



HAL
open science

Étude structurale du système d'efflux membranaire MexXY-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*

Gilles Phan

► **To cite this version:**

Gilles Phan. Étude structurale du système d'efflux membranaire MexXY-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie [q-bio.BM]. Université René Descartes - Paris V, 2008. Français. NNT: . tel-00512797

HAL Id: tel-00512797

<https://theses.hal.science/tel-00512797>

Submitted on 31 Aug 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ECOLE DOCTORALE DU MEDICAMENT

Année 2007-2008

N°

THESE

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
présentée et soutenue publiquement par

Gilles PHAN

le 12 juin 2008

Titre :

**ETUDE STRUCTURALE DU SYSTEME D'EFFLUX MEMBRANAIRE MEXXY-OPRM
IMPLIQUE DANS LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES
CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Membres du jury

Mme Catherine ETCHEBEST <i>Professeur – Université Paris Diderot</i>	Président du jury
Mme Andréa DESSEN <i>Directeur de recherche – CNRS</i>	Rapporteur
Mr Jean-Marie PAGES <i>Directeur de recherche – INSERM</i>	Rapporteur
Mr Vincent VILLERET <i>Directeur de recherche – CNRS</i>	Examineur
Mr Arnaud DUCRUIX <i>Professeur – Université Paris Descartes</i>	Directeur de thèse
Mme Isabelle BROUTIN <i>Chargé de recherche – CNRS</i>	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au *Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques* (UMR 8015 CNRS), à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris Descartes.

Je remercie tout d'abord Arnaud Ducruix, directeur du laboratoire et directeur de ma thèse, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail, de sa confiance et de son soutien.

Je remercie sincèrement Isabelle Broutin qui a également dirigé ma thèse. Ses qualités scientifique et humaine ont été très enrichissantes durant ces quatre années de travail.

Un grand merci à Houssain Benabdelhak avec qui j'ai fait mes premiers pas dans le laboratoire. Merci d'avoir pris le temps de me former.

Je remercie Andréa Dessen et Jean-Marie Pagès d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que Catherine Etchebest et Vincent Villeret d'avoir accepté d'être membres du jury.

Je remercie nos collaborateurs : Myriam Reffay, Nicolas Taulier et Wladimir Urbach du *Laboratoire de Physique Statistique* à l'École Normale Supérieure de Paris; Catherine Llanes, Lucie Vettoretti et Patrick Plésiat du *Laboratoire de Bactériologie* au CHU de Besançon.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire, aussi bien les anciens que les nouveaux, pour leur sympathie et leur disponibilité.

Enfin, je remercie sincèrement ma famille (mes parents et mes deux frères) et mes amis. Je n'aurai jamais pu réaliser ce travail sans votre soutien. Merci pour tout.

À mon père.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	5
CHAPITRE I : INTRODUCTION	7
1) Les antibiotiques	9
2) Les principales classes d'antibiotiques	10
3) Cibles des antibiotiques	12
4) La résistance aux antibiotiques	15
5) Les différents systèmes de sécrétion chez la bactérie à Gram-négatif	18
6) Système de sécrétion de types I : les pompes d'efflux	21
7) Architecture des pompes d'efflux de la famille RND	26
8) Structure des OMF, porines de la famille "TolC"	27
9) Structure de l'adaptateur périplasmique MFP	32
10) Structure du transporteur RND	37
11) Assemblage du système d'efflux tripartite	46
12) La résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
13) Une nouvelle stratégie thérapeutique : l'inhibition des pompes d'efflux RND	61
14) Présentation de la thèse	64
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	65
Méthodes biochimiques	67
1) Production et purification des protéines recombinantes	69
2) BN-PAGE (<i>Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)	79
3) Marquage des cystéines N-terminales avec le MTS-EMCA	80
4) Cristallisation des protéines	81
Méthodes biophysiques	83
5) Cristallographie des rayons X	85
6) Spectrométrie de masse	107
7) Spectroscopie RMN	107
Méthodes bioinformatiques	109
8) Analyse des modes normaux	111
9) Modèle structural par homologie	113

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	115
La porine OprM	117
1) Expression, purification et cristallisation d'OprM	119
2) Structures cristallographiques d'OprM	125
3) Analyse structurale d'OprM	137
4) Modèle d'ouverture des porines par les modes normaux	166
L'adaptateur MexX	187
5) Une isoforme de MexX	189
6) Production et purification des différentes constructions de MexX	190
7) Cristallisation de MexX	192
8) Cristallisation de MexXt	195
9) Caractérisation biochimique du domaine C-terminal de MexX	196
Etude préliminaire de l'assemblage	203
10) Oligomérisation des protéines MexA et MexX	205
11) Stoechiométries du complexe binaire OprM-MexA	208
Le transporteur MexY	213
12) Clonage et production de MexY	215
13) Modélisation de la structure de MexY	215
14) Analyse des mutants cliniques de MexY	218
15) La sélectivité des substrats	222
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	227
BIBLIOGRAPHIE	235
ANNEXE : alignement multiple des RND	259
PUBLICATIONS	265

ABBREVIATIONS

BET = Bromure d'Ethidium

BN-PAGE = Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

β OG = β -Octyl Glucoside

CLHP = Chromatographie Liquide Haute Performance

DDM = Dodecyl Maltoside

DO = Densité Optique

EPI = Efflux Pump Inhibitor

ESRF = European Synchrotron Radiation Facility

FITC = Fluorocéine Isothiocyanate

FRAPP = Fluorescence Recovery after fringe Pattern Photobleaching

IUP = Intrinsically Unstructured Protein

KIH = Knobs-into-Hole

MDR = Multi Drug Resistance

MFP = Membrane Fusion Protein

MTS-EMCA = N-[2-methanethiosulfonyl-ethyl]-7-methoxycoumarin-4-acetamide

NMA = Normal Mode Analysis

OMF = Outer Membrane Factor

PCR = Polymerase Chain Reaction

PDB = Protein Data Bank

PEG = PolyEthylen Glycol

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD = Root Mean Square Deviation

RND = Resistance Nodulation Division

SDS-PAGE = Sodium Dodécyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TFA = Trifluoroacetate

v/v = volume per volume

w/v = weight per volume

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1) LES ANTIBIOTIQUES

Proposé par Vuillemin en 1889, « l'antibiotique » est un « principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie ».

La pénicilline, qui a fait l'objet d'une thèse de Médecine en 1897 par Ernest Duchesne, fut par la suite identifiée en tant qu'antibiotique par Alexander Fleming en 1929. Mais ce n'est qu'en 1940 que le terme « antibiotique » fut introduit par René Dubos, puis clairement défini par le microbiologiste américain Selman Abraham Waksman en 1943 : « toutes substances chimiques produites par des micro-organismes capables d'inhiber le développement et de détruire des bactéries et d'autres micro-organismes ».

Issus du Grec *antibios* qui signifie « contre la vie », les antibiotiques sont des substances chimiques naturellement produites par les bactéries ou les champignons. Dans le règne microbien, la finalité de ces « armes chimiques » est d'arrêter la prolifération ou même d'entraîner la mort cellulaire des bactéries, une lutte environnementale sans merci entre les micro-organismes pour la colonisation du territoire et la pérennité de leur espèce. Dans le premier cas, les antibiotiques sont dits « bactériostatiques » et dans le deuxième cas, on les qualifie de « bactéricides » (Walsh, 2003). Notons que le terme « d'antibiotique » est réservé aux agents chimiques n'agissant que sur les bactéries. Pour les champignons, on parlera « d'antifongique ».

Après l'isolement des premiers antibiotiques dans les années 40, cette grande découverte a été rapidement mise à profit dans la lutte contre les maladies infectieuses, puisque ces molécules n'ont aucun effet sur les cellules eucaryotes : c'est l'avènement de l'antibiothérapie.

La plupart des antibiotiques ont été découverts et mis sur le marché entre les années 40 et 60 à partir d'extraction de souches microbiennes naturelles, pour la plupart des champignons et des acinobactéries. Leurs effets sont testés à l'aveugle sur les bactéries pathogènes, d'abord *in situ* sur des plaques de culture, ensuite *in vivo* dans des modèles animaux infectés, avant de subir les différentes phases cliniques nécessaires au développement d'un médicament. Les antibiotiques désignent des produits d'origine microbienne, donc naturelle. Cependant, il existe des molécules ayant un « effet antibiotique » mais entièrement issues de la synthèse chimique : on parlera plus volontiers « d'antibactériens » (Overbye & Barrett, 2005).

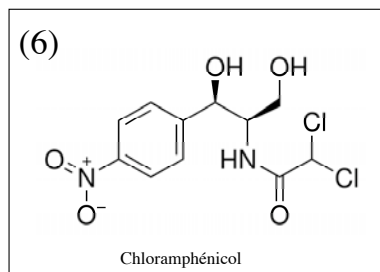
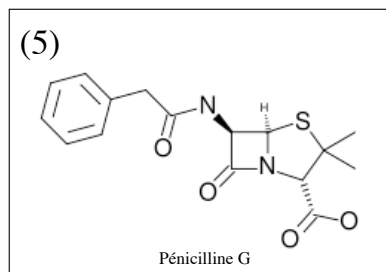
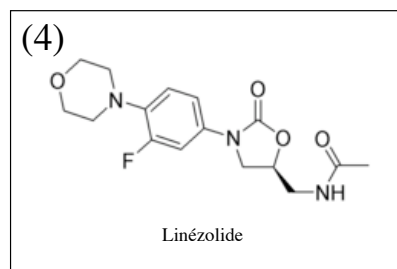
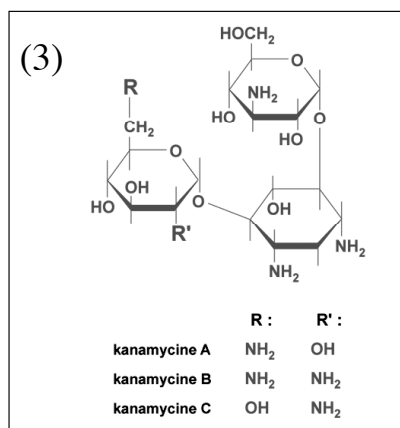
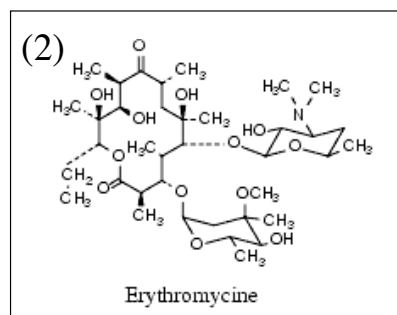
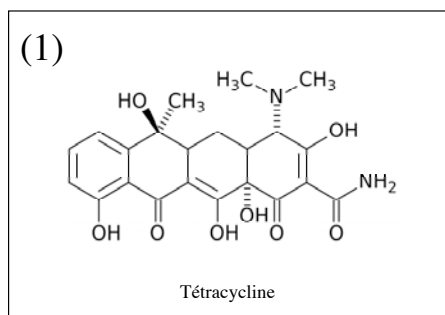
La recherche des antibactériens est moins florissante que celle des antibiotiques, mais c'est par cette voie que l'antibiothérapie a commencé dans les années 30 avec les sulfamides, première famille d'antibactérien découverte par Gerhard Domagk. Ensuite sont arrivés les quinolones dans les années 60, et plus récemment l'oxazolidinone autorisé aux Etats-Unis en 2000 (Leeb, 2004).

Dans les années 70, un troisième axe de recherche tire logiquement son épingle du jeu en convergeant les deux approches précédentes : il s'agit des molécules « héli-synthétiques », c'est-à-dire produites après modification chimique d'antibiotiques d'origine naturelle, comme les β -lactames ou les macrolides. Dans ce cas, on parlera d'antibiotiques même si la source n'est pas totalement naturelle (Mascaretti, 2003 ; Pelaez, 2006). Mais depuis les années 80, le marché des antibiotiques est largement dominé par ces molécules, le plus souvent issues de la chimie combinatoire des substances naturelles connues (Newman & Cragg, 2007).

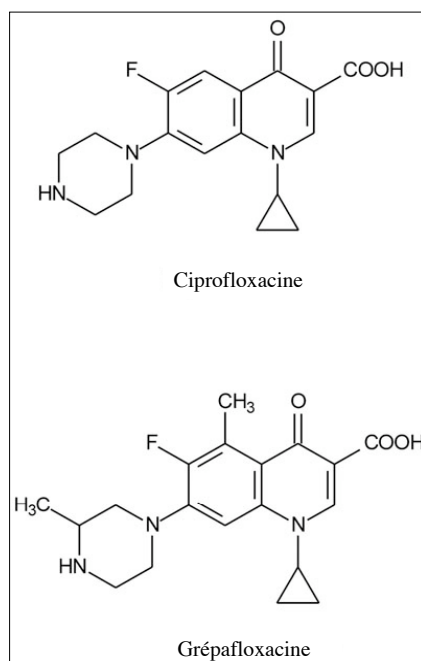
2) LES PRINCIPALES CLASSES D'ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont de nature chimique très nombreuse et variable. Mais la majorité est obtenue par héli-synthèse à partir d'une structure de base commune d'origine naturelle qui, historiquement, donne le nom à la famille de l'antibiotique. Ainsi, les 4 familles importantes sont (1) les cyclines (*e.g.* tétracycline), (2) les macrolides (*e.g.* érythromycine), (3) les aminosides (*e.g.* kanamycine), (4) l'oxazolidinone (*e.g.* linézolide), (5) les β -lactamines (*e.g.* pénicilline) et (6) les phénicolés (*e.g.* chloramphénicol).

Les structures développées sont représentées ci-dessous :



Une septième famille d'antibiotique se démarque des autres par son origine totalement synthétique : il s'agit des quinolones dont font partie la ciprofloxacine et la grépafloracine.



Actuellement, deux autres critères sont utilisés pour classer les antibiotiques. Un premier critère considère l'impact économique de l'antibiotique sur le marché de l'industrie pharmaceutique, les céphalosporines étant en tête de liste avec 8,5 millions de dollars par an de chiffre de vente en 1997 (les antibiotiques représentent globalement 24 milliards de dollars de chiffre de vente par an ([Walsh, 2003](#))). Un deuxième critère regroupe les antibiotiques en fonction de l'agent infectieux en cause ([Levy, 1998](#)).

3) CIBLES DES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques ont principalement trois cibles spécifiques qui sont essentielles pour la croissance bactérienne et qui se distinguent des cellules eucaryotes (Figure 1, [Walsh, 2000](#)) :

- (1) Synthèse de la paroi bactérienne. La paroi de la bactérie est constituée d'une membrane lipidique associée à un réseau de peptidoglycanes qui confère une résistance mécanique. Les enzymes impliquées dans la réticulation des peptidoglycanes (la transpeptidase ou la transglycosidase), peuvent être inhibées de façon irréversible. La bactérie est alors très sensible à la pression osmotique. D'autres antibiotiques ne ciblent pas directement les enzymes, mais séquestrent les peptides substrats (précurseurs D-Ala-D-Ala) impliqués dans la formation du peptidoglycane. La conséquence est la même, c'est-à-dire l'arrêt de la formation des peptidoglycanes et une fragilisation de la paroi cellulaire ;

- (2) Synthèse des protéines. Il s'agit de la machinerie de traduction des messagers. Le ribosome ou la peptidyl-transférase de la bactérie sont suffisamment différents de leurs analogues eucaryotes pour être sélectivement ciblés ;

- (3) Réplication et réparation de l'ADN. Les enzymes ciblées sont les ADN gyrases (ou topo-isomérases) qui régulent l'état de surenroulement de l'ADN en induisant temporairement des brèches dans le squelette phospho-ester lors de la réplication. L'action des antibiotiques sur les ADN gyrases inhibe le processus de raboutage. Cela entraîne une accumulation excessive de cassures dans l'ADN qui ne sont plus prises en charge par la machinerie de réparation, entraînant ainsi la mort cellulaire.

Figure 1 : Représentation des principales cibles des antibiotiques.

Cibles des antibiotiques

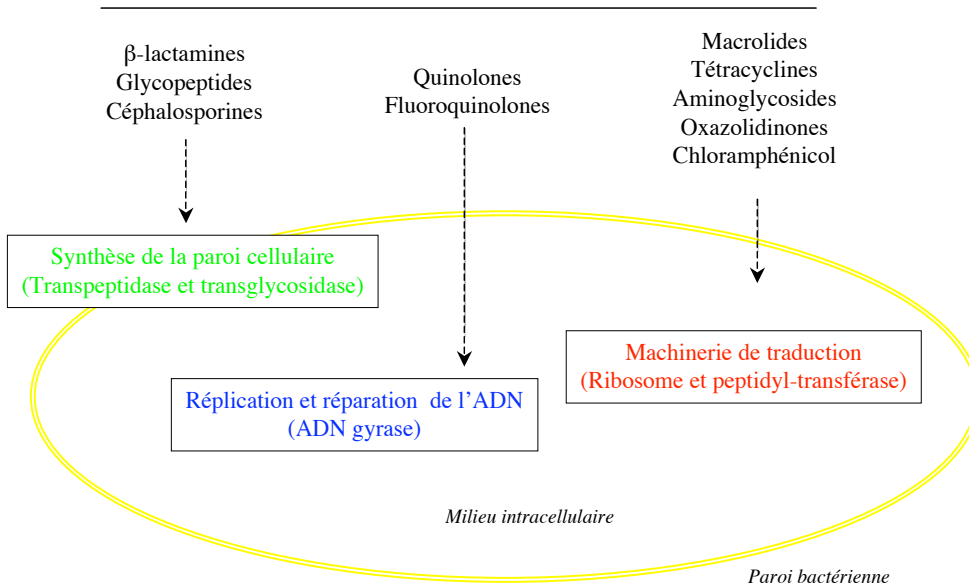
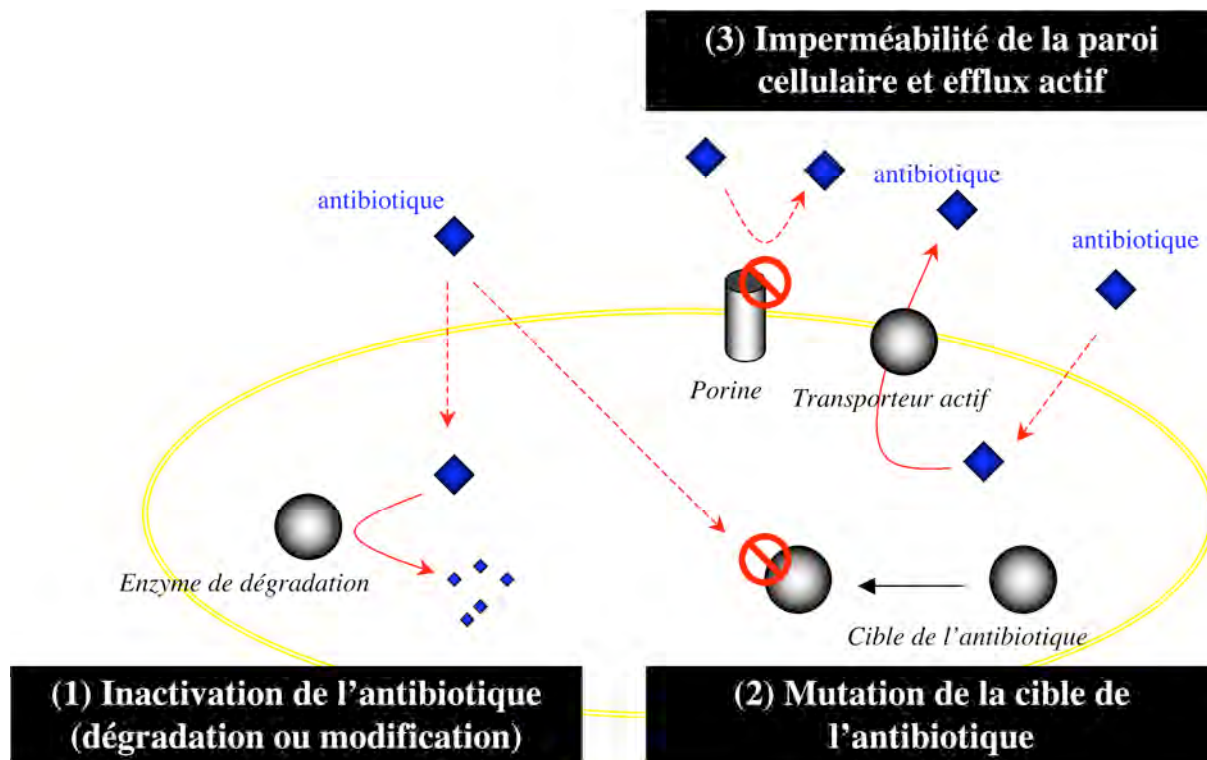


Figure 2 : Illustration des trois principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez la bactérie.



4) LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Comme l'avait prévu Flemming dans les années 30, des formes de résistance bactérienne ont déjà été décrites cinq ans après les premières prescriptions de pénicilline (premier antibiotique utilisé en médecine). Si ce phénomène de « pharmaco-résistance » était d'abord peu répandu et n'inquiétait pas les autorités, il s'agit aujourd'hui d'un problème de santé publique. Depuis plus de 20 ans, la découverte de nouveaux antibiotiques efficaces se fait rare face à une résistance en constante augmentation.

On connaît actuellement trois stratégies de résistance développées par les bactéries (Figure 2) :

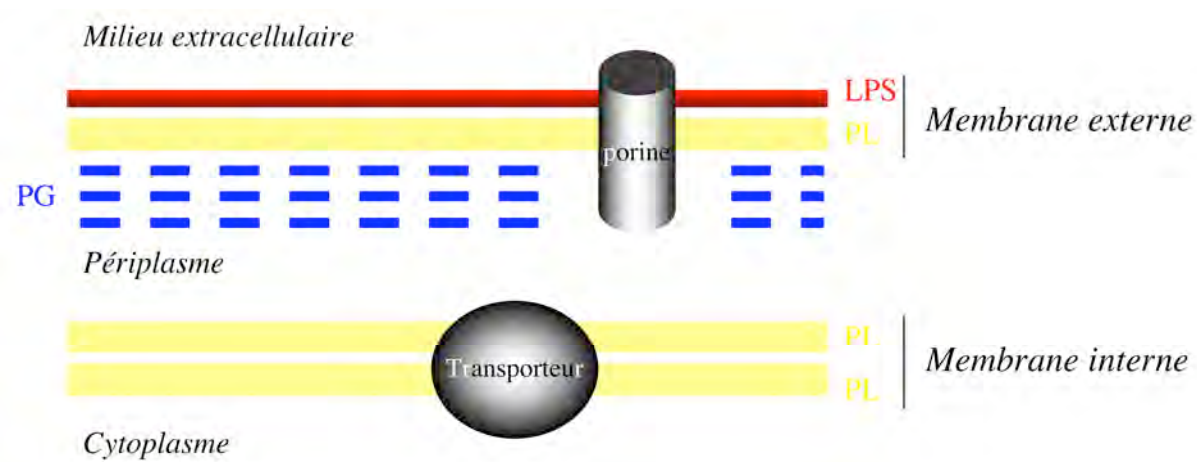
- (1) La production d'enzymes dégradant ou inactivant l'antibiotique. L'exemple typique est celui des β -lactamases qui sont majoritairement à l'origine de la résistance aux β -lactames, notamment avec l'apparition des β -lactamases à large spectre d'action ou ESBL pour *Extended-Spectrum-Beta-Lactamase* (Thomson & Smith, 2000 ; Babic *et al.*, 2006). Ces enzymes sont sécrétées dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram-négatif et hydrolysent les antibiotiques constitués d'un noyau β -lactame, comme la pénicilline ou les céphalosporines. Un autre exemple est celui de la résistance aux aminoglycosides. Cette fois il s'agit d'une modification chimique qui empêche la fixation de l'antibiotique sur sa cible. Les enzymes en question sont les O-phosphotransférases, les O-adényltransférases ou les N-acétyltransférases (Wright, 1999). Enfin, la résistance au chloramphénicol est également liée à une enzyme de modification : une O-acétyltransférase (Murray & Shaw, 1997).
- (2) La modification de la cible de l'antibiotique. Les cibles des antibiotiques sont majoritairement des protéines. Leur mutation peut conduire à une perte de reconnaissance de l'antibiotique qui devient alors inactif. C'est le cas des PLP (Protéines de Liaison à la Pénicilline) qui sont les enzymes assurant l'assemblage des peptidoglycanes de la paroi bactérienne (transglycosidase et transpeptidase) et qui sont ciblées par les β -lactames, classe d'antibiotique dont fait partie la pénicilline. La mutation des PLP provoque une diminution de l'affinité pour ces antibiotiques (Hakenbeck & Coyette, 1998).

Dans le cas des fluoroquinolones, la résistance est liée à la mutation des topoisomérases (Hooper, 2000). Et enfin, la modification du ribosome confère la résistance aux tétracyclines (Chopra & Roberts, 2001) et aux macrolides (Leclercq & Courvalin, 1991).

- (3) La réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique. La résistance innée des bactéries aux antibiotiques est en partie liée à l'imperméabilité naturelle de la paroi cellulaire. Cela est particulièrement vrai chez les bactéries à Gram-négatif dont la paroi cellulaire est constituée de deux membranes lipidiques : une membrane interne et une membrane externe séparées par un espace périplasmique dans lequel on trouve de nombreuses molécules comme des oligosaccharides, des protéines solubles ou encore un réseau de peptidoglycanes (Figure 3). Contrairement à la membrane interne, la membrane externe est une bicouche asymétrique constituée de phospholipides et de LPS (Lipopolysaccharides). Les peptidoglycanes et les LPS sont à l'origine de la rigidité de la membrane externe et sont donc responsables de la faible diffusion des molécules à travers la paroi cellulaire, dont les antibiotiques (Nikaido, 2003). Mais la concentration intracellulaire d'antibiotique peut être significativement réduite par la synergie de deux événements : la modification (ou l'absence) des porines et le transport actif vers l'extérieur de la cellule par des pompes d'efflux (Li & Nikaido, 2004).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement au mécanisme d'efflux actif, d'importance clinique croissante. Les pompes d'efflux font parties des systèmes de sécrétion de type I chez la bactérie à Gram-négatif. De façon générale, les systèmes de sécrétion de la bactérie font l'objet de recherches importantes car ils représentent des cibles thérapeutiques prometteuses (Remaut & Waksman, 2004). Leur étude structurale est actuellement un défi car il s'agit souvent de complexes membranaires de grande taille. Ces systèmes de sécrétion permettent à la bactérie de sécréter des toxines, d'échanger l'information génétique (dont les gènes de résistances aux antibiotiques), d'infecter la cellule cible ou encore de coloniser l'environnement. Parmi les six systèmes de sécrétion que nous allons brièvement passer en revue, le système de sécrétion de type I est le seul directement impliqué dans la résistance aux antibiotiques par efflux actif.

Figure 3 : Schéma de la paroi cellulaire d'une bactérie à Gram-négatif. La membrane interne est un double feuillet de phospholipides (PL). La membrane externe est constituée d'une bicouche asymétrique de lipopolysaccharides (LPS) et de phospholipides (PL). Les deux membranes sont séparées par le périplasma dans lequel se trouve un réseau de peptidoglycane (PG). De nombreuses protéines sont insérées dans ces membranes, dont les porines (membrane externe) et les transporteurs (membrane interne).

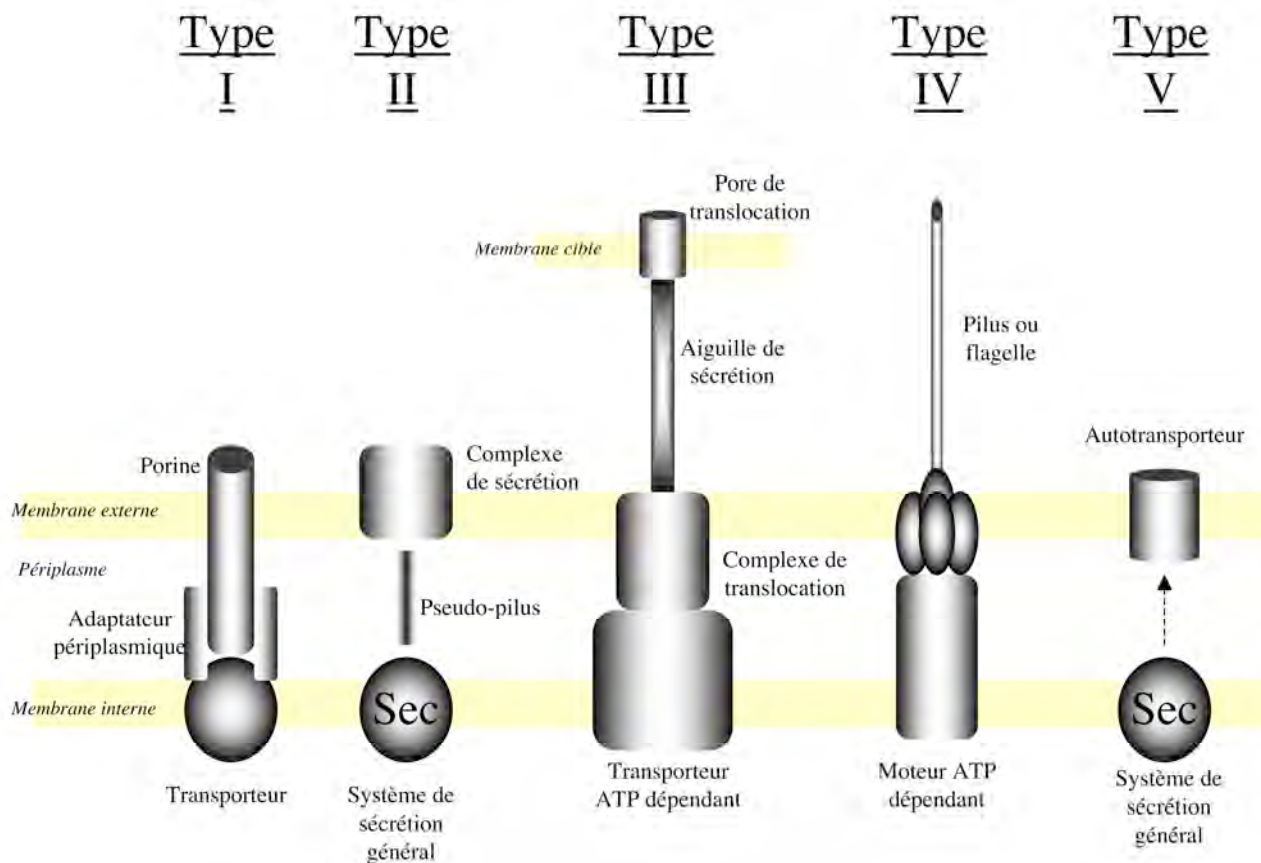


5) LES DIFFERENTS SYSTEMES DE SECRETION CHEZ LA BACTERIE A GRAM-NEGATIF

On connaît aujourd'hui six systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram-négatif (Figure 4). Ces systèmes diffèrent par leur organisation macromoléculaire et par le type de substrat transporté. Ils permettent essentiellement à la bactérie de s'adapter à l'environnement et d'infecter les cellules cibles (Economou *et al.*, 2006 ; Remaut & Waksman, 2004 ; Girard & Mourez, 2006).

- Le système de sécrétion de type I correspond aux pompes d'efflux qui permettent la sécrétion de petites molécules, comme les antibiotiques, mais aussi des protéines impliquées dans la virulence. Ce système, qui nous intéressera plus particulièrement dans le cadre de la présente thèse, participe à la pathogénicité et à la résistance aux antibiotiques. L'efflux actif s'effectue grâce à un transporteur dans la membrane interne associé à une porine insérée dans la membrane externe. Une protéine périplasmique assure la cohésion du complexe protéique.
- Le système de sécrétion de type II participe à la virulence bactérienne. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, ce système permet la sécrétion de toxines comme l'élastase, la phospholipase C ou l'exotoxine A (Johnson *et al.*, 2006). Le transport passe par le système de sécrétion général *Sec* de la membrane interne (Xie & Dalbey, 2008), un pseudo-pilus périplasmique et un pore formé dans la membrane externe.
- Le système de sécrétion de type III permet l'interaction de la bactérie avec la cellule cible et la sécrétion de diverses molécules dans le but d'une infection ou d'une symbiose (Galan & Collmer, 1999). Le système, appelé « injectisome », est composé de deux anneaux permettant le passage des molécules à travers la paroi bactérienne, d'une aiguille de sécrétion extracellulaire et d'un pore de translocation inséré dans la membrane de la cellule cible.

Figure 4 : Schéma illustrant les différents systèmes de sécrétion chez la bactérie à Gram-négatif. Il n'existe pas encore de modèle pour le système de sécrétion de type VI.



- Le système de sécrétion de type IV est impliqué dans les processus très variés, comme la sécrétion de toxines, la transformation d'ADN, l'adhésion cellulaire et la mobilité bactérienne (Ding *et al.*, 2003). Le système est constitué d'un pilus extracellulaire formé d'un assemblage de pilines (Craig *et al.*, 2004). La croissance ou la rétraction du pilus dépend d'un complexe transmembranaire ATPasique.
- Le système de sécrétion de type V correspond à la famille des autotransporteurs qui assurent le passage de différentes molécules et peptides pathogènes à travers la membrane externe (Henderson *et al.*, 2004). Les autotransporteurs sont constitués d'un domaine transporteur N-terminal et d'un domaine β C-terminal impliqué dans l'autotranslocation du système vers la membrane externe. Les autotransporteurs passent par la voie de sécrétion générale *Sec* (Xie & Dalbey, 2008) pour atteindre la membrane externe.
- Le système de sécrétion de type VI a été récemment identifié chez *P. aeruginosa* comme étant codé par le locus HSI-I (Mougous *et al.*, 2006). Fortement impliqué dans les infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose, la structure de ce système reste inconnue, mais on sait qu'il permet de sécréter un facteur de virulence appelé Hcp1 (*Hemolysin coregulated protein*). Ce dernier est constitué d'un tonneau β d'environ 40 Å formé par l'association de six monomères.

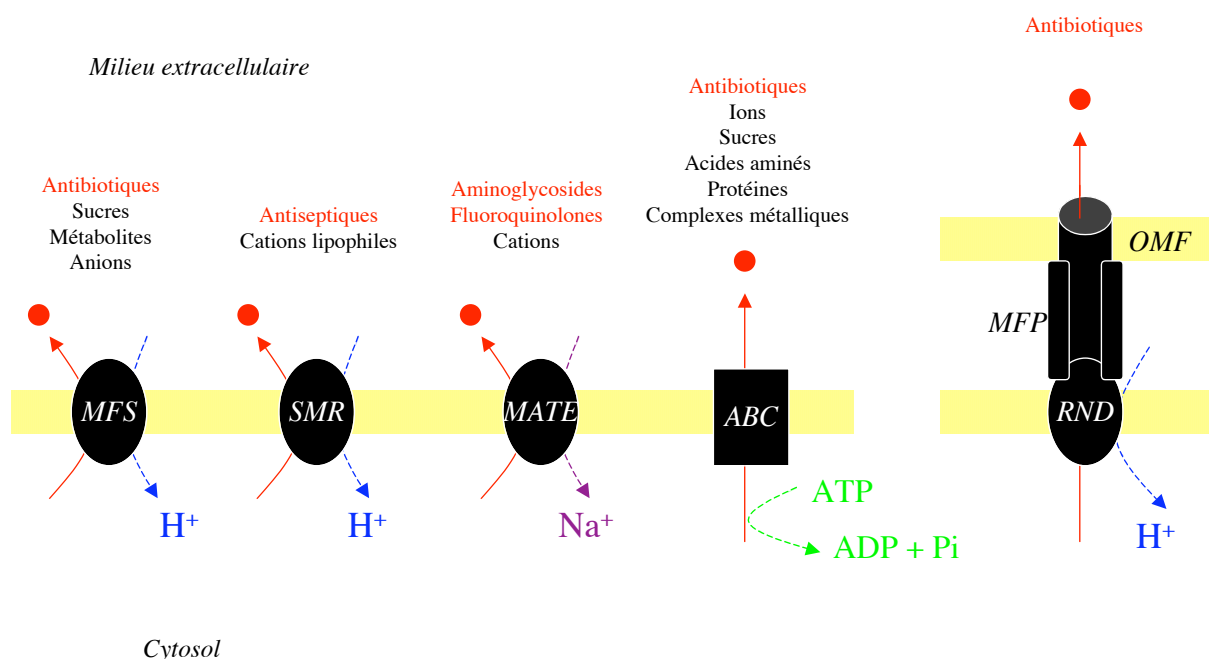
À présent nous allons nous focaliser sur les systèmes de sécrétion de type I dont fait partie la pompe d'efflux MexXY-OprM, objet de mon sujet de thèse, en insistant sur les aspects structuraux.

6) SYSTEME DE SECRETION DE TYPE I : LES POMPES D'EFFLUX

Les pompes d'efflux sont des transporteurs qui peuvent être spécifiques à un type de substrat et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotique. Par exemple les transporteurs de la famille MFS (*Major Facilitator Superfamily*) Tet de *S. aureus* qui est spécifique des tétracyclines ou encore Mef de *S. pneumoniae* qui est spécifique des macrolides (Markham & Neyfakh, 2001). Mais la plupart des transporteurs peuvent prendre en charge des molécules de structure très différente et ainsi contribuer de manière significative à la multi-résistance aux antibiotiques MDR (*multidrug-resistance* ; Poole, 2004).

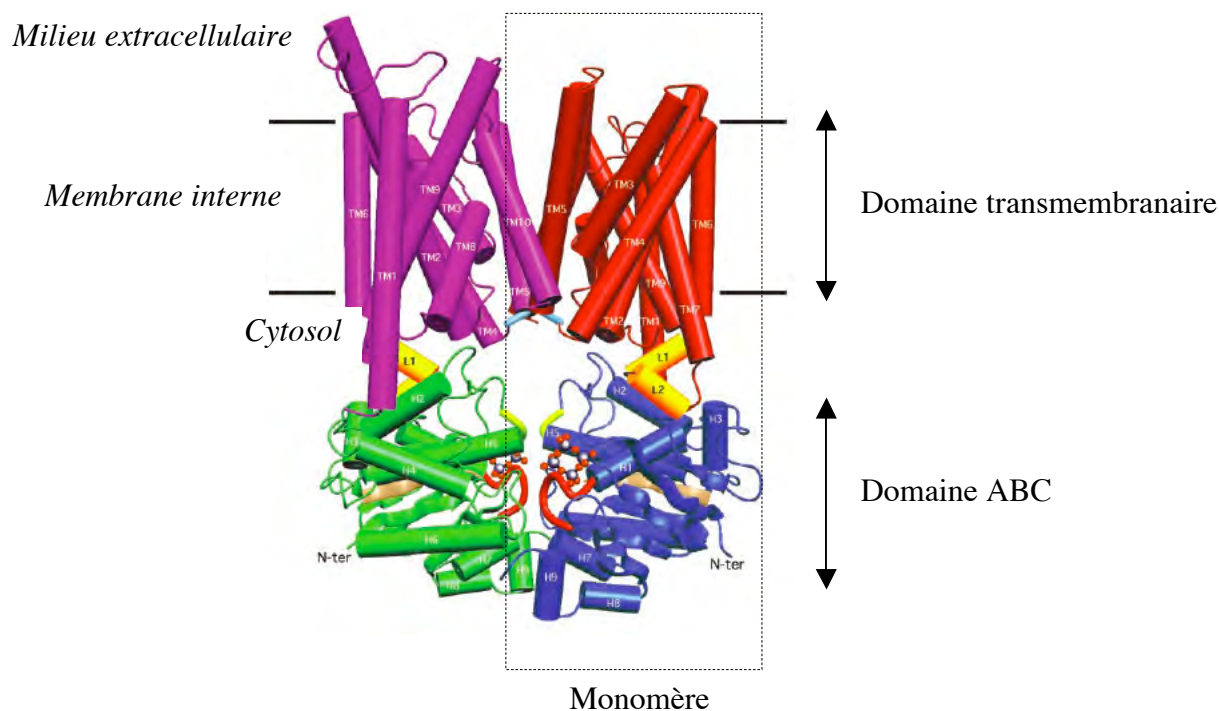
Les pompes d'efflux sont des transporteurs actifs. Il existe 5 familles de pompes d'efflux classées selon deux critères (Figure 5) : d'une part la source d'énergie nécessaire à leur fonctionnement (gradient électrochimique ou hydrolyse de l'ATP), d'autre part leur structure second-tertiaire.

Figure 5 : Schéma représentant les 5 familles de pompe d'efflux chez les procaryotes ainsi que les substrats généralement transportés (Li & Nikaido, 2004). MFS-major facilitator superfamily ; SMR-small multidrug resistance ; MATE-multidrug and toxic compound extrusion ; ABC-atp binding cassette ; RND-resistance nodulation cell division ; OMF-outer membrane factor ; MFP-membrane fusion protein.



