

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES CHIMIQUE À FINALITÉ SPÉCIALISÉE EN CHIMIE EN ENTREPRISE

Caractérisation et étude de la protéine membranaire PcoB chez *Caulobacter crescentus* impliquée dans l'homéostasie du cuivre

BALON, Hugo

Award date:
2023

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



Université de Namur
Faculté des Sciences

Caractérisation et étude de la protéine membranaire
PcoB chez *Caulobacter crescentus* impliquée dans
l'homéostasie du cuivre

Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de
Master Chimie « Chimie du Vivant et des Nanomatériaux » : Finalité Spécialisée

Hugo BÂLON

Janvier 2023

UNIVERSITÉ DE NAMUR
Faculté des Sciences
Secrétariat du Département de Chimie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : +32(0)8172.54.44 – Téléfax : +32(0)81 72.54.40
E-mail : enseignement.chimie@unamur.be – www.unamur.be/sciences

Caractérisation et étude de la protéine membranaire PcoB chez *Caulobacter crescentus* impliquée dans l'homéostasie du cuivre

BÂLON Hugo

Résumé

Le cuivre est un élément essentiel pour les organismes vivants mais cytotoxique en concentration trop élevée. Par conséquent, cela lui confère des propriétés désinfectantes et antimicrobiennes connues et employées depuis des siècles. Le cuivre est notamment utilisé pour couvrir les surfaces fréquemment touchées dans les hôpitaux et les centres de soins afin de diminuer les transmissions par contact et diminuer les infections nosocomiales.

Cependant, certaines bactéries comme *Escherichia coli* ou *Caulobacter crescentus* ont développé des mécanismes d'homéostasie, de résistance et de tolérance leur permettant de supporter des concentrations en Cu^{2+} bien plus hautes que la plupart des autres bactéries. Chez *C. crescentus*, ce mécanisme de détoxification dépend de deux protéines : PcoA, une *multi-copper oxydase* périplasmique qui oxyde le Cu^+ en Cu^{2+} , et PcoB, supposée être une protéine membranaire à efflux de cuivre qui exporterait les cations Cu^{2+} hors du périplasme.

L'objectif général de ce travail consiste en l'étude et la caractérisation de la protéine membranaire PcoB afin de mieux comprendre son rôle dans le mécanisme d'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*. Pour ce faire, sa structure sera étudiée à l'aide de techniques computationnelles, physico-chimiques et spectroscopiques, tandis que sa fonction sera évaluée via l'élaboration d'un test de relargage *in vitro*. Ce dernier consiste à insérer la protéine dans la membrane d'un liposome contenant du cuivre afin de former un protéoliposome. Le cuivre relargué sera par la suite dosé.

Mémoire de master en Sciences Chimiques (Orientation Chimie du Vivant et des Nanomatériaux) Finalité Spécialisée

Janvier 2023

Promoteur : C. Michaux

Co-promoteur : E. A. Perpète

Encadrante : L. Hennaux

A Éric, l'homme dont le savoir et l'ardeur de vivre n'avaient d'égal que son amour pour la famille du CPB. Ton esprit vif, cultivé, incisif et caustique n'a malheureusement jamais eu le temps de m'exposer et de m'apprendre tout ce que j'ignore encore. Puisse-tu être heureux et en paix là où tu es.

Résiste et mords !

Remerciements

Ce mémoire est le fruit de deux années passées au laboratoire de Chimie-Physique des Biomolécules (CPB) de l'Université de Namur. Je désire remercier de tout cœur toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'achèvement de ce manuscrit.

Dans un premier temps, je voudrais remercier du plus profond de mon cœur ma promotrice, le Pr. Catherine Michaux, pour tous ses conseils avisés, sa sagesse et son esprit critique. Tu as toujours été disponible et à l'écoute dès qu'un obstacle se présentait à nous. Merci pour la confiance que tu nous as accordée dès les premiers jours et pour ton dévouement à notre réussite. Le CPB est tout pour toi mais sache que tu es également tout pour lui.

Je voudrais également remercier (ou plutôt féliciter) mon encadrante Laurelenn d'avoir (réussi l'exploit de) supporter mon humour (piquant) et mes questions (souvent stupides) tout au long de cette aventure. Tu as été une encadrante Noble, Universitaire, Légendaire, Limpide et Ecclésiastique mais tout de même appréciée pour tes expressions faciales saugrenues et ta joie de vivre quotidienne. Je terminerais ce paragraphe en te disant une chose : sorry mais tu ne trouveras plus jamais un mémorant aussi drôle et brillant que moi.

En outre, j'aimerais dire un tout grand merci aux autres anciens mémorants, aux doctorants et aux chercheurs du CPB, c'est-à-dire Laurane, Cyril, Blinera, Julien, Virgile et Maude. Vous avez toujours été disponibles pour nous guider, nous, les petits bébés de mémorants, malgré vos nombreuses occupations (Maison des Desserts, grasse matinée, après-midi à la cafétéria, ...). De plus, jamais les parties de jeux de société n'auraient été aussi amusantes (et rageantes) sans vous. Merci également à Coco, Nef et Jérémy pour toutes ces parties de rikiiki (parfois inachevées) qui permettaient de se changer les idées durant le temps de midi.

Merci aussi à mes co-mémorants Tanguy et Ugo d'avoir été là, autant pour faire la fête (au Chapitre ou ailleurs) que pour travailler nos écrits et nos présentations. Merci surtout à toi, Jean Poucet (à lire avec l'accent anglais), pour tous nos débats, nos écoutes musicales et nos discussions sans fin en laboratoire à parler de tout et de rien. Malgré une année forte en émotions et en couleurs, nous avons toujours été de l'avant en se serrant les coudes et en ayant tous le même dédain pour tous ces doctorants qui nous trouvent « stupides ». Merci aussi à Romain, Charles et François pour les ragots et les discussions échangés lors de leurs petits passages au bureau durant leurs pauses.

Je remercie grandement les personnes qui ont contribué à l'obtention des résultats scientifiques. Un grand merci au Pr. Jean-Yves Matroule et à Amira Khochtali pour ces réunions constructives et ces informations utiles concernant PcoB. Merci également à Corry Charlier pour sa précieuse aide lors de ces nombreux essais de préparation des grilles et des images TEM. Merci aussi au laboratoire de Chimie Organique de Synthèse (COS) pour l'utilisation de l'évaporateur rotatif et à Pierre Delmée pour sa disponibilité et ses explications techniques concernant cet appareil.

J'aimerais également montrer toute ma gratitude envers ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes études et dans la voie que j'ai choisie. Même si, à part Papa, vous n'avez jamais vraiment compris sur quoi je travaillais, vous m'avez toujours écouté et c'est déjà beaucoup. Comme je l'ai dit étant gamin, « le prix Nobel se rapproche de jour en jour ».

Pour terminer, j'aimerais remercier du plus profond de mon cœur mon amoureuse, ma meilleure amie et ma confidente Elisabeth. Merci d'avoir été là durant toutes ces épreuves et de m'avoir toujours soutenu et réconforté même dans les moments les plus sombres.

Table des matières

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introduction | 6 |
| 1.1. | Cuivre et propriétés antimicrobiennes | 6 |
| 1.2. | Homéostasie, résistance et tolérance bactérienne | 8 |
| 1.3. | <i>Caulobacter crescentus</i> et PcoB | 10 |
| 1.4. | Les protéines membranaires et leurs difficultés | 12 |
| 1.5. | Renaturation par la méthode SDS-MPD | 13 |
| 1.6. | Liposomes et protéoliposomes | 13 |
| 2. | Objectifs et stratégie | 18 |
| 3. | Résultats et discussion | 21 |
| 3.1. | Analyses bio-informatiques | 21 |
| 3.2. | Surexpression de PcoB chez <i>E. coli</i> | 25 |
| 3.2.1. | Principe | 25 |
| 3.2.2. | Résultats | 27 |
| 3.3. | Purification de PcoB en conditions dénaturantes | 28 |
| 3.3.1. | Principe | 28 |
| 3.3.2. | Résultats de la purification | 29 |
| 3.3.3. | Électrophorèse SDS-PAGE | 30 |
| 3.4. | Dosage protéique | 30 |
| 3.5. | Renaturation de PcoB | 31 |
| 3.5.1. | Principe | 31 |
| 3.5.2. | Résultats | 32 |
| 3.6. | Étude de la liaison entre PcoB et certains cations métalliques | 34 |
| 3.6.1. | Analyse de la liaison de PcoB avec le Cu^{2+} | 34 |
| 3.6.2. | Étude de la sélectivité de PcoB pour le Cu^{2+} | 36 |
| 3.7. | Formation des liposomes | 37 |
| 3.7.1. | Principe | 37 |
| 3.8. | Formation des protéoliposomes | 40 |
| 3.9. | Purification des protéoliposomes | 44 |
| 3.10. | Stabilité du Cu^{2+} en solution | 45 |
| 4. | Conclusion | 49 |
| 5. | Matériels et méthodes | 52 |
| 5.1. | Analyses bio-informatiques | 52 |
| 5.2. | Surexpression de PcoB chez <i>E. coli</i> | 52 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.2.1. | Préculture..... | 52 |
| 5.2.2. | Cultures | 52 |
| 5.2.3. | Centrifugation..... | 52 |
| 5.2.4. | Lyse | 53 |
| 5.2.5. | Lavage | 53 |
| 5.3. | Solubilisation des CI | 53 |
| 5.4. | Purification de PcoB en conditions dénaturantes | 53 |
| 5.4.1. | Appareillage | 53 |
| 5.4.2. | Conditionnement de la colonne | 54 |
| 5.4.3. | Purification | 54 |
| 5.5. | Élimination des sels et de l'imidazole | 54 |
| 5.6. | Électrophorèse SDS-PAGE..... | 54 |
| 5.6.1. | Préparation des gels..... | 54 |
| 5.6.2. | Préparation des échantillons | 55 |
| 5.6.3. | Migration | 56 |
| 5.7. | Dosage protéique..... | 56 |
| 5.8. | Renaturation de PcoB..... | 56 |
| 5.9. | Formation des liposomes..... | 57 |
| 5.10. | Formation des protéoliposomes..... | 58 |
| 5.11. | Purification des PL | 58 |
| 5.11.1. | Purification par ultracentrifugation fractionnée | 58 |
| 5.11.2. | Purification par ultracentrifugation avec gradient de sucrose | 58 |
| 5.11.3. | Purification par filtration | 59 |
| 5.12. | Dichroïsme Circulaire | 59 |
| 5.13. | Fluorescence intrinsèque des tyrosines et des tryptophanes..... | 59 |
| 5.14. | Diffusion Dynamique de la Lumière..... | 59 |
| 5.15. | Microscopie électronique à transmission | 60 |
| 6. | Bibliographie | 62 |

Liste des abréviations

| | |
|---------|---|
| APS | <i>Ammonium PerSulfate</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| CD | <i>Circular Dichroism</i> |
| CI | Corps d'Inclusion |
| CL | 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phospho]-glycérol |
| CMC | Concentration Micellaire Critique |
| CPB | Laboratoire de Chimie-Physique des Biomolécules |
| D.O. | Densité optique |
| DLS | <i>Dynamic Light Scattering</i> |
| EPA | <i>United States Environmental Protection Agency</i> |
| FPLC | <i>Fast Liquid Protein Chromatography</i> |
| FT | <i>Flow Through</i> |
| GUV | <i>Giant Unilamellar Vesicles</i> |
| His-tag | Étiquette poly-histidines |
| IDP | <i>Intrinsically Disordered Protein</i> |
| IDR | <i>Intrinsically Disordered Region</i> |
| IMAC | <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> |
| IPTG | Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside |
| ITTF | <i>Intrinsic Tyrosine and Tryptophan Fluorescence</i> |
| Kana | Kanamycine |
| LB | <i>Lysogeny Broth</i> |
| LUV | <i>Large Unilamellar Vesicles</i> |
| MLV | <i>Multi Lamellar Vesicles</i> |
| MPD | 2-méthyl-2,4-pentane-1,3-diol |
| OLV | <i>Oligo Lamellar Vesicles</i> |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |

| | |
|----------|--|
| PcoA | <i>Copper resistance protein A</i> |
| PcoB | <i>Copper resistance protein B</i> |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PG | 1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phospho-1'-rac-glycérol |
| PL | Protéoliposomes |
| POPG | 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycéro-3-phospho-1'-rac-glycérol |
| PTA | <i>Phosphotungstic acid</i> |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| ST | <i>Stalked Cell</i> |
| SUV | <i>Small Unilamellar Vesicles</i> |
| SW | <i>Swarmer Cell</i> |
| TEM | <i>Transmission Electron Microscopy</i> |
| TEMED | Tétraméthyléthylènediamine |
| UV | Ultraviolet |

1. Introduction

1. Introduction

1.1. Cuivre et propriétés antimicrobiennes

Le cuivre (Cu) est un élément essentiel à la plupart des organismes vivants car il est impliqué, souvent comme cofacteur, dans une multitude de réactions redox enzymatiques. Chez l'Humain, celui-ci se retrouve par exemple comme cofacteur de la *cytochrome C oxydase*, une enzyme cruciale pour le fonctionnement des mitochondries et donc de toutes les cellules humaines.^{1,2} Ce métal est également retrouvé chez les bactéries comme cofacteur des oxydases impliquées dans la réduction de l'O₂ et dans le maintien du gradient de protons.³

Bien que primordial, les ions cuivre sont cytotoxiques lorsqu'ils sont présents en excès. Cette propriété du cuivre explique pourquoi il est utilisé comme agent désinfectant et antimicrobien depuis des siècles. En effet, la première trace de son application dans le domaine médical remonte au papyrus Edwin Smith, rédigé vers 1600 BC mais supposé être une copie d'un travail réalisé vers 3000 BC.⁴ Ce manuscrit décrit l'utilisation de composés cuivrés pour stériliser une blessure à la poitrine ou assainir de l'eau et la rendre potable. Les traitements employés à l'époque étaient principalement constitués d'éclats et de copeaux de cuivre métallique ainsi que de divers sels et oxydes naturels comme la malachite (Cu₂CO₃(OH)₂) ou le chrysocolle ((Cu, Al)₂H₂Si₂O₅(OH)₄.n H₂O) par exemple.⁴

En 2008, le cuivre pur et 478 de ses alliages ont été officiellement reconnus par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (*United States Environmental Protection Agency, US EPA*) comme les tous premiers métaux antibactériens.⁵ Pour posséder cette propriété, il est nécessaire que le mélange soit composé au minimum de 60 % de cuivre. Ces alliages sont classés en 5 groupes en fonction de leur pourcentage en cuivre (Tableau 1).

Tableau 1 – Contenu en cuivre et numéro EPA des différents groupes d'alliages antibactériens⁶

| Groupe | % en Cu | N° d'enregistrement EPA |
|--------|---------------|-------------------------|
| I | 95.20 – 99.99 | 8212-1 |
| II | 87.30 – 95.00 | 8212-2 |
| III | 78.10 – 87.09 | 8212-3 |
| IV | 68.20 – 77.50 | 8212-4 |
| V | 65.00 – 67.80 | 8212-5 |
| VI | 60.00 – 64.50 | 8212-6 |

Le cuivre métallique possède les meilleures propriétés antimicrobiennes mais, en pratique, les alliages sont plus fréquemment employés car leur coût est moindre. Les deux principaux alliages employés de nos jours sont le bronze (généralement composé de minimum 65 % en cuivre, d'environ 15 % en étain et le tout complété par divers autres éléments tels que le zinc, le plomb ou encore l'aluminium) et le laiton (composé de 60 à 95 % en cuivre et complété par du zinc).⁷

A l'heure actuelle, le cuivre est toujours employé comme un agent antimicrobien et désinfectant. Il est principalement retrouvé dans le domaine des soins de santé et les hôpitaux comme revêtement pour les équipements et les surfaces fréquemment touchées tels que les éviers, les poignées de porte ou encore les rampes (Figure 1).⁸⁻¹⁰ L'objectif de cette utilisation est de diminuer la charge microbienne des surfaces afin de réduire la transmission par contact ainsi que le taux d'infections nosocomiales. Il est important de noter que la majorité des surfactants employés dans les hôpitaux pour laver les surfaces sont compatibles avec celles recouvertes de cuivre. Seuls ceux contenant des chélateurs d'ions métalliques tels que l'EDTA ne peuvent être utilisés. Par ailleurs, la crise sanitaire mondiale engendrée par le COVID-19 a également renouvelé l'intérêt pour ces surfaces antibactériennes depuis que l'EPA a officiellement reconnu certains alliages du cuivre comme étant efficaces contre le virus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*).¹¹

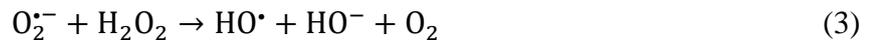


Figure 1 – Exemples de surfaces fréquemment touchées recouvertes d'un revêtement cuivré (Central Texas Veterans Health Care System, Temple, TX, USA).⁹

Actuellement, les mécanismes de la cytotoxicité du cuivre envers les bactéries, virus et champignons ne sont pas encore totalement compris. D'après les hypothèses actuelles sur le

sujet, ces mécanismes seraient différents pour chaque organisme. En ce qui concerne les bactéries, la forte concentration en ions de cuivre dissous par l'environnement liquide semble jouer un rôle important dans cette toxicité. La grande majorité du cuivre présent dans les solutions aqueuses est sous forme de cation divalent et non monovalent. En effet, bien que la dernière couche de la structure électronique du Cu^+ soit fermée et donc plus stable, son enthalpie d'hydratation est très faible. Cette énergie est bien plus grande pour le Cu^{2+} ce qui permet de contrebalancer le déficit énergétique engendré par la couche électronique de valence ouverte.

Ces cations métalliques engendreraient des dégâts au niveau de la membrane et y formeraient des pores.¹² Ils pénétreraient ainsi dans la cellule via ces orifices, ce qui engendrerait des réactions de types Fenton (1-4) et donc la formation d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) telles que $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ou HO^\bullet .¹³



L'augmentation de la quantité de ROS contenue dans les cellules entrainerait un déséquilibre entre la vitesse de formation de ces derniers et leur vitesse de dégradation par l'organisme. Ce phénomène se nomme stress oxydatif. Il est nocif pour la bactérie puisque les ROS vont réagir avec de nombreuses entités telles que des protéines, des lipides, ou encore des bases nucléiques. Tous ces composés vont être dégradés et altérés, ce qui va détraquer tout le métabolisme et conduire à la mort cellulaire.¹³

De plus, la forte concentration en cuivre dans le milieu et la grande affinité des cations Cu^+ et Cu^{2+} pour les thiols engendreraient un déplacement dans les équilibres des métalloprotéines ce qui conduirait à la mismétallation de certaines d'entre elles. Leur activité en serait alors modifiée et cela mènerait à l'apoptose.¹⁴

1.2. Homéostasie, résistance et tolérance bactérienne

Malgré l'efficacité du cuivre contre la plupart des virus et des bactéries *via* les mécanismes hypothétiques mentionnés ci-dessus, certains organismes semblent avoir développé des systèmes d'homéostasie, de résistance ou de tolérance. Le phénomène

d'homéostasie correspond au maintien d'un paramètre cellulaire (pH, concentration en ions, ...) dans une gamme optimale pour la bactérie alors que la résistance est la mise en œuvre de mécanismes cellulaires permettant à la bactérie de survivre en permanence dans des conditions plus dures (pour des bactéries ne possédant pas ce système). La tolérance est observée lorsque le stress est passager et non permanent.

Ces trois systèmes de détoxification sont par exemple retrouvés chez certaines bactéries à gram négatif telles que *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et également chez certaines bactéries à gram positif comme *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus hirae*. Tous ces organismes peuvent supporter des concentrations en cuivre plus élevées que la moyenne des bactéries ne possédant pas de stratégie de détoxification du cuivre.^{3,8,15-18}

De nombreux systèmes de régulation existent parmi les bactéries. Chez celles à gram négatif, les quatre principaux se nomment Cue, Cus, Pco et Cop.¹⁹⁻²¹ La régulation des ions du cuivre est principalement étudiée chez *E. coli* où l'on retrouve ces quatre grands mécanismes (Figure 2). Tous ces systèmes sont composés de multiples protéines (globulaires et membranaires) et possèdent des fonctionnements relativement différents. Cependant, leur objectif principal est identique : maintenir une certaine concentration en cuivre dans l'organisme (ni trop haute ni trop basse) *via* le captage et l'expulsion des Cu^+ et Cu^{2+} , afin de protéger la bactérie de la cytotoxicité de ces cations métalliques.

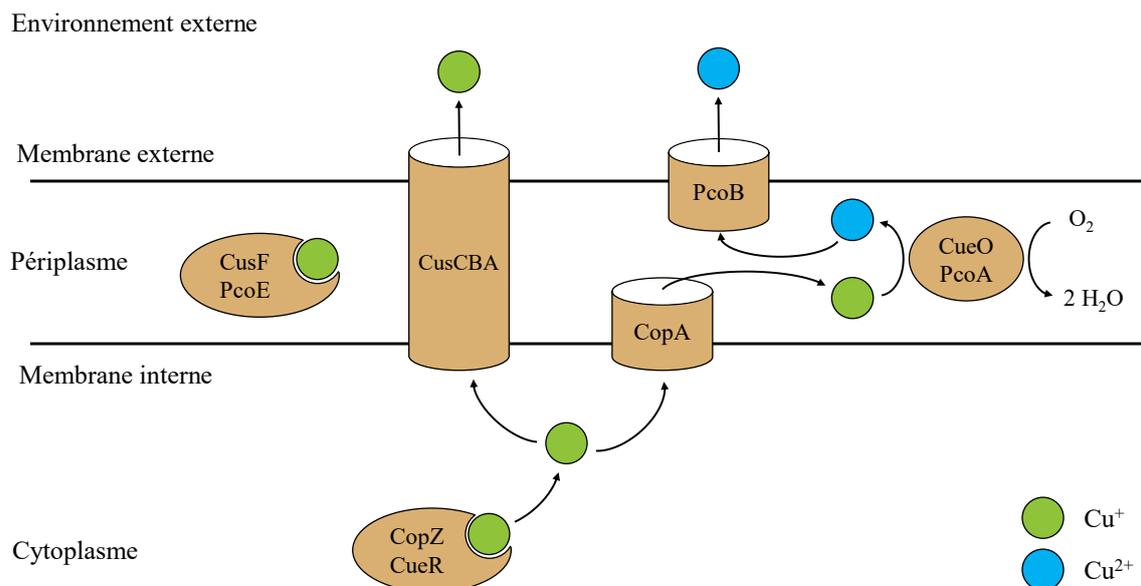


Figure 2 – Schéma simplifié des systèmes de régulation du cuivre Cue, Cus, Pco et Cop présents chez *E. coli*.²¹

1.3. *Caulobacter crescentus* et PcoB

C. crescentus est une alphaprotéobactérie à gram négatif et non pathogène capable de vivre dans des milieux oligotrophes. Elle est principalement retrouvée dans des milieux aquatiques comme des sources d'eau douce (rivières et lacs) ou dans certains types de sols. Elle est également une bactérie modèle fortement étudiée en biologie car elle possède un cycle de réplication asymétrique peu commun (Figure 3). En effet, la division d'une cellule mère produit deux types de cellules filles différentes : une cellule mobile possédant un flagelle (*swarmer cell*, SW) et une seconde immobile possédant un pédoncule (*stalked cell*, ST). Dans un milieu stressant comme par exemple une forte concentration en cuivre, les cellules SW vont se déplacer par chimiotaxie négative afin de trouver un environnement plus adapté alors que les ST, immobilisées sur une surface *via* leur pédoncule, expriment de manière plus abondante le système de détoxification du cuivre Pco.

