



Université de Liège

Département des Sciences de la Vie

Faculté des Sciences

# Application d'une méthode de renaturation à la protéine découplante-1 (UCP-1) et à la métallo- $\beta$ -lactamase L1 (L1)

**Mémoire présenté par Elise PERET**

En vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire, à  
finalité approfondie

**Année académique 2020-2021**

**Promoteur :** André Matagne (ULiège)

**Co-promotrice :** Catherine Michaux (UNamur)



# Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à l'encadrement, l'accueil et le soutien de nombreuses personnes auxquelles j'aimerais témoigner toute ma reconnaissance.

En premier lieu, je souhaite remercier mon promoteur et ma co-promotrice, André Matagne et Catherine Michaux, d'avoir accepté d'encadrer ce projet. Il y a un an, je contactais Catherine Michaux afin de voir si je pouvais faire mes trois mois de stage de 2<sup>ème</sup> master au sein de son laboratoire. Après un coup de fil passionnant, elle m'a proposé de réaliser non pas mon stage mais mon mémoire à partir de ses recherches. Quelques mois plus tard, je contactais André Matagne afin de lui proposer le projet et c'est ainsi qu'est née cette recherche, fruit de la collaboration entre les universités de Liège et de Namur.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des chercheurs, doctorants, mémorants et techniciens du CIP (Centre d'Ingénierie des Protéines de l'ULiège) qui m'ont accueillie avec bienveillance, intégrée à leurs équipes et transmis leurs connaissances tout au long de mon mémoire. J'exprime également toute ma gratitude à mon promoteur André Matagne pour ses conseils et remarques avisés lors de nos entrevues. Je remercie particulièrement Romain Malempré, mon encadrant, pour son partage d'expérience, sa bonne humeur, sa gentillesse et son suivi.

Merci aux membres du CPB (laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules de l'UNamur) de m'avoir également accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir fait confiance, autant dans mon travail individuel que dans l'encadrement des stagiaires. Je remercie ma co-promotrice Catherine Michaux pour sa disponibilité, son écoute et son suivi. Merci également à Eric Perpète ainsi qu'aux autres membres de l'équipe pour leurs conseils pertinents lors des LabMeetings et pour leur bonne humeur.

Je remercie également l'ensemble des professeurs et des assistants de l'ULiège du master BBMC et de l'UNamur du bachelier SBIM qui m'ont transmis leurs savoirs tout au long de mon cursus universitaire.

Et pour terminer, je remercie Alice pour sa présence encourageante et son soutien indéfectible lors de mon parcours universitaire. Un grand merci également à mes parents de m'avoir permis de suivre ma passion jusqu'ici et de toujours croire en moi. Merci à mes grands-parents qui connaissent par cœur l'intitulé de mon master, à défaut de le comprendre. Bien évidemment, je n'oublie pas Fred et Elodie du CIP ainsi que Laurane et Virgile du CPB, de belles amitiés nées dans le cadre de ce mémoire.



## Application d'une méthode de renaturation à la protéine découplante-1 (UCP-1) et à la métallo- $\beta$ -lactamase L1 (L1)

**Résumé :** Une méthode associant un détergent anionique (le dodécylsulfate de sodium, SDS) et un cosolvant (le 2-méthyle-2,4-pentanediol, MPD) a montré une efficacité de renaturation sur différents types de protéines solubles et membranaires. Ce travail cherche à approfondir la connaissance de ce processus de renaturation en appliquant la méthode à deux protéines : la protéine découplante-1 (UCP-1) et la métallo- $\beta$ -lactamase L1 (L1). Trois grandes étapes communes aux deux protéines ont été suivies : leurs productions en grand volume sous forme de corps d'inclusion (CI), leurs purifications et leurs expériences de repliement. Il apparaît que la méthode SDS/MPD n'est pas favorable au repliement de la protéine L1 et que les résultats quant au repliement d'UCP-1 ne sont pas suffisants pour déterminer l'efficacité de la méthode sur celle-ci.

**Mots-clefs :** renaturation, méthode SDS/MPD, protéine découplante-1, métallo- $\beta$ -lactamase L1

**Année académique :** 2020-2021

**Laboratoires d'accueil :** CIP (Centre d'Ingénierie des Protéines, ULiège) et CPB (Chimie Physique des Biomolécules, UNamur)

**Nom et prénom de l'étudiante :** PERET Elise

**Nom et prénom du promoteur :** MATAGNE André

**Nom et prénom de la co-promotrice :** MICHAUX Catherine



## Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Les protéines : généralités .....	1
1.2. Production de protéines recombinantes sous forme de corps d'inclusion .....	2
1.3. Techniques de repliement des protéines dénaturées .....	3
1.3.1. Repliement par dialyse et par dilution directe .....	3
1.3.2. Repliement sur colonne .....	3
1.3.3. La méthode SDS-MPD .....	4
1.4. La protéine découplante-1 (UCP-1) .....	6
1.5. La métallo- $\beta$ -lactamase L1 (L1) .....	8
1.5.1. Les $\beta$ -lactamases : généralités.....	8
1.5.2. L1 : spécificités .....	9
1.6. Objectifs du travail .....	10
2. Matériels et méthodes.....	11
2.1. PARTIE UCP-1 .....	11
2.1.1. Production de corps d'inclusion d'UCP-1 .....	11
2.1.1.1. Transformation de souches CD41(DE3).....	11
2.1.1.2. Surexpression d'UCP-1 (préculture, culture et induction) .....	11
2.1.1.3. Lyse bactérienne et récupération des corps d'inclusion .....	12
2.1.2. Purification par chromatographie d'affinité .....	12
2.1.3. Production en grand volume d'UCP-1 .....	13
2.1.3.1. Surexpression d'UCP-1 .....	13
2.1.3.2. Lyse bactérienne, récupération et lavage des corps d'inclusion.....	14
2.1.3.3. Purification par chromatographie d'affinité .....	14
2.1.3.4. Dessalage et détermination de la concentration d'UCP-1 .....	15
2.1.4. Repliement d'UCP-1 .....	16
2.1.4.1. Plan d'expérience de repliement d'UCP-1 .....	16
2.1.4.2. Expérience de repliement d'UCP-1 en plaque 96 puits .....	16
2.1.4.3. Mesures CD des meilleures conditions de renaturation.....	17
2.2. PARTIE L1.....	18
2.2.1. Biologie moléculaire.....	18
2.2.1.1. Extraction et digestion du plasmide pET9a-L1. ....	18
2.2.1.2. Construction du plasmide pET9a-L1-6xHis par ligature.....	18
2.2.1.3. Transformation bactérienne, précultures et séquençage du plasmide pET9a-L1-6xHis .....	19
2.2.2. Optimisation de la production de corps d'inclusion de L1 .....	20





2.2.2.1. Transformation de souches <i>d'Escherichia coli</i> BL21(DE3) et KRX .....	20
2.2.2.2. Optimisation de la surexpression de L1 .....	20
2.2.2.3. Quantification de L1 par SDS-PAGE .....	20
2.2.3. Production de L1 .....	21
2.2.3.1. Surexpression de L1 .....	21
2.2.3.2. Lyse bactérienne, récupération et lavage des corps d'inclusion .....	22
2.2.3.3. Purification par chromatographie d'affinité de L1 .....	22
2.2.3.4. Western-blot .....	23
2.2.4. Repliement de L1 .....	24
2.2.4.1. Plan d'expérience de repliement de L1 .....	24
2.2.4.2. Expérience de repliement de L1 en plaque 96 puits .....	25
2.2.4.3. Quantification de la concentration de L1 par gel SDS-PAGE .....	25
2.2.4.4. Mesure de l'activité enzymatique de L1 .....	26
2.2.4.5. Dessalage par chromatographie d'affinité .....	27
3. Résultats et discussion .....	28
3.1. PARTIE UCP-1 .....	28
3.1.1. Production de corps d'inclusion .....	28
3.1.2. Purification par chromatographie d'affinité .....	29
3.1.3. Production en grand volume d'UCP-1 .....	31
3.1.3.1. Production, extraction et lavage des corps d'inclusion .....	31
3.1.4. Purification par chromatographie d'affinité et dessalage .....	33
3.1.4. Repliement d'UCP-1 .....	35
3.1.4.1. Génération du plan d'expérience de repliement et de la plaque 96 puits .....	35
3.2. PARTIE L1 .....	39
3.2.1. Biologie moléculaire .....	39
3.2.1.1. Extraction et digestion du plasmide pET9a-L1 .....	39
3.2.1.2. Transformation bactérienne, précultures et séquençage du plasmide pET9a-L1-6xHis .....	40
3.2.2. Optimisation de la production de corps d'inclusion .....	40
3.2.2.1. Quantification de L1 par SDS-PAGE .....	41
3.2.3. Production de L1 .....	43
3.2.3.1. Production, extraction et lavage des corps d'inclusion .....	43
3.2.3.2. Purifications par chromatographie d'affinité et dessalages .....	45



3.2.4. Repliement de L1.....	51
3.2.4.1. Génération du plan d'expérience de repliement et de la plaque 96 puits .....	51
3.2.4.2. Quantification de la concentration de L1 par SDS-PAGE.....	51
3.2.4.3. Mesure de l'activité spécifique de L1 .....	51
3.2.4.4. Mesure du taux de repliement de L1 avant et après dessalage par chromatographie d'affinité .....	51
4. Conclusions et perspectives.....	53
Bibliographie	
Annexes	



## Liste des abréviations

<b>AAC</b>	Transporteur ADP/ATP ( <i>ADP/ATP Carrier</i> )
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BSA</b>	Albumine sérique bovine ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CAPS</b>	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonique
<b>CD</b>	Dichroïsme circulaire
<b>CI</b>	Corps d'inclusion
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GSH</b>	Glutathion (forme réduite)
<b>GSSG</b>	Disulfure de glutathion (forme oxydée)
<b>IMAC</b>	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés ( <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> )
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
<b>L1</b>	Métallo- $\beta$ -lactamase L1
<b>LB</b>	<i>Luria-Bertani</i> (milieu)
<b>MPD</b>	2-méthyle-2,4-pentanediol
<b>OG</b>	Octyl- $\beta$ -glucoside
<b>PenG</b>	Pénicilline G ou benzylpénicilline
<b>PMSF</b>	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>SDS-PAGE</b>	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
<b>SOC</b>	<i>Super Optimal Broth</i> (milieu)
<b>TAB</b>	Tissu adipeux brun
<b>Tris</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>UCP-1</b>	Protéine découplante-1 ( <i>Uncoupling protein 1</i> )



## Liste des figures

**Figure 1.** Corps d'inclusion visualisés par microscopie électronique à balayage.

**Figure 2.** Récupération de la protéine d'intérêt à partir de CI.

**Figure 3.** Structure chimique du dodécylsulfate de sodium (SDS).

**Figure 4.** Structure chimique du (R)-2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD).

**Figure 5.** Dissociation des micelles de SDS (sphères orange et bleue) en présence d'une grande concentration de MPD (sphères vertes).

**Figure 6.** Topologie des transporteurs mitochondriaux basée sur le schéma de la structure secondaire de l'AAC.

**Figure 7.** Mécanisme d'action de la protéine UCP-1.

**Figure 8.** Structures tridimensionnelles de la protéine L1.

**Figure 9.** Structures des sites actifs de la protéine L1 en présence de deux antibiotiques.

**Figure 10.** Mécanisme catalytique des métallo- $\beta$ -lactamases appartenant aux classes B1 et B3.

**Figure 11.** Analyse par SDS-PAGE des différentes conditions d'induction d'UCP-1.

**Figure 12.** Analyse par SDS-PAGE des corps d'inclusion d'UCP-1.

**Figure 13.** Purification de l'échantillon **C** contenant les corps d'inclusion d'UCP-1 solubilisés dans du SDS sur une colonne HisTrap™ FF de 5 mL.

**Figure 14.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant UCP-1.

**Figure 15.** Analyse par SDS-PAGE des différents lavages des corps d'inclusion d'UCP-1.

**Figure 16.** Purification d'un échantillon de 3 mL contenant les corps d'inclusion d'UCP-1 solubilisés dans du SDS sur une colonne HisTrap™ FF.

**Figure 17.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant UCP-1.

**Figure 18.** Spectres d'émission de fluorescence d'UCP-1 en fonction des 3 meilleures conditions de renaturation après 24h.

**Figures 19 A.** Spectres d'émission de fluorescence d'UCP-1 ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) et **B.** Spectres CD de la protéine UCP-1 ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) dans l'UV-lointain (190-260nm).

**Figure 20.** Analyse sur gel d'agarose 1% du plasmide pET9a-L1 (avant digestion enzymatique) et du produit PCR.

**Figure 21.** Analyse sur gel d'agarose 1% du plasmide pET9a-L1 après digestion enzymatique.

**Figure 22.** Analyse par SDS-PAGE d'une production de L1.

**Figure 23.** Analyse par SDS-PAGE d'une seconde production de L1.

**Figure 24.** Quantification par SDS-PAGE des différentes conditions de production de L1.

**Figure 25.** Analyse par SDS-PAGE des différents lavages des corps d'inclusion de L1.

**Figure 26.** Résultats du Western-Blot de la protéine L1.

**Figure 27.** Purification de l'échantillon contenant les corps d'inclusion de L1 solubilisés dans 8 M d'urée sur une colonne Profinity® de 20 mL.





**Figure 27 bis.** Zoom sur les deux pics d'absorbance lors de la purification de l'échantillon contenant les corps d'inclusion de L1 solubilisés dans 8 M d'urée sur une colonne Profinity® de 20 mL.

**Figure 28.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 (SDS).

**Figure 29.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 (élution par le SDS et l'imidazole).

**Figure 30.** Purification en *batch* du *flow-through* contenant L1.

**Figure 31.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 après la purification en *batch* (SDS).

**Figure 32.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 après la purification en *batch* (SDS et imidazole).

**Figure 33.** Dessalage des fractions de L1 récupérées après purification sur une colonne Hitrap G25 Sephadex™.

**Figure 34.** Quantification absolue par SDS-PAGE de la concentration de deux échantillons de L1 solubilisée.

**Figure 35.** Effets de la concentration en SDS/MPD sur le pourcentage de repliement (**A**) et de la concentration en L1 (**B**).

**Figure S1.** Représentation schématique du plasmide pHis17-mUCP1.

**Figure S2.** Représentation de la partie N-terminale de L1.

**Figure S3.** Représentation schématique du plasmide pET9a-L1-6xHis.



## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Résumé des 6 différents facteurs et leurs gammes de concentrations testées dans le but d'obtenir les conditions optimales de repliement d'UCP-1.

**Tableau 2.** Les différentes solutions stocks réalisées pour le Western-blot.

**Tableau 3.** Résumé des 8 différents facteurs et leurs gammes de concentrations testées dans le but d'obtenir les conditions optimales de repliement de L1.

**Tableau 4.** Résumé des compositions des 6 échantillons réalisés pour mesurer les structures secondaires par dichroïsme circulaire.

**Tableau 5 A.** Résumé des différentes purifications réalisées pour purifier la protéine L1 et  
**5 B.** Résumé des hypothèses et des résolutions en vue de purifier L1.

**Tableau 6.** Résumé des différentes fractions récupérées après purifications et concentrées pour l'expérience de repliement de la protéine L1.

**Tableau 7.** Résumé des 11 tampons de repliement idéaux déterminés par JMP après l'expérience de repliement sur plaque 96 puits.

**Tableau S1.** Résumé des différents milieux et tampons utilisés.

**Tableau S2.** Résumé des séquences d'oligonucléotides.

**Tableau S3.** Résumé des différentes conditions de culture testées en vue d'obtenir les meilleures conditions de production de corps d'inclusion de L1.

**Tableau S4.** Plan d'expérience de repliement d'UCP-1 généré par le programme JMP.

**Tableau S5.** Plan d'expérience de repliement de L1 généré par le programme JMP.



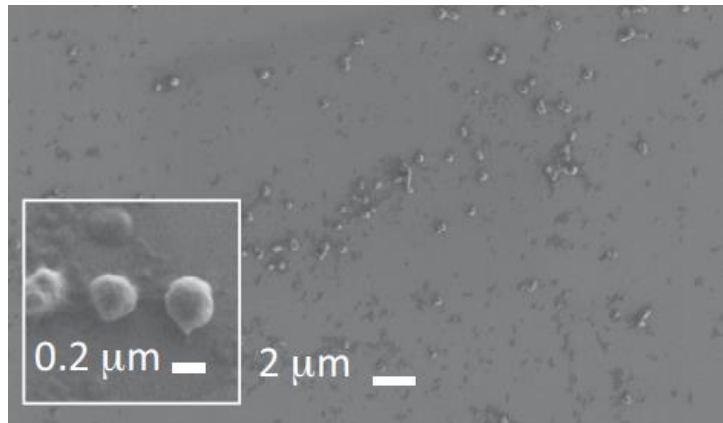
# 1. Introduction

## 1.1. Les protéines : généralités

Les protéines représentent plus de la moitié de la masse sèche des cellules [1]. Ce sont des polymères constitués d'acides aminés. Les cellules utilisent au plus 20 acides aminés différents pour synthétiser les protéines. Ces 20 acides aminés possèdent une même structure de base : ils contiennent un groupement amine ( $-\text{NH}_2$ ), un groupement carboxyle ( $-\text{COOH}$ ), un atome d'hydrogène et un groupement radical variable ( $-\text{R}$ ). Ces différents groupements sont tous orientés autour d'un carbone asymétrique (carbone alpha). Le radical variable est communément appelé : « chaîne latérale ». Les 20 acides aminés constituant les protéines diffèrent de par leurs chaînes latérales. Ils sont ainsi classés en différentes catégories : polaires et chargés (négativement et positivement), polaires et non-chargés, neutres et non-polaires (aliphatiques et aromatiques). Les acides aminés s'assemblent par la formation de liaisons peptidiques (réaction entre la fonction carboxylique et la fonction amine) et forment une chaîne polypeptidique comprenant une extrémité amine (N-terminale) et une extrémité carboxyle (C-terminale) [2].

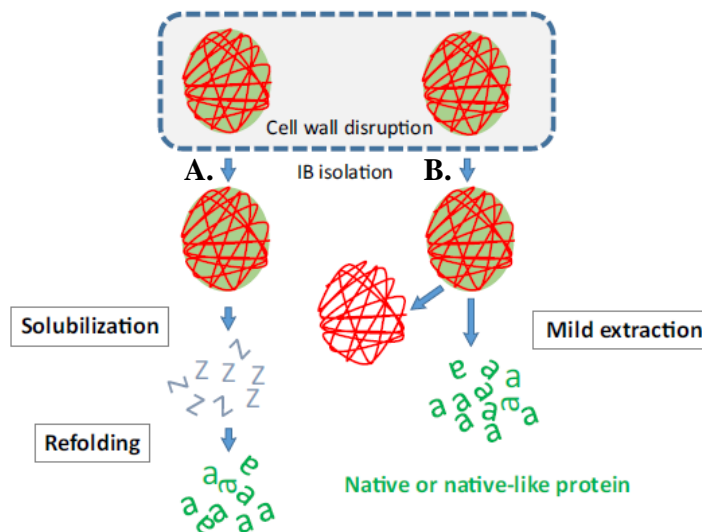
Les conformations tridimensionnelles des protéines dépendent des chaînes polypeptidiques et donc des acides aminés les constituant. Les protéines possèdent quatre niveaux structuraux, de la structure primaire à la structure quaternaire [1,2] :

- **La structure primaire** se réfère à l'ordre d'enchaînement des acides aminés au sein de la chaîne polypeptidique. Le premier acide aminé forme l'extrémité N-terminale et le dernier acide aminé forme l'extrémité C-terminale.
- **La structure secondaire** regroupe les différentes structures formées par la chaîne principale. Ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogènes et regroupent notamment les hélices  $\alpha$  ou  $3_{10}$ , les feuillets  $\beta$  (parallèles ou antiparallèles), les coudes et des parties non-structurées (régions non-ordonnées).
- **La structure tertiaire** correspond à l'agencement des structures secondaires dans l'espace. Cet agencement forme la structure tridimensionnelle de la protéine. Différentes interactions et liaisons contribuent au maintien de la structure 3D de la protéine : les effets hydrophobes, les interactions électrostatiques et les ponts disulfures.
- **La structure quaternaire** est la structure générale d'une protéine formée par l'interaction des sous-unités entre elles. Par exemple, un homotétramère est l'assemblage de quatre sous-unités identiques, ce qui est le cas de la métallo- $\beta$ -lactamase L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*.



**Figure 1.** Corps d'inclusion visualisés par microscopie électronique à balayage [5].

Les CI (représentés dans l'encadré blanc) sont formés après l'induction de l'expression de la protéine. Ils se situent préférentiellement dans les régions polaires des cellules d'*Escherichia coli*.



**Figure 2.** Récupération de la protéine d'intérêt à partir de CI [5].

**A.** Les cellules bactériennes sont lysées et les CI sont isolés par centrifugation. Les CI sont ensuite solubilisés par un agent dénaturant et la protéine d'intérêt est extraite pour le repliement.

**B.** Les protéines peuvent être récupérées sous leur forme bioactive (native) en utilisant des conditions d'extraction douce.

Les symboles « z » correspondent à la forme dénaturée de la protéine et les symboles « a » correspondent à la forme native de la protéine.

## 1.2. Production de protéines recombinantes sous forme de corps d'inclusion

A l'heure actuelle, la production de protéines recombinantes représente la plus grande partie des revenus du secteur biopharmaceutique. Un grand nombre de ces protéines sont produites dans la bactérie *Escherichia coli*. Cette bactérie est largement utilisée car d'une part, sa physiologie et son génome sont bien connus et d'autre part, elle présente des taux de réplication très rapides ce qui engendre de hauts rendements de production. De plus, les milieux de culture dans lesquels elle est produite sont peu coûteux [3–6].

La production de protéines recombinantes chez *E. coli* peut donner lieu à des agrégats insolubles, les corps d'inclusion (CI). Les CI sont des particules protéiques de 50 à ~800 nm (Figure 1) [5,6]. A l'origine, les CI étaient considérés comme des déchets produits par les bactéries. Ils sont pourtant aujourd'hui utilisés pour produire en grande quantité les protéines recombinantes [3–5]. En effet, les CI offrent de nombreux avantages : ils peuvent être isolés facilement des cellules, ils permettent d'exprimer des protéines toxiques pour la cellule et ils offrent un grand rendement de protéines surexprimées. De plus, les protéines présentes dans les CI sont protégées de la protéolyse. Il a également été mis en évidence que certaines protéines présentes dans les CI possèdent une activité biologique et que les protéines produites sous forme de CI s'accumulent à des niveaux plus élevés par rapport à celles produites sous forme soluble [4–6]. En ce qui concerne les protéines membranaires, elles peuvent être induites sous forme de corps d'inclusion en retirant la séquence d'insertion en membrane (le peptide signal) à l'extrémité N-terminale ou à l'extrémité C-terminale.

Une fois la protéine d'intérêt produite dans les CI, plusieurs étapes sont nécessaires pour la récupérer (Figure 2). La première étape consiste à isoler les CI. Pour ce faire, les cellules bactériennes sont lysées pour récupérer les CI présents dans le cytoplasme. Une fois la lyse réalisée, les CI sont isolés par centrifugation à grande vitesse. Après cette étape, des lavages sont réalisés avec des détergents et de la DNase pour éliminer les débris cellulaires, les acides nucléiques et les protéines bactériennes. La seconde étape consiste en la solubilisation des CI dans des agents chaotropiques (*e.g.* urée ou chlorure de guanidinium) ou par des détergents forts (*e.g.* dodécylsulfate de sodium, SDS) pour dénaturer la protéine d'intérêt. Enfin, la protéine recombinante est isolée des autres protéines présentes en solution par purification à l'aide de méthodes chromatographiques. Cette étape permet également de purifier la protéine des contaminants qui n'ont pas été éliminés lors des étapes de lavages [4,5].

La renaturation de la protéine d'intérêt est une étape qui peut s'avérer ardue. Les conditions de renaturation dépendent des propriétés des protéines et doivent être investiguées empiriquement au cas par cas [4].





### 1.3. Techniques de repliement des protéines dénaturées

Il n'existe actuellement pas de méthode universelle pour le repliement des protéines. Des études approfondies, basées sur des méthodes d'analyses biochimiques et biophysiques, sur le mécanisme de repliement des protéines et sur les différentes conditions optimales de repliement pourraient conduire au développement d'une méthode de repliement générale [4].

Les principaux défis liés au repliement sont la formation d'agrégats protéiques et/ou de protéines mal repliées lors du processus. En effet, des interactions moléculaires peuvent avoir lieu entre des intermédiaires insolubles. Ce sont ces interactions moléculaires qui entraînent la formation d'agrégats protéiques lors du processus de repliement. Le taux d'agrégation des protéines est généralement favorisé par une concentration élevée en protéines. Différentes méthodes ont été développées pour favoriser le repliement correct de protéines récupérées à partir de CI [1,4,6].

#### 1.3.1. Repliement par dialyse et par dilution directe

La dialyse est une méthode simple qui consiste en la diminution de la concentration en agents dénaturants forts (urée et chlorure de guanidinium) par diffusion à travers une membrane semi-perméable. Cette méthode permet de changer de tampon vers une solution finale favorable au repliement de la protéine. Les principaux inconvénients de cette méthode de repliement sont de faibles rendements dus à la formation d'agrégats ou la précipitation de la protéine suite au changement de tampon. De plus, le changement de tampon à travers la membrane semi-perméable peut prendre plusieurs heures [4,6].

La dilution directe est également une méthode simple et très utilisée. Cette technique consiste en la dilution de l'échantillon protéique dans un tampon de repliement en vue de réduire la concentration en agents dénaturants (chaotropes). Cependant, cette technique présente les mêmes inconvénients que le repliement par dialyse [4,6].

La dialyse et la dilution directe sont les méthodes de repliement les plus couramment pratiquées en laboratoire. Pourtant, ces techniques offrent des rendements faibles et provoquent la formation d'agrégats protéiques.

#### 1.3.2. Repliement sur colonne

Une autre méthode utilisée pour le repliement des protéines est la séparation par chromatographie de la protéine d'intérêt des agrégats présents en solution. Le principe est d'accrocher la protéine sur une matrice d'affinité ou échangeuse d'ions et de changer le tampon dans lequel elle se trouve. Cette technique réduit les interactions protéine-protéine et donc la formation d'agrégats protéiques. Par contre, elle est difficilement applicable à l'échelle industrielle étant donné la difficulté à l'adapter à de grands volumes [4].

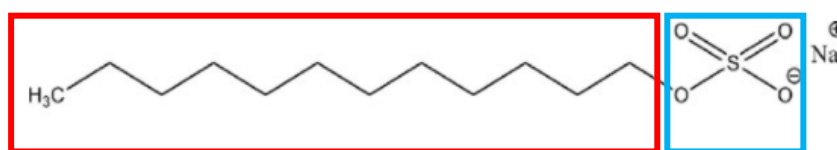


### 1.3.3. La méthode SDS-MPD

Une méthode innovante de renaturation des protéines a été mise au point par Michaux *et al.* [7] et a ensuite fait l'objet de nombreuses études [7–11] au sein du laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules (CPB) à l'université de Namur. Cette méthode de renaturation consiste en l'association d'un détergent anionique (le dodécylsulfate de sodium, SDS) avec un cosolvant (le 2-méthyle-2,4-pentanediol, MPD).

La méthode SDS/MPD a permis de renaturer différents types de protéines. En effet, des protéines solubles [7] (anhydrase carbonique II humaine et le lysozyme de blanc d'œuf) et des protéines membranaires (PagP [7] et la VDAC36 [12], des protéines en tonneaux  $\beta$  et l'Omp2a, une protéine trimérique [9]) ont pu être repliées avec succès *via* cette méthode. Ces protéines ont été dénaturées dans des tampons contenant du SDS et ont été renaturées en présence de fortes concentrations en MPD (de l'ordre du molaire) associées à de faibles concentrations en SDS (millimolaires) [7–11].

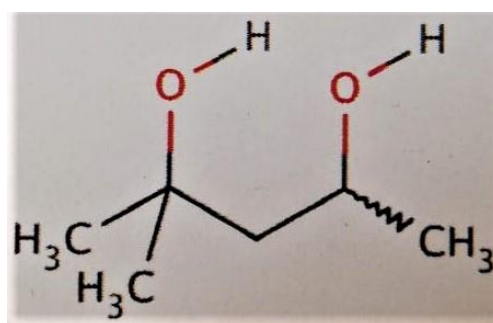
Le SDS (Figure 3) est un détergent anionique qui, contrairement à l'urée et au chlorure de guanidinium, nécessite des concentrations faibles de l'ordre du millimolaire pour dénaturer les protéines [7].



**Figure 3.** Structure chimique du dodécylsulfate de sodium (SDS).

L'encadré **rouge** représente la partie non-polaire du SDS (partie hydrophobe) et l'encadré **bleu** représente la partie polaire du SDS (partie hydrophile).

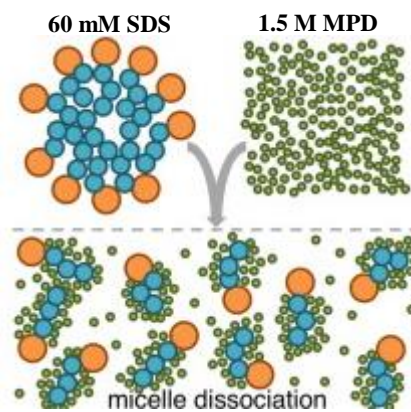
Le MPD (Figure 4) est un cosolvant de type diol, habituellement utilisé lors des expériences de cristallisation des protéines en tant qu'agent précipitant. Sa partie apolaire interagit avec les parties hydrophobes des protéines [11].



**Figure 4.** Structure chimique du 2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD).



En présence d'une concentration élevée en MPD, le SDS voit ses propriétés de détergent changer, passant de détergent « fort » à détergent « doux » favorisant ensuite le repliement des protéines. En effet, la présence de MPD dissocie les micelles de SDS (Figure 5). Le cosolvant, de par sa nature amphipathique, écranterait la charge négative du SDS et limiterait les interactions entre la partie non-polaire du SDS et l'eau. Le MPD réduit ainsi l'interaction entre le SDS et les protéines. Cependant, le mécanisme précis d'action du SDS/MPD n'est pas encore bien compris à ce-jour [7-11]. Plus la concentration en MPD est élevée, plus le processus de dissociation des micelles est efficace [10].



**Figure 5.** Dissociation des micelles de SDS (sphères orange et bleue) en présence d'une grande concentration de MPD (sphères vertes) [10].