(1) Les transporteurs ABC (*ATP-binding-cassette*)

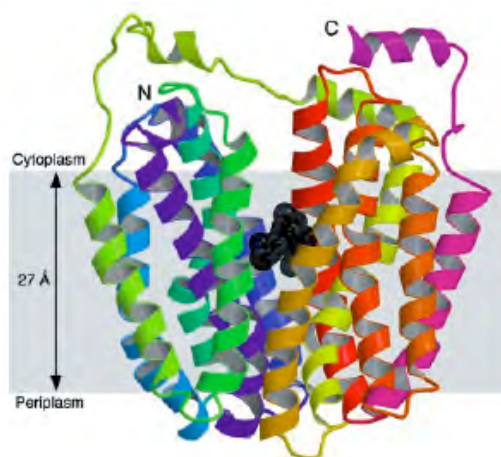
Utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, les transporteurs ABC constituent la plus vaste famille de protéines (Lage, 2003). Ils sont surtout connus pour leur implication dans la résistance multiple des cellules cancéreuses. Chez les bactéries, ces transporteurs sont généralement organisés en homodimères (Li & Nikaido, 2004). Chaque monomère est constitué d'un domaine transmembranaire de 6 hélices α impliqué dans la reconnaissance du substrat et d'un domaine ABC, très conservé, impliqué dans la liaison à l'ATP. La première structure cristallographique d'un transporteur ABC entier a été obtenue pour BtuCD d'*E. coli* (Locher *et al.*, 2002 ; Hvorup *et al.*, 2007). La figure ci-dessous représente sa structure cristallographique qui a été résolue à 2.6 Å (code PDB 2QI9).



(2) Les transporteurs MFS (*Major Facilitator Superfamily*)

Les transporteurs MFS sont des symports ou des antiports membranaires d'environ 400 résidus, utilisant la force proto-motrice (Saier *et al.*, 1999). Cette famille est divisée en deux sous-familles, l'une constituée de 12 segments transmembranaires et l'autre constituée de 14 segments transmembranaires. Le transporteur fonctionne généralement seul, mais il peut également s'associer à d'autres protéines de la membrane externe, comme la porine TolC (Lomovskaya & Lewis, 1992). La lactose perméase LacY d'*E. coli* est un représentant de cette famille particulièrement bien étudié (Figure 6).

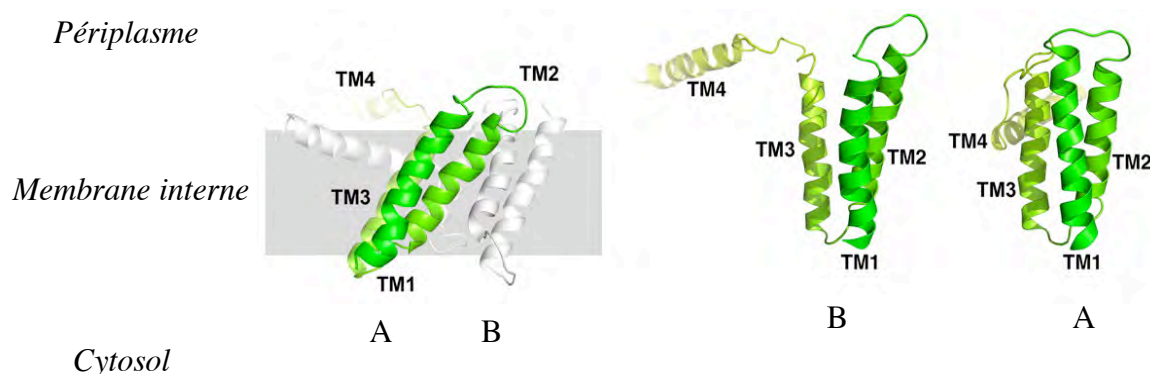
Figure 6 : Structure cristallographique de LacY d'*E. coli* résolue à 3.5 Å (code PDB 1PV6, Abramson *et al.*, 2003).



(3) Les transporteurs SMR (*Small Multidrug Resistance*)

Cette famille de transporteur se trouve exclusivement chez les procaryotes et se caractérise par une petite taille d'environ 110 résidus avec 4 segments transmembranaires (Putman *et al.*, 2000). Ces pompes sont des antiports utilisant le gradient de protons comme source d'énergie et sont responsables de l'efflux d'antiseptiques ou de désinfectants comme les ammoniums quaternaires (Li & Nikaido, 2004). La structure cristallographique d'EmrE chez *E. coli* a montré que la pompe s'organise en homodimère en adoptant une configuration très asymétrique en absence de substrat (Figure 7).

Figure 7 : Structure cristallographique de l'homodimère EmrE résolue à 4.5 Å de résolution (code PDB 3B61, [Chen et al., 2007](#)).



(4) Les transporteurs MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*)

Cette famille de pompe adopte la même topologie que les transporteurs MFS ([Brown et al., 1999](#)). L'efflux est énergisé par un gradient de sodium et permet aux bactéries d'être résistantes aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones ([Morita et al., 1998](#)). Il n'y a actuellement aucune information structurale à haute résolution pour cette famille de transporteur.

(5) Les transporteurs de la famille RND (*Resistance-Nodulation-cell-Division*)

Les pompes d'efflux RND forment une vaste famille de transporteurs ubiquitaires, où l'on trouve au moins 7 sous-familles ([Tseng et al., 1999](#)). Chez les bactéries à Gram-négatif, les transporteurs RND sont essentiellement des antiports dépendant du gradient de proton et jouent un rôle significatif dans la résistance naturelle ou acquise vis-à-vis de nombreux antibiotiques, souvent en synergie avec l'imperméabilité de la paroi cellulaire ([Poole, 2004](#) ; [Zgurskaya, 2002](#) ; [Li & Nikaido, 2004](#)). Ils sont constitués d'environ 1000 résidus d'acides aminés et présentent 12 segments transmembranaires avec deux grandes boucles périplasmiques ([Putman et al., 2000](#)).

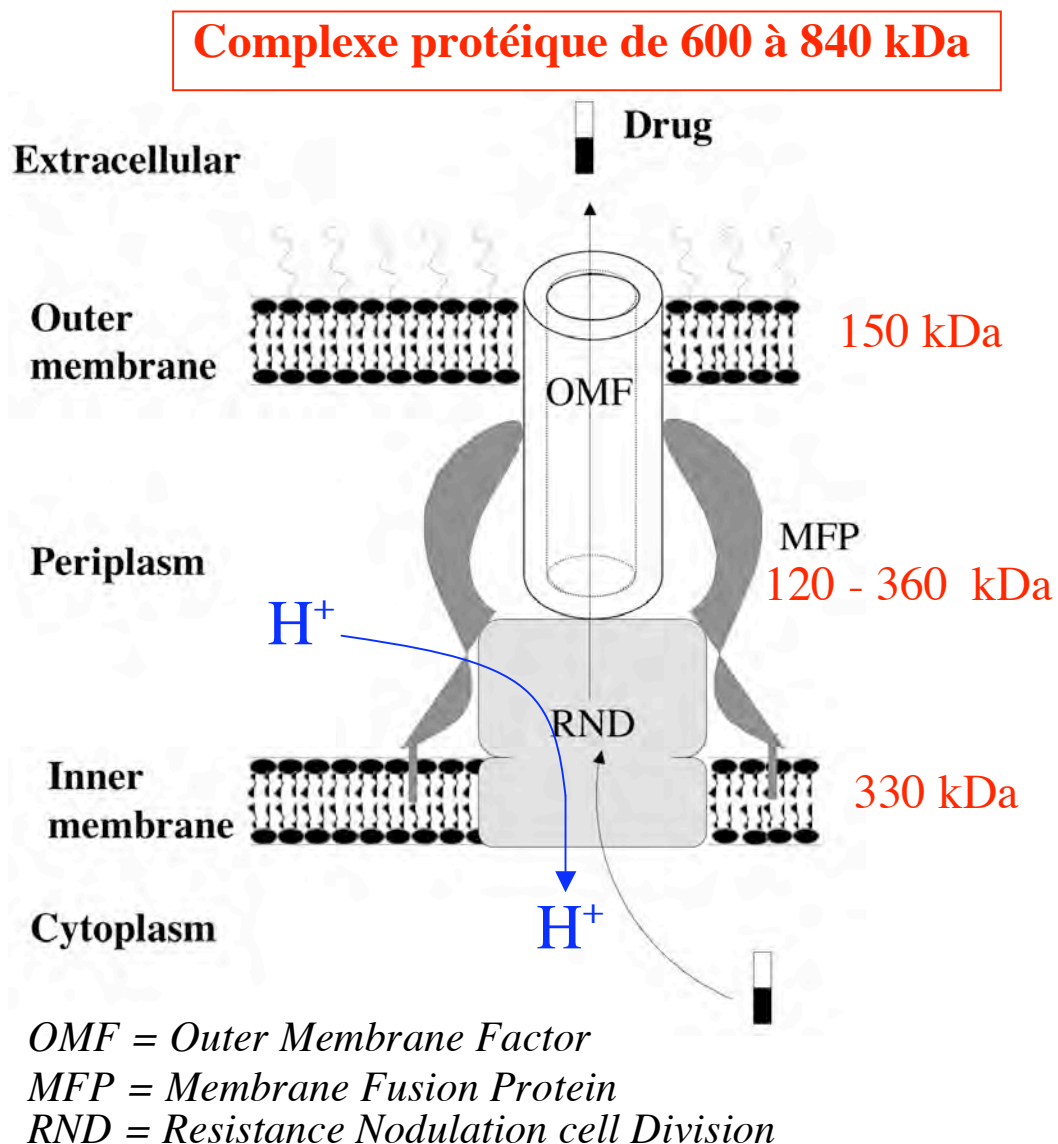
Afin de transporter le substrat à travers le périplasma et la membrane externe de la bactérie à Gram-négatif, les transporteurs RND s'associent en un complexe tripartite avec une protéine périplasmique MFP (*Membrane Fusion Protein*) et une porine de la membrane externe OMF (*Outer Membrane Factor*). Une même pompe d'efflux RND peut transporter des substrats très différents, comme les colorants, les solvants organiques ou les détergents, mais participe surtout à la résistance multiple aux antibiotiques (Li & Nikaido, 2004).

L'objectif principal de ma thèse est l'étude structurale de la pompe d'efflux MexXY-OprM, transporteur de la famille RND. C'est pourquoi nous allons voir plus en détail l'architecture des différents constituants de cette famille de pompe et faire l'état des lieux des données structurales et biologiques en corrélation avec leur assemblage et leur fonctionnement.

7) ARCHITECTURE DES POMPES D'EFFLUX DE LA FAMILLE RND

Les pompes d'efflux de la famille RND sont localisées dans la membrane interne de la bactérie à Gram-négatif (Figure 8). Elles sont associées à une porine insérée dans la membrane externe (OMF pour *Outer Membrane Factor*) qui présente un long prolongement périplasmique. Les substrats transportés peuvent donc être directement acheminés à travers les deux membranes bactériennes, du cytosol vers le milieu extracellulaire. Un troisième partenaire protéique, la protéine MFP (*Membrane Fusion Protein*) permet de consolider le système au niveau du périplasma (Zgurskaya & Nikaido, 2000).

Figure 8 : Schéma du transporteur RND impliqué dans le système d'efflux tripartite.



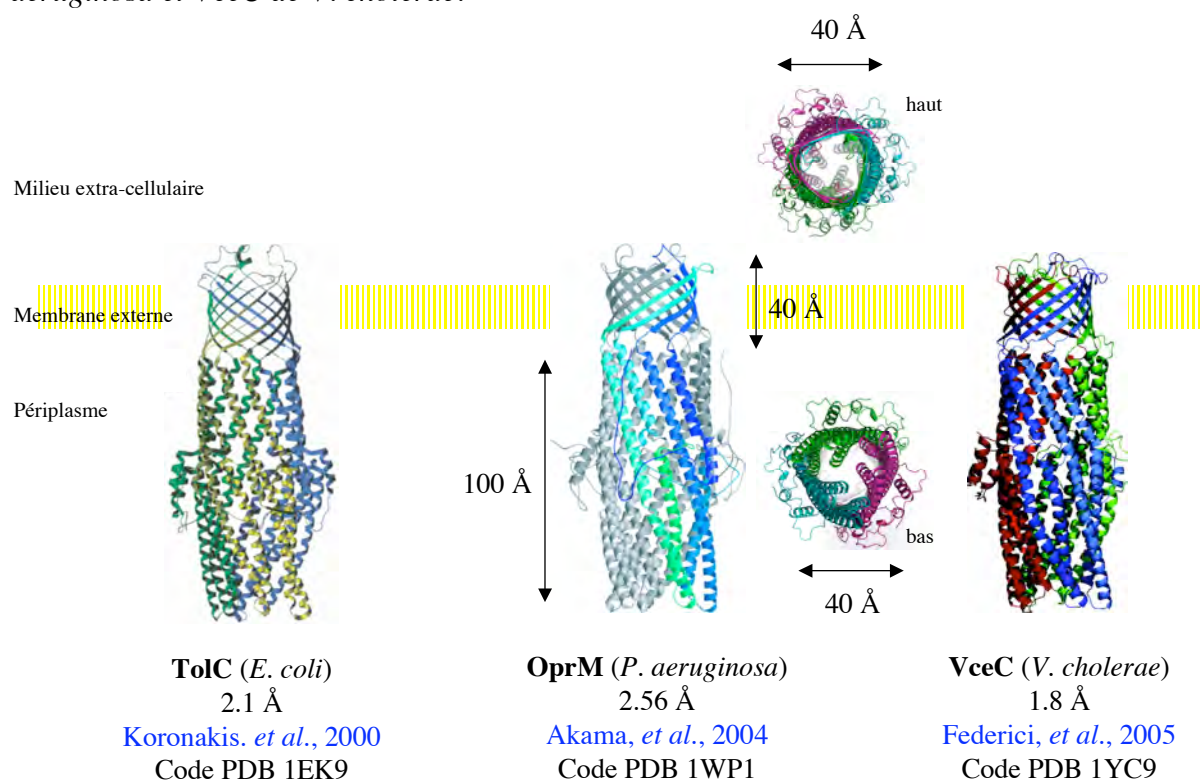
La porine OMF et le transporteur RND sont des homotrimères d'environ 150 kDa et 330 kDa respectivement. À l'heure actuelle, la stoechiométrie d'assemblage de la protéine périplasmique MFP (environ 40 kDa) reste incertaine, pouvant aller de 3 à 12 monomères par système d'efflux.

Bien que l'organisation tripartite soit majoritairement adoptée, il existe des variantes dans l'organisation de ce système d'efflux. Par exemple la pompe AcrD d'*E. coli*, impliquée dans le transport des aminoglycosides, fonctionne seule (Rosenberg *et al.*, 2000). De plus, certaines porines de la membrane externe, comme OprJ chez *P. aeruginosa*, pourraient s'organiser en tétramère (Yoshihara & Eda, 2006).

8) STRUCTURE DES OMF, PORINES DE LA FAMILLE « TOLC »

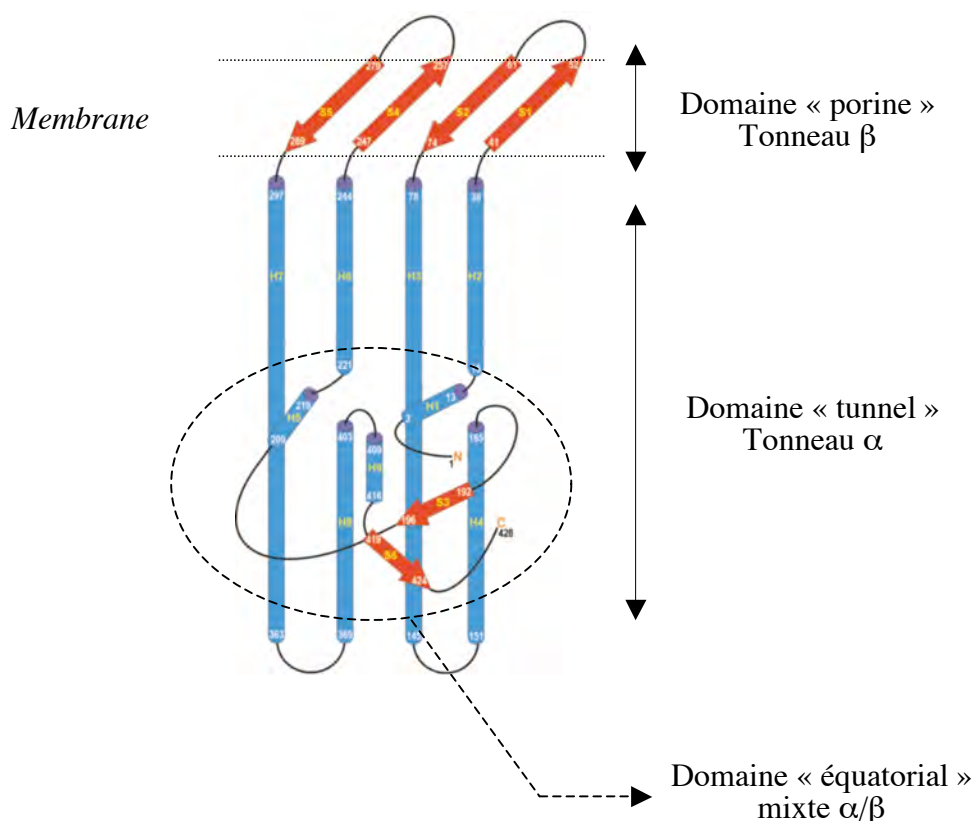
On connaît aujourd'hui trois structures cristallographiques de cette famille de porine (Figure 9) dont le représentant le mieux caractérisé est TolC d'*E. coli* (Sharff *et al.*, 2001 ; Koronakis *et al.*, 2004).

Figure 9 : Structures cristallographiques des porines OMF : TolC d'*E. coli*, OprM de *P. aeruginosa* et VceC de *V. cholerae*.



Cette famille de porine adopte une organisation particulière : le canal, formé par l'association de trois monomères, présente un tonneau β transmembranaire appelé « domaine porine » et un long tonneau α périplasmique d'environ 100 Å appelé « domaine tunnel ». Un troisième domaine mixte α/β forme une ceinture autour de la partie médiane du tonneau α (Figure 10, [Koronakis et al., 2000](#)). Les structures cristallographiques de TolC, OprM et VceC montrent les porines dans leur état fermé, suggérant une ouverture induite par l'association des autres partenaires, c'est-à-dire la pompe RND et la protéine du périplasmie MFP. Par ailleurs, OprM se distingue par la présence d'un palmitoyl sur le résidu N-terminal, inséré dans la membrane externe ([Nakajima et al., 2000](#)).

Figure 10 : Topologie d'un monomère de TolC ([Koronakis et al., 2000](#)). Les hélices α sont représentées en bleu et les brins β sont en rouge.



Le tonneau β est une architecture généralement adoptée par les porines de la membrane externe chez la bactérie à Gram-négatif (Buchanan, 1999 ; Koebnik *et al.*, 2000 ; Postle & Vakharia, 2000). Les porines de la famille de TolC se distinguent des autres car le pore est formé par l'association de trois monomères (Figure 12). Cette organisation est comparable à celle de l'hémolysine α chez *S. aureus* où sept monomères s'assemblent pour former un tonneau β de 14 brins insérés dans la membrane de la cellule cible (Figure 13, Song *et al.*, 1996). De même pour le facteur de virulence Hcp1 (*Hemolysin coregulated protein*) sécrété par *P. aeruginosa* où six monomères forment un anneau de 24 brins β (Figure 13, Mougous *et al.*, 2006).

Bien que la partie extracellulaire des porines OMF présente une ouverture qui doit probablement s'agrandir pour laisser passer les substrats, un modèle d'ouverture a surtout été proposé pour l'extrémité périplasmique. La porine est fermée par la constriction des « *coiled-coils* internes » H7/H8 (Figure 11). L'ouverture serait alors comparable à un diaphragme photographique où les « *coiled-coils* internes » subiraient une torsion pour s'aligner avec les « *coiled-coils* externes » H3/H4 (Andersen *et al.*, 2002).

Figure 11 : Modèle d'ouverture de TolC au niveau de l'entrée périplasmique (Andersen *et al.*, 2002). (A) Vue latérale de l'homotrimère TolC avec un seul monomère colorié. (B) Etat fermé de l'entrée périplasmique. Le coiled-coil externe (H3/H4) est représenté en vert/bleu et le coiled-coil interne (H7/H8) est représenté en jaune/rouge. Les liaisons I, II et III correspondent aux connexions responsables de la constriction des hélices. (C) Modèle de l'état ouvert obtenu après un simple alignement des coiled-coils internes avec les coiled-coils externes. (D) Détail moléculaire des connexions I, II et III.

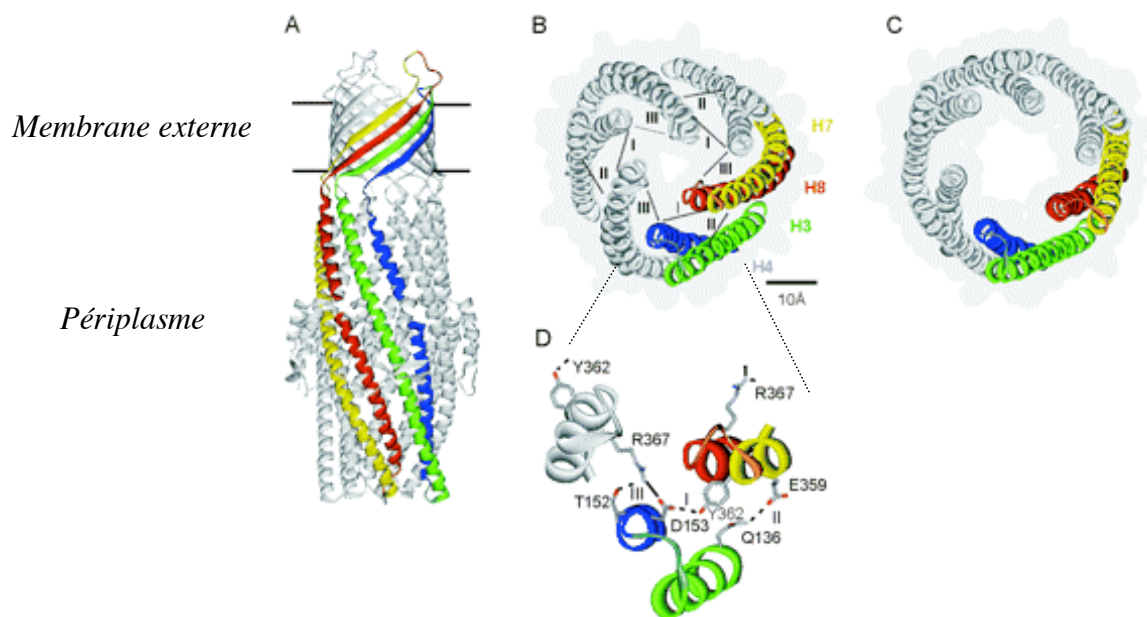
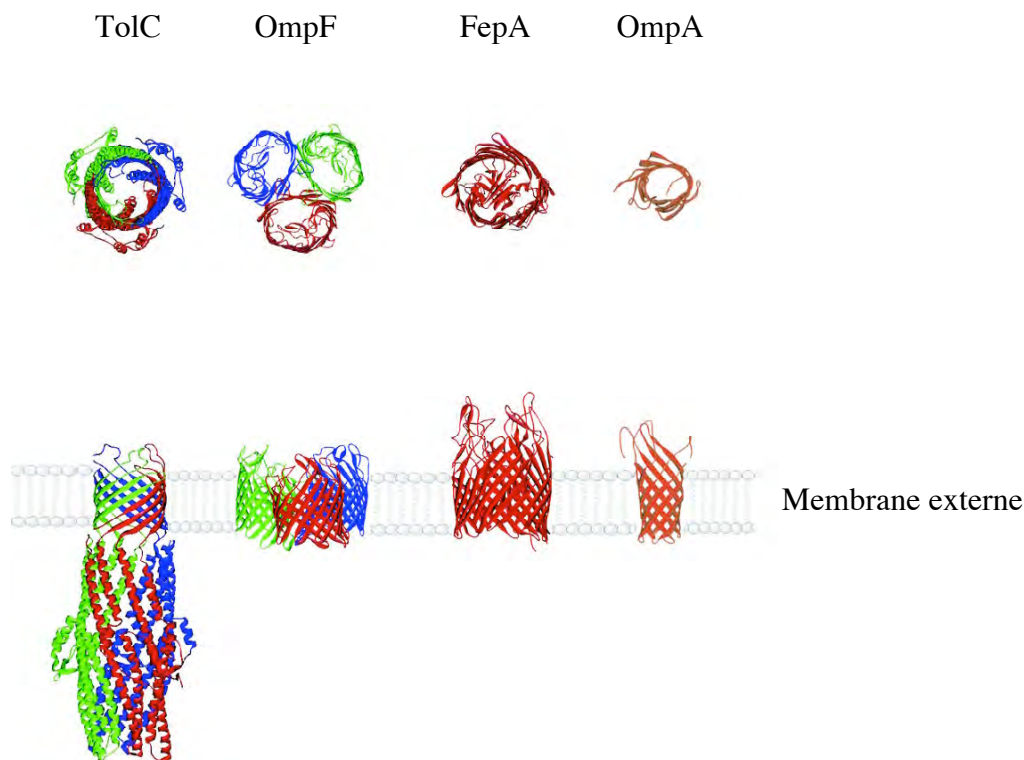
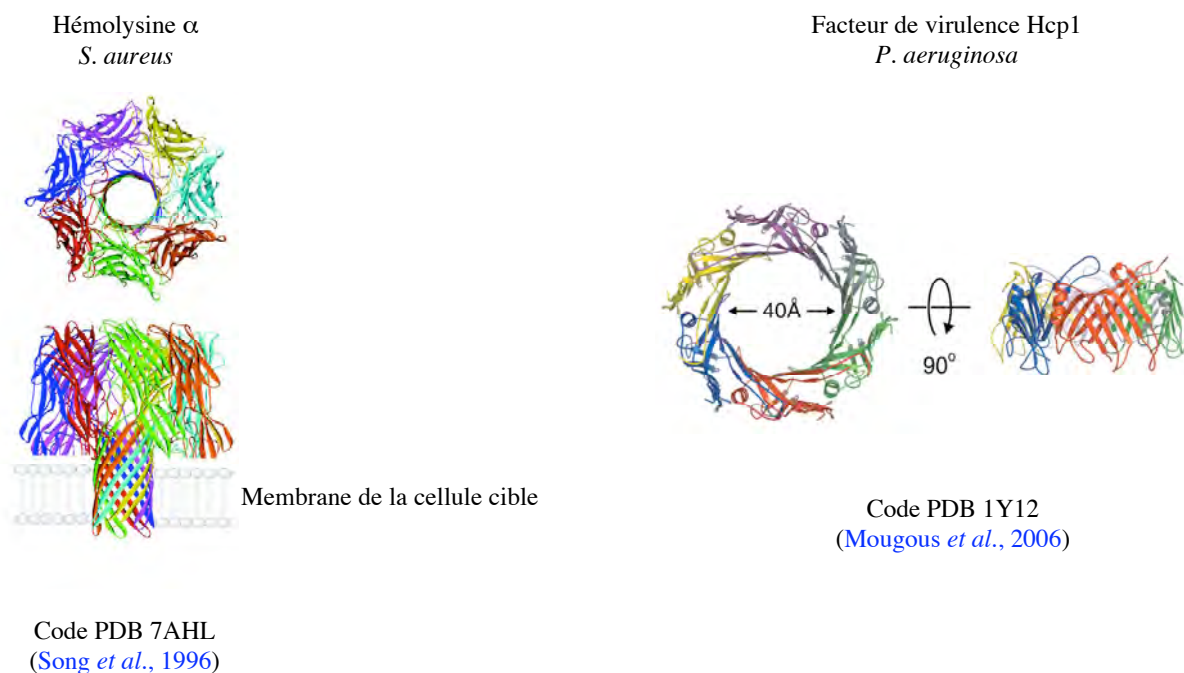


Figure 12 : Vue latérale des structures cristallographiques de différentes porines localisées dans la membrane externe d'*E. coli*. TolC est la seule porine formée par l'association de plusieurs monomères. La porine OmpF est trimérique mais chaque monomère forme un pore de 16 brins β . Le domaine N-terminal de OmpA, connu pour être l'une des porines les plus petites, forme un tonneau β de 8 brins. Le tableau montre les caractéristiques structurales de chaque porine (Koronakis et al., 2004). Chaque monomère est colorié différemment.



	TolC	OmpF	FepA	OmpA (domaine N-terminal)
Code PDB	1EK9	2OMF	1FEP	1BXW
Longueur (Å)	140	35	70	57
Rayon (Å)	17.5	15.5	19.9	13
Nombre de pores	1	3	1	1
Nombre de monomères	3	3	1	1
Nombre de brins β par monomère	4	16	22	8

Figure 13 : Structures cristallographiques de deux protéines virulentes formant un tonneau β par le biais de plusieurs monomères. Chaque monomère est colorié différemment.



L'autre spécificité structurale des porines de la famille de TolC est le long prolongement périplasmique qui lui permet d'établir la connexion avec la pompe de la membrane interne. Il s'agit d'un tonneau α constitué de 12 hélices α antiparallèles. L'association des hélices α forme des *coiled-coils* atypiques qui permettent la formation d'un cylindre (Calladine *et al.*, 2001).

La dynamique d'assemblage *in vivo* des porines de la famille de TolC et leur mécanisme d'ouverture restent des questions à élucider (Koronakis *et al.*, 2004).

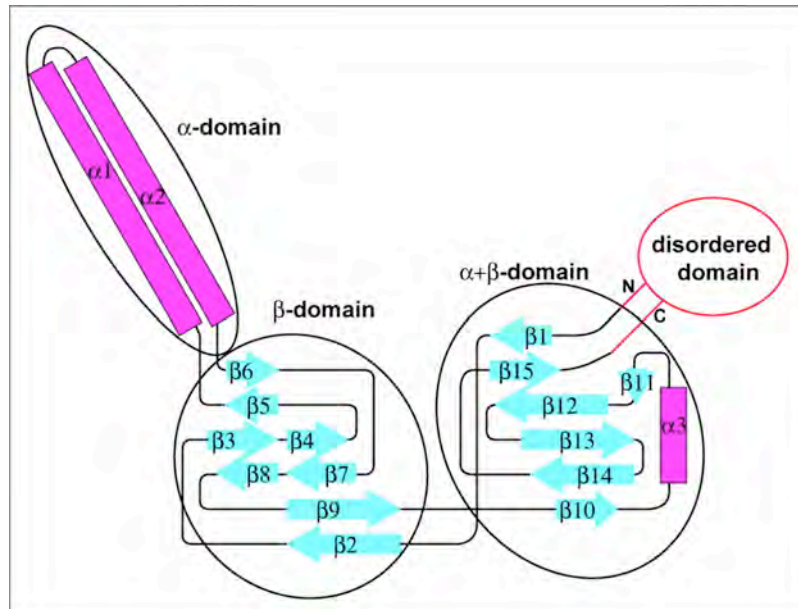
9) STRUCTURE DE L'ADAPTATEUR PERIPLASMIQUE MFP

Initialement nommées « protéines de fusion » à cause de leur homologie de séquence avec la protéine de fusion du paramyxovirus 5 (Dinh *et al.*, 1994), les protéines MFP sont localisées dans le périplasme, donc hydrosolubles, mais ancrées à la membrane interne *via* un palmitoyl acylé sur la cystéine N-terminale. Cette attache membranaire serait impliquée dans la localisation cellulaire de la protéine et ne semblerait qu'accessoire au fonctionnement du système d'efflux (Yoneyama *et al.*, 2000 ; Zgurskaya & Nikaido, 1999).

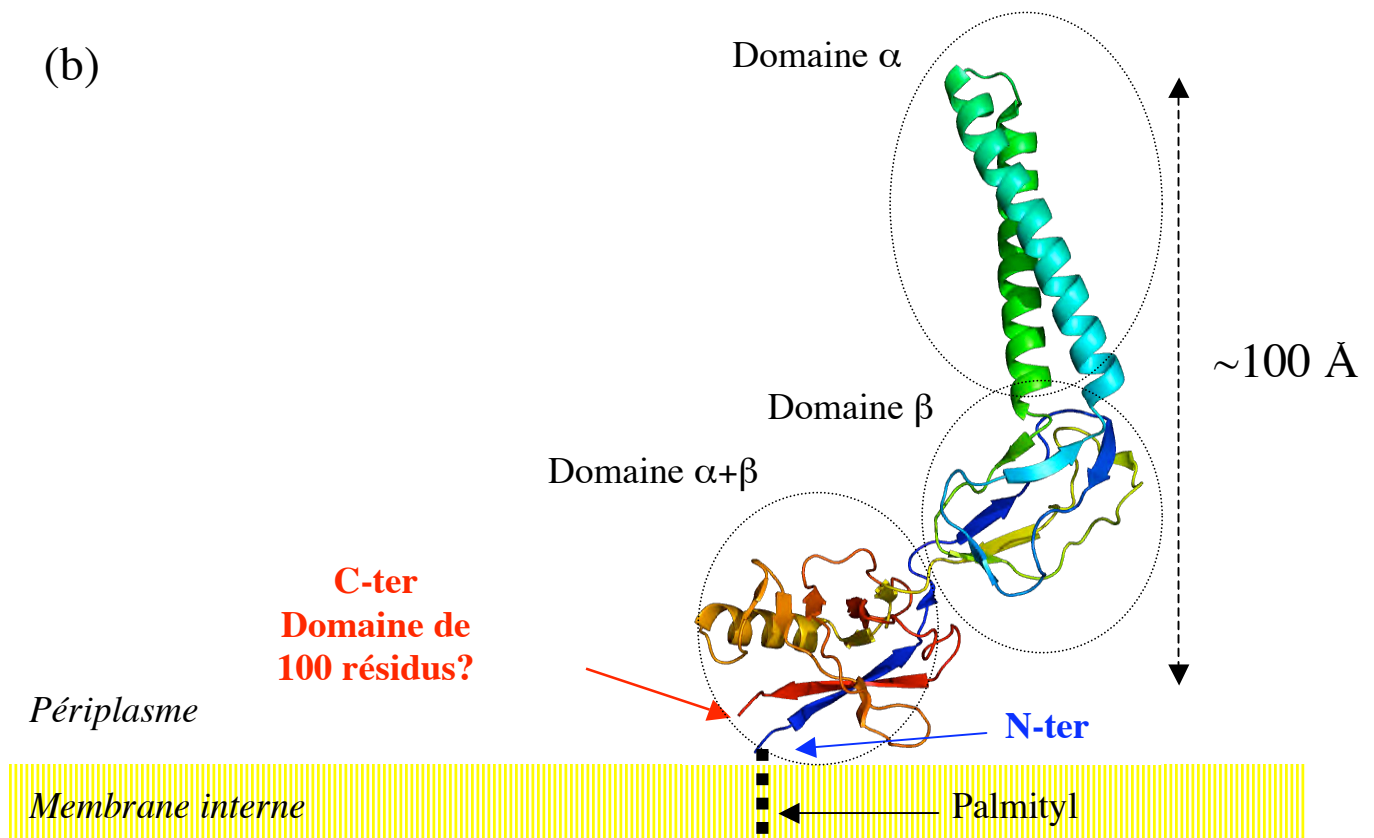
Les structures cristallographiques de deux membres de la famille MFP sont connues et présentent la même organisation : il s'agit d'AcrA chez *E. coli* (code PDB 2F1M, Mikolosko *et al.*, 2006) et de MexA chez *P. aeruginosa* (code PDB 1T5E, Higgins *et al.*, 2004 ; code PDB 1VF7, Akama *et al.*, 2004(b)). Les protéines sont très allongées (environ 100 Å de long) et sont constituées de 3 domaines distincts (Figure 14) : un domaine α « *coiled-coil* » présentant deux grandes hélices α associées en « épingle à cheveux », un domaine globulaire β essentiellement formé de brins β antiparallèles, appelé domaine « lipoyl » selon la classification SCOP (Murzin *et al.*, 1995) et un domaine mixte $\alpha+\beta$ (dans le cas de MexA seulement) ou plus généralement appelé domaine en « tonneau β ». Notons qu'une version soluble des protéines ont été cristallisées, c'est-à-dire sans le palmitoyl N-terminal.

Figure 14 : Structure cristallographique de MexA (code PDB 1T5E ou 1VF7). (a) Topologie de la structure secondaire (Akama et al., 2004(b)) avec les 3 domaines observés dans la structure cristallographique. Les hélices α sont en magenta et les brins β en cyan. (b) Structure en C α avec l'orientation par rapport à la membrane interne. Les 100 derniers résidus C-terminaux pourraient constituer un 4e domaine non-structuré.

(a)



(b)

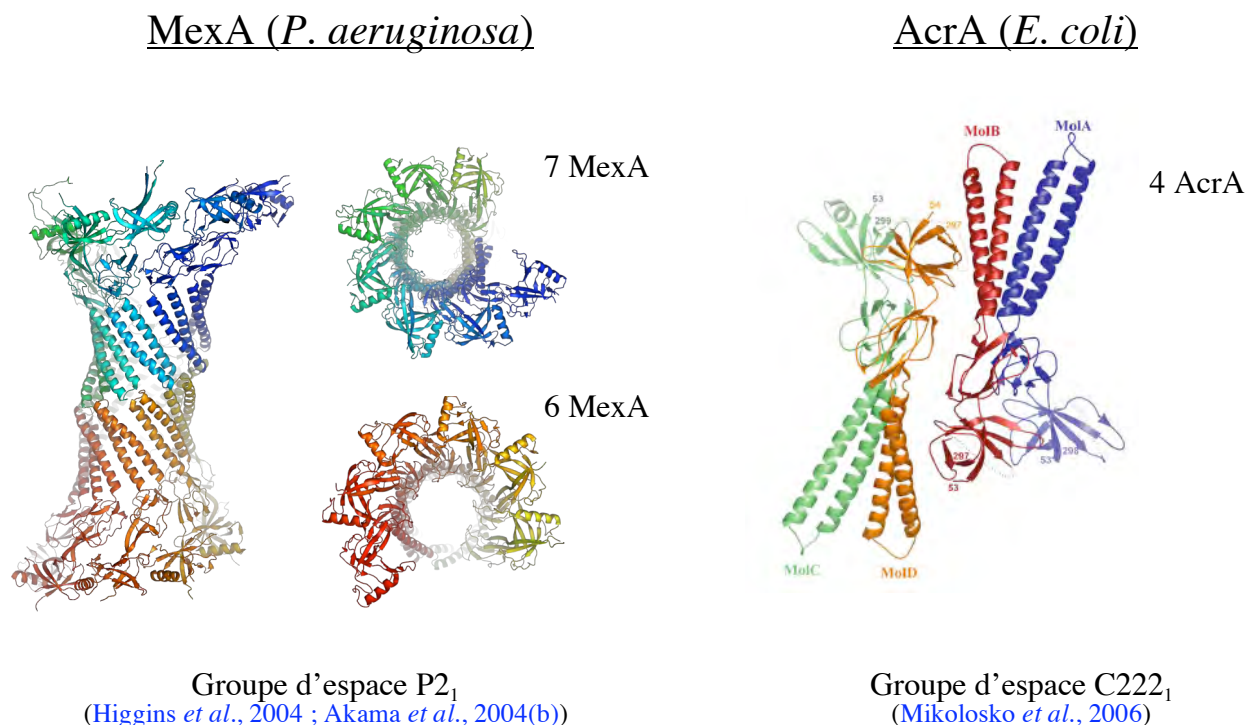


Dans la structure cristallographique de MexA, les 100 derniers résidus C-terminaux ne sont pas visibles dans la densité électronique, probablement parce qu'ils ne sont pas bien structurés. Dans le cas d'AcrA, la même région a été supprimée par protéolyse ménagée afin de permettre la cristallisation de la protéine.

La différence principale entre les protéines MFP réside d'une part au niveau du domaine « tonneau β » car on observe une hélice α pour MexA et non pour AcrA, et d'autre part dans la longueur du domaine α . Dans le cas d'AcrA, ce domaine fait 105 Å de long et contient 7 résidus supplémentaires par rapport au même domaine de MexA qui fait 89 Å de long (Mikolosko *et al.*, 2007). Généralement, le domaine α des MFP contient 4 à 6 « motifs heptamériques » répétés qui constituent par définition les structures de type *coiled-coil* (Lupas, 1996).