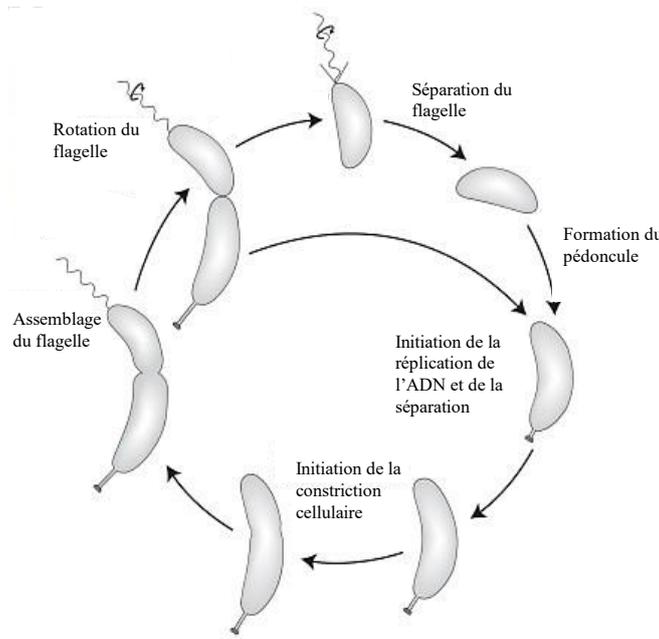


Figure 3 – Cycle de réplication de *Caulobacter crescentus*^{22,23}

Les membranes externes de cette bactérie sont majoritairement composées d'environ 95 % de 1,2-dielaidoyl-sn-glycéro-3-phospho-1'-rac-glycérol (PG 18:1 ou PG) et d'environ 5 % de de 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phospho]-glycérol (Cardiolipine 18:1 ou CL) (Figure 4).²⁴⁻²⁷

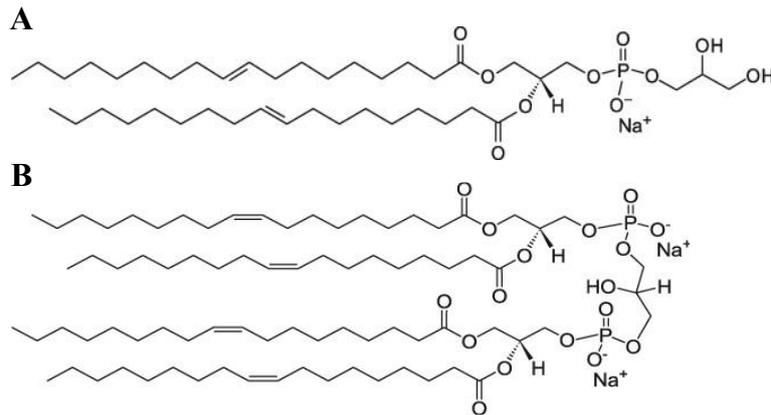


Figure 4 – Structure (A) du PG et (B) de la CL, lipides constitutifs de la membrane de *C. crescentus*.

Dans des conditions naturelles sans stress extérieur, la concentration périplasmique en Cu²⁺ chez *C. crescentus* est d'environ 2 mM.²⁸ Afin de maintenir cette concentration au niveau optimal, les trois systèmes de régulation mentionnés dans la section précédente (Figure 2) sont actifs chez cette bactérie.²⁸ Dans ce travail, seul le système Pco de *C. crescentus* sera abordé. Ce dernier se nomme PcoAB car il est constitué de deux protéines : PcoA et PcoB (Figure 5).

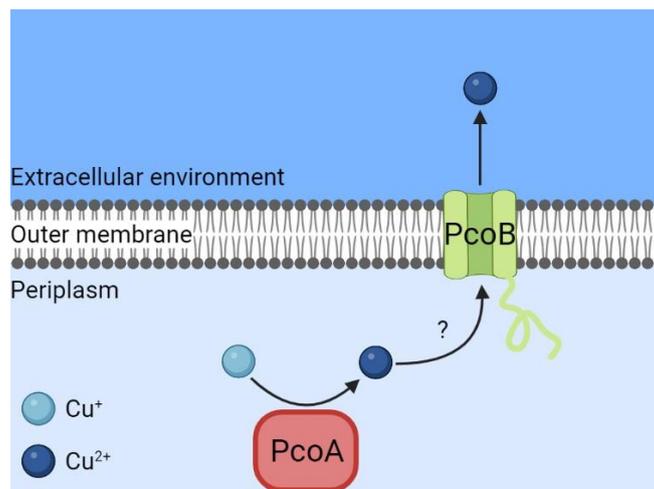


Figure 5 – Modèle du mécanisme PcoAB impliqué dans la tolérance au cuivre de *C. crescentus*.²⁸

PcoA est une *multi-copper oxydase* périplasmique qui convertit le Cu⁺ en Cu²⁺ alors que PcoB est, quant à elle, supposée être une protéine membranaire à efflux de cuivre qui exporterait les cations Cu²⁺ hors du périplasm. Contrairement à PcoB, de nombreuses informations sont disponibles dans la littérature concernant PcoA qui est une protéine globulaire soluble. Sa structure tertiaire a par ailleurs pu être prédite sur base d'une protéine homologue dont la structure a été cristallisée (CueO, code *Protein Data Bank* (PDB) : 3NSF).²⁹ Concernant PcoB, du fait de son caractère membranaire, seule sa séquence a été déterminée. Cette dernière est composée de 302 résidus et possède une masse moléculaire de 32.69 kDa.

1.4. Les protéines membranaires et leurs difficultés

Il existe trois grandes familles de protéines définies selon leur structure tertiaire et/ou quaternaire : les protéines globulaires, les protéines membranaires et les protéines fibreuses. Étant donné leur caractère soluble en milieu aqueux, les protéines globulaires sont principalement retrouvées dans le cytoplasme et le périplasma. Par ailleurs, les protéines membranaires seront généralement insérées dans les membranes car elles possèdent une partie de leur structure qui est hydrophobe. Les protéines fibreuses sont également insolubles en milieu aqueux et se retrouveront donc généralement dans la matrice extracellulaire.³⁰

Les propriétés intrinsèques des protéines globulaires leur permettent d'être facilement surexprimées, purifiées, cristallisées et caractérisées. L'obtention de leur conformation 3D est principalement réalisée *via* diffraction de rayons X ou résonance magnétique nucléaire. Cependant, malgré le fait qu'environ 25 % des protéines synthétisées par les organismes soient des protéines membranaires³¹, les propriétés de ces dernières rendent leur étude plus complexe. En effet, très peu de leurs structures sont référencées dans la PDB : seulement 10495 structures sur les 198998 sont celles de protéines membranaires, ce qui représente environ 5 % de l'ensemble des structures connues à ce jour.³²

Malgré ces difficultés engendrées par la nature même des protéines membranaires, certaines méthodes permettent tout de même de pouvoir les produire et les étudier. En ce qui concerne la surexpression de ce type de protéines, deux grandes méthodes existent : i) la surexpression en membrane, où la protéine en est extraite par l'ajout de détergent, ii) la surexpression en corps d'inclusion, amenant la protéine dans le cytosol et menant généralement à sa dénaturation. La première option possède un avantage structural puisqu'elle permet de récupérer la protéine dans sa conformation native. Cependant, le rendement final qui en résulte est très faible.^{33,34} La seconde méthode permet d'obtenir des rendements bien plus élevés mais mène à la formation d'agrégats biologiquement inactifs nommés corps d'inclusion (CI).^{35,36} Le désavantage de cette méthode est que la protéine est donc sous sa forme dénaturée et qu'une étape de renaturation est nécessaire afin de replier la protéine et de récupérer sa fonction native. En revanche, les rendements sont élevés car les CI formés sont présents en grande quantité, la protéine d'intérêt y est relativement pure et protégée de la protéolyse.^{31,37-39}

1.5. Renaturation par la méthode SDS-MPD

Plusieurs stratégies peuvent être employées afin de renaturer une protéine membranaire *in vitro*. La manière la plus employée dans la littérature, pour sa facilité de réalisation, est la solubilisation des CI à l'aide de fortes concentrations en urée ou en chlorure de guanidinium suivi d'une dilution successive de l'échantillon dans un tampon de renaturation contenant un détergent. Toutefois, son efficacité est moindre puisqu'elle engendre généralement un faible taux de repliement.⁴⁰

La méthode de renaturation employée dans ce travail repose sur l'association d'un détergent anionique comme le *sodium dodecylsulfate* (SDS) et d'un cosolvant comme le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD). Cette dernière a été développée par C. Michaux *et al.* en 2008 et optimisée dans le laboratoire du CPB.⁴¹ Elle a déjà prouvé son efficacité pour le repliement de diverses protéines membranaires à tonneau β telles que PagP⁴¹, Omp2A⁴² ou encore VDAC36⁴³. Malgré le fait que le mécanisme exact n'ait pas encore été élucidé, la renaturation serait due à la déstabilisation des micelles de SDS par le MPD. Cela pourrait entraîner la formation de micelles hybrides SDS-MPD qui seraient capables de laisser la protéine reprendre sa forme native tout en la maintenant en solution.

1.6. Liposomes et protéoliposomes

L'utilisation de la méthode de renaturation SDS-MPD permet d'obtenir la protéine d'intérêt sous sa forme repliée. Cependant, afin de pouvoir la caractériser, cette stratégie de stabilisation n'est pas suffisante. Le SDS et le MPD présents dans la solution interagissent avec de nombreux composés et une légère modification des micelles hybrides engendrerait la dénaturation et la précipitation de PcoB. Afin d'étudier les protéines membranaires sous leur forme native, il est donc nécessaire d'utiliser des systèmes plus stables permettant de mimer la bicouche lipidique et de conserver la forme renaturée de la protéine. De nombreuses autres méthodes sont renseignées dans la littérature, cependant les principales sont les bicelles de lipide/détergent, les nanodisques de lipides et les liposomes (Figure 6).⁴⁴

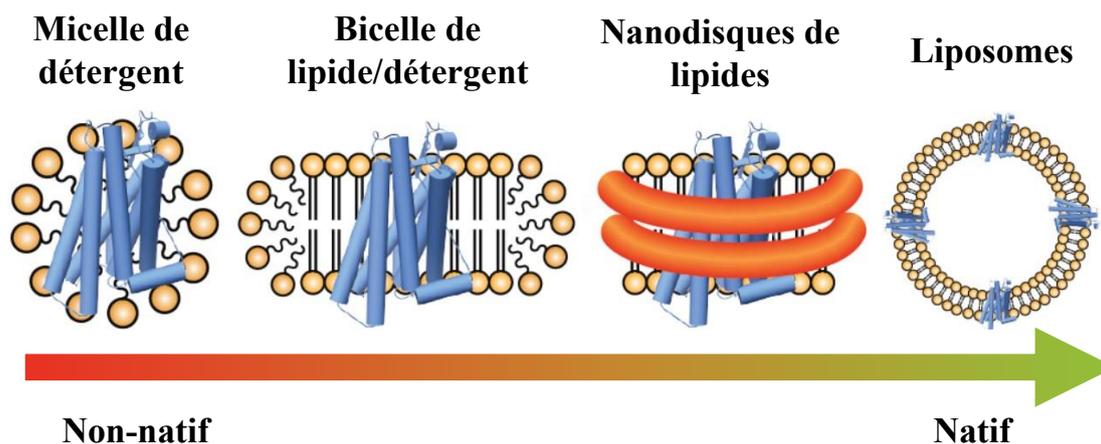


Figure 6 - Principales méthodes de stabilisation des protéines membranaires classées du moins proche au plus proche de l'environnement natif de la protéine.⁴⁴

Les micelles de détergent sont les systèmes les plus employés car ils sont relativement simples à obtenir : il suffit d'ajouter, en concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC), un des multiples détergents disponibles et compatibles pour la solubilisation de protéines. Cependant, cette méthode de stabilisation des protéines membranaires permet de les maintenir en solution sous une conformation proche de celle native mais pas de prendre en compte leur environnement natif.⁴⁵⁻⁴⁸ Les bicelles permettent un environnement plus naturel pour ces protéines mais, la présence de détergent est toujours problématique et peut engendrer un mauvais repliement ou une dénaturation.^{49,50} En ce qui concerne les nanodisques, développés en 2007 par S. Sligar *et al.*⁵¹, ceux-ci sont un premier pas vers un système composé uniquement de lipides et de protéines. Cependant, ceux-ci nécessitent des agents structurants tels que des protéines⁵¹ ou des polymères⁵². De plus, ces nanodisques permettent d'imiter une courte section des membranes cellulaires mais, ne permettent pas de simuler une paroi cellulaire complète séparant un milieu intérieur de l'environnement extérieur. Or il est nécessaire de posséder *in vitro* deux environnements séparés afin d'étudier les canaux transmembranaires et leur fonctionnement. En outre, les liposomes possèdent tous les avantages des nanodisques concernant le mimétisme de l'environnement natif des protéines membranaires mais, ceux-ci permettent également de créer une séparation physique entre deux milieux aqueux. C'est la raison pour laquelle ce sont ces systèmes qui ont été sélectionnés pour ce mémoire.

Les liposomes, décrits pour la première fois dans la littérature par A. Bangham *et al.*⁵³ sont des vésicules sphériques de bicouches phospholipidiques qui peuvent être classés en fonction de leur structure et de leur taille (Figure 7). Diverses classes de liposomes existent et sont recensées dans la littérature. Les vésicules oligolamellaires (*Oligo Lamellar Vesicles*,

OLV) et multilamellaires (*Multi Lamellar Vesicles*, MLV) sont composées de multiples membranes imbriquées les unes dans les autres. Ces deux familles de liposomes sont fortement employées en cosmétique et en médecine en tant que systèmes de relargage médicamenteux pouvant traiter divers pathologies et cancers.⁵⁴⁻⁵⁷ Toutefois, seuls les liposomes constitués d'une monocouche tel que les petites vésicules unilamellaires (*Small Unilamellar Vesicles*, SUV), les larges vésicules unilamellaires (*Large Unilamellar Vesicles*, LUV) et les géantes vésicules unilamellaires (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUV) sont intéressants pour ce travail. En effet, l'objectif n'est pas de simuler une bactérie à gram négatif possédant deux membranes lipidiques distinctes mais d'étudier le flux de cations Cu^{2+} engendré par la présence de PcoB dans les bicouches.

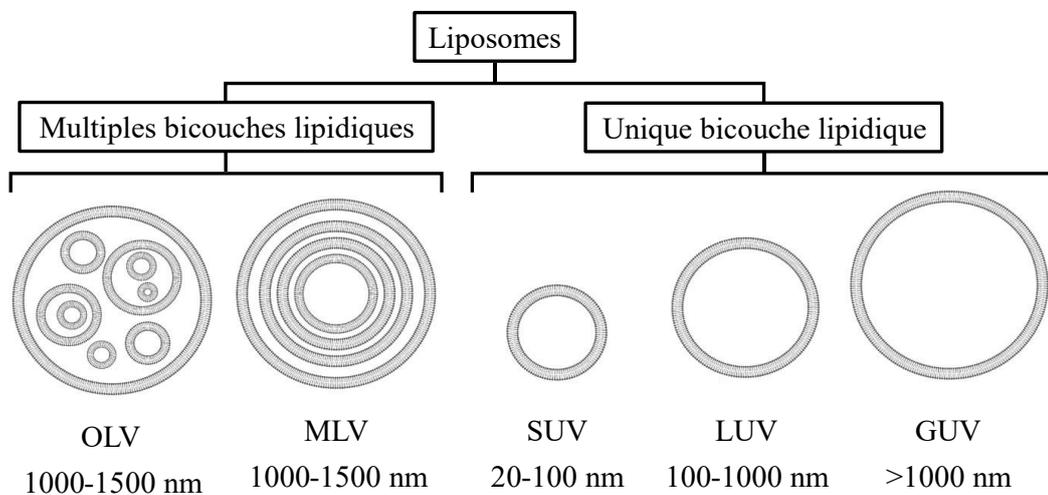


Figure 7 - Classification des différents types de liposomes

Les liposomes sont formés à partir de lipides amphiphiles, généralement des phospholipides. Étant donné leur dualité de caractère hydrophobe/hydrophile, les lipides s'auto-assemblent en solution aqueuse sous diverses formes et structures afin de se stabiliser. Diverses méthodes de formation des liposomes ont été développées depuis leur description par A. Bangham. La méthode la plus simple et la plus décrite est la méthode d'hydratation d'un film fin. Ces systèmes peuvent être formés à l'aide d'un ou de plusieurs lipides en fonction des applications désirées.^{58,59}

Les protéoliposomes (PL) sont des liposomes dans lesquels ont été insérés un ou plusieurs types de protéines membranaires. Ces systèmes peuvent être obtenus via différentes méthodes en fonction des protéines étudiées. La technique la plus décrite dans la littérature consiste en la déstabilisation de la membrane des liposomes préalablement formés par l'ajout d'un détergent afin de faciliter l'insertion de la protéine d'intérêt. Toutefois, il a été observé que

l'ajout du tensioactif n'était pas nécessaire pour l'insertion de toutes les protéines membranaires.⁶⁰⁻⁶² Ces PL permettent de stabiliser les protéines membranaires sous leur forme native tout en mimant au mieux leur environnement natif. De plus, la séparation physique engendrée par la bicouche du liposome permet de réellement simuler les conditions de fonctionnement des canaux protéiques et d'évaluer leurs activités de transport. C'est pourquoi ces systèmes sont fortement employés afin d'étudier des structures mais également afin de comprendre le fonctionnement de protéines transmembranaires.⁶³⁻⁶⁶

2. Objectifs et stratégie

2. Objectifs et stratégie

Ce travail vise à analyser la structure et comprendre le rôle de la protéine PcoB présente dans la membrane externe de *Caulobacter crescentus* et impliquée dans le mécanisme de détoxification du cuivre. L'hypothèse actuelle stipule que PcoB permettrait l'exportation des cations Cu^{2+} hors des cellules. Afin de vérifier celle-ci, un système de relargage du cuivre sera mis au point *in vitro* en insérant PcoB dans la bicouche d'un liposome (Figure 8).

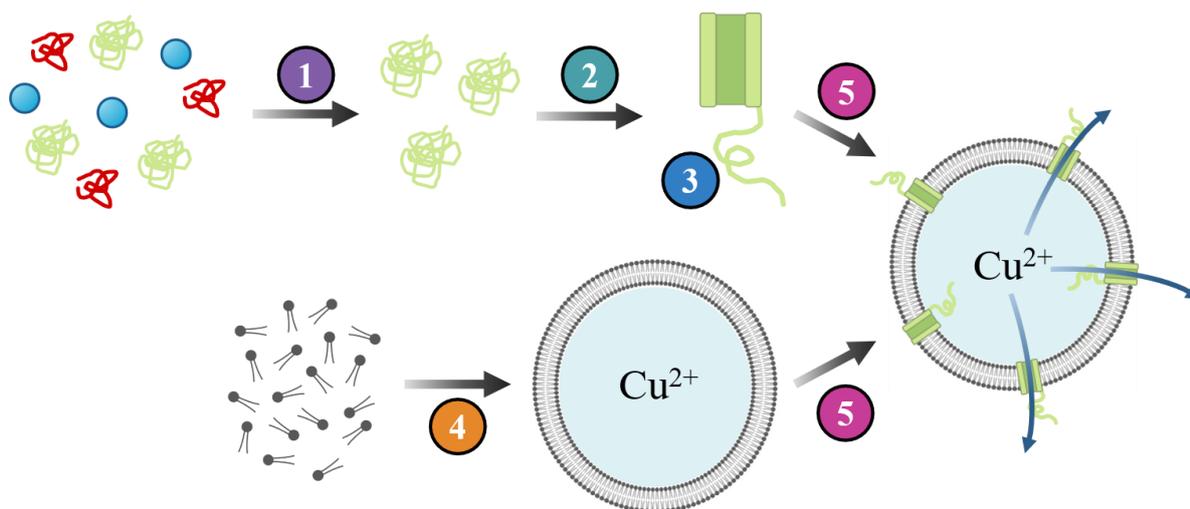


Figure 8 – Représentation schématique de la stratégie de ce travail.

La première étape de ce travail consistera en la production de la protéine *via* une surexpression hétérologue chez *Escherichia coli*. Comme pour la plupart des protéines membranaires surexprimées dans cette bactérie, PcoB sera obtenue sous forme de corps d'inclusion qui seront solubilisés et purifiés en conditions dénaturantes *via* une chromatographie d'affinité sur base des propriétés intrinsèques de PcoB (1). La protéine sera ensuite repliée par la méthode SDS-MPD afin de récupérer sa structure native et par conséquent, sa fonction (2). Le bon déroulement de la purification ainsi que du repliement seront vérifiés par diverses techniques telles que l'électrophorèse (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), la spectroscopie UV-visible, la fluorescence intrinsèque des tyrosines et des tryptophanes (*Intrinsic Tyrosine and Tryptophan Fluorescence*, ITTF) et le dichroïsme circulaire (*Circular Dichroism*, CD). La sélectivité et la force d'interaction de PcoB pour les ions Cu^{2+} seront évaluées *via* des mesures d'ITTF (3).

En parallèle, la formation de liposomes SUV et LUV dont la composition lipidique est POPG/CL 95/5 sera réalisée afin de mimer au mieux la membrane externe de *C. crescentus*, l'environnement natif de PcoB (4). Des mesures de diffusion dynamique de la lumière

(*Dynamic Light Scattering*, DLS) seront réalisées afin de confirmer la formation de ces structures, d'obtenir leur diamètre hydrodynamique moyen et d'estimer leur stabilité dans le temps. De plus, des images en microscopie électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) seront obtenues afin de confirmer les résultats obtenus en DLS et permettront également de vérifier l'unilamellarité des liposomes.

Une fois la protéine et les liposomes obtenus, l'insertion de PcoB dans les membranes lipidiques pourra être réalisée afin d'obtenir des protéoliposomes (5). La taille de ces systèmes et leur stabilité dans le temps seront déterminées par DLS et le repliement de PcoB sera évalué par mesures CD. Des images de TEM permettront d'observer la protéine insérée dans la membrane.⁶⁷

Pour finir, ce système sera employé afin d'évaluer le flux en Cu^{2+} entrant et/ou sortant des vésicules et ainsi obtenir les premières informations sur le fonctionnement de PcoB (5). Afin de pouvoir incorporer du cuivre dans les liposomes, une étude de la stabilité des cations Cu^{2+} en solution tamponnée à pH physiologique sera investiguée.