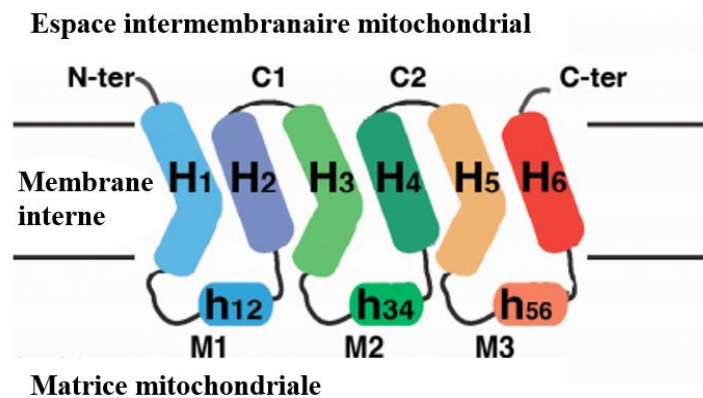
La présence de sels en solution peut modifier les propriétés des détergents, affecter les interactions entre les protéines et les détergents et changer la solubilité des protéines. La force ionique joue donc un rôle très important dans la méthode SDS/MPD. En effet, les sels favorisent la formation de micelles et diminuent la concentration micellaire critique en protégeant le groupement polaire des détergents, les empêchant ainsi de se repousser [9,11].

La méthode SDS/MPD, de par son efficacité sur des protéines solubles et membranaires, est un nouvel outil pour l'étude du repliement des protéines.



#### 1.4. La protéine découplante-1 (UCP-1)

La protéine UCP-1 (protéine découplante-1) est une protéine membranaire se situant dans la membrane interne des mitochondries du tissu adipeux brun. Elle possède une masse moléculaire de ~33 kDa. Il n'existe actuellement pas de structure à haute résolution pour l'UCP-1. Cependant, il a été confirmé, sur base de sa séquence en acides aminés, que cette protéine appartient à la famille des transporteurs mitochondriaux et qu'elle est apparentée au transporteur ADP/ATP (*ADP/ATP Carrier*, AAC) [13–17]. Les transporteurs mitochondriaux partagent la même structure de base et une même topologie membranaire. Ils sont effectivement composés de trois domaines homologues d'environ 100 acides aminés chacun et chaque domaine comprend deux hélices  $\alpha$  transmembranaires (Figure 6) [13–15,18–20].



**Figure 6.** Topologie des transporteurs mitochondriaux basée sur le schéma de la structure secondaire de l'AAC [19].

**C1** et **C2** représentent les boucles dans l'espace intermembranaire mitochondrial, **H1** à **H6** représentent les hélices transmembranaires, **h12**, **h34** et **h56** représentent les hélices de surface et **M1** à **M3** représentent les boucles de la matrice mitochondriale.

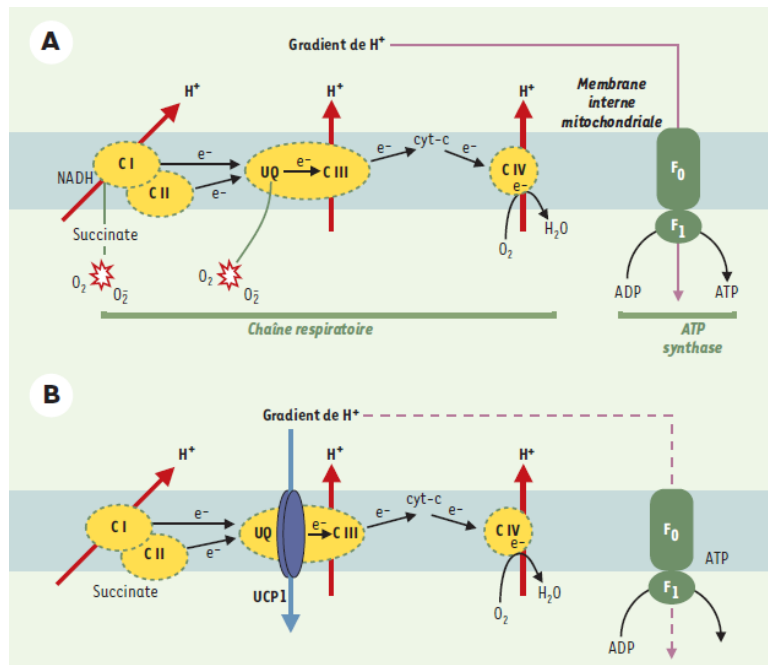
L'UCP-1 est présente dans les adipocytes du tissu adipeux brun (TAB) qui produisent de la chaleur pour maintenir la température corporelle à 37°C. Cette production de chaleur est la thermogénèse adaptative dite « sans frisson ». Cette thermogénèse survient dans des conditions particulières : chez les mammifères nouveau-nés, lors de l'hibernation chez les mammifères, lors d'une exposition au froid et lors d'une prise alimentaire [13,14,17,21].

On a longtemps cru que le TAB n'était présent que chez les nouveau-nés pour maintenir l'homéostasie et qu'il disparaissait à l'âge adulte. Cependant, il a été démontré que le TAB est toujours présent chez les humains adultes [13].





Lors d'une exposition prolongée au froid ou lors d'une suralimentation, le système nerveux sympathique active la lipolyse qui se déroule dans les adipocytes du TAB. Cette lipolyse libère des acides gras qui activent et stimulent l'UCP-1, déclenchant la thermogenèse sans frisson *via* un découplage entre la respiration et la synthèse d'ATP (Figure 7) [13,14,16,21].



**Figure 7.** Mécanisme d'action de la protéine UCP-1 [16].

**A.** Fonctionnement d'une mitochondrie en l'absence d'UCP-1  
**B.** Fonctionnement d'une mitochondrie en présence d'UCP-1  
**CI à CIV** = complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale  
**F<sub>0</sub>** et **F<sub>1</sub>** = les deux domaines protéiques de l'ATP synthase  
**UQ** = ubiquinone et **Cyt-c** = cytochrome-c

En l'absence d'UCP-1 (Figure 7A.), les protons présents dans l'espace intermembranaire s'accumulent et forment un gradient de protons. Ce gradient est utilisé par l'ATP synthase pour former des molécules d'ATP. Dans ce cas-ci, la respiration et la synthèse d'ATP sont couplées. En présence d'UCP-1 (Figure 7B.), il n'y a plus de gradient de protons car la protéine UCP-1 capte les protons pour produire de la chaleur. Etant donné l'absence de gradient de protons, la synthèse d'ATP est arrêtée. La respiration et la synthèse d'ATP sont découplées, d'où l'appellation de la protéine « découplante ».

L'activité d'UCP-1 est activée par les acides gras mais est inhibée par les nucléotides puriques (ATP, ADP, GTP et GDP). Il a été démontré que le GDP (guanosine diphosphate) possède une forte affinité de liaison avec la protéine UCP-1 pour un rapport 1 :1 de l'ordre du nM [12,13,16].



## 1.5. La métallo- $\beta$ -lactamase L1 (L1)

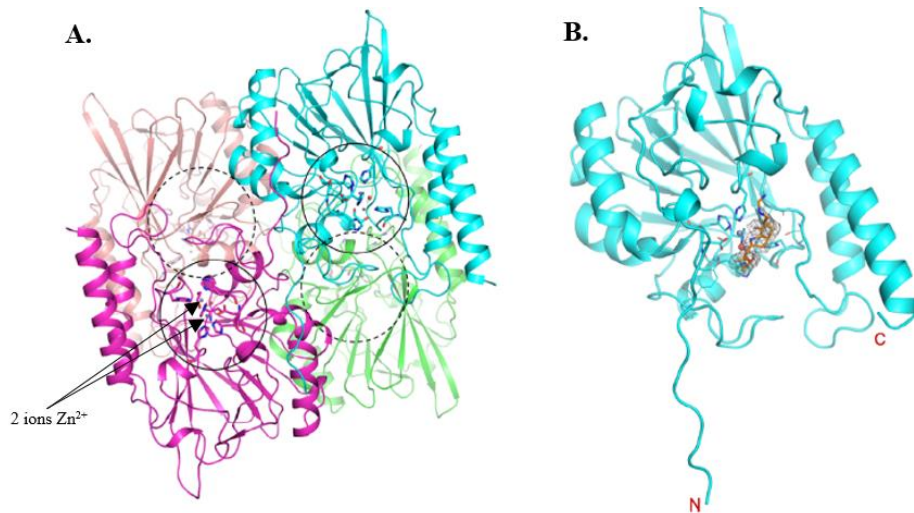
### 1.5.1. Les $\beta$ -lactamases : généralités

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'origine bactérienne qui hydrolysent les antibiotiques contenant un cycle  $\beta$ -lactame. Ces enzymes jouent un rôle majeur dans le phénomène de résistance aux antibiotiques. En effet, elles se diversifient en milieu hospitalier ce qui conduit à l'émergence de bactéries pathogènes résistantes à diverses classes d'antibiotiques [22–24].

Les  $\beta$ -lactamases sont un groupe d'enzymes très hétérogènes qui peuvent être classées en fonction de leur identité de séquence protéique (classification d'Ambler, 1980 [25]). Selon la classification d'Ambler, quatre classes différentes peuvent être distinguées : les classes A, C et D, représentant les  $\beta$ -lactamases qui possèdent une sérine active dans leur site catalytique et la classe B, contenant les métallo- $\beta$ -lactamases. Ces dernières requièrent au moins un ion zinc ( $Zn^{2+}$ ) dans leur site actif pour leur activité catalytique [22–26].

Selon leur séquence protéique et leur structure, les métallo- $\beta$ -lactamases sont classées en trois sous-classes : B1, B2 et B3. Les métalloprotéines des classes B1 et B3 nécessitent deux ions métalliques dans leur site actif pour leur activité catalytique. Les métalloprotéines de la classe B2, quant à elles, n'en requièrent qu'un seul [24].

Les métallo- $\beta$ -lactamases hydrolysent une grande partie des antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, y compris les carbapénèmes qui sont des antibiotiques utilisés en dernier recours lors d'une infection bactérienne [24,26,27]. L'étude de ces enzymes revêt donc un intérêt majeur dans le cadre de la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

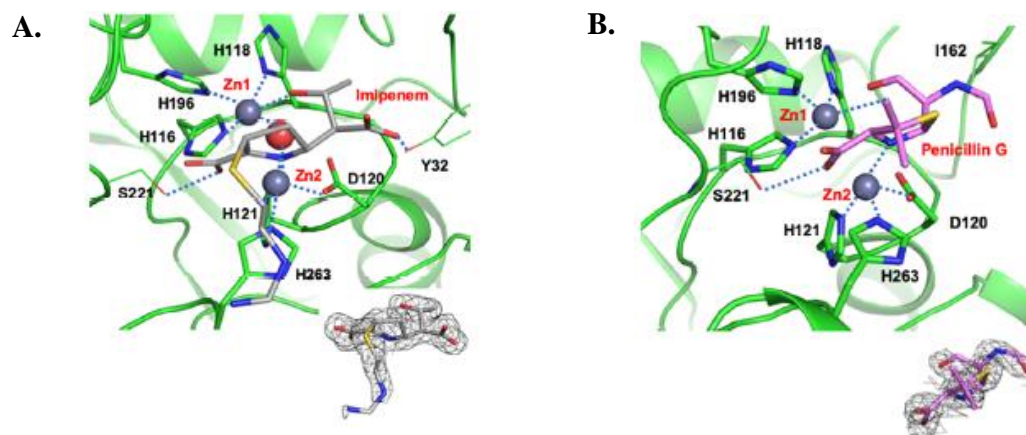


**Figure 8.** Structures tridimensionnelles de la protéine L1 [24].

**A.** Homotétramère de L1. Les ions métalliques  $Zn^{2+}$  sont représentés par des sphères grises et chaque monomère est représenté par une couleur différente. Les 4 sites actifs sont indiqués par des cercles noirs et ceux en pointillés représentent les sites actifs se trouvant à l'arrière de l'enzyme.

**B.** Monomère de L1 en complexe avec un antibiotique (imipénème) hydrolysé. Ce ligand est représenté en orange.

(PDB : 5DPX)



**Figure 9.** Structures des sites actifs de la protéine L1 en présence de deux antibiotiques [24].

**A.** Site actif de L1 en présence de l'imipénème.

**B.** Site actif de L1 en présence de pénicilline G.

Les deux antibiotiques sont représentés sous leurs formes hydrolysées.

### 1.5.2. L1 : spécificités

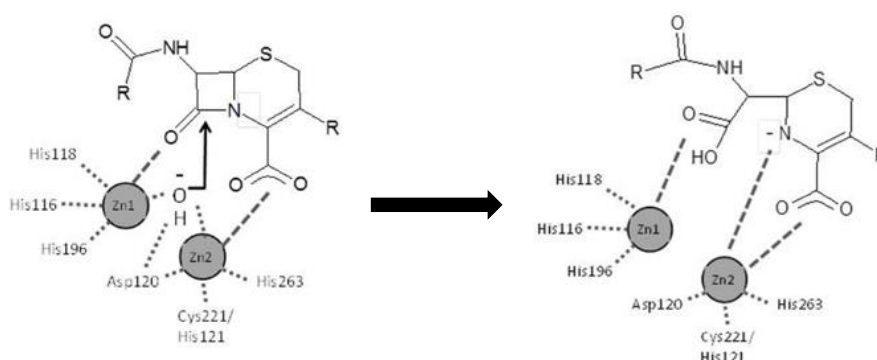
La métallo- $\beta$ -lactamase L1 appartient à la sous-classe B3 et possède donc deux ions zinc ( $Zn^{2+}$ ) dans son site actif. Cette protéine est produite par une bactérie à gram négatif : *Stenotrophomonas maltophilia* qui est considérée comme étant une bactérie pathogène multirésistante et opportuniste [24,28,29].

Dans sa forme native, la protéine L1 est un homotétramère de 116 kDa. La protéine L1 est la seule métallo- $\beta$ -lactamase qui forme un tétramère, nécessaire pour son activité catalytique (Figure 8A.). Chaque monomère de 28 kDa contient deux ions zinc ( $Zn^{2+}$ ) et forme une structure  $\alpha\beta/\beta\alpha$  (Figure 8B.). Ce motif  $\alpha\beta/\beta\alpha$  est caractéristique des métallo- $\beta$ -lactamases [24,30].

Une particularité qui différencie L1 des autres  $\beta$ -lactamases de classe B est la présence d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 218 et 246 [30].

Le site catalytique est constitué de deux ions zinc ( $Zn^{2+}$ ) et se situe entre les deux feuillets  $\beta$  du sandwich  $\alpha\beta/\beta\alpha$  dans chaque monomère. Trois histidines (H116, H118 et H196) sont liées au 1<sup>er</sup> ion zinc (Zn1, Figure 9). Le 2<sup>ème</sup> ion zinc (Zn2, Figure 9) est en interaction avec un acide aspartique (D120) et deux histidines (H121 et H263). Des deux antibiotiques hydrolysés et liés dans le site actif de L1 sont représentés à la Figure 9. Ils appartiennent au groupe des  $\beta$ -lactamines. L'imipénème fait partie des carbapénèmes et la pénicilline G fait partie des benzylpénicillines [24].

Les métallo- $\beta$ -lactamases qui possèdent deux ions zinc dans leur site actif (les sous-classes B1 et B3) ont un mécanisme catalytique similaire (Figure 10). L'oxygène du groupe carbonyle du noyau  $\beta$ -lactame interagit avec Zn1 et le groupe carboxyle interagit avec Zn2. L'ion hydroxyde situé au centre des deux ions zinc va faire une attaque nucléophile sur le carbone du groupement carbonyle du noyau  $\beta$ -lactame, conduisant à la formation d'un intermédiaire tétraédrique. Ensuite, l'ouverture du cycle est réalisée par protonation de l'azote *via* une seconde molécule d'eau [31].



**Figure 10.** Mécanisme catalytique des métallo- $\beta$ -lactamases appartenant aux classes B1 et B3 [31].



## 1.6. Objectifs du travail

Ce mémoire de maîtrise en Biologie, biochimie moléculaire et cellulaire a pour objectif de tester la méthode de renaturation de protéines SDS/MPD sur deux protéines différentes, toutes deux réputées pour être difficiles à renaturer. En effet, la renaturation des protéines – défi scientifique qui représente un intérêt majeur pour le secteur industriel – est une manipulation qui peut s'avérer ardue car elle implique diverses procédures, et des conditions physiques et produits chimiques bien spécifiques. Les conditions de renaturation dépendent des propriétés des protéines et doivent être expérimentées au cas par cas afin d'obtenir une efficacité et un rendement intéressant.

Le projet de ce mémoire est donc double. Il consiste à appliquer la méthode SDS/MPD, basée sur l'association d'un détergent et d'un cosolvant, sur les protéines suivantes : d'une part, sur UCP-1, une protéine membranaire de 33 kDa qui possède six hélices alpha transmembranaires, et d'autre part, sur L1, une enzyme tétramérique de grande taille (116 kDa) qui possède des ponts disulfures et des ions zinc. Les expériences réalisées sur la protéine UCP-1 ont été réalisées au sein du laboratoire CPB à l'université de Namur. Celles réalisées sur la protéine L1 ont été effectuées au CIP (Centre d'Ingénierie des Protéines) à l'université de Liège.

Dans un premier temps, les protéines sont produites sous forme de corps d'inclusion (CI). Ces derniers sont ensuite solubilisés et les protéines sont purifiées à l'aide d'une étiquette d'histidines par chromatographie d'affinité. Une fois les différentes conditions établies pour obtenir les protéines pures, elles sont produites en grand volume dans des fermenteurs. L'objectif est de récupérer une grande quantité de CI afin de tester le repliement des protéines. La méthode SDS/MPD est privilégiée pour les expériences de repliement. Les différentes conditions de repliement sont déterminées par un logiciel statistique de plan d'expérience et réalisées sur une plaque 96 puits *via* un robot qui réalise un pipetage automatique, au sein de la plateforme Robotein® (<http://www.robotein.ulg.ac.be/>) à l'université de Liège. Enfin, des techniques biophysiques (la fluorescence intrinsèque et le dichroïsme circulaire) et biochimiques (la liaison au GDP et des tests enzymatiques) ont été effectués afin d'évaluer la renaturation des protéines.





## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.1. PARTIE UCP-1

---

#### 2.1.1. Production de corps d'inclusion d'UCP-1

##### 2.1.1.1. Transformation de souches CD41(DE3)

Des cellules compétentes C41(DE3) d'*Escherichia coli* ont été utilisées comme hôtes pour le plasmide pHis17 contenant le gène codant pour UCP-1 de souris (*Mus musculus*). Ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur T7 en amont du gène (Figure S1). 50  $\mu\text{L}$  de souches stockées à  $-80^\circ\text{C}$  sont décongelées sur glace pendant 15 minutes. 2  $\mu\text{L}$  de solution contenant le plasmide sont ajoutés à la solution. L'échantillon est laissé sur glace pendant 30 minutes. Un choc thermique est ensuite réalisé en plaçant l'échantillon dans un bain thermostatique à  $42^\circ\text{C}$  pendant 45 secondes puis sur glace pendant 3 minutes. 450  $\mu\text{L}$  de milieu LB (Tableau S1) sont ajoutés à la solution et les cellules sont laissées à incuber sous agitation pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$  dans un ThermoMixer® (Eppendorf®). Une fois l'incubation terminée, 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont déposés et étalés sur une boîte de Petri contenant un milieu LB-agar et de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). La boîte est incubée pendant 18 heures à  $37^\circ\text{C}$ .

Des réserves de bactéries dans du glycérol sont réalisées une fois que des colonies sont présentes dans la boîte de Petri. L'objectif de cette manipulation est la conservation des souches transformées à  $-80^\circ\text{C}$ . Pour ce faire, une préculture a été réalisée en inoculant 100 mL de milieu LB stérile contenant de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) à partir d'une colonie de bactéries transformées. La préculture est incubée pendant 18 heures sous agitation à  $37^\circ\text{C}$ . Après la période d'incubation, 500  $\mu\text{L}$  de cette préculture sont mélangés à 500  $\mu\text{L}$  de glycérol 60% dans un tube Eppendorf™ qui est ensuite stocké à  $-80^\circ\text{C}$ .

##### 2.1.1.2. Surexpression d'UCP-1 (préculture, culture et induction)

Un tube (1 mL) contenant les bactéries C41(DE3) dans du glycérol transformées pour produire la protéine UCP-1 est décongelé sur glace pendant 15 minutes. La préculture est réalisée en inoculant 100 mL de milieu LB stérile contenant de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) avec 500  $\mu\text{L}$  de bactéries transformées. Après 18 heures d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation, la préculture est récupérée. Une culture de 500 mL de milieu LB stérile (2 x 250 mL) contenant de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) est ensuite réalisée par l'ajout de 10 mL de préculture (2 x 5 mL). Les deux cultures de 250 mL sont laissées à incuber à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation jusqu'à atteindre une absorbance située entre 0.5 et 0.6 à 600 nm. Une fois l'absorbance atteinte, l'expression d'UCP-1 est induite en ajoutant de l'IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 0.7 mM. Une des deux cultures est induite pendant 3 heures à  $37^\circ\text{C}$  tandis que l'autre est induite pendant 18 heures à  $20^\circ\text{C}$ .



Après 3 heures d'induction à 37°C, la culture bactérienne est centrifugée pendant 30 minutes à 3220 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de la lyse bactérienne et du lavage des corps d'inclusion. Le même mode opératoire est suivi pour l'induction pendant 18 heures à 20°C.

#### 2.1.1.3. Lyse bactérienne et récupération des corps d'inclusion

250 mL de tampon de lyse (Tableau S1) ont été préparés en vue de lyser le culot de cellules conservé à -20°C. Les cellules sont lysées par sonication (6 séries de 30 secondes et 30 secondes sur glace). Ensuite, les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 600 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes pour récupérer les corps d'inclusion dans le culot. Le culot est récupéré et congelé jusqu'à l'étape de purification. La présence des corps d'inclusion a été vérifiée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Le gel a migré pendant 55 minutes à 220 Volts.

#### 2.1.2. Purification par chromatographie d'affinité

Une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) a été réalisée pour purifier les échantillons d'UCP-1. Les corps d'inclusion ont d'abord été solubilisés pendant 24 heures sous agitation à 20°C dans un tampon de solubilisation (20 mM phosphate de sodium pH 8, 1% SDS) puis centrifugés pendant 20 minutes à 20 000 g à 20°C pour éliminer ce qui n'a pas été solubilisé.

La colonne utilisée est une HisTrap™ FF (Dutscher SAS) qui contient 5 mL de résine agarose hautement réticulée (6%). Cette colonne a été chargée avec une solution de 100 mM de NiSO<sub>4</sub>. La résine contenue dans la colonne est constituée d'un ligand chélateur immobilisé chargé d'ions Ni<sup>2+</sup> permettant de purifier la plupart des protéines marquées d'une étiquette poly-histidine.

La colonne est d'abord équilibrée avec un tampon d'équilibration (20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS) à un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Un échantillon de 10 mL (2 x 5 mL) de protéine UCP-1 a été chargé sur la colonne. Après l'équilibration de la colonne, la protéine est éluée au moyen d'un gradient en imidazole pendant 30 minutes (30 mL avec un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>). Le tampon d'éluion est composé de 20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS, 500 mM imidazole. L'imidazole va entrer en compétition avec les histidines, permettant de décrocher la protéine jusqu'alors accrochée à la matrice. L'absorbance à 280 nm et la conductivité (mS·cm<sup>-1</sup>) sont suivies tout au long de la purification et des fractions de 1 mL sont récoltées lors de l'éluion. Après analyse du chromatogramme, les fractions d'intérêt possédant un pic d'absorbance à 280 nm sont ensuite analysées par SDS-PAGE.



### 2.1.3. Production en grand volume d'UCP-1

#### 2.1.3.1. Surexpression d'UCP-1

Un tube glycérol-stock (1 mL) contenant les bactéries C41(DE3) transformées pour produire la protéine UCP-1 est décongelé sur glace pendant 15 minutes. Une première préculture est réalisée en inoculant 5 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) avec 10  $\mu\text{L}$  de bactéries transformées. Après ~8 heures d'incubation à 37°C sous agitation, une seconde préculture de 500 mL (2 x 250 mL) de milieu LB contenant de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) est réalisée en ajoutant 4 mL (2 x 2 mL) de la première préculture. La seconde préculture est incubée pendant 18 heures à 37°C sous agitation.

La culture a ensuite été réalisée à 37°C dans un fermenteur contenant 14.5 L de milieu 2XYT (Tableau S1) et de l'ampicilline ( $100 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) avec 500 mL de préculture. L'expression d'UCP-1 a été induite en ajoutant 0.7 mM d'IPTG lorsque l'absorbance a atteint 0.8 à 600 nm. Une fois induite, la culture est incubée pendant 18 heures à 25°C.

Après les 18 heures d'induction, la culture bactérienne est centrifugée pendant 15 minutes à 1600 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de la lyse et du lavage des corps d'inclusion.



### 2.1.3.2. Lyse bactérienne, récupération et lavage des corps d'inclusion

500 mL de tampon de lyse (Tableau S1) sont utilisés pour resuspendre le culot de cellules à 4°C. La solution est ensuite homogénéisée sur glace par le biais de l'Ultra-Turrax® IKA T45 (Gemini). Les cellules sont lysées par 2 passages à travers la presse de French *via* le disrupteur Avestin EmulsiFlex-C3 (ATA Scientific©) et le lysat est collecté sur glace. 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01 mg·mL<sup>-1</sup> de DNase I et 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> de lysozyme sont ajoutés au lysat. La solution est laissée pendant 20 minutes sous agitation à température ambiante. Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 17 700 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de lavage des corps d'inclusion.

Le culot contenant les corps d'inclusion est décongelé et solubilisé dans 500 mL de tampon de lavage 1 (Tableau S1). La solution est homogénéisée sur glace par le biais de l'Ultra-Turrax® et laissée pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 17 000 g à 4°C et le surnageant est éliminé. Un second lavage est réalisé selon le même mode opératoire.

Concernant le troisième lavage des corps d'inclusion, le culot est solubilisé dans 500 mL de tampon de lavage 2 (Tableau S1) puis homogénéisé sur glace par le biais de l'Ultra-Turrax®. La solution est laissée à agiter pendant 30 minutes à température ambiante. Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 17 000 g à 4°C et le surnageant est éliminé. Le culot contenant les corps d'inclusion lavés est stocké à -20°C. La pureté et la présence des corps d'inclusion est analysée par SDS-PAGE.

### 2.1.3.3. Purification par chromatographie d'affinité

Une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés a été réalisée pour purifier les échantillons d'UCP-1. 60 mg de corps d'inclusion ont d'abord été solubilisés pendant 24 heures sous agitation à 20°C dans 3 mL de tampon de solubilisation (20 mM phosphate de sodium pH 8, 1% SDS). Après agitation, la solution est centrifugée à 20 000 g pendant 20 minutes à 20°C pour éliminer ce qui n'a pas été solubilisé.

L'équilibration de la colonne a été réalisée selon le mode opératoire décrit au point §2.1.2. Après cette étape, la protéine est éluée au moyen d'un gradient en imidazole pendant 30 minutes (30 mL avec un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>). Le tampon d'éluion est composé de 20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS, 500 mM imidazole. Des fractions de 1 mL sont récoltées lors de cette étape. Après analyse du chromatogramme, les fractions d'intérêt sont ensuite analysées par SDS-PAGE.





#### 2.1.3.4. Dessalage et détermination de la concentration d'UCP-1

Après détermination des fractions d'intérêt par analyse SDS-PAGE, celles-ci sont rassemblées avant le changement de tampon (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS) sur une colonne de dessalage PD-10 Sephadex™ G-25 M (GE Healthcare©) en suivant les instructions du fabricant.

Une fois la manipulation terminée, la colonne est lavée avec 30 mL d'eau déminéralisée par une série de lavages successifs. Après rinçage, 2.5 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés en surface de la matrice et la colonne est stockée à 4°C.

Après l'étape du changement de tampon, un scan de longueur d'onde allant de 200 à 400 nm est réalisé pour doser la concentration de la protéine en solution. Un blanc composé d'un tampon 20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS est nécessaire avant la mesure de l'échantillon. La concentration de la protéine est déterminée par son absorbance à 280 nm *via* la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$  où  $A$  est l'absorbance sans unité,  $\epsilon$  est le coefficient d'absorption molaire en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ,  $l$  la longueur du trajet parcouru par la lumière en cm et  $c$  la concentration de la solution en  $mol \cdot L^{-1}$ . La mesure de l'absorbance de l'échantillon a été déterminée avec un spectrophotomètre UV-6300PC (VWR©).



## 2.1.4. Repliage d'UCP-1

### 2.1.4.1. Plan d'expérience de repliage d'UCP-1

Un plan d'expérience a été généré par un programme informatique de statistiques, JMP® (SAS®). Pour ce faire, 6 facteurs différents ont été testés pour analyser quelles étaient les meilleures conditions de repliage d'UCP-1 (Tableau 1). Le programme JMP a établi 96 conditions de tampon à préparer.

**Tableau 1.** Résumé des 6 différents facteurs et leurs gammes de concentrations testées dans le but d'obtenir les conditions optimales de repliage d'UCP-1.

Facteurs testés	Concentrations ou valeurs testées
SDS	0 ; 3 ; 10 ; 30 mM
MPD	0 ; 0.5 ; 1 ; 1.5 ; 2 M
NaCl	0 ; 100 ; 200 ; 300 mM
OG	0 ; 1%
pH	6 ; 7 ; 8 ; 9
UCP-1	0.1 mg.mL <sup>-1</sup>

### 2.1.4.2. Expérience de repliage d'UCP-1 en plaque 96 puits

Les fractions d'intérêt purifiées contenant la protéine UCP-1 ont été dessalées et rassemblées selon le mode opératoire décrit au point §2.1.3.4. La concentration en protéines présente en solution a été déterminée par mesure d'absorbance à 280 nm avec la loi de Beer-Lambert décrit au point §2.1.3.4. Le coefficient d'extinction molaire d'UCP-1 est de 34070 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Le volume final de protéines purifiées dans le tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS) est de 7 mL avec une concentration de 0.9 mg.mL<sup>-1</sup>.

Une plaque en polystyrène transparent de 96 puits a été utilisée pour l'expérience de repliage. Des solutions stocks des 6 différents facteurs testés ont été réalisées : 5% SDS, 7.83 M MPD, 2.5 M NaCl, 1% OG, 200 mM de tampon Tris-HCl pH 6 à 9 et UCP-1 (0.9 mg.mL<sup>-1</sup>) solubilisée dans un tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS).

Ces solutions stocks ont été placées dans le Microlab Star (Hamilton®) qui est une plateforme automatisée de manipulation de liquides permettant d'obtenir une exactitude et une haute précision lors des pipetages répétitifs. Les différents volumes préalablement calculés pour un volume final de 300 µL dans chaque puit ont ensuite été prélevés par la plateforme. La protéine UCP-1 a été ajoutée en dernier lieu et la plaque a été scellée par le biais d'un film d'étanchéité en aluminium et laissée à incuber pendant 48 heures sous agitation à 25°C.



