est versé. Les peignes des cassettes sont retirés et les puits se trouvent immergés dans le tampon de migration. La cellule est connectée à un générateur réglé sur une tension de 200 V et avec un temps de migration de 1h30. Une fois la migration terminée, les gels sont sortis de leur cassette et rincés à l'eau déminéralisée. Le gel est ensuite coloré avec une solution de coloration (bleu de

Coomassie R-250 30 mM, méthanol 11 M et acide acétique 1.7 M) pendant 30 à 45 minutes sur un agitateur orbital. Le gel est ensuite rincé à l'eau déminéralisée et déposé dans une solution de décoloration (méthanol 7.4 M et acide acétique 1.7 M) pendant 1 h. Les procédures de coloration et de décoloration du gel nécessitent de travailler avec des gants en nitrile.

## V. Renaturation de la stVDAC36

### *V.1 Méthode SDS-MPD*

La stVDAC36 est renaturée en utilisant la méthode SDS-MPD développée au sein du laboratoire CPB. La protéine se trouve dans une solution tampon phosphate 20 mM à pH 8, 100 mM NaCl et 0.1 % SDS. L'échantillon final qui contient la protéine renaturée doit avoir une concentration en protéine d'approximativement 0.1 mg/mL afin de pouvoir faciliter les mesures de dichroïsme circulaire.

Deux solutions sont préalablement préparées : une solution tampon phosphate 20 mM à pH 8 et une solution 100 mM SDS. La solution commerciale de MPD a une concentration de 7.8 M. Afin d'avoir un mélange homogène, l'ajout de MPD se fait sous agitation. Pour renaturer la stVDAC36 il est nécessaire d'ajouter à un aliquot de 1.5 mL dans l'ordre suivant : 268  $\mu$ L de tampon phosphate, 11  $\mu$ L de SDS, 32  $\mu$ L d'eau déminéralisée et 64  $\mu$ L de MPD. Un volume de 125  $\mu$ L de stVDAC36 est ajouté à cette solution au goutte à goutte et sous agitation au vortex. Les concentrations finales dans l'échantillon protéique sont de 3 mM en SDS et de 1 M en MPD.

### *V.2 Caractérisation par dichroïsme circulaire*

La renaturation est suivie par dichroïsme circulaire (CD) en utilisant un spectropolarimètre MOS-500™ thermostaté à 20 °C et une cellule en quartz de trajet optique de 1 mm. Quatre scans sont réalisés avec un balayage de 20 nm/min, un intervalle de 1 nm et un temps d'intégration digitale de 2 s. L'ensemble des scans sont ensuite moyennés. À partir des spectres CD obtenus, des pourcentages

en structures secondaires peuvent être calculés. Pour ce faire, le serveur d'analyse Dichroweb est utilisé avec l'algorithme CDSSTR et le set de référence SP175.

### V.3 Caractérisation par spectroscopie de fluorescence

La renaturation est suivie par spectroscopie de fluorescence à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent Cary Eclipse™ dont la source lumineuse est une lampe à xénon. La longueur d'onde d'excitation propre aux tyrosines est 275 nm et 295 nm pour les tryptophanes. Il est possible d'exciter simultanément ces deux acides aminés aromatiques à 280 nm. L'ensemble des mesures sont réalisées dans une cellule en quartz de trajet optique de 10 mm.

## VI. Test de liaison ATP-stVDAC36

Afin de vérifier si la stVDAC36 garde sa fonction après sa renaturation, elle est renaturée en présence d'ATP. Différents échantillons sont préparés avec différentes concentrations en ATP (Tableau 9). Plusieurs solutions sont préparées : une solution SDS 100 mM, une solution commerciale de MPD 7.8 M et une solution d'ATP  $15.76 \times 10^{-6} M$ . Le protocole de renaturation est identique à celui présenté au point V.a. Les échantillons sont mis à incuber pendant approximativement 16 h à 25 °C.<sup>72</sup>

Tableau 9 : Composition des différents échantillons pour le test de liaison ATP-stVDAC36.