En parallèle de ces analyses expérimentales, une étude bio-informatique de PcoB sur base des informations disponibles dans la littérature sera réalisée afin d'obtenir des informations sur sa topologie en membrane et sur sa structure tridimensionnelle (3D).

A long terme, ce travail a pour objectif d'élargir les connaissances concernant les mécanismes d'homéostasie au cuivre dans l'optique de développer des agents capables de bloquer ces systèmes.

3. Résultats

3. Résultats et discussion

3.1. Analyses bio-informatiques

En raison de son caractère membranaire, la caractérisation structurale de la protéine PcoB de *C. crescentus* est complexe ce qui explique le peu d'informations la concernant dans la littérature. Seule sa séquence en acides aminés (UniProtKB - A0A0H3C699), connue depuis 2010, est disponible.⁶⁸ Par ailleurs, la partie carboxy-terminale (C-terminale) de PcoB de *E. coli* a récemment été cristallisée (code PDB : 7PGE, Juin 2022).⁶⁹ A l'aide de ces deux informations, il est possible de réaliser diverses prédictions et analyses structurales par le biais de multiples outils bio-informatiques. Cela permet par exemple de prédire sa structure 3D, de déterminer son caractère désordonné, son orientation dans la membrane externe de *C. crescentus* ou encore de localiser ses divers domaines.³⁹

Dans un premier temps, la structure 3D de PcoB provenant de *C. crescentus* a été prédite à l'aide de la méthode de modélisation par homologie⁷⁰ en se basant sur l'homologue structural disponible dans la PDB (39.5 % d'identité et 65.8 % d'homologie de séquence avec PcoB de *E. coli*⁶⁹) (Figure 9 A-A'). Étant donné l'absence d'homologue pour la partie aminoterminal (N-terminale), celle-ci n'a pu être modélisée par cette méthode. Les modélisations par enfilage⁷¹ (Figure 9 B-B') et *ab initio*⁷² (Figure 9 C-C') ont donc été réalisées afin d'obtenir une structure complète.

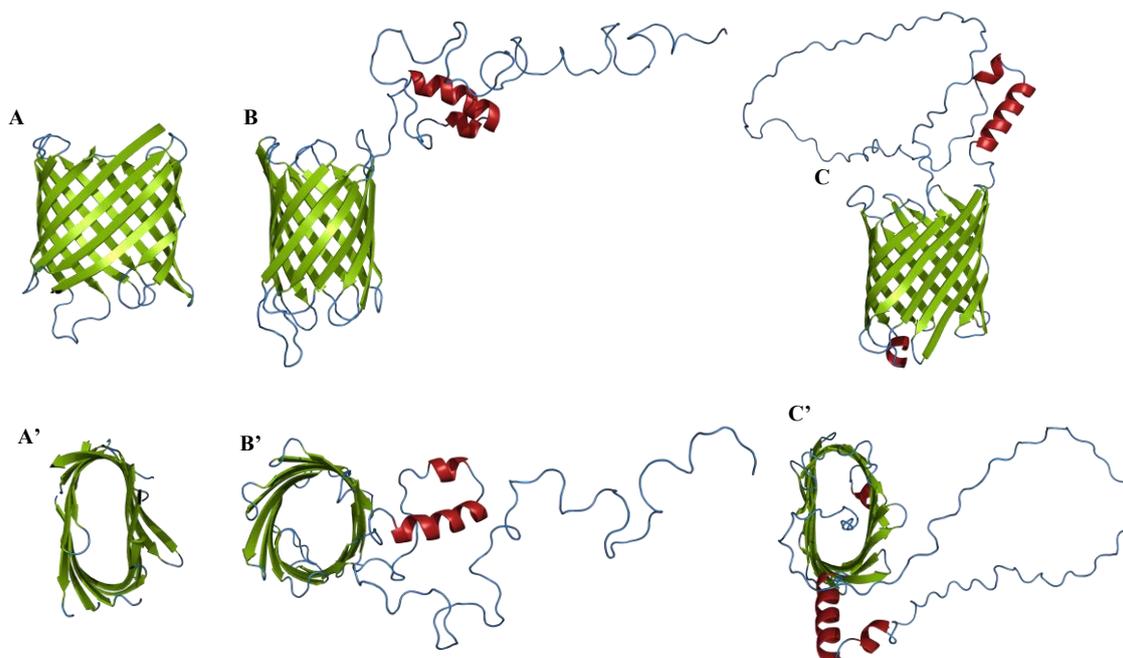


Figure 9 – Vues de côté (X) et du dessus (X') de la structure tridimensionnelle de PcoB prédite (A) via modélisation par homologie sur base de PcoB de chez *E. coli* (code PDB : 7PGE), (B) via modélisation par enfilage et (C) via modélisation *ab initio*. Les feuilletés β sont représentés en vert, les hélices α en rouge et les structures désordonnées/turns en bleu.

Les trois modèles révèlent la présence d'un tonneau β composé de 12 feuillets β antiparallèles en position C-terminale, représentant environ les deux tiers de la séquence. Cependant, la forme du tonneau prédite par homologie et *ab initio* est ovale et aplatie alors que celle obtenue par enfilage est circulaire. Cette déformation est également observée chez l'homologue structural provenant d'*E. coli* et serait expliqué par des interactions ioniques à l'intérieur de ce tonneau ce qui rapprocherait légèrement les deux côtés opposés.⁶⁹ Un phénomène similaire aurait alors lieu chez PcoB provenant de *C. crescentus*. En ce qui concerne la partie N-terminale d'environ 100 résidus, les deux modèles obtenus par les méthodes d'enfilage et *ab initio* ne donnent aucune structure particulière mise à part une hélice α d'environ 14 résidus.

Les diagrammes de Ramachandran de chacun des modèles (Figure 10) montrent respectivement 94, 90 et 92 % des résidus étant dans des régions autorisées pour le modèle obtenu par homologie (A), par enfilage (B) et par *ab initio* (C). Cela signifie que les modèles sont plausibles et que les acides aminés pourraient s'organiser comme les prédictions des modèles sans engendrer des tensions ou des liaisons défavorables.

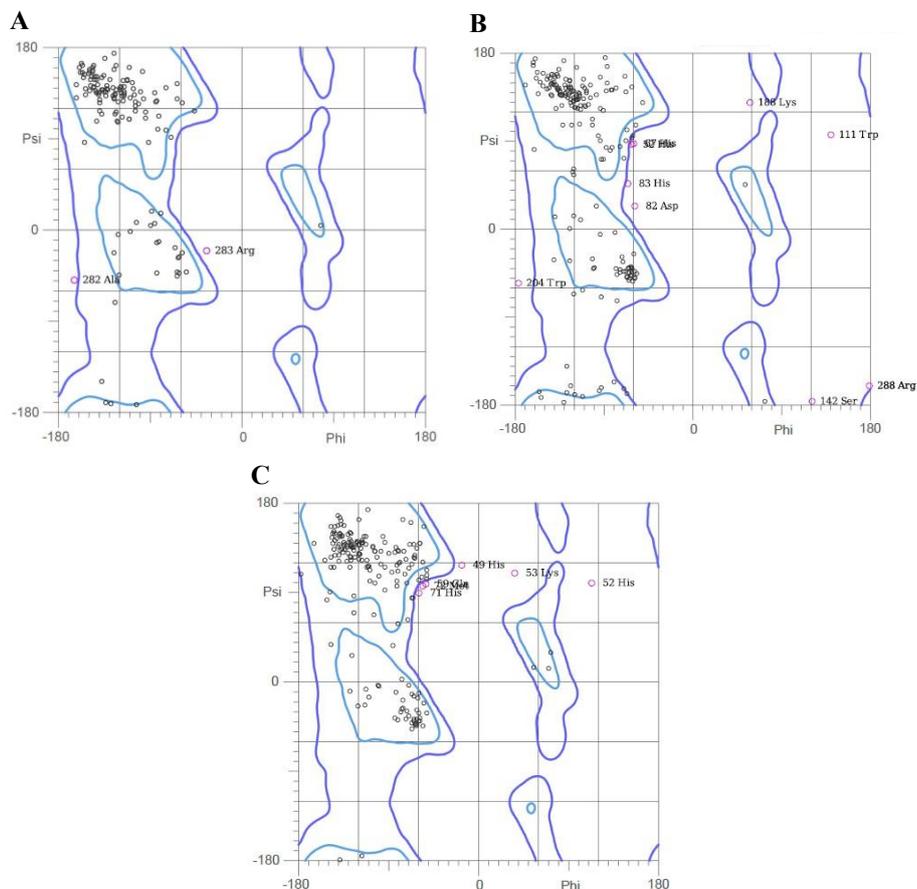


Figure 10 – Diagrammes de Ramachandran associés aux structures de PcoB prédites (A) par homologie sur base de la protéine PcoB de chez *E. coli* (code PDB : 7PGE), (B) via modélisation par enfilage et (C) via modélisation *ab initio*.

Par ailleurs, le programme NetSurfP-3.0 permet de quantifier les différents types de structures secondaires.⁷³ Sur base de la Figure 11, la séquence posséderait environ 5 % d'hélices α , 42 % de feuillets β , 32 % de désordre et 21% de *turns*. La chaîne N-terminale, représentant plus de 30 % de la séquence, est prédite comme étant majoritairement désordonnée ce qui suggère que PcoB serait une protéine intrinsèquement désordonnée (*Intrinsically Disordered Proteins*, IDP).

En effet, les IDP sont des protéines possédant de multiples conformations 3D possibles. Afin de faire partie de cette catégorie, il est nécessaire pour une protéine de posséder au moins 30 % de la totalité de sa séquence comme étant identifiée structure désordonnée et de posséder une région intrinsèquement désordonnée (*Intrinsically Disordered Region*, IDR) de minimum 30 acides aminés successifs.⁷⁴

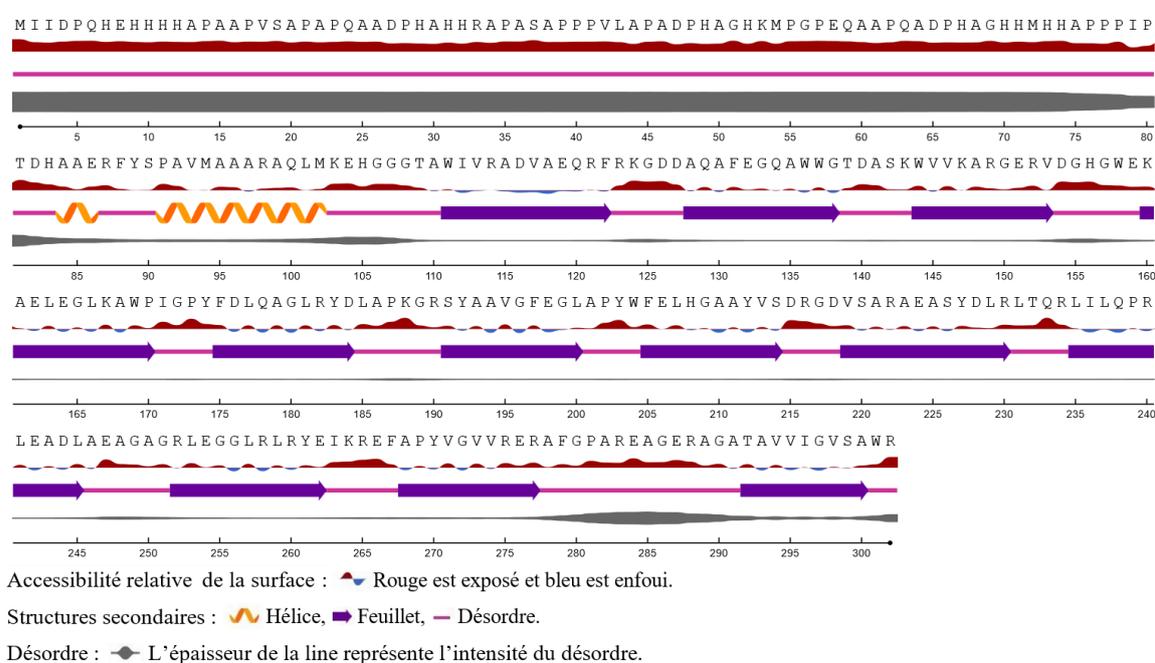


Figure 11 – Prédiction des structures secondaires de PcoB obtenues *via* le logiciel NetSurfP-3.0.

Afin de confirmer cette information, le désordre moléculaire de la séquence a été évalué par plusieurs algorithmes (Figure 12).⁷⁵ Les trois méthodes de prédiction indiquent un désordre total (score de désordre d'environ 1) pour les 90 premiers résidus de la séquence, ce qui confirme le caractère intrinsèquement désordonné de PcoB.

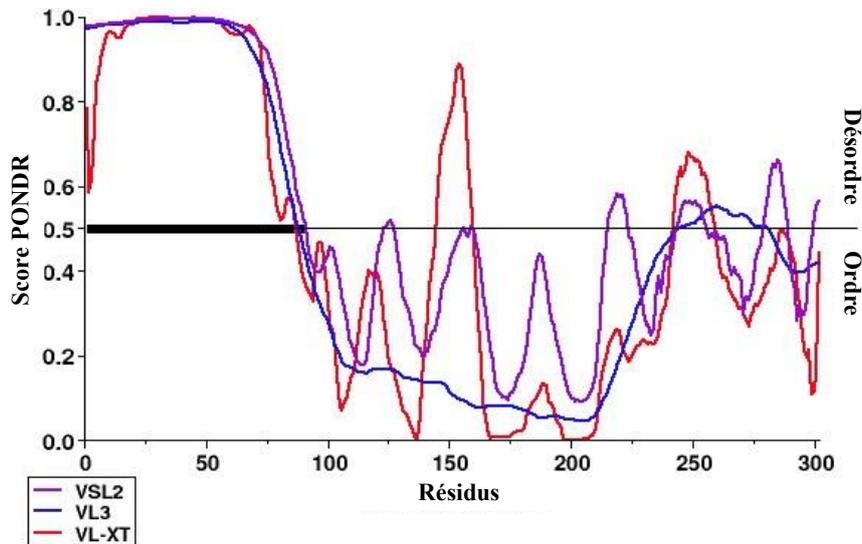


Figure 12 – Profils de prédiction du désordre interne de la protéine PcoB estimés via les méthodes VSL2 (violet), VL3 (bleu) et VL-TX (rouge).

Finalement, une analyse topologique de PcoB⁷⁶ révèle que les 12 feuilletts β sont bien transmembranaires et semble également indiquer que la chaîne N-terminale désordonnée serait située du côté du périplasma (Figure 13).

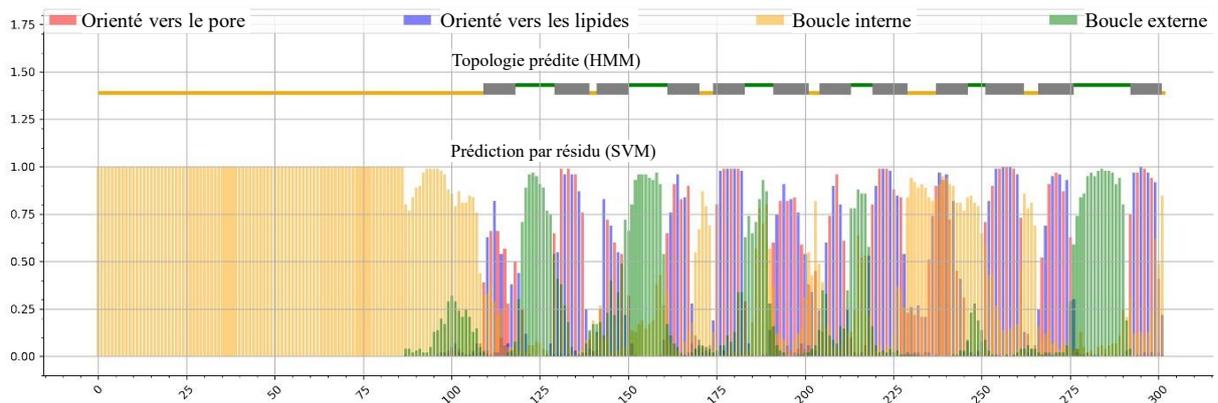


Figure 13 – Localisation des différentes structures secondaires par rapport à la membrane externe de *C. crescentus*.

Cette chaîne, composée de 108 acides aminés, possède 15 résidus d’histidines (His) qui sont connus pour avoir une forte affinité avec les cations Cu^{2+} (Figure 14).^{77,78} En effet, les acides aminés majoritairement impliqués dans la formation de liaisons et de complexes avec les Cu^{2+} sont les histidines, les aspartates, les glutamates et les tryptophanes.⁷⁷

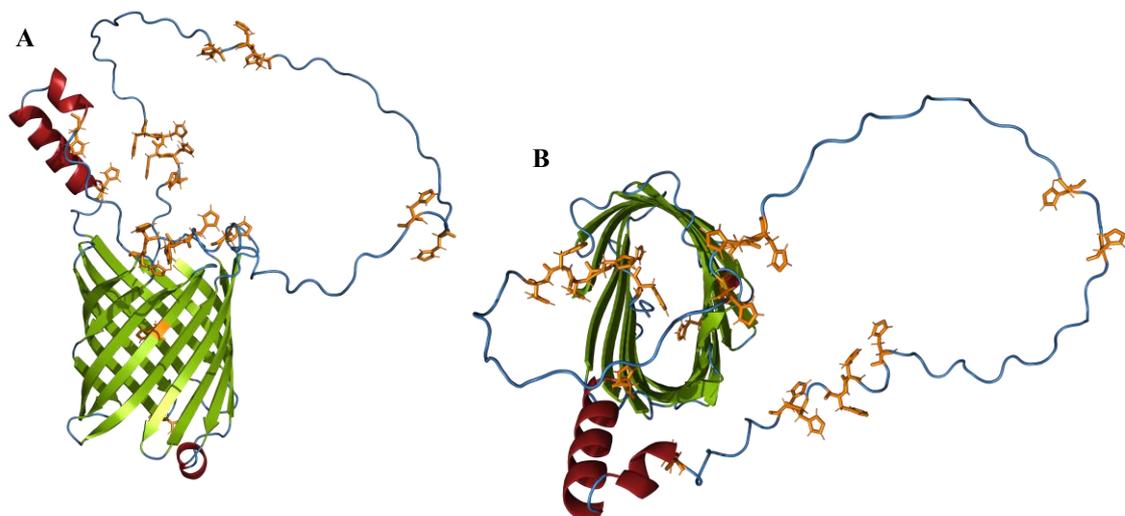


Figure 14 – Vue (A) de côté et (B) du dessus du modèle 3D de PcoB (tonneau β en vert et hélice α en rouge) avec la chaîne désordonnée (bleu) riche en résidus His (orange).

Au vu de l'ensemble de ces données, l'hypothèse du mécanisme de fonctionnement de PcoB serait que la chaîne N-terminale désordonnée et riche en His permettrait la capture des cations Cu^{2+} au sein du périplasma et cette chaîne subirait ensuite un repliement afin de former une poche augmentant localement la concentration en cations métalliques et permettant leur expulsion passive hors de la bactérie.

3.2. Surexpression de PcoB chez *E. coli*

3.2.1. Principe

La surexpression est une méthode de biologie moléculaire qui consiste à exprimer massivement un gène codant pour une protéine d'intérêt dans l'optique de produire, par après, une grande quantité de cette dernière. La surexpression de PcoB est réalisée à partir d'une souche bactérienne *E. coli* BL21(DE3) transformée contenant un vecteur *pET24b* modifié et permettant l'expression de protéines recombinantes. Ce dernier contient un gène codant pour PcoB. De plus, le plasmide contient un gène de résistance à un antibiotique, la kanamycine (Kana). La culture bactérienne est donc réalisée dans un milieu nutritif nommé LB (*lysogeny broth*) auquel est ajouté 0.03 mg/mL de Kana afin d'éviter la croissance de bactéries non désirées. Le principe de cette manipulation consiste à faire croître la population bactérienne et à induire la production de la protéine d'intérêt au moment où la bactérie est dans sa phase de croissance exponentielle (phase C, Figure 15).

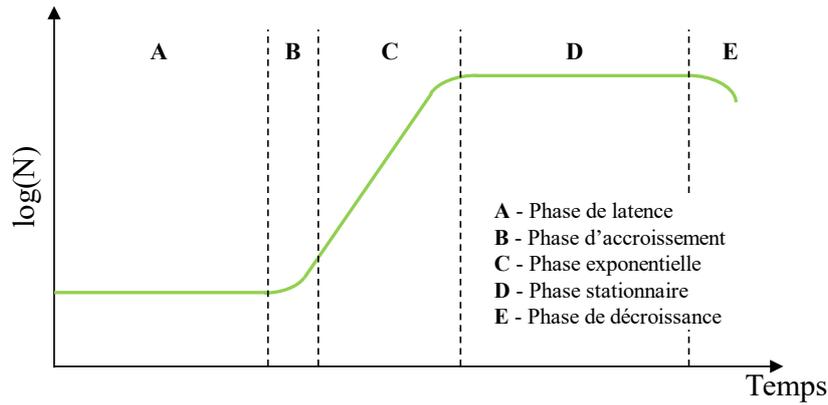


Figure 15 - Évolution du nombre de bactéries N en fonction du temps lors d'une culture bactérienne.⁷⁹

La phase de latence **A** correspond au moment où la souche se réveille, celle-ci prépare les conditions favorables à la suite de l'évolution. Il s'en suit la phase d'accroissement **B** qui consiste au démarrage de la croissance et puis, arrive la phase exponentielle **C** qui correspond au moment où l'augmentation de la population bactérienne est la plus importante. Quand le milieu s'appauvrit en nutriments, la population commence à stagner et le système rentre dans la phase stationnaire **D**. Finalement, lorsque le système ne contient plus assez de nutriments, une autolyse des bactéries est observée et marque le début de la phase de décroissance **E**.

Lors d'une surexpression bactérienne, la croissance des bactéries est suivie par une mesure de la densité optique (D.O.) à 600 nm, évaluant la turbidité du milieu. L'induction par l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) est réalisée lors de la phase exponentielle, c'est-à-dire quand cette D.O. à 600 nm se trouve entre 0.6 et 0.8. Le principe général de cette induction est décrit par la Figure 16.