La fluorescence intrinsèque du tryptophane et de la tyrosine d'UCP-1 a été mesurée après 24 et 48 heures d'agitation de la plaque 96 puits à 25°C au moyen du lecteur de microplaque Infinite 200 Pro (Tecan©) avec une longueur d'onde d'excitation de 277 nm et un scan d'émission entre 300 et 400 nm.

#### 2.1.4.3. Mesures CD des meilleures conditions de renaturation

Les spectres CD ont été mesurés avec un spectropolarimètre MOS-500 (BioLogic®).

Les mesures ont été effectuées dans des cellules en quartz de 0.1 cm. Les spectres rapportés ont été mesurés à une vitesse de 2 nm·s<sup>-1</sup> et sont une moyenne de quatre balayages. Un scan de longueur d'onde allant de 190 à 260 nm a été effectué pour chaque condition déterminée.

A partir des spectres CD, les pourcentages de structures secondaires sont calculés *via* l'algorithme CDSSTR sur le site web DichroWeb© [32]. L'analyse de ces pourcentages est basée sur un ensemble de protéines de référence pour des protéines membranaires dans le set référence SPM180 [33,34].



---

## 2.2. PARTIE L1

---

### 2.2.1. Biologie moléculaire

#### 2.2.1.1. Extraction et digestion du plasmide pET9a-L1.

Une PCR a été réalisée en mélangeant 12.5  $\mu\text{L}$  d'ADN polymérase Q5® 2X Master Mix (BioLab®), 1.25  $\mu\text{L}$  d'amorce anti-sens L1 (10 $\mu\text{M}$ ), 1.25  $\mu\text{L}$  d'amorce sens L1 (10 $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  d'ADN modèle et 9  $\mu\text{L}$  d'eau sans nucléase dans un tube PCR dont le volume final est de 25  $\mu\text{L}$ . 30 cycles de 3 phases distinctes ont été réalisés : une phase de dénaturation à 98°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation à 55°C pendant 20 secondes et une phase d'élongation à 72°C pendant 15 secondes. Une fois les 30 cycles effectués, une phase d'extension pendant 2 minutes à 72°C a été opérée. Le tube a ensuite été maintenu à 4°C.

Les deux séquences d'oligonucléotides utilisées pour la PCR ont été commandées chez Eurogentec© ([Tableau S2](#)).

En parallèle de la PCR, une digestion enzymatique est réalisée. Le plasmide pET9a (69.5  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) est digéré par deux enzymes de restriction, BamH1 et Nde1 (BioLab®). Pour ce faire, 2  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique est digéré par 2  $\mu\text{L}$  d'enzyme BamH1 et 2  $\mu\text{L}$  d'enzyme Nde1 dans un tampon CutSmart® (BioLab®) pour un volume total de 30  $\mu\text{L}$ . La solution est laissée à incuber pendant 1 heure à 37°C. Après l'incubation, la digestion enzymatique est arrêtée par l'ajout du tampon de chargement (*Orange DNA loading dye 6x*, ThermoFisher Scientific™) avant migration sur gel d'agarose 1% ([Tableau S1](#)) pendant 20 minutes à 80 Volt. Ce colorant permet de suivre la migration de l'ADN pendant l'électrophorèse.

Après l'analyse du gel d'agarose 1%, les bandes correspondant à l'ADN plasmidique et celles correspondant à l'ADN de l'insert sont prélevées en vue d'isoler l'ADN grâce au kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel©) en suivant les instructions du fabricant. La concentration d'ADN plasmidique et de l'insert en solution ont été déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm par le biais du spectrophotomètre NanoVue (GE Healthcare©).

#### 2.2.1.2. Construction du plasmide pET9a-L1-6xHis par ligature

Après l'isolement de l'ADN du plasmide et de l'insert, une ligature est réalisée en vue de construire le plasmide pET9a-L1-6xHis ([Figure S3](#)). 4.5  $\mu\text{L}$  de plasmide pET9a-L1 (10.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  après isolement de l'ADN) et 0.5  $\mu\text{L}$  d'insert (55.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  après isolement de l'ADN) sont ajoutés à 5  $\mu\text{L}$  de mélange NEBuilder® (BioLabs®) pour un volume final de 10  $\mu\text{L}$ . La solution est chauffée pendant 30 minutes à 50°C et laissée à 10°C jusqu'à l'étape de transformation bactérienne.





### 2.2.1.3. Transformation bactérienne, précultures et séquençage du plasmide pET9a-L1-6xHis

En vue de vérifier l'efficacité de la ligature et que le plasmide pET9a-L1-6xHis ait été construit sans mutation, une transformation bactérienne est réalisée. Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* NEB®5-alpha (cellules dérivées des DH5α) sont utilisées comme hôtes pour le plasmide pET9a-L1-6xHis. Ce plasmide contient un gène de résistance à la kanamycine et un promoteur T7 en amont du gène codant pour L1 ([Figure S3](#)).

100 µL de cellules NEB®5-alpha conservées à -80°C sont décongelées sur glace pendant 15 minutes. 2 µL de solution de ligature (ADN plasmidique) sont ajoutés aux cellules et la solution est mélangée 5 fois. L'échantillon est laissé sur glace pendant 30 minutes. Un choc thermique est ensuite réalisé en plaçant l'échantillon dans un bain thermostatique à 42°C pendant 30 secondes puis sur glace pendant 5 minutes. 600 µL de milieu SOC ([Tableau S1](#)) sont ajoutés à la solution qui est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C. Après l'incubation, 100 µL de solution sont étalés sur une boîte de Petri contenant un milieu LB-agar avec de la kanamycine (50 µg·mL<sup>-1</sup>). La boîte de Petri est placée dans un incubateur pendant 18 heures à 37°C.

Après l'incubation, une préculture est réalisée en inoculant 3 mL de milieu LB contenant de la kanamycine (50 µg·mL<sup>-1</sup>) avec une colonie de bactéries transformées. Cette opération est répétée 8 fois pour obtenir 8 précultures au final. Après ~8 heures d'agitation à 37°C, les précultures sont récupérées et centrifugées à 2000 g et les surnageants sont éliminés. Le plasmide d'intérêt, pET9a-L1-6xHis, est isolé à partir des culots grâce au kit de purification PCR GeneJET (ThermoFisher Scientific™) en suivant les instructions du fabricant. La concentration en ADN plasmidique en solution a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm par le biais du spectrophotomètre NanoVue (GE Healthcare©).

Concernant les 8 échantillons purifiés, 4 sont composés de 10 µL de solution plasmidique et 10 µL de solution de promoteur et 4 sont composés de 10 µL de solution plasmidique et 10 µL de solution de terminateur. Les échantillons ont été envoyés à séquencer (séquençage de Sanger) au GIGA (ULiège).



## 2.2.2. Optimisation de la production de corps d'inclusion de L1

### 2.2.2.1. Transformation de souches *d'Escherichia coli* BL21(DE3) et KRX

Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* BL21(DE3) et KRX sont utilisées comme hôtes pour le plasmide pET9a-L1-6xHis. Les transformations de ces deux hôtes ont été réalisées selon le même mode opératoire décrit au point §2.2.1.3.

### 2.2.2.2. Optimisation de la surexpression de L1

Six précultures sont réalisées dans des Falcon™ de 12 mL pour tester et optimiser la production de corps d'inclusion de L1. Pour ce faire, trois milieux différents ont été préparés : un milieu LB, un milieu 2XYT et un milieu TB (Tableau S1). Les six précultures ont été réalisées en inoculant 4 mL de milieu (LB, 2XYT ou TB) contenant de la kanamycine ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) avec une colonie de bactéries transformées (soit des BL21(DE3) soit des KRX). Les précultures sont incubées pendant 18 heures à 37°C sous agitation.

Différentes conditions de culture (22 conditions au total) ont été testées pour déterminer quelles étaient les plus optimales quant à la production de corps d'inclusion de L1. Deux plaques en polypropylène stériles de 24 puits carrés ont été utilisées pour tester les différentes conditions. Dans chaque puit, 4 mL de milieu (LB, 2XYT ou TB) avec  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de kanamycine ont été inoculés par 100  $\mu\text{L}$  de préculture correspondant au milieu adéquat (LB, 2XYT ou TB) réalisée la veille. L'expression de L1 a été induite – quand l'absorbance se situait entre 0.6 et 0.8 à 600 nm – pendant 4 ou 18 heures à 37 ou 27°C par de l'IPTG (à une concentration finale de 1 ou 5 mM) si la souche présente dans le milieu est BL21(DE3) ou par du rhamnose (à une concentration finale de 0.1 ou 0.05%) si la souche présente dans le milieu est KRX (*cf.* Tableau S2 pour un résumé des différentes conditions).

Après la durée choisie d'induction, les cultures ont été centrifugées pendant 10 minutes à 2500 g à 4°C. Les surnageants ont été éliminés et les culots conservés à -20°C. La présence et la concentration des corps d'inclusion de L1 ont été analysées par SDS-PAGE.

### 2.2.2.3. Quantification de L1 par SDS-PAGE

Les culots conservés à -20°C sont décongelés et solubilisés dans 1 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0.5% Triton-X100). Les cellules sont ensuite lysées par sonication (10 séries de 30 secondes suivie de 30 secondes de pause dans un bain réfrigéré à 4°C) puis centrifugées pendant 20 minutes à 18.400 g. Le surnageant est éliminé et les culots sont solubilisés avec 100  $\mu\text{L}$  de SDS (dodécylsulfate de sodium) 500 mM et 150  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse. Les solutions sont laissées à agiter pendant 18 heures à 20°C.



En vue de déterminer la concentration de protéine en solution, une droite d'étalonnage est réalisée avec 3 quantités (1.5 µg – 1 µg – 0.8 µg) de protéine L1 pure à partir d'une solution concentrée à du 8.8 µg·µL<sup>-1</sup>. Cette droite d'étalonnage permet le dosage de L1 par quantification absolue en SDS-PAGE en comparant leur intensité de bande avec celles de la droite d'étalonnage grâce à l'imageur Image Lab (Bio-Rad© Laboratories).

12 µL d'échantillon sont ajoutés à 4 µL de tampon de charge concentré 4x pour un volume final de 16 µL. 10 µL de solution sont déposées sur un gel précasté de 15 puits (4-20% Mini-PROTEIN® Bio-Rad© Laboratories) et la migration s'est déroulée pendant 35 minutes à 180 volts. Le gel est ensuite passé dans le programme d'analyse d'images et les meilleures conditions de production de corps d'inclusion de L1 ont pu être déterminées.

### 2.2.3. Production de L1

#### 2.2.3.1. Surexpression de L1

Après détermination de la meilleure condition par quantification absolue sur gel SDS-PAGE de la protéine L1, la souche d'*Escherichia coli* KRX a été transformée avec le plasmide pET9a-L1-6xHis selon le mode opératoire décrit au point §2.2.1.3.

Une première préculture est réalisée en inoculant 5 mL de milieu LB stérile contenant de la kanamycine (50 µg·µL<sup>-1</sup>) avec une colonie de bactéries KRX transformées. Après ~8 heures d'incubation à 37°C sous agitation, une seconde préculture de 500 mL (2 x 250 mL) de milieu 2XYT contenant de la kanamycine (50 µg·µL<sup>-1</sup>) est réalisée en ajoutant 4 mL (2 x 2 mL) de la première préculture. La seconde préculture est incubée pendant 18 heures à 37°C sous agitation.

La culture est réalisée à 37°C pendant 18 heures dans un fermenteur contenant 9.5 L de milieu 2XYT avec 0.05% de glucose, 0.05% de rhamnose, 50 µg·µL<sup>-1</sup> de kanamycine et les 500 mL de la seconde préculture.

Après les 18 heures de culture à 37°C, celle-ci est centrifugée pendant 15 minutes à 5400 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de la lyse bactérienne, récupération et lavage des corps d'inclusion.



### 2.2.3.2. Lyse bactérienne, récupération et lavage des corps d'inclusion

500 mL de tampon de lyse (Tableau S1) sont utilisés pour resuspendre le culot de cellules à 4°C. La solution est ensuite homogénéisée sur glace par le biais de l'Ultra-Turrax®. Les cellules sont lysées par 3 passages à travers la presse de French *via* le disrupteur EmulsiFlex-C3 et le lysat est collecté sur glace. 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01 mg.mL<sup>-1</sup> de DNase I et 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> de lysozyme sont ajoutés au lysat. La solution est laissée pendant 20 minutes sous agitation à température ambiante. Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 17 700 g et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de lavage des corps d'inclusion.

Le culot contenant les corps d'inclusion est décongelé et solubilisé dans 500 mL de tampon de lavage 1 (Tableau S1). La solution est homogénéisée sur glace par le biais de l'Ultra-Turrax® et laissée pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation.

Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes 17 700 g à 4°C et le surnageant est éliminé. Un second lavage est réalisé selon le même mode opératoire.

Concernant le troisième lavage des corps d'inclusion, le culot est solubilisé dans 500 mL de tampon de lavage 2 (Tableau S1) puis homogénéisé sur glace par le biais de l'Ultra-Turrax®. La solution est laissée à agiter pendant 30 minutes à température ambiante. Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 17 700 g à 4°C et le surnageant est éliminé. Le culot contenant les corps d'inclusion lavés est stocké à -20°C. La pureté et la présence des corps d'inclusion est analysée par SDS-PAGE.

### 2.2.3.3. Purification par chromatographie d'affinité de L1

Une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés a été réalisée pour purifier les échantillons de L1. 3.2 g de corps d'inclusion ont d'abord été solubilisés pendant 24 heures sous agitation à 20°C dans 30 mL de tampon de solubilisation (20 mM HEPES pH 8, 8 M d'urée) puis centrifugés pendant 30 minutes à 15 000 g à 20°C pour éliminer ce qui n'a pas été solubilisé.

Une colonne IMAC Profinity™ de 20 mL est d'abord équilibrée avec un premier tampon d'équilibration (20 mM HEPES pH 8, 8 M urée) à un débit de 5 mL·min<sup>-1</sup> avant de charger un échantillon de 30 mL de protéine L1. Ensuite, la colonne est à nouveau équilibrée avec un second tampon d'équilibration (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS) à un débit de 5 mL·min<sup>-1</sup>.

**Tableau 2.** Les différentes solutions stocks réalisées pour le Western-blot.

<b>Solutions préparées (volumes)</b>	<b>Compositions</b>
Tampon de transfert (1 L)	25 mM Tris-HCl pH 8, 192 mM glycine, méthanol 20%
Solution de blocage (30 mL)	5% caséine alkali-soluble (dans du TBS 5x), H <sub>2</sub> O MilliQ
TBS 1x (1 L)	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl,
TBST 1x (1 L)	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, , 0.05% v/v Tween-20
His-tag antibody HRP (20 mL)	Anti-corps anti-His (dilution 1500x) dans la solution de blocage



Après l'équilibration de la colonne, la protéine est éluée au moyen d'un gradient en imidazole pendant 20 minutes (100 mL à un débit de 5 mL·min<sup>-1</sup>). Le tampon d'éluion est composé de 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M imidazole. L'absorbance à 280 nm et la conductivité (mS·cm<sup>-1</sup>) sont suivies tout au long de la purification et des fractions de 4 mL sont récoltées lors de l'éluion.

Après analyse du chromatogramme, les fractions d'intérêt possédant un pic d'absorbance à 280 nm sont ensuite analysées par SDS-PAGE.

Une chromatographie discontinue (*batch chromatography*) a été également réalisée pour purifier les échantillons de L1. Le *flow-through* récupéré lors de la purification décrite ci-dessus a été ajouté à 20 mL de matrice IMAC Profinity®. La solution est laissée à agiter doucement pendant 16 heures à température ambiante.

Après les 16 heures d'agitation, la solution est centrifugée pendant 5 minutes à 3000 g. Le culot est ensuite empaqueté dans une colonne et la purification est réalisée.

Une colonne IMAC Profinity™ de 20 mL est d'abord équilibrée avec 100 mL de tampon d'équilibration (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS) à un débit de 5 mL min<sup>-1</sup>.

Après équilibration de la colonne, la protéine est éluée au moyen d'un gradient en imidazole pendant 22 minutes (110 mL à un débit de 5 mL min<sup>-1</sup>). Le tampon d'éluion est composé de 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M imidazole. L'absorbance à 280 nm et la conductivité (mS·cm<sup>-1</sup>) sont suivies tout au long de la purification et des fractions de 4 mL sont récoltées lors de l'éluion.

Après analyse du chromatogramme, les fractions d'intérêt possédant un pic d'absorbance à 280 nm sont ensuite analysées par SDS-PAGE.

#### 2.2.3.4. Western-blot

Afin de vérifier la présence de l'étiquette poly-histidine sur la protéine L1 à l'extrémité N-terminale, un Western-blot a été réalisé. Un gel polyacrylamide de 10 puits précastés (4-20% Mini-PROTEIN® Bio-Rad© Laboratories) a d'abord été préparé en ajoutant 20 µL de solution contenant 6 µL de tampon de charge concentré 4x à 18 µL d'échantillon (volume final de 24 µL) par puits. Le gel a migré pendant 35 minutes à 180 Volts. En parallèle de la migration, des solutions stocks de tampon de transfert, de solution de blocage, de TBS 1x (*Tris-Buffered Saline*) et de TBST 1x (*Tris-Buffered Saline with Tween 20*) ont été préparées ([Tableau 2](#)).

**Tableau 3.** Résumé des 8 différents facteurs et leurs gammes de concentrations testées dans le but d'obtenir les conditions optimales de repliement de L1.

<b>Facteurs testés</b>	<b>Concentrations ou valeurs testées</b>
SDS	0.5 ; 5 ; 10 mM
MPD	0 ; 1.25 ; 2.5 M
NaCl	0 ; 100 mM
L-Arginine	0 ; 0.1 ; 0.2 mM
Ratio GSH : GSSG	{4 :1} ; {1 :1} ; {1 :4}
[Glutathion] <sub>totale</sub>	5 ; 15 mM
pH	8 ; 9 ; 10 ; 11
[L1] <sub>initiale</sub>	0.1 ; 0.5 ; 1 ; 3 mg.mL <sup>-1</sup>

Concernant l'étape de transfert, deux feuilles de papier buvard ont été coupées selon la taille du gel et placées dans un bac contenant du tampon de transfert pour les hydrater par capillarité.

Une membrane de transfert en PVDF (fluorure de polyvinylidène) est immergée dans de l'éthanol 100% pendant 1 minute puis rincée 3 fois avec de l'eau Milli-Q. La membrane est ensuite incubée dans du tampon de transfert pendant 3 minutes. Un sandwich est réalisé dans une cassette dont la composition est la suivante : un papier buvard, la membrane de transfert en PVDF, le gel polyacrylamide et, pour finir, un papier buvard. L'excédent de tampon est enlevé et la cassette est fermée puis placée dans un système de transfert Trans-Blot Turbo (Bio-Rad®).

Après l'étape de transfert, des lavages sont réalisés en plaçant la membrane dans du tampon TBS pendant 10 minutes. L'opération est réalisée 2 fois.

Après les lavages, un blocage est opéré en ajoutant du tampon de blocage sur la membrane. La préparation est laissée sous agitation pendant 18 heures à 4°C.

L'étape de révélation est réalisée après les 18 heures sous agitation. Pour ce faire, des lavages sont réalisés. Un premier lavage se déroule dans du tampon TBST 1x pendant 10 minutes (2 fois). Un second lavage est réalisé dans du tampon TBS 1x pendant 10 minutes. Après ces lavages, la membrane est incubée 1 heure avec l'anticorps anti-His dilué (1500x) dans du tampon de blocage. Une fois l'incubation terminée, la membrane est à nouveau lavée 3 fois (2 fois avec du tampon TBST et 1 fois avec du tampon TBS). Ensuite, 1 mL de Clarity™ Western Peroxide Reagent et 1 mL de Clarity™ Western Luminol/Enhancer Reagent (Bio-Rad® Laboratories) sont ajoutés sur la membrane qui est ensuite visualisée dans un système d'imagerie numérique pour blots ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare®).

## 2.2.4. Repliement de L1

### 2.2.4.1. Plan d'expérience de repliement de L1

Comme pour la protéine UCP-1, un plan d'expérience a été généré par un programme informatique de statistiques, JMP® (SAS®). Pour ce faire, 8 facteurs différents ont été testés pour analyser quelles étaient les meilleures conditions de repliement de L1 (Tableau 3). Le programme JMP a établi 96 conditions de tampon à préparer en vue de déterminer le meilleur tampon de repliement.



#### 2.2.4.2. Expérience de repliement de L1 en plaque 96 puits

Environ 3.2 g de corps d'inclusion sont solubilisés dans 30 mL de tampon de solubilisation (20 mM HEPES pH 8, 8M urée, 1 mM DTT). L'échantillon est laissé à agiter pendant 18 heures à température ambiante. Après agitation, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 20 000 g à 20°C pour éliminer ce qui n'a pas été solubilisé.

L'échantillon est ensuite chargé à un débit de 5 mL·min<sup>-1</sup> sur une colonne contenant 20 mL de résine IMAC Profinity™ qui a été préalablement équilibrée avec un tampon d'équilibration (20 mM HEPES pH 8, 8 M urée). Les fractions d'intérêt – où se situe le pic d'absorbance à 280 nm – sont analysées par SDS-PAGE. La concentration de la protéine purifiée présente en solution est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre Specord 200 (AnalytikJena©). Selon les concentrations nécessaires pour le plan d'expérience (Tableau 3), l'échantillon est concentré avec une cellule Amicon® Pro Purification System de 10 KDa (Merck©) pendant 5 minutes à 5000 g et 20°C.

Une plaque en polystyrène transparent de 96 puits a été utilisée pour l'expérience de repliement. Des solutions stocks des 8 différents facteurs testés ont été réalisées : 10 mM et 200 mM SDS, 7.83 M MPD, 5 M NaCl, 0.8M L-Arginine, 40 mM et 200 mM GSH et GSSG, 200 mM de tampon Tris-HCl pH 8 et pH 9 ou 200 mM CAPS pH 10 et pH 11, 1 mM ZnCl<sub>2</sub> et la protéine L1 (3 mg·mL<sup>-1</sup> et 15 mg·mL<sup>-1</sup>) solubilisée dans un tampon de stockage (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS). Ces solutions stocks ont été placées dans le robot Microlab Star Hamilton®. Ensuite, le robot a prélevé les différents volumes préalablement calculés pour un volume final de 200 µL par puits. La protéine a été ajoutée en dernier lieu et la plaque a été scellée par le biais d'un film d'étanchéité en aluminium et laissée à incuber pendant 48 heures à température ambiante.

#### 2.2.4.3. Quantification de la concentration de L1 par gel SDS-PAGE

En vue de déterminer la concentration en protéine en solution, une droite d'étalonnage est réalisée avec 4 masses (2 µg – 1.5 µg – 1.125 µg – 0.75 µg) de protéine L1 pure concentrée à du 8.8 µg·µL<sup>-1</sup>. La masse des échantillons à doser a été déterminée par le programme d'analyse d'images Image Lab (Bio-Rad© Laboratories) décrit au point §2.2.2.3.



#### 2.2.4.4. Mesure de l'activité enzymatique de L1

Le pourcentage de repliement de la métallo- $\beta$ -lactamase L1 a été déterminé par le suivi de la dégradation de la pénicilline G (PenG) à 235 nm. En effet, la métallo- $\beta$ -lactamase L1 hydrolyse les antibiotiques possédant un noyau  $\beta$ -lactame. L'hydrolyse du substrat, PenG, se déroule dans des conditions où la concentration en substrat est largement supérieure à la constante de Michaelis-Menten ( $[S] \gg K_m$ ). Dans ces conditions, la vitesse est égale à la vitesse maximale, *i.e.* à l'activité spécifique de l'enzyme ( $v = V_{max}$ ). La vitesse initiale de l'enzyme ( $v_i$  en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) est déterminée à partir de la pente de la régression linéaire de la dégradation de la PenG à 235 nm, exprimée en  $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$  et correspondant à l'activité spécifique de l'enzyme,  $v$ .

L'équation pour déterminer la vitesse initiale de l'enzyme est la suivante :  $v_i = \frac{v \cdot V_{total}}{\Delta \varepsilon \cdot V_{enzyme}}$

où  $V_{total}$  correspond au volume total dans la cuvette ou dans le puit,  $V_{enzyme}$  correspond au volume d'enzyme utilisé et  $\Delta \varepsilon$  correspond au coefficient d'extinction molaire de PenG à 235 nm ( $- 775 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

L'activité spécifique de L1 ( $V_{max}$  en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a été mesurée à partir d'un stock en protéine L1 pure dont la concentration est connue ( $8.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Après détermination de la vitesse initiale de l'enzyme ( $v_i$  en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) et de l'activité spécifique de L1 ( $V_{max}$  en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), la quantité de protéine active – et donc repliée – peut être calculée ( $\frac{v_i}{V_{max}} = qE$ , la quantité d'enzyme exprimée en mg).

Le pourcentage de repliement peut finalement être déterminé en divisant la quantité d'enzyme ( $qE$  en mg) par la quantité initiale d'enzyme utilisée dans l'expérience de repliement ( $[E]$  en mg) multiplié par 100 :  $\% \text{ repliement} = \frac{qE}{[E]}$

Une fois les 48 heures d'incubation terminées, la plaque de 96 puits est centrifugée pendant 15 minutes à 5000 g. Les 96 conditions sont ensuite diluées 512x, 1000x et 2197x par le biais du robot Microlab Star Hamilton® dans un tampon de dilution (20 mM HEPES pH 7.5, 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BSA, albumine sérique bovine). Après les dilutions, l'enzyme est à nouveau diluée 30x dans 300  $\mu\text{L}$  de tampon contenant le substrat (20 mM HEPES pH 7.5, 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 1 mM PenG). La plaque 96 puits contenant les échantillons dilués est ensuite placée dans lecteur de microplaque Tecan© Infinite 200 Pro et la dégradation de la PenG à 235 nm est suivie pendant 20 minutes.



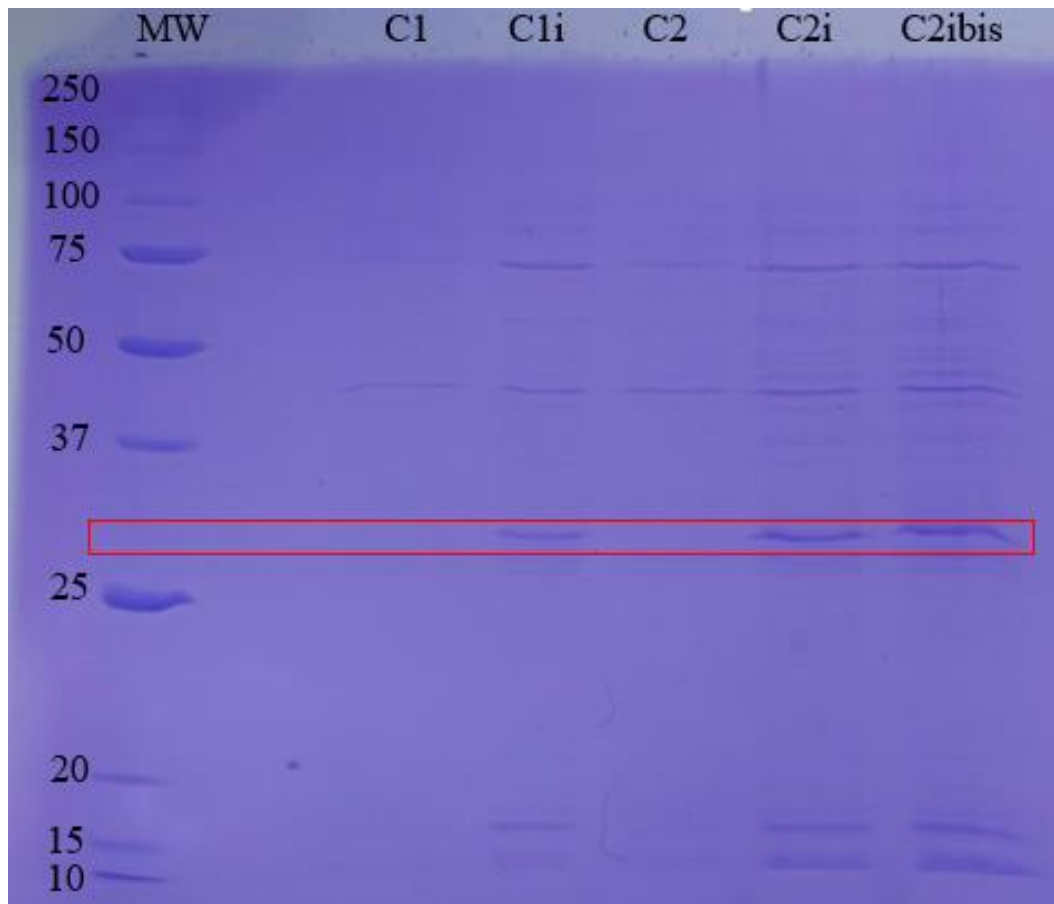


#### 2.2.4.5. Dessalage par chromatographie d'affinité

200 mL de tampon d'équilibration (20 mM HEPES pH 7.5, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) et 200 mL de tampon d'élution (20 mM HEPES pH 7.5, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 1 M imidazole) ont été préparés pour le dessalage par chromatographie d'affinité.

La protéine L1 a été diluée 10x pour diminuer la concentration en SDS dans 450  $\mu$ L de tampon d'équilibration. 50  $\mu$ L de matrice IMAC Profinity™ ont été ajoutés dans une plaque de purification de 96 puits. La matrice a été équilibrée 3x avec 500  $\mu$ L d'eau Milli-Q et 3x avec 500  $\mu$ L de tampon d'équilibration. La matrice a été chargée avec les 500  $\mu$ L de solution contenant la protéine L1 diluée 10x et équilibrée 3x avec le tampon d'équilibration. L'élution s'est déroulée en ajoutant 50  $\mu$ L de tampon d'élution. Le volume final présent dans les 96 puits est de 50  $\mu$ L. Le changement de tampon s'est opéré par aspiration par le biais de la plateforme Microlab Star.

La plaque contenant la protéine L1 renaturée dans un tampon 20 mM HEPES pH 7.5, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 1 M imidazole a été conservée à 4°C jusqu'à la mesure de l'activité enzymatique.