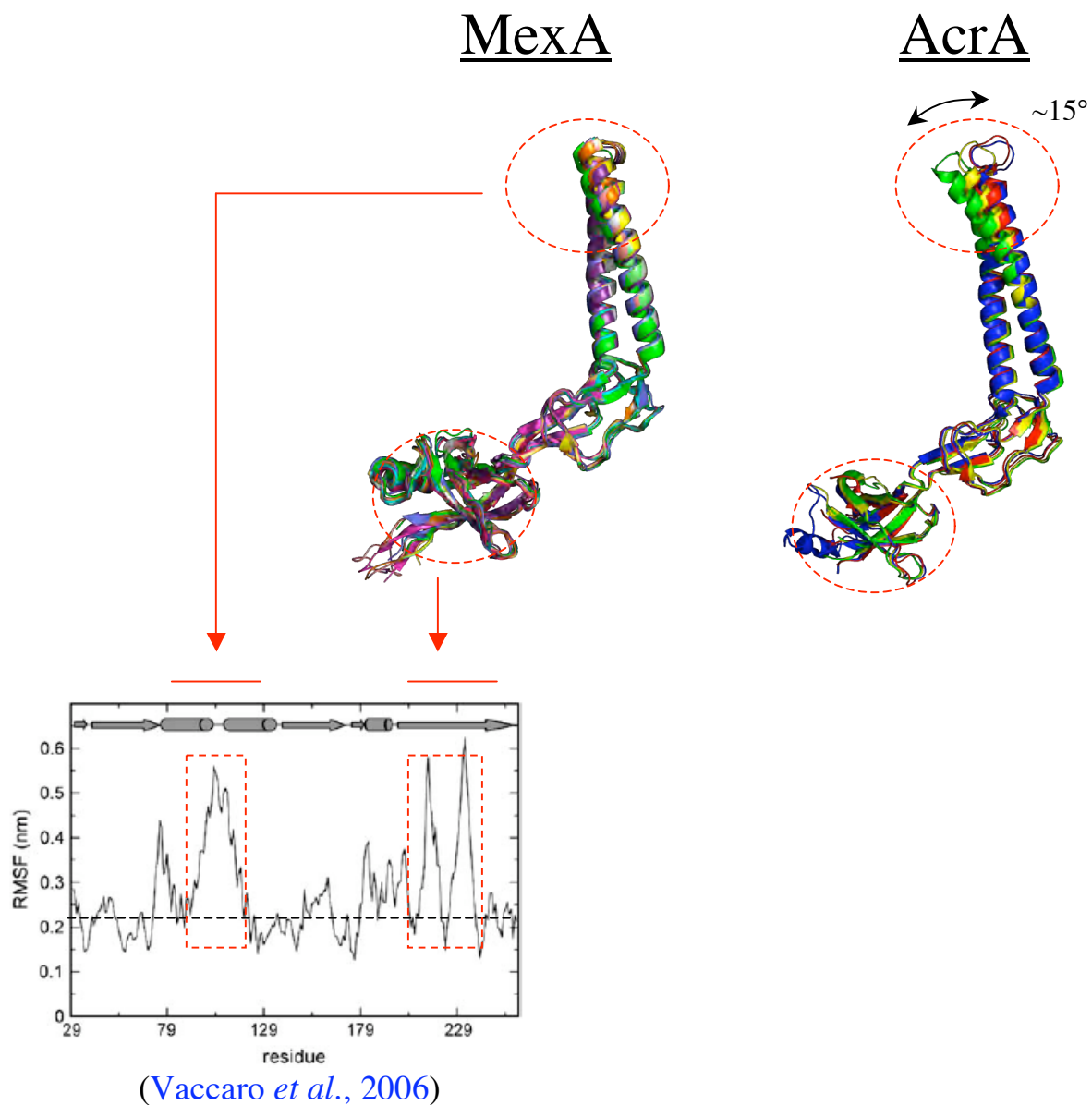
De façon originale, l'empilement cristallin de MexA montre un complexe cylindrique formé par l'association « tête-à-tête » de deux fers à cheval, respectivement constitués de 6 et 7 monomères. Par contre, l'empilement cristallin d'AcrA est différent car il montre deux dimères associés de façon antiparallèle (Figure 15). Cette différence d'empilement cristallin entre AcrA et MexA est probablement liée à la coupure protéolytique faite sur AcrA (Mikolosko *et al.*, 2007). Mais les contacts intermoléculaires sont semblables et s'étendent sur toute la longueur des monomères, incluant les 3 domaines *coiled-coil*, « lipoyl » et mixte $\alpha+\beta$. Le degré d'oligomérisation reste cependant ambigu, d'autant plus que les protéines MexA et AcrA sont monomériques *in vitro* (Akama *et al.*, 2004(b); Higgins *et al.*, 2004) et apparemment trimériques *in vivo* d'après des expériences de *cross-link* (Zgurskaya & Nikaido, 2000(b)).

Figure 15 : Empilement cristallin de MexA et AcrA dans leur unité asymétrique respective. Chaque monomère est colorié différemment.



La superposition des différents monomères de MexA ou AcrA contenus dans l'unité asymétrique de leur cristal respectif montre une flexibilité évidente de la protéine au niveau du domaine α *coiled-coil* et du domaine mixte $\alpha+\beta$ (Figure 16). Cette observation est supportée par des études de dynamique moléculaire faites sur MexA où le mouvement principal serait comparable à une pince, la charnière étant localisée entre le domaine α et le domaine β (Vaccaro *et al.*, 2006).

Figure 16 : Superposition des monomères de MexA et AcrA contenus dans l'unité asymétrique. Le graphe montre le résultat d'une dynamique moléculaire de MexA sur 25 ns, indiquant les RMSF (root-mean-square fluctuation) en fonction du C α d'un monomère. La topologie du monomère est indiquée au-dessus. Les zones flexibles sont entourées en rouge.



La flexibilité de la protéine MFP joue probablement un rôle important dans l'assemblage et le fonctionnement du système d'efflux tripartite.

10) STRUCTURE DU TRANSPORTEUR RND

AcrB d'*E. coli* est le représentant des transporteurs RND le mieux caractérisé au niveau fonctionnel mais aussi structural. Il est exprimé de façon constitutive et donc impliqué dans la résistance innée d'*E. coli* à différentes molécules de structures très variées, incluant les colorants, les détergents et bien sûr les antibiotiques (Sulavik, 2001).

Il y a actuellement 24 structures cristallographiques différentes d'AcrB disponible sur la PDB (Tableau 1). Ces différentes structures montrent le transporteur natif ou muté, dans différentes conformations, seul ou complexé, et associé ou non à des ligands.

AcrB est un homotrimère où chaque protomère est constitué de 1049 acides aminés. Il présente trois domaines : deux domaines périplasmiques d'environ 70 Å de long appelés « domaine d'amarrage pour TolC » et « domaine du pore », et un domaine inséré dans la membrane interne d'environ 50 Å appelé « domaine transmembraire » (Figure 17).

- Le « domaine d'amarrage pour TolC » est constitué de deux sous-domaines mixtes α + β nommés DN et DC. Chaque sous-domaine contient une grande « épingle à cheveux β » qui pointe vers l'extrémité supérieure. Au niveau de l'homotrimère, le « domaine d'amarrage pour TolC » forme un entonnoir (*funnel*) présentant les mêmes dimensions que l'extrémité inférieure de TolC, avec un diamètre interne d'environ 30 Å.
- Le « domaine du pore » est composé de 4 sous-domaines PN1, PN2, PC1 et PC2. Chaque sous-domaine est un motif caractéristique β - α - β répété que l'on retrouve dans la carboxypeptidase G2 d'*E. coli* (Rowell *et al.*, 1997). L'interface des sous-domaines PC1 et PC2 forme une crevasse de 40 Å de long, perpendiculaire au plan de la membrane. Celle-ci pourrait être le site d'interaction avec la protéine périplasmique MFP, en l'occurrence AcrA. Au niveau de l'homotrimère, les hélices α délimitent un pore dont l'axe est confondu avec la symétrie d'ordre 3.

Tableau 1 : Résumé des 24 structures cristallographiques d'AcrB disponibles dans la PDB, classées dans l'ordre des résolutions croissantes.

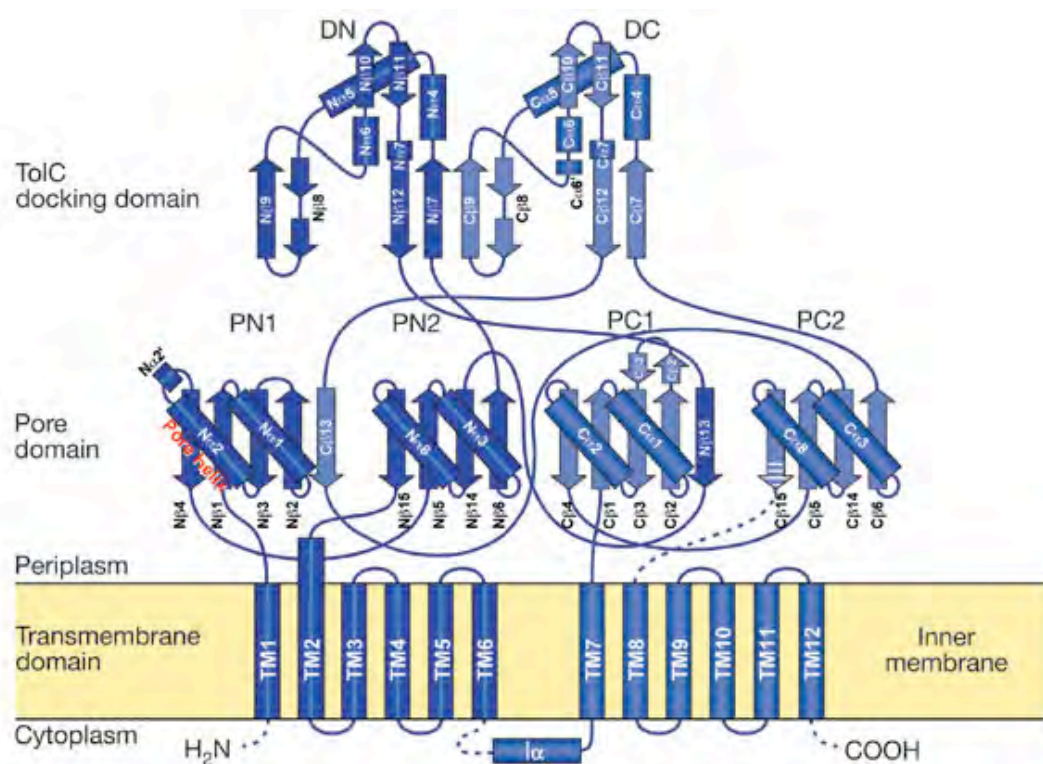
Code PDB	Résolution (Å)	R_{cryst} (%)	R_{free} (%)	 (Å²)	Groupe d'espace	Remarque	Référence
2J8S	2.54	22.9	27.1	43.28	P212121	Complexe avec DARPin	Sennhauser <i>et al.</i> , 2007
2DHH	2.80	27.0	30.7	93.70	C2(C121)	Trimère asymétrique	Murakami <i>et al.</i> , 2006
2GIF	2.90	22.8	26.7	73.94	C2(C121)	Trimère asymétrique	Seeger <i>et al.</i> , 2006
2HRT	3.00	23.4	27.4	51.41	P1	Trimère asymétrique	Seeger <i>et al.</i> , 2006
1T9X	3.08	27.4	35.9	N/A	H32	Mutant N109A + ligand éthidium	Yu <i>et al.</i> , 2005
2I6W	3.10	30.5	34.1	69.70	H32	Structure du N-ter	Das <i>et al.</i> , 2007
2DRD	3.10	25.7	31.0	83.85	C2(C121)	Ligand minocycline (T)	Murakami <i>et al.</i> , 2006
1T9U	3.11	26.7	33.5	N/A	H32	Ligand ciprofloxacine (FQ)	Yu <i>et al.</i> , 2005
1T9T	3.23	27.7	33.8	N/A	H32	Mutant N109A	Yu <i>et al.</i> , 2005
1T9W	3.23	27.0	34.9	N/A	H32	Mutant N109A + ligand nafciline (βL)	Yu <i>et al.</i> , 2005
2DR6	3.30	30.2	35.9	116.59	C2(C121)	Ligand doxorubicine (T)	Murakami <i>et al.</i> , 2006
2HQB	3.38	25.2	28.0	80.67	H32	Mutant K940A	Su <i>et al.</i> , 2006
2HQG	3.38	25.5	27.5	94.76	H32	Mutant T978A	Su <i>et al.</i> , 2006
1OYE	3.48	26.0	32.3	N/A	H32	Ligand ciprofloxacine (FQ)	Yu <i>et al.</i> , 2003
2RDD	3.50	29.9	33.4	65.60	H32	Ligand Amp + complexe avec YajC (hélice TM)	Törnroth-Horsefield <i>et al.</i> , 2007
1IWG	3.50	29.0	35.5	N/A	H32	Première structure d'AcrB	Murakami <i>et al.</i> , 2002
2HQC	3.56	27.2	29.4	88.35	H32	Mutant D407A	Su <i>et al.</i> , 2006
1OY8	3.63	24.9	32.2	N/A	H32	Ligand rhodamine	Yu <i>et al.</i> , 2003
1T9Y	3.64	27.8	34.0	N/A	H32	Ligand Phe-Arg-naphthylamide	Yu <i>et al.</i> , 2005
2HQD	3.65	26.3	30.3	100.25	H32	Mutant D408A	Su <i>et al.</i> , 2006
1OY6	3.68	27.5	33.0	N/A	H32		Yu <i>et al.</i> , 2003
1T9V	3.80	27.8	33.1	N/A	H32	Mutant N109A + ligand rhodamine	Yu <i>et al.</i> , 2005
1OY9	3.80	28.6	34.4	N/A	H32	Ligand éthidium	Yu <i>et al.</i> , 2003
1OYD	3.80	28.7	33.8	N/A	H32	Ligand déqualinium	Yu <i>et al.</i> , 2003

NB : DARPin = ankirin-repeat protein ; Amp = ampicilline ; T = tétracycline ; FQ = fluoroquinolone ; TM = transmembranaire ; βL = β-lactamine.

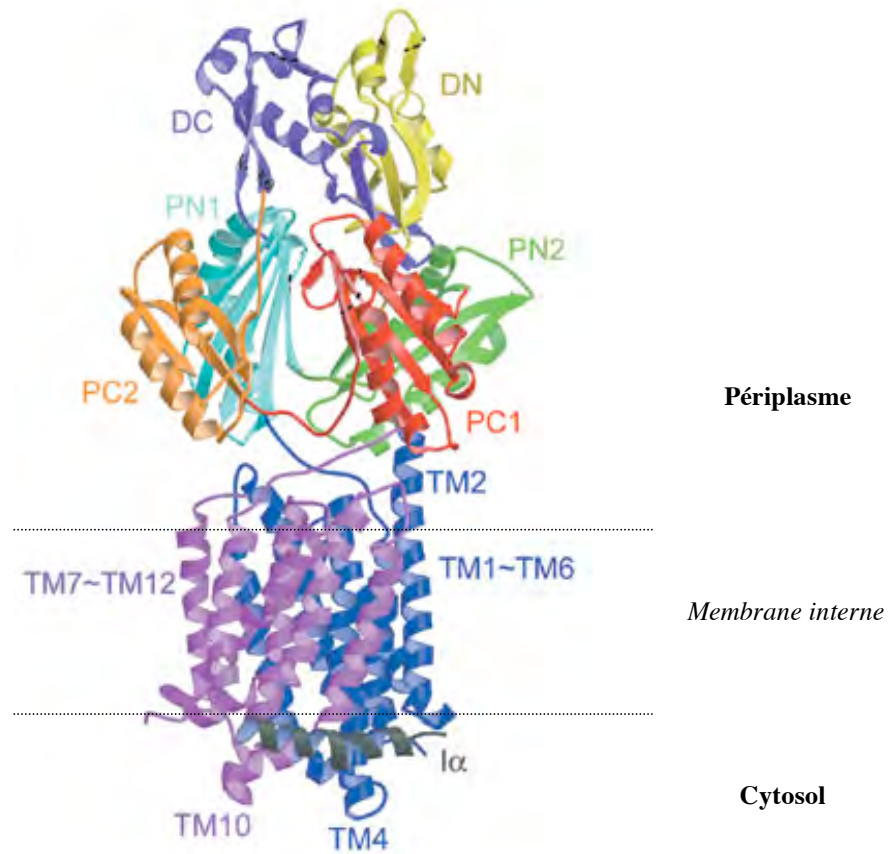
- Le « domaine transmembranaire » contient 12 hélices α transmembranaires (TM) et une hélice α cytosolique « $I\alpha$ » située entre TM6 et TM7 et parallèle au plan de la membrane. C'est au sein de ce « domaine transmembranaire » que le relais de protons énergisant l'efflux a lieu. Le transfert de protons serait assuré par les résidus D407, D408, K940, R971 et T978 (Guan & Nakae, 2001 ; Su *et al.*, 2006 ; Takatsuka & Nikaido, 2006).

Figure 17 : Structure cristallographique d'AcrB (Murakami *et al.*, 2002). (a) Topologie d'un protomère (TM : hélices α transmembranaires, $N\alpha$ / $N\beta$: hélices α / brins β dans la partie N-terminale, $C\alpha$ / $C\beta$: hélices α / brins β dans la partie C-terminale. Les régions désordonnées sont indiquées en pointillé. (b) Structure en $C\alpha$ d'un protomère. (c) Structure en $C\alpha$ d'un trimère. Une vue transversale du « domaine du pore » permet de voir l'entrée des vestibules et les crevasses périphériques.

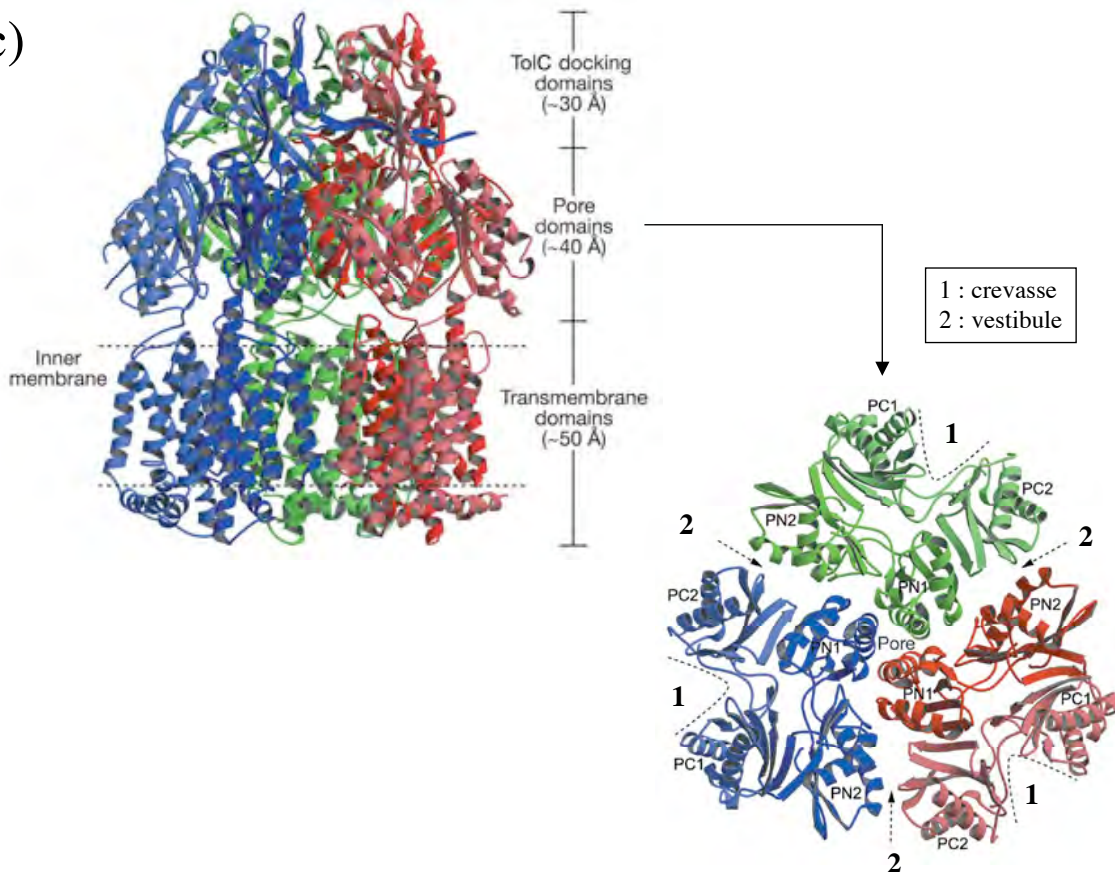
(a)



(b)



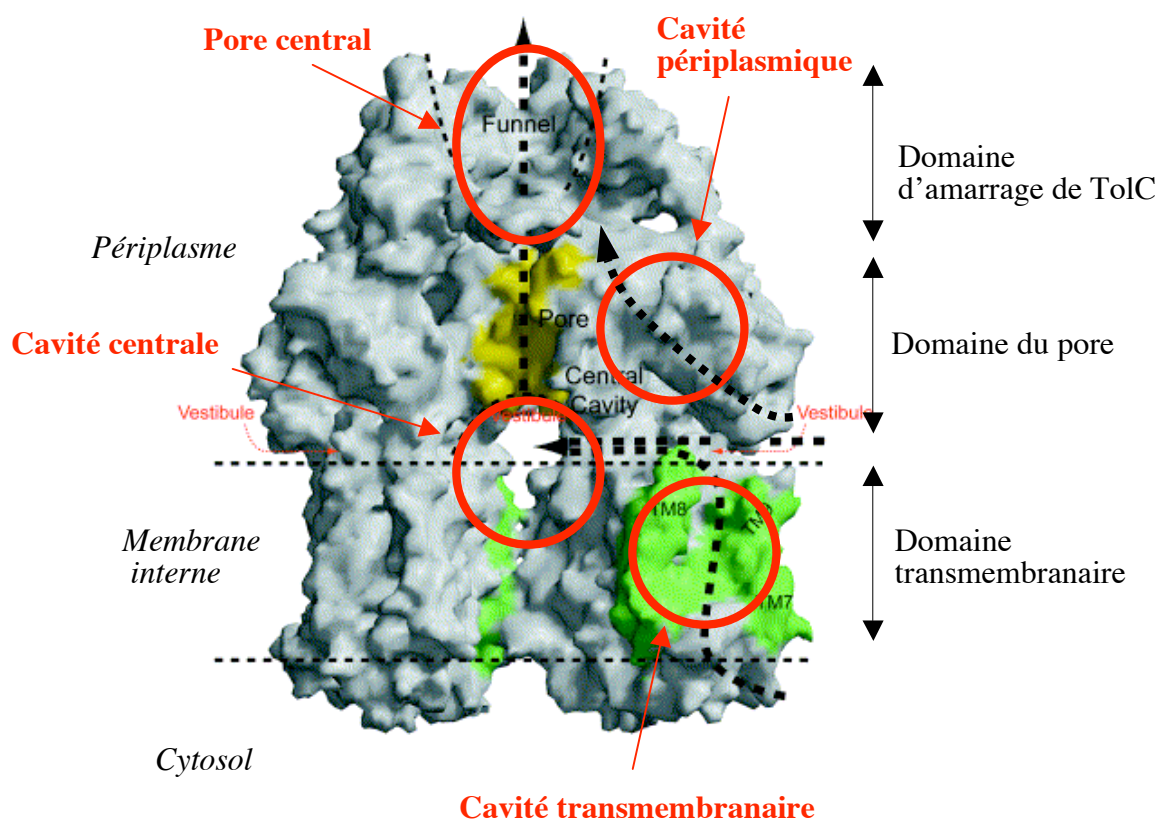
(c)



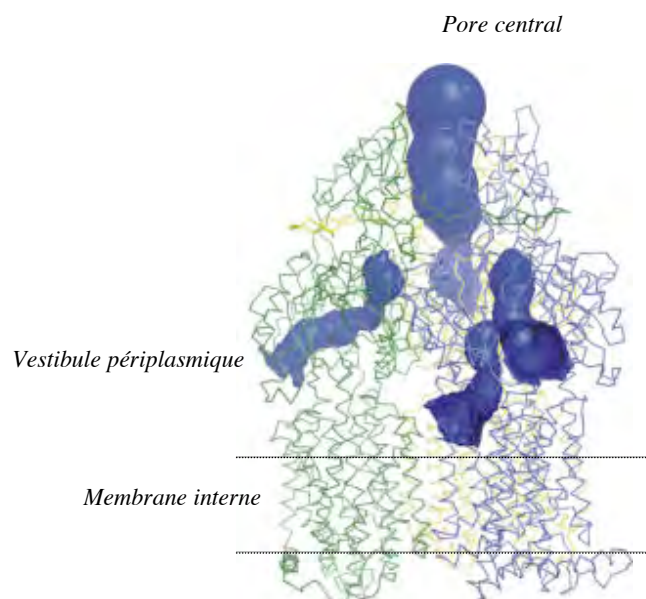
Contrairement aux transporteurs de la famille MFS ou SMR (Abramson *et al.*, 2001 ; Gutman *et al.*, 2003), le flux de protons et la translocation des substrats dans les transporteurs RND n'ont pas lieu dans la même région.

Figure 18 : Localisation des cavités constituant les poches de fixation et voies de passage des substrats transportés par AcrB (Murakami & Yamaguchi, 2003 ; Sennhauser *et al.*, 2007). (a) Surface accessible au solvant d'AcrB : l'acheminement hypothétique des substrats est représenté par les flèches noires en pointillé et les cavités sont indiquées par des cercles rouges. (b) Représentation du volume des cavités périplasmiques et du pore central sur la structure d'AcrB en C α .

(a)



(b)



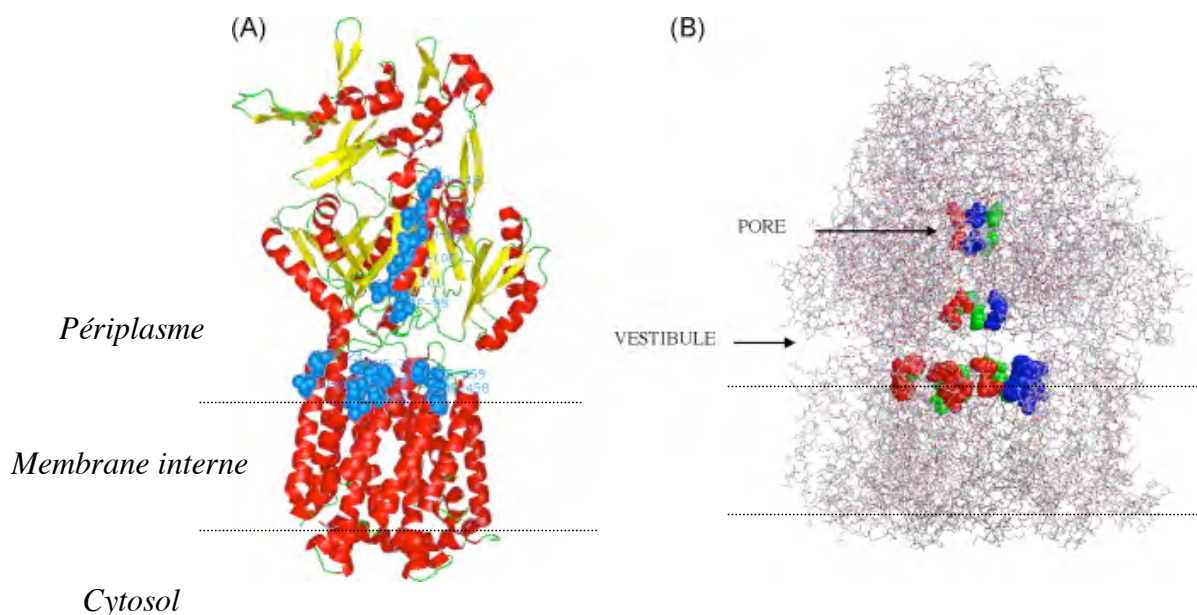
Les structures cristallographiques d'AcrB en présence de différents ligands, analogues d'antibiotiques pour la plupart, ont permis de voir trois cavités d'interaction et de proposer un trajet d'efflux des substrats au sein du transporteur (Figure 18, [Yu et al., 2005](#) ; [Murakami et al., 2006](#) ; [Seeger et al., 2006](#) ; [Sennhauser et al., 2007](#)) :

- la « cavité périplasmique » particulièrement riche en acides aminés aromatiques et localisée au niveau du « domaine du pore » de chaque protomère ;
- la « cavité centrale » formée à l'interface des « domaines transmembranaires » des protomères ;
- le « pore central » formé par le trimère au niveau du « domaine d'amarrage pour TolC ».

Les substrats peuvent accéder à la « cavité périplasmique » par un vestibule et sont finalement acheminés vers le « pore central » qui se prolonge probablement par le tunnel de la porine OMF. Pour expliquer l'efflux des substrats cytosoliques, une quatrième « cavité transmembranaire » de fixation délimitée par les hélices TM7, TM8 et TM9 a été proposée (Murakami *et al.*, 2002), mais aucun ligand n'y a été observé jusqu'à présent. Cela dit, des études de génétique et de mutagenèse (Eda *et al.*, 2003 ; Elkins & Nikaido, 2002 ; Mao *et al.*, 2002 ; Middlemiss & Poole, 2004 ; Tikhonova *et al.*, 2002) ont montré que la sélection des substrats serait uniquement déterminée par le domaine périplasmique.

Sur la base des structures cristallographiques d'AcrB avec les différents ligands et d'alignements multiples de séquences des différents RND, il a été proposé que la spécificité de reconnaissance des substrats serait en partie déterminée par un groupe de 14 acides aminés en contact direct avec le ligand (Figure 19) : cinq résidus du « pore central » (D101, V105, N109, Q112, et P116 dans AcrB) et 9 résidus dans la « cavité périplasmique » (L25, K29, D99, V382, A385 F386, F388 et F459 dans AcrB). Cependant, la diversité des ligands pris en charge par certain RND, comme AcrB, impliquerait également une grande plasticité de la poche de fixation (Hernandez-Mendoza *et al.*, 2007).

Figure 19 : Localisation des 14 acides aminés impliqués dans la reconnaissance des substrats dans AcrB (A) sur un protomère et (B) sur le trimère (tous les résidus n'y sont pas représentés, Hernandez-Mendoza *et al.*, 2007).



Les structures cristallographiques d'AcrB résolues dans des groupes d'espace où l'axe de symétrie du trimère n'est pas confondu avec une symétrie cristallographique d'ordre 3 (Murakami *et al.*, 2006 ; Seeger *et al.*, 2006 ; Sennhauser *et al.*, 2007) ont révélé une asymétrie entre les trois protomères. Cela a permis de proposer un modèle d'efflux cyclique où chaque protomère alterne avec les trois conformations différentes : une conformation *Binding* (B) ou *Tight* (T) où le substrat se trouve dans la cavité périplasmique, une conformation *Access* (A) ou *Loose* (L) où l'entrée du vestibule périplasmique est ouverte aux substrats et une conformation *Extrusion* (E) ou *Open* (O) où la cavité périplasmique s'ouvre au pore central qui permet l'efflux du substrat vers l'OMF, c'est-à-dire TolC dans le cas d'AcrB (Figures 20 et 21).

Figure 20 : Schéma du modèle d'efflux rotatif d'AcrB (Schuldiner, 2006). La conformation « access » (A) est en violet, la conformation « binding » (B) est en rose et la conformation « extrusion » (E) est en cyan. Le substrat est représenté par un petit hexagone rouge. (a) Vue latérale du complexe tripartite « AcrAB-TolC » d'*E. coli*. (b) Vue transversale d'AcrB.

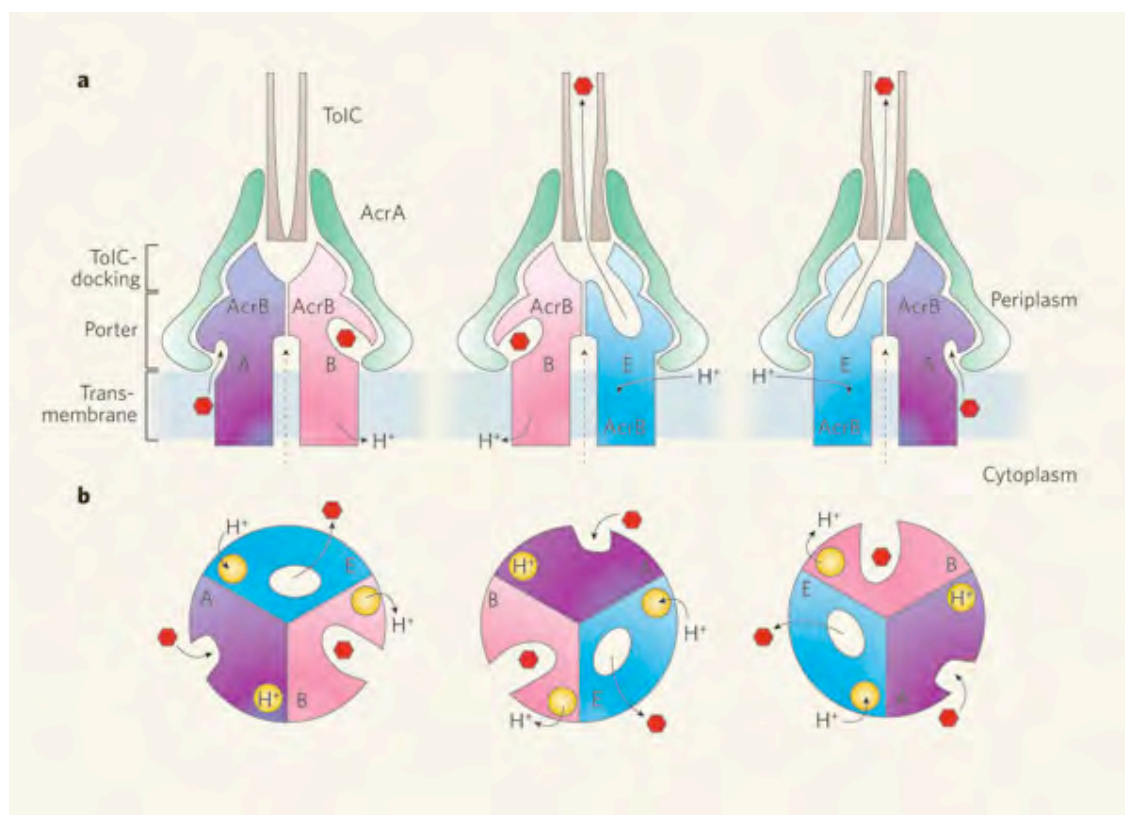
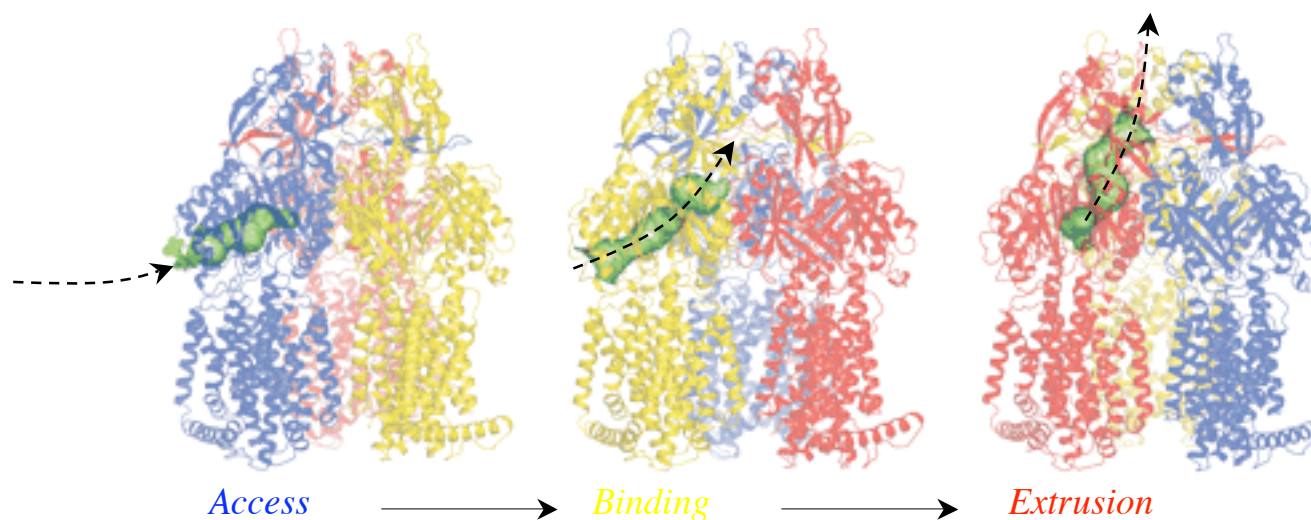


Figure 21 : Evolution de la cavité périplasmique suivant le modèle d'efflux rotatif d'AcrB, en vue latérale (Seeger *et al.*, 2006). Les conformations « access » (A), « binding » (B) et « extrusion » (E) sont respectivement en bleu, jaune et rouge. La cavité périplasmique est en vert. Le sens de transport des substrats est représenté par une flèche noire en pointillé.



A priori, la sélection du substrat ne semble pas dépendre de la porine OMF. De façon versatile, une même porine peut s'associer à différents systèmes d'efflux. L'exemple le plus frappant est celui de TolC d'*E. coli* qui fonctionne principalement avec le système RND « AcrAB-TolC », mais entre aussi dans la composition d'autres systèmes d'efflux comme celui de l'hémolysine « HlyBD-TolC » (transporteur ABC), le transporteur MFS « EmrAB-TolC », le transporteur ABC « MacAB-TolC » ou le transporteur RND « AcrEF-TolC » (Koronakis *et al.*, 2004). Certes, la sélection du substrat dépend essentiellement du transporteur RND, mais il a été montré que la porine OMF peut également être déterminante dans la spécificité d'action d'une pompe d'efflux. Par exemple, le système « MexJK-OprM » peut effluer l'érythromycine mais non le triclosan. Ce dernier est pris en charge lorsque la porine OprM est remplacée par un homologue OpmH (Chuanchuen *et al.*, 2005). Le rôle joué par la porine OMF dans la sélection du substrat n'est donc pas encore bien défini.

11) ASSEMBLAGE DU SYSTEME D'EFFLUX TRIPARTITE

Les structures cristallographiques des différents partenaires du système d'efflux tripartite « MFP-RND-OMF », notamment le système « AcrAB-TolC » d'*E. coli*, ont permis de proposer plusieurs modèles d'assemblage (Figure 22, [Fernandez-Recio et al., 2004](#) ; [Akama et al., 2004](#) ; [Higgins et al., 2004](#)). La porine OMF et le transporteur RND s'organisent en homotrimère. Cependant, aucune donnée expérimentale ne permet encore de déterminer le nombre exact de protéines MFP dans un système tripartite. D'après les modèles proposés, ce nombre serait un multiple de trois, allant de 3 à 12 monomères de MFP. Notons que la structure de la porine OMF dans son état ouvert n'est pas connue, ce qui induit probablement un biais dans la modélisation des interactions.

La protéine périplasmique MFP a un rôle essentiel dans l'assemblage du système d'efflux tripartite. Des études d'interaction *in vitro* et *in vivo* (par des expériences de *cross-link*) ont montré que la protéine périplasmique MFP est capable d'interagir avec la porine OMF ou le transporteur RND indépendamment. Par contre, l'interaction entre la porine OMF et le transporteur RND ne semble pas se faire ou semble être instable en absence du troisième partenaire périplasmique ([Touze et al., 2004](#) ; [Mokhonov et al., 2004](#)).

Les systèmes d'efflux les mieux caractérisés structuralement et fonctionnellement sont « AcrAB-TolC » d'*E. coli* et « MexAB-OprM » de *P. aeruginosa* ([Poole, 2001](#) ; [Tikhonova et al., 2002](#) ; [Zguskaya et al., 2003](#) ; [Zgurskaya & Nilaido, 2000\(b\)](#) ; [Koronakis et al., 2000](#) ; [Akama et al., 2004\(a\)](#) ; [Akama et al., 2004\(b\)](#) ; [Higgins et al., 2004](#) ; [Murakami et al., 2002](#) ; [Mikolosko et al., 2006](#) ; [Federeci et al., 2005](#)). Les structures cristallographiques ont montré une grande analogie entre protéines de même famille. Cela permet de comprendre comment des protéines orthologues, issues de deux systèmes d'efflux différents, peuvent s'interchanger pour former des « systèmes chimériques », notamment « AcrAB-VceC » (VceC est une porine OMF de *V. cholerae*), « AcrA-MexB-TolC » ou « AcrAB-OprM » ([Stegmeier et al., 2006](#) ; [Vediyappan et al., 2006](#) ; [Krishnamoorthy et al., 2008](#)). Cependant, les systèmes d'efflux chimériques ne sont fonctionnels qu'après mutation de certains résidus clés qui ont probablement un rôle stabilisateur dans ces interactions.

Figure 22 : Modèles d'assemblage de la pompe d'efflux « AcrAB-TolC » d'*E. coli*, en vues latérales et transversales.