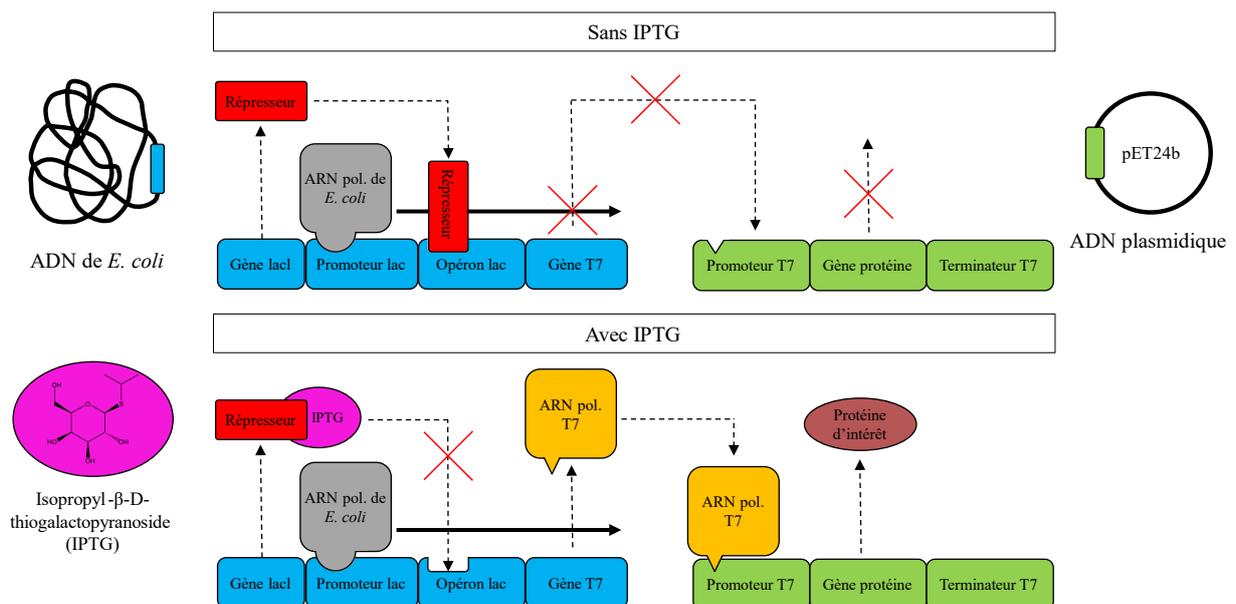


Figure 16 – Schéma du mécanisme d'induction de l'expression d'une protéine d'intérêt par l'IPTG.⁸⁰

L'IPTG est un sucre de la famille des pyranoses possédant une fonction thioéther et un analogue de l'allolactose, un métabolite du lactose activant la transcription de l'opéron lac. Lors de l'ajout d'IPTG dans un milieu de culture, celui-ci va se lier au répresseur lac *via* une multitude de ponts H. Cette liaison va empêcher la formation du complexe répresseur lac-opéron lac. L'acide ribonucléique (ARN) polymérase de *E. coli* va donc continuer sa transcription sans être stoppée par le complexe. Le gène T7 sera alors transcrit et l'ARN polymérase T7 va être produite. Cette dernière possède un site de reconnaissance du promoteur T7 qui va lui permettre de s'y attacher et de débiter la transcription du gène d'intérêt (présent dans l'ADN plasmidique).

3.2.2. Résultats

Afin de suivre la quantité de protéine produite à chaque étape, un gel SDS-PAGE est réalisé avec les divers échantillons prélevés lors de la surexpression (Figure 17). Cette technique a pour objectif de séparer les différentes protéines présentes dans un échantillon sur base de leur masse moléculaire. Pour ce faire, les échantillons sont mélangés avec du tampon de charge (contenant du SDS et du β -mercaptoéthanol) ce qui a pour but de totalement dénaturer les protéines et de leur attribuer à toutes une charge nette négative. Ce mélange est ensuite déposé sur un gel de polymère possédant un certain pourcentage de réticulation. Une différence de potentiel est ensuite appliquée aux deux extrémités de ce dernier avec la borne positive située en bas afin de faire migrer les protéines chargées négativement.

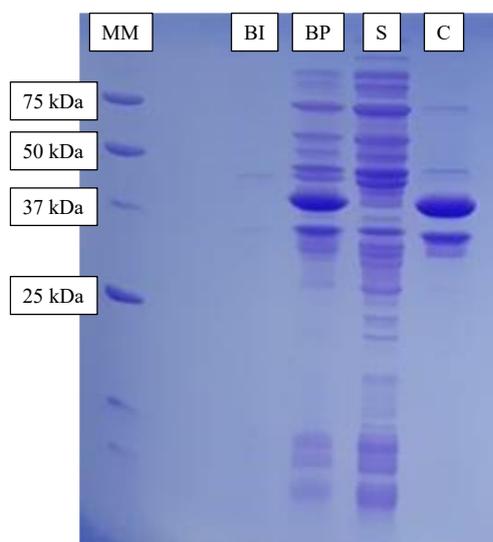


Figure 17 – Gel SDS-PAGE de suivi de surexpression avec MM étant le marqueur de masse moléculaire, BI étant l'échantillon avant induction, BP étant l'échantillon après induction à l'IPTG, S étant le surchargeant et C le culot de l'échantillon après la lyse bactérienne.

Le premier puits contient le marqueur de masse moléculaire qui est composé d'un mélange de protéine de masses connues. Celui-ci permet d'évaluer la migration et de prévoir la masse approximative associée à chaque bande. Le second puits (BI), contenant un échantillon prélevé dans le milieu de culture avant l'induction à l'IPTG, ne contient pas de PcoB. Cela est normal étant donné que la protéine n'est pas encore produite par les bactéries. Dans le puits correspondant à la fraction avant purification (BP), une large bande de forte intensité à environ 37 kDa est constatée, correspondant à la protéine PcoB. L'induction a donc permis de produire la protéine d'intérêt en grande quantité. Les deux derniers puits contenant les échantillons prélevés dans le tube après la lyse bactérienne permettent de constater que la majorité de PcoB se trouve agrégée sous forme de CI dans le culot (C).

3.3. Purification de PcoB en conditions dénaturantes

Malgré l'étape de lavage par centrifugation réalisée après la surexpression, le culot contient tout de même des protéines contaminantes et des débris cellulaires produits par *E. coli*. Afin de désassembler les agrégats de PcoB dénaturée, les CI sont solubilisés avec du tampon contenant 1 % de SDS (détergent anionique). Une chromatographie d'affinité en conditions dénaturantes (0.1 % de SDS dans les tampons) est alors réalisée afin d'isoler PcoB. Cette unique étape de purification est possible sans étiquette (ou tag) de purification grâce aux propriétés intrinsèques de PcoB, c'est-à-dire grâce à sa chaîne N-terminale désordonnée riche en histidines capables de complexer des cations divalents métalliques. La colonne employée contient donc un métal immobilisé sur une matrice (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC).

3.3.1. Principe

La chromatographie IMAC est composée de deux parties principales : une phase stationnaire/matrice immobile (dans notre cas un polymère d'agarose) possédant des agents chélatants qui sont fortement liés à un métal et une phase mobile formée par les tampons et/ou l'échantillon à purifier. Ce type de colonne permet en général de purifier des protéines contenant une étiquette poly-histidine (His-tag) puisque celle-ci possède une grande affinité pour le métal attaché à la colonne. Lors du passage au travers de la matrice, les His sont complexées par le métal ce qui va retenir la protéine d'intérêt dans la colonne et laisser passer les impuretés ainsi que les protéines non souhaitées dans le *flow-through* (FT). Afin de récupérer la protéine d'intérêt, l'élution est réalisée avec un tampon contenant une

concentration élevée en imidazole qui va rentrer en compétition avec les histidines complexées.

3.3.2. Résultats de la purification

Deux colonnes IMAC différentes ont été testées : une première ayant été chélatée au Ni^{2+} (généralement employé dans la littérature afin de lier les histidines⁸¹) et une seconde contenant du Cu^{2+} puisque PcoB est supposée lier ce cation divalent. Dans les deux cas, la protéine s'est bien attachée aux colonnes employées ce qui prouve qu'elle peut bel et bien avoir des interactions avec ces cations. Cependant, après analyse SDS-PAGE des fractions purifiées, celles récoltées avec la colonne au Ni^{2+} étaient plus pures, c'est donc ce métal qui a été conservé. Cela peut s'expliquer par une interaction des autres protéines de *E. coli* plus forte pour le Cu^{2+} que pour le Ni^{2+} . Le chromatogramme de la purification de PcoB par IMAC chélatée au Ni^{2+} est illustré à la Figure 18.

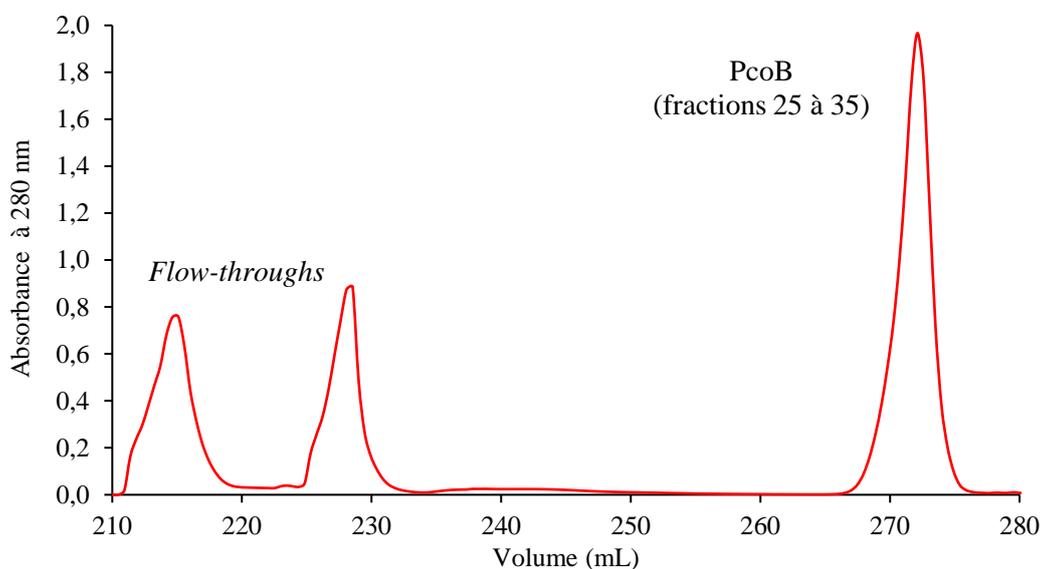


Figure 18 - Chromatogramme de la purification par IMAC de PcoB non-taguée.

L'échantillon protéique a été injecté en deux fois sur la colonne, ce qui induit que les deux premières bandes d'absorbance observées correspondent aux FT de ces deux injections. Par conséquent, ils correspondent aux protéines absorbant à 280 nm mais ne possédant pas d'affinité pour la colonne. Une fois l'élution des protéines non désirées terminée, le tampon d'élution contenant l'imidazole est injecté. Une troisième bande d'absorbance est alors observée et cette dernière correspond aux protéines ayant été complexées par les ions Ni^{2+} , dont à PcoB. Les 10 fractions contenant la protéine d'intérêt après purification ont été récupérées en sortie de colonne et analysées *via* SDS-PAGE.

3.3.3. Électrophorèse SDS-PAGE

Afin d'évaluer la pureté des fractions collectées après la purification par IMAC, une électrophorèse SDS-PAGE est réalisée (Figure 19).

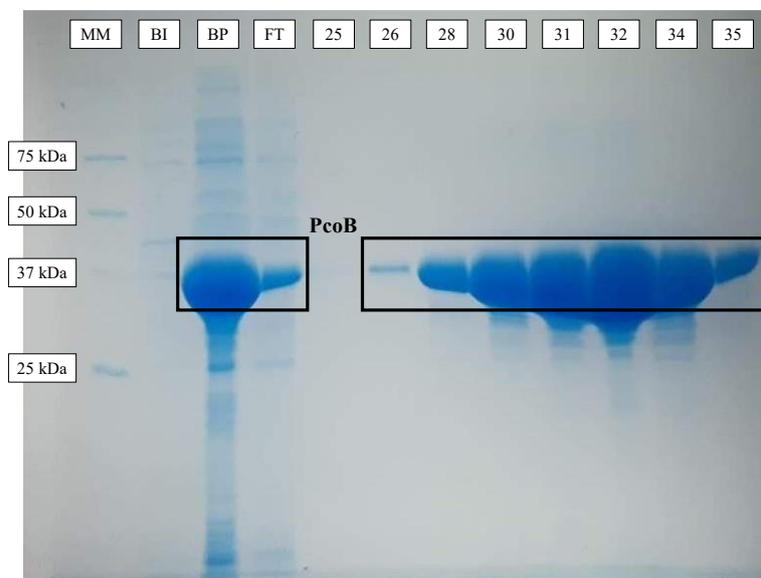


Figure 19 - Gel SDS-PAGE des fractions récoltées après IMAC avec MM étant le marqueur de masse moléculaire, BI étant la fraction avant induction, BP étant la fraction avant purification, FT étant les *flow through* et 25 à 35 correspondant aux fractions récoltées.

Le premier puits contient le marqueur de masse moléculaire comme mentionné précédemment. La présence d'une bande associée à PcoB dans le quatrième puits (FT) est due à une surcharge de la colonne, elle-même entraînée par la forte concentration protéique dans l'échantillon à purifier. Une très large bande est observée à environ 37 kDa dans les puits 26 à 35 contenant les fractions récoltées après l'IMAC. Des bandes résiduelles sont également observées à des masses plus petites, correspondant à des impuretés. Néanmoins, leur quantité est négligeable par rapport à celle de PcoB, ce qui permet d'affirmer que la plupart des impuretés présentes au-dessus et en dessous de la bande associée à PcoB ont pu être éliminées.

3.4. Dosage protéique

Après analyse par SDS-PAGE, les fractions récoltées en sortie de purification sont rassemblées et, après un passage au travers d'une colonne de dessalage afin d'éliminer l'imidazole et les sels de la solution, la concentration protéique est évaluée par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-visible). La concentration en PcoB après IMAC est d'environ ~ 2.5 mg/mL ($76.5 \mu\text{M}$) pour 10 mL de fractions récoltées, correspondant à un rendement d'environ 8.3 mg pour 100 mL de culture. Cela représente un très bon rendement, surtout pour une protéine membranaire car en moyenne, une surexpression protéique possède un rendement compris entre 0.01 et 0.5 mg pour 100 mL de culture.^{35,36}

3.5. Renaturation de PcoB

Après purification, l'échantillon protéique obtenu contient PcoB sous forme dénaturée et inactive. Il est donc nécessaire de passer par une étape de renaturation afin de replier la structure protéique et récupérer sa fonction. La méthode employée est celle développée par C. Michaux et optimisée dans le laboratoire du CPB.^{39,41-43,82,83} Pour éviter de devoir ajouter un trop grand volume de protéine lors de la renaturation, une étape de reconcentration a parfois été réalisée après certaines purifications par utilisation de polyéthylène glycol linéaire de masse molaire 20000 g/mol (PEG 20000).

3.5.1. Principe

La méthode de renaturation choisie se base sur l'association d'un détergent anionique, le SDS, et d'un co-solvant, le MPD. Les conditions optimales sont 3 mM SDS et 1.5 M MPD dans la solution finale. Il est important de noter que le MPD possède un carbone asymétrique. Des analyses préliminaires ont montré que l'utilisation de l'énantiomère R, du S ou du mélange racémique n'influence pas la méthode. Le mélange racémique est donc employé dans ce travail, celui-ci étant moins onéreux.

Des analyses *via* ITTF et CD permettent alors de suivre le repliement de PcoB. Dans un premier temps, des analyses ITTF sont réalisées afin d'observer la variation d'émission entre un échantillon de protéine dénaturée et repliée. En effet, en fonction de l'accessibilité du solvant aux acides aminés aromatiques (principalement tyrosines et tryptophanes), la position et l'intensité de la bande d'émission sont susceptibles de varier. Cela permet d'obtenir des informations concernant la structure tertiaire locale ainsi que l'exposition au solvant, et par conséquent d'évaluer l'avancement de la renaturation.

En outre, des informations sur la structure secondaire de PcoB peuvent être obtenues par des mesures de CD. Pour ce faire, un rayon formé d'un faisceau de lumière circulairement polarisée droite et gauche est envoyé sur l'échantillon. En fonction de la nature et la chiralité de ce dernier, une différence d'absorption des lumières polarisées circulairement va apparaître. L'angle formé par la résultante après absorption partielle et par les faisceaux initiaux sera mesuré en fonction de la longueur d'onde. Des spectres caractéristiques à chaque type de structure secondaire seront alors obtenus. En effet, les trois grandes catégories de structures secondaires (hélices α , feuillets β et structures aléatoires) possèdent chacune des allures typiques en CD (Figure 20). Le spectre associé aux hélices α possède deux minimas (208 et 222 nm) ainsi qu'un maximum à 193 nm. Les feuillets β , quant à eux, possèdent un

large minimum à environ 218 nm et un maximum à 195 nm. Concernant la signature des structures désordonnées/aléatoires, elle montre un minimum vers 195 nm et un signal très faible au-dessus de 210 nm.⁸⁴ Lorsque la lumière employée est située dans l'UV lointain (190-260 nm), ce sont principalement les liaisons peptidiques qui absorbent, ce qui permet d'évaluer les structures secondaires des protéines alors que des mesures dans l'UV proche (260-320 nm) peuvent révéler des informations concernant les acides aminés aromatiques et par conséquent sur la structure tertiaire de la protéine.

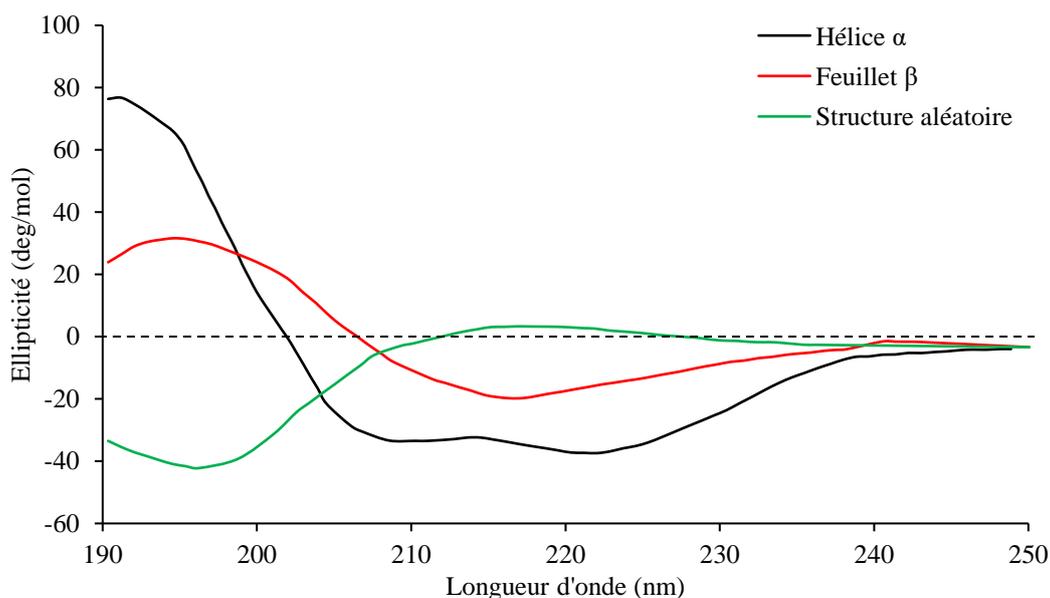


Figure 20 – Spectres CD (UV lointain) caractéristiques des trois grands types de structures secondaires : hélices α (noir), feuillets β (rouge) et structures aléatoires/désordonnées (vert).⁸⁴

3.5.2. Résultats

Des spectres ITTF ont été réalisés avec des échantillons de PcoB dénaturée et repliée afin d'évaluer les effets de la méthode SDS-MPD (Figure 21). Aucune modification de la longueur d'onde de la bande d'émission n'est observée lors de la renaturation. Cependant, à concentrations et réglages expérimentaux identiques, une augmentation de l'intensité de fluorescence des acides aminés aromatiques apparaît. Le repliement de la protéine va limiter l'accès du solvant aux Tyr et aux Trp ce qui va engendrer une modification du spectre d'émission. L'effet désactivant du solvant est donc diminué par le changement conformationnel.

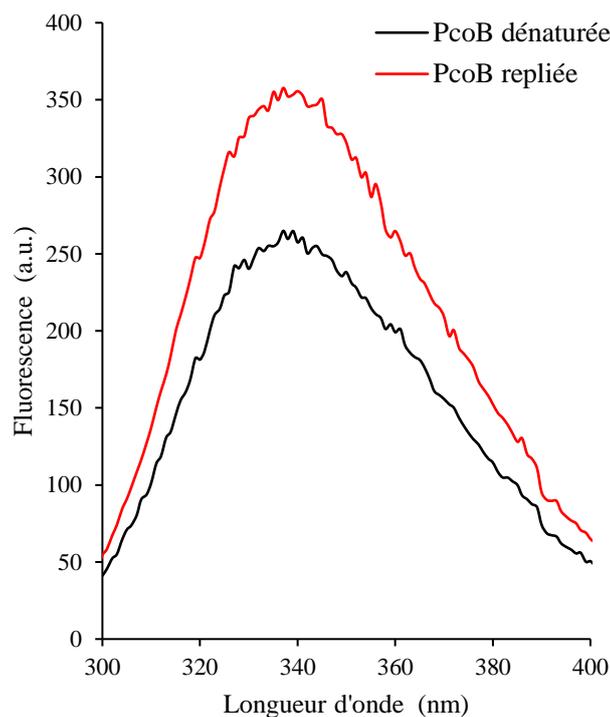


Figure 21 – Spectre de fluorescence intrinsèque des tyrosines et des tryptophanes (u.a.) d'un échantillon de PcoB dénaturée (noir) et repliée (rouge) en fonction de la longueur d'onde d'émission (nm). L'excitation des acides aminés aromatiques est réalisée à 280 nm et le *slit width* employé est 5 nm.

Par la suite, des analyses CD ont été réalisées sur ces mêmes échantillons de PcoB dénaturée et repliée (Figure 22).

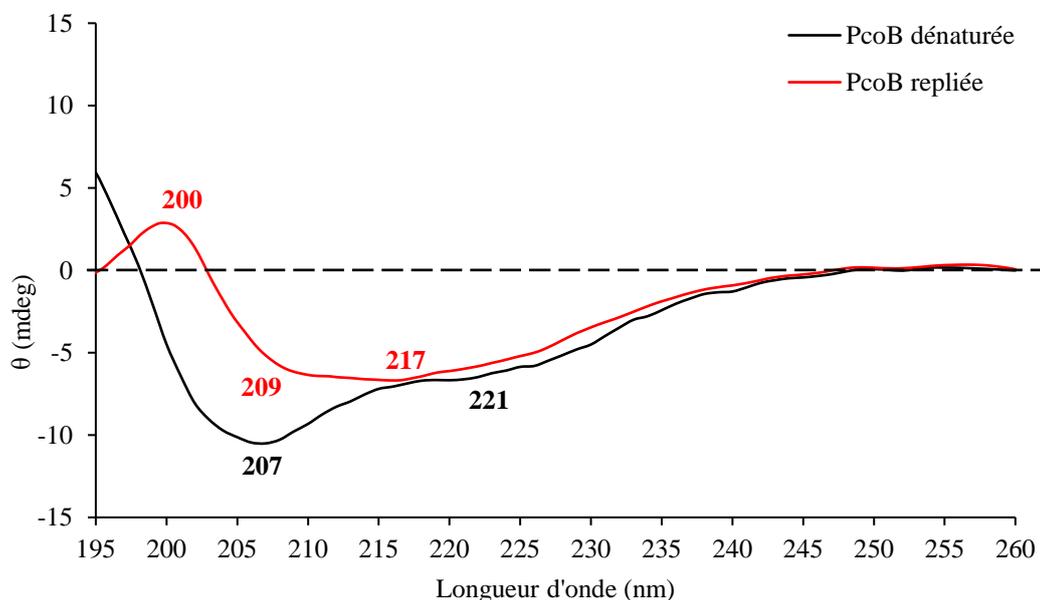


Figure 22 – Spectres CD (UV lointain) de PcoB 0.1 mg/mL dénaturée (noir) et repliée (rouge).