Ratio VDAC : ATP	Vol. (μL) stVDAC36	Vol. (μL) SDS	Vol. (μL) MPD	Vol. (μL) ATP	Vol. (μL) TP8	Vol. total (μL)
1:100	375	3.75	16	105	0	500
1:80	375	3.75	16	84	21	500
1:60	375	3.75	16	63	42	500
1:50	375	3.75	16	52.5	52.5	500
1:40	375	3.75	16	42	63	500
1:30	375	3.75	16	31.5	73.5	500

Deux groupes contrôle sont réalisés de la même manière. Le premier en utilisant la stVDAC36 dénaturée (en remplaçant le SDS et le MPD par de l'eau déminéralisée) et le second sans protéines.

## VII. Préparation de protéoliposomes

### VII.1 Préparation de liposomes

Les liposomes sont préparés en suivant la méthode d'hydratation d'une couche mince de lipide.<sup>76</sup> Une solution tampon phosphate 20 mM à pH 7.4 est réalisée. Les différentes étapes comprises dans la méthode d'hydratation d'une couche mince sont illustrées à la Figure 24. Pour former 4 mL de solution de liposomes avec une concentration de 1 mg/mL, 4 mg de lipides sont mis en solution dans 1 mL de chloroforme. Le ballon contenant cette solution est mis à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un film blanc sur les parois. Cette couche est hydratée avec 4 mL de solution tampon. Le film doit alors avoir totalement disparu. La solution aqueuse blanche contenant des vésicules multilamellaires est mise au sonicateur (Ultrasonic cleaner<sup>TM</sup> DW-5200DTD) durant 30 secondes à 40 kHz. Finalement, 10 étapes de gel-dégel de la solution au moyen d'un bain d'azote liquide et d'un bain d'eau chaude sont réalisées.

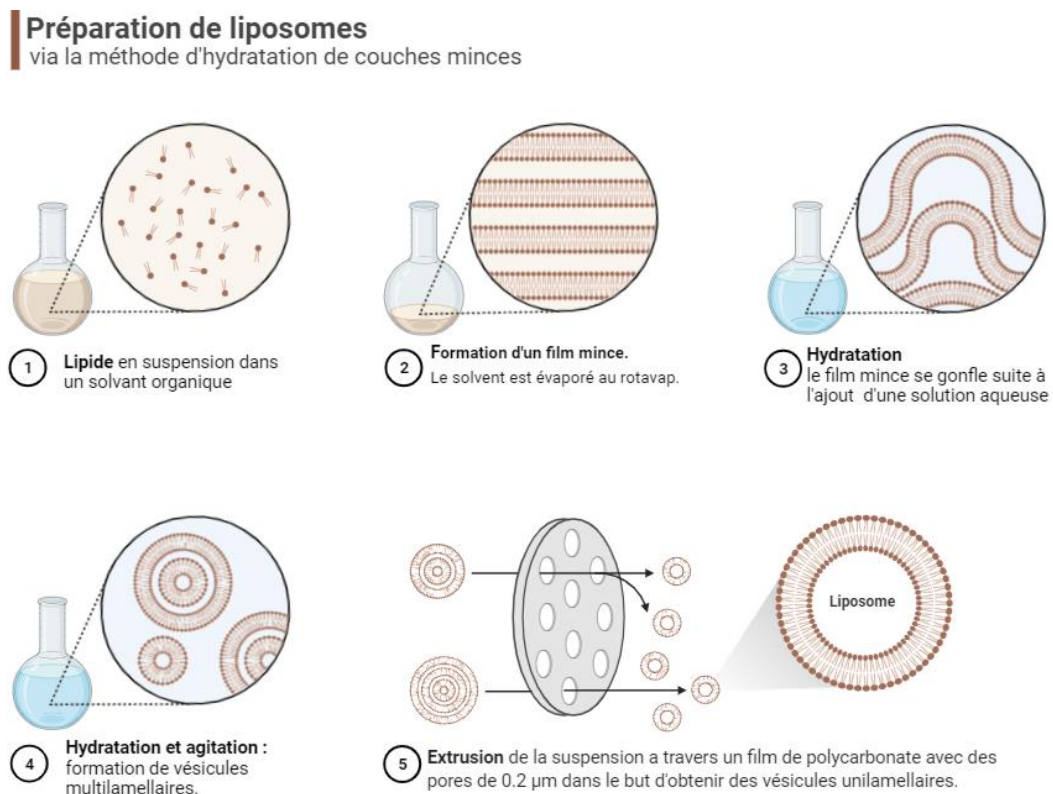


Figure 24 : Illustration de la méthode de préparation de liposomes par hydratation de couches minces