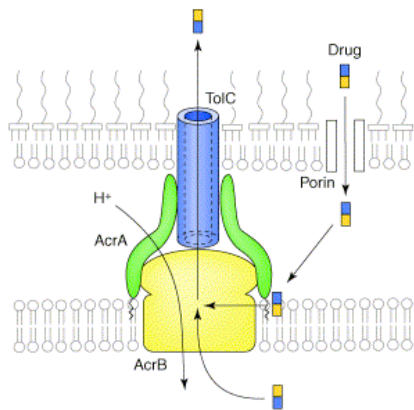
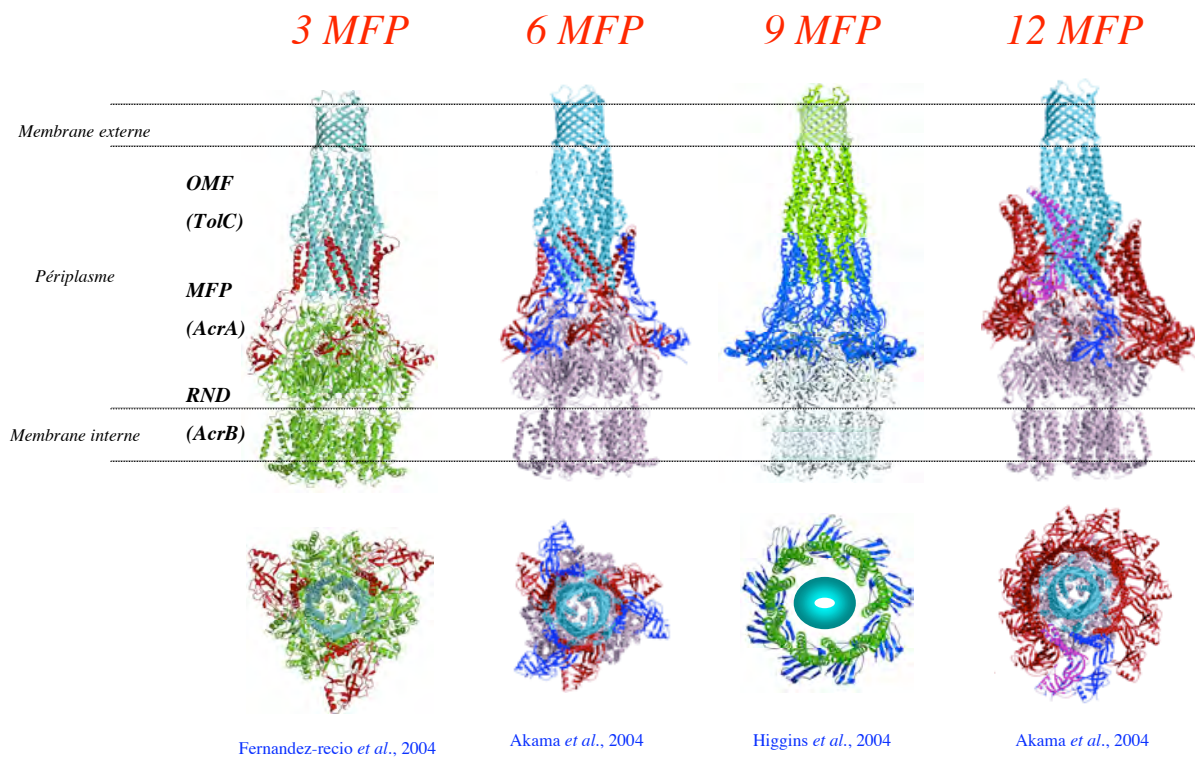


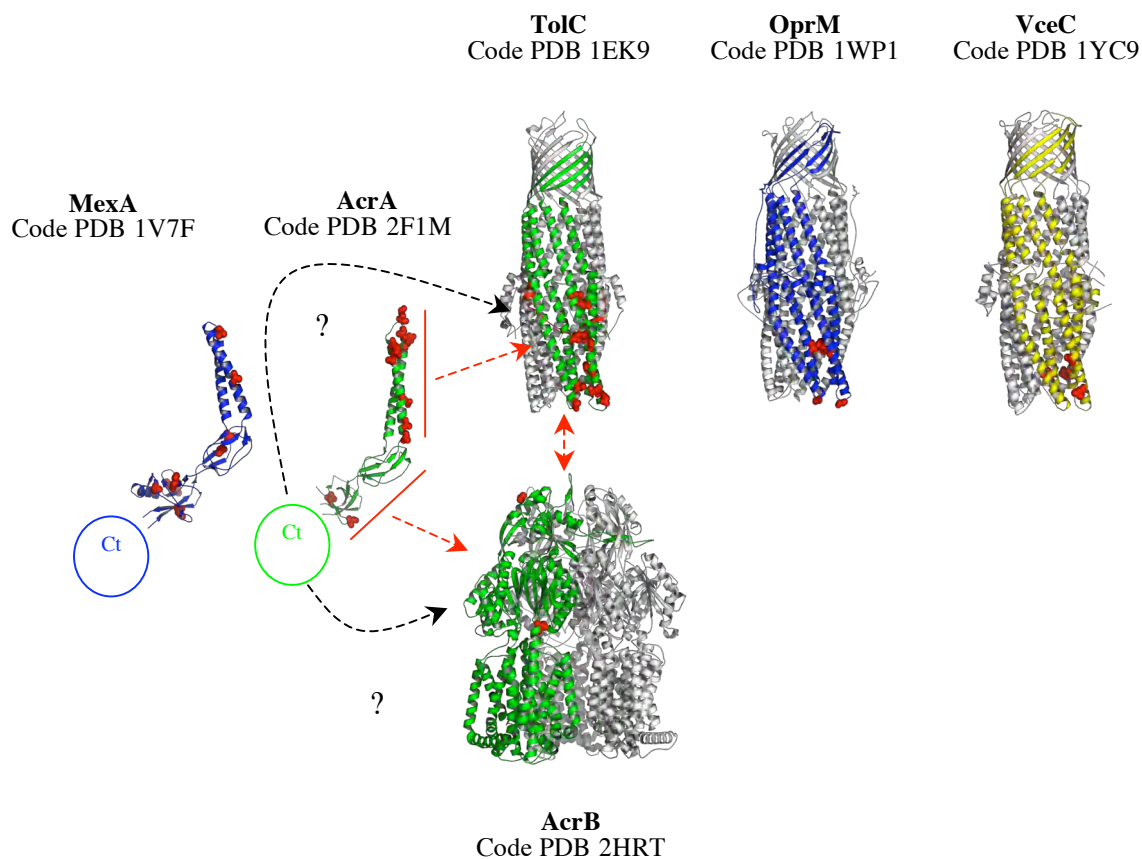
Schéma du système d'efflux « AcrAB-TolC »
(Murakami & Yamaguchi, 2003)



Des résultats de mutagenèses, de constructions chimériques et de protéolyses limitées ont permis de cerner plus précisément les régions d'interaction au sein du système d'efflux (Figure 23, Krishnamoorthy *et al.*, 2008 ; Nehme & Poole, 2007 ; Stegmeier *et al.*, 2006 ; Lobedanz *et al.*, 2007 ; Bokma *et al.*, 2006 ; Vedyappan *et al.*, 2006 ; Eda *et al.*, 2006 ; Nehme *et al.*, 2004 ; Yamanaka *et al.*, 2007). De toute évidence, les domaines « *coiled-coil* » et « lipoyl / mixte $\alpha + \beta$ » de la protéine MFP interagissent respectivement avec le domaine *coiled-coil* de la porine OMF et les domaines périplasmiques du transporteur RND. Cependant, les zones d'interaction entre la porine OMF et le transporteur RND ne sont pas bien définies. Des études de modélisation par *docking* suggèrent l'interaction des six boucles inter-hélicales de l'extrémité inférieure de la porine OMF avec les six coudes β du « domaine d'amarrage » du transporteur RND (Fernandez-Recio *et al.*, 2004). De plus, d'autres résultats suggèrent une interaction plus complexe entre la protéine MFP et la porine OMF, faisant intervenir la région C-terminale de la protéine MFP, également recrutée par le transporteur RND (Mikolosko *et al.*, 2006). Rappelons que la région C-terminale de la protéine MFP n'est pas visible dans la structure cristallographique, probablement à cause d'une agitation élevée ou de l'absence de repliement (Akama *et al.*, 2004(b) ; Higgins *et al.*, 2004). Enfin, il y a actuellement peu d'information sur les résidus du transporteur RND impliqués dans l'interaction avec les partenaires.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, c'est-à-dire les systèmes d'efflux RND chez *Pseudomonas aeruginosa* et leur implication dans la résistance aux antibiotiques, nous allons d'abord revoir les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques précisément mis en œuvre par cette bactérie afin de mieux cerner l'enjeu thérapeutique que représente l'inhibition des systèmes d'efflux.

Figure 23 : Localisation des résidus (en rouge) impliqués dans l'interaction entre les différents partenaires du système d'efflux et mis en évidence expérimentalement. Le tableau résume les acides aminés correspondants.



	<i>AcrA</i> MFP <i>E.coli</i>	<i>MexA</i> MFP <i>P.aeruginosa</i>	<i>TolC</i> OMF <i>E.coli</i>	<i>OprM</i> OMF <i>P.aeruginosa</i>	<i>VceV</i> OMF <i>V.cholerae</i>	<i>MexB</i> RND <i>P.aeruginosa</i>
Domaine coiled-coil (MFP ou OMF)	A99, A103, D111, L124, R128, Q136, I138, E142	A85, V106	S124, Q139, Q142, S363	T198, G216, G424, F439	D121, I133, Q142, V198, I369	
Domaine lipoyl (MFP)	n/a	V43, P45				
Domaine tonneauβ (MFP)	G240, V244, S249	A204, T233, V236, A240, V241, H256,				
Domaine équatorial (OMF)			L3, N188- K214, L412	n/a	n/a	
Domaine d'amarrage (RND)						A802 (A803 dans <i>AcrB</i>)
Domaine du pore (RND)						T329 (T330 dans <i>AcrB</i>)

12) LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Identifiée pour la première fois par Carle Gessard en 1882, la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas aeruginosa* est l'un des principaux micro-organismes responsables des infections nosocomiales avec *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Également connue sous le nom de bacille pyocyanique à cause de sa pigmentation bleue caractéristique, *P. aeruginosa* est une bactérie particulièrement robuste et se développe de façon ubiquitaire dans les sols et les milieux humides (Green *et al.*, 1974). Elle est considérée aujourd'hui comme étant un pathogène opportuniste, sans danger chez les personnes en bonne santé, mais hautement infectieuse chez les individus immunodéprimés (Lyczak *et al.*, 2000). Les sites d'infection privilégiés chez l'homme sont les voies respiratoires, urinaires et sanguines. Des taux importants de mortalité sont observés dans le cas de bactériémie (30-50%) ou de pneumonie nosocomiale (45-70%). *P. aeruginosa* est la première cause d'infection pulmonaire chez les personnes atteintes de mucoviscidose ou de bronchite chronique. Elle est aussi impliquée dans des bactériémies ou des septicémies chez les personnes porteuses du SIDA, les diabétiques ou les grands brûlés (Mesaros *et al.*, 2007).

P. aeruginosa est particulièrement résistante aux antiseptiques et aux antibiotiques, ce qui entraîne l'échec thérapeutique et permet aux souches résistantes de se propager. Cette résistance intrinsèque est essentiellement liée à sa faible perméabilité membranaire, à l'expression constitutive de pompes d'efflux et d'enzymes inactivant les antibiotiques (Hancock, 1998).

Par ailleurs, cette bactérie a la capacité remarquable de développer de nouveaux mécanismes de résistance. Outre les éléments génétiques mobiles (transposons et intégrons) et les plasmides qui permettent l'échange de gènes de résistance entre les bactéries, la résistance acquise est favorisée par la taille importante et la grande flexibilité de son génome. Séquencé il y a 8 ans (Stover *et al.*, 2000), le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus vastes parmi les bactéries pathogènes ou opportunistes (Guzman *et al.*, 2008) avec 5 570 cadres ouverts de lecture codés par un chromosome de 6.3 Mpb. De plus, 10% du génome est organisé en « îlots de pathogénicité », c'est-à-dire des régions mobiles et variables du génome codant majoritairement pour des facteurs de virulence ou des gènes de résistance aux antibiotiques (Kipnis *et al.*, 2006 ; Woods *et al.*, 2004 ; Normark *et al.*, 2002).

(1) Les biofilms

P. aeruginosa tend à s'organiser en biofilm, c'est-à-dire que les bactéries s'agrègent au sein d'une matrice gélatineuse sur différents types de surface dont les tissus humains. Cette organisation en biofilm protège les bactéries du milieu environnement et contribue à leur résistance aux antibiotiques. Ce phénomène est responsable de la persistance de *P. aeruginosa* dans les infections chroniques des voies respiratoires chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Mah *et al.*, 2003 ; Whiteley *et al.*, 2001). Des résultats récents ont montré que la formation des biofilms est induite par une concentration sub-inhibitrice d'aminoglycoside (Hoffman *et al.*, 2005). Le gène responsable de la réponse, appelé *arr* (*aminoglycoside response regulator*), coderait pour une phosphodiesterase membranaire dont le substrat est le cyclique di-GMP. Ce dernier est connu pour être un second messager impliqué dans les phénomènes d'adhésion chez les bactéries (D'Argenio & Miller, 2004).

(2) Les enzymes inactivant les β -lactames et les aminoglycosides

Les β -lactamases à large spectre ou *ESBL* (*extended-spectrum β -lactamase*) sont responsables de la résistance à la plupart des β -lactamines chez *P. aeruginosa*, sauf pour les carbapénèmes dont l'hydrolyse est assurée par les métallobetalactamases (Weldhagen *et al.*, 2003). Initialement limitées à certaines zones géographiques, de nouvelles souches produisant ces enzymes sont régulièrement découvertes partout dans le monde (Masterton & Turner, 2006). Les enzymes inactivant les aminoglycosides sont essentiellement les acétyltransférases (AAC). Les souches cliniques produisant ces enzymes sont trouvées de façon ubiquitaire dont 20% sont issues d'Europe et d'Amérique latine (Poole, 2005).

(3) La mutation des gyrases et la méthylation de l'ARN ribosomal

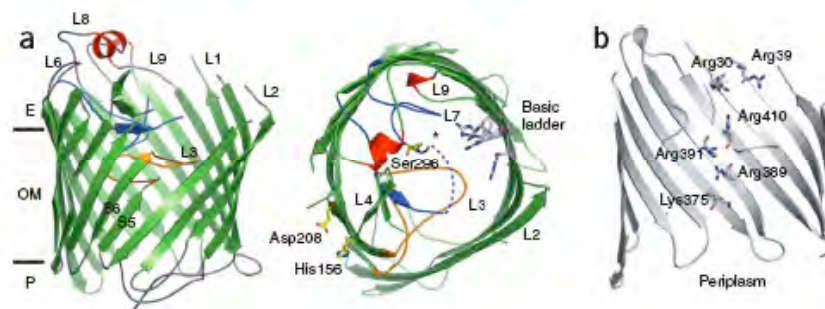
La principale cible des fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est l'ADN gyrase, notamment GyrA. La mutation de l'enzyme est donc le premier mécanisme de résistance à cette classe d'antibiotiques. Par exemple, la mutation de GyrA réduit de 16 fois son affinité pour la ciproflaxine (Mouneimne *et al.*, 1999). Il a également été montré que la méthylation de l'ARN 16S du ribosome confère la résistance aux aminoglycosides (Yokoyama *et al.*, 2003).

(4) Altération ou défaut de la porine OprD

En général, les bactéries à Gram-négatif possèdent des porines non-spécifiques, par exemple OmpF chez *E. coli*, qui permettent la diffusion passive de molécules hydrophiles de moins de 600 Da à travers la membrane externe (Koebnik *et al.*, 2000). Cependant, *P. aeruginosa* n'exprime pas ce type de porine et présente donc une membrane externe naturellement très peu perméable. La diffusion de petites molécules hydrophiles s'effectue alors par des porines sélectives de la famille d'OprD (Hancock & Brinkman, 2002 ; Tamber *et al.*, 2006). OprD est une porine qui permet de façon spécifique l'entrée des acides aminés basiques (Trias & Nikaido, 1990). Cette porine présente une importance clinique puisque c'est aussi une voie d'entrée pour les antibiotiques, notamment le carbapénème (Wolter *et al.*, 2004).

La structure cristallographique d'OprD a été résolue récemment à 2,9 Å de résolution (Figure 24, code PDB 2ODJ, Biswas *et al.*, 2007). Il s'agit d'un tonneau β à 18 brins dont l'intérieur est occupé par deux grandes boucles (L3 et L7) laissant un diamètre de 5,5 Å. La région de constriction est principalement électro négative mais présente une face chargée positivement formée par une « échelle d'Arg ». Cette bipolarité, également observée dans les porines de la famille d'OmpF (Karshikoff *et al.*, 1994), crée un champ électrostatique qui oriente les molécules polaires empruntant ce canal.

Figure 24 : Structure cristallographique d'OprD (Biswas *et al.*, 2007). (a) Vues latérale et transversale. Les brins β sont en vert, les hélices α sont en rouge et les boucles de la région de constriction L3 et L7 sont respectivement en orange et bleu. (b) Vue latérale représentant « l'échelle d'Arg » à l'intérieur de la porine.



La diminution de l'expression ou une altération de la porine OprD sont à l'origine de la résistance acquise de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes (Kohler *et al.*, 1999 ; Pai *et al.*, 2001 ; Epp *et al.*, 2001).

(5) L'efflux actif des antibiotiques : les transporteurs de la famille RND

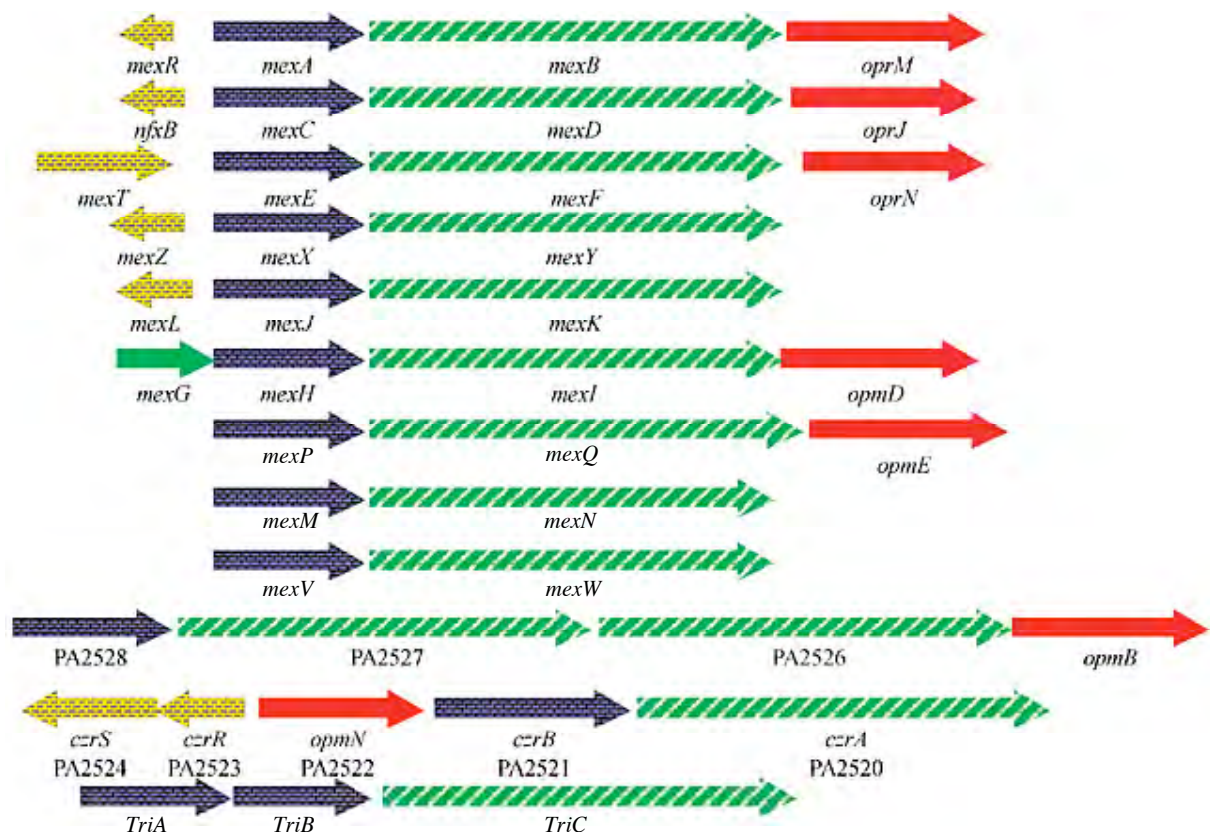
La diminution de l'expression de la porine OprD est souvent associée à l'efflux actif des antibiotiques, ce qui confère une résistance croisée à différentes classes d'antibiotique (Poole, 2004). Le système d'efflux majoritaire chez *P. aeruginosa* appartient à la famille HAE1 (*Hydrophobic/Amphiphilic Efflux-1*), une sous-classe des transporteurs de la famille RND (*Resistance Nodulation Division*). Comme nous l'avons vu précédemment, ces transporteurs sont énergisés par la force proto-motrice et fonctionnent en association avec une « protéine de fusion périplasmique » (MFP) et une porine appelée « facteur de la membrane externe » (OMF). On parle d'un système d'efflux tripartite et par convention, les systèmes d'efflux sont nommés dans l'ordre « MFP-RND-OMF ».

Sur la base d'homologie de séquences (Stover *et al.*, 2000), il existe potentiellement douze pompes d'efflux, dont dix ont été mise en évidence expérimentalement (Kumar & Schweizer, 2005 ; Mima *et al.*, 2005 ; Mima *et al.*, 2007). Les gènes codant les systèmes d'efflux s'organisent en opérons, comprenant un régulateur transcriptionnel, la protéine MFP, le transporteur RND et la porine OMF (Figure 25, Schweizer, 2003).

Cependant, tous les opérons ne présentent pas forcément le régulateur ou la porine OMF. De plus, certains opérons présentent un gène RND ou MFP supplémentaire et un seul opéron présente un gène codant pour une protéine membranaire inconnue (mexG).

Contrairement à *E. coli* où une seule OMF, TolC, a été mise en évidence et peut fonctionner avec différentes pompes, il existe au moins 18 OMF (homologues à TolC) chez *P. aeruginosa* qui sont exprimées à différent degré et participent spécifiquement à un ou plusieurs systèmes d'efflux donnés (Jo *et al.*, 2003).

Figure 25 : Schéma des opérons codant pour les 12 systèmes d'efflux RND chez *P. aeruginosa* (Schweizer, 2003). Les 10 pompes caractérisées expérimentalement sont indiquées par leur appellation et les 2 pompes encore hypothétiques sont indiquées par le numéro du gène. Chaque flèche correspond à une séquence codante : les régulateurs sont en jaune, les protéines MFP sont en gris, les transporteur RND sont en vert hachuré, les porines OMF sont en rouge et le gène codant pour une protéine membranaire inconnue (MexG) est en vert.



a) MexAB-OprM (Poole *et al.*, 1993)

Premier système d'efflux RND à avoir été découvert chez *P. aeruginosa*, MexAB-OprM est exprimé de façon constitutive et contribue à la résistance innée aux antibiotiques des souches sauvages. De plus, son spectre d'action sur les antibiotiques est très large, incluant les β -lactames, les quinolones, les macrolides, les tétracyclines, le chloramphénicol, la novobiocine, les sulfonamides, le triméthoprim et la thiolactomycine. D'autres molécules peuvent être transportées comme le cristal violet, le SDS, le triclosan et le bromure d'éthidium (Kumar & Schweizer, 2005). Les isolats cliniques de *P. aeruginosa* surexprimant la pompe MexAB-OprM sont très courants. Une étude britannique a montré qu'au moins 80% des souches résistantes à la carbénicilline surexpriment la pompe MexAB-OprM (Williams *et al.*, 1984). Une étude française a également montré qu'une grande proportion (46%) d'isolats cliniques résistants à la ticarcilline surexpriment la même pompe MexAB-OprM (Hocquet *et al.*, 2007). La surexpression de la pompe MexAB-OprM résulte souvent d'une mutation dans le gène du répresseur adjacent MexR (Saito *et al.*, 1999 ; Higgins *et al.*, 2003), mais des cas de surexpression sans mutation dans le gène du répresseur ont également été observés (Ziha-Zafiri *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2004).

b) MexCD-OprJ (Poole *et al.*, 1996)

Absente dans les souches sauvages, la pompe MexCD-OprJ est surexprimée dans les souches portant la mutation dans son répresseur NfxB. Il en résulte des souches résistantes aux quinolones, à la tétracycline, au chloramphénicol, à l'acriflavine, au bromure d'éthidium, au triclosan et aux solvants organiques (Poole *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1998 ; Chuanchuen *et al.*, 2001). La sélection de souches surexprimant MexCD-OprJ peut s'effectuer en présence de fluoroquinolones, comme la trovafloxacin (Join-Lambert *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'expression de MexCD-OprJ peut être induite, non par des antibiotiques, mais des colorants comme le bromure d'éthidium, la rhodamine ou l'acriflavine (Morita *et al.*, 2001). D'un point de vue clinique, il semblerait que la surexpression de cette pompe soit plutôt impliquée dans la résistance aux antiseptiques (Morita *et al.*, 2003).

c) MexEF-OprN (Kohler *et al.*, 1997(a))

La pompe MexEF-OprN est surexprimée dans les souches de type *nfxc* où une mutation dans l'activateur MexT le rend effectif. Cette pompe confère la résistance aux fluoroquinolones, à la tétracycline, au chloramphénicol et au triméthoprime (Schweizer, 2005). Notons que les mutants de type *nfxc* ont également une expression atténuée de la porine OprD, ce qui contribue à la résistance à l'imipénème (Ochs *et al.*, 1999). L'exposition de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones induit des mutants surexprimant la pompe MexEF-OprN (Join-Lambert *et al.*, 2001 ; Kohler *et al.*, 1997(b)). Par ailleurs, des souches cliniques vétérinaires surexprimant la pompe ont également été isolées (Beinlich *et al.*, 2001).

d) MexXY (Mine *et al.*, 1999 ; Aires *et al.*, 1999)

Contrairement aux systèmes d'efflux que nous venons de voir, l'opéron *mexXY* ne présente pas sa propre porine mais fonctionne avec OprM. La délétion du gène *mexXY* augmente la susceptibilité de *P. aeruginosa* aux aminoglycosides, à la tétracycline et à l'érythromycine (Aires *et al.*, 1999). De façon étonnante, l'expression du gène *mexXY* dans *E. coli* confère une résistance aux fluoroquinolones, ce qui n'est pas observé chez *P. aeruginosa* (Mine *et al.*, 1999 ; Aires *et al.*, 1999). La surexpression de la pompe MexXY-OprM est induite spécifiquement par les aminoglycosides (Masuda *et al.*, 2000 ; Westbrook-Wadman *et al.*, 1999), ce qui est corrélé avec l'étude de souches cliniques résistantes aux aminoglycosides qui présente une surexpression du gène *mexXY* (Sobel *et al.*, 2003). Chez les patients atteints de fibrose kystique (mucoviscidose), la surexpression de MexXY-OprM est liée à une mutation dans le gène répresseur adjacent *mexZ*. Cependant, d'autres mécanismes régulant indirectement l'expression du gène *mexXY* ont été mis en évidence (Vogne *et al.*, 2004 ; Morita *et al.*, 2006 ; Jeannot *et al.*, 2005). Les isolats cliniques de *P. aeruginosa* surexprimant MexXY-OprM sont également issus de souches exposées aux fluoroquinolones, à la cefépime et à la ticarcilline (Hocquet *et al.*, 2007 ; Hocquet *et al.*, 2008). De ce fait, MexXY-OprM constitue avec MexAB-OprM les systèmes d'efflux les plus prévalents dans les souches cliniques de *P. aeruginosa* (Llanes *et al.*, 2004).

e) MexJK (Chuanchien *et al.*, 2002)

De la même façon que MexXY, la pompe MexJK fonctionne avec la porine OprM. Elle présente un spectre d'action particulièrement restreint, comprenant l'érythromycine, la tétracycline et le triclosan. L'expression de cette pompe est induite par le triclosan, démontrant ainsi que la résistance aux antibiotiques peut également être issue d'une utilisation massive d'antiseptique. De plus, il a été montré que MexJK-OprM peut transporter l'érythromycine et la tétracycline, mais nécessite la porine OpmH, une OMF qui n'est pas localisée dans les opérons (Jo *et al.*, 2002), pour transporter le triclosan (Chuanchien *et al.*, 2005). C'est la première fois qu'on observe une spécificité d'action d'une pompe en fonction de la porine. Des isolats cliniques de *P. aeruginosa* n'ont pas encore été mis en évidence.

f) MexGHI-OpmD (Aendekerk *et al.*, 2002)

Le système d'efflux MexGHI-OpmD est constitué de la protéine périplasmique MexH, du transporteur MexI, de la porine OpmD et d'un 4^e partenaire MexG qui correspond à une petite protéine membranaire de fonction inconnue. Cette pompe est active dans les souches sauvages et leur confère la résistance au vanadium, à la norfloxacine, au bromure d'éthidium, à l'acriflavine et à la rhodamine (Sekiya *et al.*, 2003).

g) MexVW (Li *et al.*, 2003)

La pompe MexVW fonctionne avec la porine OprM et confère la résistance aux fluoroquinolones, à la tétracycline, au chloramphénicol, à l'érythromycine, au bromure d'éthidium et à l'acriflavine. Elle n'a pas été identifiée dans les souches cliniques.

h) MexPQ-OpmE et MexMN (Mima *et al.*, 2005)

Découvertes en même temps, MexPQ-OpmE et MexMN-OprM sont très peu exprimées dans les souches sauvages de *P. aeruginosa*. MexPQ-OpmE transporte les macrolides et les fluoroquinolones, tandis que MexMN-OprM confère une résistance au chloramphénicol et à la thiamphénicol. Sur la base d'homologie de séquence, MexPQ est similaire à MexEF de 83% et 90% respectivement. Cependant, elles ne présentent pas les mêmes spectres d'action. MexMN est également très homologue à une pompe encore hypothétique codée par les gènes PA2528-PA2527, avec respectivement 80% et 86% de similitude.

i) TriABC (Mima *et al.*, 2007)

Dernier système d'efflux caractérisé expérimentalement, TriABC a la particularité de présenter deux protéines périplasmiques, TriA et TriB, avec le transporteur TriC. L'expression de la pompe TriABC, qui fonctionne avec la porine OpmH (Jo *et al.*, 2002), est induite par le triclosan. Avec MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexJK-OpmH, la pompe TriABC-OpmH est la 5^e RND de *P. aeruginosa* impliquée dans l'efflux du triclosan, un antiseptique couramment utilisé.

Tableau 2 : Résumé des pompes d'efflux de la famille RND mises en évidence expérimentalement chez *P. aeruginosa*.

MFP	RND	OMF	Régulateur	Substrats
MexA	MexB	OprM	MexR	BL, CM, ML, NO, TM, TC, FQ. TR, AC. CV, EB. SDS.
MexC	MexD	OprJ	NfxB	CM, CP, FQ, TC. TR, AC. EB, RD.
MexE	MexF	OprN	MexT	CM, FQ, TC, TM.
MexH	MexI	OpmD	?	NO. AC. EB, RD. V.
MexJ	MexK	OprM/OpmH	MexL	EM, TC. TR.
MexV	MexW	OprM	?	CM, ER, FQ, TC. AC. EB.
MexX	MexY	OprM	MexZ	AG, ML, TC.
MexM	MexN	OprM	?	CM, TP.
MexP	MexQ	OpmE	?	MC, FQ.
TriA + TriB	TriC	OpmH	?	TR.

Antibiotiques : BL = β -lactame ; CM = chloramphénicol ; ML = macrolide ; NO = novobiocine ; TM = triméthoprim ; TC = tétracycline ; CP = céphalosporine ; FQ = fluoroquinolones ; EM = érythromycine ; TP = thiamphénicol ; AG = aminoglycosides.

Antiseptiques : TR = triclosan ; AC = acriflavine.

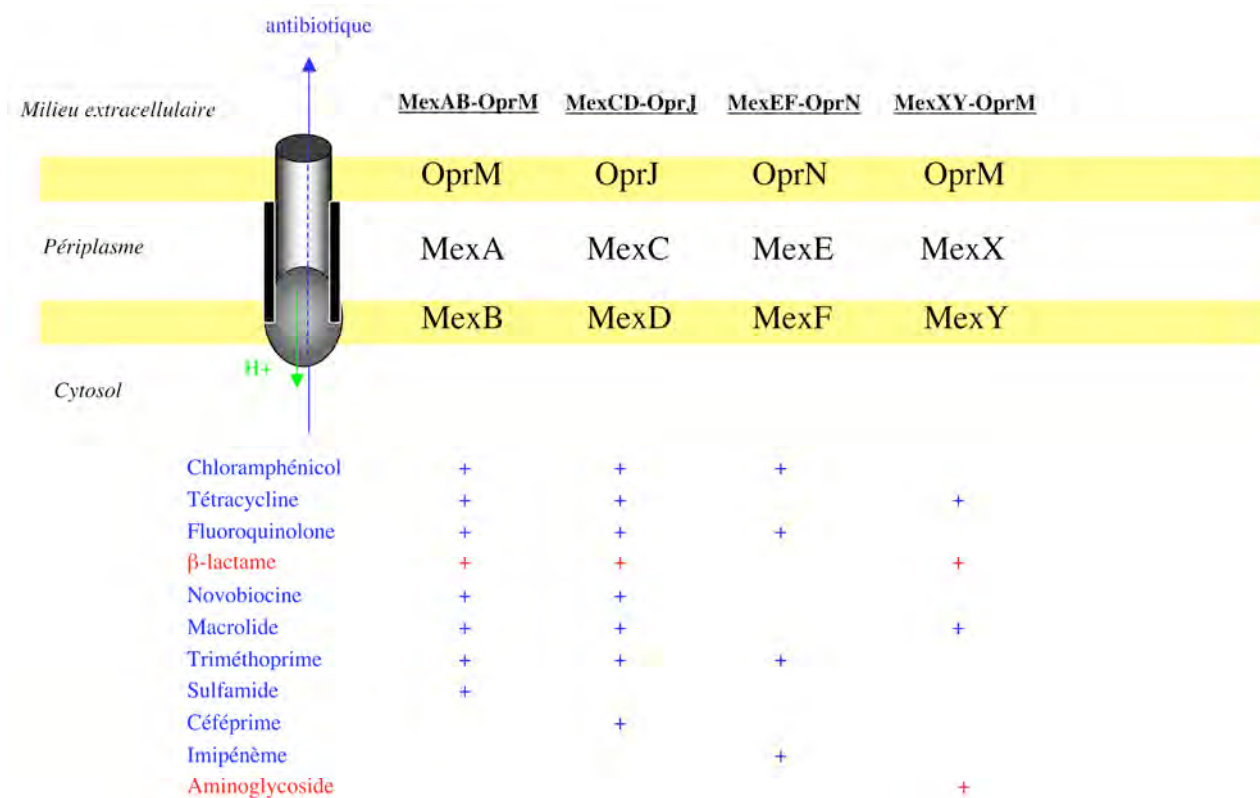
Colorants : EB = bromure d'éthidium ; CV = cristal violet ; RD = rhodamine.

Détergent : SDS = sodium dodécyl sulfate.

Métal : V = vanadium.

Parmi les 10 pompes d'efflux caractérisées à ce jour (Tableau 2), MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprM et MexXY-OprM sont les seules à avoir été observées dans des isolats cliniques, avec une forte prévalence pour MexAB-OprM et MexXY-OprM (Hocquet *et al.*, 2007).

La figure ci-dessous résume les antibiotiques exportés par les pompes d'efflux d'importance clinique. Les antibiotiques marqués en rouge correspondent à ceux couramment employés contre *P. aeruginosa* en milieu hospitalier (Mesaros *et al.*, 2007).



13) UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE : L'INHIBITION DES POMPES D'EFFLUX RND

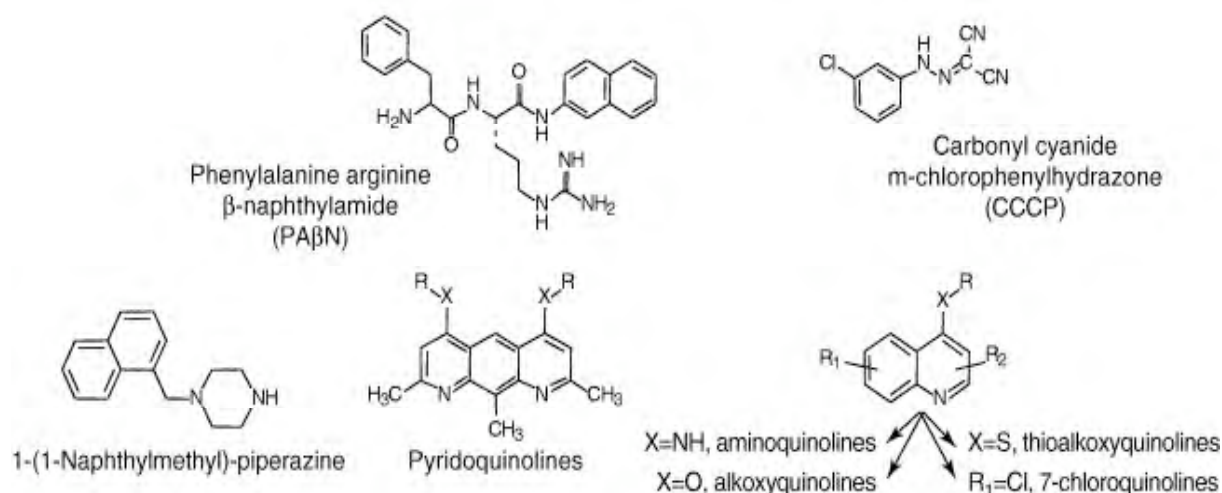
De nouveaux antibiotiques tardent à être mis sur le marché et les pompes d'efflux contribuent significativement à l'émergence de bactéries multi-résistantes à la plupart des antibiotiques couramment utilisés, voir même des nouveaux antimicrobiens comme l'inhibiteur de la peptide déformylase (Dean *et al.*, 2005), la plectasine (Myging *et al.*, 2005) ou la platensimycine (Wang *et al.*, 2006). Il devient alors important de trouver des inhibiteurs des pompes d'efflux (communément appelé EPI pour *efflux pump inhibitor*) afin de restaurer l'efficacité des antibiotiques. De plus, la surexpression de certains systèmes d'efflux semble être un préalable à l'émergence de souches résistantes (Ricci *et al.*, 2006 ; Yan *et al.*, 2006). Trois stratégies générales sont envisagées :

1. « Contourner la pompe d'efflux » en remodelant la structure chimique d'anciens antibiotiques afin de diminuer leur affinité avec le transporteur ;
2. « Modifier le trafic transmembranaire » soit en augmentant la perméabilité membranaire pour augmenter la concentration intracellulaire d'antibiotiques et saturer les pompes, soit en bloquant la porine OMF, ce qui a déjà été observé pour TolC (Higgins *et al.*, 2004) ;
3. « Altérer directement la pompe » à l'aide d'inhibiteurs ou d'agent découplant la pompe de la force protomotrice comme le CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*).

Différentes familles d'inhibiteurs des pompes d'efflux, obtenues par criblage, sont actuellement en cours d'étude (Figure 26) :

- Les pyridopyrimidine et les dérivés peptidiques ont été sélectionnés et développés à partir de leur action inhibitrice sur les pompes d'efflux de *P. aeruginosa*. Le premier est un dérivé peptidique, la Phe-Arg β -naphthylamide (PA β N). Il est capable de restaurer l'activité de différents antibiotiques dont la lévofloxacine, le chloramphénicol ou les macrolides (Mahamoud *et al.*, 2007). Des résultats de structure cristallographique d'AcrB en complexe avec l'inhibiteur ont montré qu'il se fixe dans la même poche de fixation que le substrat, s'agissant alors d'un inhibiteur compétitif (Yu *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2005). Mais le problème majeur de ces inhibiteurs est leur toxicité (Pagès *et al.*, 2005 ; Lomovskaya *et al.*, 2006) ;
- Les dérivés des quinolines ont été développés à partir de leur action inhibitrice sur les pompes d'efflux d'*Enterobacter aerogenes* (Mahamoud *et al.*, 2006 ; Chevalier *et al.*, 2001). Il a été montré que ces EPI, dits à large spectre d'action, peuvent restaurer l'efficacité des quinolones, des phénicolés et des cyclines chez *E. aerogenes* ou *Klebsiella pneumoniae*. Cependant, cette famille d'EPI a peu d'effet sur la pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Mahamoud *et al.*, 2007) ;
- Les arylpipéridines et les arylpipérazines sont respectivement capables de restaurer l'effet antibiotique de la linézolide ou d'inverser la résistance des souches surexprimant les RND chez *E. coli* (Thorarensen *et al.*, 2001 ; Bohnert *et al.*, 2005). La *N*-méthylpyrrolidone (NMP) est un pharmacophore d'arylpipérazine potentiel qui a été testé sur des souches cliniques, induisant une augmentation intracellulaire d'antibiotiques dont les fluoroquinolones, le chloramphénicol ou le linézolide. De plus, la NMP est également active sur *Acinetobacter baumannii* et dans différentes entérobactéries, dont *P. aeruginosa* (Mahamoud *et al.*, 2007). Cependant, l'arylpipérazine est un agoniste de la sérotonine et pourrait être toxique chez l'homme.

Figure 26 : Exemples d' inhibiteurs des pompes d'efflux (Pagès et al., 2005).



Le tableau ci-dessous résume les différents types d'inhibiteurs des pompes d'efflux connus chez *P. aeruginosa* ainsi que les antibiotiques dont l'activité est restaurée (Mahamoud et al., 2007) :

Types d'EPI	Antibiotiques restaurés
Analogue des quinolones	Fluoroquinolones ; macrolides.
Dérivé peptidique	Quinolones ; chloramphénicol ; macrolides ; carbénicilline ; tétracycline.
Pyridopyrimidine	Fluoroquinolones ; β-lactamines.

À ce jour, aucun EPI n'a encore été mis sur le marché. Mais grâce aux avancées importantes dans ce domaine de recherche, un EPI contre *P. aeruginosa* (identifié par le code MP-601,205) est actuellement en phase II d'essai clinique (Lynch, 2006). De plus, différents dérivés des pyridopyrimidines, fonctionnalisés par des ammoniums quaternaires, sont présentés comme de bons candidats aux essais cliniques (d'EPI contre *P. aeruginosa*) grâce à leur haute solubilité et à leur faible toxicité (Yoshida et al., 2007).

L'avancé des connaissances structurales des systèmes d'efflux RND est donc un enjeu important puisque cela pourrait permettre de mieux comprendre l'action des EPI, de les optimiser ou d'en concevoir de nouveaux.

Actuellement, le seul inhibiteur dont on connaît le mode d'action est le dérivé peptidique PA β N. En effet, la structure cristallographique de ce dernier en complexe avec le transporteur AcrB montre qu'il se loge au niveau du même site de fixation que le substrat, dans la cavité centrale du transporteur (Yu *et al.*, 2005).