La courbe associée à la protéine dénaturée possède un minimum à 207 nm ainsi qu'un second, plus faible, à 221 nm. Cette allure est typique des protéines solubilisées dans du SDS, correspondant à un mélange d'hélices α et de désordre.⁴¹ La seconde courbe possède un

maximum à 200 nm, un petit minimum à 209 nm associé à une hélice α et un large à environ 217 nm ce qui est représentatif de feuillets β . Un changement conformationnel est donc observé après renaturation et un signal qui est en accord avec la structure prédite de PcoB. En outre, la signature est similaire à celle référencée dans la littérature pour PcoB native surexprimée chez *C. crescentus*, ce qui indique que le repliement a bien eu lieu.³⁹

3.6. Étude de la liaison entre PcoB et certains cations métalliques

3.6.1. Analyse de la liaison de PcoB avec le Cu^{2+}

Pour appuyer l'hypothèse selon laquelle PcoB lierait les ions Cu^{2+} , l'ITTF de la protéine repliée est comparée à celle en présence de concentrations croissantes en Cu^{2+} . Ces analyses permettent d'évaluer si des changements dans la structure apparaissent lors de la liaison au Cu^{2+} (Figure 23).

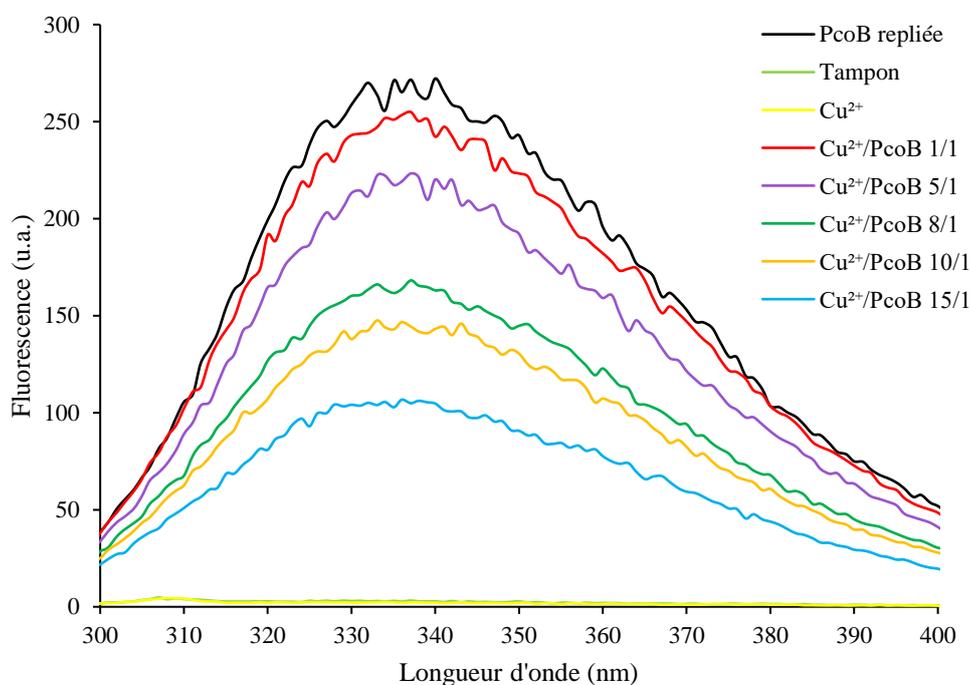


Figure 23 – Spectres de fluorescence intrinsèque des tyrosines et des tryptophanes (u.a.) de PcoB repliée avec des rapports croissants en Cu^{2+} en fonction de la longueur d'onde d'émission (nm). L'excitation des acides aminés aromatiques est réalisée à 280 nm et le *slit width* employé est 5 nm.

La solution tampon et celle de Cu^{2+} en absence de protéine n'émettent aucun signal fluorescent. Cela est logique et permet de s'assurer que les résultats obtenus dépendent uniquement de la fluorescence des acides aminés de la protéine. Par ailleurs, une diminution de l'intensité de la bande de fluorescence quand le rapport $\text{Cu}^{2+}/\text{PcoB}$ augmente est observée. Cette évolution s'explique probablement par une modification de la partie C-terminale de la structure de PcoB lors de la complexation des Cu^{2+} . Il s'avère en effet que les acides aminés aromatiques (responsables de l'émission de fluorescence) sont principalement positionnés à

l'intérieur et aux extrémités du tonneau et que seules une phénylalanine (Phe) et une tyrosine (Tyr) sont présentes dans la chaîne désordonnée (Figure 24). Les spectres ITTF ne donnent donc des informations que sur l'environnement du tonneau mais rien concernant la chaîne N-terminale et ses histidines.

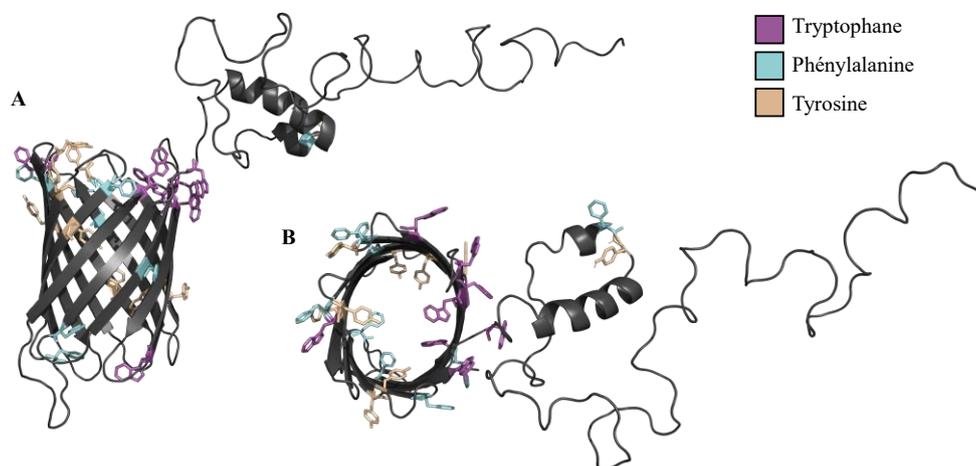


Figure 24 – Vue (A) de côté et (B) du haut du modèle tridimensionnel de PcoB avec les localisations des trois types d'acides aminés aromatiques mises en évidence.

Au sein des protéines, les cations Cu^{2+} sont généralement stabilisés par deux grandes classes d'interactions : des interactions π -cation avec des acides aminés aromatiques tels que les tryptophanes, les phénylalanines et les tyrosines ou des liaisons acide-base de Lewis avec des résidus tels que les histidines, les glutamates, les aspartates mais également avec les méthionines et les cystéines (Figure 25). Les complexes de Cu^{2+} sont majoritairement tétraogonaux alors que ceux formés avec le Cu^+ sont trigonaux plan.⁷⁷

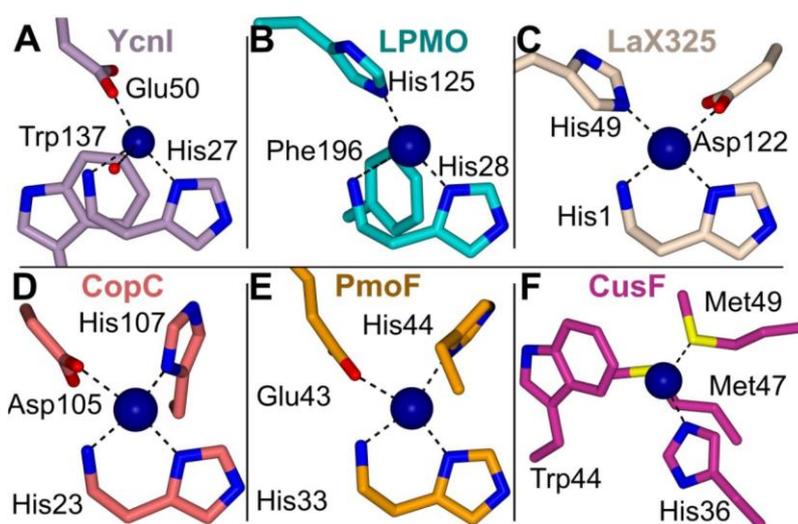


Figure 25 – Principales interactions existantes entre les acides aminés et les cations divalents Cu^{2+} révélées par l'étude des sites de liaisons du Cu de (A) *Bacillus subtilis* YcnI, (B) *Bacillus amyloliquefaciens* CBM33 LPMO, (C) l'enzyme LaX325, (D) *Methylosinus trichosporium* OB3b CopC, (E) *Methylocystis* sp. Rockwell PmoF1 et (F) *Escherichia coli* CusF.⁷⁷

3.6.2. Étude de la sélectivité de PcoB pour le Cu²⁺

Après l'analyse de la liaison PcoB/Cu²⁺, une étude de la sélectivité de PcoB pour les cations Cu²⁺ par rapport à d'autres cations divalents a été réalisée. Pour ce faire, la liaison des cations Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺ à PcoB a été évaluée par ITTF. Les trois premiers ont été sélectionnés car ils peuvent être, tout comme Cu²⁺, cytotoxique en excès⁸⁵⁻⁸⁷ alors que les trois autres sont les cations métalliques les plus abondants dans la plupart des cellules bactériennes.⁸⁸⁻⁹⁰ La concentration en cations métalliques a été fixée identique à celle employée pour le Cu²⁺ afin de pouvoir comparer l'ensemble des résultats (Figure 26).

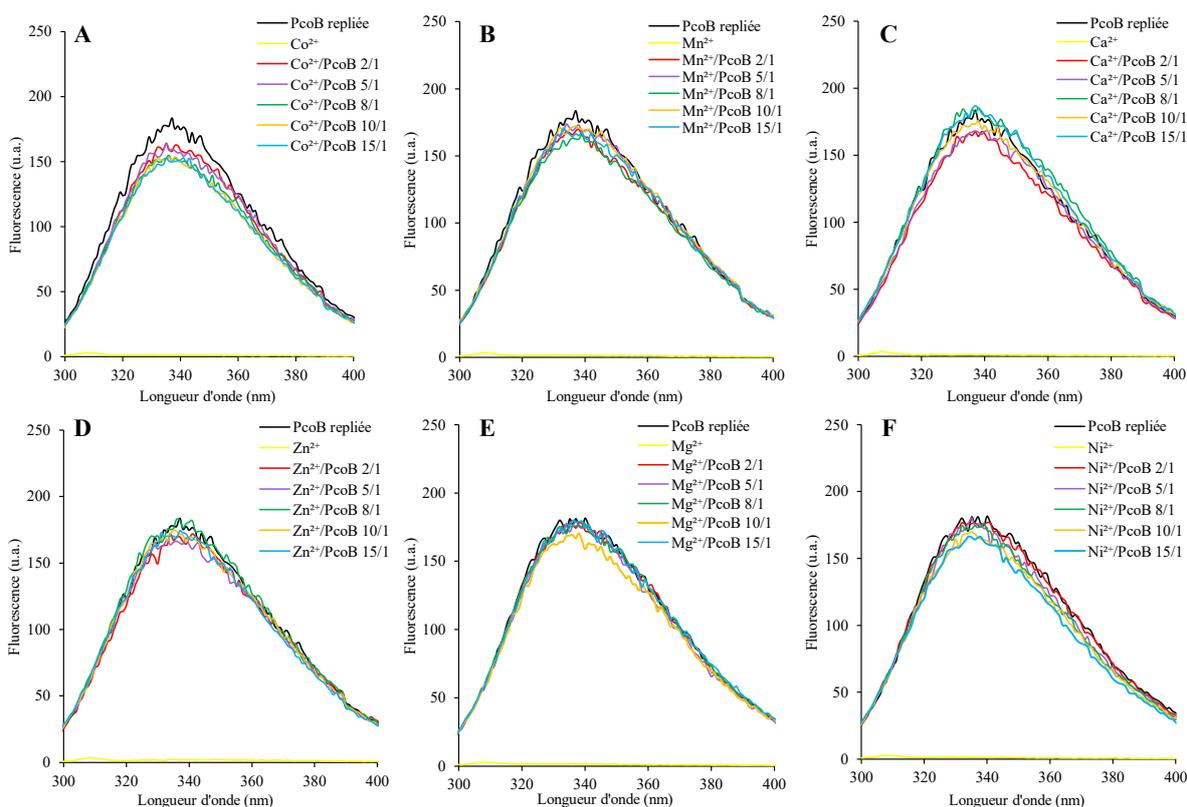


Figure 26 - Spectres de fluorescence intrinsèque des tyrosines et des tryptophanes (u.a.) de PcoB repliée avec des rapports croissants en (A) Co²⁺, (B) Mn²⁺, (C) Ca²⁺, (D) Zn²⁺, (E) Mg²⁺ et (F) Ni²⁺ en fonction de la longueur d'onde d'émission (nm). L'excitation des acides aminés aromatiques est réalisée à 280 nm et le *slit width* employé est 5 nm.

Il apparaît que l'intensité de la bande de fluorescence n'est pas ou très peu influencée par la concentration en ces cations métalliques. Cela laisse penser qu'il n'y a pas de modification de l'environnement du tonneau β ou du moins pas de site de liaison pour ces cations divalents. Comme explicité précédemment, si des interactions ont lieu avec les histidines et autres résidus de la chaîne N-terminale, l'ITTF ne permet pas de les mettre en lumière. Cependant, des interactions avec les His de la chaîne désordonnée ont probablement lieu puisque la purification a pu être réalisée en utilisant une IMAC au Ni²⁺.

3.7. Formation des liposomes

L'objectif de cette section est de former des vésicules capables de stabiliser PcoB en solution, d'imiter au mieux son environnement natif et de faire office de support pour le test de relargage. Dans ce travail, des liposomes de type LUV ont d'abord été sélectionnés pour leur simplicité de formation et les nombreux renseignements les concernant dans la littérature.^{53,91-93} Des vésicules de type SUV ont également été employées, pour analyser l'influence de la courbure de la membrane lors de l'insertion de la protéine. En effet, il semblerait que plus la tension superficielle de la bicouche est grande et plus l'insertion d'une protéine membranaire est facilitée.⁹⁴ Afin de mimer au mieux l'environnement natif de PcoB, la composition lipidique PG/CL (95/5) a été choisie. Cependant, pour des raisons de disponibilité en laboratoire, le PG a été remplacé par du 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycéro-3-phospho-1'-rac-glycérol (PG 16:0-18:1 ou POPG). Ce choix n'est pas problématique puisque PG et POPG possèdent des structures fortement similaires chimiquement parlant : la tête polaire est identique et la chaîne hydrophobe du POPG diffère par une double liaison et deux carbones en moins par rapport au PG (Figure 27).

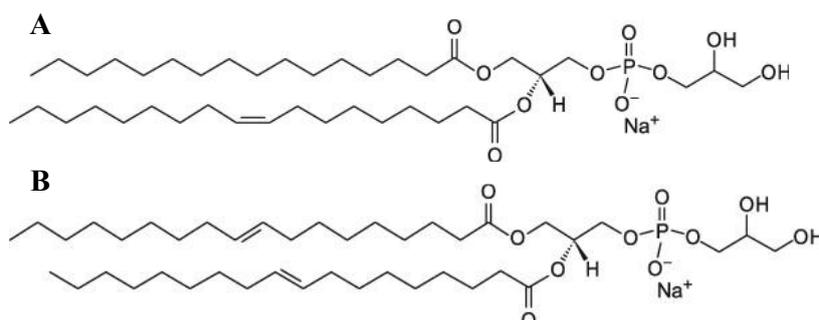


Figure 27 - Structure (A) du POPG et (B) du PG.

3.7.1. Principe

La méthode employée pour former ces vésicules est l'hydratation d'un film fin de lipides (Figure 28). Dans un premier temps, les deux lipides sont mis en solution dans du chloroforme qui est ensuite évaporé. Le film mince résultant est ensuite hydraté avec un tampon ne contenant pas de SDS (qui pourrait empêcher la formation des vésicules) et agité afin de former, par gonflement, des liposomes. Après cette étape, l'échantillon contient principalement des MLV et des OLV ce qui signifie que les vésicules ne sont ni de taille ni de structure homogène. Afin d'obtenir des SUV, la solution est soniquée un court instant ce qui permet de casser les liposomes multicouches et de réduire leur taille. Des étapes de gel/dégel sont également réalisées afin de réduire la taille de ces systèmes. Finalement, une extrusion

au travers d'un filtre est réalisée afin d'obtenir la population de vésicules la moins hétérogène possible. Pour obtenir des LUV, il est nécessaire d'appliquer le même mode opératoire sans réaliser l'étape de sonication.

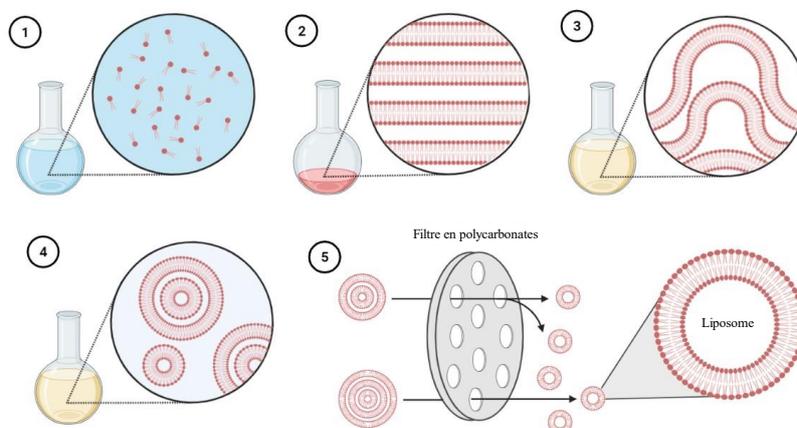


Figure 28 – Schéma récapitulatif de la méthode d'hydratation d'un film fin permettant l'obtention de liposomes.

Afin de confirmer la formation de ces systèmes, des analyses DLS ont été réalisées (Tableau 2). A l'aide d'une mesure spectrométrique et de l'équation de Stokes-Einstein (5), cette technique permet d'obtenir les diamètres hydrodynamiques \bar{D}_h des sphères de solvations des composés présents dans l'échantillon.

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_t} \quad (5)$$

où R_h est le rayon hydrodynamique de la sphère de solvation (nm), k la constante de Boltzmann ($1.381 \cdot 10^{-23}$ J/K), T la température (K), η la viscosité dynamique du solvant (Pa.s) et D_t le coefficient de diffusion des particules.

Tableau 2 – Diamètre hydrodynamique moyen \bar{D}_h (nm) des liposomes SUV et LUV de POPG et POPG/CL (95/5) le jour de leur formation (t_0) et 50 jours plus tard (t_{0+50}).

| Type | | Temps (jours) | \bar{D}_h (nm) |
|-------------------|-----|---------------|------------------|
| POPG | SUV | t_0 | 76 ± 2 |
| | | t_{0+50} | 87 ± 3 |
| POPG/CL (95/5) | SUV | t_0 | 88 ± 4 |
| | | t_{0+50} | 133 ± 6 |
| | LUV | t_0 | 133 ± 6 |
| | | t_{0+50} | 135 ± 5 |

Comme attendu, les échantillons de type SUV possèdent un \bar{D}_h compris entre 10 et 100 nm alors que celui des liposomes de type LUV fait entre 100 et 1000 nm. De plus, il s'avère que l'ajout de la CL fait augmenter le \bar{D}_h d'environ 10 nm. Afin de vérifier la stabilité de ces systèmes dans le temps, des mesures ont été réalisées 50 jours plus tard sur les mêmes échantillons. Malgré une très légère augmentation, la variation des \bar{D}_h est relativement faible ce qui permet de confirmer que ces systèmes sont stables en solution à 4 °C durant plus d'un mois.

Sur un nouveau lot de liposomes de POPG/CL (95/5) type LUV, une distribution de la population des particules en fonction du diamètre a été obtenue par mesure DLS (Figure 29). Cette courbe montre une seule et unique population de liposomes possédant un diamètre moyen d'environ 120 nm, cela confirme la bonne homogénéité de cette solution.

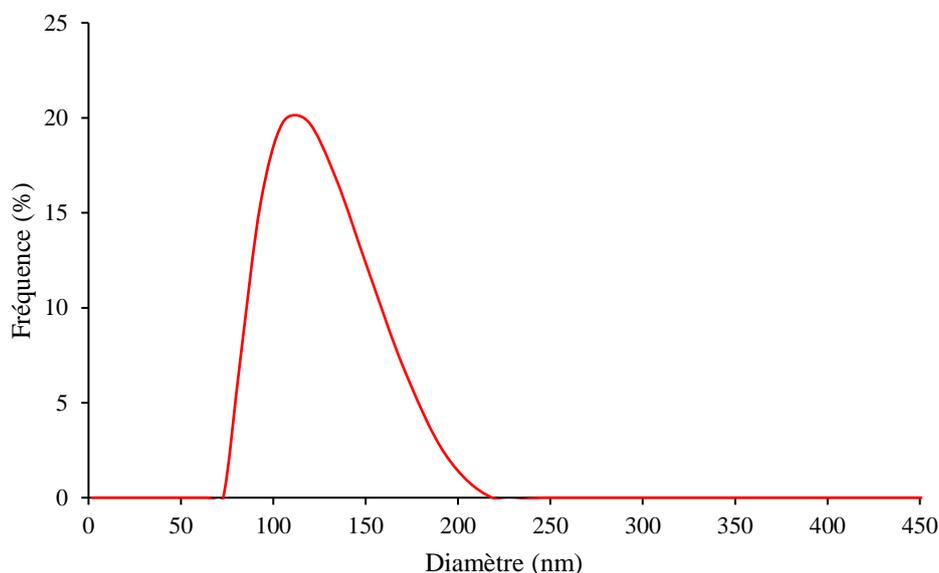


Figure 29 – Distribution du diamètre (nm) des liposomes POPG/CL (95/5) obtenue par DLS.