La dernière étape consiste à faire passer la solution obtenue à travers une extrudeuse afin d'avoir un échantillon de liposomes unilamellaires ayant une distribution de taille uniforme (Fig. 25). Les filtres supports et la membrane en polycarbonate sont hydratés dans le tampon et placés dans l'extrudeuse. La membrane en polycarbonate a une taille de  $0.2 \mu\text{m}$ . L'extrusion de la solution en tant que telle se fait en prélevant 1 mL de solution de liposome dans la seringue A et en effectuant 15 allers-retours à travers la membrane. L'échantillon à analyser est récupéré dans la seringue B. Les échantillons sont récupérés dans des cellules en polystyrène fermées par un bouchon et rendues hermétiques à l'environnement extérieur par du Parafilm™. Les échantillons sont stockés pendant plusieurs jours à  $4^\circ\text{C}$ .

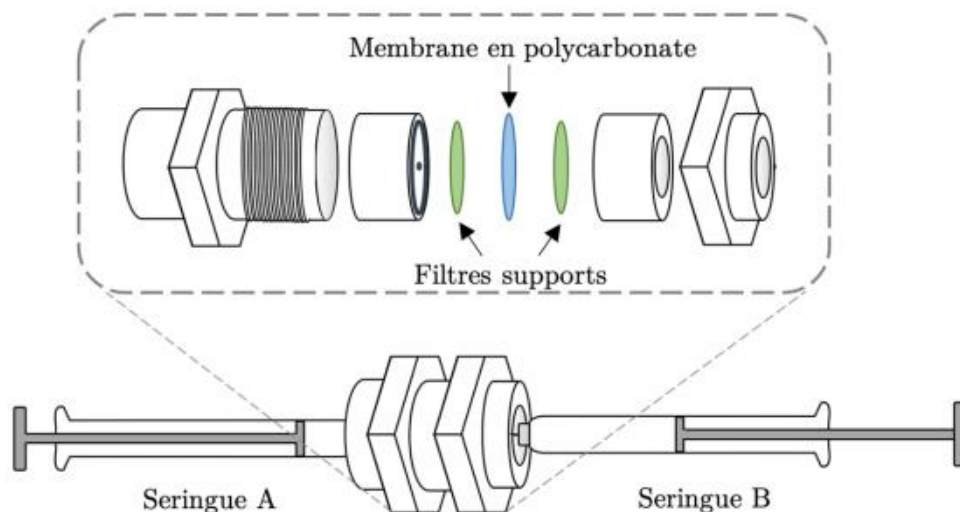


Figure 25 : Schéma du montage d'une extrudeuse.

## VII.2 Préparation de protéoliposomes

Les protéoliposomes peuvent être préparés avec un échantillon protéique renaturé préalablement ou non *via* la méthode SDS-MPD. Pour réaliser des protéoliposomes, à 1 mL de liposomes à une concentration de 1 mg/mL sont ajoutés  $2.8 \mu\text{L}$  de Triton X-100. La solution est mise sous agitation pendant 30 minutes à  $20^\circ\text{C}$ . Un volume d'échantillon protéique (renaturé ou non) est ajouté à la solution suivant un rapport lipide/protéine (w/w) de  $\sim 20$ . La solution est alors mise sous agitation pendant 2 h à  $20^\circ\text{C}$ . Le Triton X-100 est éliminé de l'échantillon par ajout de Bio-Beads™ avec un ratio détergent/Bio-Beads™ (w/w) de  $\sim 60$ . L'échantillon

est à nouveau mis à incuber sous agitation pendant 2 h à 20 °C. Les Bio-Beads™ sont retirés de l'échantillon et les protéoliposomes peuvent être analysés.