14) PRESENTATION DE LA THESE

Mon sujet de thèse porte sur l'étude structurale, essentiellement par cristallographie X, de la pompe d'efflux MexXY-OprM qui présente la particularité d'être spécifique aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Les résultats sont présentés en quatre parties :

- (1) La structure cristallographique de la porine **OprM** a été résolue à 2.4 Å de résolution. Bien que sa structure soit globalement proche de son homologue TolC, des différences notables sont observées au niveau des interactions *coiled-coil* du tonneau α , des connexions distales assurant l'état fermé de la porine, de la boucle équatoriale impliquée dans l'interaction avec le partenaire périplasmique ou encore des boucles extracellulaires jouant un rôle dans l'ouverture de la partie supérieure du canal. Ces différences structurales entre OprM et TolC ont probablement une répercussion sur leur mécanisme d'ouverture que nous avons modélisé à travers l'analyse des modes normaux.
- (2) Une version hydrosoluble de la protéine périplasmique **MexX** a été produite et purifiée en grande quantité. Une condition de cristallisation possible a été obtenue lorsque nous nous sommes affranchis du domaine C-terminal. L'étude par RMN de ce domaine isolé a montré qu'il n'est probablement pas structuré.
- (3) Une stoechiométrie d'interaction entre **OprM** et la protéine périplasmique **MexA** est proposée sur la base des résultats obtenus en BN-PAGE (*Blue-Native Gel Electrophoresis*) et en mesure de diffusion par FRAPP (*Fluorescence Recovery After Pattern Photobleaching*).
- (4) Un modèle structural par homologie de la protéine **MexY** a été obtenu, ce qui nous a permis de discuter des différents mutants cliniques observés et d'essayer de mieux comprendre le fonctionnement de cette pompe.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

METHODES BIOCHIMIQUES

1) PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES

RECOMBINANTES

La cristallographie des protéines est une technique qui nécessite au départ une grande quantité de protéine, classiquement 100-500 μl à 5-30 mg/ml pour les premiers essais de cristallisation. Un projet d'étude structurale commence donc obligatoirement par la mise en place d'une stratégie de production adéquate. Grâce aux développements importants du clonage moléculaire durant les dernières décennies, la stratégie d'expression des protéines recombinantes est la seule technique qui permet de produire en quantité abondante les protéines qui ne le sont pas dans leur contexte naturel. *Escherichia coli* constitue actuellement le système d'expression de choix pour sa croissance cellulaire rapide, sa facilité de manipulation et son faible coût de revient (Terpe, 2006).

Nous avons choisi de cloner et de surexprimer les différentes protéines de *Pseudomonas aeruginosa* (souche sauvage PAO1, Stover *et al.*, 2000) de façon hétérologue dans *E. coli*. Les protéines sont associées à une étiquette de 6 histidines à l'extrémité N- ou C-terminale pour faciliter la purification sur résine chargée en nickel (Vaugh, 2005).

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques des différentes protéines clonées (après maturation protéolytique).

- Adaptateurs MFP : MexAp (avec la palmitoylation) ; MexA (sans Cys N-ter, sans palmitoylation) ; MexAc (avec Cys N-ter, sans palmitoylation) ; MexX (sans Cys N-ter, sans palmitoylation) ; MexXt (MexX tronquée, sans le domaine C-ter) ; MexXct (domaine C-ter de MexX).
- Porine OMF : OprM.
- Transporteurs RND : MexB ; MexY.

	MFP			RND			OMF		
	MexAp	MexAc	MexA	MexX	MexXt	MexXct	MexB	MexY	OprM
Nom du locus	PA0425	PA0425	PA0425	PA2019	PA2019	PA2019	PA0426	PA2018	PA0427
Séquence exprimée	C24-G383	C24-G383	G25-G383	E25-Q396	A48-D312	L298-Q396	M1-Q1046	M1-A1044	M1-A485
Nombre de résidus	366 + 1 palmityl	366	365	378	271	99	1046	1051	474 + 1 palmityl
MM (Da)	39507.40	39357.50	39254.40	40343.60	29490.50	10297.60	112790.80	113549.10	51942.90
ϵ (ml.mg⁻¹.cm⁻¹)	0.44	0.44	0.44	0.54	0.35	1.11	0.85	0.76	0.86
pH_I	9.28	9.10	9.28	6.09	6.72	9.86	5.36	6.10	5.65
Position du His-tag	C-ter	N-ter	C-ter	N-ter	C-ter	N-ter	C-ter	C-ter	C-ter
Membranaire	+						+	+	+

ϵ = coefficient d'extinction molaire à 280 nm

NB : l'étiquette de 6 histidines est prise en compte dans les différents calculs.

A) Clonage des différents partenaires du système d'efflux

Les différentes séquences codantes de *P. aeruginosa* sont générées par PCR à partir des plasmides pOM1 (contenant l'opéron de MexAB-OprM, Köhler *et al.*, 1996) ou pAGH97 (contenant l'opéron de MexXY, Aires *et al.*, 1999). Les réactions sont réalisées à l'aide des kits PCR *HotStar Taq* ou *HotStar HiFidelity* (Qiagen). Les conditions expérimentales ainsi que les amorces de PCR sont résumées dans les tableaux suivants :

Table 1. PCR Components (Reaction Mix and Template DNA)

Component	Volume/reaction	Final concentration
Reaction mix		
5x HotStar HiFidelity PCR Buffer (contains dNTPs)*	10 µl	1x
25 mM MgSO ₄	Variable, see Table 3	See Table 3
Primer A	Variable	1 µM [†]
Primer B	Variable	1 µM [†]
HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2.5 units/µl)	● 1 µl, [‡] ▲ 2 µl [‡]	● 2.5 units, ▲ 5 units
RNase-free water	Variable	–
Template DNA		
Template DNA, added at step 4	Variable	See Table 2
Total volume	50 µl	–

* Contains optimized concentration of dNTPs and 7.5 mM MgSO₄

[†] Dependent on expected PCR product length. In general, use ● 1 µl enzyme when amplifying PCR products ≤ 2kb and ▲ 2 µl enzyme when amplifying PCR products ▲ 2–5 kb.

[‡] See Table 15 (page 33) for molar conversion ratios.

Table 2. Optimal Amounts of Starting Template from Different Origins

Starting template [‡]	Optimal range
Human genomic DNA	1 ng – 200 ng
cDNA [‡]	10 ng – 100 ng
Bacterial DNA	10 pg – 10 ng
PCR fragment (1 kb DNA)	10 fg – 1 ng
Plasmid DNA	0.1 ng – 50 ng

[‡] If template amounts strongly differ from the given value, refer to Appendix C, Table 19, page 35.

[‡] Optimal starting template amount depends on the abundance of the respective molecule in your sample. The lower value refers to highly abundant transcripts and the upper values to low abundant transcripts. To amplify long cDNA species, it is strongly recommended to use cDNA generated using oligo-dT primers only.

Table 3. Final Mg²⁺ Concentrations

Final Mg ²⁺ concentration in reaction (mM):	1.5	2.0	2.5
Required volume of 25 mM MgSO ₄ per reaction (µl):	0	1	2

Table 4. Optimized PCR Cycling Protocol

	Time	Optimized temperature	Comments
Initial activation step:	5 min	95°C	HotStar HiFidelity DNA Polymerase is activated by this heating step.
3-step cycling			
Denaturation:	15 sec	94°C	
Annealing:	1 min	50–68°C	Approximately 5°C below T_m of primers (see Table 15, Appendix B, page 32).
Extension:	● 1 min/kb	● 72°C	For PCR products of ≤2 kb, use an extension time of ● 1 min per kb DNA.
	▲ 2 min/kb	▲ 68°C	For PCR products 2–5 kb, use ▲ 2 min per kb DNA.*
Number of cycles:	30–45		The cycle number is dependent on the amount of template DNA, see Appendix C, page 34.
Final extension step	10 min	72°C	
End of PCR cycling:	Indefinite	4°C	It is recommended to program a 4°C hold step at the end of the PCR program

(**)

* It may be possible to reduce extension time to 1 min per kb.

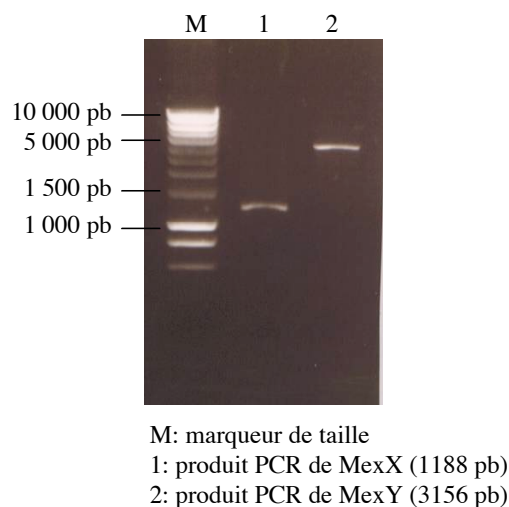
(**) Les températures de fusion T_m sont reportées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Amorces PCR des différentes constructions.

Protéine clonée	Amorces PCR	Matrice (plasmide)	Tm (°C)
OprM (M1-A485)	Allée - NdeI : GGAATTCCATATGAAACGGTCCTTCCTTTCC Retour - XmaI / 6His : TCCCCCGGGTCAGTGATGGTGATGGTGATGAGCCTGGGGATCTTCCTTC TTCGCGGTCTG	pOM1	68
MexAp (M1-G383)	Allée - NdeI : GGAATTCCATATGCAACGAACGCCAGCCATGCGTGTACTG Retour - XmaI / 6His : TCCCCCGGGTCAGTGATGGTGATGGTGATGGCCCTTGCTGTCGGTTTTTC GCCGGAGC	pOM1	68
MexA (G25-G383)	Allée - NdeI : GGAATTCCATATGGGAAAAAGCGAGGCGCCGCCG Retour - XbaI / 6His : TGCTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGGCCCTTGCTGTCGGTTTTTCG	pOM1	68
MexAc (C24-G383)	Allée - NdeI / 6His : GGAATTCCATATGCATCACCATCACCATCACTGCGGAAAAAGCGAGGCGCC G Retour - XbaI : TGCTCTAGATCAGCCCTTGCTGTCGGTTTTTCG	pOM1	68
MexB (M1-Q1046)	Allée - NdeI : GGAATTCCATATGTCGAAGTTTTTCATTGATAGGCCCATTTTTCG Retour - XbaI / 6His : TGCTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGTTGCCCTTTTCGACGGACG CCTGCTG	pOM1	68
MexX (E25-Q396)	Allée - NdeI / 6His : GGAATTCCATATGCATCACCATCACCATCACGAAGAAGCAGCGGACGCCG G Retour - XbaI : TGCTCTAGATCACTGGCCCGCCGGCGAGGC	pAGH97	68
MexXt (A48-D312)	Allée - NdeI : GGAATTCCATATGGCGCCTATCGGCATCACCAGCGA Retour - XbaI / 6His : TGCTCTAGATCAATGGTGATGGTGATGGTTCGCGCGGGACGGTGAT	pAGH97	68
MexXct (L298-Q396)	Allée - NdeI / 6His : GGAATTCCATATGCATCACCATCACCATCACCTGCAGCGCGGGTGAACCCG Retour - XbaI : TGCTCTAGATCACTGGCCCGCCGGCGAGGC	pAGH97	68
MexY (M1-A1044)	Allée - NdeI : GGAATTCCATATGGCTCGTTTCTTCATTGACCGGCCGGTC Retour - XbaI / 6His : TGCTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGGGCTTGCTCCGTGGGGATCTG	pAGH97	68

Les produits d'amplification ainsi obtenus sont flanqués des sites de restriction 5'*NdeI*-3'*XmaI* ou 5'*NdeI*-3'*XbaI* nécessaires au clonage. Les produits de PCR sont visualisés après séparation électrophorétique à travers un gel d'agarose à 0.9% (w/v) en présence de BET. On dépose 2 µl de produit PCR par puit. Pour illustration, la figure 27 montre le résultat de PCR des séquences codantes de MexX et de MexY après électrophorèse.

Figure 27 : Electrophorèse en gel d'agarose 0.9% (w/v) des produits d'amplification par PCR de MexX et de MexY.



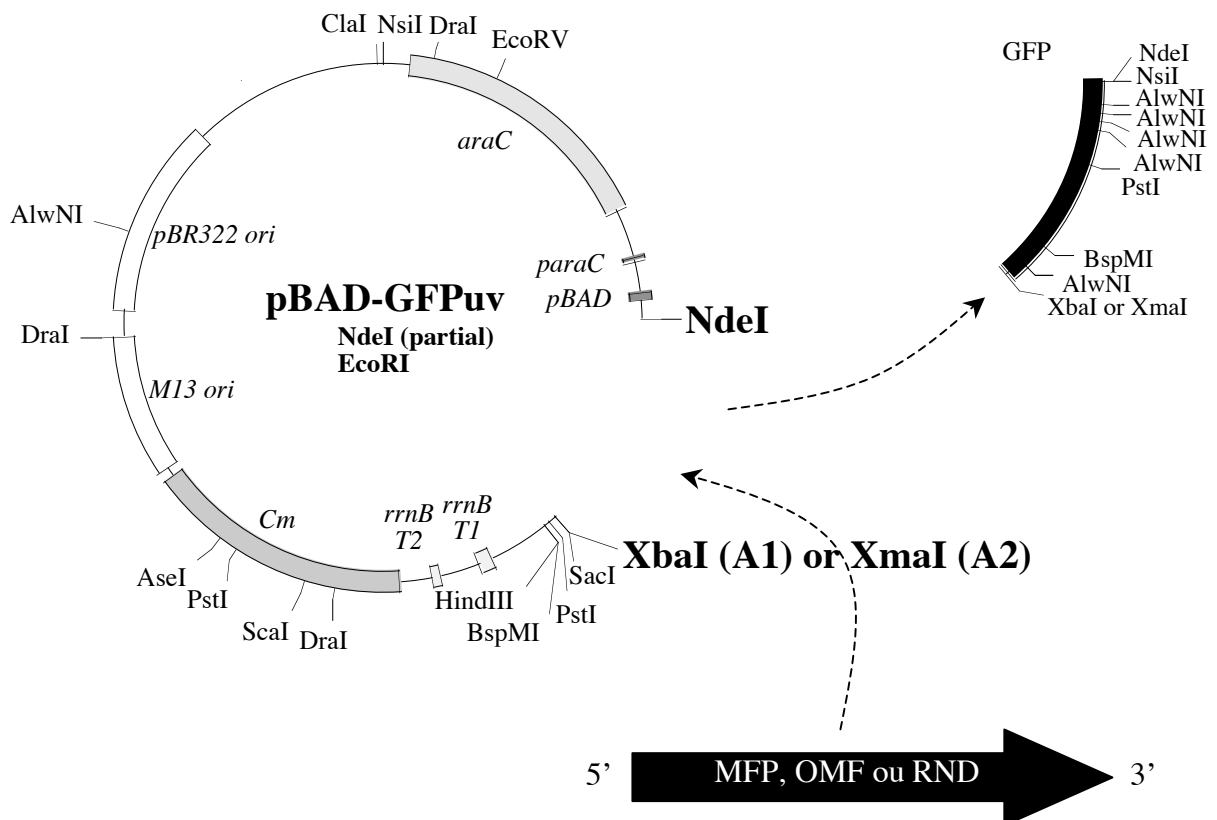
B) Le système d'expression pBAD33-GFPuv

Le vecteur d'expression que nous avons choisi est issu d'une construction particulière (Figure 28) : il s'agit d'un plasmide obtenu après insertion d'un fragment de 1726 pb, issu de la digestion *PaeI-EcoRV* du vecteur pBAD-GFPuv (Cramer *et al.*, 1996), dans le vecteur pBAD33 de 6112 pb (Guzman *et al.*, 1995) préalablement digéré de la même façon. Le vecteur d'expression ainsi obtenu, qu'on appellera pBAD33-GFPuv (Benabdelhak *et al.*, thèse de l'Université Paris-XI) porte le gène de résistance au chloramphénicol CAT (gène du *chloramphénicol acetyl-transferase*) en guise de marqueur de sélection. En aval de son promoteur inductible au L-arabinose, le pBAD33-GFPuv porte au niveau du site multiple de clonage le gène de la GFP (*gfpuv*), ce qui permet de faire un criblage visuel des clones positifs directement sur boîte de Pétri : en présence de L-arabinose et sous UV (312 nm), les clones porteurs du gène à cloner n'expriment pas la GFP, donc ne fluorescent pas.

Les produits de PCR obtenus sont purifiés grâce au kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) puis digérés par les enzymes de restriction adéquates (*NdeI*, *XmaI* ou *XbaI* de chez Biolabs, 1 unité d'enzyme/ μg d'ADN dans 50 μl final, durant 1 heure à 37°C). Ils sont ensuite insérés dans le vecteur pBAD33-GFPuv, lui-même préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé par la phosphatase alcaline *SAP* (Promega, 1 unité d'enzyme/ μg d'ADN, dans 50 μl final, durant 15 minutes à 37°C). L'insertion est réalisée avec la *T4 DNA ligase* (Biolabs, 1 unité d'enzyme/ μg d'ADN, dans 20 μl final, environ 16 heures à 16°C).

Les produits de ligation sont ensuite précipités dans une solution d'acétate de sodium 150 mM, éthanol 78% (v/v) et repris dans 10 μl d'eau pour une transformation bactérienne par électroporation dans la souche de clonage *E. coli* DH5 α .

Figure 28 : Stratégie de clonage moléculaire dans le vecteur pBAD33-GFPuv.



Les plasmides recombinants sont amplifiés après culture cellulaire des DH5 α sur la nuit (environ 16 heures) dans des tubes de 50 ml avec 5 ml de milieu LB, à 37°C et une agitation à 200 rpm, en présence d'antibiotique de sélection adéquat, en l'occurrence 25 μ g/ml de chloramphénicol. Ils sont ensuite purifiés à l'aide des kits *Miniprep* ou *Midiprep* (Qiagen ou Promega).

C) **Production des protéines recombinantes**

Les souches d'*E. coli* utilisées pour exprimer les protéines sont les BL21(DE3) ou les C43(DE3), cette dernière ayant l'avantage d'être mieux adaptée à l'expression de certaines protéines membranaires (Miroux *et al.*, 1996).

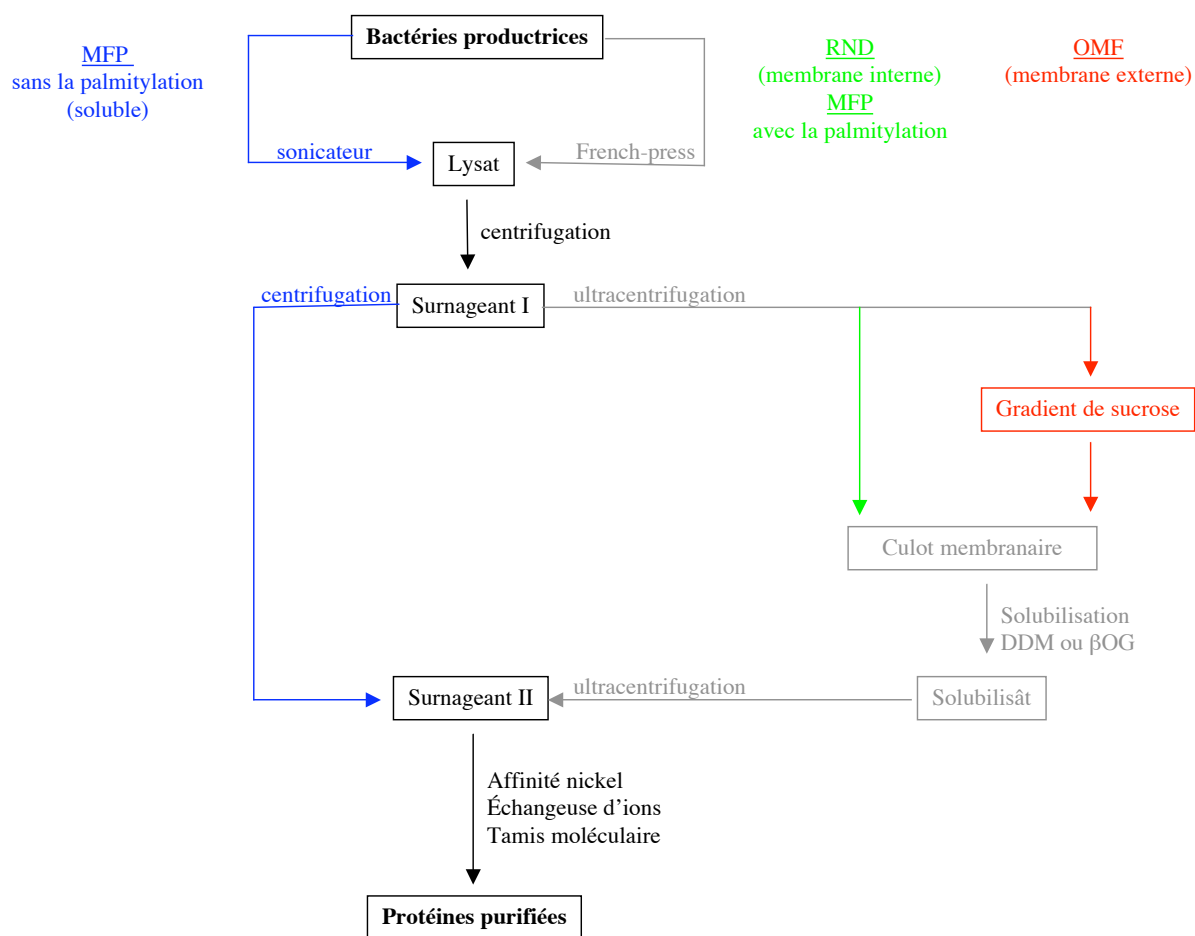
Après transformation dans l'une des souches suscitées, une cellule isolée est ensemencée dans 5 ml de LB en présence de 25 μ g/ml de chloramphénicol, à 37°C et 200 rpm, sur la nuit (environ 16 heures). Le lendemain, la pré-culture est diluée au 1/100^{ème} dans 1 litre du même milieu de culture et incubée dans les mêmes conditions jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0.6-0.8.

L'expression des protéines est alors induite par addition de 1 mM de L-arabinose, à 30°C ou 37°C et 200 rpm, de 1 à 3 heures. La DO à 600 nm est d'environ 1.5-2 en fin de production.

Les bactéries sont culottées à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C et peuvent être stockées à – 20°C.

D) Purification des protéines recombinantes (membranaires et solubles)

Trois types de protéines sont étudiés : une protéine soluble (MFP), une protéine de la membrane interne (RND) et une protéine de la membrane externe (OMF). La stratégie générale de purification est résumée dans le schéma suivant :



Les différentes étapes de purification sont suivies et contrôlées par électrophorèse à travers un gel de polyacrylamide SDS-PAGE de 10-14% (w/v), en condition dénaturante et réductrice (Laemmli, 1970 ; Weber *et al.*, 1972).

Les bactéries sont re-suspendues dans un tampon A1 (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM et 1 µl/ml d'un cocktail d'anti-protéases *SetIII* (Calbiochem) avant d'être lysées, soit par ultrasons dans le cas des protéines solubles (puissance de 20 W, 5 fois 1 minute), soit à très haute pression pour les protéines membranaires (presse de French, deux passages à 10 000 atm ou 69 MPa).

Le lysat ainsi obtenu est centrifugé à 10 000 g (4°C) pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré. À cette étape, le protocole diverge selon la protéine étudiée :

- Les constructions solubles MexA, MexX, MexXc et MexXct :

Une autre étape de centrifugation à 50 000 g (4°C) pendant 30 minutes permet de bien éliminer toutes les particules insolubles. Les protéines d'intérêt possèdent une étiquette de 6 histidines qui permet de les purifier de l'extrait bactérien soluble par chromatographie d'affinité de nickel (résine *Chelating fast-flow*, Amersham) dans un tampon B1 (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 250 mM, imidazole 25 mM pH 8), avec respectivement un lavage et une élution à 50 mM et 200 mM d'imidazole pH 8. Les fractions d'élution sont regroupées et dialysées sur la nuit (4°C) contre un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM afin d'éliminer l'excès d'imidazole. Le dialysat est ensuite purifié par chromatographie échangeuse d'ions dans le même tampon (colonne *ResourceS* ou *ResourceQ*, Amersham). Les protéines sont éluées par gradient continu de force ionique (0 à 500 mM de NaCl). Les fractions de la protéine d'intérêt purifiée sont rassemblées, dessalées par dialyse et concentrées à l'aide des concentrateurs *Amicon Ultra* (Millipore) jusqu'à 10-20 mg/ml.

- La porine de la membrane interne OprM :

Pour séparer les fragments de la membrane externe du reste, le surnageant est fractionné par ultracentrifugation sur gradient de saccharose (0.5 à 1.5 M) à 200 000 g pendant 3 heures (4°C). Le culot obtenu correspond à la fraction des membranes externes. Les membranes sont re-suspendues et solubilisées en présence de détergent, dans un tampon A2 (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, glycérol 10% (v/v), β OG ou DDM 2% (w/v)), à 4°C, sur la nuit (environ 16 heures). Le mélange est ensuite centrifugé 50 000 g pendant 30 minutes, à 4°C, avant d'être purifié par chromatographie d'affinité de nickel (résine *Chelating fast-flow*, Amersham) dans un tampon B2 (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, glycérol 10% (v/v), β OG 0.9% (w/v) ou DDM 0.05% (w/v), imidazole 20 mM pH 8). Les protéines fixées sont éluées par un gradient continu d'imidazole pH 8 (50-500 mM), à 5 ml/min. Les fractions éluées contenant OprM (entre 100 et 250 mM d'imidazole) sont rassemblées, éventuellement dessalées par dialyse et concentrées jusqu'à 8 mg/ml de protéine dans des concentrateurs *Amicon Ultra* (Millipore).

- Les transporteurs de la membrane interne MexB/MexY et la protéine palmitylée MexAp :

La purification s'effectue de la même façon que pour OprM, sans le gradient de saccharose à l'étape d'ultracentrifugation.

2) BN-PAGE (BLUE NATIVE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)

Le BN-PAGE est une électrophorèse en condition native. La présence du bleu de coomassie G250 permet de conférer une même densité de charge négative aux protéines sans les dénaturer. Il est donc possible de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire seule et en condition native (Schägger & von Jagow, 1991).

Pour chaque dépôt, on prépare 40 µl d'échantillon frais, contenant au plus 40 µg de protéines (dans 10 µl d'imidazole 20 mM pH 7, NaCl 50 mM), DDM 1% (w/v), G250 5% (w/v), glycérol 70% (v/v), acide 6-aminohexanoïque 250 mM.

Les échantillons sont incubés à 4°C pendant au moins 30 minutes. La migration électrophorétique a lieu à travers un gradient continu d'acrylamide 4-16%.

L'anode et la cathode ne baignent pas dans les mêmes tampons :

- Tampon anode A (Imidazole 25 mM pH 7)
- Tampon cathode C1 (Tricine 50 mM, imidazole 7.5 mM pH 7, bleu G250 à 0.02% (w/v))
- Tampon cathode C2 (Tricine 50 mM, imidazole 7.5 mM pH 7, bleu G250 à 0.002% (w/v))

La migration électrophorétique a lieu en deux temps :

- Migration à 7 mA pendant 30 minutes (ou 1 heure pour les gels de grand format 20 cm/16 cm) avec le tampon anode A et le tampon cathode C1.
- Migration à 10 mA pendant 1 heure (ou 16 heures pour les gels de grand format 20 cm/16 cm) avec le tampon anode A et le tampon cathode C2.

En fin de migration, les bandes de protéines sont visibles. Elles peuvent être colorées davantage en baignant le gel dans du bleu G250 ou R250, en présence d'acide acétique 10% (v/v). On élimine l'excès de bleu dans du méthanol 30% (v/v).

3) MARQUAGE DES CYSTEINES N-TERMINALES AVEC LE MTS-EMCA

Le MTS-EMCA (*N*-[2-methanethiosulfonylethyl]-7-methoxycoumarin-4-acetamide, Toronto Research) est un fluorophore capable de se lier de façon covalente à la chaîne latérale des cystéines *via* un pont disulfure entre le thiol de la cystéine et le groupement sulfhydryl (MTS).

25 µM de protéines (MexAp, MexA ou OprM) sont incubés avec 2 mM de MTS-EMCA dans un tampon HEPES 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, βOG 1% (w/v) à température ambiante, durant 2 heures, à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée en ajoutant un volume équivalent de tampon SDS-PAGE (Tris-HCl 60 mM pH 6.8, glycérol 25% (v/v), SDS 2% (w/v), bleu de bromophénol 0.1 % (w/v)).

Après électrophorèse SDS-PAGE, la fluorescence des disulfures mixtes protéine-MTS-EMCA est visualisée directement sur le gel, sous UV (312nm) avant de colorer le gel au bleu de coomassie.

4) CRISTALLISATION DES PROTEINES

Dans un premier temps, les essais de cristallisation sont effectués par criblage, selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise dans des boîtes *Greiner* de 96 puits, avec 3 cupules de dépôt par puit. Les dépôts sont réalisés grâce à un automate (Cybio).

Les solutions de cristallisation testées proviennent des kits commerciaux *Crystal Screen 1 & 2*, *Index 1 & 2* ou *Memb Fac / PEG ion* (Hampton). Les boîtes sont conservées à 18°C.

Dans un deuxième temps, l'optimisation des pistes de cristallisation est effectuée manuellement, par diffusion de vapeur en goutte suspendue, dans des boîtes *Limbro* de 24 puits. Différents paramètres sont modifiés, comme la concentration des agents précipitants, le pH, la concentration en sel, la température ou la concentration en protéine. Les différents agents précipitant et tampons sont préparés puis filtrés avant utilisation.

La co-cristallisation d'OprM avec différents antibiotiques (tétracycline, chloramphénicol, kanamycine ou ampicilline) est réalisée de la même façon que précédemment. 32 µM de trimères d'OprM sont préalablement mélangés avec 1 mM d'antibiotiques avant les essais de cristallisation.

METHODES BIOPHYSIQUES

5) CRISTALLOGRAPHIE DES RAYONS X

L'étude de la structure tridimensionnelle des macromolécules biologiques peut se faire par différentes techniques issues de la physique : la cristallographie des rayons X, la microscopie électronique (ME), la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Le tableau suivant résume quelques caractéristiques méthodologiques de ces différentes approches (Minor, 2007) :

	Résolution atomique ?	Intervalle de résolution typique	Taille limite des molécules (en kDa)	Inconvénient principal	Quantité minimum nécessaire
Cristallographie des rayons X	Oui	1.5-4 Å	Pas de limite	Cristaux 3D	100-500 µl à 5-30 mg/ml
ME sur molécules isolées	Non	10-20 Å	> 250-400	Structure à basse résolution	100 µl à 0.1 mg/ml
ME et diffraction des électrons	Oui	4.5-9 Å	15-250	Cristaux 2D	100 µl à 1 mg/ml
SAXS	Non	10-20 Å	10-600	Structure à basse résolution	100 µl à 5-30 mg/ml
RMN	Oui	1.5-3 Å	< 40	Molécule de taille limitée	100-500 µl à 5-30 mg/ml

La cristallographie des rayons X est la technique d'étude structurale à haute résolution la mieux adaptée à notre projet de recherche puisque les protéines d'intérêt sont des multimères de grande taille (40 à 330 kDa). Elle a pour but d'élucider et de visualiser la structure tridimensionnelle des molécules. En d'autre terme, il s'agit d'une technique d'imagerie à résolution atomique par laquelle il est nécessaire de disposer d'une source de rayonnement compatible avec une résolution à l'échelle atomique. Les rayonnements dont les longueurs d'onde sont du même ordre de grandeur que les distances interatomiques (c'est-à-dire ~1,5 Å) sont les rayons X.

Dans le cas des rayons X, trois problèmes se posent :

- (1) Le phénomène exploité est la diffusion élastique des rayons X par les électrons constitutifs de l'objet. Les caractéristiques du rayonnement diffusé (une onde électromagnétique définie par une amplitude et une phase) sont étroitement liées à la structure électronique de l'objet. Celle-ci est caractérisée par la densité électronique ρ . Le pouvoir de diffusion par une seule molécule est très faible ce qui oblige à faire diffuser un grand nombre de molécules simultanément pour additionner leur contribution et obtenir un signal exploitable. Pour avoir une diffusion cohérente de toutes les molécules, elles doivent être organisées de façon régulière dans l'espace. Cet état est possible dans le cristal qui est constitué d'un agencement périodique des molécules. Après diffusion, les ondes interagissent entre elles et créent des interférences, les rayons X sont réfléchis dans des directions privilégiées : c'est le phénomène de diffraction ;
- (2) L'énergie des rayons X est très élevée (10^3 - 10^5 eV), leur diffusion par les macromolécules biologiques s'accompagne d'une dégradation progressive de l'échantillon et introduit des erreurs lors des enregistrements ;
- (3) Il n'existe pas de système optique capable de faire converger les rayons X pour obtenir directement l'image de la molécule qui est la densité électronique ρ . Celle-ci peut être calculée par transformée de Fourier en partant des caractéristiques de l'onde électromagnétique diffusée, c'est-à-dire l'amplitude et la phase. Or, la seule information disponible expérimentalement est l'intensité des rayons diffractés qui permet de remonter à l'amplitude. L'information sur la phase n'est pas directement mesurable.

Au cours de la diffraction, les rayons X sont réfléchis dans des directions privilégiées de l'espace correspondant aux nœuds du réseau réciproque. Chaque atome du cristal (l'espace réel x,y,z) contribue à chaque réflexion dans l'espace réciproque h,k,l . Les ondes diffractées par un cristal peuvent être décrites par un nombre complexe :

le facteur de structure $F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(i\Phi_{hkl})$ avec h,k,l les coordonnées dans l'espace réciproque (ou indices de Miller), $|F_{hkl}|$ l'amplitude et Φ_{hkl} la phase de l'onde diffractée.

Les expériences de diffraction permettent de mesurer l'intensité des réflexions I_{hkl} qui est proportionnelle à $|F_{hkl}|^2$. Cependant, l'information de la phase Φ_{hkl} est perdue. Le problème consiste donc à retrouver cette information manquante pour calculer la densité électronique de la molécule $\rho(xyz)$ par transformée de Fourier inverse (ou synthèse de Fourier) du facteur de structure F_{hkl} :

$\rho(xyz) = 1/V \sum \{|F_{hkl}| \cdot \exp(i\Phi_{hkl}) \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)]\}$, avec V le volume de la maille cristalline, xyz les coordonnées dans le cristal (espace direct) et hkl les indices de Miller (espace réciproque).

A) Enregistrement des données de diffraction

(1) Source de rayons X

➤ Générateur à anode tournante

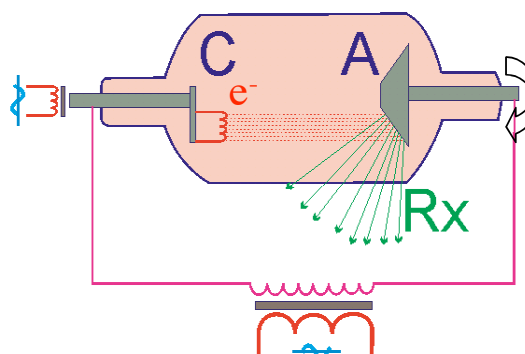
Le rayonnement X peut être obtenu par collision d'un faisceau d'électrons fortement accélérés par une différence de potentiel entre un filament cathodique C et une cible anodique A : c'est le générateur à anode tournante (Figure 29). Dans le cas de la cristallographie des macromolécules biologiques, la cible anodique est en cuivre. Le bombardement d'électrons sur la cible engendre des transitions électroniques qui émettent des rayonnements à $\sim 1,54 \text{ \AA}$, ce qui équivaut à l'énergie moyenne des électrons de la couche $K\alpha$ du cuivre. Ces générateurs de laboratoire permettent le plus souvent d'effectuer des tests de diffraction préliminaires.

Figure 29 :

Schéma d'un générateur de rayons X à anode tournante. Les rayonnements sortent du générateur à travers une fenêtre de beryllium qui absorbe peu les rayons X.

C : cathode

A : anode



➤ Synchrotron

L'enregistrement des données de diffraction à haute résolution s'effectue généralement avec des sources plus performantes : les rayonnements synchrotrons. Un synchrotron est un très grand équipement circulaire (avec des diamètres allant de 10 à quelque centaine de mètres) où des particules chargées (électrons ou positrons) évoluent à des vitesses proches de celle de la lumière. Lorsque ces particules sont accélérées dans un champ magnétique intense, leur trajectoire est déviée ce qui provoque l'émission tangentielle de rayonnements électromagnétiques s'étendant des infrarouges aux rayons X.

Le faisceau de rayons X produit par ces sources est beaucoup plus fin, polarisé, intense et brillant que celui des générateurs à anode tournante, avec un choix spectral plus large pouvant descendre en dessous de 1 \AA . La qualité des données de diffraction est considérablement améliorée et les temps d'enregistrements sont beaucoup plus courts.

La source utilisée dans notre projet de recherche est l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) à Grenoble. C'est le premier synchrotron de 3^e génération produisant des rayons X au service de la science. Il est constitué de trois parties (Figure 30) :

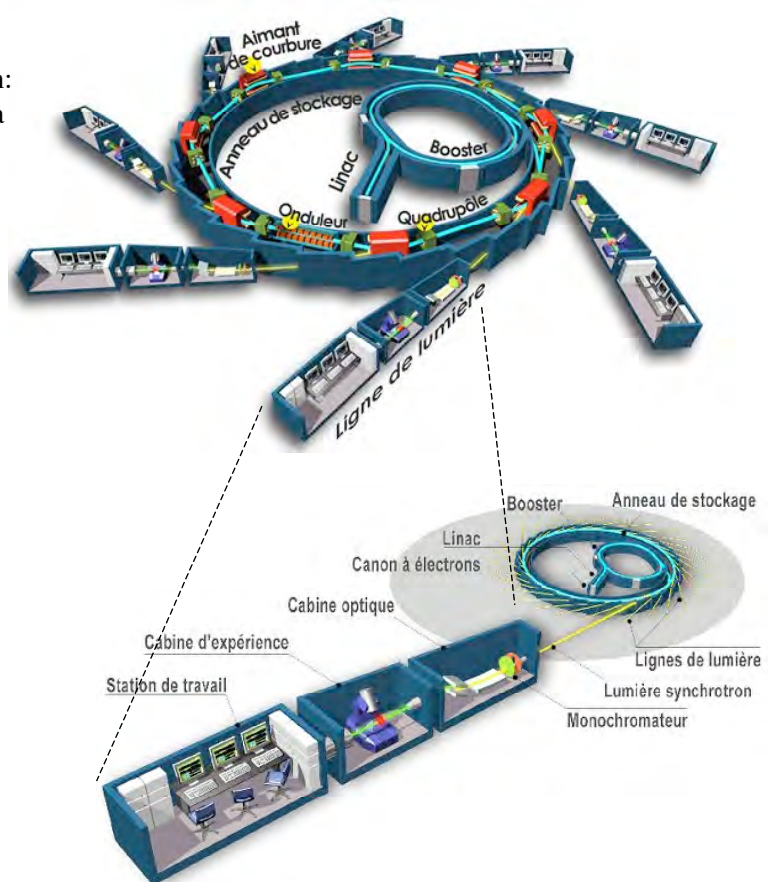
- le *linac* : un premier accélérateur linéaire de 16 mètres qui produit les électrons à 200 MeV ;
- le *booster* : un second accélérateur quasi-ellipsoïdal de 300 mètres où les électrons atteignent leur énergie maximum de 6 GeV ;

- l'anneau de stockage : les électrons issus du *booster* circulent dans cet anneau de 844 mètres à une vitesse proche de celle de la lumière.

À différents points de l'anneau de stockage, des aimants de courbure créent des champs magnétiques de 0,8 Tesla qui infléchissent le faisceau d'électrons : une radiation tangentielle est émise, c'est le rayonnement synchrotron.

Figure 30 :

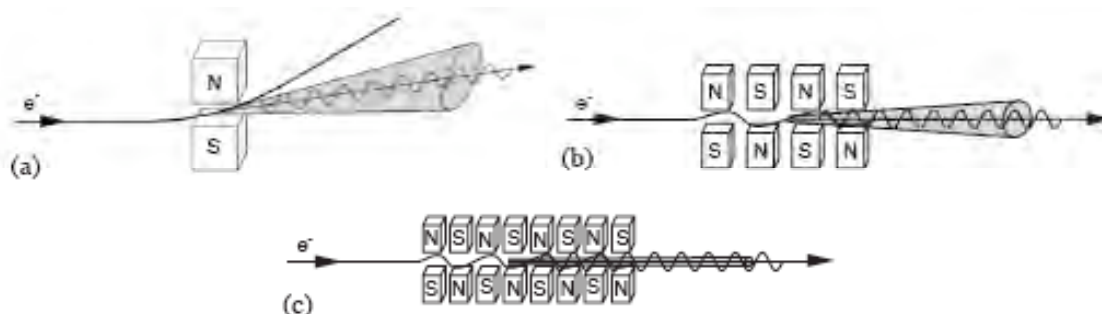
Schéma d'un équipement synchrotron: Chaque ligne de lumière correspond à une station expérimentale. L'expérimentateur monte les cristaux dans la cabine d'expérience et lance les enregistrements dans la station de travail, à l'abri des radiations. (auteurs : EPSIM/SOLEIL)



La qualité et la longueur d'onde du rayonnement synchrotron dépendent de l'énergie de la particule circulante mais aussi du champ magnétique appliqué. Trois types d'aimant au niveau de l'anneau de stockage permettent d'obtenir des rayonnements brillants et peu divergents (Figure 31, Dauter, 2005) :

- (a) Les aimants de courbure ou BM (*Bending Magnet*) : une seule paire d'aimants qui permet de produire un rayonnement tangentiel dont le spectre est relativement large ;
- (b) Les aimants de focalisation ou quadrupôles : quatre paires d'aimants qui permettent de renforcer le flux de rayons X ;
- (c) Les onduleurs ou *wrigglers* : caractéristiques des synchrotrons de 3^e génération, une série d'aimants permettent d'améliorer la brillance du rayonnement à une longueur d'onde particulière.