Dans un second temps, des images TEM ont été réalisées afin d'observer ces systèmes et de confirmer leur unilamellarité. Plusieurs points intéressants peuvent être mis en évidence sur base des images obtenues (Figure 30 **A-D**).

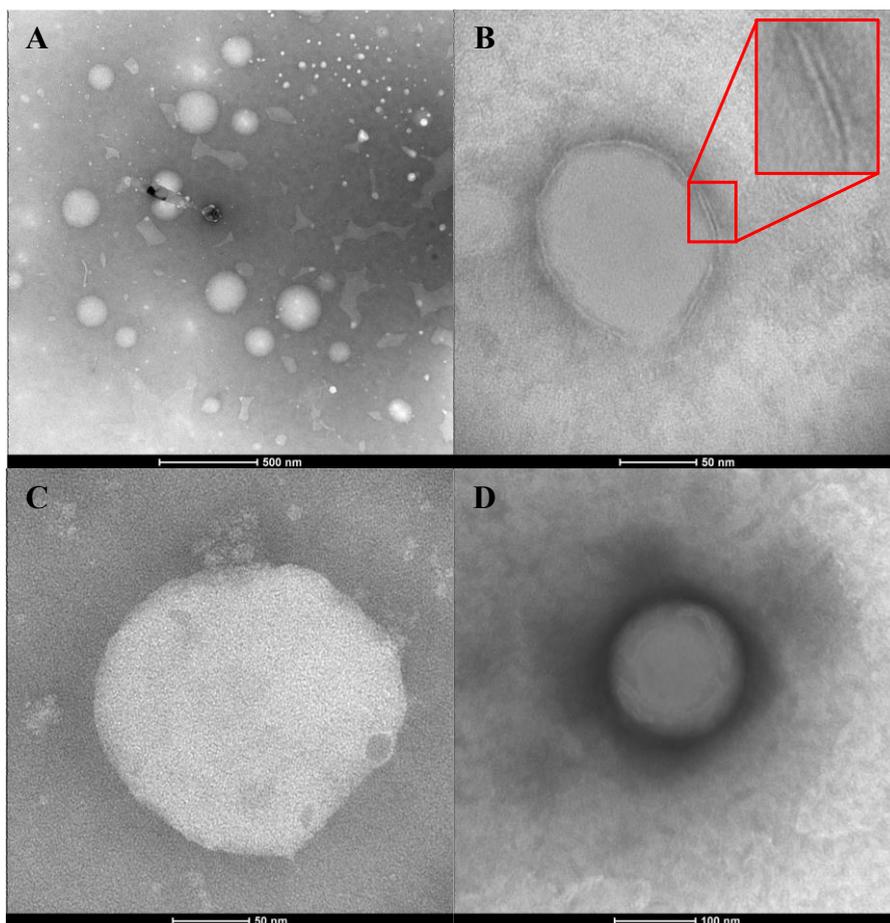


Figure 30 – Images TEM de liposomes LUV de POPG/CL (95/5) avec coloration négative au PTA.

Tout d’abord, il s’avère que l’échantillon contient bel et bien de nombreuses entités sphériques de tailles relativement proches. En observant de plus près ces structures, il est possible d’apercevoir la bicouche typique des membranes lipidiques (Figure 30 **B**). Comme attendu, les vésicules formées sont unilamellaires et le diamètre des vésicules est compris entre 160 et 200 nm. Cela confirme la formation de LUV de POPG/CL (95/5). Il est important de préciser que la méthode de préparation des grilles TEM aplatit légèrement les vésicules, ce qui engendre une petite augmentation des diamètres par rapport à ceux obtenus *via* DLS.

3.8. Formation des protéoliposomes

Après avoir formé des liposomes de POPG/CL (95/5), ceux-ci sont mélangés avec une solution de PcoB (dénaturée ou repliée) afin de former les systèmes permettant par la suite d’étudier le relargage *in vitro* du cuivre. Des mesures DLS ont été réalisées sur ces systèmes afin d’obtenir les \bar{D}_h .

Dans l’optique de former des PL en ajoutant de la protéine à une solution de liposomes, il est d’abord nécessaire de déterminer la taille de la sphère de solvation de la protéine seule

et en solution. Pour ce faire, des échantillons de PcoB dénaturée dans du SDS et repliée par la méthode SDS-MPD ont été analysés par DLS (Tableau 3). Pour la protéine sous sa forme dénaturée, un \bar{D}_h d'environ 40 nm est obtenu. Cela s'explique par le fait que sans structure secondaire précise, la protéine est très mobile et très allongée (similaire à un spaghetti), ce qui rend sa sphère de solvation très large. De plus, la protéine est entourée de micelles de détergent ce qui augmente encore la taille de l'ensemble. En ce qui concerne l'échantillon après renaturation, une diminution de la taille est observée. En effet, la structure s'est repliée et par conséquent, la protéine est plus compacte que sous sa forme dénaturée.

Tableau 3 - Diamètre hydrodynamique moyen \bar{D}_h (nm) de PcoB (dénaturée et repliée) et des protéoliposomes SUV et LUV de POPG/CL (95/5) formés à partir de PcoB repliée.

| Type | \bar{D}_h (nm) |
|----------------|------------------|
| PcoB dénaturée | 40 ± 10 |
| PcoB repliée | 9 ± 4 |
| PL (SUV) | 98 ± 9 |
| PL (LUV) | 202 ± 23 |

Des PL (SUV et LUV) ont d'abord été formés au départ de la protéine repliée et des liposomes préalablement formés. Une augmentation du \bar{D}_h est observée par rapport aux liposomes du même type ce qui est probablement engendré par l'insertion de PcoB dans la bicouche. Du fait de sa longue chaîne désordonnée, l'hypothèse est que cette dernière augmenterait la sphère de solvation de ces systèmes par rapport aux liposomes seuls et ferait donc « gonfler » les vésicules. Bien que l'orientation de PcoB dans son environnement natif soit prédite comme ayant sa chaîne désordonnée vers le périplasma (c'est-à-dire vers l'intérieur de la cellule bactérienne) (Figure 13), il est supposé qu'une majorité de protéines serait insérée avec la chaîne vers l'extérieur du liposome étant donné que l'inverse obligerait la chaîne N-terminale hydrophile à passer au travers de la membrane hydrophobe. Des distributions de population de particules en fonction du diamètre ont été réalisées par DLS (Figure 31).

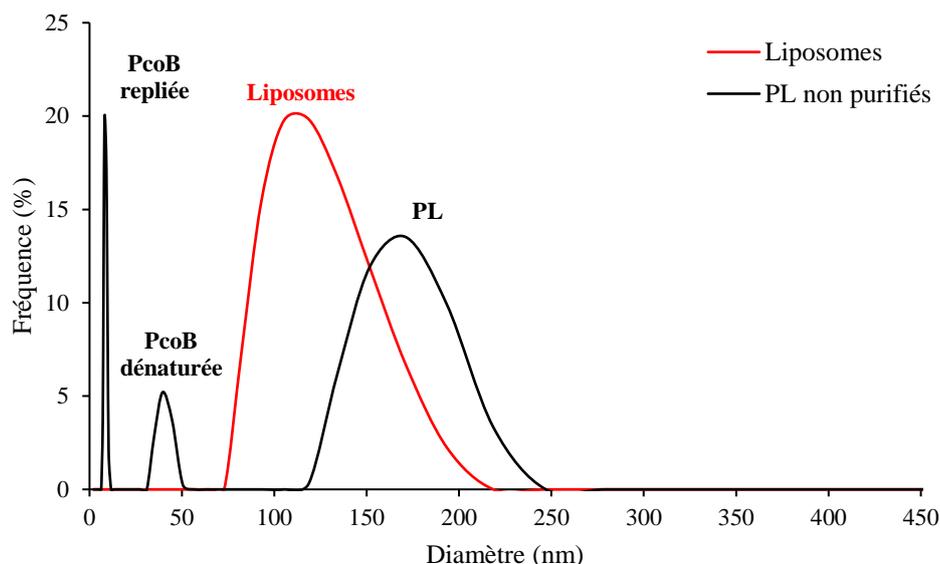


Figure 31 - Distribution du diamètre (nm) obtenue via DLS des liposomes POPG/CL (95/5) (rouge) et des PL (noir).

Au vu des trois bandes observées pour l'échantillon contenant les PL, il semble que ceux-ci ne soient pas purs. La première bande, située à environ 10 nm, est associée à PcoB sous forme repliée. La seconde, quant à elle, se situe à environ 40 nm ce qui correspond à PcoB sous sa forme dénaturée. Finalement, la dernière bande plus large est située à environ 170 nm et correspond aux PL.

La conformation de PcoB dans ces systèmes a par ailleurs été analysée par CD (Figure 32). Il est en effet crucial de vérifier si la protéine se trouve bien sous sa forme native obtenue soit *via* auto-repliement lors de l'insertion (PcoB dénaturée) soit *via* la méthode SDS-MPD préalablement réalisée (PcoB repliée).

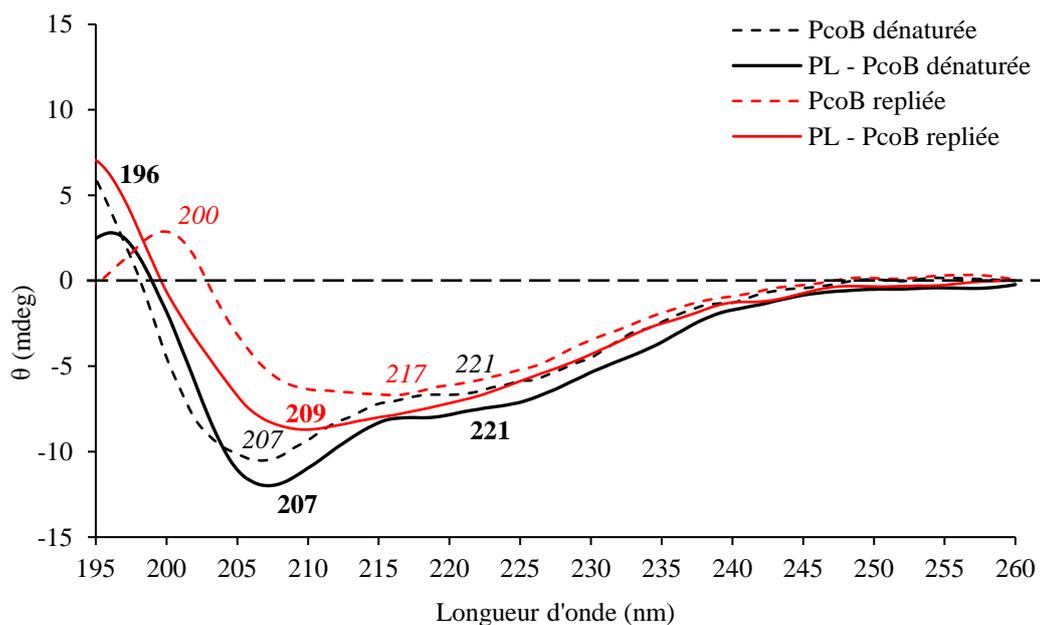


Figure 32 – Spectres CD de PcoB dénaturée (pointillés noirs) et repliée (pointillés rouges) ainsi que des PL formés à partir de PcoB dénaturée (ligne noire) et repliée (ligne rouge).

La courbe associée aux PL formés à partir de PcoB dénaturée possède un maximum à 196 et deux minima à 207 et 221 nm. Cette allure est semblable à celle de la protéine dénaturée seule en solution avec du SDS comme agent solubilisant. L'utilisation de protéine non repliée avant la formation des PL n'est donc pas judicieuse. En ce qui concerne la signature associée aux PL formés à partir de la protéine repliée, un maximum à 195 nm ainsi qu'un large et unique minimum à 209 nm sont observés. Cette allure est plus proche de celle associée aux feuillettes β et à celle de PcoB repliée en solution. Cela semble indiquer que la protéine repliée conserve sa conformation même après l'insertion au sein des liposomes. Cependant, cette courbe de PL semble se trouver à mi-chemin entre les courbes associées à PcoB dénaturée et repliée. Cela pourrait être dû à l'insertion sous forme native d'une partie de la protéine mais pas de la totalité. Le restant non-inséré resterait dans la solution environnante et perdrait sa structure 3D puisqu'une dilution a eu lieu, modifiant les concentrations en SDS et en MPD et ne les rendant plus favorables au repliement. Il serait donc nécessaire d'optimiser l'étape de formation des PL ou d'ajouter une étape de purification de ces PL afin de remplacer la solution environnante par du tampon. Cette dernière pourrait permettre d'éliminer toute trace de PcoB non-insérée et dénaturée.

Enfin, afin d'observer la protéine PcoB insérée dans la membrane, des images TEM de ces systèmes lipides/protéines ont été obtenues (Figure 33).

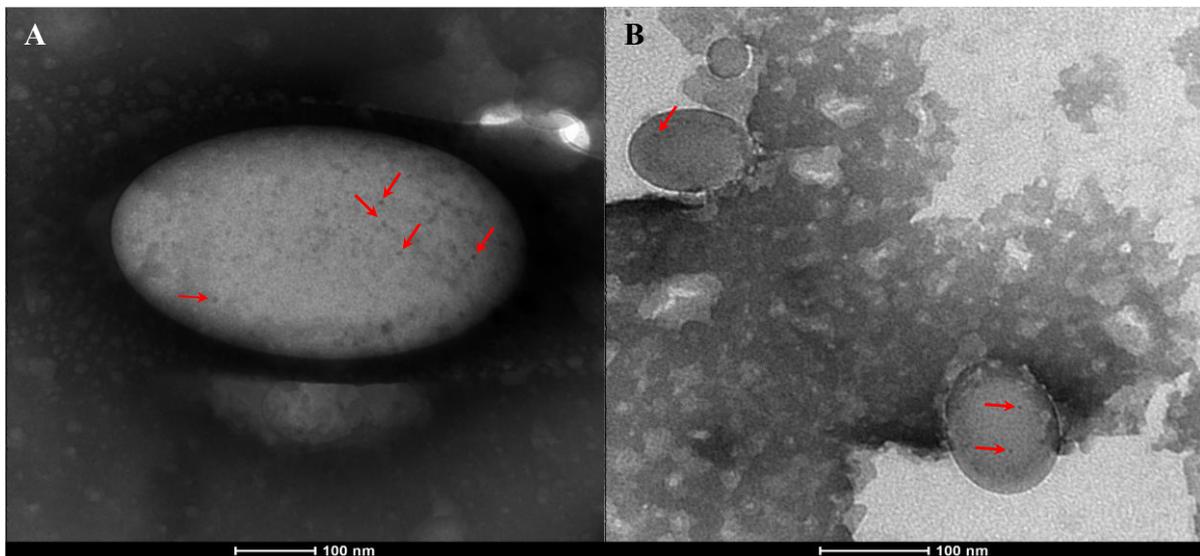


Figure 33 – Images TEM de PL avec coloration négative au PTA.

Sur ces micrographies, une bicouche unilamellaire est toujours bien observée, ce qui permet de confirmer que les PL n'ont pas été détruits durant les préparations techniques des grilles TEM. La forme ovale est due à la fluidité de ces systèmes qui, lorsqu'ils ont été placés

sur la grille, se sont figés sous cette forme allongée. En solution, ils sont cependant bel et bien sphériques. Ce qu'il est important de constater, ce sont les points noirs présents dans les liposomes. Ces derniers correspondraient à la protéine PcoB insérée dans les membranes et mise en évidence par une concentration en colorant légèrement plus importante. Ces résultats permettent de confirmer la présence de PcoB dans les bicouches et donc le bon déroulement de la formation des PL.⁶⁷

3.9. Purification des protéoliposomes

Comme mentionné dans la section précédente, les PL formés nécessitent d'être purifiés afin d'isoler le système d'intérêt des protéines libres en solution. Pour ce faire, plusieurs types de purification ont été investigués. Dans un premier temps, une séparation par ultracentrifugation fractionnée a été réalisée à $30\,000 \times g$ pendant 2 h. L'objectif de celle-ci est de former un culot contenant les systèmes les plus lourds (PL) tout en maintenant les systèmes plus légers (PcoB dénaturée ou non-insérée) dans le surnageant.⁹⁵ Après ultracentrifugation, l'allure de la distribution de population des diamètres hydrodynamiques est différente de celle avant purification (Figure 34). Tout d'abord, la disparition de la bande associée à la protéine repliée et une légère augmentation de la bande associée à PcoB dénaturée sont observées. Cela signifie que la protéine sous forme repliée a été soit séparée des PL, soit dénaturée car le SDS et le MPD ont été éliminés. De plus, le \bar{D}_h moyen est augmenté et la distribution de population est beaucoup moins homogène. La technique a donc été destructive et les systèmes ont probablement fusionné formant une population très hétérogène.

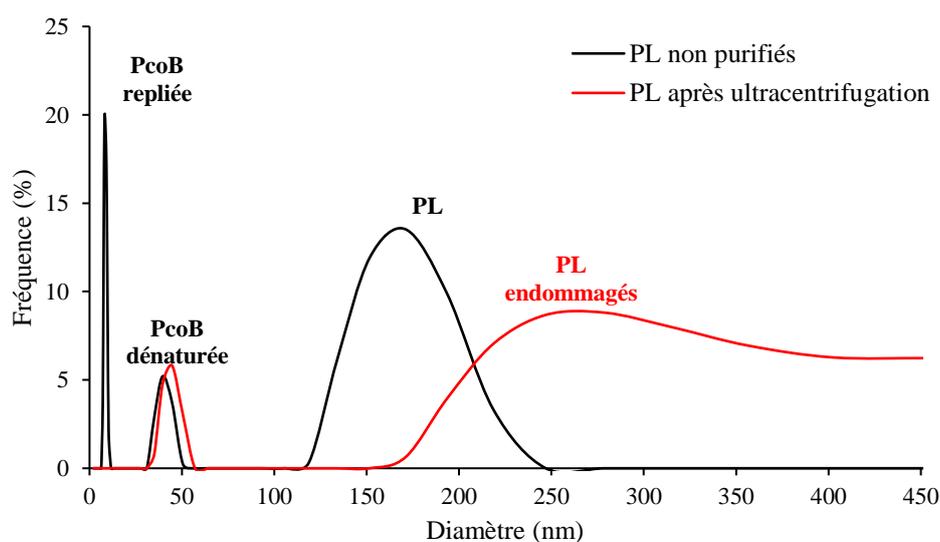


Figure 34 - Distribution du diamètre (nm) obtenue via DLS des PL non purifiés (noir) et des PL après purification par ultracentrifugation fractionnée (rouge).

Dans un deuxième temps, une ultracentrifugation avec un gradient de sucrose a été réalisée. L'utilisation de différents niveaux de sucrose possédant des densités croissantes pourrait en effet être la solution pour séparer les différentes entités.⁹⁶⁻⁹⁸ Les résultats obtenus ne sont cependant pas concluants : aucune séparation n'a été observée après analyse DLS des fractions récoltées.

La troisième méthode de séparation consiste en une filtration par centrifugation avec une membrane semi-perméable de 100 kDa. Cette dernière permettrait de laisser passer les entités ayant une taille inférieure tout en bloquant celles plus larges.⁹⁵ Cette membrane permettrait donc en théorie de laisser passer PcoB tout en bloquant les PL. La distribution de population des diamètres hydrodynamiques des fractions récoltées après filtration comporte une allure similaire à celle obtenue après centrifugation fractionnée (Figure 35). En effet, la bande associée à PcoB sous sa forme repliée disparaît au profit d'une augmentation d'intensité de la bande associée à la forme dénaturée. Néanmoins, dans ce cas-ci, la bande n'a pas subi une augmentation nette du \bar{D}_h . Un étalement a eu lieu, probablement à cause de ruptures et de fusions entre les bicouches, mais les systèmes ont été mieux conservés par rapport à la tentative de séparation par ultracentrifugation.

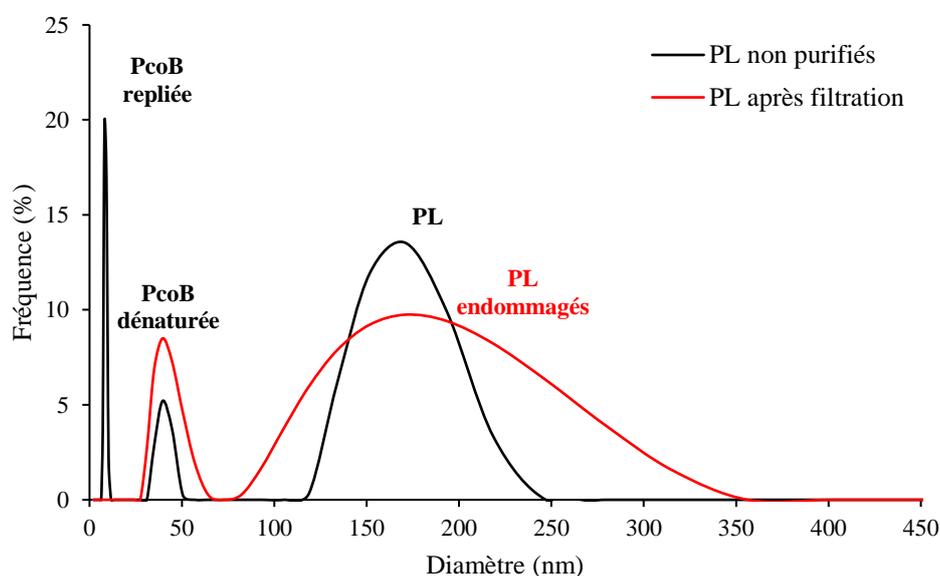


Figure 35 - Distribution du diamètre (nm) obtenue via DLS des PL non purifiés (noir) et des PL après purification par filtration (rouge).

3.10. Stabilité du Cu^{2+} en solution

La dernière étape décrite dans la stratégie de ce travail consiste à étudier le flux de cations Cu^{2+} entrant et/ou sortant des PL via les pores formés par l'insertion de PcoB dans la bicouche. Cependant, afin de pouvoir réaliser ce système final, il est nécessaire de pouvoir stabiliser les

cations divalents Cu^{2+} en solution tamponnée à pH physiologique. En effet, comme le montre le diagramme de Pourbaix du cuivre (Figure 36), ces cations ne sont pas stables dans des solutions dont le pH est supérieur à 6.