### *VII.3 Analyses par diffusion dynamique de la lumière*

Les échantillons contenant les liposomes ou protéoliposomes sont récoltés dans une cellule DLS à quatre faces de 1 cm de trajet optique en polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Il est important que la cellule soit propre et ne présente pas d'impuretés qui pourraient interférer avec les mesures de l'instrument (Horiba Zetasizer SZ-100). Les échantillons sont préalablement filtrés sur des filtres 0.2 µm en polyéthersulfone.

### *VII.4 Analyses par mesures du potentiel zêta*

Un volume d'échantillon est inséré à la seringue à l'intérieur d'une cellule comportant deux électrodes recouvertes de carbone. Les mesures sont effectuées avec l'instrument Horiba Zetasizer SZ-100.

## **VIII. Préparation de liposomes recouvert de polyélectrolytes**

La préparation de liposomes recouverts de polyélectrolytes nécessite de travailler à 4 °C. Un volume de solution de liposomes POPC-POPG 90/10 (w/w) (0.1 mg/mL dans tampon phosphate 50mM à pH 8) est ajouté au goutte à goutte à un volume de PLL de 0.1 mg/mL (dans le même tampon). Le tout se fait sous agitation au vortex pendant 20min. Dès que la manipulation est terminée, l'éventuel excès de polyélectrolyte est retiré par centrifugation pendant 30 minutes à 4°C et 100 x g.<sup>31</sup> Pour ce faire, on utilise des flacons Vivaspin Turbo Protein Concentrator™ ayant un cut-off de 100 kDa.

Les échantillons récupérés sont filtrés sur des filtres en polyéthersulfone de 0.2 µm et analysés par DLS et mesures du potentiel zêta.

## *Partie 6 - Bibliographie*



## I. Bibliographie

1. Tathe, A., *et al.* A brief review: Biomaterials and their application. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2**, 19–23 (2010).
2. Navarro, M., *et al.* Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **5**, 1137–1158 (2008).
3. Festas, A. J., *et al.* Medical devices biomaterials – A review. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part L J. Mater. Des. Appl.* **234**, 218–228 (2020).
4. Ramasamy, T. *et al.* Layer-by-layer assembly of liposomal nanoparticles with PEGylated polyelectrolytes enhances systemic delivery of multiple anticancer drugs. *Acta Biomater.* **10**, 5116–5127 (2014).
5. Kay, M. A., *et al.* Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* **7**, 33–40 (2001).
6. Whittaker, G. R. Virus nuclear import. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 733–747 (2003).
7. Tenchov, R., *et al.* Lipid Nanoparticles-From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano* (2021).
8. Jeyanathan, M. *et al.* Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 615–632 (2020).
9. Rideau, E., *et al.* Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 8572–8610 (2018).
10. Garni, M., *et al.* Biopores/membrane proteins in synthetic polymer membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859**, 619–638 (2017).
11. Raven, P. H., *et al.* *Biologie*. 5<sup>ème</sup> édition, *De Boeck Supérieur* (2020).
12. Jala, R. C. R., *et al.* A comprehensive review on natural occurrence, synthesis and biological activities of glycolipids. *Carbohydr. Res.* **516**, 108556 (2022).
13. Krause, M. R. & Regen, S. L. The Structural Role of Cholesterol in Cell Membranes: From Condensed Bilayers to Lipid Rafts. (2014).
14. Singer, S. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* bd. 175 720–731 (1972).
15. Gu, R.-X., *et al.* Cholesterol Flip-Flop in Heterogeneous Membranes. *J. Chem. Theory Comput* **15**, 32 (2019).