**Figure 11.** Analyse par SDS-PAGE des différentes conditions d'induction d'UCP-1.

**MW** : Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**C1** : Echantillon avant induction

**C1i** : Echantillon après induction pendant 3 heures à 37°C

**C2** : Echantillon avant induction

**C2i** : Echantillon après induction pendant 18 heures à 20°C

**C2ibis** : Echantillon après induction pendant 20 heures à 20°C

## 3. Résultats et discussion

---

### 3.1. PARTIE UCP-1

---

#### 3.1.1. Production de corps d'inclusion

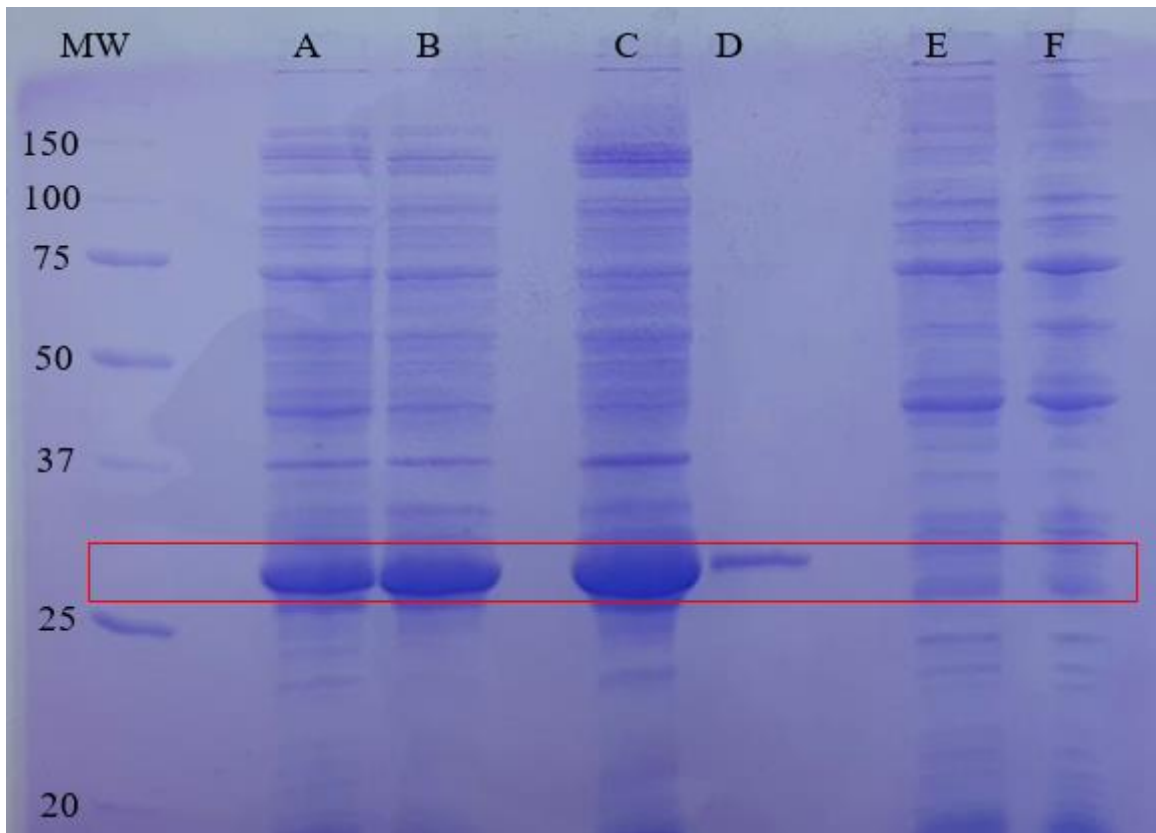
La première étape du travail a consisté à produire la protéine UCP-1 de *Mus musculus* sous forme de corps d'inclusion. Des cellules compétentes C41(DE3) d'*Escherichia coli* ont été utilisées pour produire cette protéine. En effet, ces cellules sont particulièrement efficaces pour produire des protéines membranaires et elles ont déjà été utilisées auparavant pour produire la protéine UCP-1 sous forme de corps d'inclusion [18].

Les cellules C41(DE3) ont été transformées selon la méthode décrite précédemment (§2.1.1.1) et des stocks glycérol de 1 mL ont été stockés à -80°C.

Deux conditions d'induction ont été testées. Une première induction a été réalisée pendant 3 heures à 37°C et une seconde induction pendant 18 heures à 20°C. L'objectif de la manipulation a été de déterminer quelle était la meilleure condition d'induction pour exprimer UCP-1 sous forme de corps d'inclusion. Pour ce faire, des échantillons de 1 mL ont été prélevés avant et après chaque induction lors de la surexpression décrite au point §2.1.1.2. L'inducteur qui a été utilisé est l'IPTG à une concentration de 0.7 mM et le milieu de culture est le milieu LB. Ces deux composants ont été choisis après analyse d'un protocole des conditions d'expression pour UCP-1 [18].

Le résultat des différentes conditions d'induction a été analysé par SDS-PAGE 12% (Figure 11). La protéine possède une masse moléculaire de ~33 kDa. Une bande est présente entre 25 et 37 kDa, ce qui correspond à la masse attendue de la protéine. L'induction est efficace étant donné l'absence de la protéine avant chaque induction. L'intensité de la bande est plus importante pour la condition correspondant à l'induction pendant 18 heures à 20°C (C2). Il n'y a pas de différence entre les deux inductions à 20°C (C2i vs C2ibis). Sur base de ces résultats, la protéine UCP-1 sera induite pendant 18 heures à 20°C lors des prochaines manipulations.

Après les différentes conditions d'induction, les deux cultures (2 x 250 mL) ont été centrifugées pendant 30 minutes à 3220 g et à 4°C. Le surnageant contenant le milieu de culture a été éliminé et le culot contenant les cellules a été conservé à -20°C. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication dans un tampon de lyse (Tableau S1) et différentes centrifugations ont été réalisées pour l'isolement des corps d'inclusion (cfr. §2.1.1.3) (Figure 12).



**Figure 12.** Analyse par SDS-PAGE des corps d'inclusion d'UCP-1.

**MW** : Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**A** : Surnageant C2i (600 g pendant 15 minutes)

**B** : Surnageant C1i (600 g pendant 15 minutes)

**C** : Culot C2i (10 000 g pendant 20 minutes)

**D** : Culot C1i (10 000 g pendant 20 minutes)

**E** : Surnageant C2i (10 000 g pendant 20 minutes)

**F** : Surnageant C1i (10 000 g pendant 20 minutes)

Les échantillons **A** et **B** représentent le surnageant après une centrifugation à 600 g pendant 15 minutes. L'échantillon **A** contient la protéine UCP-1 induite pendant 18 heures à 20°C et l'échantillon **B** celle induite pendant 3 heures à 37°C. La centrifugation à 600 g pendant 15 minutes permet d'éliminer les débris cellulaires qui restent dans le culot [18]. Il n'y a pas de différence entre les échantillons **A** et **B** en terme d'intensité des bandes qui correspondent à la masse attendue d'UCP-1.

Les échantillons **C** et **D** représentent le culot récupéré après une centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes. L'échantillon **C** contient les corps d'inclusion d'UCP-1 induite pendant 18 heures à 20°C et l'échantillon **D** ceux d'UCP-1 induite pendant 3 heures à 37°C. La centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes permet d'isoler les corps d'inclusion dans le culot [18]. La bande la plus intense se trouve dans le puit correspondant à l'échantillon **C**. Ce constat corrobore les résultats du gel précédent (Figure 11) où la condition d'induction optimale quant à l'expression d'UCP-1 est celle réalisée pendant 18 heures à 20°C. L'échantillon **D** ne présente aucune autre bande contaminante visible autre que celle correspondant à la masse de la protéine d'intérêt, attestant d'un degré de pureté déjà élevé.

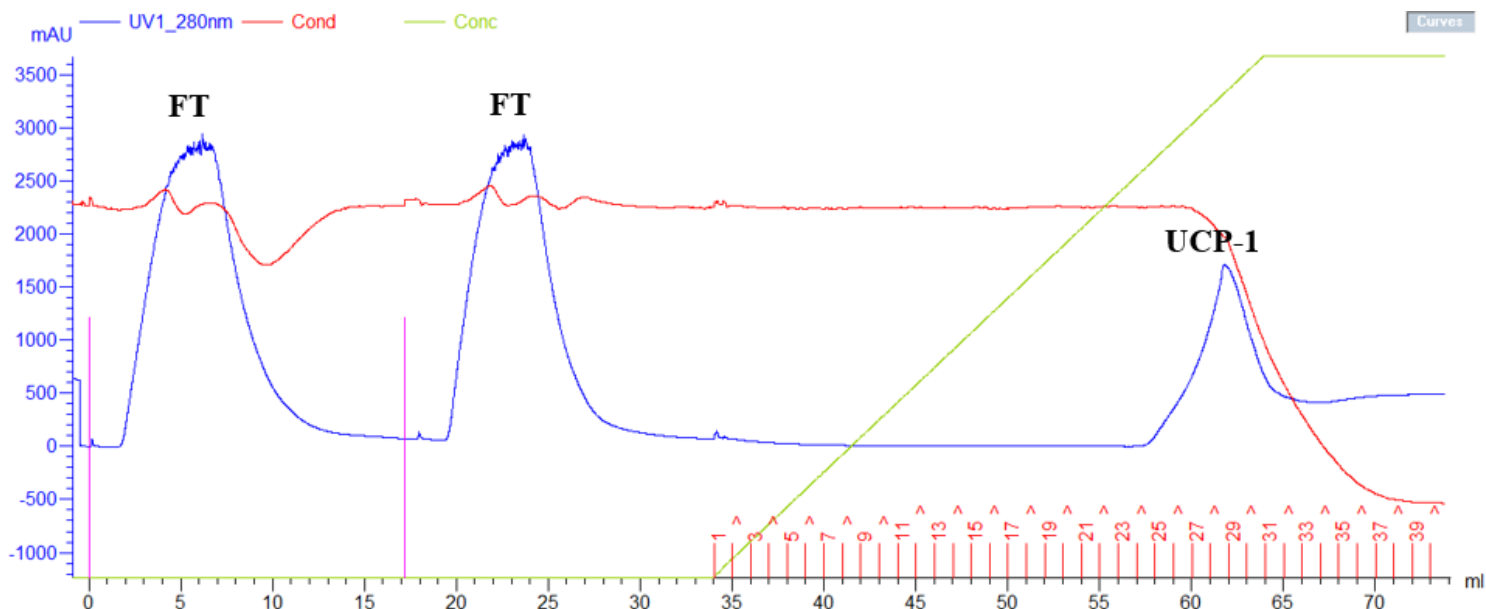
Les échantillons **E** et **F** représentent le surnageant après une centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes. L'échantillon **E** contient le surnageant d'UCP-1 induite pendant 18 heures à 20°C et l'échantillon **F** celui d'UCP-1 induite pendant 3 heures à 37°C. Ces échantillons servent de témoins. Aucune bande de la taille attendue n'est visible ce qui indique l'absence de forme soluble de la protéine.

### 3.1.2. Purification par chromatographie d'affinité

La condition **C** a été choisie comme échantillon pour la purification d'UCP-1. En effet, comme expliqué ci-dessus, cette condition semble contenir la plus grande quantité en protéine UCP-1.

Les corps d'inclusion récupérés lors de la manipulation précédente (§3.1.1) sont solubilisés dans 10 mL de tampon de solubilisation (20 mM phosphate de sodium pH 8, 1% SDS) et laissés sur un plateau agitateur pendant 18 heures à 20°C. La température est cruciale étant donné que le SDS précipite à 4°C.

La purification s'est déroulée suivant la méthode décrite précédemment (§2.1.2).



**Figure 13.** Purification de l'échantillon C contenant les corps d'inclusion d'UCP-1 solubilisés (20 mM phosphate de sodium pH 8, 1% SDS) sur une colonne HisTrap™ FF de 5 mL.

La **courbe bleue** correspond à l'absorbance à 280 nm, la **courbe rouge** à la conductivité en  $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  et la **courbe verte** au % de tampon d'éluion (20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS, 500 mM imidazole).

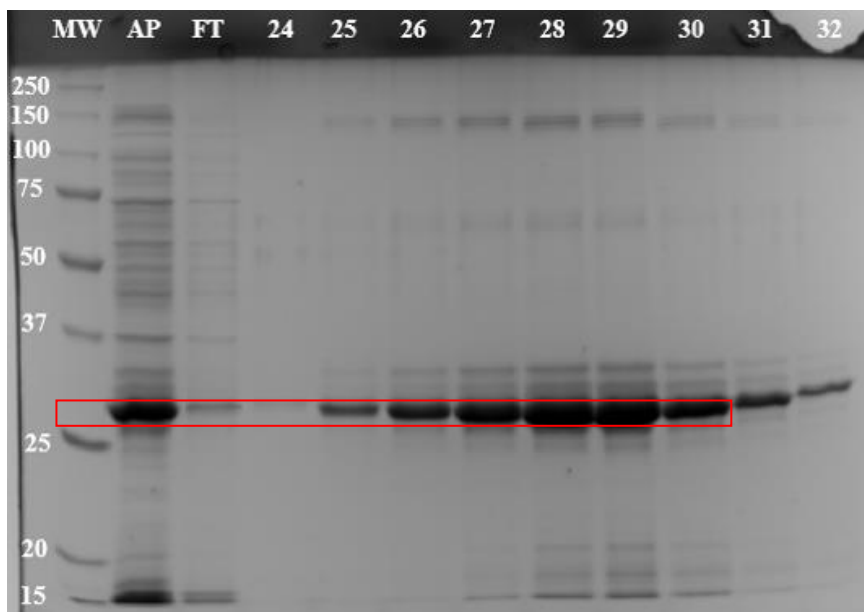
**FT** = *flow-through*

**UCP-1** = pic d'absorbance correspondant à la protéine UCP-1 (confirmé après analyse par SDS-PAGE)

L'échantillon de 10 mL contenant les corps d'inclusion d'UCP-1 a été chargé sur la colonne en deux fois dans une boucle de 5 mL. Ces deux charges sont représentées par le *flow-through* (indiqué « **FT** » sur le chromatogramme, [Figure 13](#)). Des fractions de 1 mL sont récoltées une fois que les courbes bleues et rouges sont redescendues à zéro d'absorbance. Ensuite, le tampon d'éluion est chargé sur la colonne à un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup> pendant 30 minutes. On observe une augmentation de l'absorbance à 280 nm après passage de 24 mL de tampon d'éluion, correspondant à une concentration de 400 mM en imidazole.

Les fractions 24 à 32 ont été analysées par SDS-PAGE après 55 minutes de migration à 220 Volts. Celles-ci présentent des bandes correspondant à la masse d'UCP-1 ([Figure 14](#)). Les résultats du gel indiquent que la protéine est relativement pure car il y a peu de contaminants par rapport à l'échantillon avant purification (**AP**). De plus, les contaminants sont minoritaires comparés à la protéine d'intérêt.

La faible intensité de bande correspondant à la masse de la protéine dans le *flow-through* (**FT**) indique qu'une grande quantité de protéine UCP-1 s'est accrochée à la matrice.



**Figure 14.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant UCP-1.

**MW** = marqueur de masse moléculaire (kDa)

**AP** = Echantillon avant purification

**FT** = *Flow-through*

**24 à 32** = Fractions d'intérêt de la purification sur colonne HisTrap™ FF





Concernant les échantillons **A** et **B** (Figure 12), il n'a pas été possible de les purifier car ils ont montré une viscosité trop importante. Il est fort probable que la viscosité vienne de la présence d'acides nucléiques, le tampon de lyse ne comportant pas de DNase.

L'échantillon **D** a été purifié mais deux pics d'absorbance étaient présents sur le chromatogramme (10 mM et 400 mM en imidazole, résultats non-montrés), ce qui pourrait indiquer plusieurs conformations ou populations de la protéine UCP-1. Cet échantillon n'a pas été utilisé pour la suite des expériences.

### 3.1.3. Production en grand volume d'UCP-1

Suite aux résultats obtenus précédemment, il a été décidé de produire en grand volume la protéine pour obtenir une grande quantité de corps d'inclusion en utilisant la condition d'induction optimale (pendant 18 heures à 20°C).

La deuxième partie de ce travail consiste à obtenir la protéine repliée. Cette seconde partie nécessitait donc une grande quantité de protéine pour tester différentes conditions de renaturation.

#### 3.1.3.1. Production, extraction et lavage des corps d'inclusion

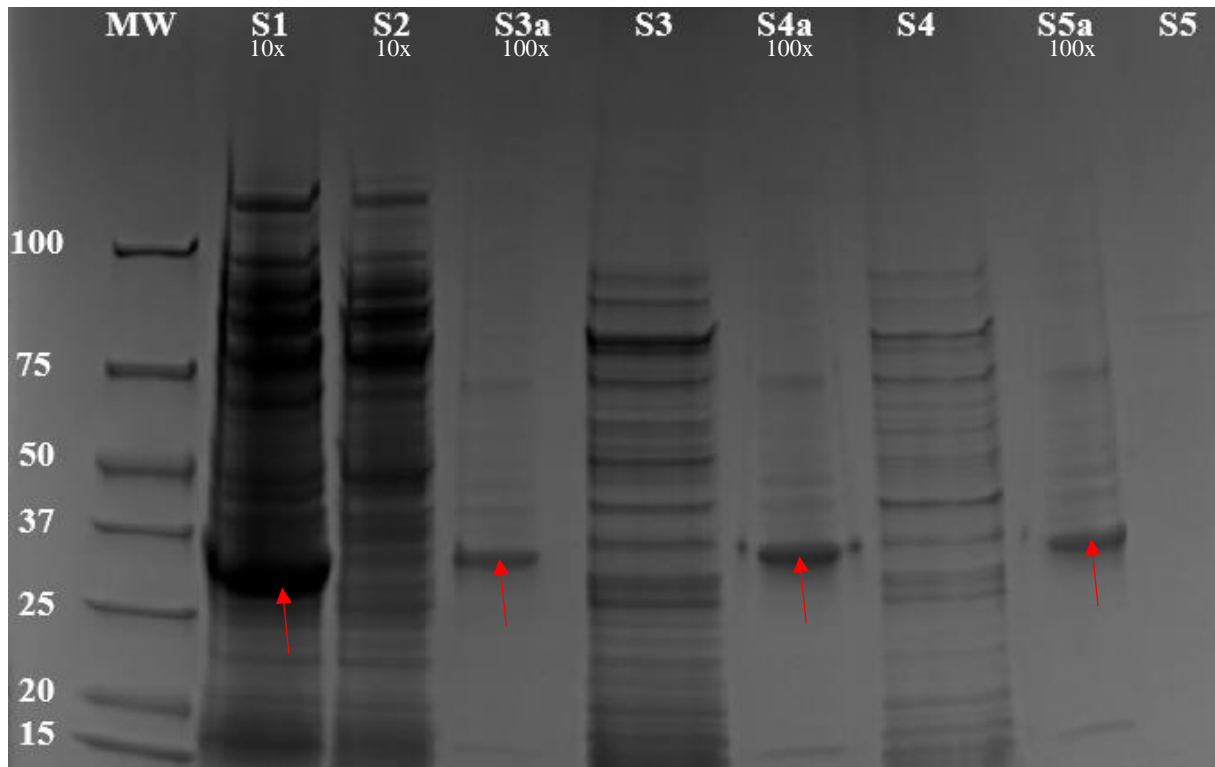
Un tube glycérol-stock contenant les cellules compétentes C41(DE3) d'*Escherichia coli* transformées pour UCP-1 a été utilisé pour produire la protéine sous forme de corps d'inclusion.

Deux précultures ont été réalisées pour maximiser la biomasse. Une première préculture de 5 mL a été incubée pendant 8 heures et une seconde préculture de 500 mL (2 x 250 mL) – inoculée par la première préculture – a été incubée pendant 18 heures à 37°C (§2.1.3.1).

La culture a été réalisée dans un fermenteur contenant 14.5 L de milieu 2XYT et 500 mL de la deuxième préculture. Ce milieu remplace le milieu LB utilisé jusqu'à présent car il est plus nutritif pour les bactéries (Tableau S1).

L'expression d'UCP-1 a été induite pendant 18 heures à 25°C et la culture bactérienne a été centrifugée pendant 15 minutes à 1600 g à 4°C. Le surnageant contenant le milieu de culture a été éliminé et le culot, contenant les cellules, a été congelé à -20°C.

Après avoir lysé les cellules par 3 passages à travers la presse de French et isolé le lysat, un test de lavage des corps d'inclusion a été réalisé sur un petit volume afin de déterminer le nombre de lavages nécessaires. Environ 4.7 g de corps d'inclusion ont été solubilisés dans 50 mL du premier tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100, 1 M NaCl, 1 mM DTT pour 500 mL).



**Figure 15.** Analyse par SDS-PAGE des différents lavages des corps d'inclusion d'UCP-1.

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**S1<sub>10x</sub>** = Lysat cellulaire (dilué 10 fois)

**S2<sub>10x</sub>** = Surnageant (dilué 10 fois) après centrifugation du lysat

**S3a<sub>100x</sub>** = Echantillon (dilué 100 fois) après le 1<sup>er</sup> lavage, avant centrifugation

**S3** = Surnageant après le 1<sup>er</sup> lavage, après centrifugation

**S4a<sub>100x</sub>** = Echantillon (dilué 100 fois) après le 2<sup>ème</sup> lavage, avant centrifugation

**S4** = Surnageant après le 2<sup>ème</sup> lavage, après centrifugation

**S5a<sub>100x</sub>** = Echantillon (dilué 100 fois) après le 3<sup>ème</sup> lavage, avant centrifugation

**S5** = Surnageant après le 3<sup>ème</sup> lavage, après centrifugation

Les flèches « → » indiquent les bandes où se situe la protéine UCP-1.

Le culot a été solubilisé par sonication (30 séries de 30 secondes et 30 secondes de pause dans un bain réfrigéré à 4°C) et l'échantillon homogénéisé pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 30 minutes à 15.000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est pesé (3.8 g) pour vérifier qu'il n'y ait pas eu de perte lors de ce premier lavage. Un second lavage est réalisé selon le même mode opératoire décrit ci-dessus. Après élimination du surnageant, le culot est pesé (3.6 g).

Enfin, un 3<sup>ème</sup> lavage a été opéré en solubilisant le culot dans 40 mL du second tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 1 mM DTT pour 500 mL). Le même mode opératoire que les deux précédents lavages a été suivi. Finalement, après ces 3 lavages, 3.5 g de corps d'inclusion ont été pesés. Il y a donc eu une perte de 1.2 g durant cette manipulation.

Afin de vérifier que la protéine ne se trouve pas dans le surnageant suite aux différents lavages, un gel polyacrylamide a été réalisé (Figure 15).

L'échantillon **S1<sub>10x</sub>** correspond au lysat cellulaire récupéré après les 2 passages à travers la presse de French et l'incubation pendant 20 minutes sous agitation à température ambiante (§2.1.3.2). Cet échantillon a été dilué 10 fois avant d'être déposé sur gel pour éviter toute saturation du gel polyacrylamide.

L'échantillon **S2<sub>10x</sub>** est le surnageant après centrifugation du lysat. Il n'y a pas de bande correspondant à la masse d'UCP-1. La protéine a donc été produite sous forme de corps d'inclusion et non sous forme soluble. Il y a une bande importante dans le lysat cellulaire (Figure 15 **S1<sub>10x</sub>**) correspondant à la masse attendue d'UCP-1 (~33 kDa).

Les fractions **S3a<sub>100x</sub>** à **S5a<sub>100x</sub>** correspondent aux échantillons obtenus après les différents lavages (**S3a<sub>100x</sub>**, après le 1<sup>er</sup> lavage ; **S4a<sub>100x</sub>**, après le 2<sup>ème</sup> lavage et **S5a<sub>100x</sub>**, après le 3<sup>ème</sup> lavage), avant centrifugation. Ces échantillons ont tous été dilués 100 fois pour la même raison que précédemment. L'analyse de ces 3 fractions démontre l'efficacité des lavages. En effet, il y a une grande diminution des contaminants qui étaient présents dans les échantillons **S1<sub>10x</sub>** et **S2<sub>10x</sub>**. On remarque également une bande majoritaire à la masse attendue correspondant à la protéine UCP-1 (Figure 15, flèche rouge). Au total, 1.2 g de corps d'inclusion ont été perdus lors des lavages (32%), qui correspondrait, d'après les résultats sur le gel, à des contaminants autres que la protéine d'intérêt.

Environ 47 g de CI ont été produits et récupérés lors de la production dans 15 L de culture. Ce résultat correspond à un rendement élevé (~3.13 g de CI par litre de culture). Les CI ont ensuite été lavés en suivant le mode opératoire décrit précédemment (§2.1.3.2).

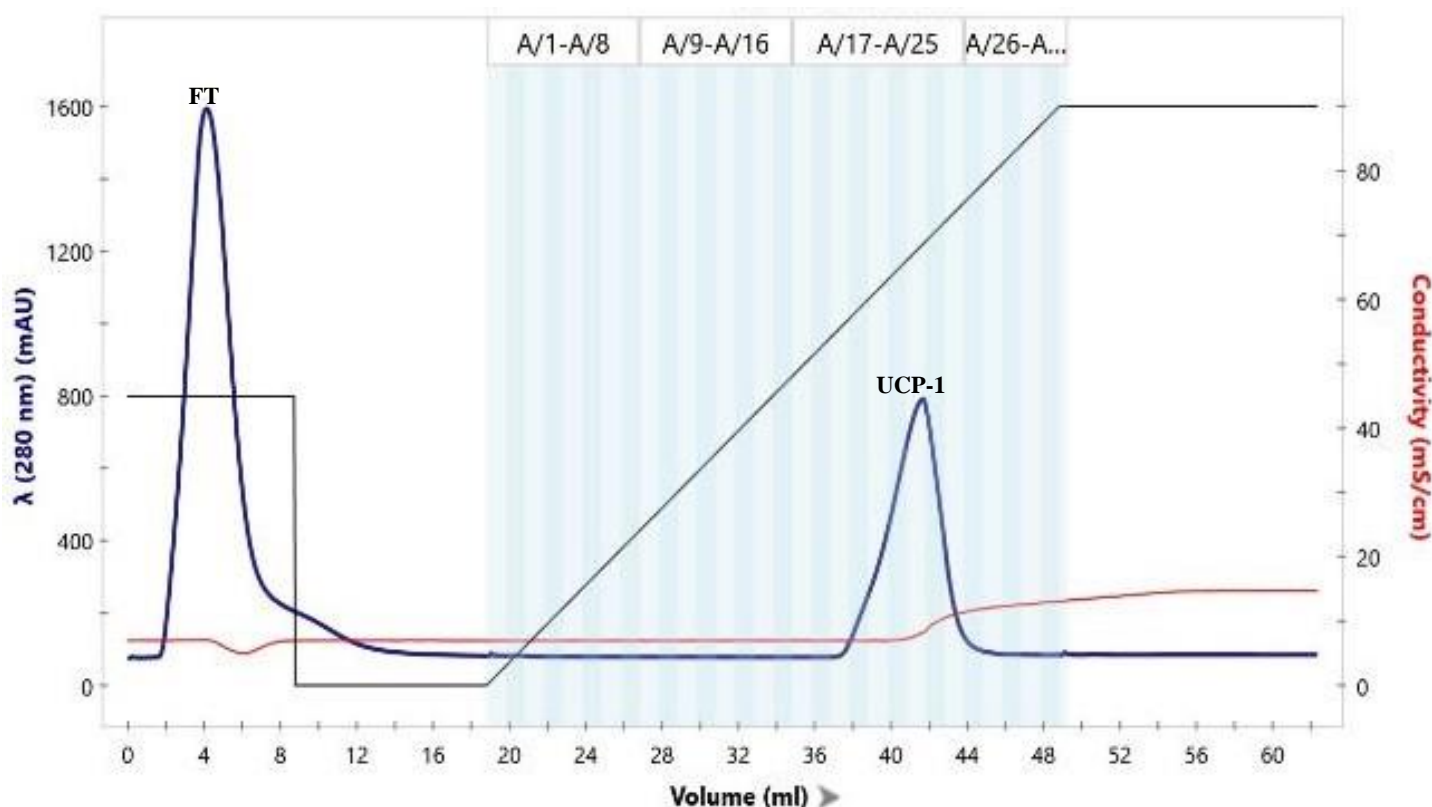


### 3.1.4. Purification par chromatographie d'affinité et dessalage

Environ 60 mg de CI lavés sont solubilisés dans 3 mL de tampon de solubilisation (20 mM phosphate de sodium pH 8, 1% SDS) et laissés à agiter pendant 18 heures à 20°C. La purification s'est déroulée suivant la méthode décrite précédemment (§2.1.3.3). Après l'équilibration (20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS) de la colonne, l'échantillon de 3 mL a été chargé à un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Cette charge est représentée par le *flow-through* (indiqué « FT » sur le chromatogramme, Figure 16).

Une fois l'absorbance à 280 nm nulle, un gradient d'imidazole est réalisé avec le tampon d'éluion (20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS, 500 mM imidazole)

pendant 30 mL à un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Des fractions de 1 mL sont récoltées lors de l'éluion. Une augmentation de l'absorbance à 280 nm apparaît à partir de la fraction 19 (300 mM en imidazole).



**Figure 16.** Purification d'un échantillon de 3 mL contenant les corps d'inclusion d'UCP-1 solubilisés (20 mM phosphate de sodium pH 8, 1% SDS) sur une colonne HisTrap™ FF de 5 mL.

La **courbe bleue** correspond à l'absorbance à 280 nm, la **courbe rouge** à la conductivité en mS·cm<sup>-1</sup> et la courbe noire au % de tampon d'éluion (20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS, 500 mM imidazole).