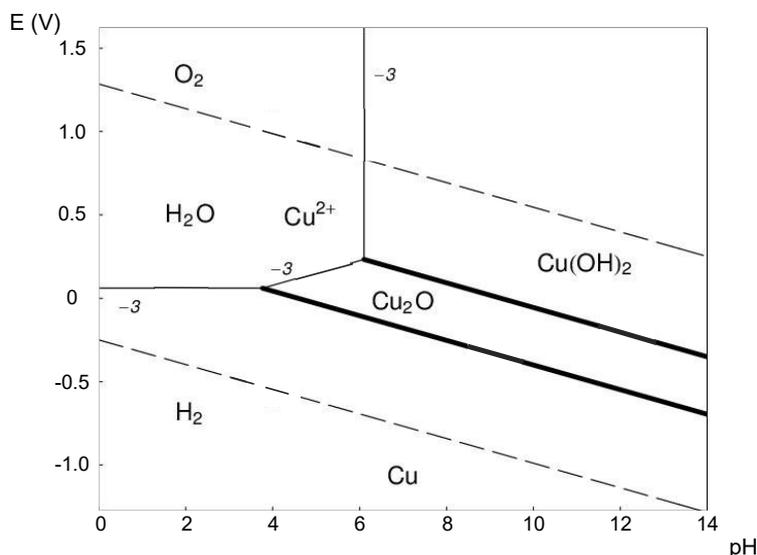


Figure 36 - Diagramme de Pourbaix (E-pH) à 25 °C du cuivre (les tirets délimitent le domaine de stabilité de l'eau).⁹⁹

Ce diagramme permet de connaître les zones de stabilité du cuivre et de ses dérivés dans une solution aqueuse à divers potentiels. Dans notre cas, PcoB se trouve dans une solution où le potentiel est nul et le pH vaut 7.4. Cela signifie que le cuivre formera spontanément du $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Il est par ailleurs important de noter que certains tampons forment des complexes avec les cations divalents du cuivre. Par exemple, un tampon phosphate formera du $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ qui précipitera puisque c'est un sel insoluble. Afin de pallier ce problème, N. Good et son équipe ont sélectionné 20 tampons biocompatibles qui ne posséderaient pas ou très peu d'affinité pour les cations métalliques.¹⁰⁰⁻¹⁰² Divers tampons de cette liste ainsi que certains de leurs dérivés découverts plus récemment ont donc été testés dans le but de parvenir à stabiliser au mieux les cations Cu^{2+} . La concentration employée a été fixée à 5 mM dans le but d'obtenir, après efflux, une concentration hors des vésicules suffisantes pour être quantifiée. Malheureusement, aucun tampon n'a permis d'atteindre cet objectif (Figure 37). En effet, tous les tubes possèdent soit un précipité bleuté, soit une teinte engendrée par un complexe soluble, soit les deux.



Figure 37 – Photographie des solutions de Cu^{2+} 5 mM réalisées dans divers tampons de Good.

Une seconde option a été investiguée afin de stabiliser les Cu^{2+} en solution. Cette dernière consiste à utiliser du NH_3 comme agent complexant afin de former un complexe stable et soluble ($\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$) ce qui permet d'éviter la formation de $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Cependant, il faut que la constante de dissociation K_d de ce complexe $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ soit plus grande que celle du complexe PcoB/cuivre afin de ne pas séquestrer les cations divalents sans pouvoir les rendre disponibles à la protéine. Cependant, il s'est avéré expérimentalement que le mélange $\text{NH}_3/\text{Cu}^{2+}$ entraînait inévitablement la dénaturation et la précipitation de PcoB lorsque celle-ci était ajoutée dans le milieu. Cette piste a donc été mise de côté. Aucune méthode de stabilisation des ions Cu^{2+} n'a donc pu être mise au point durant ce mémoire. D'autres possibilités restent encore à essayer comme l'utilisation de glycine ou travailler à un pH plus acide tout en évitant la dénaturation de PcoB.

4. Conclusions

4. Conclusion

Ce travail avait pour objectif principal d'élucider la structure et le rôle de la protéine membranaire PcoB dans le mécanisme d'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter crescentus*. Étant supposée participer à l'export du Cu^{2+} hors des bactéries, un test *in vitro* de relargage des cations divalents Cu^{2+} par insertion de PcoB dans la bicouche de liposomes POPG/CL (95/5) permettrait de vérifier cette hypothèse.

Une étude bio-informatique sur la structure de la protéine a d'abord été réalisée sur base des informations disponibles à son sujet dans la littérature. Les prédictions de la structure 3D de PcoB montrent qu'elle formerait un tonneau β transmembranaire avec du côté N-terminal, une longue chaîne désordonnée et riche en histidines représentant environ 1/3 de la séquence. De plus, il s'est avéré que PcoB contient plus de 30 % de structure désordonnée et une IDR de plus de 30 acides aminés consécutifs ce qui signifie que cette protéine est une IDR. Une étude topologique a également prédit une orientation de la protéine dans la membrane native plaçant la chaîne désordonnée du côté du périplasme. Une hypothèse stipulant l'implication de celle-ci et de ses nombreuses histidines dans le mécanisme de capture des ions Cu^{2+} a donc pu être émise.

En parallèle de ces prédictions computationnelles, PcoB a été surexprimé sous forme de corps d'inclusion et purifiée par une étape unique de chromatographie d'affinité IMAC en conditions dénaturantes sur base des propriétés intrinsèques de la protéine. Un gel SDS-PAGE a confirmé le bon déroulement de la surexpression et la pureté des fractions récoltées après IMAC. PcoB a ensuite été repliée par la méthode SDS-MPD, afin de récupérer son repliement natif et sa fonction associée. Des analyses ITTF et CD ont pu confirmer cette étape.

Par la suite, la liaison de PcoB aux ions Cu^{2+} a été mise en évidence par ITTF montrant des changements conformationnels de la protéine à proximité des acides aminés aromatiques lors de l'ajout de ces cations. La sélectivité de PcoB ces derniers par rapport à d'autres cations divalents (Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+}), a également été observée.

Afin de mettre au point un système de relargage au cuivre, PcoB doit être insérée dans des liposomes. Dans un premier temps, la formation de ces vésicules de composition lipidique POPG et POPG/CL (95/5), proche de celle de la membrane de *C. crescentus*, a pu être mise en évidence par des mesures DLS. Des images TEM ont également été réalisées sur ces systèmes, ce qui a permis de mettre en évidence leur caractère unilamellaire.

Dans un second temps, à l'aide de PcoB (dénaturée et repliée) et des liposomes POPG/CL (95/5) préformés, la formation de PL a été investiguée. Un auto-repliement de PcoB lors de son insertion dans la bicouche n'a pu être observé, il est donc nécessaire de passer par une étape de renaturation préalable avant de former les PL pour obtenir des systèmes renfermant la protéine sous sa forme native. Des analyses par DLS ont révélé qu'une certaine quantité de PcoB ne s'était pas insérée dans les vésicules. Trois méthodes de purifications des échantillons de PL ont alors été testées mais sans succès.

Finalement, plusieurs tampons biologiques à pH 7.4 ont été testés pour maintenir une concentration élevée en Cu^{2+} en solution et prévenir la formation de complexes solubles et/ou insolubles. Les tests préliminaires n'ont pas été concluants. L'utilisation de NH_3 comme agent complexant a également été investiguée afin de pallier ce problème mais il s'est avéré que ce composé n'était pas compatible avec une solution de PcoB repliée.

Les perspectives à court terme de ce travail sont d'abord la mise au point d'une méthode de purification des PL afin de séparer efficacement la protéine (dénaturée et repliée) des systèmes lipidiques. Cela pourrait être réalisé à l'aide d'une colonne d'exclusion de taille. De plus, il sera nécessaire de rechercher un moyen de stabilisation des cations Cu^{2+} dans les solutions biologiques tamponnés afin de pouvoir par la suite former des liposomes et PL contenant des cations divalents de Cu. Pour ce faire, l'utilisation d'autres agents complexant tels que la glycine ou l'utilisation de solutions tamponnées à pH inférieur à 6 pourrait être envisagées. Un clivage à la trypsine des PL et une analyse via SDS-PAGE ou Western-Blot permettraient également d'obtenir des informations concernant l'orientation de PcoB dans les liposomes après son insertion. En ce qui concerne l'étude du flux entrant et sortant des systèmes de relargage, les variations des concentrations en cuivre pourront être suivies et évaluées *via* des mesures ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*) ou *via* des mesures spectroscopiques après ajout d'un colorant chélatant tel que le polyéthylèneimine (PEI) ou la calcéine.

Les objectifs à long terme visent à mieux comprendre les mécanismes de détoxification des bactéries et à développer des agents inactivant et inhibiteurs de ces systèmes dans l'optique de réduire le temps de vie des bactéries. Cet écrit vise également à faire avancer la recherche fondamentale concernant les protéines membranaires et les protéines intrinsèquement désordonnées.

5. Matériels et méthodes

5. Matériels et méthodes

5.1. Analyses bio-informatiques

La séquence en acides aminés de PcoB (UniProtKB - A0A0H3C699) est analysée avec le logiciel NetSurfP-3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetSurfP-3.0>)⁷³ afin d'obtenir sa structure secondaire. De plus, sa structure tertiaire est prédite par homologie *via* le programme SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)⁷⁰, par modélisation par enfilage à l'aide du programme RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>)⁷¹ et par la méthode *ab initio* à l'aide du logiciel AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).⁷² Une prédiction du désordre de la séquence est également réalisée en utilisant le programme PONDR (<http://www.pondr.com/>).⁷⁵ L'orientation de PcoB dans la membrane externe de *C. crescentus* est prédite par le logiciel BOCTOPUS2 (<https://b2.topcons.net/>).⁷⁶

5.2. Surexpression de PcoB chez *E. coli*

Les manipulations de cette section sont réalisées en conditions stériles. Le milieu de culture nutritif utilisé est du LB auquel est ajouté 0.03 mg/mL de kanamycine, un antibiotique.

5.2.1. Préculture

La préculture est réalisée en prélevant un peu de stock glycérol contenant la souche modifiée à l'aide d'une boucle d'inoculation et de plonger cette dernière dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu nutritif LB-Kana 0.03 mg/mL préalablement stérilisé. Cet erlenmeyer est ensuite refermé à l'aide d'un bouchon et mis à incuber à 37 °C durant 18 h sous agitation à 150 tours/minute.

5.2.2. Cultures

Les cultures sont réalisées dans 4 erlenmeyers de 2 L contenant 400 mL de milieu nutritif LB-Kana 0.03 mg/mL stérile. Par la suite, 4 mL de préculture préalablement incubés sont ajoutés. Ces cultures sont incubées jusqu'à ce que la D.O. à 600 nm soit entre 0.6 et 0.8. Un aliquot de 1 mL de chaque erlenmeyer est conservé pour les analyses SDS-PAGE.

Lorsque les D.O. se trouvent dans la gamme citée ci-dessus, l'induction à l'IPTG est réalisée en ajoutant 200 µL d'IPTG 1 M dans chaque erlenmeyer. Les cultures sont à nouveau rebouchées et incubées 3 h sous agitation à 150 tours/min à 37 °C.

5.2.3. Centrifugation

Les cultures sont placées dans 4 bouteilles en plastique carrées de 500 mL et centrifugées 30 minutes à 4000 × g et 4 °C (rotor EppendorfTM A-4-81 et centrifugeuse EppendorfTM 5804

R). Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resolubilisé avec 20 mL de tampon *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) pH 7.4 dans un falcon de 50 mL. Ces derniers sont centrifugés à $12000 \times g$ et $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé et les culots sont conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.4. Lyse

Les culots sont mis en suspension dans 10 mL de tampon PBS pH 7.4 et vortexés afin d'être homogènes. La lyse est réalisée par sonication des falcons un à un et ceux-ci doivent être placés sous glace car les ondes font chauffer la solution. Six cycles de 30 s à puissance 6 avec 15 s de pause entre chaque cycle sont réalisés. Les falcons sont ensuite centrifugés 30 minutes à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $12000 \times g$ et le surnageant est éliminé. Les culots sont conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.5. Lavage

Les culots sont lavés une première fois par centrifugation avant d'être purifiés par chromatographie. Pour ce faire, 15 mL de tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM et Triton X-100 2 %) sont ajoutés et le tout est homogénéisé. Les falcons sont ensuite centrifugés 15 minutes à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $12000 \times g$. Le surnageant est éliminé et un second lavage est réalisé de la même manière. Les culots sont conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3. Solubilisation des CI

Un culot de PcoB est solubilisé avec 10 mL de tampon de solubilisation ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM pH 7.4 SDS 1 %) sous agitation douce durant 12 h à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le falcon est centrifugé 10 minutes à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $4000 \times g$ (centrifugeuse VWR Mega Star 600). Le surnageant est récupéré et filtré sur un filtre seringue $0.45\text{ }\mu\text{m}$ (VWR Polyéthersulfone).

5.4. Purification de PcoB en conditions dénaturantes

5.4.1. Appareillage

L'appareil employé pour purifier la protéine est une FPLC (*Fast Liquid Protein Chromatography*) GE ÄKTA Purifier 10 (UPC-900) avec une boucle d'injection de 5 mL. Toutes les solutions employées avec cette machine sont préalablement filtrées et dégazées afin d'éliminer toutes impuretés et bulles d'air pouvant entraîner des dégâts au système et à sa tuyauterie.

5.4.2. Conditionnement de la colonne

La technique employée est une chromatographie IMAC. Pour ce faire, une colonne HiTrap™ FF (GE Healthcare) est chargée en cations Ni²⁺ avec 20 mL d'une solution de NiSO₄ 0.1 M. La colonne, précédemment blanche/incolore, devient ensuite bleutée.

Le système est lavé avec 30 mL d'eau distillée à un débit 3 mL/min. La colonne est ensuite équilibrée avec le tampon d'équilibration A (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, SDS 0.1 %) à un débit de 1 mL/min jusqu'à atteindre une stabilisation des courbes de conductivité et d'absorbance à 280 nm.

5.4.3. Purification

L'échantillon protéique filtré est injecté sur la colonne par volume de 5 mL et l'élution est réalisée avec le même tampon A afin de faire éluer le FT. Lorsque la courbe de l'UV à 280 nm revient à la ligne de base, un tampon d'élution B (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, SDS 0.1 %, imidazole 250 mM) est employé afin de faire éluer la protéine d'intérêt. L'élution est fractionnée par volume de 1 mL. La colonne et le système sont ensuite nettoyés avec ~75 mL d'eau distillée et ensuite de l'éthanol 20 %. La colonne est enlevée du système et conservée à 4 °C.

5.5. Élimination des sels et de l'imidazole

Afin d'éliminer les différents sels et l'imidazole présents dans les fractions récoltées après purification, une colonne de dessalage PD-10 (GE Healthcare Sephadex G25) est utilisée. Cette colonne est préalablement équilibrée avec 25 mL de tampon C (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.4, SDS 0.1 %) et ensuite 2.5 mL d'échantillon y sont déposés. Lorsque la solution est à fleur de la matrice, 3.5 mL de tampon C sont ajoutés afin de faire éluer la protéine et 3.5 mL sont récoltés en sortie de colonne. Une équilibration est nécessaire entre chaque utilisation si le volume à dessaler est supérieur à 2.5 mL. Après utilisation, la colonne est lavée avec 35 mL d'eau distillée et conservée à 4 °C.

5.6. Électrophorèse SDS-PAGE

5.6.1. Préparation des gels

Deux gels différents sont préparés : un gel de focalisation ou *stacking gel* (acrylamide 4 %, Tris-HCl 0.126 M pH 6.8, SDS 0.1 %, persulfate d'ammonium (*ammonium persulfate*, APS) 0.05 %, tétraméthyléthylènediamine (TEMED) 0.05 %) et un gel de séparation ou *running gel* (acrylamide 12 %, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1 %, APS 0.05 %, TEMED).

Le premier a pour objectifs de bien concentrer toutes les fractions sur une ligne unique et le second est le gel principal dont le but est de séparer les différents composants. Les compositions de ces deux gels sont indiquées dans le Tableau 4.

Tableau 4 – Compositions et volumes (mL) pour la préparation de 10 mL de gel de séparation 12 % en acrylamide et de 10 mL de gel de focalisation 4 % en acrylamide.

| Substance | Gel de focalisation | Gel de séparation |
|------------------------------|---------------------|-------------------|
| | Volume (mL) | Volume (mL) |
| Eau distillée | 6 | 3.39 |
| Acrylamide | 1.32 | 3.96 |
| Tampon Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 | 0 | 2.5 |
| Tampon Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 | 2.52 | 0 |
| SDS 10 % | 0.1 | 0.1 |
| APS 10 % | 0.05 | 0.05 |
| TEMED | 0.01 | 0.005 |

Le gel de séparation est coulé aux trois quarts d'une cassette Novex® Life Technologies™ de 1.0 mm. Une couche d'1 cm d'éthanol 20 % est directement ajouté par-dessus afin de le protéger durant la polymérisation. Après 45 minutes, l'éthanol est éliminé et le gel de focalisation est coulé afin de remplir entièrement la cassette. Un peigne doté de 12 divisions est inséré afin de créer des puits pour déposer les échantillons. Il faut ensuite attendre environ 30 minutes que le second gel soit polymérisé avant de pouvoir utiliser cette cassette pour la suite des manipulations.

5.6.2. Préparation des échantillons

Les échantillons à déposer sur le gel doivent subir une dénaturation et une coloration préalable. Pour ce faire, 10 µL de fraction à analyser sont placés dans un eppendorf et 10 µL de tampon de charge (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glycérol 20 %, SDS 2 %, bleu de bromophénol 0.02 %, β-mercaptoéthanol 0.07 M) sont ajoutés. Chaque microtube est ensuite vortexé afin d'homogénéiser et 10 µL du mélange final sont prélevés pour être déposés sur le gel. Pour certains échantillons, il est possible d'ajouter une étape supplémentaire de chauffage à 95 °C pendant 5 minutes afin de s'assurer que toutes les protéines présentes sont dénaturées.

5.6.3. Migration

L'objectif de cette technique est la séparation des protéines sur base de leur masse moléculaire. Pour ce faire, une cassette est placée dans une cellule d'électrophorèse Novex[®] Life Technologies[™] XCell SureLock[™] et du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 3.4 mM, SDS 0.1 %) est ajouté afin de remplir entièrement la cuve. Le peigne est enlevé lentement du gel afin de faire apparaître les puits et 10 µL échantillons y sont déposés. La migration est ensuite lancée durant 1 h avec une différence de potentiel de 200 V. Quand celle-ci est terminée, la cassette est enlevée de la cuve et ouverte en deux afin d'extraire le gel. Ce dernier est ensuite placé pendant 30 minutes dans une solution de coloration (bleu de Coomassie R250 30 mM, méthanol 11 M, acide acétique 1.7 M). Finalement, le gel est rincé et placé 2 h dans une solution de décoloration (méthanol 7.4 M, acide acétique 1.7 M). Le gel est conservé à 4 °C dans de l'eau distillée avec un peu d'acide acétique.

5.7. Dosage protéique

La concentration protéique est déterminée par spectrophotométrie UV-visible à une longueur d'onde de 280 nm (spectrophotomètre VWR[™] UV-6300PC). Pour ce faire, le coefficient d'extinction molaire à 280 nm ($\epsilon_{280 \text{ nm}}$) de PcoB est calculé sur base de sa séquence en acides aminés et vaut $57410 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.¹⁰³ La mesure est réalisée à l'aide d'une cellule micro-UV BRAND[®] dont le chemin optique est de 1 cm.

5.8. Renaturation de PcoB

La méthode de renaturation employée lors de ce travail se base sur l'association du détergent SDS et du cosolvant MPD. La concentration protéique finale est de 0.2 mg/mL, cependant il est possible de faire varier cette valeur en fonction des nécessités des manipulations. Le Tableau 5 reprend les volumes utilisés en pratique pour obtenir 10 mL d'une solution finale de PcoB repliée 0.2 mg/mL en partant de PcoB dénaturée 2.5 mg/mL.

Tableau 5 – Substances, solutions et volumes (mL) employés pour obtenir 10 mL de PcoB repliée 0.2 mg/mL en partant de PcoB dénaturée 2.5 mg/mL.

| Substance et solution | Volumes (mL) |
|---|--------------|
| NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH 7.4 | 6.678 |
| NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH 7.4 SDS 50 mM | 0.600 |
| MPD 7.8 M | 1.923 |
| PcoB dénaturée 2.5 mg/mL | 0.798 |

En pratique, les trois premiers volumes sont placés dans un falcon de 50 mL et la protéine dénaturée est ajoutée goutte à goutte sous agitation au vortex. La solution finale est placée sous agitation douce durant environ 24 heures puis conservée dans un falcon fermé à 20 °C étant donné que le SDS précipite à 4 °C.

5.9. Formation des liposomes

Les liposomes sont préparés par la méthode d'hydratation d'un film fin (Figure 28). Le mélange lipidique employé dans ce travail est 95 % de POPG (N° CAS 268550-95-4) et 5 % de CL (N° CAS 115404-77-8).

La procédure générale est la suivante : 20 mg de lipides (19 mg POPG et 1 mg CL) sont pesés et mis en solution dans un ballon monocol en verre avec environ 5 mL de chloroforme. Le solvant est évaporé *via* un évaporateur rotatif (pompe à vide Vacuubrand™ PC 3001 VARIO et évaporateur rotatif Heidolph™ Laborata 4000 efficient) afin d'évaporer le solvant sous agitation moyenne. Un film mince blanc apparaît sur les parois du ballon. Ce dernier est ensuite hydraté avec 10 mL de solution désirée D ne contenant pas de SDS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM pH 7.4) et agité lentement à la main durant environ 2 minutes. La solution devient alors blanche et trouble. Pour obtenir des SUV, cette solution est plongée dans un bain à ultrasons (aussi nommé bain de sonication, Ultrasonic cleaner DW-5200DTD) durant 30 secondes à 40 kHz. Cette étape est ignorée lors de la formation de LUV. Dix étapes de gel/dégel sont ensuite réalisées en plongeant le ballon successivement dans de l'azote liquide (-196 °C) et dans un bain d'eau chaude (environ 60 °C).

La dernière étape de cette procédure est l'extrusion de la solution. L'appareillage utilisé se nomme une extrudeuse (Figure 38), toutes les parties composant cette dernière sont préalablement rincées à l'eau distillée et ensuite avec de la solution D.

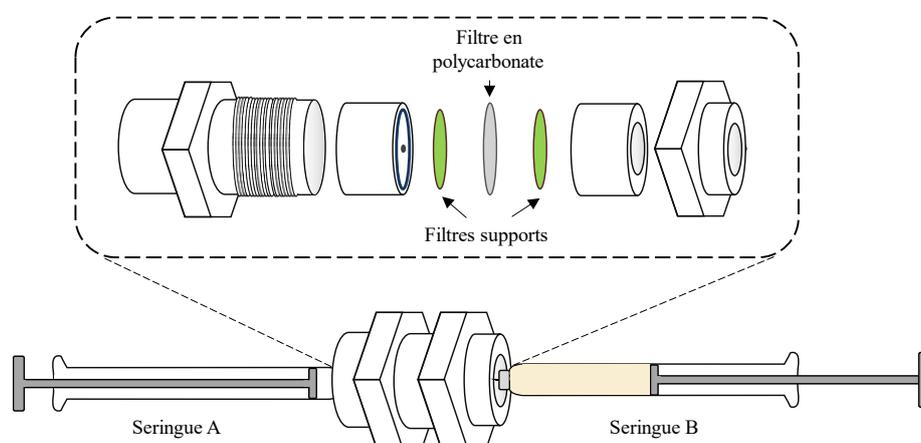


Figure 38 – Schéma de l'extrudeuse et des filtres employés

Le montage est réalisé en suivant l'illustration ci-dessus en plaçant un filtre 0.2 μm en polyéthersulfone entre deux filtres support. Le système est équilibré à l'aide de la solution D et ensuite l'échantillon est extrudé par 1 mL. Après 15 passages au travers du système, les fractions sont rassemblées dans un falcon et conservées à 4 °C.