16. Chiantia, S. & London, E. Lipid Bilayer Asymmetry. i *Encyclopedia of Biophysics* 1250–1253 (2013).
17. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **437**, 640–647 (2005).
18. Park, S. J. & Seo, M. K. *Interface Applications in Nanomaterials. Interface Science and Technology* bd. 18 (2011).
19. Dwivedi, C. & Verma, S. Review on Preparation and Characterization of Liposomes with Application. *J. Sci. Innov. Res. Rev.* **2**, 2320–4818 (2013).
20. Geertsma, E. R., *et al.* Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nat. Protoc.* **3**, 256–266 (2008).
21. Rigaud, J. L. & Levy, D. Reconstitution of membrane proteins in liposomes. *Methods Mol. Biol.* **372**, 65–86 (2003).
22. Jia, Y. & Li, J. Reconstitution of FoF1-ATPase-based biomimetic systems. *Nat. Rev. Chem.* **3**, 361–374 (2019).
23. Sun, G., *et al.* A layer-by-layer self-assembly approach to developing an aquaporin-embedded mixed matrix membrane. *RSC Adv.* **3**, 473–481 (2013).
24. Bloß, T., *C et al.* Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214**, 783–791 (2002).
25. Ciancaglini, P. *et al.* Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys. Rev.* **4**, 67–81 (2012).
26. Volodkin, D., *et al.* Coating of negatively charged liposomes by polylysine: Drug release study. *J. Control. Release* **117**, 111–120 (2007).
27. Kim, J. O. *et al.* Layer-by-layer coated lipid-polymer hybrid nanoparticles designed for use in anticancer drug delivery. *Carbohydr. Polym.* **102**, 653–661 (2014).
28. Van der Meeren, L., *et al.* Classification of analytics, sensorics, and bioanalytics with polyelectrolyte multilayer capsules. *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 5015–5029 (2020).
29. Reurink, D. M., *et al.* Aquaporin-containing proteopolymersomes in polyelectrolyte multilayer membranes. *Membranes.* **10**, 1–18 (2020).
30. Volodkin, D., *et al.* Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 280–290 (2007).

31. Hermal, F., *et al.* Development and characterization of layer-by-layer coated liposomes with poly(L-lysine) and poly(L-glutamic acid) to increase their resistance in biological media. *Int. J. Pharm.* **586**, (2020).
32. Ge, L., *et al.* Phospholipid liposomes stabilized by the coverage of polyelectrolyte. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **221**, 49–53 (2003).
33. Volodkin, D. *et al.* Composite multilayered biocompatible polyelectrolyte films with intact liposomes: Stability and temperature triggered dye release. *Soft Matter* **4**, 122–130 (2007).
34. Campbell, N. A. *et al.* *Campbell Biology*. 10<sup>th</sup> edition. New York, Pearson Education (2013).
35. Kalwarczyk, T., *et al.* Biologistics-Diffusion coefficients for complete proteome of Escherichia coli. *Bioinformatics* **28**, 2971–2978 (2012).
36. Engel, A. & Gaub, H. E. Structure and mechanics of membrane proteins. *Annual Review of Biochemistry*. **77** 127–148 (2008).
37. Sachs, J. N. & Engelman, D. M. Introduction to the membrane protein reviews: The interplay of structure, dynamics, and environment in membrane protein function. *Annual Review of Biochemistry*. **75** 707–712 (2006).
38. Villaverde, A. & Mar Carrio, M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 1385–1395 (2003).
39. Mathieu, K. *et al.* Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from E. coli is highly dependent upon the strain. *Sci. Rep.* **9**, 1–15 (2019).
40. Thomas, J. G. & Baneyx, F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli cells overexpressing heat-shock proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 11141–11147 (1996).
41. Perpète, E. A. & Michaux, C. Unravelling the refolding of membrane proteins, one of the most challenging therapeutic targets. *Med. Clin. Sci.* **1**, 1–2 (2019).
42. Yamaguchi, S., *et al.* Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnol. J.* **8**, 17–31 (2013).
43. Gull, N. *et al.* Refolding of bovine serum albumin via artificial chaperone protocol using gemini surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **364**, 157–162 (2011).
44. Michaux, C., *et al.* Unravelling the mechanisms of a protein refolding process based on the association of detergents and co-solvents. *J. Pept. Sci.* 485–491 (2016).