Figure 31 :



Représentation schématique des trois types d'aimant permettant d'obtenir les rayons X (Dauter, 2005) :

- (a) Aimants de courbure ou BM (*Bending Magnet*) ;
- (b) Aimants de focalisation ou quadrupôle ;
- (c) Onduleurs ou *wrigglers*.

Généralement, les rayons X issus du synchrotron sont polychromatiques. Un dispositif optique permet de focaliser le faisceau et de sélectionner une longueur d'onde précise.

(2) Les détecteurs

Le diffractomètre du laboratoire est équipé d'un détecteur bidimensionnel *mar 345* (Mar Research). Il s'agit d'une plaque circulaire constituée d'une matrice phosphorescente sensible aux photons X. Une fois exposée, un faisceau laser transmet l'excitation de la plaque vers un photomultiplicateur qui permet de quantifier le signal proportionnel à la quantité de photons X reçus. Le signal est ensuite numérisé.

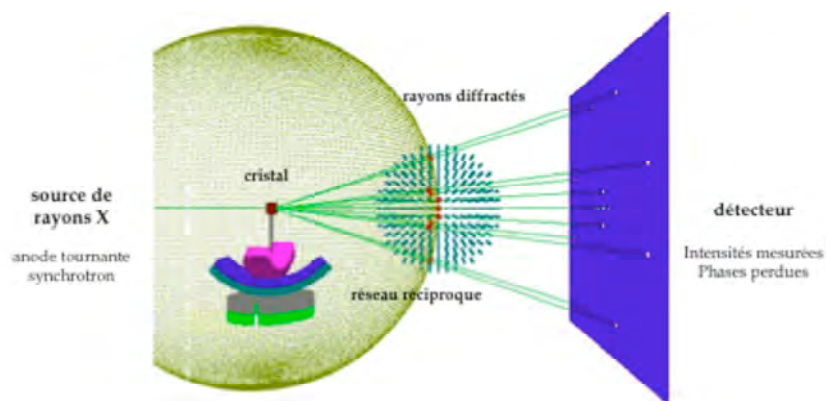
Les lignes de l'ESRF qui ont été utilisées pour notre projet (*FIP-BM30A, ID14 et ID29*) sont équipées de détecteur tridimensionnel CCD (*Charge Coupled Device*) contenant un gaz ionisant photosensible couplé à un système vidéo. Le signal est amplifié grâce à un champ électrique puis numérisé. Ce type de détecteur est très sensible et possède une statistique de comptage élevée ce qui permet de diminuer le temps d'acquisition d'une image de quelques minutes à quelques secondes.

(3) Enregistrement des données

Les ondes diffractées par un cristal forment un réseau tridimensionnel de réflexions appelé réseau réciproque. Or, nous enregistrons ces données sur un détecteur à deux dimensions (Figure 32). Afin d'enregistrer l'ensemble du réseau réciproque, il faut faire tourner le cristal sur lui-même.

Figure 32 :

Expérience de diffraction aux rayons X : les images enregistrées sur le détecteur correspondent à l'intersection du réseau réciproque (ou sphère d'Ewald) avec un plan.



Les paramètres à choisir sont :

- (1) Longueur d'onde λ du faisceau X : par définition, la résolution entre les réflexions est inversement proportionnelle à la longueur d'onde (loi de Bragg). Cependant, l'intensité I_{hkl} des réflexions de Bragg est proportionnelle à la longueur d'onde λ qui est elle-même inversement proportionnelle au facteur d'absorption A_{hkl} (Drenth, 1995) :

$$I_{hkl} = \lambda^3 / \omega V^2 \times (e^2 / mc^2)^2 \times V_{\text{cristal}} \times I_o \times L_{hkl} \times P_{hkl} \times A_{hkl} \times |F_{hkl}|^2$$

Avec λ longueur d'onde ; ω vitesse angulaire du cristal ; I_o intensité incidente ; V volume de la maille ; V_{cristal} volume irradié du cristal ; e charge de l'électron ; m masse de l'électron ; c célérité de la lumière ; L facteur de Lorentz ; P facteur de polarisation ; A facteur d'absorption ; $|F_{hkl}|$ module du facteur de structure.

Le choix de la longueur d'onde est donc un compromis pour obtenir la meilleure résolution possible tout en ayant des intensités de diffraction exploitables et une faible absorption des rayons X. En pratique, on choisit une longueur d'onde voisine de 1 Å. Notons que le choix de la longueur d'onde dépend également de la méthode de phasage.

- (2) La distance cristal-détecteur d : une distance courte favorise l'enregistrement des réflexions de haute résolution. Cependant pour les grandes mailles cristallines (ce qui est notre cas), les réflexions tendent à se chevaucher et cela pose des problèmes au niveau du traitement des données. En pratique, la distance est fixée de sorte que les réflexions soient séparées et que les réflexions de plus haute résolution soient au bord de l'image.
- (3) L'angle de rotation $\Delta\phi$: ce paramètre doit être choisi pour favoriser l'enregistrement des réflexions totales sur chaque image.

(4) Le temps d'exposition t : en général, les statistiques de traitement des données de diffraction sont meilleures lorsque l'intensité moyenne du jeu de données est forte. Or l'intensité de diffraction décroît avec la résolution, ce qui nous invite à prolonger le temps d'exposition. Cependant, un temps d'exposition trop important risque de saturer l'intensité des réflexions de la basse résolution inéluctablement éliminées lors du traitement des données, ce qui pose problème pour le phasage par remplacement moléculaire (voir la partie sur la résolution des phases) et la détermination de la structure du solvant. Encore une fois, il s'agit d'un compromis. En pratique, pour un temps d'exposition choisi, il est nécessaire de faire au moins deux passages afin d'obtenir des intensités bien mesurées.

B) Traitement des données de diffraction

L'objectif est d'assigner à chaque réflexion mesurée l'indice de Miller correspondant : on parle d'indexation. Différents programmes permettent de réaliser automatiquement cette étape dont le déroulement, qui est globalement le même pour tous les programmes, s'effectue en trois temps (Leslie, 2006) :

(1) L'auto-indexation

Le but est de déterminer les paramètres de maille et l'orientation du cristal vis-à-vis du faisceau de rayons X incident. À l'issue d'un enregistrement, nous disposons d'une série d'images des tâches de diffraction qui représentent les nœuds du réseau réciproque défini par les vecteurs a^* , b^* et c^* . Chaque nœud est identifié par sa position $ha^* + kb^* + lc^*$, avec h, k, l des entiers relatifs. D'abord, il faut déterminer le groupe d'espace qui est représenté par le réseau direct, lui-même algébriquement lié au réseau réciproque. Quelques images de diffraction permettent de déterminer les vecteurs a^* , b^* et c^* et de proposer les groupes d'espace possibles, associés à un indice de confiance. En pratique, le choix se porte sur le groupe d'espace ayant le meilleur indice de confiance mais aussi la plus haute symétrie.

(2) Prédiction et estimation de la mosaïcité

L'indexation de quelques images selon le groupe d'espace choisi permet d'affiner certains paramètres géométriques : les paramètres de maille, la mosaïcité du cristal, l'orientation du cristal dans le faisceau, la distance cristal-détecteur et la position du faisceau incident.

(3) Intégration et correction des intensités

Les réflexions sont indexées sur l'ensemble des images. Les intensités mesurées de façon numérique doivent être corrigées : un masque est appliqué autour des réflexions pour délimiter les pixels à intégrer du bruit de fond. Le profil des intensités est ensuite normalisé par tranche de résolution de sorte à obtenir le meilleur rapport signal/bruit : les réflexions sont mises à l'échelle. En effet, le cristal ne diffracte pas de façon constante pour plusieurs raisons expérimentales : le fonctionnement du synchrotron implique la décroissance du flux d'électrons au cours du temps nécessitant une réinjection régulière. Ceci entraîne des corrections lors des enregistrements, notamment sur la dose de rayons X reçue. S'ajoute à cela la baisse du pouvoir de diffraction du cristal au cours du temps. Les réflexions enregistrées plusieurs fois, ou équivalentes par symétrie cristallographique, sont ensuite moyennées. La qualité d'un jeu de données est principalement évaluée par deux paramètres statistiques :

- L'écart-type entre les réflexions équivalentes qui doit être minimisé :

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \langle I(h) \rangle}, \text{ où } I_i(h) \text{ est l'intensité de la } i\text{-ème mesure et } \langle I(h) \rangle \text{ est la moyenne pondérée de toutes les mesures } I_i(h) \text{ des réflexions équivalentes } h ;$$

- Le rapport signal/bruit des intensités $I/\sigma(I)$ qui doit être le plus élevé possible.

Une fois mises à l'échelle, les données sont réduites à l'unité asymétrique et les intensités sont transformées en amplitude $|F_{hkl}|$ avec le programme *TRUNCATE* de la chaîne de programmes *CCP4* (*Collaborative Computational Project number 4, 1994*).

Dans le cadre de ma thèse, le traitement des données a été réalisé avec deux programmes différents : *MOSFLM* (Leslie, 1990) et *XDS* (Kabsch, 1993). La différence réside dans l'algorithme d'intégration des réflexions partielles : dans *MOSFLM*, une intégration dite « bi-dimensionnelle » consiste à intégrer les réflexions partielles de façon indépendante et de les regrouper au cours de la mise à l'échelle. Dans le cas de *XDS*, un algorithme d'intégration dit « tri-dimensionnelle » permet de corriger et de regrouper simultanément les intensités partielles. En conséquence, les données qui ont été traitées avec *MOSFLM* sont mises à l'échelle avec un programme supplémentaire, par exemple *SCALA* de la chaîne de programmes *CCP4* (1994). Contrairement au programme *XDS*, il est possible de visualiser les profils des réflexions au cours du traitement avec le programme *MOSFLM*.

C) Résolution des phases

Le problème de la cristallographie des macromolécules réside dans la perte des phases lors de l'enregistrement des ondes diffractées. Seules les intensités, donc les amplitudes, sont accessibles à ce stade. Or nous avons vu que l'information des phases est indispensable pour calculer la densité électronique et déterminer la structure de la molécule.

Pour comprendre la résolution des phases, un bref rappel sur la fonction de Patterson s'impose : en cristallographie, la fonction de Patterson P est la synthèse de Fourier sur les intensités de diffraction. On peut la calculer sans avoir à résoudre les phases :

$$P(x,y,z) = 1/V \sum_{hkl} I_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

Elle peut aussi être définie comme le produit de convolution de la densité électronique et de sa symétrique par rapport à l'origine : $P(x,y,z) = \rho(x,y,z) * \rho(-x,-y,-z)$

Cela se traduit par des « cartes de Patterson » qui contiennent des pics correspondant aux vecteurs inter-atomiques. Lorsque le nombre d'atomes est petit, leur localisation sur les cartes est possible, ce qui revient à résoudre leur phase.

Dans le cas des macromolécules comme les protéines, le nombre de vecteurs inter-atomiques est bien trop grand pour pouvoir identifier la position de chaque atome. Cependant, la manipulation des cartes de Patterson s'avère très utile pour s'affranchir du problème des phases.

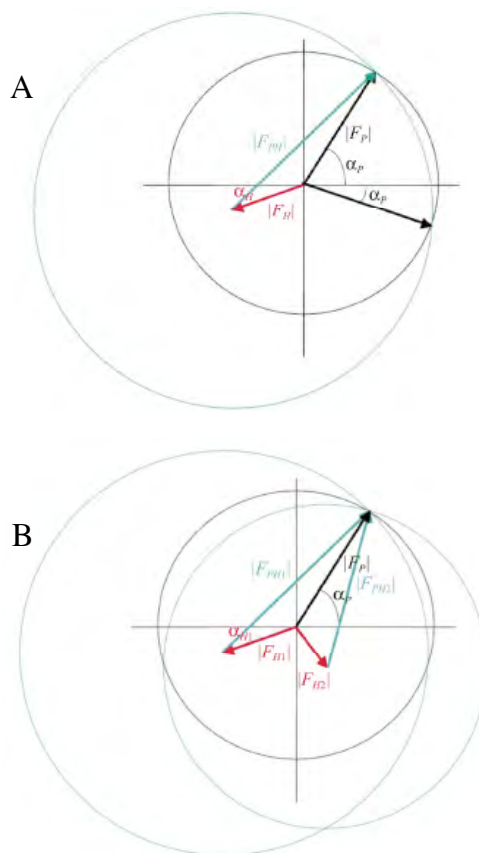
En cristallographie biologique, le problème des phases peut être résolu par trois méthodes principalement (Taylor, 2003) :

- (1) La méthode MIR (*Multiple Isomorphous Replacement*, Figure 33) est l'approche qui a permis de résoudre les premières structures de protéine dans les années 60. Elle consiste à résoudre les phases en introduisant un atome « lourd » dans le cristal (dérivé mercuriel par exemple), c'est-à-dire un atome localisé de façon spécifique et dont le pouvoir de diffraction est plus important grâce à un nombre d'électrons plus grand. Le cristal ainsi modifié est le « dérivé lourd ». À l'aide de la fonction de Patterson différence, la résolution de la phase des atomes lourds est possible à partir des nouvelles intensités de diffraction car ils sont en plus petit nombre dans le cristal. Cela permet de remonter aux phases de la macromolécule entière. En principe, l'introduction de l'atome lourd ne doit pas modifier la maille cristalline. Cette condition d'isomorphisme est souvent l'étape limitante de cette approche car elle nécessite généralement plusieurs dérivés lourds, donc plusieurs cristaux. De plus, il s'agit d'une approche aléatoire où la fixation de l'atome lourd n'est pas covalente.

Figure 33 :

Illustration de la méthode MIR par la représentation de Harker (Taylor, 2003) :

Si un atome lourd est ajouté de manière isomorphe dans le cristal, on a la relation $F_p = F_{PH} - F_H$, avec F_p le facteur de structure du cristal natif, F_{PH} celui du dérivé lourd et F_H celui de l'atome lourd ($|F|$ et α correspondent respectivement au module et à la phase du facteur de structure). La solution de la phase α_p se traduit par l'intersection du cercle de rayon $|F_p|$ (noir) avec le cercle de rayon $|F_{PH}|$ (bleu). Cependant il y a deux solutions possibles (A). L'ambiguïté est levée avec un deuxième dérivé lourd F_{PH2} : c'est l'intersection des trois cercles (B).



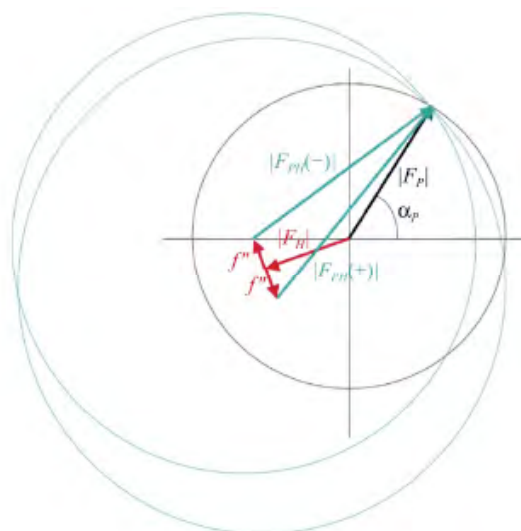
- (2) La méthode MAD (Multiple Anomalous Diffraction, Figure 34) exploite la variation du facteur de diffusion d'un atome lourd en fonction de la longueur d'onde du rayon X incident. Lorsque la longueur d'onde est proche du seuil d'absorption, une partie de l'énergie est absorbée puis réémise sous forme de fluorescence, ce qui modifie le facteur de diffusion atomique et la loi de Friedel n'est plus respectée c'est-à-dire que $|F_{hkl}| \neq |F_{-h,-k,-l}|$. Les différences observées dans les intensités des réflexions permettent de localiser l'atome responsable et de résoudre le problème des phases grâce à la fonction de Patterson différence. Actuellement, la méthode la plus commode est d'introduire directement l'atome lourd dans la macromolécule lors de son expression, par exemple sous forme de méthionine ou cystéine sélénée dans le cas des protéines.

L'approche MAD implique l'utilisation d'une source de rayons X à différentes longueurs d'onde (en général trois) autour du seuil d'absorption de l'atome diffuseur pour optimiser l'absorption et la diffusion anormale. Néanmoins, cette expérience peut se faire sur le même cristal car un seul dérivé lourd suffit, ce qui permet de s'affranchir du problème d'isomorphisme des cristaux.

Figure 34 :

Représentation de Harker dans le cas de la méthode MAD (Taylor, 2003) :

La diffusion anormale engendre une modification du facteur de diffusion atomique : $f(\lambda) = f^0 + f^r(\lambda) + if''(\lambda)$. La présence de la composante imaginaire $f''(\lambda)$ se traduit par une rupture de la loi de Friedel où $F_{hkl} \neq F_{-h,-k,-l}$. Si le dérivé lourd F_{PH} présente de la diffusion anormale, alors $|F_{PH(+)}| \neq |F_{PH(-)}|$. L'intersection des cercles de rayons $|F_{PH(+)}|$, $|F_{PH(-)}|$ (bleus) et $|F_P|$ (noir) permet de retrouver α_p , la phase du cristal natif.

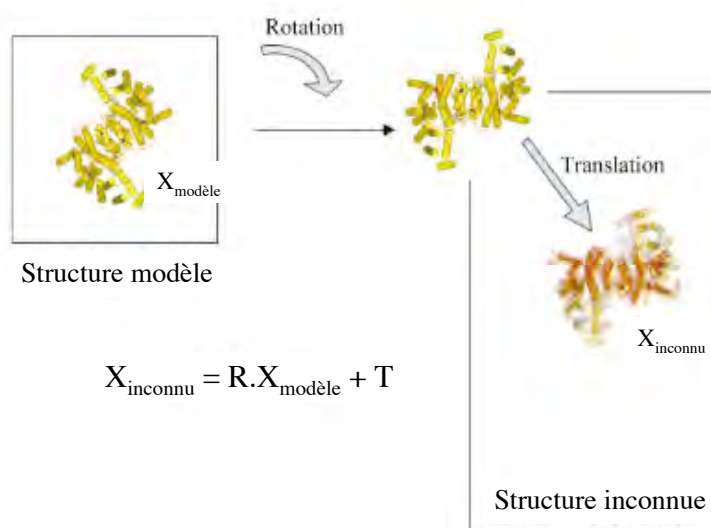


- (3) La méthode du remplacement moléculaire consiste à résoudre les phases par une approche stochastique (par opposition aux approches expérimentales précédentes) en plaçant dans le cristal « inconnu » une molécule modèle suffisamment proche de la structure à déterminer. Une homologie de séquence d'au moins 25% ou un écart-type moyen global du squelette C α inférieur à 2 Å entre la structure inconnue et le modèle sont généralement nécessaires. Cette méthode tire avantage de la similitude architecturale de nombreux domaines protéiques et de la connaissance croissante des structures à haute résolution. Dans le cadre de ma thèse, nous avons eu recours à cette méthode qui est décrite plus en détail dans la suite.

D) Le remplacement moléculaire

Décrite pour la première fois dans les années 60 (Rossmann & Blow, 1962 ; Crowther & Blow, 1967), le remplacement moléculaire permet de résoudre les phases en plaçant virtuellement dans l'unité asymétrique du cristal étudié une molécule modèle en « corps rigide », c'est-à-dire que le degré de liberté de la structure se réduit à la rotation et translation de la molécule entière. Les essais de placement sont des problèmes à 6 dimensions. La solution à trouver X_{inconnu} consiste dans un premier temps à appliquer une matrice de rotation R (3 angles possibles) au modèle « guide » $X_{\text{modèle}}$, puis dans un deuxième temps un vecteur de position T (3 directions possibles).

Illustration de la méthode de phasage par Remplacement Moléculaire (Taylor, 2003)



Le meilleur placement du modèle dans le cristal est obtenu lorsque le facteur de structure du modèle $F_{\text{modèle}}$ est proche du facteur de structure des données observées F_{obs} (dont les phases ont été estimées avec le modèle). La recherche des solutions, c'est-à-dire des meilleures corrélations entre F_{obs} et $F_{\text{modèle}}$, peut se faire par deux approches différentes (Philip Evans & Airlie McCoy, 2008) :

- La méthode dite « traditionnelle » qui repose sur la superposition des cartes de Patterson du modèle et des données expérimentales. La meilleure corrélation dans l'espace de Patterson permet de résoudre la phase ;
- La méthode statistique par « maximum de vraisemblance ». Introduite par Gérard Bricogne dans les années 90, la méthode consiste à construire une expression analytique de vraisemblance de F_{obs} en fonction de $F_{\text{modèle}}$, permettant de trouver la valeur la plus vraisemblable de la phase. La recherche s'effectue dans l'espace réciproque.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé le programme *PHASER* (McCoy, 2007) qui utilise la méthode de recherche du maximum de vraisemblance. La question posée est la suivante : pour chaque orientation et position du modèle $F_{\text{modèle}}$ dans le cristal, quelle est la probabilité d'obtenir les amplitudes expérimentales $|F_{\text{obs}}|$? Cette estimation est possible car la contribution des facteurs de structure de chaque atome dans chaque réflexion peut être modélisée par une courbe Gaussienne. Selon le théorème de Bayes, $P(F_{\text{modèle}}|F_{\text{obs}}) = P(F_{\text{modèle}}) \times P(F_{\text{obs}}|F_{\text{modèle}})$ avec $P(F_{\text{obs}}|F_{\text{modèle}})$ la fonction de vraisemblance. Pour chaque réflexion h :

$$F_{\text{modèle}}(h) = \sum_j \exp(2\pi i h \cdot T_j) \cdot \sum_i f_i \exp(2\pi i h \cdot R_j x_i), \text{ avec } T_j \text{ et } R_j \text{ les opérations de translation et de rotation selon la symétrie } j \text{ du cristal, et } x_i \text{ les coordonnées fractionnaires de l'atome } i.$$

Cette approche présente plusieurs avantages par rapport à la méthode de remplacement moléculaire par la fonction de Patterson :

- Il s'agit d'une approche statistique qui intègre les erreurs expérimentales (l'écart-type des facteurs de structure par exemple). La recherche est alors plus robuste dans les cas de remplacement moléculaire difficiles ;

- La recherche par rotation est beaucoup plus restreinte dans l'espace de Patterson car elle se limite aux vecteurs intramoléculaires. Dans l'espace réciproque, la recherche s'effectue sur toute la maille ;
- La méthode du maximum de vraisemblance est plus efficace dans la recherche de complexes moléculaires grâce à un processus itératif : une molécule déjà placée dans l'unité asymétrique renforce le signal de ses partenaires (McCoy, 2004).

En mode « automatique », le programme *PHASER* fait le remplacement moléculaire en 6 étapes :

- (1) Correction d'anisotropie : les cristaux de macromolécules biologiques ne diffractent pas de manière homogène car, d'une part les atomes répétés n'ont pas exactement la même position d'une maille à l'autre, d'autre part l'agitation thermique fait vibrer les atomes autour de leur position d'équilibre. Ce désordre est quantifié par le facteur de température $B = 8\pi^2\langle(\Delta r)^2\rangle$, avec $\langle(\Delta r)^2\rangle$ le déplacement atomique moyen. L'intensité des réflexions peut être exprimée en fonction de B : $I_{hkl} = I_o \exp(-B\sin^2\theta/\lambda^2)$, avec I_{hkl} l'intensité de la réflexion, θ l'angle de diffraction et λ longueur d'onde du rayon X incident. L'intensité des ondes diffractées diminue donc avec le facteur de température B . Il est nécessaire de supprimer les variations anisotropiques avant le remplacement moléculaire en normalisant les facteurs B de chaque réflexion.
- (2) Génération d'un modèle (« *ensembling* ») : dans un premier temps, le nombre de molécules à placer dans la maille est calculé selon le coefficient de Matthews V_M (Matthews, 1968) : $V_M = V/MxZ$, avec V le volume de la maille, M la masse moléculaire de la macromolécule et Z le nombre de macromolécules dans la maille. Z peut être estimé car il a été montré que V_M varie généralement entre 1,7 et 3,5 Å³/Da dans les cristaux de protéines, avec une valeur moyenne de 2,15 Å³/Da. Les facteurs de structure du modèle sont ensuite calculés ($F_{\text{modèle}}$) pour être comparés aux données expérimentales.

Dans *PHASER*, ce calcul prend en compte l'écart-type moyen (ou *rmsd*) entre la structure du modèle et la structure inconnue. Le *rmsd* en C α peut être estimé en fonction du pourcentage d'identité de séquence par la formule suivante (Chothia & Lesk, 1986) : $rmsd = 0,4 \exp[1,87 \times (1 - \% \text{ d'identité de séquence})]$.

- (3) Fonction de rotation R : la recherche par rotation selon les angles Euler est guidée par la plus haute vraisemblance sur les intensités, donc les amplitudes. Une première recherche rapide est faite par la fonction LERF (*Likelihood-Enhanced fast Rotation Function*) qui est une simplification de la fonction de rotation (le calcul est réduit au premier terme d'une série de Taylor). Les plus hautes valeurs du LERF sont ensuite sélectionnées pour être re-calculées dans la fonction de rotation complète MLRF (*Maximum-Likelihood Rotation Function*) qui permet une meilleur discrimination.
- (4) Fonction de translation T : suite à l'orientation, le positionnement du modèle est réalisé selon les symétries du cristal, avec la même stratégie de calcul : LETF (*Likelihood-Enhanced fast Translation Function*), puis MLTF (*Maximum-Likelihood Translation Function*). La recherche est guidée par la plus haute vraisemblance des phases cette fois.
- (5) Fonction d'empilement : l'empilement cristallin des solutions proposées est évalué sur la proximité géométrique des C α inter-moléculaires, avec une valeur limite fixée à 2 Å. Le nombre d'excès autorisé doit être généralement nul, à moins que l'identité de séquence avec le modèle soit faible ou qu'il y ait potentiellement de larges boucles flexibles.
- (6) Affinement en corps rigide : la solution est une molécule modèle calculée (F_{calc}) dont les coordonnées doivent être finement remaniées pour refléter au mieux les données expérimentales (F_{obs}) : c'est le rôle de l'affinement cristallographique.

À l'issue du remplacement moléculaire, *PHASER* effectue un premier affinement en corps rigide afin d'optimiser la position du modèle dans le cristal.

À chaque solution de rotation ou translation proposée, un indice de confiance est associé : le *Z score* (RFZ pour la fonction de rotation et TFZ pour la fonction de translation). Il s'agit du nombre de déviation standard des facteurs de structure σ_F supérieure à la moyenne. En pratique, un *Z score* < 5 correspond à un placement incorrect, et un *Z score* > 8 est associé à une solution plausible.

E) Reconstruction de la structure et affinement cristallographique

Suite à la résolution des phases par remplacement moléculaire, un modèle partiel de la structure étudiée est obtenu. La reconstruction de la structure consiste à assigner la véritable séquence d'acides aminés et de combler les fragments manquants. Le facteur de structure calculé par transformée de Fourier à partir du modèle F_{calc} est loin d'être en accord avec le facteur de structure observé F_{obs} . L'affinement cristallographique consiste à réduire l'écart entre F_{calc} et F_{obs} défini par le facteur cristallographique R_{crist} :

$$R_{\text{crist}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}, \text{ avec } k \text{ facteur d'échelle.}$$

Pour chaque atome du modèle, différents paramètres sont modifiés au cours de l'affinement : 3 paramètres pour la position (x,y,z), 6 paramètres pour le facteur de température B anisotropique (la vibration thermique de l'atome est décrite dans un espace ellipsoïdal) et 1 paramètre pour le facteur d'occupation. En pratique, du fait des erreurs expérimentales, le nombre de réflexions doit être au moins deux fois plus grand que le nombre de paramètres à affiner, ce qui est souvent associé à une résolution cristallographique de $\sim 2 \text{ \AA}$. Lorsque le nombre d'observables est insuffisant, les paramètres à affiner peuvent être réduits par différentes simplifications ([Tronrud, 2004](#)) :

- Le nombre de paramètres à affiner peut se résumer à 4, avec la position des atomes (x,y,z) et un facteur de température B isotrope qui considère comme équivalente la vibration thermique de tous les atomes ;
- Lorsque l'unité asymétrique contient plusieurs copies de la molécule, le nombre d'atomes à affiner peut être réduit par « symétrie non cristallographique » ou NCS (*Non-Crystallographic Symmetry*) qui consiste à imposer un opérateur de symétrie entre molécules identiques ;
- Les facteurs de température B anisotropiques peuvent être simplifiés à 3 paramètres (au lieu de 6) par un système de trois matrices qui décrivent le mouvement de la molécule par groupe d'atomes. Ce paramétrage est le TLS (*Translation, Libration, Screw*).

(1) Les méthodes d'affinement

Dans le cadre de ma thèse, nous avons eu recours à deux méthodes d'affinement :

- L'affinement par dynamique moléculaire qui cherche à minimiser l'énergie globale de la molécule définie par $E_{\text{totale}} = E_{\text{effective}} + E_{\text{empirique}}$. L'énergie empirique $E_{\text{empirique}}$ correspond aux contraintes stéréochimiques covalentes (liaisons et angles) et non-covalentes (interactions électrostatiques et contacts de Van der Waals). L'énergie effective $E_{\text{effective}}$ correspond aux données cristallographiques. Celle-ci est proportionnelle à l'écart entre F_{obs} et F_{calc} . Cet affinement a été réalisé par recuit simulé avec le module *annealing* du programme *CNS* (Brünger *et al.*, 1998).
- L'affinement par maximum de vraisemblance est une approche statistique qui intègre les paramètres à affiner X dans une fonction de vraisemblance à maximiser $P(X|F_{\text{obs}}) = P(X) \times P(F_{\text{obs}}|X)$. Cet affinement a d'abord été réalisé avec les modules *rigid*, *minimize* et *bindividual* du programme *CNS* (Brünger *et al.*, 1998), puis le programme *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 1997) de la suite de programmes *CCP4* (1994).

Après chaque cycle d'affinement, la carte de densité électronique est calculée à partir des données expérimentales et affinées. Cela permet d'ajuster et/ou de construire manuellement le modèle sur la carte de densité électronique.

Les modifications sont guidées par deux types de cartes de densité électronique appelées « cartes de Fourier différence ». Ce sont des synthèses de Fourier où $\rho(x,y,z) = 1/V \sum_{hkl} (n|F_{obs}| - |F_{calc}|) \exp(i\phi_{calc}) \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)]$, avec V le volume de la maille, ϕ_{calc} la phase calculée et n un nombre entier :

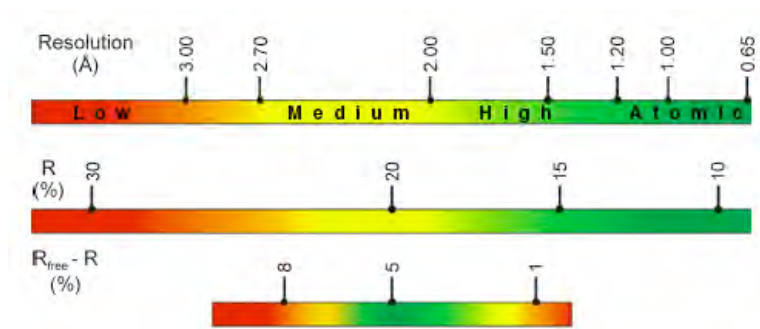
- lorsque $n=2$, on observe la carte « $2F_o - F_c$ » : elle permet de visualiser la densité électronique de la structure et d'ajuster le modèle. Elle donne plus de poids aux données expérimentales et réduit le biais du modèle ;
- lorsque $n=1$, on parle de carte «différence » : elle permet de localiser les différences entre le modèle et la structure expérimentale. Les pics positifs indiquent les atomes manquants dans le modèle et les pics négatifs signalent la présence d'atomes mal placés ou excédentaires en électrons.

Les reconstructions et la visualisation des cartes de densité électronique sont réalisées avec les programmes *O* (Jones *et al.*, 1991) et *COOT* (Emsley & Cowtan, 2004).

(2) Critères de validation de l'affinement et du modèle

Au cours de l'affinement, l'écart entre $|F_{obs}|$ et $|F_{calc}|$ est minimisé, donc le facteur R_{crist} tend à diminuer vers une valeur selon la résolution obtenue (Figure 35). Cependant, ce n'est pas un critère objectif de l'affinement puisqu'il est calculé à partir de paramètres minimisés. Une fonction similaire appelée facteur libre R_{libre} est calculé sur un jeu de réflexion exclue de l'affinement (Brünger, 1992). Une amélioration globale du modèle diminue R_{crist} et R_{libre} de façon concomitante. Une diminution du R_{crist} seul indique une extrapolation du modèle vis-à-vis des données expérimentales. En pratique, les facteurs R diminuent et la différence $R_{crist} - R_{libre}$ ne devrait pas dépasser 7%.

Figure 35 : Échelle des valeurs standard attendues pour les facteurs R_{crist} (ou R) et R_{libre} (ou R_{free}) et leur différence en fonction de la résolution (Wlodawer et al., 2007).



Par ailleurs, la qualité stéréochimique du modèle permet également de valider l’affinement (Laskowski et al., 1993). Les paramètres généralement observés sont les écarts-types ou *rmsd* (*Root-Mean-Square Deviation*) moyens des liaisons qui ne doivent pas dépasser 0.03 Å, la distribution des angles Φ , Ψ selon le diagramme de Ramachandran et la planéité des liaisons peptidiques ω . Ces paramètres géométriques sont analysés à l’aide du programme *PROCHECK* de la chaîne de programme *CCP4* (1994).

6) SPECTROMETRIE DE MASSE

L'analyse des protéines par spectrométrie de masse est réalisée dans deux laboratoires différents : soit à l'Institut des Sciences du Médicament (IFR 71, Faculté de Pharmacie Paris-Descartes), soit au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique de Strasbourg (UMR 7509 CNRS, collaboration avec Sarah Sanglier).

A) Spectre de masse à l'IFR 71

Les échantillons peuvent être analysés par injection directe ou après séparation chromatographique CLHP sur phase reverse (silice fonctionnalisée avec des butyles). La phase mobile est un mélange eau/acétonitrile (95/5) + 0,1% (v/v) de TFA.

Le spectromètre de masse est un appareil *LCQ Advantage* (ThermoElectron). L'ionisation est réalisée par électro-nébulisation et la détection de la masse est faite dans un piège à ions.

B) Spectre de masse au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique

➤ Analyse en condition dénaturante : les protéines sont diluées dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) + 1% (v/v) d'acide formique, de sorte à obtenir 5 μ M final en monomère.

➤ Analyse en condition native : les protéines sont diluées dans une solution d'acétate d'ammonium 10 mM pH 7,8.

7) SPECTROSCOPIE RMN

Les spectres de RMN ^1H ont été réalisés au laboratoire sur un spectromètre *Brucker Avance* de 600 MHz. La protéine MexXct (0,6 mM) est dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, imidazole 10 mM et D_2O 10% (v/v).

METHODES BIOINFORMATIQUES

8) ANALYSE DES MODES NORMAUX (OU DYNAMIQUE VIBRATIONNELLE)

Parallèlement aux techniques expérimentales, la dynamique des protéines peut être étudiée par modélisation moléculaire. L'énergie potentielle de la protéine est définie par la somme de toutes les énergies d'interaction covalente et non-covalente. Le comportement de la protéine est calculé selon un champ de force qui permet de représenter au mieux les variations de son énergie potentielle en fonction de sa structure et de son environnement.

L'étude des mouvements d'une protéine *in silico* peut se faire par deux grandes approches :

- la dynamique moléculaire qui décrit l'évolution des molécules au cours du temps. Leur trajectoire est décrite par la résolution des équations de Newton sur une période de temps donnée. Les coordonnées de chaque atome sont modifiées au cours du temps selon leur énergie cinétique et leur environnement. Le champ de force appliqué est réaliste car il peut prendre en compte la solvatation et éventuellement l'environnement membranaire de la molécule. En pratique, les équations sont intégrées sur un temps défini appelé « pas d'intégration ». Ce temps doit être de l'ordre de la femtoseconde afin de minimiser les erreurs de calcul. De même que l'augmentation du nombre d'atomes dans le système étudié, l'utilisation d'un petit pas d'intégration contribue à allonger le temps de calculs. Seuls les mouvements rapides sont observés (de 10^{-12} à 10^{-9} s) ;
- la dynamique vibrationnelle ou méthode des modes normaux qui permet d'analyser les mouvements corrélés dans les macromolécules. L'équation de mouvement est résolue à partir d'un système harmonique, donc simplifié, ce qui permet de réduire considérablement le temps de calculs. Cette technique donne une information sur la déformabilité de la molécule et met en évidence les grands mouvements qui sont de l'ordre de la milliseconde, donc difficilement accessibles par la dynamique moléculaire. Étant donné que l'on étudie des mouvements amples, la protéine peut être réduite à ses C α .

Le tableau suivant met en évidence les avantages ou limites des deux méthodes décrites :

	Dynamique moléculaire	Dynamique vibrationnelle
Temps de simulation	Long (plusieurs heures)	Rapide (quelques minutes)
Description de la protéine	Tout atome	C α
Environnement	Réaliste (solvant et/ou membrane)	Simplifié (protéine seule)
Mouvements décrits	Rapides (localisés)	Lents (collectifs)

Dans le cadre de la thèse, nous avons choisi d'étudier la déformabilité d'OprM et de son homologue TolC par la dynamique vibrationnelle afin de proposer un modèle d'ouverture. Cette approche est particulièrement bien adaptée à notre recherche puisqu'il s'agit d'une protéine transmembranaire de grande taille (de l'ordre de 150 kDa), dont le mécanisme d'ouverture implique probablement un mouvement collectif de la protéine.

A) Principe de l'analyse des modes normaux

La théorie des modes normaux est basée sur la résolution des équations de mouvement en effectuant une approximation harmonique de l'énergie potentielle. La diagonalisation de la matrice contenant les dérivées secondes de l'énergie potentielle (ou « matrice d'Hessien ») permet d'accéder aux modes normaux. Les atomes sont soumis à des vibrations autour de leur position d'équilibre et sont donc assimilés à des ressorts. Le couplage entre ces ressorts provoque des mouvements collectifs sur toute la protéine : ce sont les modes normaux de vibration. Les déplacements sont caractérisés en termes de directions de mouvement associées à des fréquences.

B) Calcul des modes normaux

Nous avons appliqué le modèle du « réseau élastique » de Monique Tirion (1996) où les atomes de la protéine sont reliés par un réseau de ressorts. L'énergie potentielle de ce système est définie par l'équation suivante :

$$E_p = \sum C (d_{ij} - d_{ij}^o)^2, \text{ avec } d_{ij} < R_c$$

Avec d_{ij} la distance entre deux atomes i et j , d_{ij}^o la même distance dans la structure initiale, C la constante de force du potentiel (qui est la même pour toutes les paires d'atomes) et Rc le paramètre de *cutoff* qui est la distance au-delà de laquelle les interactions ne sont plus prises en compte.

Une version simplifiée de ce champ de force a été utilisée où la protéine n'est représentée que par les $C\alpha$ (Hinsen, 1998). La plupart des modes normaux a été générée à l'aide du serveur NOMAD-Ref (Lindahl *et al.*, 2006) avec $Rc = 8 \text{ \AA}$ et le « paramètre de pondération des distances » = 5 \AA (paramètre proportionnel à la constante de force C). Le rmsd des trajectoires a été fixé à une valeur limite de 5 \AA pour que les déformations de la protéine restent réalistes.

C) Construction des modèles structuraux à l'état « ouvert »

Parmi les modes normaux pertinents permettant d'observer une ouverture des porines étudiées, l'état dont l'amplitude d'ouverture est la plus grande est isolé puis minimisé à l'aide des modules *generate_model* et *minimize_model* du programme *CNS* (Brünger *et al.*, 1998). Les états ouverts issus de deux modes différents sont additionnés en effectuant la somme des vecteurs principaux (ou vecteurs de déplacement).

9) MODELE STRUCTURAL PAR HOMOLOGIE

Parmi les méthodes permettant de prédire la structure tridimensionnelle des protéines, la modélisation par homologie (ou méthode de modélisation comparative) est actuellement l'une des plus intéressantes (Petry & Honig, 2005). Cela est lié aux nombreuses structures expérimentales, résolues par cristallographie RX ou RMN, en constante augmentation et disponibles dans la PDB.

Cette méthode repose sur le fait que les protéines présentant un fort taux d'identité de séquence (classiquement $> 40\%$) présentent en conséquence une structure tridimensionnelle très proche (Sanchez & Sali, 1997).

La structure de MexY est modélisée par homologie avec celle de son homologue AcrB dont le pourcentage d'identité de séquence s'élève à 50%. Parmi les 24 structures cristallographiques d'AcrB déposées à ce jour dans la PDB, nous avons choisi la structure 2DHH (Murakami *et al.*, 2006) comme modèle initial car elle correspond à la structure native de meilleure résolution (2.8 Å) où les trois protomères ont été construite indépendamment.