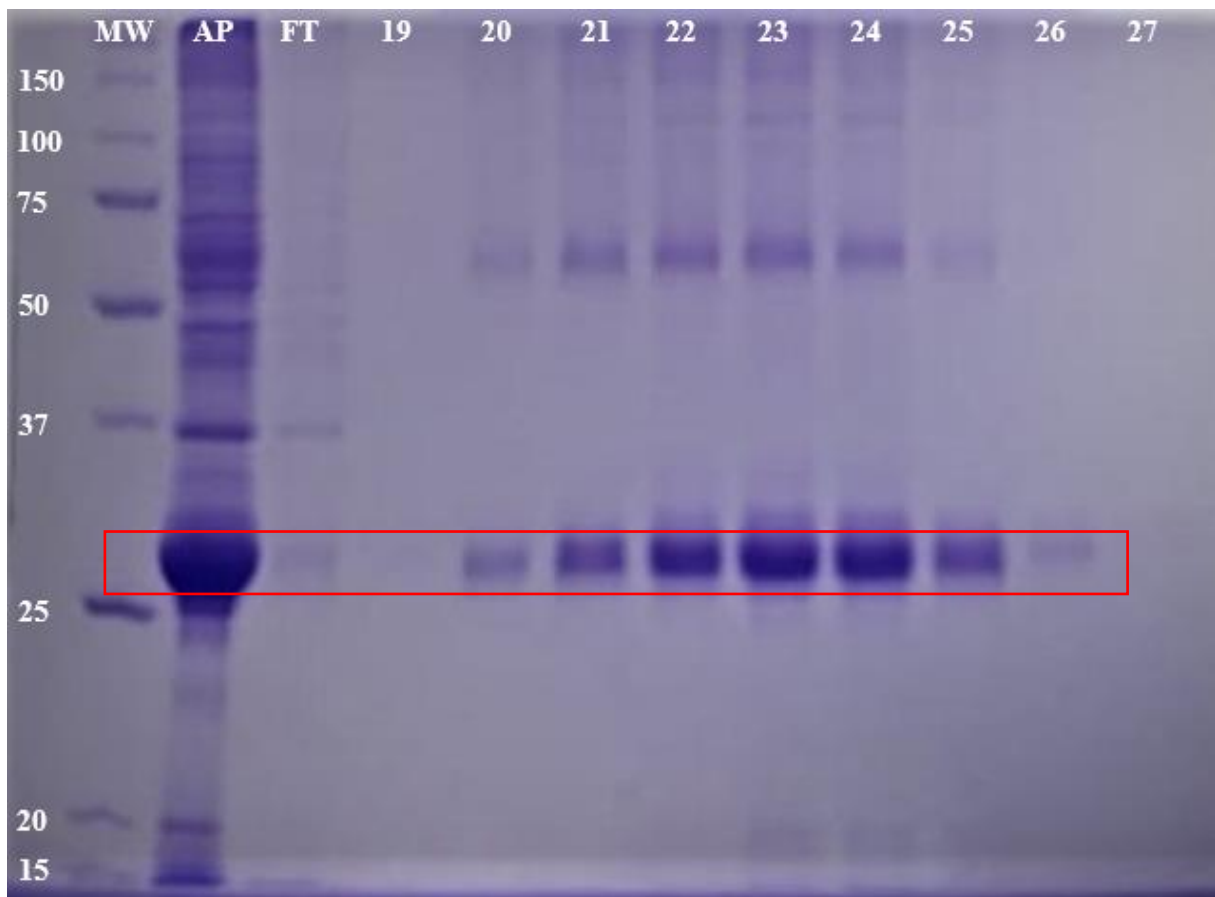
**FT** = *flow-through*

**UCP-1** = pic d'absorbance correspondant à la protéine UCP-1 (confirmé après analyse par SDS-PAGE)



Les fractions 19 à 27 analysées par SDS-PAGE (Figure 17) indiquent que la protéine est relativement pure car il y a peu de contaminants dans les fractions d'intérêt par rapport à l'échantillon avant purification (AP). La protéine s'est accrochée dans sa totalité à la matrice. En effet, il n'y a pas de bande correspondant à la masse d'UCP-1 dans la fraction *flow-through* (FT). Les fractions 21 à 25 contiennent une plus grande quantité de protéines par rapport aux autres fractions. En effet, l'intensité des bandes correspondant à la protéine est plus intense dans ces fractions.

Une bande est présente entre 50 et 75 kDa dans les fractions 20 à 25. Cette bande pourrait correspondre à un dimère d'UCP-1 (66 kDa) résistant à la dénaturation.



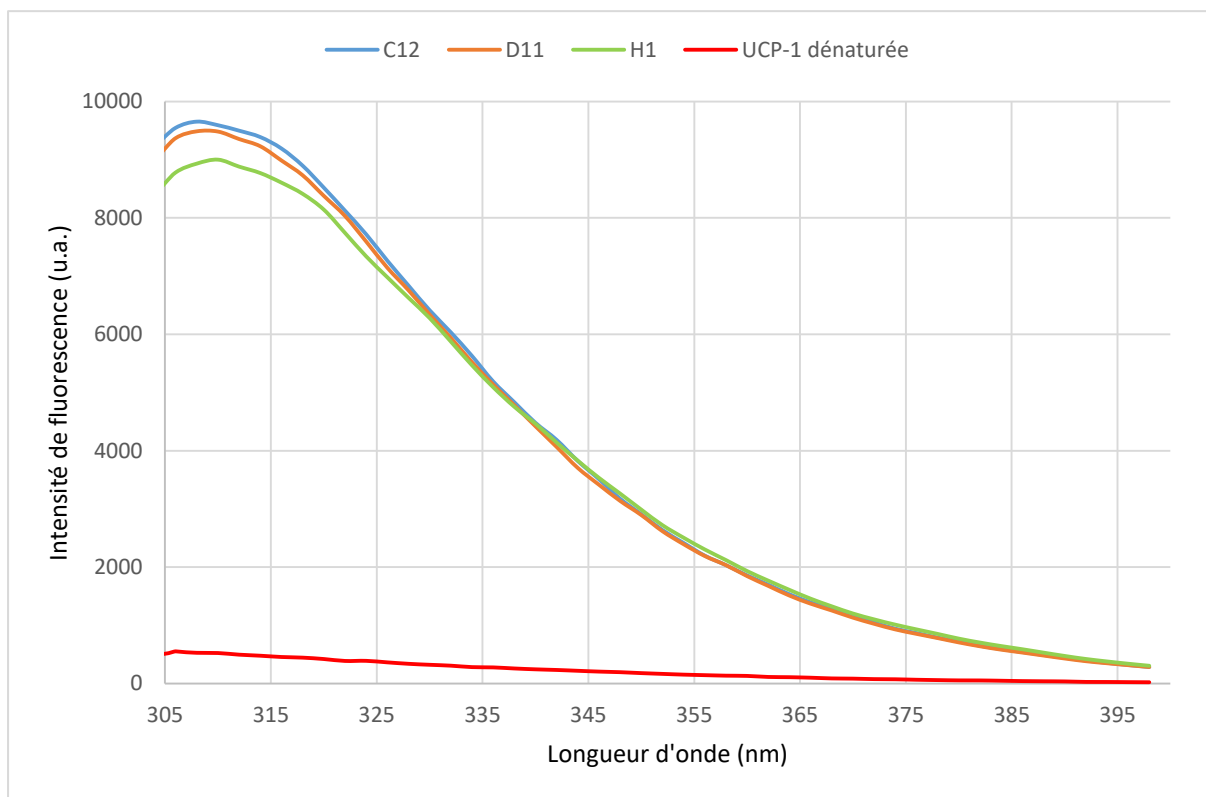
**Figure 17.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant UCP-1.

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**AP** = Echantillon avant purification

**FT** = *Flow-through*

**19 à 27** = Fractions d'intérêt



**Figure 18.** Spectres d'émission de fluorescence d'UCP-1 en fonction des 3 meilleures conditions de renaturation après 24h.

Le **spectre rouge** représente la protéine dénaturée dans le tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS).

Le **spectre bleu** représente la condition de renaturation **C12** (20 mM Tris-HCl pH 9, 0.5 M MPD, 1% OG).

Le **spectre orange** représente la condition de renaturation **D11** (20 mM Tris-HCl pH 9, 1% OG).

Le **spectre vert** représente la condition de renaturation **H1** (20 mM Tris-HCl pH 7, 30 mM SDS, 0.5 M MPD, 200 mM NaCl).

La concentration en protéine dans ces 4 échantillons est de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



Les fractions 21 à 25 ont donc été rassemblées avant d'être dessalées. L'objectif de la manipulation est de retirer l'imidazole présent dans l'échantillon en changeant le tampon d'élution avec un tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS). Pour ce faire, les 5 mL ont été chargés en deux fois sur une colonne de dessalage PD-10 Sephadex™ G-25 M en suivant les instructions du fabricant. Le volume final d'échantillon récupéré après le dessalage est de 7 mL.

Après le dessalage, la concentration en protéine a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm *via* la loi de Beer-Lambert décrite précédemment (§2.1.3.4). Sachant qu'UCP-1 possède un coefficient d'extinction molaire théorique de 34070 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (ProtParam, Expasy™) et que l'absorbance à 280 nm est de 0.7, la concentration de l'échantillon de 7 mL après dessalage est de 0.9 mg·mL<sup>-1</sup> ce qui correspond à ~6.3 mg de protéines dans l'échantillon.

### 3.1.4. Replie ment d'UCP-1

#### 3.1.4.1. Génération du plan d'expérience de replie ment et de la plaque 96 puits

En vue de déterminer le meilleur tampon de replie ment de la protéine, 96 conditions de tampon ont été générées par le programme JMP (SAS®). 6 facteurs ont été testés : [SDS], [MPD], [NaCl], [OG], pH et [UCP-1].

L'OG (octyl-β-glucoside) est un détergent non-ionique fréquemment utilisé pour solubiliser les protéines membranaires. Ce détergent a notamment été utilisé dans le cadre d'une recherche impliquant la protéine UCP-1. En effet, il a été démontré que la protéine UCP-1 adopte une conformation repliée dans ce détergent (67% de structures en hélices α) [14].

Les différents tampons générés par le programme (Tableau S4) ont été distribués dans une plaque en 96 puits par le robot Microlab Star (Hamilton®). La plaque a ensuite été scellée et incubée sous agitation à 25°C.

La fluorescence intrinsèque du tryptophane et de la tyrosine d'UCP-1 a été mesurée après 24 et 48 heures (§2.1.4.2). Le spectre d'émission de fluorescence d'une protéine est lié à l'environnement des résidus aromatiques. C'est donc l'organisation tridimensionnelle de la protéine (structure tertiaire) qui est mesurée. Cette technique est couramment utilisée pour suivre le replie ment des protéines [11]. Les conditions de renaturation comprenant les changements de fluorescence les plus importants ont été obtenues après 24 heures. Sur base de ces résultats, 3 tampons de replie ment dénotent des autres par une augmentation d'intensité de fluorescence (Figure 18). Les spectres d'émission de fluorescence indiquent qu'il y a un changement d'environnement entre la protéine dénaturée et les 3 conditions de replie ment. En effet, il y a une augmentation d'intensité de fluorescence pour les 3 échantillons. Ces résultats ont déjà été observés lors d'études avec la méthode SDS/MPD qui indiquent une augmentation d'intensité dans un milieu SDS quand la protéine est repliée [11].



Pour déterminer la meilleure condition de repliement de la protéine, il a été décidé de réaliser des mesures de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain. En effet, cette technique de spectroscopie mesure l'activité optique des molécules asymétriques en solution et fournit des informations sur les structures secondaires des protéines.

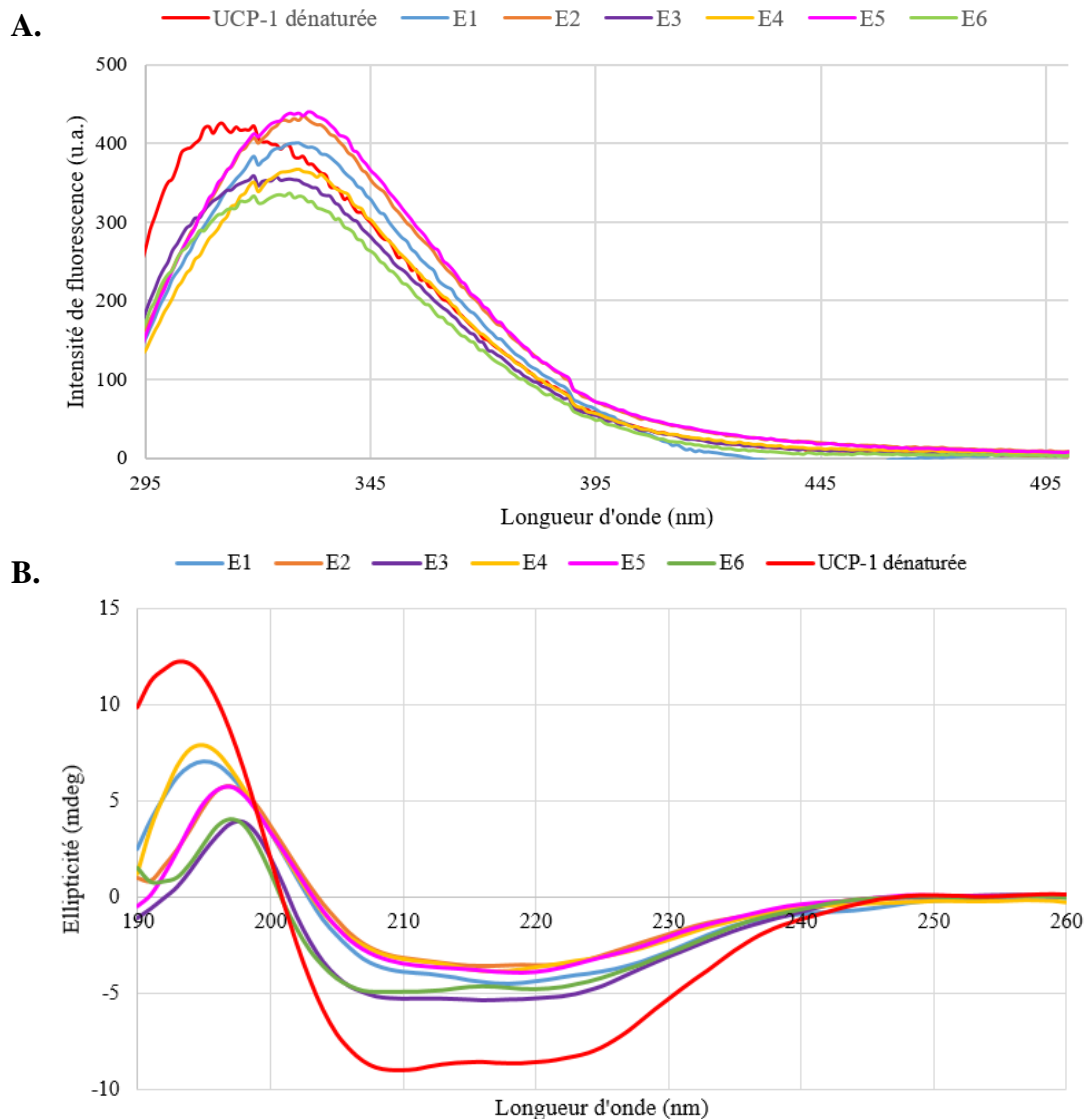
Pour analyser et déterminer la meilleure condition de repliement entre les 3 présentées précédemment (H1, D11 et C12), différents échantillons ont été préparés dans des tubes Eppendorf™ dont le volume final est de 300 µL (pour rester dans les mêmes conditions que la plaque 96 puits).

Les échantillons **E1** à **E3** fournissent des informations sur l'aspect structural de la protéine et correspondent aux conditions **D11**, **C12** et **H1**. En plus de ces trois échantillons, 3 autres échantillons ont été préparés pour obtenir des informations sur l'aspect fonctionnel de la protéine. Les échantillons **E4** à **E6** contiennent donc un rapport GDP : UCP-1 (1 :1) en plus des conditions D11, C12 et H1. Il a été démontré qu'UCP-1 lie ce nucléotide avec une stœchiométrie de 1 :1 et un  $K_d$  de 46 nM [13]. 6 blancs correspondant aux 6 échantillons sans la protéine ont également été préparés. Les échantillons sont restés 24 heures sous agitation à 25°C.

**Tableau 4.** Résumé des compositions des 6 échantillons réalisés pour mesurer les structures secondaires par dichroïsme circulaire.

La concentration en protéine dans ces 6 échantillons est de 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>.

<b>Echantillons</b>	<b>Compositions</b>
<b>E1</b>	20 mM Tris-HCl pH 9, 1% OG ( <b>D11</b> )
<b>E2</b>	20 mM Tris-HCl pH 9, 0.5 M MPD, 1% OG ( <b>C12</b> )
<b>E3</b>	20 mM Tris-HCl pH 7, 30 mM SDS, 0.5 M MPD, 200 mM NaCl ( <b>H1</b> )
<b>E4</b>	20 mM Tris-HCl pH 9, 1% OG ( <b>D11</b> ) + GDP (1 :1)
<b>E5</b>	20 mM Tris-HCl pH 9, 0.5 M MPD, 1% OG ( <b>C12</b> ) + GDP (1 :1)
<b>E6</b>	20 mM Tris-HCl pH 7, 30 mM SDS, 0.5 M MPD, 200 mM NaCl ( <b>H1</b> ) + GDP (1 :1)



**Figures 19 A.** Spectres d'émission de fluorescence d'UCP-1 (0.1 mg·mL<sup>-1</sup>) et **B.** Spectres CD de la protéine UCP-1 (0.1 mg·mL<sup>-1</sup>) dans l'UV-lointain (190-260nm).

Le **spectre rouge** représente la protéine dénaturée dans le tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS).

Le **spectre bleu (E1)** représente la condition de renaturation **D11** (20 mM Tris-HCl pH 9, 1% OG).

Le **spectre orange (E2)** représente la condition de renaturation **C12** (20 mM Tris-HCl pH 9, 0.5 M MPD, 1% OG).

Le **spectre mauve (E3)** représente la condition de renaturation **H1** (20 mM Tris-HCl pH 7, 30 mM SDS, 0.5 M MPD, 200 mM NaCl).

Le **spectre jaune (E4)** représente la condition de renaturation **D11** + GDP (1 :1).

Le **spectre rose (E5)** représente la condition de renaturation **C12** + GDP (1 :1).

Le **spectre vert (E6)** représente la condition de renaturation **H1** + GDP (1 :1).

Il y a une différence de longueur d'onde d'intensité de fluorescence maximale entre la protéine UCP-1 dénaturée dans le tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS) et les 6 conditions testées (Figure 19A.). En effet, un déplacement vers les grandes longueurs d'onde (déplacement bathochrome) est induit par les 6 conditions, indiquant une modification de conditions environnementales telles qu'un environnement plus polaire. En plus du déplacement bathochrome, les conditions E2 et E5 présentent une augmentation de fluorescence. La condition E2 correspond à la protéine dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 9, 0.5 M MPD, 1% OG et la condition E5 correspond à la protéine dans le même tampon qu'E2 mais avec un rapport GDP : UCP-1 de 1 : 1. Les autres conditions montrent également un déplacement bathochrome mais avec une diminution d'intensité contrairement aux conditions E2 et E5. D'après la spectroscopie de fluorescence, il semble que les conditions E2 et E5 soient les meilleures conditions pour le repliement de la protéine UCP-1. Ce résultat corrobore certaines observations qui ont démontré que la protéine UCP-1 était correctement repliée dans le détergent OG [15].

Pour confirmer ces analyses et obtenir des informations sur la structure secondaire de la protéine UCP-1, des mesures CD dans l'UV-lointain ont été réalisées selon la méthode décrite précédemment (§2.1.4.3). La région de l'UV-lointain (190-250 nm) fournit des informations sur la structure secondaire grâce aux signaux dus aux liaisons peptidiques tandis que la région UV-proche (250-300 nm) donne des informations sur la structure tertiaire *via* des signaux provenant des acides aminés aromatiques. En fonction de la nature de la structure secondaire, des signaux CD typiques sont observés. Les hélices  $\alpha$  présentent un spectre caractéristique avec deux maxima d'ellipticité négative à 208 nm et à 222 nm.

Les spectres CD de la protéine UCP-1 sont présentés à la figure 19B. L'échantillon contenant la protéine dénaturée dans le tampon de stockage présente un signal plus intense à 208 et 222 nm que les autres conditions. Cette observation pourrait être due à une augmentation du contenu de la structure en hélices  $\alpha$  comme cela est souvent observé avec les protéines en présence de SDS donnant une structure  *$\alpha$ -helix-like* [11]. Les conditions E1 à E6 présentent toutes un spectre typique d'une structure en hélices  $\alpha$ . Les conditions E1 et E4 présentent une ellipticité maximale positive autour de 195 nm. Le spectre de la condition E6 présente une structure en hélices  $\alpha$  plus marquée que celle de la condition E3. L'ajout de GDP engendre donc une modification structurelle de la protéine UCP-1.

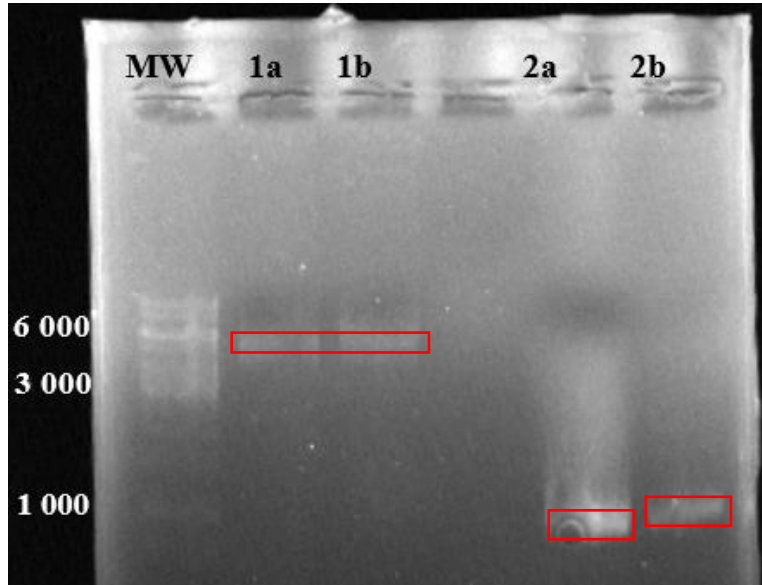


Afin d'obtenir plus d'informations concernant les structures secondaires, le pourcentage de structures secondaires a été déterminée selon la méthode décrite précédemment (§2.1.4.3).

**Tableau 5.** Pourcentage de structures secondaires de la protéine UCP-1 dénaturée et renaturée.

Echantillons	%Hélices $\alpha$	%Feuillets $\beta$	%Coudes	%Non-ordonnées
E1	16	31	13	40
E2	13,7	35,3	11	40
E3	21	24	13	42
E4	8	36	12	44
E5	16	28	13	42
E6	19	24	13	42
Protéine dénaturée	31	19	13	36

Malgré l'apparence des spectres CD ressemblant à une structure en hélices  $\alpha$  (Figure 19B.), les résultats du pourcentage de repliement des différentes conditions (Tableau 6) indiquent que la protéine UCP-1 n'est que partiellement hélicoïdale. Etonnement, le pourcentage en hélices  $\alpha$  est plus important pour la protéine dans le tampon de stockage (protéine dénaturée). Ces résultats indiqueraient que la protéine UCP-1, en présence de SDS, adopte une conformation davantage  $\alpha$ -*helix-like* dans le tampon de stockage que dans les différentes conditions. Cela correspondrait ainsi aux résultats obtenus à partir des mesures de CD. Il serait donc judicieux d'optimiser et de tester plus de conditions de repliement de la protéine UCP-1 en modulant diverses concentrations en SDS et en MPD. En effet, plus de la moitié de la protéine indique une structure non-ordonnée.

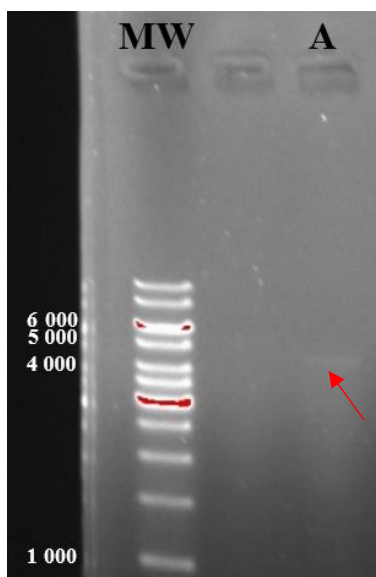


**Figure 20.** Analyse sur gel d'agarose 1% du plasmide pET9a-L1 (avant digestion enzymatique) et du produit PCR.

**MW** = Marqueur de paires de base de l'ADN

**1a** et **1b** = Plasmide pET9a-L1 avant digestion enzymatique

**2a** et **2b** = Produits PCR



**Figure 21.** Analyse sur gel d'agarose 1% du plasmide pET9a-L1 après digestion enzymatique.

**MW** = Marqueur de paires de base de l'ADN

**A** = Plasmide pET9a-L1 digéré par les enzymes de restriction BamH1 et NdeI.



---

## 3.2. PARTIE L1

---

### 3.2.1. Biologie moléculaire

Le plasmide pET9a-L1 (5182 pb) possède la séquence codant pour la métallo- $\beta$ -lactamase L1 de *Stenotrophomans maltophilia*. Ce plasmide a été modifié car un peptide signal se situait en amont du gène codant pour L1. L'objectif de cette manipulation a été de remplacer le peptide signal par une étiquette poly-histidine (Figure S2) en N-terminal en vue de faciliter la purification de la protéine (IMAC). De plus, l'élimination du peptide signal a permis d'éviter l'exportation de L1 dans le périplasme, confinant L1 dans le cytoplasme sous forme de corps d'inclusion.

#### 3.2.1.1. Extraction et digestion du plasmide pET9a-L1

La partie biologie moléculaire a commencé par la réalisation d'une PCR (réaction de polymérisation en chaîne) pour amplifier le nouvel insert selon la méthode décrite précédemment (§2.2.1.1).

Un gel d'agarose 1% a été réalisé pour vérifier la taille du produit PCR (Figure 20). Une bande apparaît entre 6000 et 5000 pb (Figure 20.1a et 1b) correspondant à la taille du plasmide pET9a-L1 (5182 pb) avant digestion enzymatique. Le produit PCR révèle une bande en-dessous de 1000 pb correspondant à la taille de l'insert (843 pb) déterminée par Benchling (*Inc*). Le produit PCR contient le gène codant pour la protéine L1 modifié par les 2 séquences d'oligonucléotides (Tableau S2).

En parallèle de la PCR, une digestion enzymatique est réalisée (§2.2.1.1). Cette étape consiste à extraire le gène codant pour la protéine L1 du plasmide pET9a-L1 pour ensuite la remplacer par le nouvel insert qui contient une étiquette poly-histidine à la place du peptide signal. Pour ce faire, les enzymes de restriction BamH1 et NdeI ont digéré le plasmide pET9a-L1 pendant 1 heure à 37°C. Le produit de digestion a été analysé sur gel d'agarose 1% (Figure 21). Une bande apparaît entre 4000 et 5000, correspondant à la taille du produit de digestion (4301 pb) déterminée par Benchling *via* une digestion enzymatique *in silico*.

Les bandes correspondant au plasmide pET9a digéré ( $10.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et au produit PCR ( $55.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ont ensuite été prélevées et isolées du gel.



### 3.2.1.2. Transformation bactérienne, précultures et séquençage du plasmide pET9a-L1-6xHis

Une ligature a été réalisée en vue de construire le nouveau plasmide pET9a-L1-6xHis (Figure S3) selon la méthode décrite précédemment (§2.2.1.2). Ce plasmide contient un gène de résistance à la kanamycine et un promoteur T7 en amont du gène codant pour la protéine L1.

Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* NEB®5-alpha (cellules dérivées des DH5α) ont été utilisées comme hôtes pour le plasmide pET9a-L1-6xHis. Ces souches de clonage permettent une efficacité de transformation élevée et une production du plasmide d'intérêt en grandes quantités. Une fois la transformation et la préculture réalisées (§2.2.1.3), 8 échantillons contenant l'ADN plasmidique en solution ont été envoyés au séquençage au GIGA© (ULiège). La concentration de l'ADN plasmidique (pET9a-L1-6xHis) a été déterminée *via* la mesure d'absorbance à 260 nm et équivaut à 30 µg·mL<sup>-1</sup>.

Lors de l'analyse des données de séquençages, il n'y a pas eu de mutation entre les différents échantillons sauf un présentant une ambiguïté. Le plasmide pET9a-L1-6xHis a donc été correctement construit et a été utilisé lors des prochaines transformations en vue de produire la protéine L1.

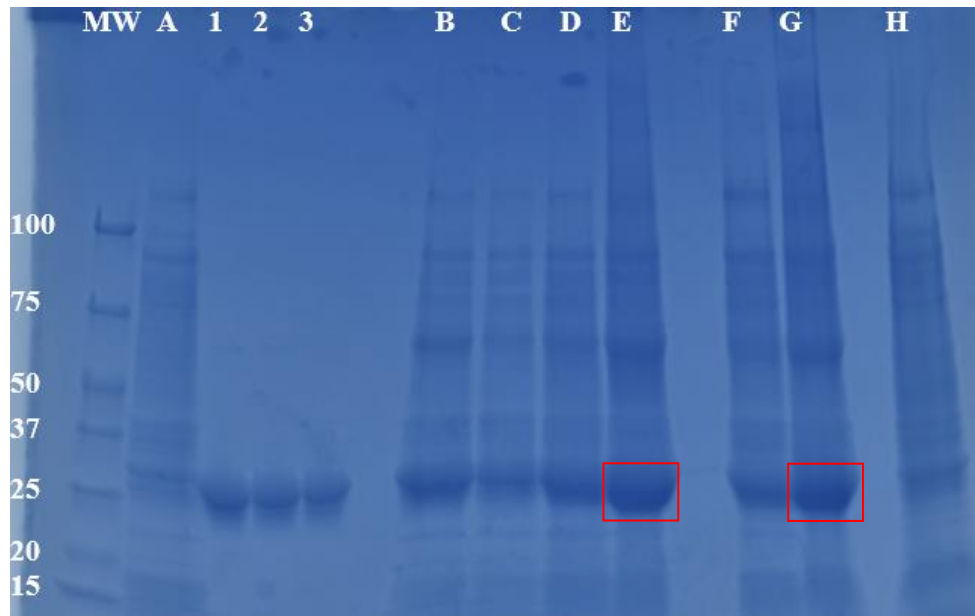
### 3.2.2. Optimisation de la production de corps d'inclusion

Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* BL21(DE3) et KRX ont été utilisées comme hôtes pour le plasmide pET9a-L1-6xHis. Ces deux souches possèdent des systèmes d'induction différents.

La souche BL21(DE3) est fréquemment utilisée pour produire des protéines car elle possède l'ARN T7 polymérase ce qui la rend inductible à l'IPTG.

La souche KRX est un système de clonage et d'expression du rhamnose. Le gène d'intérêt – ici, le gène codant pour L1 – est cloné sous le contrôle du promoteur rhaPBAD inductible par le L-rhamnose. Une fois le glucose dégradé, la souche KRX utilise le rhamnose comme glucide à la place du glucose, ce qui induit l'expression de L1.

Cette étape du travail a consisté à tester et à optimiser la production de corps d'inclusion de L1. Après transformations de ces deux souches et après les 6 précultures réalisées (§2.2.2.2), 22 conditions de cultures ont été testées (Tableau S3).



**Figure 22.** Analyse par SDS-PAGE d'une production de L1.

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**A** = ind. 27°C LB-4H-Rham 0,1%

**1** = 1.5 µg L1 « pure »

**2** = 1 µg L1 « pure »

**3** = 0.8 µg L1 « pure »

**B** = ind. 37°C LB-4H-Rham 0,1%

**C** = ind. 37°C 2XYT-4H-IPTG 5mM

**D** = ind. 37°C 2XYT-4H-Rham 0,1%

**E** = ind. 37°C 2XYT-18H-Rham 0,05%

**F** = ind. 37°C 2XYT-18H-IPTG 1mM

**G** = ind. 37°C TB-4H-Rham 0,1%

**H** = ind. 27°C TB-18H-IPTG 1mM

Les deux meilleures conditions sont représentées par un cadre rouge.