45. Michaux, C. & Perpète, E. A. Unravelling the refolding of membrane proteins, one of the most challenging therapeutic targets. *Med. Clin. Sci.* **1**, (2019).
46. Roussel, G., *et al.* The role of 2-methyl-2, 4-pentanediol in sodium dodecyl sulfate micelle dissociation unveiled by dynamic light scattering and molecular dynamics simulations. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **114**, 357–362 (2014).
47. Michaux, C., *et al.* Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS: A structural study. *BMC Struct. Biol.* **8**, 1–7 (2008).
48. Roussel, G., *et al.* Towards a universal method for protein refolding: The trimeric beta barrel membrane Omp2a as a test case. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 417–423 (2013).
49. Najbauer, E. E. *et al.* Structure, gating and interactions of the voltage-dependent anion channel. *Eur. Biophys. J.* **50**, 159–172 (2021).
50. Shoshan-Barmatz, V. & Gincel, D. The voltage-dependent anion channel characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem. Biophys.* **39**, 279–292 (2003).
51. Salinas, T. *et al.* The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18362–18367 (2006).
52. Lopes-Rodrigues, M. *et al.* Structural and functional characterization of *Solanum tuberosum* VDAC36. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **88**, 729–739 (2020).
53. Colombini, M. VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 1457–1465 (2012).
54. Colombini, M., *et al.* The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is regulated by a synthetic polyanion. *BBA - Biomembr.* **905**, 279–286 (1987).
55. Shoshan-Barmatz, V., *et al.* VDAC1: from structure to cancer therapy. (2012).
56. Zimmerberg, J. & Parsegian, V. A. Polymer inaccessible volume changes during opening and closing of a voltage-dependent ionic channel. *Nature* **323**, 36–39 (1986).
57. Shuvo, S. R., *et al.* The N-terminus of VDAC: Structure, mutational analysis, and a potential role in regulating barrel shape. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 1350–1361 (2016).
58. Ujwal, R. *et al.* The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17742–17747 (2008).

59. Zachariae, U. *et al.*  $\beta$ -Barrel mobility underlies closure of the voltage-dependent anion channel. *Structure* **20**, 1540–1549 (2012).
60. Choudhary, O. P. *et al.* Structure-guided simulations illuminate the mechanism of ATP transport through VDAC1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 626–632 (2014).
61. Noskov, S. Y., *et al.* ATP Transport through VDAC and the VDAC–Tubulin Complex Probed by Equilibrium and Nonequilibrium MD Simulations. (2013).
62. Rostovtseva, T. K. & Bezrukov, S. M. ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys. J.* **74**, 2365–2373 (1998).
63. Krammer, E. M., *et al.* Dual mechanism of ion permeation through VDAC revealed with inorganic phosphate ions and phosphate metabolites. *PLoS One* **10**, 1–25 (2015).
64. Yehezkel, G., *et al.* Nucleotide-binding sites in the voltage-dependent anion channel: Characterization and localization. *J. Biol. Chem.* **281**, 5938–5946 (2006).
65. Marbach, A. & Bettenbrock, K. Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J. Biotechnol.* **157**, 82–88 (2012).
66. Tessier, L. *Technologies des bioprocédés industriels.* (2018).
67. Sigma-Aldrich. Optimizing Purification of Histidine-Tagged Proteins. 1–13 <https://www.sigmaaldrich.com/BE/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-purification/optimizing-purification-of-histidine-tagged-proteins> (2021).
68. Greenfield, N. & Fasman, G. D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **8**, 4108–4116 (1969).
69. Michaux, C., *et al.* Refolding SDS-Denatured Proteins by the Addition of Amphipathic Cosolvents. *J. Mol. Biol.* **375**, 1477–1488 (2008).
70. Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400 (2008).
71. Miles, A. J., *et al.* DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Sci.* 1–10 (2021).
72. Li, Q. *et al.* Recognition and binding of voltage-dependent anion channel-1 with ATP and NADH by spectroscopic analysis and molecular docking. *RSC Adv.* **6**, 13407–

- 13417 (2016).
73. Bayrhuber, M. *et al.* Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15370–15375 (2008).
74. Surana, N. K. *et al.* Evidence for conservation of architecture and physical properties of Omp85-like proteins throughout evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14497–14502 (2004).
75. Jyothisri, K., *et al.* Purification and characterization of a major 40 kDa outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *FEBS Lett.* **443**, 57–60 (1999).
76. Zhang, H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods Mol. Biol.* **1522**, 17–22 (2017).