Nous avons utilisé le programme *MODELLER* qui permet de réaliser la modélisation par homologie, guidée par les contraintes stéréochimiques (Sali & Blundell, 1993 ; Fiser & Sali, 2003). La procédure peut être résumée en 2 étapes :

- L'alignement de séquence entre la structure « support » (AcrB) et la protéine « cible » à modéliser (MexY). Généralement, il s'agit d'une étape critique qui nécessite de l'optimisation à l'aide d'alignements multiples entre plusieurs protéines de la même famille. Dans notre cas, le taux élevé d'identité entre AcrB et MexY (50%) permet de réaliser aisément cette étape ;
- La construction du modèle s'effectue par le transfert des contraintes spatiales de la structure « support » vers la protéine « cible » au niveau des régions identiques. Cela regroupe essentiellement les distances entre C α , les liaisons hydrogènes et les angles dièdres. Les régions conservées sont alors construites à partir des mêmes coordonnées que la structure « support ». Par contre, les régions non conservées doivent être construites *ab initio*. L'exploration conformationnelle de ces régions inconnues est réalisée par recuit simulé et différents modèles sont générés et classés selon une « fonction objective » qui relate les contraintes géométriques du modèle dans l'espace cartésien. Plus la fonction objective est basse, « meilleur » est le modèle.

Parmi dix modèles générés, nous avons choisi celui qui présente la « fonction objective » la plus basse. La stéréochimie de ce modèle est vérifiée à l'aide du programme *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) de la chaîne de programme *CCP4* (1994).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

LA PORINE OPRM

Au cours de ma thèse, j'ai mené parallèlement l'étude structurale des différents partenaires de la pompe d'efflux MexXY-OprM.

OprM correspond à la protéine OMF (*Outer Membrane Factor*). Il s'agit d'une porine insérée dans la membrane externe à travers laquelle les substrats, une fois pris en charge par la pompe MexY, sont expulsés vers le milieu extérieur. Bien que la structure moléculaire de cette famille de protéine soit connue, il reste néanmoins de nombreuses questions à élucider quant à la dynamique d'assemblage de la porine avec ses partenaires, au mécanisme d'ouverture et à l'acheminement des substrats vers le milieu extracellulaire.

1) EXPRESSION, PURIFICATION ET CRISTALLISATION D'OPRM

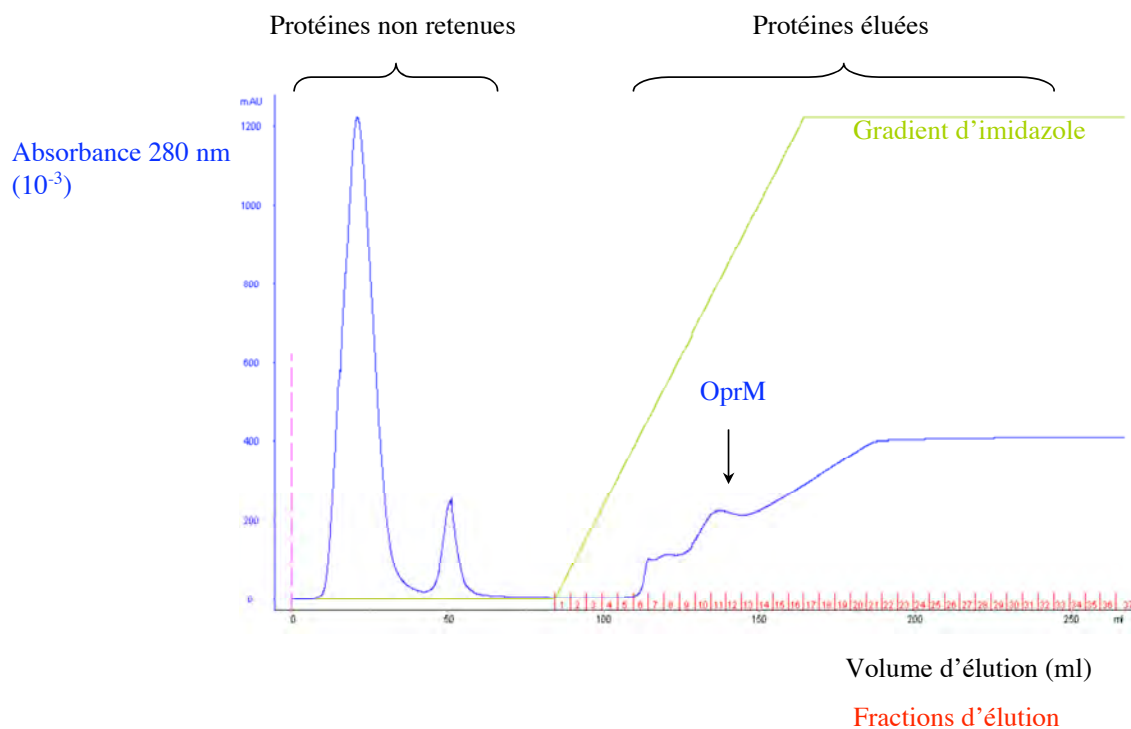
A) Expression et Purification d'OprM

Précédemment, un protocole de production hétérologue d'OprM cloné dans les vecteurs d'expression pET28a et pET28b de Novagen avait été mis au point au laboratoire (Charbonnier *et al.*, 2001). La protéine était produite sous forme de corps d'inclusion puis renaturée au cours de sa purification. Malgré de nombreux essais, la protéine ainsi purifiée n'a jamais cristallisé.

Pour éviter cette étape de renaturation qui pourrait être à l'origine d'une population hétérogène de protéines, nous avons mis au point un nouveau protocole de production d'OprM en l'exprimant cette fois dans un vecteur pBAD qui présente un promoteur inductible à l'arabinose moins fort que celui des vecteurs pET. En effet, la production de protéine sous forme insoluble est souvent liée à une cinétique d'expression trop rapide par rapport à l'étape de repliement. La protéine OprM est exprimée de façon hétérologue dans *E. coli* (souche C43-DE3), avec une étiquette de 6 histidines C-terminales. L'extrémité N-terminale est réservée aux remaniements cellulaires de la séquence-signal d'adressage vers la membrane externe de la bactérie, en l'occurrence une protéolyse suivie d'une palmylation sur la Cys-18 (Nakajima *et al.*, 2000). L'induction se déroule à 30°C afin de réduire l'agrégation de la protéine sous forme de corps d'inclusion. Cette nouvelle stratégie de production a permis d'obtenir de la protéine en grande quantité dans la fraction membranaire de la bactérie.

OprM est extraite des membranes par solubilisation avec les détergents non-ioniques β OG ou DDM avant d'être purifiée jusqu'à homogénéité en une seule étape de chromatographie d'affinité de nickel. La figure 36 montre le profil d'élution chromatographique. OprM est localisée dans le deuxième pic d'élution. Le premier pic contient vraisemblablement des protéines endogènes d'*E. coli* ayant une affinité naturelle pour les ions Ni^{2+} .

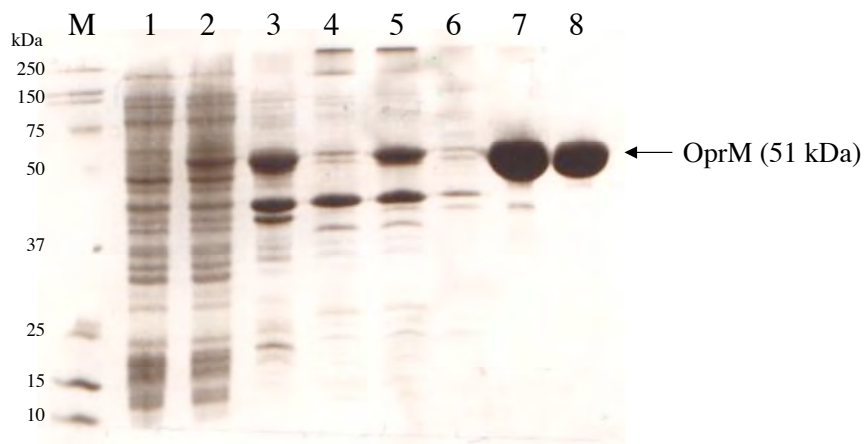
Figure 36 : Profil d'élution d'OprM en chromatographie d'affinité de nickel. Au moment de l'élution, une augmentation continue de l'absorbance à 280 nm est liée au gradient d'imidazole (20 mM à 500 mM à 2 ml/min).



Les fractions d'élution de la protéine purifiée sont dessalées et concentrées jusqu'à 8 mg/ml au maximum. Le rendement de purification est d'environ 5 mg de protéine pure pour 1 litre de culture bactérienne.

La figure 37 montre un résultat d'une électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE résumant les différentes étapes de la purification d'OprM, de l'expression à la chromatographie d'affinité de nickel, en passant par l'extraction des membranes externes. OprM est un homotrimer. La séparation des protomères nécessite un chauffage à 95°C pendant 5 minutes en présence de SDS.

Figure 37 :



Expression et purification d'OprM illustrées par SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie(acrylamide 12% (w/v))

- M: marqueur de poids moléculaire
- 1: bactérie totale avant induction
- 2: bactérie totale après induction
- 3: membrane externe totale avant solubilisation
- 4: fraction non retenue sur résine nickel
- 5: membrane externe totale après solubilisation
- 6: fraction de lavage de la résine nickel
- 7: fraction d'élution n°17-19
- 8: fraction d'élution n°20-34

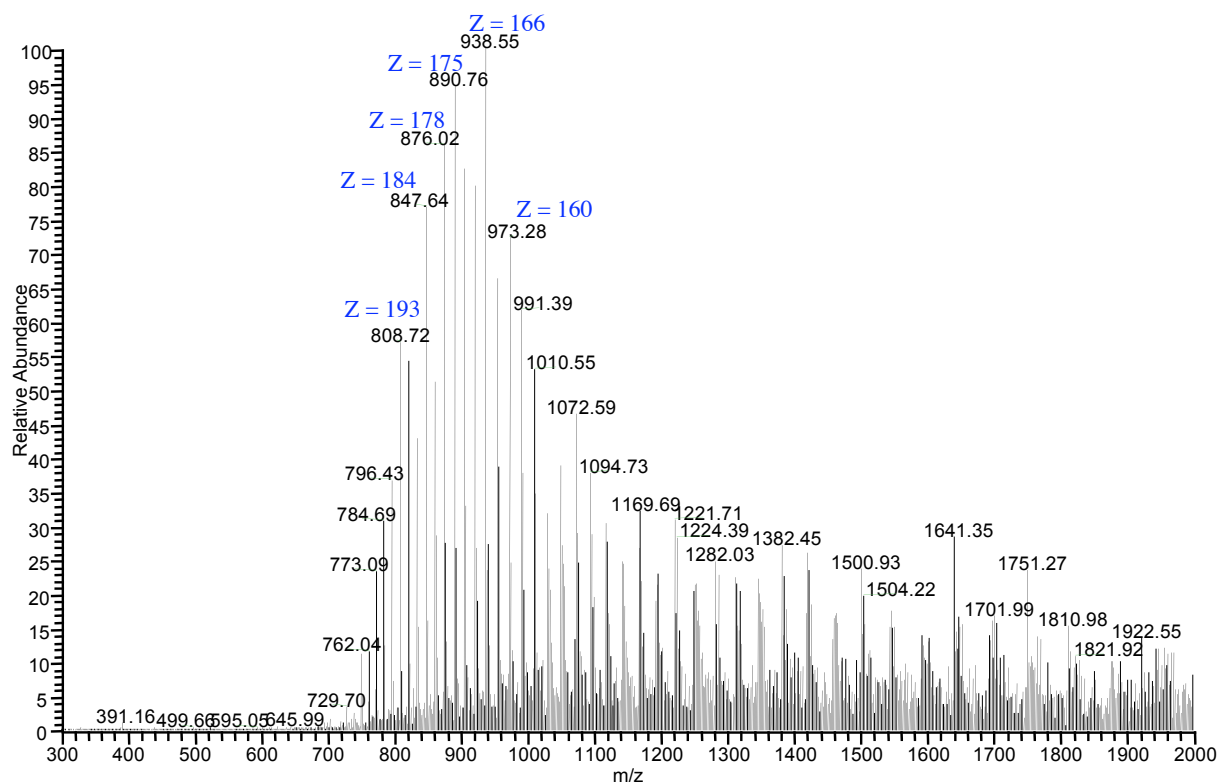
La masse moléculaire moyenne théorique d'OprM mature (en comptant l'étiquette de 6 His sur chaque monomère, soit 840,8 Da) est présentée dans le tableau suivant :

	Formule brute	Masse moléculaire théorique
Monomère d'OprM	$C_{2278}H_{3612}N_{658}O_{711}S_3$	51 689.9 Da
Trimère d'OprM		155 069.7 Da
Palmitate	$C_{16}H_{32}O_2$	255 g/mole
Trimère d'OprM + 3 palmityl		155 828.7 Da

Chaque monomère d'OprM présente un palmityl sur l'extrémité N-terminale. La masse moléculaire du monomère d'OprM a été calculée à l'aide du programme *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2005).

Un spectre de masse est effectué sur OprM après dessalage par CLHP en présence de TFA 0,1% (v/v) puis ionisation par électro-nébulisation (Figure 38). Les pics observés (indiqués par le nombre de charges Z) correspondent au trimère d'OprM_{6His} palmitylé, soit une masse moléculaire de 155 828,7 Da.

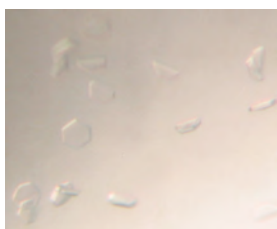
Figure 38 : Spectre de masse d'OprM par électro-nébulisation.



B) Cristallisation d'OprM

Les essais de cristallisation ont été effectués à différentes concentrations d'OprM (4-8 mg/ml). Plusieurs pistes de cristallisation ont été obtenues pour OprM en une semaine, à 18°C, avec le kit commercial *Crystal Screen 1 & 2* (Hampton). Les différentes conditions de cristallisation et les cristaux obtenus sont résumés sur la figure 39.

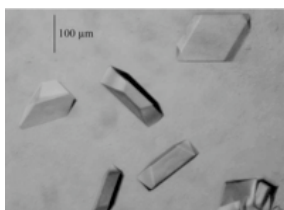
Figure 39 : Cristaux d'OprM seul, obtenus au bout d'une semaine à 18°C.



OprM à 5 mg/ml
0.1M HEPES pH 7.5
1.5 M LiSO₄



OprM à 5 mg/ml
0.1M Na-HEPES pH 7.5
1.8 M Na-H₂PO₄



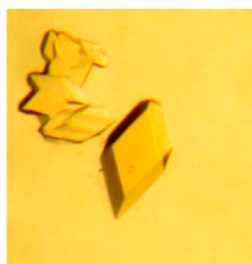
OprM à 6 mg/ml
0.1 M Na-Acétate
6% (w/v) PEG 20 000
0.3 M Citrate d'ammonium
25-30% (v/v) Glycérol
0.9% (w/v) βOG



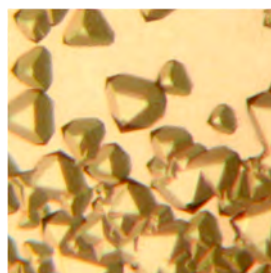
OprM à 4.4 mg/ml
0.8-1 M Na-Citrate pH 5-6.5

Par ailleurs, d'autres conditions de cristallisation ont été obtenues pour OprM en présence de différents antibiotiques à 1 mM (Figure 40). La diffraction aux rayons X d'un de ces cristaux n'a pas permis d'obtenir un jeu de données complet (Figure 41).

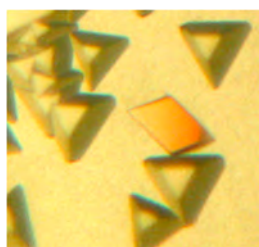
Figure 40 : Cristaux d'OprM (à 5 mg/ml) en présence de différents antibiotiques (en rouge), obtenus au bout d'une semaine à 18°C.



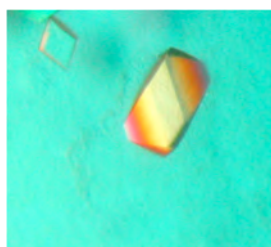
0.1 M citrate pH5.6
1.0 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
1 mM **tétracycline**



0.1 M imidazole pH5.8
1.0 M Na-acétate
1 mM **ampicilline**



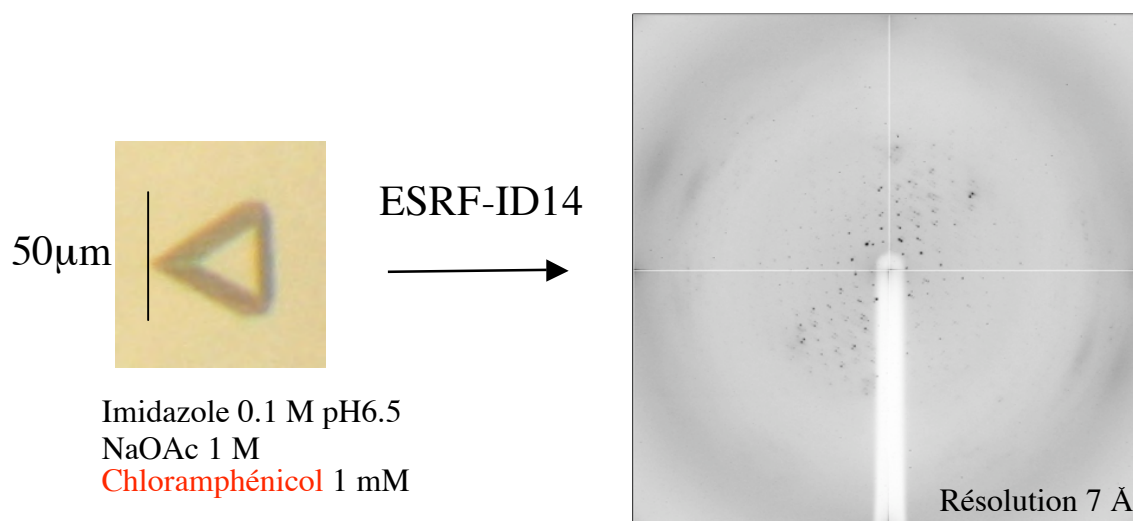
0.1 M imidazole pH5.8
1.0 M Na-acétate
1 mM **chloramphénicol**



0.1 M citrate pH5.6
1.0 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
1 mM **kanamycine**

—
50 μm

Figure 41 : Diffraction aux rayons X d'un cristal d'OprM obtenu en présence de chloramphénicol.



Groupe d'espace estimé C2 :
a = 306.41 b = 360.89 c = 367.98
 $\alpha = 90 \beta = 106 \gamma = 90$

2) STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES D'OPRM

A) Traitements des clichés de diffractions RX

Une condition de cristallisation optimisée d'OprM à 6 mg/ml a été obtenue dans l'acétate de sodium 100 mM pH 4.5, PEG 20 000 6% (w/v), citrate d'ammonium 300 mM, glycérol 25-30% (v/v) et β OG 0.9% (w/v). De forme rhomboédrique, les cristaux de plus grande taille mesurent 100 x 100 x 30 μ m. Un jeu de diffraction aux rayons X à 3,8 Å de résolution a été enregistré sur la ligne ID29 (ESRF, Grenoble) avec un cristal congelé en présence de glycérol 25% (v/v) en guise de cryo-protectant. Le cristal a été exposé 10 secondes par degré. Les données de diffraction ont été mises à l'échelle et intégrées avec les programmes *MOSFLM* et *SCALA* de la chaîne de programmes *CCP4* (1994). Ces résultats cristallographiques préliminaires d'OprM dans le groupe d'espace monoclinique C2 ont fait l'objet d'une première publication (Broutin *et al.*, 2005).

Par ailleurs, une autre condition de cristallisation améliorée d'OprM à 4,4 mg/ml dans le citrate de sodium 1M pH 5-6 a donné des cristaux de forme hexagonale cette fois, avec des dimensions comparables à la condition précédente. Parmi de nombreux cristaux, un seul nous a permis d'enregistrer un nouveau jeu de diffraction complet à relativement haute résolution (2,4 Å) sur la ligne ID14-1 de l'ESRF, avec une exposition de 60 secondes par degré. Les réflexions ont été intégrées, mises à l'échelle et réduites avec les programmes *XDS* (Kabsch, 1993) et *TRUNCATE* de la chaîne de programmes *CCP4* (1994). Notons que le traitement des données avec le programme *MOSFLM* a été abandonné car les statistiques d'intégration était moins satisfaisant. Contrairement au programme *XDS*, de nombreuses réflexions étaient rejetées dans le programme *MOSFLM* et la complétude résultante était faible (Tableau 5). De plus, l'affinement de la maille s'est révélé difficile, le programme s'interrompant souvent à cette étape. Cela est probablement lié au chevauchement de certaines réflexions que le programme n'arrive pas à intégrer. Ces clichés de diffraction sont caractéristiques des cristaux d'OprM.

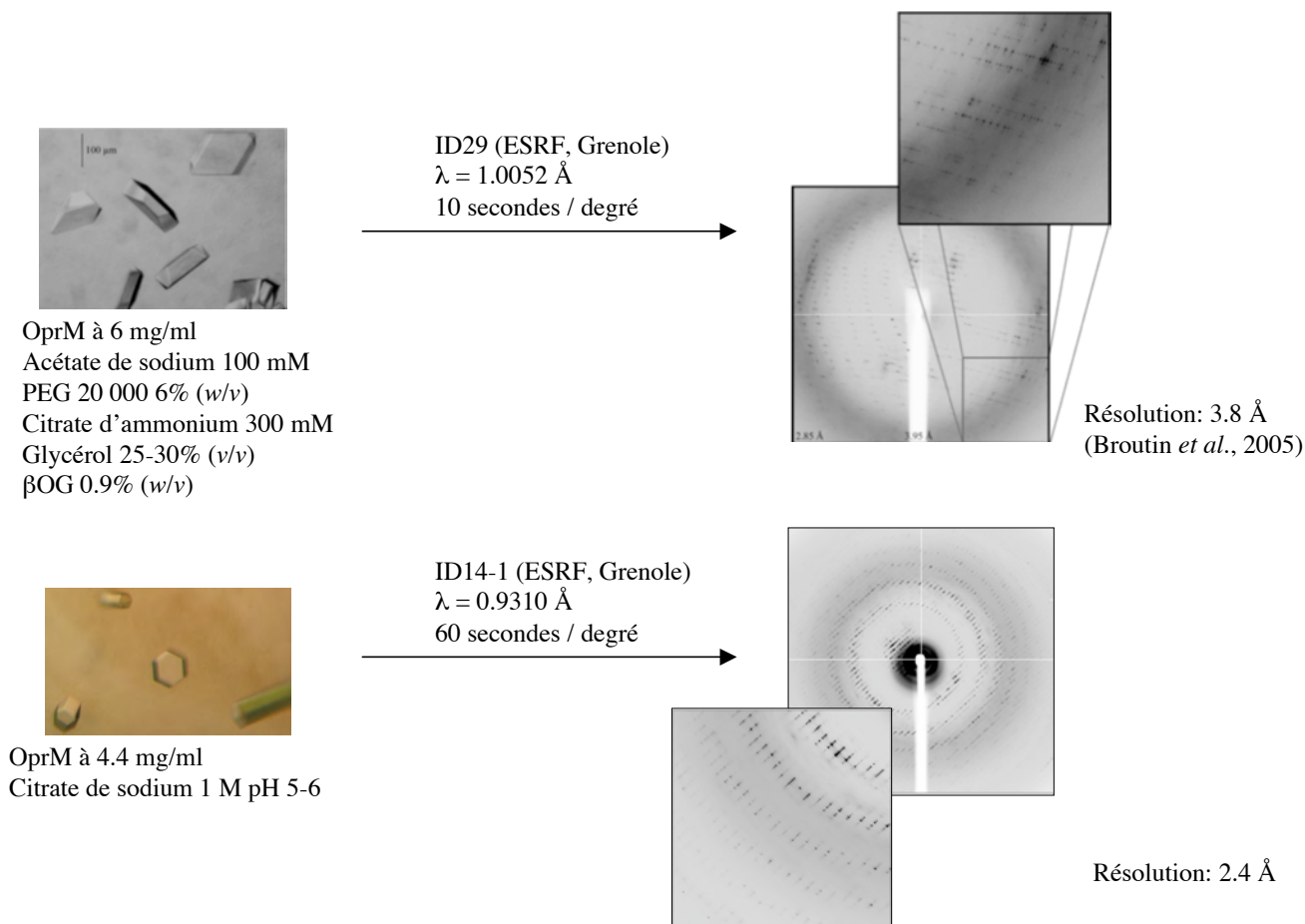
Tableau 5 : Intégration du nouveau jeu de données d'OprM : comparaison entre les deux programmes de traitement *XDS* et *MOSFLM*.

	<i>XDS</i>	<i>MOSFLM</i>
Résolution (Å)	35 - 2.4 (2.54 - 2.4)	35 - 2.5 (2.64 - 2.5)
Nombre de réflexions observées	439 539	208 947
Nombre de réflexions uniques	69 761	32 576
R _{merge} (%)*	9.3 (28.8)	8.0 (19.1)
Complétude (%)	98.7 (94.4)	65.1 (71.2)

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution.

* $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_i \sum_j |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum_i \sum_j \langle I(h) \rangle}$; $I(h)$ est l'intensité observée et $\langle I(h) \rangle$ est l'intensité moyenne sur tous les $I(h)$.

La figure suivante présente les deux conditions de cristallisation d'OprM qui ont permis l'enregistrement des deux jeux complets de diffraction :



Les clichés présentent des profils de diffraction élargis et chevauchants caractéristiques des cristaux mosaïques, c'est-à-dire des cristaux imparfaits et constitués de plusieurs blocs d'orientations légèrement différentes (Figure 42). Cela montre bien la difficulté d'obtenir dans le cas d'OprM des cristaux homogènes de qualité pour les expériences de diffraction. Une hypothèse serait d'incriminer la partie hydrophobe de la protéine associée aux détergents qui s'agrège probablement de façon hétérogène.

Figure 42 (Drenth, 1995) :

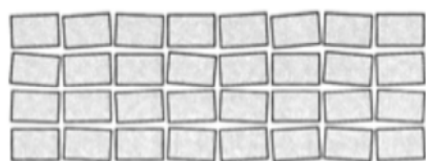


Schéma illustrant l'organisation mosaïque d'un cristal de protéine: le cristal est constitué de différents blocs qui présentent des orientations légèrement différentes. Ceci engendre un élargissement des profils des réflexions et un chevauchement des tâches de diffraction.

Le nouveau jeu de données a révélé une nouvelle organisation cristalline d'OprM dans le groupe d'espace orthorhombique $P2_12_12_1$, avec une résolution améliorée de 2,4 Å (Tableau 6).

Au cours de nos travaux, la structure cristallographique d'OprM a été publiée par une équipe concurrente dans le groupe d'espace trigonal $R32$ à 2,54 Å de résolution (Akama *et al.*, 2004(a), code PDB 1WP1).

Tableau 6 : Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'intégration des données pour les trois structures d'OprM.

	Phan <i>et al.</i> , thèse	Broutin <i>et al.</i> , 2005	Akama <i>et al.</i> , 2004
Longueur d'onde du faisceau X (Å)	0.9310	1.0052	0.9000
Distance cristal - détecteur (mm)	230	400	550
Groupe d'espace	$P 2_12_12_1$	$C2$	$R32$
Paramètres de maille :			
a, b, c (Å)	73.9, 70.2, 344.5	152.6, 87.9, 355.9	85.43, 85.43, 1044.3
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 98.9	90, 90, 120
Coefficient de Matthews V_M (Å ³ /Da)	2.88	3.80	3.50
Contenu de l'unité asymétrique (kDa)	155	310	103
Quantité de solvant (%)	51.3	67.7	65.1
Résolution (Å)	35 - 2.4 (2.54 - 2.4)	88 - 3.8 (4.01 - 3.8)	40.0 - 2.56 (2.69 - 2.56)
Nombre de réflexions observées	439 539	131 301	548 330
Nombre de réflexions uniques	69 761	40 566	48 709
R_{merge} (%)*	9.3 (28.8)	12.2 (31.2)	4.7 (36.2)
Complétude (%)	98.7 (94.4)	87.7 (77.9)	99.1 (94.5)
Redondance	6.3 (6.1)	3.2 (3.3)	11.4 (?)
I/σ (I)	15.12 (7.57)	8.5 (3.3)	6.4 (2.0)

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution.

* $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum_i \langle I(h) \rangle}$; $I(h)$ est l'intensité observée et $\langle I(h) \rangle$ est l'intensité moyenne sur tous les $I(h)$.

Les résultats obtenus par Akama *et al.* (2004(a)) ont confirmé que la porine OprM s'organise en homotrimère. Nous avons donc utilisé le trimère comme modèle de remplacement moléculaire avec le programme PHASER (McCoy *et al.*, 2007) en mode automatique. Nous avons choisi un modèle en poly-alanine afin de souligner au mieux les différences atomiques de notre structure avec la leur. La fonction de rotation ne présentait pas de contraste (RFZ = 3,7). Néanmoins, la fonction de translation a permis de résoudre les phases sans ambiguïté (TFZ = 42,7). Notons que les tentatives de remplacement moléculaire d'OprM avec la structure connue de son orthologue TolC chez *E. coli* (Koronakis *et al.*, 2000, code PDB : 1EK9) avaient échoué, malgré les similitudes notables entre les deux structures. Cela pourrait s'expliquer par une identité de séquence plutôt modérée entre les deux protéines (18%).

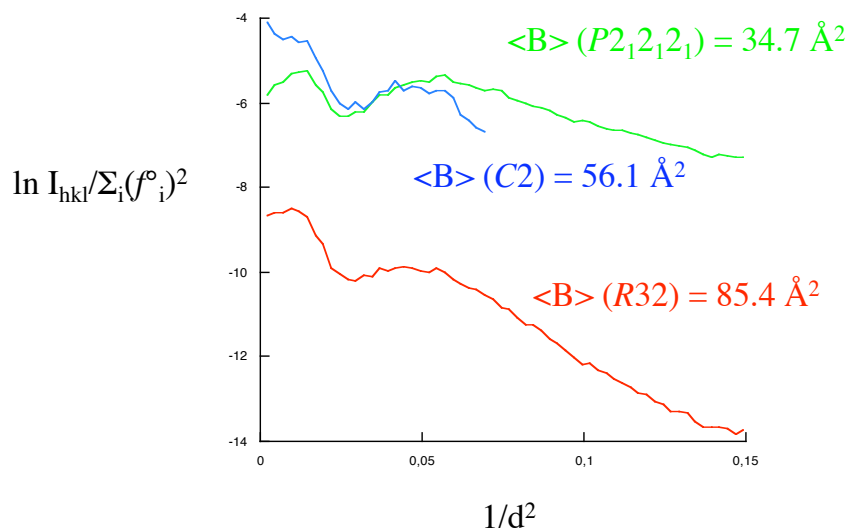
Contrairement à la structure publiée, nos données nous ont permis de résoudre une structure d'OprM avec une résolution légèrement améliorée (2,4 Å au lieu de 2,54 Å), mais surtout dans deux nouveaux groupes d'espace ne présentant pas de symétrie cristallographique d'ordre 3 ($P2_12_12_1$ et $C2$ au lieu de $R32$). En conséquence, cela nous a permis de reconstruire les trois protomères d'OprM de façon indépendante et de mettre en évidence les différences structurales.

Le facteur de température B moyen d'une protéine peut être estimé grâce au graphique de Wilson. L'intensité des réflexions I_{hkl} est tracée en fonction de la résolution $\sin^2\theta/\lambda^2$ (ou $1/d^2$) suivant la relation suivante :

$$\ln [I_{hkl}/\sum_i (f_i^o)^2] = \ln C - 2 B (\sin^2\theta/\lambda^2), \text{ avec } f_i^o \text{ facteur de diffusion de l'atome } i \text{ et } C \text{ facteur d'échelle absolu des intensités.}$$

La pente de la droite ainsi obtenue donne une estimation du facteur de température B. Les graphiques de Wilson des trois structures d'OprM sont présentés dans la figure 43. Bien que les structures cristallographiques d'OprM résolues dans les groupes d'espace $P2_12_12_1$ et $R32$ présentent des résolutions proches, on observe d'une part un écart important entre leur facteur de température moyen, d'autre part un facteur de température anormalement élevé pour une protéine dans le cas du cristal $R32$ (85,4 Å²). Cela est probablement la conséquence d'un désordre cristallin, lié à un grand paramètre de maille et une solvatation non négligeable (Akama *et al.*, 2005).

Figure 43 : Représentation de Wilson des structures cristallographiques d'OprM obtenues dans les trois groupes d'espace différents.



B) Construction et affinement de la structure cristallographique d'OprM dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$

La structure cristallographique à 2,4 Å a été construite dans la carte de densité électronique à partir d'un modèle en poly-alanine d'OprM à l'aide du programme *O* (Jones *et al.*, 1991) puis *COOT* (Emsley & Cowtan, 2004). *A priori*, 10 950 atomes (sans les hydrogènes) du trimère d'OprM (3 650 atomes du monomère x 3) doivent être affinés. Dans le cas de l'affinement le plus simple, le nombre de paramètres à affiner est de 438 000 (10 950 atomes x 4 paramètres à affiner qui sont le facteur de température B isotrope et les coordonnées spatiales x,y,z). Le nombre de réflexions observées (439 539) est légèrement supérieur au nombre de paramètres (438 000), l'affinement du modèle devrait alors converger vers les données expérimentales. Notons que le nombre de réflexions observées n'était pas suffisant pour affiner les facteurs d'occupation et les facteurs de température anisotropes.

Dans un premier temps, les affinements ont été réalisés majoritairement par maximum de vraisemblance avec les modules *rigid*, *minimize* et *bindividual* du programme *CNS* (Brünger *et al.*, 1998), respectivement pour affiner les paramètres de position en corps rigide, les paramètres de position de chaque atome et les facteurs de température de chaque atome. Un affinement par dynamique moléculaire a été réalisé par recuit simulé avec le module *annealing* du programme *CNS*.

Le modèle structural initial est un trimère d'OprM en poly-alanine. Au cours des sept premiers cycles d'affinement, nous avons introduit la séquence d'acides aminés d'OprM et créé un masque autour de la protéine à l'aide du module *model_mask* du programme *CNS*. Ce masque a été étendu manuellement, au niveau de la région susceptible d'être occupée par le palmitoyl N-terminal. Cette opération, appelée « aplatissement du solvant », permet de renforcer la densité électronique de la protéine par rapport au bruit de fond. Chaque résidu d'OprM a pu être placé sans interruption de la Cys 1 à la Val 455. La densité électronique des 19 derniers résidus C-terminaux (Thr 456 à Ala 468 + 6 His) n'apparaît pas, probablement à cause d'une flexibilité importante de cette extrémité dans le cristal ou d'une perte du fragment par protéolyse. Dans ce dernier cas, un spectre de masse sur le cristal utilisé dans les expériences de diffraction aurait permis d'apporter une réponse. Ce spectre n'a pu être obtenu à cause d'une trop faible quantité de protéine dans le cristal.

Nous sommes ensuite passé au programme d'affinement *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 1997) qui est associé au nouveau programme de construction *COOT* (Emsley & Cowtan, 2004). Ce dernier permet d'obtenir des cartes de Fourier-différence de meilleure qualité et de façon automatique. Durant les six derniers cycles d'affinement, nous avons :

- (i) Placé les molécules d'eau de façon automatique avec l'option *ARP/WARP* du programme *REFMAC* ;
- (ii) Tenté d'interpréter quelques amas résiduels de densité électronique ;

- (iii) Vérifié la densité électronique de chaque molécule d'eau en remplaçant certaines par des ions Na⁺ ou Cl⁻ présents dans le tampon de purification (de coordination hexa- ou divalente respectivement). En effet, le facteur de température de ces molécules d'eau était devenu inférieur à celui de l'atome de la protéine auquel elles étaient liées.

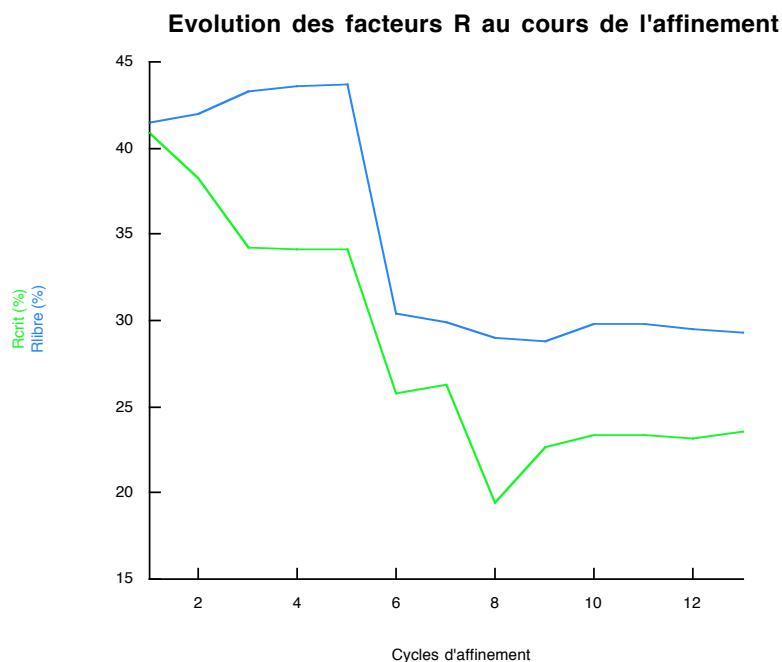
Lorsque la protéine a été entièrement construite, nous avons tenté de réduire le nombre de paramètres à affiner en moyennant la structure par symétrie non-cristallographique ou *NCS*. Les régions concernées sont celles qui présentaient un *rmsd* < 0,5 Å entre chaque monomère, c'est-à-dire I4-Q20, V33-V90, L119-T185, S202-L238, L256-T258, A262-Y397, L412-G447 et G449-Q453. Cependant, n'ayant pas obtenu une meilleure carte de densité électronique ou d'amélioration du facteur cristallographique R_{crist} , nous sommes revenus à trois monomères indépendants.

Les différents cycles de construction et d'affinement sont résumés dans le tableau suivant :

Cycles d'affinement (modules et programmes utilisés)	Applications	R_{cris} (%)	R_{libre} (%)
1 – <i>rigid</i>	Affinement en corps rigide	40.87	41.47
2 – <i>minimize</i>	Construction et affinement	38.21	41.95
3 – <i>minimize</i>	Construction et affinement	34.23	43.33
4 – <i>minimize</i>	Construction et affinement	34.14	43.59
5 – <i>minimize, model_mask</i>	Construction, aplatissement du solvant et affinement	34.09	43.70
6 – <i>minimize, bindividual</i>	Affinement	25.82	30.44
7 – <i>minimize, annealing, bindividual</i>	Affinement	26.29	29.90
8 – <i>refmac, arp/warp</i>	Construction du solvant et affinement	19.47	29.02
9 – <i>refmac</i>	Correction du solvant et affinement	22.61	28.76
10 – <i>refmac</i>	Affinement	23.36	29.83
11 – <i>refmac</i>	Affinement	23.31	29.82
12 – <i>refmac</i>	Construction du palmityl et affinement	23.17	29.55
13 – <i>refmac</i>	Affinement	23.58	29.32

Au niveau de la partie transmembranaire de la protéine, la carte Fourier-différence montre de la densité électronique résiduelle que nous n'avons pas réussi à interpréter. Nous avons tenté d'y placer du β OG, du citrate (présents dans les conditions de cristallisation) ou encore le polypeptide correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine, mais le facteur R reste inchangé. Cependant, il est probable que ces fragments de densités électroniques correspondent à du β OG ou à un lipide endogène puisqu'ils sont d'une part de forme allongée, d'autre part majoritairement présents au niveau de la partie transmembranaire d'OprM.

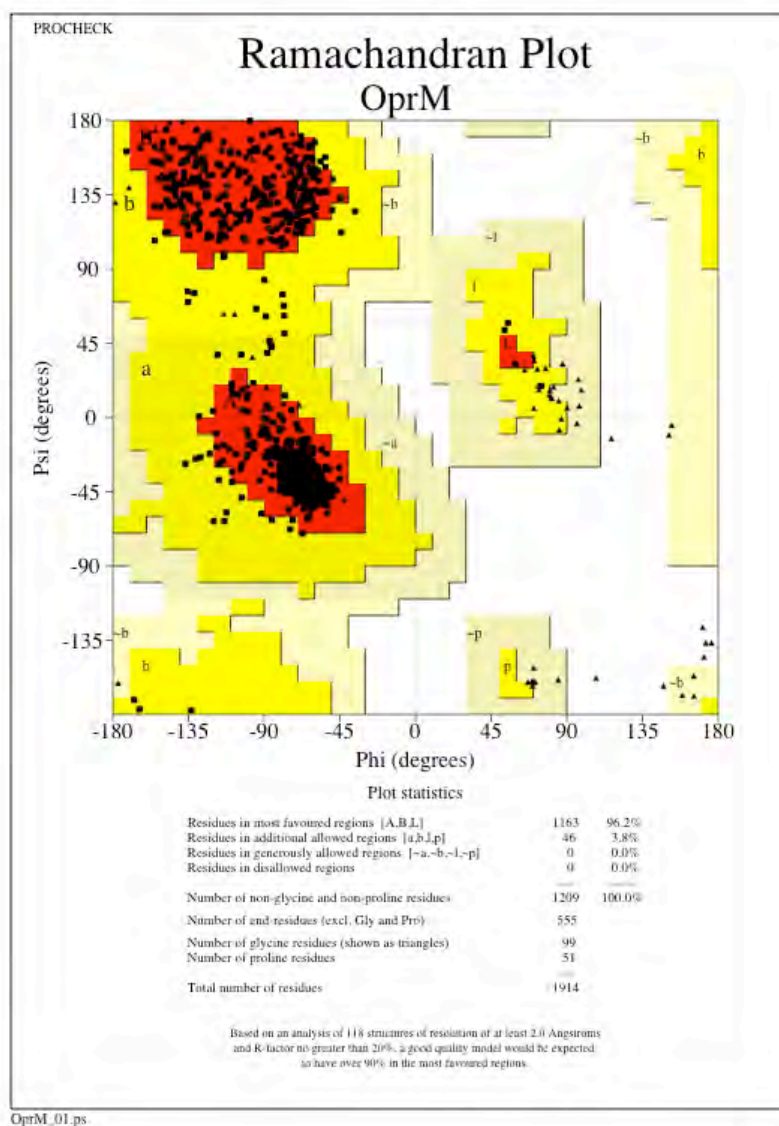
Au cours de l'affinement, les facteurs de structure observés et calculés doivent converger. En d'autres termes leur écart, qui est représenté par le facteur cristallographique R_{crist} , doit diminuer. Cependant, pour éviter une extrapolation de l'affinement, la différence avec le facteur cristallographique libre ($R_{\text{crist}} - R_{\text{libre}}$) au final ne doit généralement pas excéder 7% à notre résolution (2,4 Å). Dans le cas de la structure d'OprM dans le groupe $P2_12_12_1$, la différence est de 5,7%. La courbe ci-dessous montre l'évolution des facteurs cristallographiques R_{crist} et R_{libre} au cours des cycles d'affinement :



C) Validation de la structure cristallographique d'OprM dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$

Dans le programme de construction *COOT*, de nombreux modules ont permis de vérifier la stéréochimie du modèle final. D'après le diagramme de Ramachandran du trimère d'OprM (Figure 44), 96,2% des résidus se trouvent dans les régions favorables.