**Figure 23.** Analyse par SDS-PAGE d'une seconde production de L1.

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**1, 1'** = 2 µg L1 « pure »

**2** = 1.5 µg L1 « pure »

**3** = 1 µg L1 « pure »

**4** = 0.8 µg L1 « pure »

**A** = ind. 27°C LB-4H-IPTG 1mM

**B** = ind. 27°C LB-18H-IPTG 5mM

**C** = ind. 27°C 2XYT-4H-IPTG 5mM

**D** = ind. 27°C 2XYT-4H-Rham 0,1%

**E** = ind. 27°C 2XYT-18H-Rham 0,05%

**F** = ind. 27°C 2XYT-18H-IPTG 1mM

**G** = ind. 27°C TB-4H-IPTG 5mM

**H** = ind. 27°C TB-4H-Rham 0,1%

**I** = ind. 27°C TB-18H-Rham 0,05%

Les deux meilleures conditions sont représentées par un cadre rouge.

Les résultats des différentes productions ont été analysés par SDS-PAGE ([Figure 22](#) et [Figure 23](#)). En conditions dénaturantes, la protéine L1 se trouve sous forme de monomère. Le monomère de L1 possède une masse de ~28 kDa. Dans chaque puits, une bande se situe entre 25 et 35 kDa ce qui correspond à la masse attendue du monomère de L1.

Sur les 22 conditions de cultures testées, 17 ont pu être analysées par SDS-PAGE. Les 5 autres conditions n'ont pas atteint une absorbance suffisante à 600 nm pour induire l'expression de la protéine L1 ([Tableau S3](#)).

La quantité de L1 présente dans chaque condition a pu être estimée en comparant l'intensité de chaque bande. Les deux gels indiquent clairement que la souche KRX produit plus de protéines que la souche BL21(DE3). En effet, les 4 meilleures conditions sont représentées par les encadrés rouge sur les gels et correspondent toutes à l'induction au rhamnose. Ces conditions sont les **E** (milieu 2XYT, induction à 37°C pendant 18 heures avec 0.05% de rhamnose) et **G** (milieu TB, induction à 37°C pendant 4 heures avec 0.1% de rhamnose) sur la [Figure 22](#) et les **E** (milieu 2XYT, induction à 27°C pendant 18 heures avec 0.05% de rhamnose) et **I** (milieu TB, induction à 27°C pendant 18 heures avec 0.05% de rhamnose) sur la [Figure 23](#).

#### 3.2.2.1. Quantification de L1 par SDS-PAGE

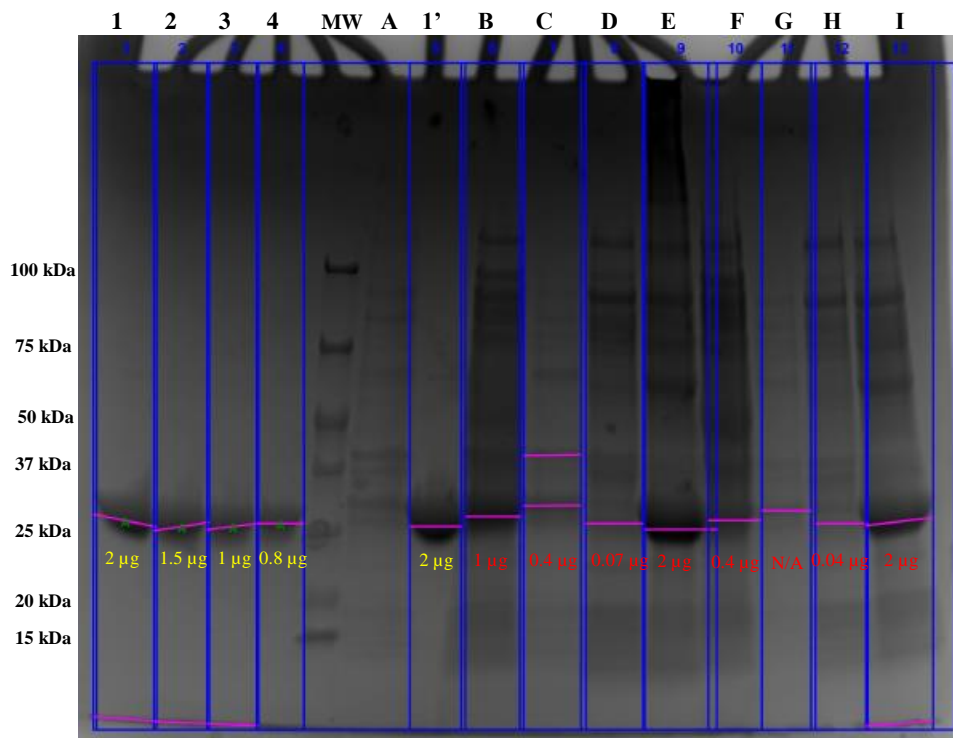
Pour déterminer la concentration de protéine en solution, une droite d'étalonnage est réalisée avec 4 quantités (2 µg – 1.5 µg – 1 µg – 0.8 µg, puits 1 à 4 [Figures 22](#) et [23](#)) de protéine L1 pure à partir d'une solution concentrée à 8.8 µg·µL<sup>-1</sup>. La droite d'étalonnage permet de doser L1 par quantification absolue en SDS-PAGE.

En procédant de cette manière pour déterminer la concentration, seule L1 est mesurée contrairement aux mesures d'absorbance à 280 nm qui quantifient toutes les protéines présentes en solution. Cette quantification fournit donc des concentrations plus exactes que celles déterminées par mesure d'absorbance à 280 nm.



Le gel ci-dessous (Figure 24) correspond à la quantification absolue en SDS-PAGE qui se base sur celui présenté à la Figure 23. Les conditions **E** (milieu 2XYT, induction à 27°C pendant 18 heures avec 0.05% de rhamnose) et **I** (milieu TB, induction à 27°C pendant 18 heures avec 0.05% de rhamnose) fournissent une masse en protéine supérieure à celle des autres échantillons.

Finalement, c'est la condition **E** qui sera utilisée pour produire L1 en grand volume. En effet, le milieu 2XYT est plus économique que le milieu TB.



**Figure 24.** Quantification par SDS-PAGE des différentes conditions de production de L1.

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**1 à 4 (+ 1')** = Droite d'étalonnage de L1 pure. Les quantités connues sont indiquées en jaune en-dessous des bandes.

**A à I** = Conditions décrites à la Figure 23. Les quantités déterminées par rapport à la droite d'étalonnage sont indiquées en rouge en-dessous des bandes.

Equation de la régression linéaire réalisée à partir de la droite d'étalonnage :

$$y = 0.00218 \cdot x - 205 \text{ avec un coefficient de détermination de } 0.95.$$

$x$  est l'intensité de la bande détectée et  $y$  la masse de la protéine en  $\mu\text{g}$ .





### 3.2.3. Production de L1

#### 3.2.3.1. Production, extraction et lavage des corps d'inclusion

Des cellules KRX possédant le plasmide pET9a-L1-6xHis sont utilisées pour produire la protéine L1. Une première préculture est incubée pendant 8 heures et une seconde préculture – inoculée par la première préculture – est incubée pendant 18 heures à 37°C (§2.2.3.1).

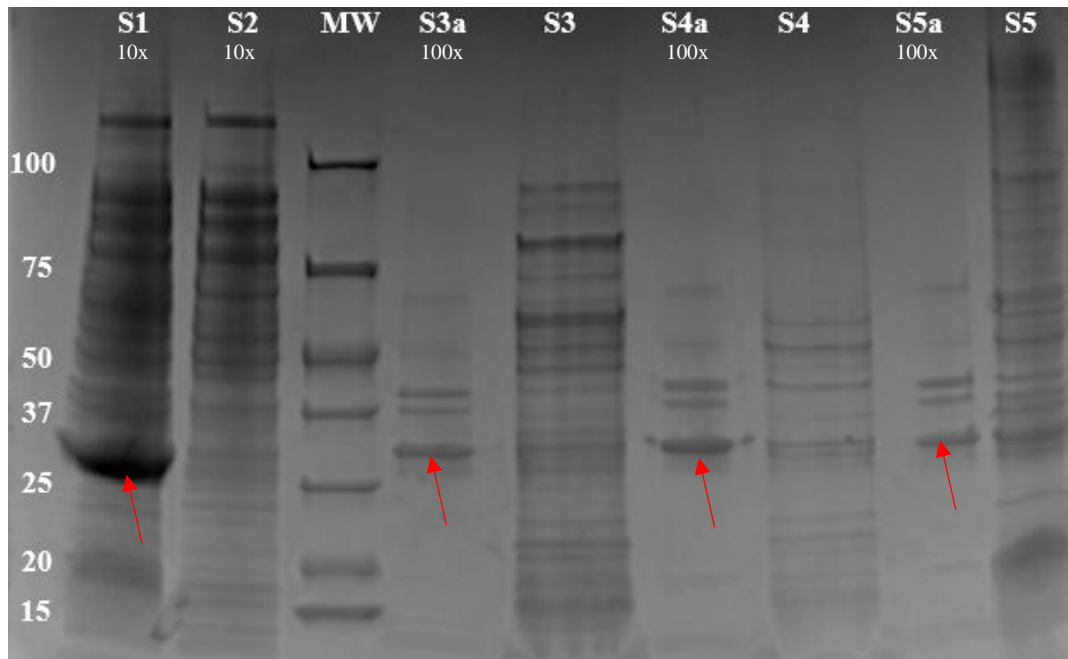
La culture a été démarrée dans un fermenteur contenant 9.5 L de milieu 2XYT avec 0.05% de glucose, 0.05% de rhamnose, 50  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de kanalycline inoculé par 500 mL de la seconde préculture pendant 18 heures à 37°C. L'expression de L1 est induite une fois que tout le glucose est dégradé par les cellules KRX.

La culture est centrifugée pendant 15 minutes à 5400 g à 4°C. Le surnageant contenant le milieu de culture est éliminé et le culot, contenant les cellules, est stocké à -20°C.

Après avoir lysé les cellules par 3 passages à travers la presse de French et isolé le lysat selon la méthode décrite précédemment (§2.2.3.2.), un test de lavage des corps d'inclusion est réalisé sur un petit volume afin de déterminer le nombre de lavages nécessaires. Environ 5.8 g de corps d'inclusion ont été solubilisés dans 70 mL du premier tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100, 1 M NaCl, 1 mM DTT pour 500 mL).

Le culot est solubilisé par sonication et l'échantillon est homogénéisé pendant 30 minutes à température ambiante sur un plateau agitateur avant d'être centrifugé pendant 30 minutes à 15.000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est pesé (4.2 g). Un second lavage est réalisé selon le même mode opératoire décrit ci-dessus. Après élimination du surnageant, le culot est à nouveau pesé (3.7 g).

Enfin, un 3ème lavage a été opéré en solubilisant le culot dans 45 mL du second tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM DTT pour 500 mL). Le même mode opératoire que les deux précédents lavages a été suivi. Finalement, après ces 3 lavages, 3.3 g de corps d'inclusion ont été pesés. Il y a donc eu une perte de 2.5 g durant l'étape de lavage des corps d'inclusion.



**Figure 25.** Analyse par SDS-PAGE des différents lavages des corps d'inclusion de L1.

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**S1<sub>10x</sub>** = Lysat cellulaire (dilué 10 fois)

**S2<sub>10x</sub>** = Surnageant (dilué 10 fois) après centrifugation du lysat

**S3a<sub>100x</sub>** = Echantillon (dilué 100 fois) après le 1<sup>er</sup> lavage, avant centrifugation

**S3** = Surnageant après le 1<sup>er</sup> lavage, après centrifugation

**S4a<sub>100x</sub>** = Echantillon (dilué 100 fois) après le 2<sup>ème</sup> lavage, avant centrifugation

**S4** = Surnageant après le 2<sup>ème</sup> lavage, après centrifugation

**S5a<sub>100x</sub>** = Echantillon (dilué 100 fois) après le 3<sup>ème</sup> lavage, avant centrifugation

**S5** = Surnageant après le 3<sup>ème</sup> lavage, après centrifugation

Les flèches « **→** » indiquent les bandes où se situe la protéine L1.

Pour vérifier que la protéine L1 ne se trouve pas dans le surnageant durant ces différents lavages, un gel polyacrylamide est réalisé (Figure 25).

L'échantillon **S1<sub>10x</sub>** correspond au lysat cellulaire après les 3 passages à travers la presse de French et l'incubation pendant 20 minutes sous agitation à température ambiante (§2.2.3.2.). Cet échantillon a été dilué 10 fois avant d'être déposé sur gel pour éviter toute saturation du gel polyacrylamide.

L'échantillon **S2<sub>10x</sub>** est le surnageant après 30 minutes de centrifugation du lysat à 17 700 g et à 4°C. Cet échantillon a également été dilué 10 fois pour la même raison.

Il y a une bande importante dans le lysat cellulaire (Figure 25 S1<sub>10x</sub>) correspondant à la masse attendue du monomère de L1 (~28 kDa). Cette bande est absente dans le surnageant après centrifugation du lysat (Figure 25 S2<sub>10x</sub>) ce qui indique que L1 est produite exclusivement sous forme de corps d'inclusion et non sous forme soluble.

Les fractions **S3a<sub>100x</sub>** à **S5a<sub>100x</sub>** correspondent aux échantillons obtenus après les différents lavages (**S3a<sub>100x</sub>**, après le 1<sup>er</sup> lavage ; **S4a<sub>100x</sub>**, après le 2<sup>ème</sup> lavage et **S5a<sub>100x</sub>**, après le 3<sup>ème</sup> lavage), avant centrifugation. Ces échantillons ont tous été dilués 100 fois pour la même raison que précédemment. L'analyse de ces 3 fractions démontre l'efficacité des lavages. En effet, les contaminants présents dans les échantillons **S1<sub>10x</sub>** et **S2<sub>10x</sub>** sont absents dans les 3 fractions après les différents lavages.

Les fractions **S3** à **S5** correspondent aux échantillons obtenus après les différents lavages et après centrifugation. Ces fractions indiquent également que les lavages sont efficaces. De fait, des bandes de contaminants apparaissent après centrifugation. De plus, l'absence de la bande correspondant à la protéine L1 dans ces 3 fractions confirme le fait que la protéine est produite exclusivement sous forme de corps d'inclusion.

Environ 47 g de corps d'inclusion ont été produits et récupérés lors de la production de 10 L de culture (9,5 L de milieu de culture et 500 mL de préculture). Ce résultat correspond à un rendement élevé. En effet, ~4,7 g de corps d'inclusion sont produits par litre de culture. Les CI ont été lavés selon le mode opératoire décrit précédemment (§2.2.3.2.)

**Tableau 5 A.** Résumé des différentes purifications réalisées pour purifier la protéine L1.

Numéros essais	Types de colonnes (volumes)	Tampons d'équilibration	Tampons d'élution	Débits (mL·min <sup>-1</sup> )
1	IMAC Profinity® (20 mL)	50 mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 5 mM Imidazole	TE <sup>1</sup> + 500 mM imidazole	5
2	IMAC Profinity® (20 mL)	50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS	TE + 500 mM imidazole	5
3	IMAC Profinity® (20 mL)	50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS	TE + 500 mM imidazole	1
4	HisTrap FF (5 mL)	20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS	TE + 1 M imidazole	1
5	NIPC (1 mL)	20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS	TE + 1 M imidazole	1
6	HisPur™ Cobalt Resin (5 mL) <sup>2</sup>	20 mM phosphate de sodium pH 8, 0.1% SDS	TE + 1 M imidazole	1

**Tableau 5 B.** Résumé des hypothèses et des résolutions en vue de purifier L1.

Numéros essais	Hypothèses	Résolutions
1	Les micelles de SDS encombrant l'étiquette poly-histidines empêchant ainsi la protéine de s'accrocher à la matrice.	Diminution de la concentration en SDS dans le tampon d'équilibration.
2	Le débit (5 mL·min <sup>-1</sup> ) ne laisse pas le temps à la protéine de s'accrocher à la matrice.	Diminution du débit, passant de 5 à 1 mL·min <sup>-1</sup> .
3	L'élution de la protéine nécessite une plus grande concentration en imidazole et la matrice ne convient pas pour la purification de L1.	Augmentation de la concentration en imidazole passant de 500 mM à 1 M et changement de matrice et de colonne.
4	La matrice ne convient pas pour la purification de L1.	Changement de matrice et de colonne.
5	Les ions cobalt (Co <sup>2+</sup> ) sont censés avoir une meilleure affinité pour les étiquettes poly-histidines que les ions nickel (Ni <sup>2+</sup> ).	Changement de matrice et de colonne.

<sup>1</sup> TE = tampon d'équilibration.<sup>2</sup> Ici, l'ion métallique utilisé n'est plus du Ni<sup>2+</sup> mais bien du Co<sup>2+</sup>.

### 3.2.3.2. Purifications par chromatographie d'affinité et dessalages

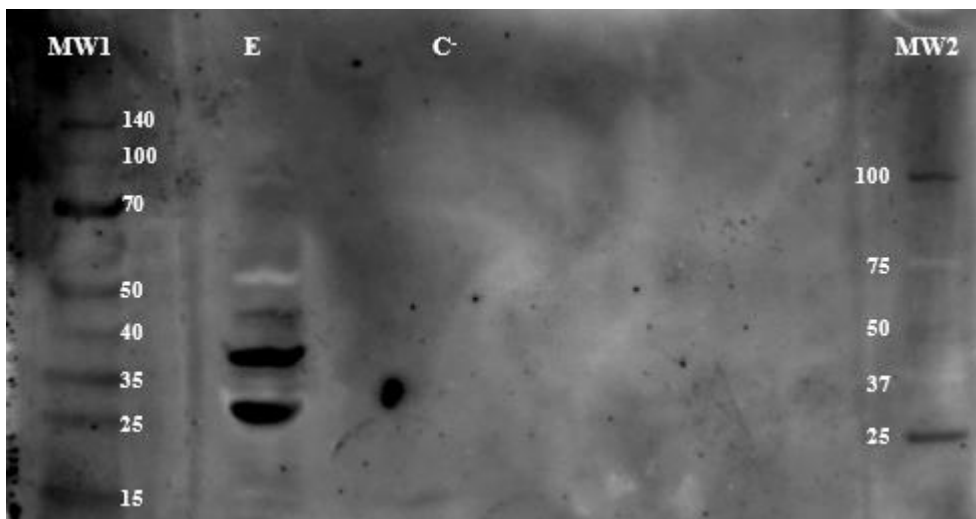
Plusieurs purifications avec différents types de colonnes et des conditions différentes en tampon d'équilibration et d'élution ont été réalisées en vue de purifier la protéine L1 (Tableau 5A). Environ 2.2 g de corps d'inclusion ont été solubilisés dans 30 mL de tampon de solubilisation (50 mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 5 mM Imidazole) pendant 18 heures sous agitation à 20°C. Les essais de purifications ont été infructueux, la protéine ne s'accrochant pas à la matrice dans chacune des conditions testées et se retrouvant dans le *flow-through* (SDS-PAGE non montré). Différentes hypothèses et résolutions ont été testées en vue de purifier la protéine L1 (Tableau 5B).

Après ces essais de purifications, la présence de l'étiquette poly-histidine sur la protéine a été remise en question. Il a donc été décidé de réaliser un Western-Blot pour vérifier cette hypothèse. Le Western-Blot est basée sur des interactions immunogéniques et permet la détection de protéines. Ici, un anticorps anti-histidine a été utilisé pour cibler et visualiser la protéine L1.

Un gel polyacrylamide a d'abord été réalisé selon la méthode décrite précédemment (§2.2.3.4).

Un contrôle négatif contenant du lysozyme à une concentration de 5 mg·mL<sup>-1</sup> a été déposé sur le gel (Figure 26, C'). Le marqueur de masse moléculaire non-coloré sert de contrôle positif. L'échantillon de L1 déposé sur gel est un échantillon récupéré avant la 1<sup>ère</sup> purification.

Il apparaît une bande importante entre 25 et 35 kDa ce qui correspond à la masse du monomère de la protéine (~28 kDa). La bande présente au-dessus de la protéine pourrait être un agglomérat de L1. Les résultats de ce gel réfutent l'hypothèse selon laquelle l'étiquette poly-histidine ne serait pas présente sur la protéine L1.



**Figure 26.** Résultats du Western-Blot de la protéine L1.

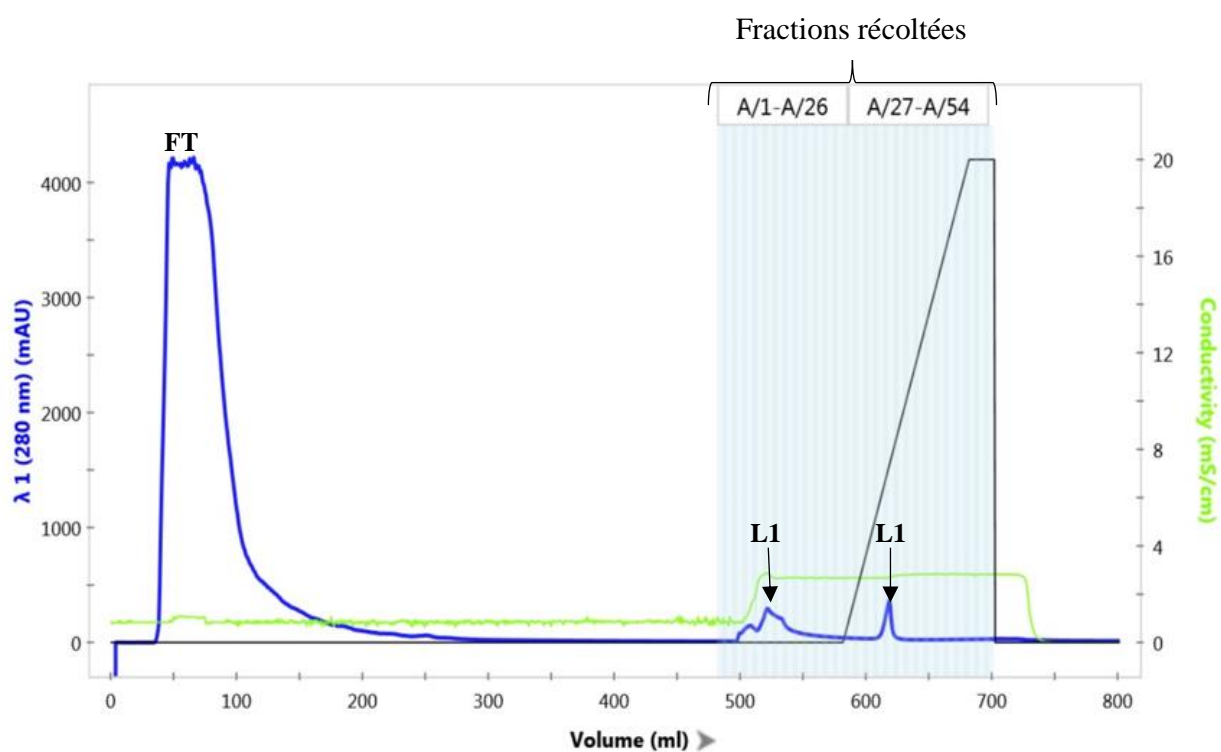
**MW1** = Marqueur de masse moléculaire pré-coloré (kDa)

**E** = Echantillon de L1

**C'** = Contrôle négatif (lysozyme à une concentration de 5 mg·mL<sup>-1</sup>)

**MW2** = Marqueur de masse moléculaire non-coloré (kDa)

L'encadré rouge indique position de la protéine L1.

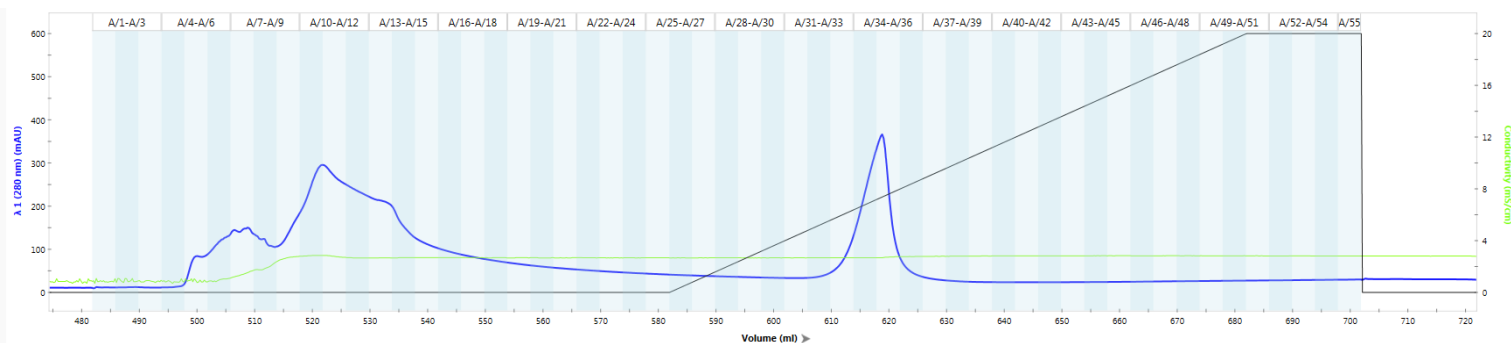


**Figure 27.** Purification de l'échantillon contenant les corps d'inclusion de L1 solubilisés dans 8 M d'urée sur une colonne Profinity® de 20 mL.

La **courbe bleue** correspond à l'absorbance à 280 nm, la **courbe verte** à la conductivité en  $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  et la courbe noire au % de tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M Imidazole).

**FT** = flow-through

**L1** = pics d'absorbance correspondant à la protéine L1 (confirmé après analyse par SDS-PAGE).



**Figure 27 bis.** Zoom sur les deux pics d'absorbance lors de la purification de l'échantillon contenant les corps d'inclusion de L1 solubilisés dans 8 M d'urée sur une colonne Profinity® de 20 mL.

Les fractions 1 à 25 correspondent au changement de tampon d'équilibrion (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS).

Les fractions 26 à 51 correspondent à l'éluion de la protéine dans le tampon d'éluion 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M Imidazole.

La présence de la queue poly-histidine par Western-blot indiquerait que celle-ci ne serait pas dans des conditions favorables pour une interaction avec la matrice dans le tampon utilisé. L'hypothèse est que le détergent SDS, même à faible concentration, empêcherait la liaison de l'étiquette poly-histidine aux ions métalliques. Le tampon de solubilisation des corps d'inclusion de L1 a donc été modifié.

Environ 3.2 g de corps d'inclusion sont solubilisés dans 30 mL de tampon 20 mM HEPES pH 8, 8 M urée pendant 18 heures à 20°C. La purification s'est déroulée suivant la méthode décrite précédemment (§2.2.3.3). Après l'équilibration de la colonne contenant de la résine IMAC Profinity® (20 mL), l'échantillon de 30 mL est chargé à un débit de 5 mL·min<sup>-1</sup>. Cette charge est représentée par le *flow-through* (indiqué « FT » sur le chromatogramme, [Figure 27](#)). Des fractions de 4 mL sont récoltées lorsque l'absorbance à 280 nm redescend à zéro.

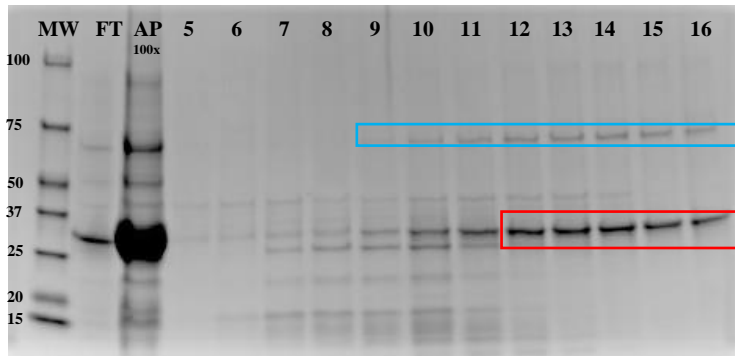
Afin d'enlever l'urée présente en solution pour la suite des expériences de repliement et la méthode SDS/MPD, la colonne a été équilibrée avec 100 mL de tampon d'équilibration 2 (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS). Une augmentation de l'absorbance à 280 nm est alors observée à partir de la fraction 4 ([Figure 27 bis](#)).

Après la seconde équilibration, le tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M imidazole) a été chargé sur la colonne pendant 25 minutes à un débit de 5 mL·min<sup>-1</sup>. Un pic d'absorbance apparaît après 32 mL d'élution ([Figure 27 bis](#)). La protéine L1 est donc éluée à 320 mM d'imidazole.





La présence de la protéine à la fois dans le premier pic et dans le pic d'éluion a été confirmée par SDS-PAGE (Figures 28 et 29).



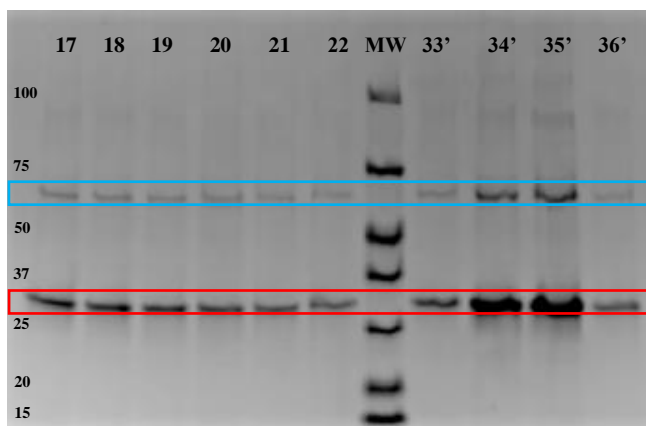
**Figure 28.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 (SDS).

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)  
**AP<sub>100x</sub>** = Echantillon avant purification (dilué 100x)  
**FT** = *Flow-through*  
**5 à 16** = Fractions récoltées lors du changement de tampon

Le changement de tampon engendre une perte de contaminants (Figure 28, fractions 7 à 10). La protéine L1 est relativement pure à partir de la fraction 12 (encadré rouge). Le changement de tampon – et donc la présence de SDS – engendre l'éluion de la protéine. Une hypothèse serait que, même à faible concentration en SDS, des micelles se forment et provoquent le décrochage de la protéine à la matrice.

La bande qui se situe entre 50 et 75 kDa pourrait correspondre à un dimère de L1 dont la masse est de ~56 kDa (encadré bleu).

Une bande d'une très grande intensité se situe entre 25 et 37 kDa dans le *flow-through*. Ce résultat indique qu'une grande quantité de protéine L1 ne s'est pas accrochée à la matrice.