5.10. Formation des protéoliposomes

Après avoir formé des liposomes et obtenu la protéine PcoB purifiée et repliée, ces deux éléments sont combinés afin de former des PL. Le rapport PcoB/lipide a été choisi à 0.1/1. Les PL sont réalisés en mélangeant 1 mL de PcoB repliée 0.2 mg/mL avec 1 mL de liposomes SUV ou LUV 2 mg/mL. La solution est laissée sous agitation douce pendant environ 20 h à 20 °C. Les PL obtenus sont conservés dans un falcon fermé à 20 °C étant donné que le SDS présent précipite à 4 °C.

5.11. Purification des PL

Après la formation des PL, il est nécessaire de les purifier afin de se débarrasser de la protéine (dénaturée et/ou repliée) environnante. Pour ce faire, trois méthodes ont été employées.

5.11.1. Purification par ultracentrifugation fractionnée

Pour réaliser cette méthode, 1 mL d'échantillon de PL à purifier est placé dans un eppendorf spécial centrifugation préalablement rincée avec du tampon phosphate 20 mM pH 7.4. Ce dernier est centrifugé 2 heures à 10 °C et $30000 \times g$ (rotor TLA 100.3 et la centrifugeuse BC Optima TLX-120). Le surnageant est éliminé et 1 mL de tampon phosphate 20 mM pH7.4 est ajouté au culot. La solution est homogénéisée et stockée à température ambiante (environ 20 °C).

5.11.2. Purification par ultracentrifugation avec gradient de sucrose

Cette purification se base sur la succession de plusieurs couches possédant des concentrations en sucrose différentes et donc des densités et des coefficients de flottaison différents. Pour ce faire, 5 solutions de sucrose sont réalisées : 60, 20, 10, 5 et 2.5 % (w/w) dans du tampon phosphate 20 mM pH 7.4. A l'aide d'un réfractomètre, le coefficient de diffraction de chaque solution est mesuré et du tampon est ajouté afin d'obtenir précisément les pourcentages mentionnés précédemment. Sont ensuite mélangés 1 mL d'échantillon de PL et 1 mL de sucrose (60 % w/w). Dans un tube à centrifugation de 13 mL en polypropylène, 1.5 mL de ce mélange est placé dans le fond puis recouvert lentement par 1.5 mL de chaque

solution en gradient décroissant. Pour finir, 0.75 mL de tampon sont ajoutés sur la dernière couche de sucrose. Le tube est centrifugé 1 heure à 10 °C et 82600 × g (rotor Beckman SW28 et centrifugeuse BC Optima LE-80K). Ensuite, le tube est récupéré et sectionné en 20 morceaux. Après chaque découpe, la solution est prélevée et placée dans des eppendorf stockés à température ambiante (environ 20 °C). L'indice de réfraction de chaque fraction est mesuré afin de pouvoir calculer la concentration en sucrose après centrifugation.

5.11.3. Purification par filtration

Cette purification est réalisée avec des Amicon de 100 K. Un volume de 1 mL d'échantillon de PL à purifier est placé dans la partie supérieure de cet Amicon et 4 mL de tampon phosphate 20 mM pH 7.4 sont ajoutés. L'échantillon est centrifugé 5 minutes à 10 °C et 6000 × g (centrifugeuse VWR Mega Star 600). Le filtrat est récupéré dans un eppendorf et du tampon phosphate est ajouté de nouveau dans la partie supérieure afin d'atteindre un volume de 5 mL. Ces étapes sont répétées afin de réaliser 5 cycles de filtration. Le dernier cycle est réalisé de manière à obtenir un volume final de 1 mL dans la partie supérieure. Cette solution est récupérée et conservée à température ambiante (environ 20 °C).

5.12. Dichroïsme Circulaire

La protéine repliée et les PL sont analysés par CD dans l'UV lointain. Pour ce faire, il est nécessaire que la concentration protéique soit de 0.1 mg/mL. Les spectres sont enregistrés avec un spectropolarimètre MOS-500 à 20 °C en utilisant une cellule en quartz Suprasil (Hellma) dont le chemin optique est de 1 mm. Pour chaque spectre, quatre scans (20nm/min, pas de 0.5 nm, intensité de 0.1 nm et 2 s de temps d'intégration digitale) sont moyennés et lissés.

5.13. Fluorescence intrinsèque des tyrosines et des tryptophanes

La protéine PcoB repliée et les PL sont analysés par ITTF. Les mesures sont réalisées avec un spectrophotomètre de fluorescence Agilent Cary Eclipse équipé d'une lampe au Xénon et la cellule employée est une cellule en quartz QS (Hellma) dont le chemin optique est de 10 mm. L'ouverture de la fente monochromatique est fixée à 5 nm et la longueur d'onde d'excitation à 280 nm. Les spectres d'émission sont réalisés de 280 à 600 nm.

5.14. Diffusion Dynamique de la Lumière

Les échantillons sont analysés en DLS afin d'obtenir les diamètres hydrodynamiques moyens \bar{D}_h . Les mesures sont réalisées avec un Horiba Zetasizer SZ-100 et une cellule

Kartell™ STD en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) possédant 4 faces optiques et un chemin optique de 1 cm. Ces cellules sont refermées et si possible, conservées à 4 °C afin de réaliser des suivis dans le temps de certains échantillons.

5.15. Microscopie électronique à transmission

Les liposomes et PL sont observés en TEM avec coloration négative à l'aide d'acide phosphotungstique (*phosphotungstic acid*, PTA) comme agent contrastant. La procédure de préparation principale est la suivante : les micrographies sont prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission FEI™ Tecnai™ G² 20 à filament de LaB₆ opérant à un potentiel d'accélération de 120 kV. Des grilles d'analyses en cuivre recouvertes de carbone et de Formvar (thermoplastique adhésif) sont préalablement hydrophilisées par décharge lumineuse de plasma (*glow discharge*) avec un Quorum Q150T E/S. Sur un morceau de Parafilm propre, 3 gouttes différentes d'environ 5-10 µL sont déposées : une première pour le rinçage avec de l'eau milliQ filtrée sur filtre seringue 0.2 µm, une seconde avec l'échantillon à déposer sur la grille et une troisième avec l'agent contrastant (PTA 2 % dans de l'eau milliQ pH 7.4) également filtré sur filtre seringue 0.2 µm. Après hydrophilisation, la grille est rincée 5 fois avec l'eau milliQ puis déposée 10 minutes sur la goutte d'échantillon. L'excédent est aspiré à l'aide de papier buvard et la grille est ensuite déposée sur la goutte de PTA durant 1 min. L'excédent est à nouveau aspiré comme avant et la grille est laissée environ 15 minutes à l'air libre afin de sécher le plus possible. La grille est ensuite placée sur un porte-grille afin d'être observée en TEM. L'ensemble de ces manipulations ont été réalisées sous l'expertise de Corry Charlier du Service de Microscopie de l'Université de Namur (UNamur).

6. Bibliographie

6. Bibliographie

1. Bost M., Houdart S., *et al.*, Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **35**, 107–115 (2016).
2. Gupta A. & Lutsenko S., Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential, *Future Med. Chem.*, **1**, 1125 (2009).
3. Argüello J. M., Raimunda D., *et al.*, Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **4**, 73 (2013).
4. Dollwet H. H. A. & Sorenson J. R. J., Historic Use of Copper Compounds in Medicine, *Trace Elements in Medicine*, **2**, 80–87 (1985).
5. Copper Development Association Inc., *U.S. EPA Approves Registration of Antimicrobial Copper Alloys*, 25 March 2008 (https://www.copper.org/about/pressreleases/2008/pr2008_Mar_25.html, dernière consultation le 21/04/2022).
6. United States Environmental Protection Agency, *Search Database Database: Copper Development Association (CDA, 82012)* ([https://ordspub.epa.gov/ords/pesticides/f?p=113:19:::":](https://ordspub.epa.gov/ords/pesticides/f?p=113:19:::), dernière consultation le 21/04/2022).
7. Davis J. R., Henry S. D., *et al.*, *ASM Specialty Handbook - Copper and Copper Alloys*, ASM International, (2001).
8. Mikolay A., Huggett S., *et al.*, Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1875–1879 (2010).
9. Chatterjee P., Williams M. D., *et al.*, Effectiveness of copper-impregnated solid surfaces on lowering microbial bio-burden levels in an acute care hospital, *Open Forum Infect. Dis.*, **7**, (2020).
10. Karpanen T. J., Casey A. L., *et al.*, The Antimicrobial Efficacy of Copper Alloy Furnishing in the Clinical Environment: A Crossover Study, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **33**, 3–9 (2012).
11. United States Environmental Protection Agency, *EPA Registers Copper Surfaces for Residual Use Against Coronavirus*, February 10 2021, (<https://www.epa.gov/newsreleases/epa-registers-copper-surfaces-residual-use-against-coronavirus>, dernière consultation le 14/09/2022).
12. Peters K., Pazos M., *et al.*, Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β -lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 10786–10791 (2018).
13. Kohen R. & Nyska A., Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicol. Pathol.*, **30**, 620–650 (2016).
14. Giachino A. & Waldron K. J., Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways, *Mol. Microbiol.*, **114**, 377–390 (2020).
15. Hernández-Montes G., Argüello J. M., *et al.*, Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria, *BMC Microbiol.*, **12**, 1–14 (2012).

16. Quintana J., Novoa-Aponte L., Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 15691 (2017).
17. Santo C. E., Morais, P. V., Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 1341–1348 (2010).
18. Orell A., Navarro C. A., *et al.*, Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals, *Biotechnol. Adv.*, **28**, 839–848 (2010).
19. Solioz M., *Copper Homeostasis in Gram-Negative Bacteria* dans Solioz M., *Copper and Bacteria*, Springer Briefs in Molecular Science - Biometals, 49–80 (2018).
20. Bondarczuk K. & Piotrowska-Seget Z., Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria, *Cell. Biol. Toxicol.*, **29**, 397 (2013).
21. Chaturvedi K. S. & Henderson J. P., Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **5**, 3 (2014).
22. Govers S. K. & Jacobs-Wagner C., *Caulobacter crescentus*: model system extraordinaire, *Current Biology*, **30**, R1151–R1158 (2020).
23. Jenal U., Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control, *FEMS Microbiol Rev.*, **24**, 177–191 (2000).
24. Contreras I., Shapiro, L., *et al.*, Membrane phospholipid composition of *Caulobacter crescentus*, *J. Bacteriol.*, **135**, 1130–1136 (1978).
25. Jones D. E. & Smith J. D., Phospholipids of the differentiating bacterium *Caulobacter crescentus*, *Can. J. Biochem.*, **57**, 424–428 (2011).
26. De Siervo A. J. & Homola A. D., Analysis of *Caulobacter crescentus* Lipids, *J. Bacteriol.*, **143**, 1215–1222 (1980).
27. Lin T. Y. & Weibel D. B., Organization and function of anionic phospholipids in bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 4255–4267 (2016).
28. Lawarée E., Gillet S., *et al.*, *Caulobacter crescentus* intrinsic dimorphism provides a prompt bimodal response to copper stress, *Nat. Microbiol.*, **1**, 16098 (2016).
29. Singh S. K., Roberts S. A., *et al.*, Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): functional role of a methionine-rich sequence, *J. Biol. Chem.*, **286**, 37849–37857 (2011).
30. van Raaij M. J. & Mitraki A., *Natural Fibrous Proteins: Structural Analysis, Assembly, and Applications* dans Ruso J. M., Piñeiro Á., *Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science*, John Wiley and Sons, 219–232 (2013).
31. Carpenter E. P., Beis K., *et al.*, Overcoming the challenges of membrane protein crystallography, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 581 (2008).
32. RCSB Protein Data Bank, *PDB Statistics* (<https://www.rcsb.org/stats>, dernière consultation le 28/11/2022).
33. Schlegel S., Löfblom J., *et al.*, Optimizing Membrane Protein Overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3), *J. Mol. Biol.*, **423**, 648–659 (2012).
34. Grisshammer R., Understanding recombinant expression of membrane proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, 337–340 (2006).

35. Eshaghi S., Hedrén M., *et al.*, An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins, *Protein Science*, **14**, 676–683 (2005).
36. Birch J. & Quigley A., The high-throughput production of membrane proteins, *Emerg. Top. Life Sci.*, **5**, 655–663 (2021).
37. Mathieu K., Javed W., *et al.*, Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from *E. coli* is highly dependent upon the strain, *Scientific Reports*, **9**, 1–15 (2019).
38. Wagner S., Caars L., *et al.*, Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*, *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1527–1550 (2007).
39. Hennaux L., Kohchtali A., *et al.*, Refolding and biophysical characterization of the *Caulobacter crescentus* copper resistance protein, PcoB: An outer membrane protein containing an intrinsically disordered domain, *BBA – Biomembranes*, **1864**, 184038 (2022).
40. Fischer B. E., Renaturation of recombinant proteins produced as inclusion bodies, *Biotechnol. Adv.*, **12**, 89–101 (1994).
41. Michaux C., Pomroy N. C. *et al.*, Refolding SDS-Denatured Proteins by the Addition of Amphipathic Cosolvents, *J. Mol. Biol.*, **375**, 1477–1488 (2008).
42. Roussel G., Perpète E. A., *et al.*, Towards a universal method for protein refolding: The trimeric beta barrel membrane Omp2a as a test case, *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 417–423 (2013).
43. Lopes-Rodrigues M., Matagne A., *et al.*, Structural and functional characterization of *Solanum tuberosum* VDAC36, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **88**, 729–739 (2020).
44. Klöpfer K. & Hagn F., Beyond detergent micelles: The advantages and applications of non-micellar and lipid-based membrane mimetics for solution-state NMR, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **114–115**, 271–283 (2019).
45. Jones M. B. & Garrison J. C., Instability of the G-Protein β_5 Subunit in Detergent, *Anal. Biochem.*, **268**, 126–133 (1999).
46. Infed N., Hanekop N., *et al.*, Influence of detergents on the activity of the ABC transporter LmrA, *BBA – Biomembranes*, **1808**, 2313–2321 (2011).
47. Chipot C., Dehez F., *et al.*, Perturbations of Native Membrane Protein Structure in Alkyl Phosphocholine Detergents: A Critical Assessment of NMR and Biophysical Studies, *Chem. Rev.*, **118**, 3559–3607 (2018).
48. Booth P. J., The trials and tribulations of membrane protein folding in vitro, *BBA – Biomembranes*, **1610**, 51–56 (2003).
49. Kimble-Hill A. C., A review of factors affecting the success of membrane protein crystallization using bicelles, *Frontiers in Biology*, **8**, 261–272 (2012).
50. Sanders C. R. & Landis G. C., Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies, *Biochemistry*, **34**, 4030–4040 (1995).
51. Nath A., Atkins W. M., *et al.*, Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins, *Biochemistry*, **46**, 2059–2069 (2007).
52. Frick M. & Schmidt C., Mass spectrometry - A versatile tool for characterising the lipid environment of membrane protein assemblies, *Chem. Phys. Lipids*, **221**, 145–157 (2019).

53. Bangham A. D., Standish M. M., *et al.*, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-277 (1965).
54. Ashtiani H. R. A., Bishe P., *et al.*, Liposomes in Cosmetics, *Journal of Skin and Stem Cell*, **3**, 65815 (2016).
55. Lasic D. D., Novel applications of liposomes, *Trends Biotechnol.*, **16**, 307–321 (1998).
56. Egbaria K. & Weiner N., Liposomes as a topical drug delivery system, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **5**, 287–300 (1990).
57. Kaasgaard T. & Andresen T. L., Liposomal cancer therapy: exploiting tumor characteristics, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **7**, 225–243 (2010).
58. De Gier J., Mandersloot J. G., *et al.*, Lipid composition and permeability of liposomes, *BBA – Biomembranes*, **150**, 666–675 (1968).
59. Du Plessis J., Ramachandran C., *et al.*, The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage, *Int. J. Pharm.*, **127**, 273–278 (1996).
60. Yang L., Catalano C., *et al.*, A native cell membrane nanoparticles system allows for high-quality functional proteoliposome reconstitution, *BBA Advances*, **1**, 100011 (2021).
61. Dilworth M. V., Findlay H. E. *et al.*, Detergent-free purification and reconstitution of functional human serotonin transporter (SERT) using diisobutylene maleic acid (DIBMA) copolymer, *BBA – Biomembranes*, **1863**, (2021).
62. Galkin M. A., Russell A. N., *et al.*, Detergent-free Ultrafast Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid Bilayers Using Fusogenic Complementary-charged Proteoliposomes, *J. Vis. Exp.*, **2018**, 56909 (2018).
63. Banerjee R. K. & Datta A. G., Proteoliposome as the model for the study of membrane-bound enzymes and transport proteins, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **50**, 3–15 (1983).
64. Kreir M., Farre C., *et al.*, Rapid screening of membrane protein activity: electrophysiological analysis of OmpF reconstituted in proteoliposomes, *Lab Chip*, **8**, 587–595 (2008).
65. Rigaud J. L., Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **35**, 753–766 (2002).
66. Das B. B., Nothnagel H. J., *et al.*, Structure determination of a membrane protein in proteoliposomes, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 2047–2056 (2012).
67. Mayeux G., Gayet L., *et al.*, Cell-free expression of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* for vaccine purposes, *Life Sciences Alliance*, **4**, 1-16 (2021).
68. Marks M. E., Castro-Rojas C. M., *et al.*, The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*, *J. Bacteriol.*, **192**, 3678–3688 (2010).
69. Li P., Nayeri N., *et al.*, PcoB is a defense outer membrane protein that facilitates cellular uptake of copper, *Protein Science*, **31**, e4364 (2021).
70. Waterhouse A., Bertoni M., *et al.*, SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296–W303 (2018).
71. Peng J. & Xu J., Raptorx: Exploiting structure information for protein alignment by statistical inference, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **79**, 161–171 (2011).

72. Jumper J., Evans R., *et al.*, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583–589 (2021).
73. Høie M. H., Kiehl E. N., *et al.*, NetSurfP-3.0: accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning, *Nucleic Acids Res.*, **50**, W510–W515 (2022).
74. Deiana A., Forcelloni S., *et al.*, Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell, *PLoS One*, **14**, e0217889 (2019).
75. Xue B., Dunbrack R. L., *et al.*, PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids, *BBA - Proteins and Proteomics*, **1804**, 996–1010 (2010).
76. Hayat S., Peters C., *et al.*, Inclusion of dyad-repeat pattern improves topology prediction of transmembrane β -barrel proteins, *Bioinformatics*, **32**, 1571–1573 (2016).
77. Damle M. S., Singh A. N., *et al.*, The YcnI protein from *Bacillus subtilis* contains a copper-binding domain, *J. Biol. Chem.* **297**, 101078 (2021).
78. Bolotin S. N., Panyushkin V. T., *et al.*, Complexation of Copper(II) with L-Histidine in an Aqueous Solution as Probed by EPR, *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, **49**, 1707-1711 (2004).
79. Parmentier M., *Development of a microbiologic module for hydrobiogeochemical modelling and applications on arsenic mobility*, École Nationale Supérieure des Mines de Paris (2006).
80. Studier F. W., Rosenberg A. H., *et al.*, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.*, **185**, 60–89 (1990).
81. Ha E. J., Kim Y. J., *et al.* Purification of His-tagged proteins using Ni²⁺-poly(2-acetamidoacrylic acid) hydrogel, *Journal of Chromatography B*, **876**, 8–12 (2008).
82. Michaux C., Pouyez J., *et al.*, Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS: A structural study, *BMC Struct. Biol.*, **8**, 1–7 (2008).
83. Michaux C., Roussel G., *et al.*, Unravelling the mechanisms of a protein refolding process based on the association of detergents and co-solvents, *Journal of Peptide Science*, **22**, 485–491 (2016).
84. Wei Y., Thyparambil A. A., *et al.*, Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230nm, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1844**, 2331–2337 (2014).
85. Nies D. H., Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes, *Plasmid*, **27**, 17–28 (1992).
86. Silver S. & Phung L. T., Bacterial heavy metal resistance: new surprises, *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 753–789 (1996).
87. Silver S., Bacterial resistances to toxic metal ions--a review, *Gene*, **179**, 9–19 (1996).
88. Dominguez D. C., Calcium signalling in bacteria, *Mol. Microbiol.*, **54**, 291–297 (2004).
89. Rosen B. P., Bacterial calcium transport, *BBA - Reviews on Biomembranes*, **906**, 101–110 (1987).
90. Galera-Laporta L., Comerci C. J., *et al.*, IonoBiology: The functional dynamics of the intracellular metallome, with lessons from bacteria, *Cell. Syst.*, **12**, 497–508 (2021).

91. Lichtenberg D. & Barenholz Y., Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation, *Methods Biochem. Anal.*, **33**, 337–462 (1988).
92. Shailesh, S., Neelam S., *et al.*, Liposomes: A review, *J. Pharm. Res.*, **2**, 1163–1167 (2009).
93. Lorin A., Flore C., *et al.*, Les liposomes : description, fabrication et applications, **8**, 163-176 (2004).
94. Campelo F. & Kozlov M. M., Sensing Membrane Stresses by Protein Insertions, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003556 (2014).
95. Roberts S. A., Neelaveni N., *et al.*, A novel filtration approach to create small unilamellar liposomes for drug delivery, *2017 IEEE Healthcare Innovations and Point of Care Technologies (HI-POCT 2017)*, **2017-December**, 64–67 (2017).
96. Rigaud J. L. & Lévy D., Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes, *Methods Enzymol.*, **372**, 65–86 (2003).
97. Lévy D., Gulik A., *et al.*, Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents, *BBA – Biomembranes*, **1107**, 283–298 (1992).
98. Santos F. R., Ferraz D. B., *et al.*, Mimetic membrane system to carry multiple antigenic proteins from *Leishmania amazonensis*, *Journal of Membrane Biology*, **210**, 173–181 (2006).
99. Le Gorrec B., Montella C., *et al.*, *Équilibres chimiques et électrochimiques en solution aqueuse*, Hermann (2004).
100. Good N. E. & Izawa S., Hydrogen ion buffers, *Methods Enzymol.*, **24**, 53–68 (1972).
101. Ferguson W. J., Braunschweiger K. I., *et al.*, Hydrogen ion buffers for biological research, *Anal. Biochem.*, **104**, 300–310 (1980).
102. Good, N. E., Winget D., *et al.*, Hydrogen Ion Buffers for Biological Research, *Biochemistry*, **5**, 467–477 (2002).
103. Gasteiger E., Hoogland C., *et al.*, *Protein Analysis Tools on the ExPASy Server* in Walker J. M., *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607 (2005).