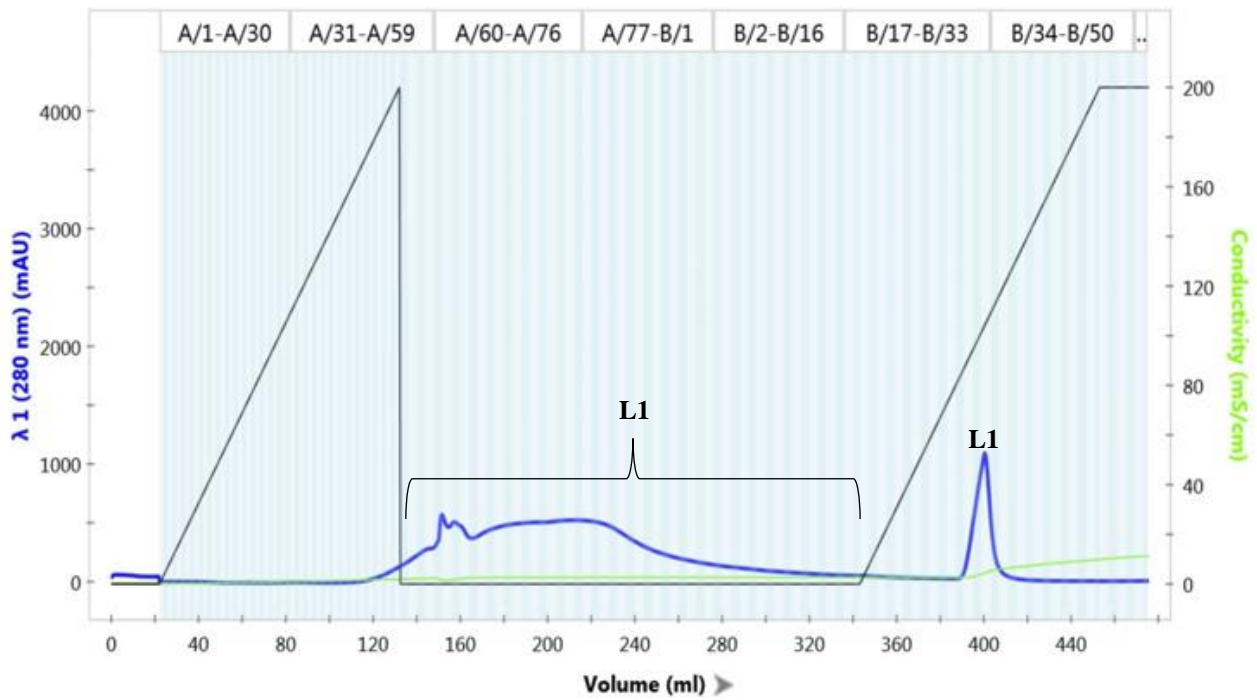


**Figure 29.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 (éluion par le SDS et l'imidazole).

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)  
**17 à 22** = Fractions récoltées lors du changement de tampon  
**33' à 36'** = Fractions récoltées lors de l'éluion

Les fractions 17 à 22 sont la suite des fractions récupérées lors du changement de tampon. La protéine est pure (encadré rouge) car il n'y a pas de bandes correspondant à des contaminants, exceptées celles correspondant au potentiel dimère de L1.

Les fractions 33' à 36' sont les fractions d'intérêt récupérées lors de l'éluion (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M imidazole). Les bandes correspondant à la protéine sont d'une grande intensité dans les fractions 34' et 35' comparés aux fractions 17 à 22, 33' et 36'. La bande se situant entre 50 et 75 kDa est toujours présente (encadré bleu). La présence dans les fractions récoltées lors de l'éluion pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle il s'agirait d'un dimère de L1.



**Figure 30.** Purification en *batch* du *flow-through* contenant L1.

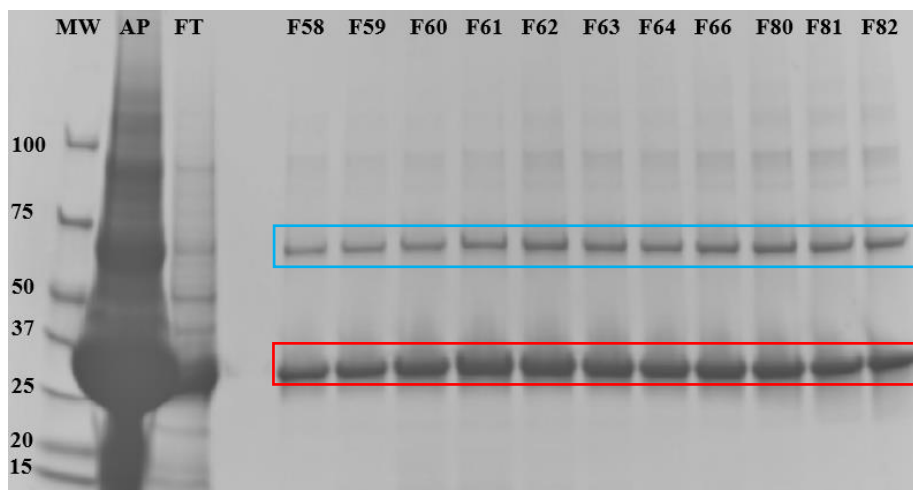
La **courbe bleue** correspond à l'absorbance à 280 nm, la **courbe verte** à la conductivité en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  et la courbe noire au % de tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M Imidazole).

**L1** = pics d'absorbance correspondant à la protéine L1 (confirmé après analyse par SDS-PAGE).

Suite aux résultats obtenus, une chromatographie discontinue (*batch chromatography*) a été réalisée selon la méthode décrite précédemment (§2.2.3.3). En effet, la présence d'une bande importante dans le *flow-through* indique qu'une grande quantité de protéine ne s'est pas accrochée à la résine. L'objectif de ce procédé est d'augmenter la durée d'accrochage de la protéine à la matrice IMAC Profinity®. Pour ce faire, 20 mL de matrice IMAC Profinity® sont ajoutés au *flow-through* récupéré lors de la purification précédente (Figure 28).

Après centrifugation (§2.2.3.3), le culot – contenant la matrice et la protéine accrochée – est emballé dans une colonne et la purification est réalisée. Le surnageant est récupéré car il contient tout ce qui n'a pas été accroché (*flow-through*). Un gradient a été réalisé avec 100 mL de tampon d'équilibration (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS) pour déterminer à partir de quelle concentration en SDS la protéine s'élue. Une augmentation de l'absorbance à 280 nm est observée après passage des 100 mL du tampon d'équilibration (Figure 30), indiquant que la protéine ne se décroche qu'à partir de 0.1% de SDS.

Après que l'absorbance à 280 nm soit redescendue à zéro, un gradient en imidazole est réalisé avec le tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 M imidazole). Un pic d'absorbance apparaît après 300 mM, ce qui est proche de la valeur obtenue auparavant (320 mM).



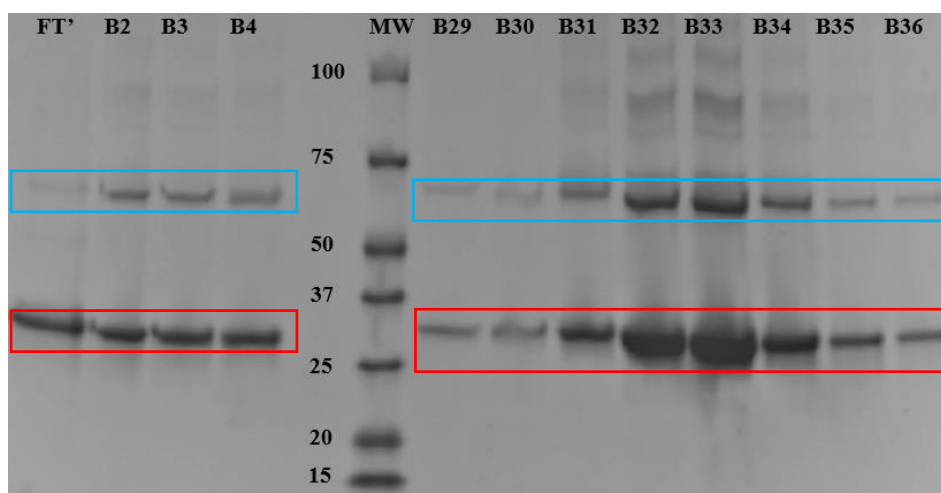
**Figure 31.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 après la purification en *batch* (SDS).

**MW** = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**AP<sub>100x</sub>** = Echantillon avant purification

**FT** = *Flow-through*

**F58 à F64, F66 et F80 à F82**= Fractions récoltées lors du changement de tampon



**Figure 32.** Analyse par SDS-PAGE des fractions d'intérêt contenant L1 après la purification en *batch* (SDS et imidazole).

**FT'** = *Flow-through*

**B2 à B3**= Fractions récoltées lors du changement de tampon

**B29 à B36**= Fractions récoltées lors de l'élution

La présence de la protéine dans les fractions d'intérêt a été confirmée par SDS-PAGE (Figures 31 et 32).

L'intensité de la bande correspondant à la masse de L1 présente dans le *flow-through* est plus faible par rapport à celle obtenue lors de la purification précédente. Ce résultat indique que la méthode en *batch* est efficace car plus de protéines se sont accrochées à la matrice.

Il y a une bande importante correspondant à L1 dans les fractions récupérées lors de l'éluion au SDS (Figures 31 et 32). La bande correspondant à l'éventualité d'un dimère de L1 est également présente que ce soit dans les fractions récupérées après l'éluion par le SDS ou par l'imidazole.

Pour réaliser l'expérience de repliement, différentes fractions contenant la protéine L1 purifiée ont été récupérées (Tableau 6). Les fractions « éluées au SDS » n'ont pas besoin d'être dessalées contrairement à celles qui ont été éluées à l'imidazole. Tous les échantillons ont été concentrés selon la méthode décrite précédemment (§2.2.4.2).

**Tableau 6.** Résumé des différentes fractions récupérées après purifications et concentrées pour l'expérience de repliement de la protéine L1.

Fractions récupérées	Elutions	Concentrations (volumes échantillons)
33 à 36 (Figure 29)	300 mM d'imidazole	5.5 mg·mL <sup>-1</sup> (2 mL)
29 à 36 (Figure 32)	300 mM d'imidazole	3.3 mg·mL <sup>-1</sup> (2 mL)
14 à 25 (Figure 28)	0.1% SDS	3.6 mg·mL <sup>-1</sup> (2 mL)
58 à 68 (Figure 31)	0.1% SDS	10 mg·mL <sup>-1</sup> (2 mL)
69 à 80 (Figure 31)	0.1% SDS	14 mg·mL <sup>-1</sup> (2 mL)
81 à 90 (Figure 31)	0.1% SDS	8.8 mg·mL <sup>-1</sup> (2 mL)

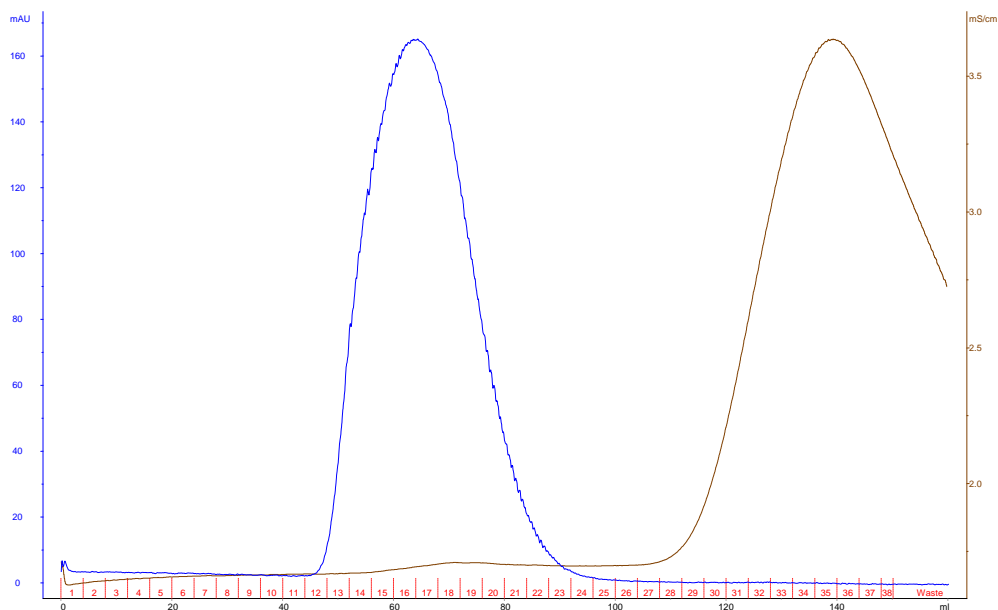
Les fractions récupérées lors de l'éluion à l'imidazole ont été dessalées (page suivante).



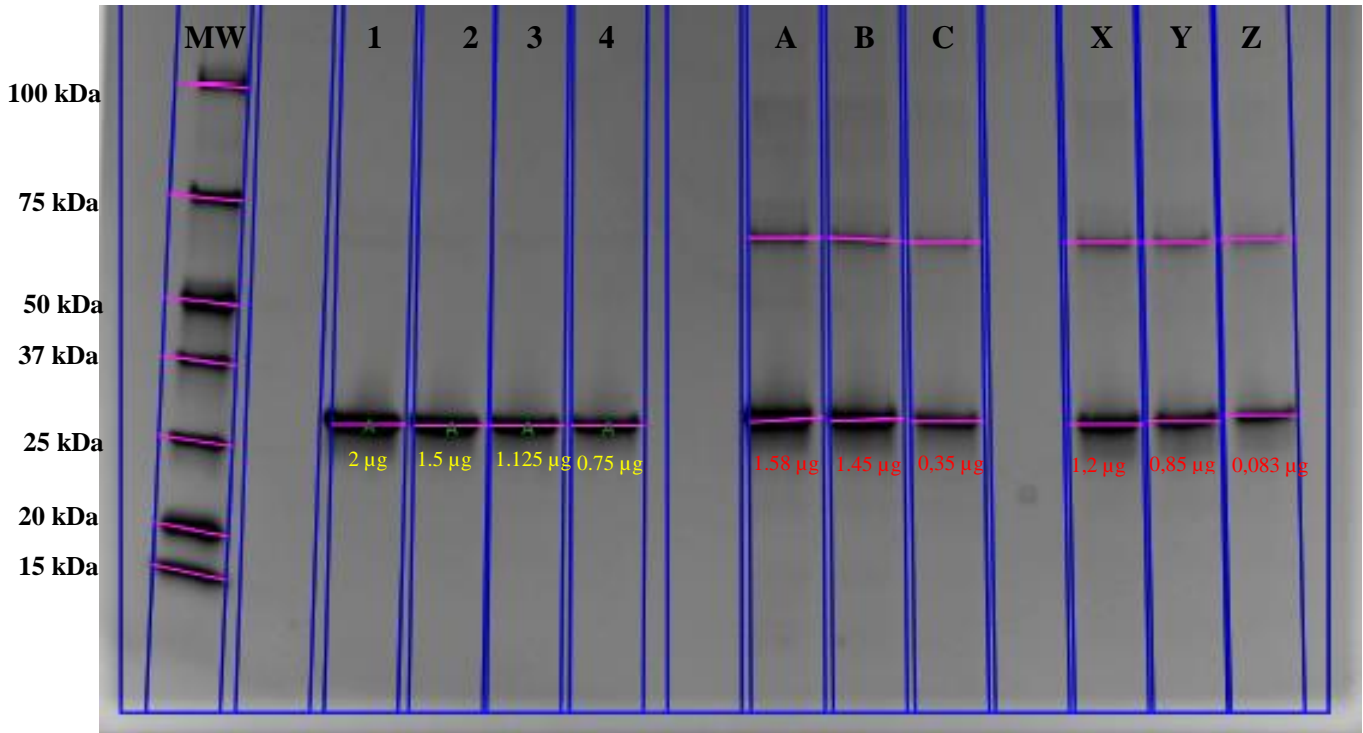
Les fractions récupérées lors de l'élution dans le SDS n'ont pas été dessalées contrairement à celles récupérées lors de l'élution dans l'imidazole. Les fractions B29 à B36 (Figure 32) ont donc été rassemblées avant d'être dessalées. L'objectif ici est de retirer l'imidazole présent en solution en changeant le tampon d'élution avec un tampon de stockage (50mM Tris-HCl pH8 0.1%SDS).

Une chromatographie d'exclusion stérique a donc été réalisée sur une colonne HiTrap G25 Sephadex™.

On observe un pic d'absorbance important après 40 mL d'élution, correspondant à la protéine L1 (Figure 33). Il y a une augmentation de la conductivité vers 110 mL d'élution qui pourrait correspondre à l'élution de l'imidazole qui est donc bien séparé de la protéine. Les fractions comprenant la protéine ont été rassemblées puis concentrées pour obtenir une concentration finale de 15 mg·mL<sup>-1</sup> et de 3 mg·mL<sup>-1</sup> qui sont les deux concentrations en protéine L1 requises pour l'expérience de repliement.



**Figure 33.** Dessalage des fractions de L1 récupérées après purification sur une colonne Hitrap G25 Sephadex™. La courbe bleue correspond à l'absorbance à 280 nm et la courbe brune à la conductivité en mS·cm<sup>-1</sup>.



**Figure 34.** Quantification absolue par SDS-PAGE de la concentration de deux échantillons de L1 solubilisée.

MW = Marqueur de masse moléculaire (kDa)

**1 à 4** = Droite d'étalonnage de L1 pure. Les quantités connues sont indiquées en jaune en-dessous des bandes.

**A à B** = Echantillon de L1 solubilisée (50mM Tris-HCl pH8 0.1%SDS) dont la concentration est de  $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Les quantités déterminées par le programme sont indiquées en rouge en-dessous des bandes détectées.

**X à Z** = Echantillon de L1 solubilisée (50mM Tris-HCl pH8 0.1%SDS) dont la concentration est de  $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Les quantités déterminées par le programme sont indiquées en rouge en-dessous des bandes détectées.

Equation de la régression linéaire réalisée à partir de la droite d'étalonnage :

$$y = 0.00199 \cdot x - 982 \cdot \text{avec un coefficient de détermination de } 0.99.$$

$x$  est l'intensité de la bande détectée et  $y$  la masse de la protéine en  $\mu\text{g}$ .



### 3.2.4. Repliement de L1

#### 3.2.4.1. Génération du plan d'expérience de repliement et de la plaque 96 puits

En vue de déterminer le meilleur tampon de repliement de la protéine L1, 96 conditions de tampon ont été générées à l'aide du programme informatique de statistiques JMP (SAS®). 8 facteurs ont été testés : [SDS], [MPD], [NaCl], [L-Arginine], ratio GSH : GSSG, [Glutathion]<sub>totale</sub> pH et [L1]. L'arginine est utilisée pour limiter l'agrégation de protéine. Le glutathion et le disulfure de glutathion (en tant que couple oxydo-réducteur GSH :GSSG) sont utilisés pour favoriser la formation du pont disulfure au sein des monomères de L1. Les différents tampons générés par le programme (Tableau S5) ont été distribués dans une plaque en 96 puits par le robot Microlab Star (Hamilton®). La plaque a ensuite été scellée et incubée pendant 48 heures à température ambiante.

#### 3.2.4.2. Quantification de la concentration de L1 par SDS-PAGE

La concentration en protéine en solution a été déterminée par une quantification absolue par SDS-PAGE (Figure 35) selon la méthode décrite précédemment (§2.2.2.3). La concentration de L1 déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm a pu être ajustée grâce à cette technique. En effet, la concentration à 15 mg·mL<sup>-1</sup> est passée à 12 mg·mL<sup>-1</sup> (- 20%) et celle à 3 mg·mL<sup>-1</sup> est passée à 3,5 mg·mL<sup>-1</sup> (+17%).

#### 3.2.4.3. Mesure de l'activité spécifique de L1

La mesure de l'activité spécifique de L1 a été déterminée *via* le protocole décrit au point §2.2.4.4. Pour ce faire, la protéine pure à une concentration de 8.8 mg·mL<sup>-1</sup> a été diluée 2 fois dans un tampon 20 mM Hepes pH 7.5, 100 µM ZnCl<sub>2</sub>. Les mesures de l'activité spécifique de L1 ont été réalisées en triplica et avec trois dilutions différentes (2197x, 1000x et 512x) à partir de l'échantillon de L1 native et purifiée de concentration connue (4.4 mg·mL<sup>-1</sup>). La dilution de l'enzyme et la réaction enzymatique sont réalisées avec le même tampon et de façon manuelle dans une plaque 96 puits. L'activité spécifique de L1 est de **1700 ± 300 µmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>**.

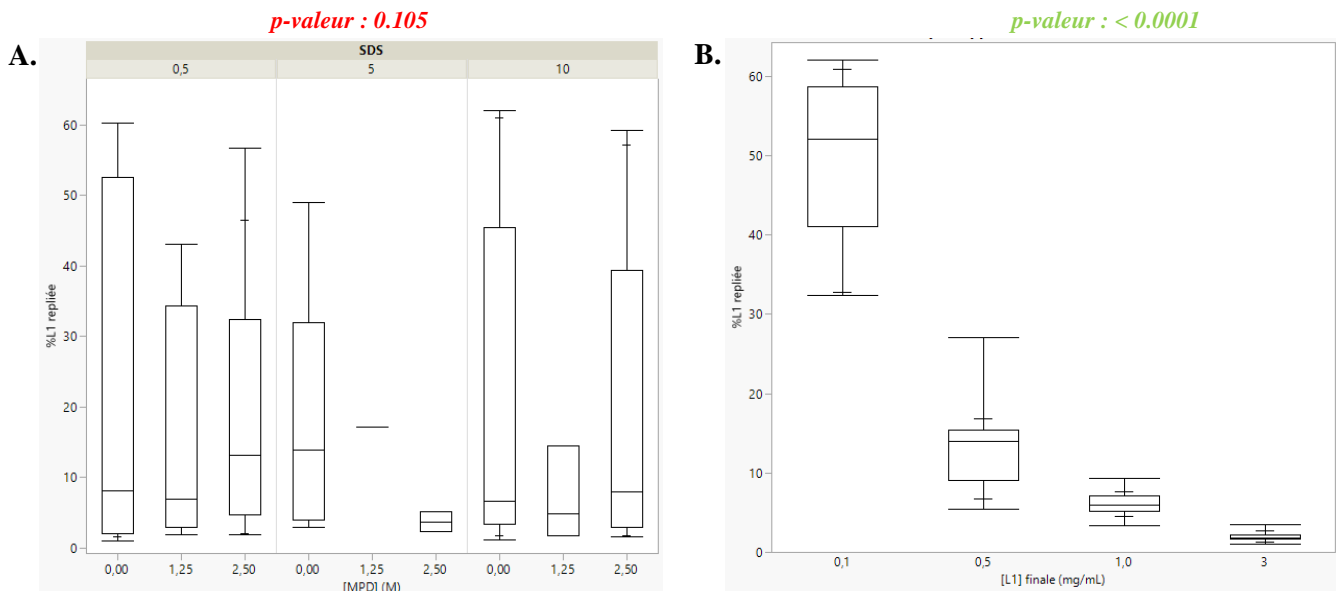
#### 3.2.4.4. Mesure du taux de repliement de L1 avant et après dessalage par chromatographie d'affinité

Après 48 heures d'incubation à température ambiante, des mesures de vitesses initiales d'hydrolyse de la PenG à 235 nm d'absorbance par les différents échantillons de l'expérience de repliement (96 puits) ont été réalisées selon la méthode décrite précédemment (§2.2.4.4) afin de déterminer le taux de repliement de L1. En effet, l'efficacité du repliement de la protéine peut être estimée par l'activité enzymatique.

**Tableau 7.** Résumé des 11 tampons de repliement idéaux déterminés par JMP après l'expérience de repliement sur plaque 96 puits.

**%max** = pourcentage de repliement maximum obtenu lors de l'expérience.

Conditions	[SDS] mM	[MPD] M	[NaCl] mM	Ratio GSH :GSSG	[Arginine] M	[Glutathion] <sub>totale</sub> mM	pH	[L1] mg·mL <sup>-1</sup>	%max
<i>h2</i>	10	0	200	4 : 1	0	15	8	0.1	62
<i>f1</i>	10	0	100	1 : 1	0.2	5	11	0.1	61
<i>c1</i>	0.5	0	200	1 : 4	0	15	11	0.1	60
<i>h5</i>	0.5	0	100	1 : 4	0.2	15	9	0.1	60
<i>b12</i>	10	2.5	200	1 : 4	0.2	15	11	0.1	59
<i>e1</i>	0.5	0	200	1 : 4	0.2	5	8	0.1	58
<i>h8</i>	10	0	0	1 : 4	0.2	15	8	0.1	58
<i>h10</i>	10	0	0	4 : 1	0.2	15	11	0.1	58
<i>f12</i>	10	2.5	0	4 : 1	0.2	5	10	0.1	57
<i>a2</i>	10	2.5	0	1 : 4	0.1	5	9	0.1	57
<i>c11</i>	0.5	2.5	0	4 : 1	0	5	8	0.1	56



**Figure 36.** Effets de la concentration en SDS/MPD sur le pourcentage de repliement (A) et de la concentration en L1 (B).

Les effets des 8 différents facteurs ont été analysés *via* le logiciel JMP qui réalise un modèle linéaire d'après les données expérimentales. Le taux maximum de repliement déterminé par JMP est de 38% avec un  $R^2$  de 0.86. L'interprétation de ces résultats doit se faire avec précautions. En effet, il y a une imprécision au niveau des triplicats pour chaque dilution (2197x, 1000x et 512x). Une variabilité non-négligeable est observée entre les différentes dilutions réalisées pour la même condition de repliement.

Un dessalage par chromatographie d'affinité a été réalisé sur une plaque 96 puits selon la méthode décrite précédemment (§2.2.4.5.). L'objectif de cette expérience est de retirer le SDS présent en solution dans certaines conditions (Tableau S5). La protéine repliée est donc récupérée dans un tampon de stockage 20 mM HEPES pH 7.5, 100  $\mu$ M  $ZnCl_2$ , 1 M imidazole. La plaque des 96 conditions contenant la protéine dans le tampon de stockage a été conservée à 4°C jusqu'à l'étape de mesure du taux de repliement.

Le taux de repliement a été mesuré comme décrit précédemment. Le taux maximum de repliement déterminé par JMP est de 62% avec un  $R^2$  de 0.98. Avant le dessalage sur plaque 96 puits, le taux maximum de repliement était de 38%. Il y a donc une augmentation de 63% du taux de repliement de la protéine après le dessalage.

Les 11 conditions ayant un taux de repliement supérieur à 55% ont été mises en évidence sous forme de tableau (Tableau 7). Les 11 conditions ont une concentration en protéine de 0.1  $mg \cdot mL^{-1}$ . 7 conditions sur les 11 ne contiennent pas de MPD. Mis à part ces observations, aucune tendance générale n'apparaît comme étant commune aux meilleurs taux de repliement.

Les 96 conditions de repliement ont été analysées à l'aide du logiciel JMP afin de voir si d'autres tendances se démarquaient dans celles-ci. L'absence de MPD apparaît comme une condition favorable du repliement de la protéine L1 (*p*-valeur : 0.0232) et ce, même en présence de SDS quelle que soit sa concentration (Figure 36A). La combinaison SDS/MPD ne présente quant à elle pas d'effet significatif (*p*-valeur : 0.1057) ce qui induit que la méthode SDS/MPD n'est pas efficace pour la renaturation de la protéine L1. Plus la concentration en protéine est faible, plus le taux de repliement est important (*p*-valeur : <0.0001) (Figure 36B) Cette observation confirme le fait qu'une faible concentration en protéine réduit la formation d'agrégats et induit un meilleur repliement [1,4,6].

Aucun autre effet majeur des 8 facteurs testés (isolés ou combinés) n'a été observé. En effet, dans l'analyse des *P*valeurs des différents facteurs et combinaisons de facteurs, aucune autre n'était en deçà du seuil de 5%. Ceci confirme que seules les observations décrites ci-dessus sont statistiquement significatives.



## 4. Conclusions et perspectives

La renaturation des protéines produites sous forme de corps d'inclusion (CI) est un défi scientifique majeur que ce soit pour la détermination de nouvelles structures de protéines ainsi que pour les usages que pourra en tirer le secteur industriel.

Afin d'appliquer la méthode de renaturation SDS/MPD sur la protéine membranaire découplante-1 (UCP-1) et sur la protéine soluble métallo- $\beta$ -lactamase L1, trois grandes étapes communes ont été réalisées : la production des deux protéines en grand volume sous forme de CI, leurs purifications et leurs expériences de repliement en plaque 96 puits.

La protéine UCP-1 a été produite sous forme de CI dans un milieu 2XYT pendant 18 heures à 25°C dans un fermenteur de 15 L sous induction à l'IPTG (0.7 mM). Un haut rendement a été obtenu lors de cette production (~3.1 g de CI par litre de culture). Trois lavages successifs des CI ont permis d'éliminer les contaminants. Les CI ont été solubilisés et la protéine a été purifiée avec succès, mis à part la présence d'un éventuel dimère résistant à la dénaturation par le SDS. Il serait intéressant d'augmenter la concentration en SDS et d'ajouter un agent réducteur (*e.g.* DTT) lors de la solubilisation des CI afin de confirmer ou réfuter l'hypothèse concernant la présence de ce dimère. De plus, une analyse par spectrométrie de masse ou un Western-blot anti-histidine seraient pertinents quant à la détermination de cet éventuel dimère.

En vue de déterminer le meilleur tampon de repliement de la protéine, 96 conditions de repliement ont été générées par un logiciel statistique. La spectroscopie de fluorescence et le dichroïsme circulaire ont été utilisés pour suivre le repliement de la protéine UCP-1. Trois conditions de repliement ont été sélectionnées selon l'augmentation d'intensité de fluorescence intrinsèque et le déplacement bathochrome qui indiquaient une modification des conditions environnementales. Afin d'obtenir plus d'informations sur la structure de la protéine, des mesures CD ont été effectuées et ont indiqué que la protéine dénaturée dans le tampon de stockage (20 mM phosphate de sodium pH 7, 0.1% SDS) adoptait une structure  *$\alpha$ -helix-like*. Le pourcentage en structures secondaires, quant à lui, a indiqué que la protéine n'était que partiellement hélicoïdale. Toutefois, il est nécessaire de rester prudent quant aux résultats du pourcentage en structures secondaires. En effet, il est difficile d'estimer la représentativité de la base de données utilisée (SMP180), notamment par rapport aux protéines à hélices alpha présentes dans celle-ci.

Idéalement, il aurait fallu tester davantage de conditions sur les 96 au moyen du CD pour obtenir plus de données analysables. En effet, les données issues du CD des 3 meilleures conditions de fluorescence ne présentent pas assez d'informations pour mettre en avant des tendances générales. D'autre part, il serait judicieux de réaliser les trois grandes étapes dans le détergent OG (à la place du SDS) qui a déjà permis de replier correctement la protéine UCP-1 [15].



De plus, il serait intéressant de comparer la méthode SDS/MPD avec le détergent OG et de tester plus de conditions avec diverses concentrations en OG/MPD. Ensuite, sachant que la protéine UCP-1 fait partie de la famille des transporteurs mitochondriaux, il serait intéressant de réaliser les trois grandes étapes décrites dans ce mémoire sur plusieurs transporteurs mitochondriaux. Enfin, il serait pertinent d'extraire la protéine directement des membranes afin de l'obtenir dans sa conformation native pour avoir une référence quant aux mesures de fluorescences intrinsèques et de CD.

Concernant la protéine soluble métallo- $\beta$ -lactamase L1, la modification du plasmide pET9-L1 (en remplaçant le peptide signal par une étiquette poly-histidine) a permis de produire avec succès la protéine sous forme de CI dans un fermenteur de 10L de milieu 2XYT pendant 18 heures à 37°C. Un grand rendement a été obtenu lors de cette production (~4,7 g par litre de culture). Un Western-Blot a été réalisé pour vérifier et confirmer la présence de l'étiquette histidine. La protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité (IMAC) en présence de SDS pour appliquer la méthode SDS/MPD par la suite. Les échantillons contenant la protéine purifiée ont été concentrés à 3 mg·mL<sup>-1</sup> et à 15 mg·mL<sup>-1</sup> pour réaliser une expérience de repliement sur une plaque 96 puits.

La métallo- $\beta$ -lactamase L1 étant une enzyme, l'efficacité du repliement de la protéine a été estimée et déterminée par l'activité enzymatique en suivant la dégradation de la PenG à 235 nm. Les effets de 8 facteurs différents ont été analysés *via* le logiciel JMP. Le taux de repliement maximum obtenu après dessalage des 96 conditions a atteint 62%. L'analyse des facteurs en regard du résultat du pourcentage de repliement a permis de mettre en lumière les éléments suivants. Il a été démontré que plus la concentration en protéine L1 était faible, plus le taux de repliement était important. L'absence de MPD apparaît comme une condition favorable du repliement de la protéine L1 et ce, quelle que soit la concentration en SDS.

La méthode SDS/MPD ne semble donc pas favorable au repliement de la protéine métallo- $\beta$ -lactamase L1. Tandis que sur la protéine UCP-1, les résultats de repliement de ce travail ne sont pas suffisants pour affirmer ou réfuter l'efficacité de cette méthode sur la protéine. Ainsi, il serait intéressant d'appliquer la méthode SDS/MPD sur d'autres types de protéines afin de déterminer si cette méthode est uniformément efficace sur un certain type de protéine.





## Bibliographie

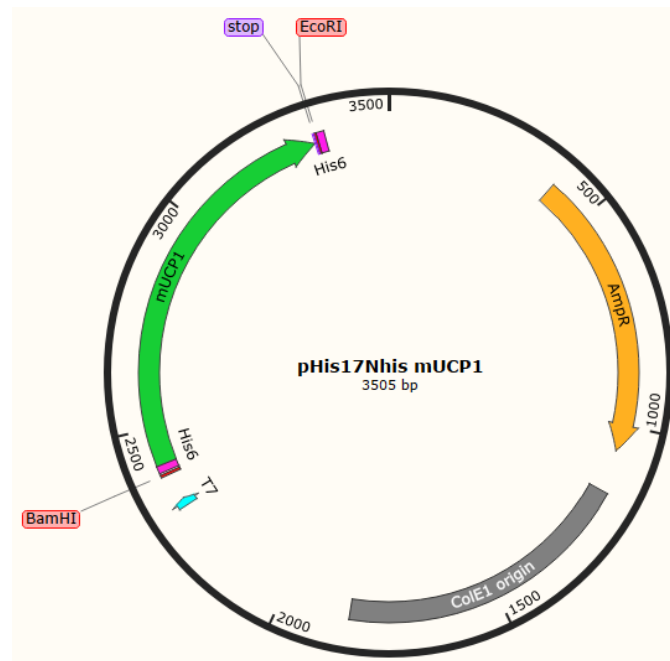
1. Benhabilès, N., Thomas, A. & Brasseur, R. Les mécanismes de repliement des protéines solubles. *BASE* (2000).
2. Neil A. Campbell & Reece, J. B. *Biologie*. (2004).
3. Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O. & Herwig, C. Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 1143–1153 (2019).
4. Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S. & Panda, A. K. Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends Biotechnol.* **38**, 474–486 (2020).
5. Rinas, U., Garcia-Fruitos, E., Corchero, J.L., Vasquez, E., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A. Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 726–737 (2017).
6. Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* **4**, 235–251 (2014).
7. Michaux, C., Pomroy, N. C. & Privé, G. G. Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents. *J. Mol. Biol.* **375**, 1477–1488 (2008).
8. Roussel, G., Tinti, E., Perpète, E. & Michaux, C. Refolding of SDS-denatured proteins using amphipathic cosolvents and osmolytes. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 28**, Unit28.5 (2013).
9. Roussel, G., Perpète, E. A., Matagne, A., Tinti, E. & Michaux, C. Towards a universal method for protein refolding: the trimeric beta barrel membrane Omp2a as a test case. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 417–423 (2013).
10. Roussel, G., Rouse, S. L., Sansom, M. S. P., Michaux, C. & Perpète, E. A. The role of 2-methyl-2, 4-pentenediol in sodium dodecyl sulfate micelle dissociation unveiled by dynamic light scattering and molecular dynamics simulations. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **114**, 357–362 (2014).
11. Michaux, C., Roussel, G., Lopes-Rodrigues, M., Matagne, A. & Perpète, E. A. Unravelling the mechanisms of a protein refolding process based on the association of detergents and co-solvents. *J. Pept. Sci.* **22**, 485–491 (2016).

12. Lopes-Rodrigues, M., Matagne, A., Zanuy, D., Aleman, C., Perpète, E. A., Michaux, C. Structural and functional characterization of *Solanum tuberosum* VDAC36. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **88**, 729–739 (2020).
13. Crichton, P. G., Lee, Y. & Kunji, E. R. S. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie* **134**, 35–50 (2017).
14. Ricquier, D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* **134**, 3–8 (2017).
15. Hoang, T., Smith, M. D. & Jelokhani-Niaraki, M. Expression, folding, and proton transport activity of human uncoupling protein-1 (UCP1) in lipid membranes: evidence for associated functional forms. *J. Biol. Chem.* **288**, 36244–36258 (2013).
16. Nibbelink, M., Arnaud, E., Pénicaud, L. & Casteilla, L. La protéine découplante du tissu adipeux brun (UCP1) : la fin des dogmes. *médecine/sciences* **18**, 780–783 (2002).
17. Jelokhani-Niaraki, M., Ivaniva, M. V., McIntyre, B. L., Newman, C. L., McSorley, F. R., Young, E. K., Smith, M. D. A CD study of uncoupling protein-1 and its transmembrane and matrix-loop domains. *Biochem. J.* **411**, 593–603 (2008).
18. Shaw, A. Z. & Miroux, B. A general approach for heterologous membrane protein expression in *Escherichia coli*: the uncoupling protein, UCP1, as an example. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **228**, 23–35 (2003).
19. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J-M., Brandolin, G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**, 39–44 (2003).
20. Blesneac, I. Relations structure - fonction des transporteurs mitochondriaux. (Université de Grenoble, 2010).
21. Ricquier, D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Front. Endocrinol.* **2**, 85 (2011).
22. Brandt, C., Braun, S. D., Stein, C., Slickers, P., Ehricht, R., Pletz, M. W., Makarewicz, O. In silico serine  $\beta$ -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. *Sci. Rep.* **7**, 43232 (2017).

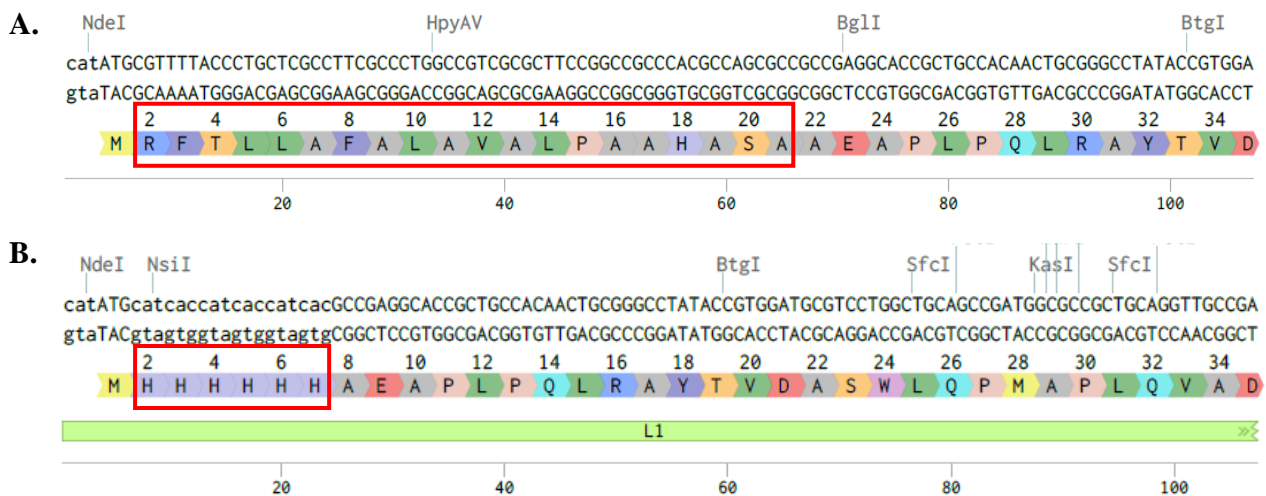
23. Bush, K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e01076-18 (2018).
24. Kim, Y., Maltseva, N., Wilamowski, M., Tesar, C., Endres, M., Joachimiak, A. Structural and biochemical analysis of the metallo- $\beta$ -lactamase L1 from emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* revealed the subtle but distinct di-metal scaffold for catalytic activity. *Protein Sci.* **29**, 723–743 (2020).
25. Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**, 321–331 (1980).
26. Rotondo, C. M. & Wright, G. D. Inhibitors of metallo- $\beta$ -lactamases. *Curr. Opin. Microbiol.* **39**, 96–105 (2017).
27. Wolff, M., Joly-Guillou, M.-L. & Pajot, O. Les carbapénèmes. *Réanimation* **18**, S199–S208 (2009).
28. McManus-Munoz, S. & Crowder, M. W. Kinetic mechanism of metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biochemistry* **38**, 1547–1553 (1999).
29. Periyannan, G., Shaw, P. J., Sigdel, T. & Crowder, M. W. In vivo folding of recombinant metallo-beta-lactamase L1 requires the presence of Zn(II). *Protein Sci.* **13**, 2236–2243 (2004).
30. Ullah, J. H., Walsh, T. R., Taylor, I. A., Emery, D. C., Verma, C. S., Gamblin, S. J., Spencer, J. The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 125–136 (1998).
31. Palzkill, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, 91–104 (2013).
32. Whitmore, L. & Wallace, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**, W668-673 (2004).
33. Abdul-Gader, A., Miles, A. J. & Wallace, B. A. A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **27**, 1630–1636 (2011).
34. Miles, A. J. & Wallace, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4859–4872 (2016).



## Annexes

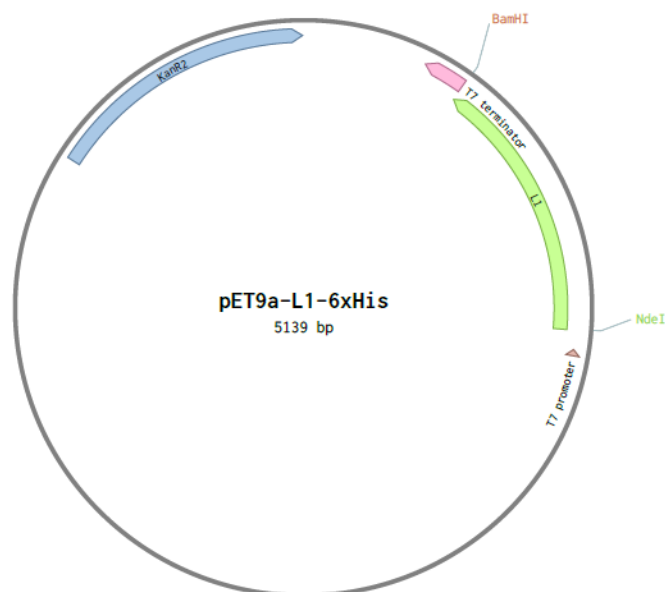


**Figure S1.** Représentation schématique du plasmide pHis17-mUCP1.



**Figure S2.** Représentation de la partie N-terminale de L1.

Le cadre rouge au point **A.** représente le peptide signal qui a été modifié par une étiquette poly-histidine représentée dans le cadre rouge au point **B.**



**Figure S3.** Représentation schématique du plasmide pET9a-L1-6xHis

**Tableau S1.** Résumé des différents milieux et tampons utilisés.

Milieux ou tampons utilisés	Compositions (volumes)
Milieu LB ( <i>Luria-Bertani</i> )	10 g tryptone, 5 g extrait de levure, 10 g NaCl (1 L)
Tampon de lyse (§2.1.1.3)	10 mM phosphate de sodium pH 7.45, 300 mM NaCl, 1 g·L <sup>-1</sup> lysozyme, 0.125 mM PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle) (250 mL)
Milieu 2XYT	16 g tryptone, 10 g extrait de levure, 5 g NaCl (1 L)
Tampon de lyse (§2.1.3.2)	50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 0.5% Triton-X100, 1 mM DTT (dithiothréitol), 0.1 mM PMSF (500 mL)
Tampon de lavage 1 (§2.1.3.2)	50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100, 1 M NaCl, 1 mM DTT (500 mL)
Tampon de lavage 2 (§2.1.3.2)	50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM EDTA, 1 mM DTT (500 mL)
Gel d'agarose 1%	0.25 g poudre agarose (Merck©), 25 mL tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) pH 8, 2.5 µL Midori <sup>GREEN</sup> Advance (Genetics©)
Milieu SOC ( <i>Super Optimal Broth</i> )	2% tryptone, 0.5% extrait de levure, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM glucose, pH 7 (1 L)
Milieu TB	6 g tryptone, 12 g extrait de levure, 1.1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4.65g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4 mL glycérol (500 mL)
Tampon de lyse (§2.2.3.2)	50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0.5% Triton-X100, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF (500 mL)
Tampon de lavage 1 (§2.2.3.2)	50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100, 1 M NaCl, 1 mM DTT (500 mL)
Tampon de lavage 2 (§2.2.3.2)	50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM DTT (500 mL)

**Tableau S2.** Résumé des séquences d'oligonucléotides.

Noms	Séquences (5' → 3')	Longueurs
L1 BamHI Rev	TCGGGCTTTGTTAGCAGCCG	20
L1 His Forward	TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCATCA CCATCACCATCACGCCGAGGCACCGCTGCCAC	65

**Tableau S3.** Résumé des différentes conditions de culture testées en vue d'obtenir les meilleures conditions de production de corps d'inclusion de L1.

Les meilleures conditions sont représentées **en gras et en vert** dans le tableau.

5 des 22 conditions n'ont pas été induites et sont représentées **en gras et en rouge**.

Conditions	Températures d'induction (°c)	Milieux	Durées d'induction (heures)	Inducteurs et leurs gammes de concentrations
<b>1</b>	<b>37</b>	<b>LB</b>	<b>4H</b>	<b>IPTG 1mM</b>
<b>2</b>	37	LB	4H	Rhamnose 0,1%
<b>3</b>	<b>37</b>	<b>LB</b>	<b>18H</b>	<b>IPTG 5 mM</b>
<b>4</b>	37	2XYT	4H	IPTG 5 mM
<b>5</b>	37	2XYT	4H	Rhamnose 0,1%
<b>6</b>	<b>37</b>	<b>2XYT</b>	<b>18H</b>	<b>Rhamnose 0,05%</b>
<b>7</b>	37	2XYT	18Hs	IPTG 1mM
<b>8</b>	<b>37</b>	<b>TB</b>	<b>4H</b>	<b>IPTG 5 mM</b>
<b>9</b>	37	TB	4H	Rhamnose 0,1%
<b>10</b>	<b>37</b>	<b>TB</b>	<b>18H</b>	<b>Rhamnose 0,05%</b>
<b>11</b>	<b>37</b>	<b>TB</b>	<b>18H</b>	<b>IPTG 1mM</b>
<b>12</b>	27	LB	4H	IPTG 1mM
<b>13</b>	27	LB	4H	Rhamnose 0,1%
<b>14</b>	27	LB	18H	IPTG 5 mM
<b>15</b>	27	2XYT	4H	IPTG 5 mM
<b>16</b>	27	2XYT	4H	Rhamnose 0,1%
<b>17</b>	<b>27</b>	<b>2XYT</b>	<b>18H</b>	<b>Rhamnose 0,05%</b>
<b>18</b>	27	2XYT	18H	IPTG 1mM
<b>19</b>	27	TB	4H	IPTG 5 mM
<b>20</b>	27	TB	4H	Rhamnose 0,1%
<b>21</b>	<b>27</b>	<b>TB</b>	<b>18H</b>	<b>Rhamnose 0,05%</b>
<b>22</b>	27	TB	18H	IPTG 1mM

**Tableau S4.** Plan d'expérience de repliement d'UCP-1 généré par le programme JMP.

La 1<sup>ère</sup> colonne correspond aux positions des différents tampons sur la plaque 96 puits.

Chaque puit contient un tampon 20 mM Tris-HCl pH 6, 7, 8 ou 9 et la protéine à une concentration de 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>.

<b>Positions plaque</b>	<b>[SDS] mM</b>	<b>[MPD] M</b>	<b>[NaCl] mM</b>	<b>pH</b>	<b>OG 0 ou 1%</b>	<b>[UCP-1] mg·mL<sup>-1</sup></b>
<i>a1</i>	10	1,5	0	6	0	0,1
<i>b1</i>	30	2	100	8	0	0,1
<i>c1</i>	30	1,5	200	8	0	0,1
<i>d1</i>	10	2	200	6	0	0,1
<i>e1</i>	0	1,5	0	7	0,01	0,1
<i>f1</i>	30	0	200	6	0	0,1
<i>g1</i>	30	0,5	0	7	0	0,1
<i>h1</i>	30	0,5	200	7	0	0,1
<i>a2</i>	0	2	300	9	0	0,1
<i>b2</i>	30	0	300	7	0	0,1
<i>c2</i>	30	0	100	9	0	0,1
<i>d2</i>	10	0,5	0	6	0	0,1
<i>e2</i>	30	1,5	200	9	0	0,1
<i>f2</i>	10	0,5	0	6	0	0,1
<i>g2</i>	0	0	200	6	0,01	0,1
<i>h2</i>	30	0	300	6	0	0,1
<i>a3</i>	3	1	100	8	0	0,1
<i>b3</i>	30	1,5	100	6	0	0,1
<i>c3</i>	30	2	200	7	0	0,1
<i>d3</i>	3	1	0	6	0	0,1
<i>e3</i>	10	1,5	300	8	0	0,1
<i>f3</i>	0	1,5	200	9	0	0,1
<i>g3</i>	30	0,5	200	7	0	0,1
<i>h3</i>	10	0	300	6	0	0,1
<i>a4</i>	10	0,5	300	9	0	0,1
<i>b4</i>	10	0,5	100	6	0	0,1
<i>c4</i>	10	1,5	300	8	0	0,1
<i>d4</i>	0	2	200	6	0	0,1
<i>e4</i>	10	2	0	7	0	0,1



<i>f4</i>	10	0	200	7	0	0,1
<i>g4</i>	3	1,5	100	9	0	0,1
<i>h4</i>	3	0,5	200	8	0	0,1
<i>a5</i>	10	2	0	9	0	0,1
<i>b5</i>	3	2	200	9	0	0,1
<i>c5</i>	10	2	0	8	0	0,1
<i>d5</i>	0	0	100	8	0,01	0,1
<i>e5</i>	10	0	100	6	0	0,1
<i>f5</i>	0	1,5	100	6	0,01	0,1
<i>g5</i>	30	2	0	9	0	0,1
<i>h5</i>	0	0	300	8	0,01	0,1
<i>a6</i>	0	0	0	8	0,01	0,1
<i>b6</i>	30	0	100	8	0	0,1
<i>c6</i>	30	1,5	300	8	0	0,1
<i>d6</i>	0	1,5	200	6	0	0,1
<i>e6</i>	30	1,5	0	8	0	0,1
<i>f6</i>	30	1	300	9	0	0,1
<i>g6</i>	30	0,5	300	6	0	0,1
<i>h6</i>	10	1,5	100	9	0	0,1
<i>a7</i>	10	0	100	7	0	0,1
<i>b7</i>	30	1	200	7	0	0,1
<i>c7</i>	30	0	0	8	0	0,1
<i>d7</i>	10	2	300	8	0	0,1
<i>e7</i>	0	0,5	300	9	0,01	0,1
<i>f7</i>	30	0,5	300	6	0	0,1
<i>g7</i>	30	2	200	8	0	0,1
<i>h7</i>	3	0	0	7	0	0,1
<i>a8</i>	0	1	0	6	0,01	0,1
<i>b8</i>	10	0	200	9	0	0,1
<i>c8</i>	0	0	0	7	0,01	0,1
<i>d8</i>	30	2	300	9	0	0,1
<i>e8</i>	3	0,5	300	8	0	0,1
<i>f8</i>	0	0,5	200	9	0	0,1
<i>g8</i>	30	2	100	9	0	0,1

<i><b>h8</b></i>	0	1,5	300	7	0,01	0,1
<i><b>a9</b></i>	10	0,5	0	9	0	0,1
<i><b>b9</b></i>	30	0,5	0	9	0	0,1
<i><b>c9</b></i>	30	0	300	7	0	0,1
<i><b>d9</b></i>	30	0	0	9	0	0,1
<i><b>e9</b></i>	10	1,5	0	9	0	0,1
<i><b>f9</b></i>	10	1	300	9	0	0,1
<i><b>g9</b></i>	10	0	200	8	0	0,1
<i><b>h9</b></i>	0	0,5	100	8	0,01	0,1
<i><b>a10</b></i>	3	0	200	9	0	0,1
<i><b>b10</b></i>	30	0,5	100	7	0	0,1
<i><b>c10</b></i>	30	2	100	6	0	0,1
<i><b>d10</b></i>	3	1,5	300	7	0	0,1
<i><b>e10</b></i>	10	2	0	6	0	0,1
<i><b>f10</b></i>	10	2	200	6	0	0,1
<i><b>g10</b></i>	0	0	300	6	0,01	0,1
<i><b>h10</b></i>	30	1,5	0	6	0	0,1
<i><b>a11</b></i>	30	1,5	100	6	0	0,1
<i><b>b11</b></i>	0	2	100	7	0,01	0,1
<i><b>c11</b></i>	10	0	100	8	0	0,1
<i><b>d11</b></i>	0	0	0	9	0,01	0,1
<i><b>e11</b></i>	0	0,5	200	8	0	0,1
<i><b>f11</b></i>	0	0,5	100	9	0,01	0,1
<i><b>g11</b></i>	0	2	300	7	0,01	0,1
<i><b>h11</b></i>	0	0	100	9	0,01	0,1
<i><b>a12</b></i>	3	2	100	7	0	0,1
<i><b>b12</b></i>	10	1,5	200	7	0	0,1
<i><b>c12</b></i>	0	0,5	0	8	0,01	0,1
<i><b>d12</b></i>	10	2	300	7	0	0,1
<i><b>e12</b></i>	0	1,5	0	7	0	0,1
<i><b>f12</b></i>	10	0,5	100	7	0	0,1
<i><b>g12</b></i>	0	2	300	6	0,01	0,1
<i><b>h12</b></i>	30	2	0	8	0	0,1

**Tableau S5.** Plan d'expérience de repliement de L1 généré par le programme JMP.

La 1<sup>ère</sup> colonne correspond aux positions des différents tampons sur la plaque 96 puits. Chaque puit contient un tampon 20 mM Tris-HCl (pH 8 et 9) ou CAPS (pH 10 et 11) et 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . La concentration de la protéine L1 varie (0.1 ; 0.5 ; 1 ; 3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Position plaque	[SDS] (mM)	[MPD] (M)	[NaCl] (mM)	Ratio GSH:GSSG	[Arginine] (M)	[Glutathion] (mM)	pH	[L1] ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
a1	10	2,5	200	4:1	0	15	10	0,5
b1	0,5	0	0	1:1	0	5	9	0,1
c1	0,5	0	200	1:4	0	15	11	0,1
d1	0,5	0	200	1:4	0	15	10	1
e1	0,5	0	200	1:4	0,2	5	8	0,1
f1	10	0	100	1:1	0,1	5	11	0,1
g1	0,5	2,5	0	4:1	0,2	5	10	3
h1	0,5	2,5	100	1:4	0,2	5	8	0,5
a2	10	2,5	0	1:4	0,1	5	9	0,1
b2	10	0	200	1:4	0,2	5	11	0,5
c2	10	2,5	0	4:1	0,2	5	11	1
d2	10	2,5	0	1:4	0,2	15	9	1
e2	0,5	2,5	0	4:1	0	15	11	3
f2	10	0	0	4:1	0	5	11	0,5
g2	0,5	0	0	1:4	0	5	8	3
h2	10	0	200	4:1	0	15	8	0,1
a3	10	0	0	1:4	0	15	10	0,5
b3	0,5	0	200	1:4	0,2	5	10	3
c3	10	0	200	1:4	0,1	15	8	0,5
d3	10	2,5	0	4:1	0,2	15	11	0,5
e3	10	0	200	1:4	0	5	9	3
f3	0,5	2,5	0	1:4	0	5	10	0,5
g3	0,5	1,25	200	1:4	0	5	11	1
h3	10	0	0	4:1	0,1	15	9	1
a4	10	2,5	0	1:4	0,2	15	8	3
b4	10	2,5	200	1:4	0,2	5	10	1
c4	10	0	200	4:1	0,2	15	10	1
d4	0,5	2,5	0	4:1	0,2	15	8	0,1

<b>e4</b>	0,5	0	200	1:1	0,2	15	8	3
<b>f4</b>	10	2,5	200	4:1	0,2	15	9	3
<b>g4</b>	0,5	1,25	200	4:1	0,2	15	10	0,1
<b>h4</b>	0,5	2,5	0	1:4	0	15	9	0,5
<b>a5</b>	0,5	0	0	4:1	0	15	11	1
<b>b5</b>	0,5	2,5	200	1:1	0,2	5	9	0,1
<b>c5</b>	10	1,25	200	4:1	0	5	9	1
<b>d5</b>	10	2,5	0	1:4	0,1	5	11	3
<b>e5</b>	0,5	1,25	0	1:4	0,2	5	9	3
<b>f5</b>	10	0	0	1:4	0,2	5	9	0,5
<b>g5</b>	0,5	2,5	200	4:1	0	15	8	0,5
<b>h5</b>	0,5	0	100	1:4	0,2	15	9	0,1
<b>a6</b>	10	2,5	200	4:1	0	5	11	0,1
<b>b6</b>	0,5	2,5	0	1:4	0,2	5	11	0,1
<b>c6</b>	10	2,5	200	1:4	0	5	9	0,5
<b>d6</b>	0,5	2,5	200	1:4	0	15	8	0,1
<b>e6</b>	5	2,5	0	4:1	0	15	10	1
<b>f6</b>	0,5	0	0	4:1	0	15	10	0,5
<b>g6</b>	5	2,5	200	4:1	0	5	8	3
<b>h6</b>	10	0	0	4:1	0,2	5	8	3
<b>a7</b>	10	0	200	4:1	0	15	11	3
<b>b7</b>	10	0	0	1:4	0	5	10	1
<b>c7</b>	0,5	0	200	4:1	0	15	9	3
<b>d7</b>	0,5	2,5	100	1:4	0	5	9	1
<b>e7</b>	10	0	0	1:4	0,2	15	11	1
<b>f7</b>	0,5	2,5	200	4:1	0,2	15	11	1
<b>g7</b>	10	2,5	200	1:4	0	15	11	1
<b>h7</b>	10	2,5	0	1:1	0	5	8	0,5
<b>a8</b>	5	0	0	1:4	0,2	5	10	0,1
<b>b8</b>	0,5	0	0	4:1	0	15	10	0,1
<b>c8</b>	10	1,25	0	4:1	0	15	8	3
<b>d8</b>	0,5	0	200	4:1	0,2	15	9	0,5
<b>e8</b>	10	2,5	200	4:1	0,2	15	8	1
<b>f8</b>	5	0	200	1:4	0,2	5	9	1

<b>g8</b>	0,5	2,5	0	1:1	0,2	5	8	1
<b>h8</b>	10	0	0	1:4	0,2	15	8	0,1
<b>a9</b>	0,5	2,5	0	1:4	0,1	15	10	0,1
<b>b9</b>	5	0	0	1:4	0	15	9	3
<b>c9</b>	10	0	200	4:1	0,2	5	9	0,1
<b>d9</b>	10	0	0	4:1	0	5	10	3
<b>e9</b>	10	2,5	0	4:1	0	5	9	3
<b>f9</b>	0,5	2,5	0	4:1	0,2	15	9	1
<b>g9</b>	0,5	0	0	1:4	0,1	15	11	0,5
<b>h9</b>	0,5	0	200	1:4	0	5	9	0,5
<b>a10</b>	0,5	2,5	200	4:1	0	5	10	1
<b>b10</b>	10	2,5	200	1:4	0	15	10	3
<b>c10</b>	0,5	2,5	200	1:4	0,2	15	11	3
<b>d10</b>	10	2,5	200	4:1	0	15	9	0,1
<b>e10</b>	0,5	0	100	4:1	0,2	5	11	3
<b>f10</b>	0,5	2,5	200	1:4	0	15	9	3
<b>g10</b>	0,5	2,5	0	4:1	0,1	5	9	0,5
<b>h10</b>	10	0	0	4:1	0,2	15	11	0,1
<b>a11</b>	10	2,5	0	1:4	0	15	11	0,1
<b>b11</b>	10	0	0	1:4	0,2	15	10	3
<b>c11</b>	0,5	2,5	0	4:1	0	5	8	0,1
<b>d11</b>	5	1,25	100	1:1	0	15	11	0,5
<b>e11</b>	5	0	200	4:1	0,1	5	10	0,5
<b>f11</b>	0,5	0	0	4:1	0,2	5	10	1
<b>g11</b>	0,5	2,5	200	4:1	0,2	5	11	0,5
<b>h11</b>	0,5	0	200	4:1	0	5	8	1
<b>a12</b>	10	0	200	1:4	0	5	10	0,1
<b>b12</b>	10	2,5	200	1:4	0,2	15	11	0,1
<b>c12</b>	10	1,25	200	4:1	0,2	5	8	0,5
<b>d12</b>	5	0	0	4:1	0,2	15	8	0,5
<b>e12</b>	10	0	200	1:4	0	5	8	1
<b>f12</b>	10	2,5	0	4:1	0,2	5	10	0,1
<b>g12</b>	0,5	2,5	200	1:4	0,2	15	10	0,5
<b>h12</b>	0,5	1,25	0	1:4	0	15	8	1