Figure 44 : Diagramme de Ramachandran, obtenu à l'aide du programme PROCHECK de la chaîne de programme CCP4 (1994). Les valeurs des angles Φ - Ψ sont issues de la structure cristallographique d'OprM résolue dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$.



Les statistiques d'affinement ainsi que la qualité géométrique des structures cristallographiques d'OprM dans les trois groupes d'espaces différents sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	Phan <i>et al.</i>, thèse	Broutin <i>et al.</i>, 2005	Akama <i>et al.</i>, 2004
$R_{\text{crist}} / R_{\text{libre}} (\%)$	23.6 / 29.3	33.5 / 39.2	25.2 / 30.8
Rmsd moyen des liaisons (Å)	0.006	0.015	0.014
Rmsd moyen des angles (°)	0.888	2.100	1.386
Contenu de l'unité asymétrique :			
Chaînes	3	6	2
Résidus	1 365	2 742	861
Solvants	543	0	24
Ions	10	0	0
Facteur de température moyen $\langle B \rangle$ (Å ²)	31.6	97.3	82.1

3) ANALYSE STRUCTURALE D'OPRM

Nous avons réalisé une description structurale du trimère d'OprM de façon comparative avec ses homologues TolC (code PDB 1EK9, [Koronakis et al., 2000](#)) et VceC (code PDB 1YC9, [Federici et al., 2005](#)).

A) Architecture générale

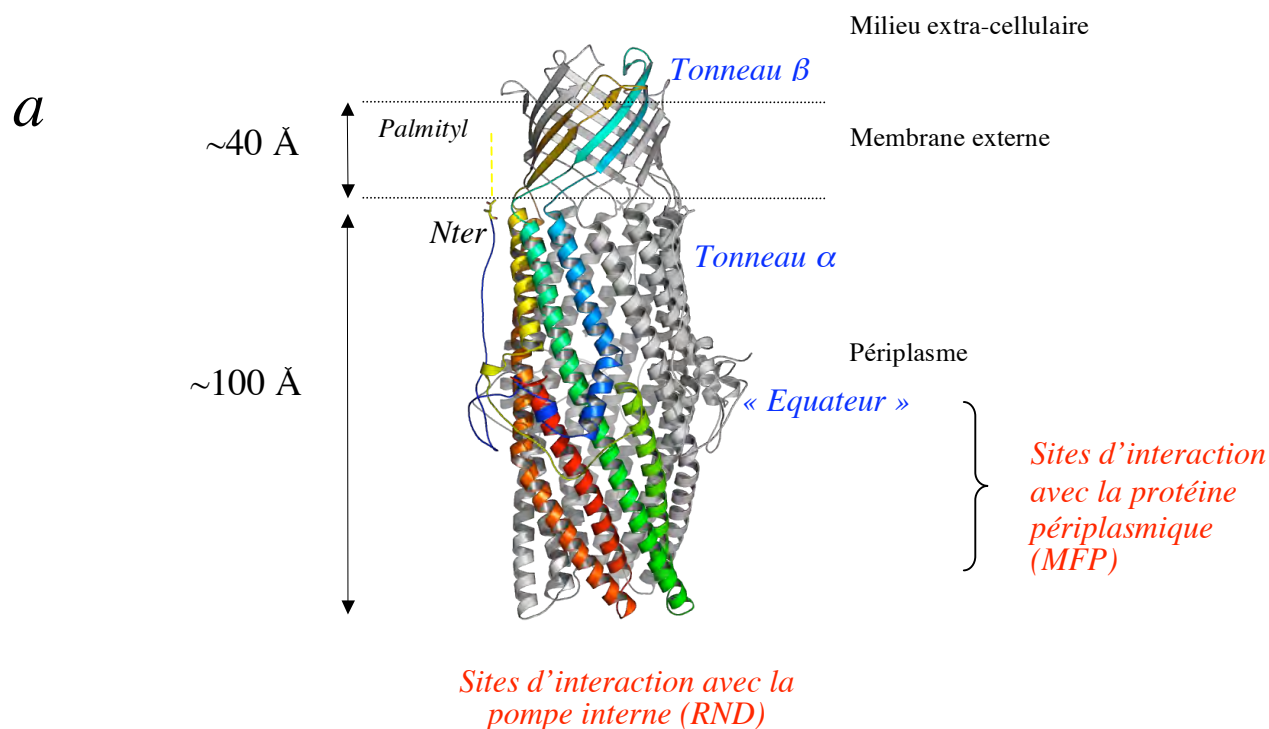
La structure cristallographique d'OprM a été obtenue dans deux groupes d'espace différents au laboratoire : $P2_12_12_1$ à 2.4 Å et $C2$ à 3.8 Å. La plupart des descriptions sont faites sur la structure résolue dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ car elle présente une meilleure résolution.

Comme précédemment décrit par Akama *et al.* (2004(a)), OprM est un homotrimère d'environ 155 kDa, le poids moléculaire de chaque protomère étant d'environ 51,7 kDa. L'architecture générale est semblable aux structures des orthologues connues à ce jour, c'est-à-dire TolC chez *E. coli* ([Koronakis et al., 2000](#)) et VceC chez *V. cholerae* ([Federici et al., 2005](#)). La nomenclature des structures secondaires est calquée sur celle de TolC dont la structure a été la première résolue pour cette famille d'OMP. On parle d'ailleurs des porines de la « famille de TolC ».

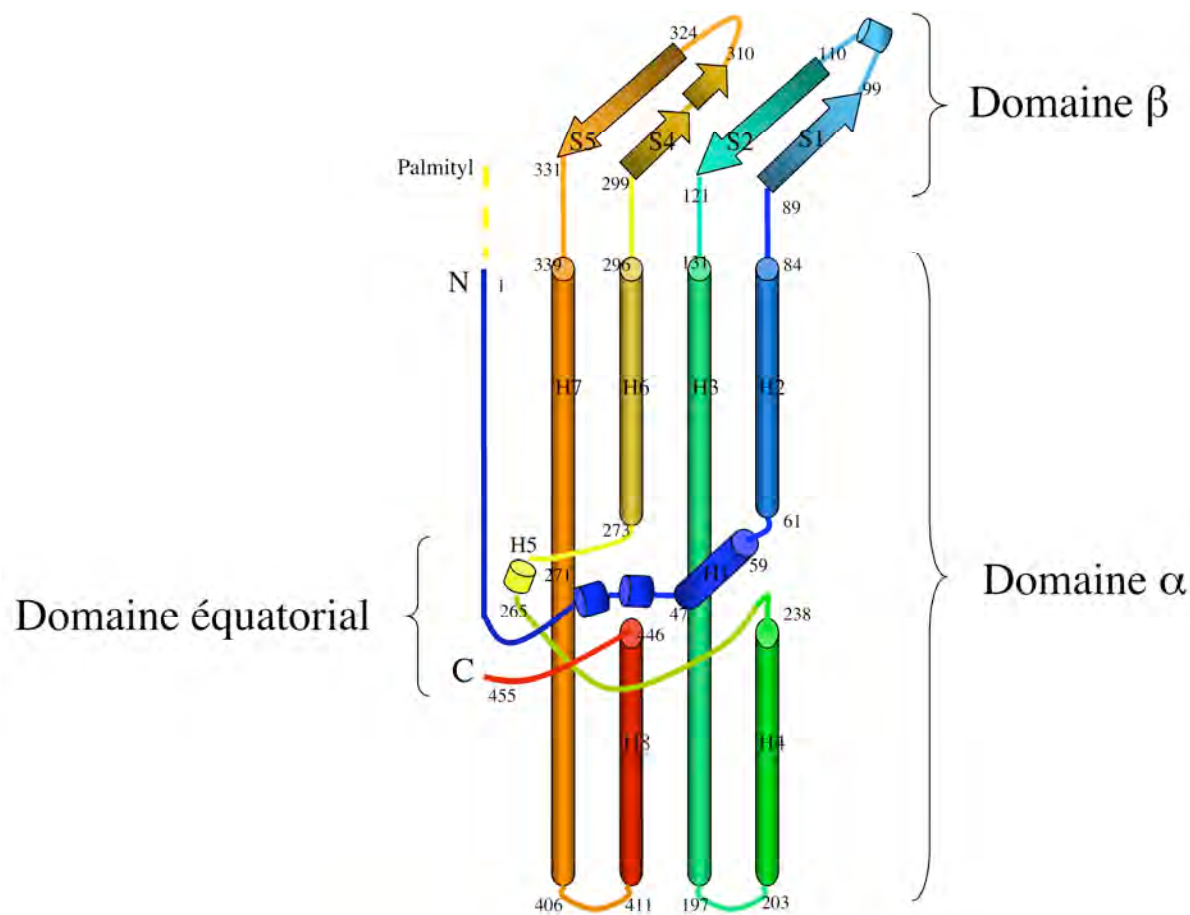
En accord avec les descriptions structurales en microscopie électronique ([Lambert et al., 2005](#)), OprM est un grand cylindre légèrement conique d'environ 140 Å de long, 40 Å de large pour la partie supérieure et 70 Å de large pour la partie inférieure. Pour chaque monomère d'OprM, 97,2% de la protéine mature (455 sur 468 résidus) sont représentés dans notre modèle, les 13 résidus manquants correspondent à l'extrémité C-terminale. Le monomère est constitué de quatre brins β antiparallèles transmembranaires (B1, B2, B4 et B5) et de huit hélices α périplasmiques (H1 à H8, Figure 45). Les brins β sont constitués d'une dizaine de résidus qui s'associent pour former un seul feuillet β antiparallèle s'incurvant de façon remarquable d'un angle de $\sim 60^\circ$. Chaque brin β est incliné d'environ 45° par rapport à l'axe de symétrie du trimère.

L'hélice H1 est constituée de 13 résidus, H2/H6 de 23 résidus, H4/H8 de 36 résidus et H3/H7 de 67 résidus. Les plus petites hélices s'associent le long des plus grandes pour former un grand feuillet incurvé d'hélices α antiparallèles. Chaque faisceau d'hélices s'incline d'environ 20° par rapport à l'axe de symétrie du trimère. Les trois monomères s'assemblent pour former un tonneau β transmembranaire d'environ 40 \AA de long et de large qui se prolonge vers le périplasma par un grand tonneau α de 100 \AA de long et 70 \AA de large. La structure d'OprM peut être séparée en trois domaines : le domaine transmembranaire qui forme un tonneau β , le domaine périplasmique qui forme un tonneau α et le domaine équatorial situé au niveau de la partie médiane du domaine α . Celui-ci est une structure mixte, constituée par deux hélices α (H1 et H5), des boucles et des hélices 3_{10} . Les domaines β et α sont connectés par quatre petites boucles formant un angle d'environ 110° , au niveau des résidus aromatiques F85, F129, F297 et F335. Le domaine équatorial forme une « bouée » autour du tonneau α . L'extrémité N-terminale d'OprM, qui est ancrée à la membrane interne *via* un palmyl lié à la cystéine terminale, fait partie du domaine équatorial.

Figure 45 : Structure cristallographique d'OprM en structure secondaire avec sa localisation au niveau de la paroi bactérienne. (a) Représentation de l'homotrimère d'OprM avec un des trois monomères coloré. (b) Topologie d'un monomère d'OprM.

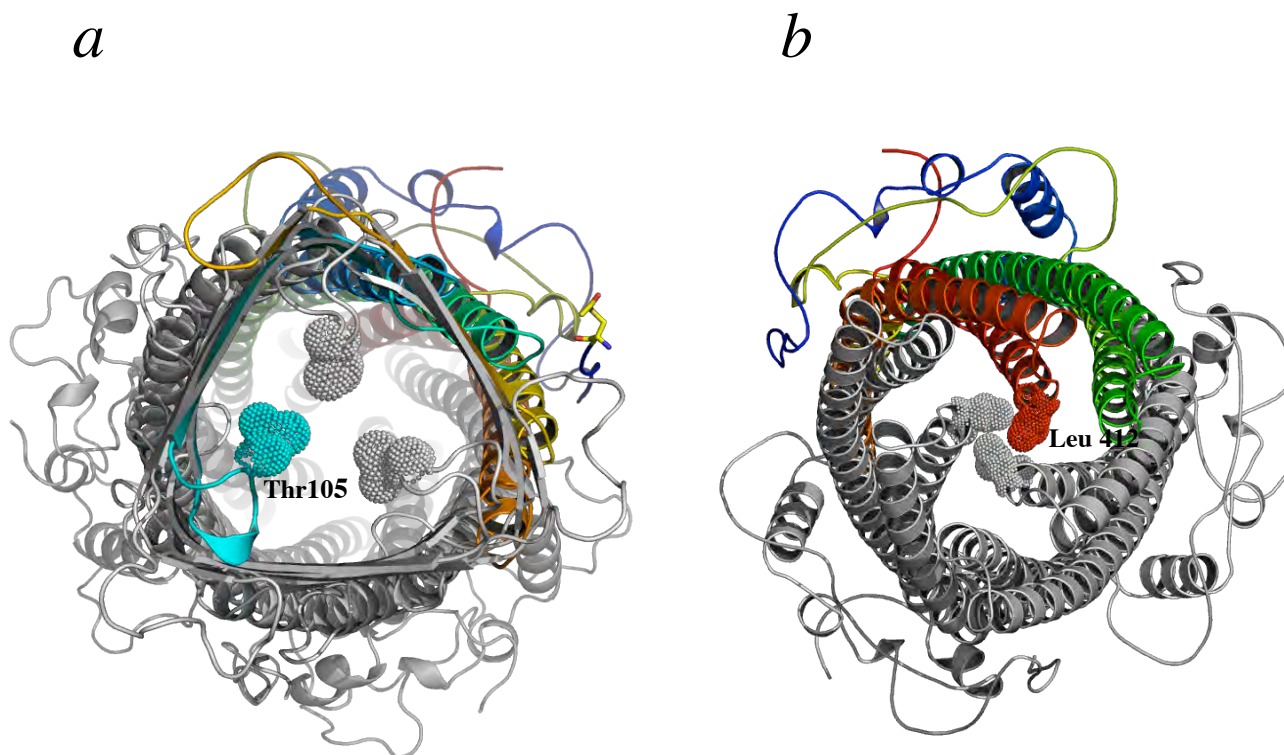


b



La structure cristallographique d'OprM est dans une conformation fermée, ce qui expliquerait sa faible conductance dans les expériences de reconstitution *in vitro* de la porine au sein des bicouches lipidiques planes (Wong *et al.*, 2000). L'extrémité supérieure (sortie de la porine) ne laisse entrevoir qu'une ouverture de 2 Å de diamètre au niveau des Thr 105, ce qui est insuffisant pour laisser passer des substrats comme les antibiotiques. L'extrémité inférieure (entrée de la porine) est fermée par les Leu 412 de chaque protomère (Figure 46). Cette configuration fermée de la porine a également été observée sur les structures cristallographiques des homologues TolC et VceC avec respectivement des diamètres moyens de 6 Å et 2 Å (Figure 47).

Figure 46 : Vues transversales de la structure cristallographique d'OprM. Un seul monomère est coloré et les résidus fermant la porine sont représentés en sphères (Thr 105 et Leu 412). (a) Extrémité supérieure (vue de dessus). (b) Extrémité inférieure (vue de dessous).

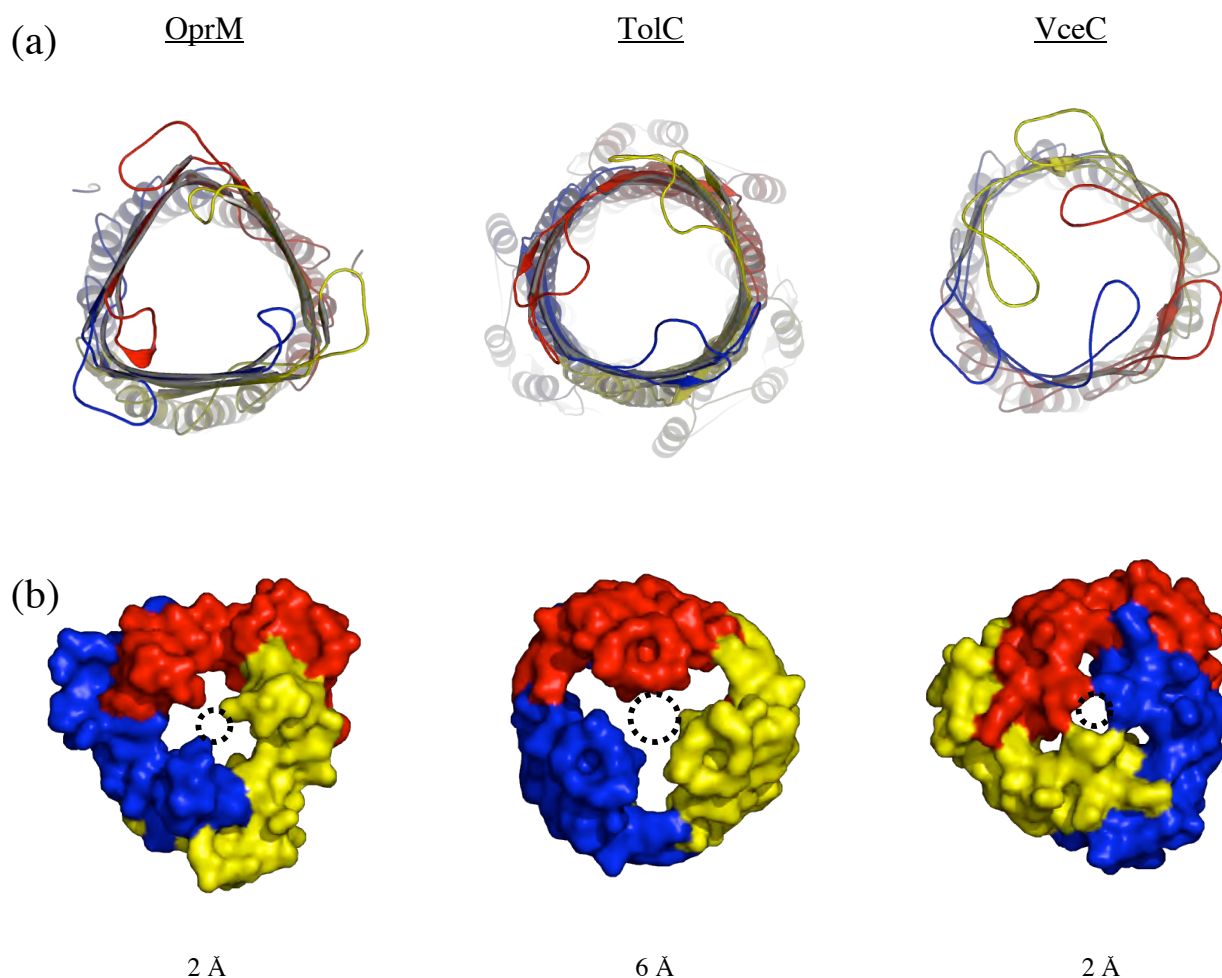


B) Domaine β transmembranaire

De façon analogue aux porines de la famille des OMP connues à ce jour ([Koronakis et al., 2004](#)), le domaine transmembranaire d'OprM est un tonneau β formé par l'association de 12 brins antiparallèles. Mais, comme ses homologues TolC et VceC, le tonneau β présente la particularité d'être formé, non pas par un seul, mais par l'association de trois monomères. En vue transversale, le tonneau β d'OprM s'avère plutôt triangulaire contrairement à celui de TolC ou de VceC qui sont à l'image des OMP connus, c'est-à-dire cylindriques (Figure 47). La cavité des OMP est généralement occupée par une grande boucle qui permet de réguler le flux à travers la porine. Dans le cas d'OprM et ses homologues, cette boucle n'existe pas et l'intérieur du canal est donc complètement libre. Cependant, de larges boucles extracellulaires, coiffant leur extrémité supérieure, sont responsables de l'état fermé observé dans les structures cristallographiques.

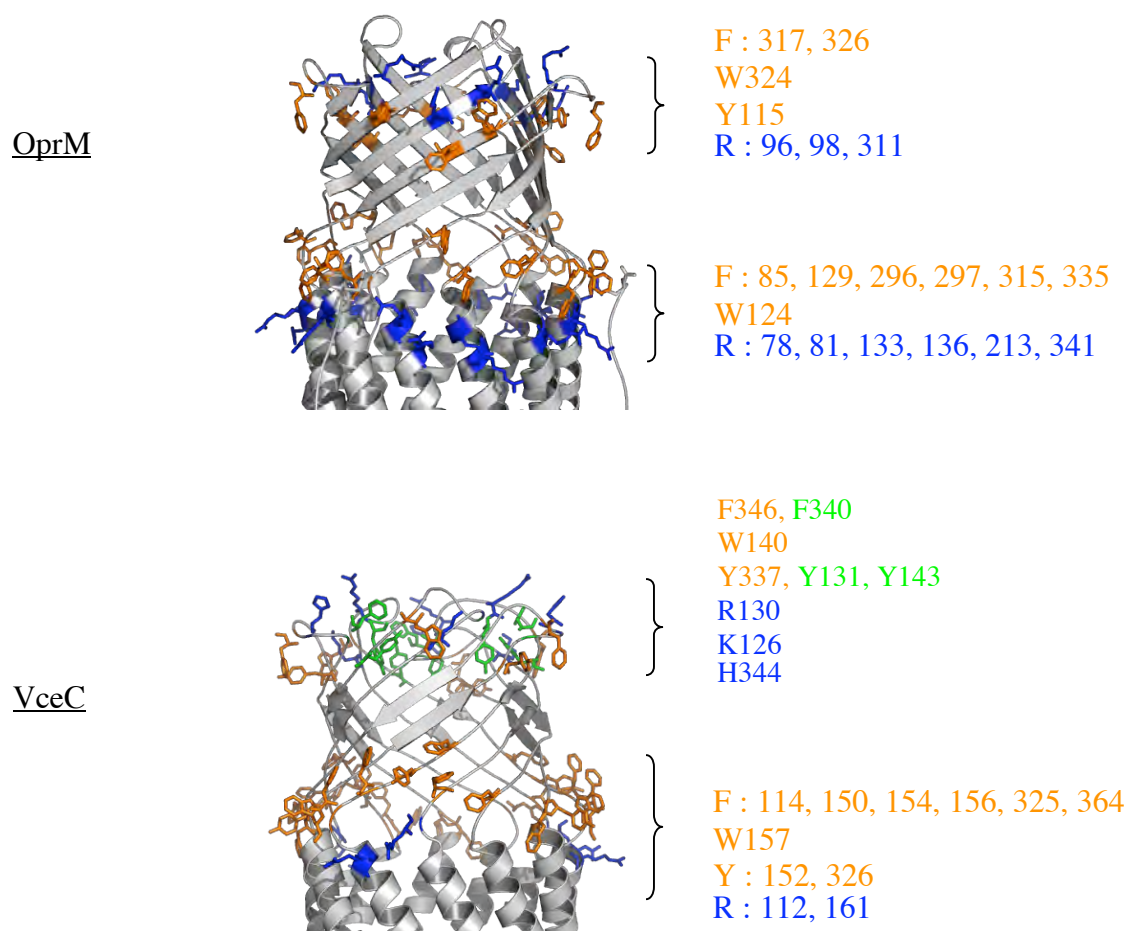
Ces boucles extracellulaires d'une dizaine de résidus participeraient donc à l'ouverture et fermeture de la partie supérieure de cette famille de porine. Comme nous le verrons plus loin, il est probable que le domaine β subisse des changements structuraux notables lors de l'ouverture du canal.

Figure 47 : Vue transversale de l'extrémité supérieure d'OprM, TolC et VceC. Les monomères A, B et C sont respectivement colorés en rouge, bleu et jaune. (a) Représentation en structure secondaire. (b) Représentation en surface de Van der Waals avec les diamètres moyens associés.

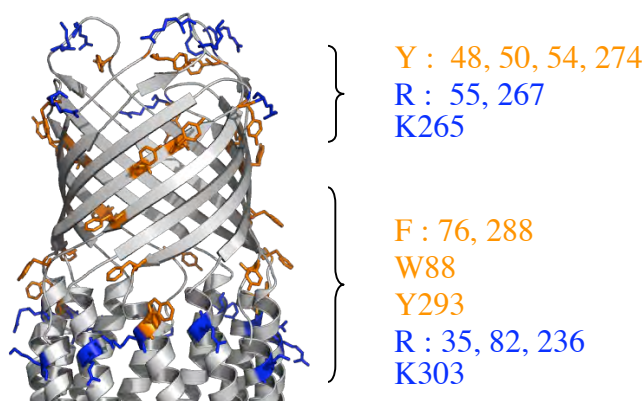


L'autre caractéristique des OMP est la délimitation du tonneau β par deux couronnes de résidus aromatiques et basiques, de part et d'autre de la membrane, ce qui assure la stabilisation et le positionnement vertical du canal au sein de la bicouche phospholipidique (Schulz, 2002). Les résidus aromatiques impliqués dans la stabilité du tonneau β sont essentiellement des Phe. Ils sont majoritairement localisés au niveau de la couronne inférieure qui correspond également à la zone de jonction avec le domaine α . De même pour les résidus basiques qui sont en grande partie des Arg. Par ailleurs, l'hydroxyle des résidus Tyr, quand il y en a, pointe logiquement vers les groupements polaires des phospholipides. La répartition de ces résidus sur OprM, TolC et VceC est présentée dans la figure 48.

Figure 48 : Vue latérale des tonneaux β d'OprM, TolC et VceC. Les résidus aromatiques sont représentés en orange et les résidus basiques en bleu. Dans le cas de VceC, les résidus aromatiques dont la chaîne latérale pointe vers l'intérieur du canal sont représentés en vert.



TolC



On constate que la nature et le nombre de ces résidus est très variable d'une porine à l'autre, ce qui est probablement lié à leurs différences structurales. Contrairement à OprM et VceC, les couronnes de résidus aromatiques ne sont pas bien définies dans TolC. Cela suggère que la structure de ce dernier est relativement moins stable au sein de la membrane lipidique. Dans le cas de VceC, la chaîne latérale des résidus F340, Y131 et Y143 est localisée vers l'intérieur de la porine et n'interagit donc pas avec la membrane cellulaire. Il est possible que ces résidus puissent se réorienter vers l'extérieur pour stabiliser le tonneau β lors de l'ouverture du canal.

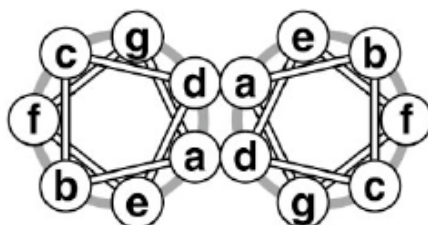
C) Domaine α périplasmique

Le domaine α correspond à un grand tonneau de 18 hélices α hydrosolubles occupant la moitié de l'espace périplasmique, chaque protomère apportant 6 hélices α . Cette structure, décrite pour la première fois chez TolC, fait la particularité des porines de cette famille. Les longues hélices (H3 et H7) interagissent avec les petites hélices (H2, H4, H6 et H8), deux à deux, à la manière d'hélices surenroulées ou *coiled-coils*, et ceci de façon antiparallèle. Définis pour la première fois par Francis Crick (1953), ces surenroulements d'hélices α sont stabilisés par l'emboîtement de chaînes latérales, le plus souvent aliphatiques, dans des petites concavités formées par quatre résidus de l'hélice opposée. La distance entre le résidu « tenon » et ceux qui forment la « mortaise » est classiquement de 7 Å (on parle de *packing cut-off*). Les résidus en interaction apparaissent dans les motifs heptamériques répétés « a-b-c-d-e-f » de tenons et mortaises ou KIH (*knobs-into-holes*, Gruber & Lupas, 2003), où a et d sont les résidus tenons.

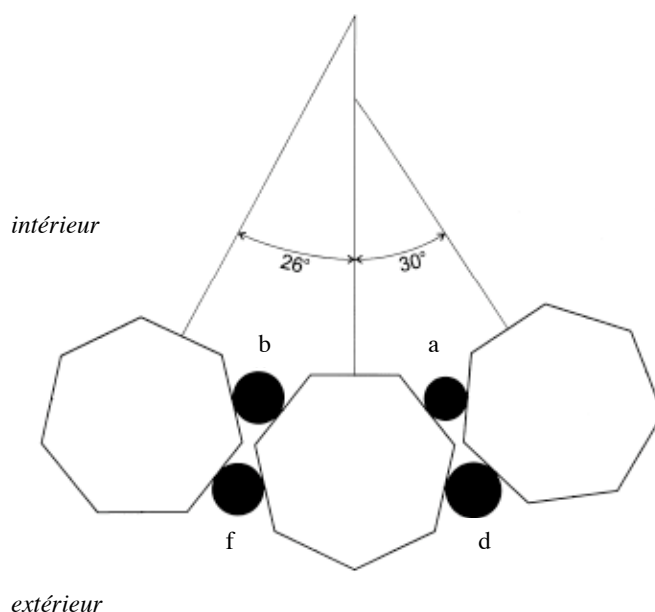
Le tonneau α peut être séparé en deux sous-domaines, de part et d'autre du domaine équatorial. Dans la partie inférieure, H3 et H7 présentent un début de surenroulement respectivement avec H4 et H8. Ils forment alors deux *coiled-coils* qui, à leur tour, s'incurvent de façon constrictive pour fermer l'extrémité inférieure de la porine. En revanche, le sous-domaine α supérieur correspond à une organisation originale de type « cylindre α » qui a été précédemment décrit pour la première fois chez TolC (Calladine *et al.*, 2001 ; Walshaw & Woolfson, 2001). Les hélices en interaction ne s'enroulent pas et n'adoptent pas une configuration KIH canonique. Elles sont disposées à la manière d'un feuillet α dont l'axe de chaque hélice est incliné et translaté pour stabiliser cette configuration *coiled-coil* inhabituelle. De plus, chaque hélice peut interagir avec deux voisines pour former un feuillet parallèle ou antiparallèle. Cela implique des résidus tenons supplémentaires pour l'hélice charnière, il s'agit des résidus b/f en plus des résidus a/d si l'on garde les conventions du motif heptamérique (Figure 49). Le cylindre α est formé par l'association de trois feuillets α incurvés. On distingue alors les tenons internes (a et b) et les tenons externes (d et f). La taille des tenons internes détermine le degré de courbure du feuillet α et la nature des résidus du motif heptamérique semble suivre une distribution caractéristique des porines de la famille de TolC (Calladine *et al.*, 2001).

Figure 49 : Interactions interhélicales au sein du domaine α des OMP de la famille de TolC. (a) Représentation en roue d'hélice montrant l'orientation des résidus impliqués dans l'interaction *coiled-coil* entre deux hélices α parallèles (Walshaw & Woolfson, 2001). Par convention, le motif heptamérique impliqué dans cette interaction est noté « a-b-c-d-e-f », avec a et d les résidus tenons. (b) Représentation transversale d'un feuillet α constitué de trois hélices antiparallèles avec les angles de courbure potentiels. Les résidus tenons sont représentés en rond noir (Calladine *et al.*, 2001).

(a)



(b)



Derrière les similitudes structurales du domaine α des OMP de la famille de TolC se cachent des géométries d'interaction interhélicale différentes selon la porine, en particulier au niveau du cylindre α supérieur. Si nous étudions les motifs heptamériques à l'aide du programme *SOCKET* (Walshaw & Woolfson, 2001), on constate que les résidus tenons des *coiled-coils* H3/H4 et H7/H8 du domaine α inférieur sont bien identifiés chez TolC, OprM et VceC (Figure 50). Bien que le programme utilisé ne soit pas adapté aux structures de type feuillet α , quelques résidus tenons ont également été identifiés au niveau du domaine α supérieur TolC et OprM, mais de manière très inégale et en moindre quantité que le domaine α inférieur. En revanche, aucun résidu tenon n'a été identifié sur le domaine α supérieur de VceC (Figure 50). On remarquera que des interactions KIH intermoléculaires au niveau du cylindre α n'ont été identifiées que chez OprM. C'est aussi la seule interface où l'on trouve une interaction verticale entre les tenons a de type « Ile-Leu-Ile », démontrée pour être énergétiquement très favorable dans les *coiled-coils* antiparallèles (Figure 51, Hadley *et al.*, 2008).

Figure 50 : Vue latérale des monomères d'OprM, TolC et VceC. Les résidus tenons des interactions KIH intramoléculaires et intermoléculaires sont respectivement représentés en bleu et rouge. L'identification des résidus a été réalisée à l'aide du programme SOCKET avec un packing cut-off de 7 Å, (Walshaw & Woolfson, 2001).

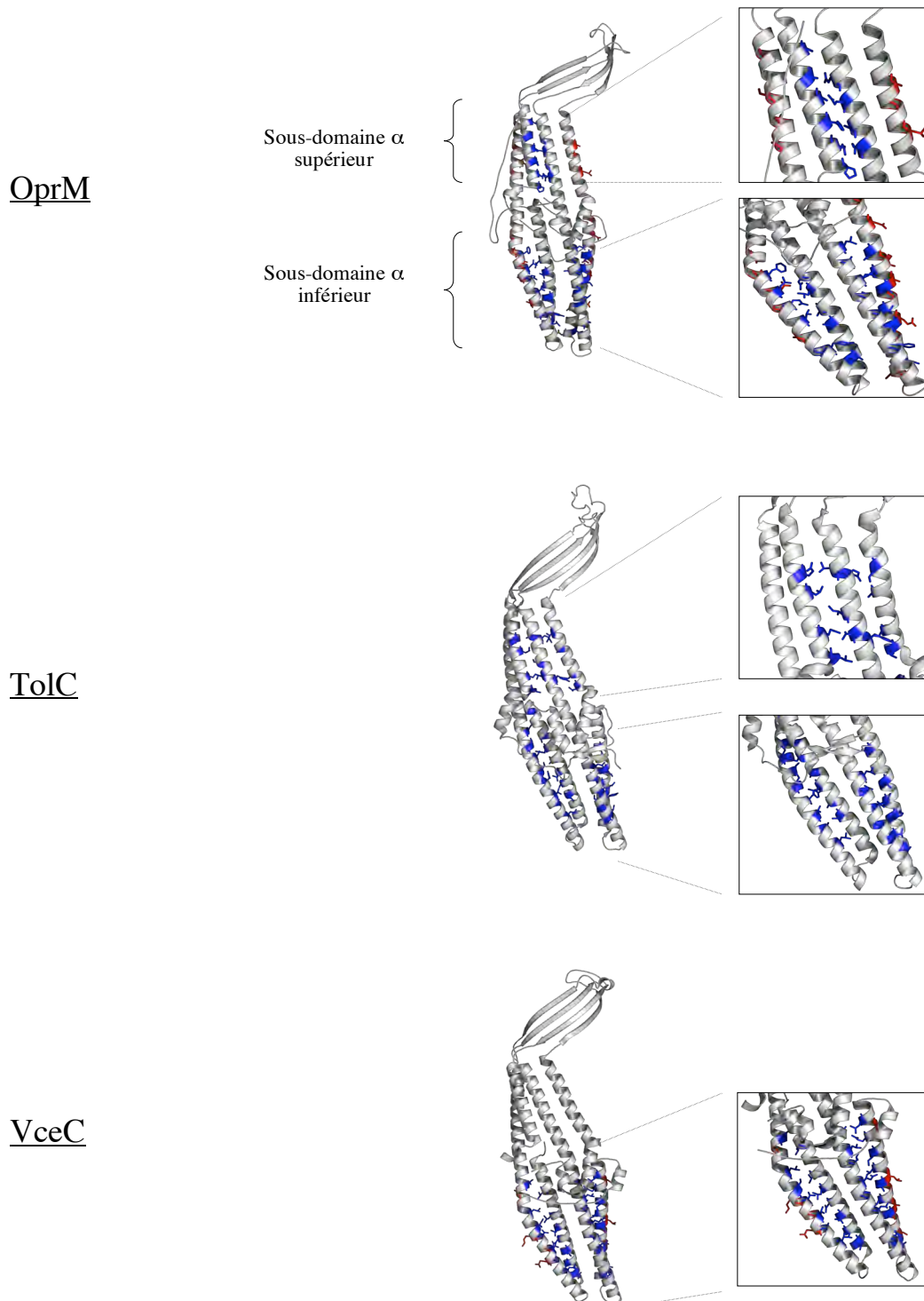
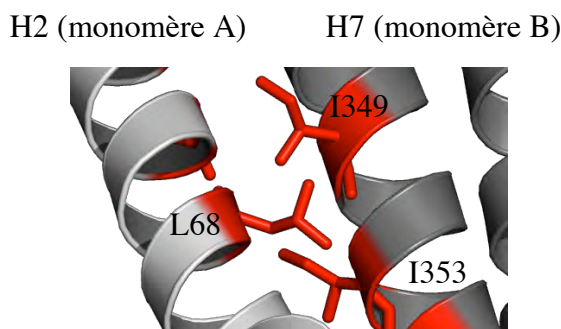


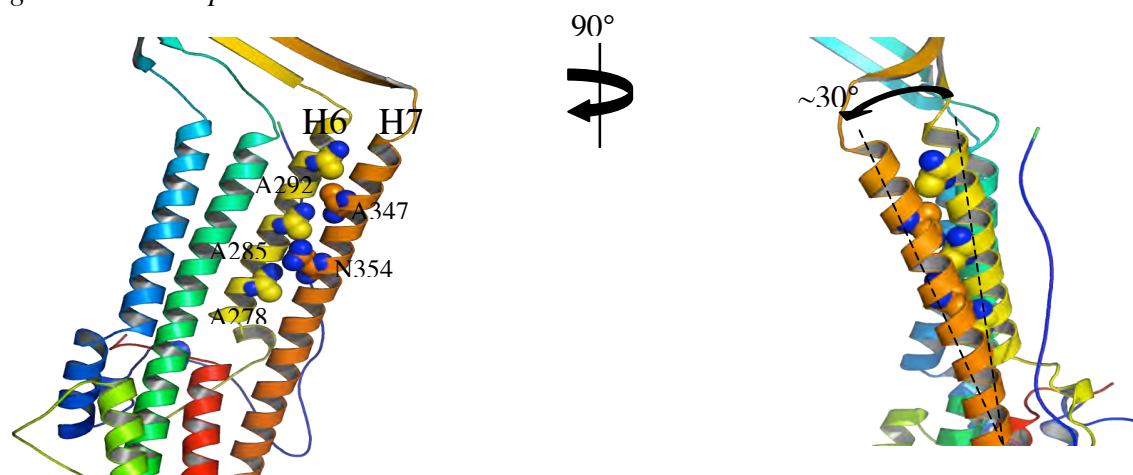
Figure 51 : Interaction KIH verticale « Ile-Leu-Ile » à l'interface de deux monomères d'OprM, entre les hélices H2 du monomère A et H7 du monomère B.



Comparativement à TolC, l'analyse des résidus tenons impliqués dans les feuillettes α antiparallèles d'OprM et VceC montre une distribution préférentielle précédemment décrite (Calladine *et al.*, 2001) : les résidus a/d ont tendance à être petits ou polaires avec une longue chaîne latérale, les résidus b sont préférentiellement petits et non-polaires (majoritairement des Ala) et les résidus f sont plutôt non-polaires.

De façon remarquable, les résidus tenons internes b à l'interface des hélices H6/H7 sont exclusivement des alanines, à l'exception de N354 dans le cas d'OprM. Cette conservation de petits résidus permet une inclinaison de l'axe de l'hélice H7 d'environ 30° au sein du feuillet α et favorise alors la formation d'un cylindre au niveau de la structure quaternaire (Figure 52).

Figure 52 : Vue latérale du côté intérieur d'un monomère d'OprM. La présence de petits résidus (représentés en sphère) au niveau des tenons internes b à l'interface des deux hélices H6 et H7 permet une inclinaison d'environ 30° , ce qui confère une courbure générale au feuillet α et permet la formation d'un cylindre. Cette observation, illustrée par OprM, est également vraie pour TolC et VceC.

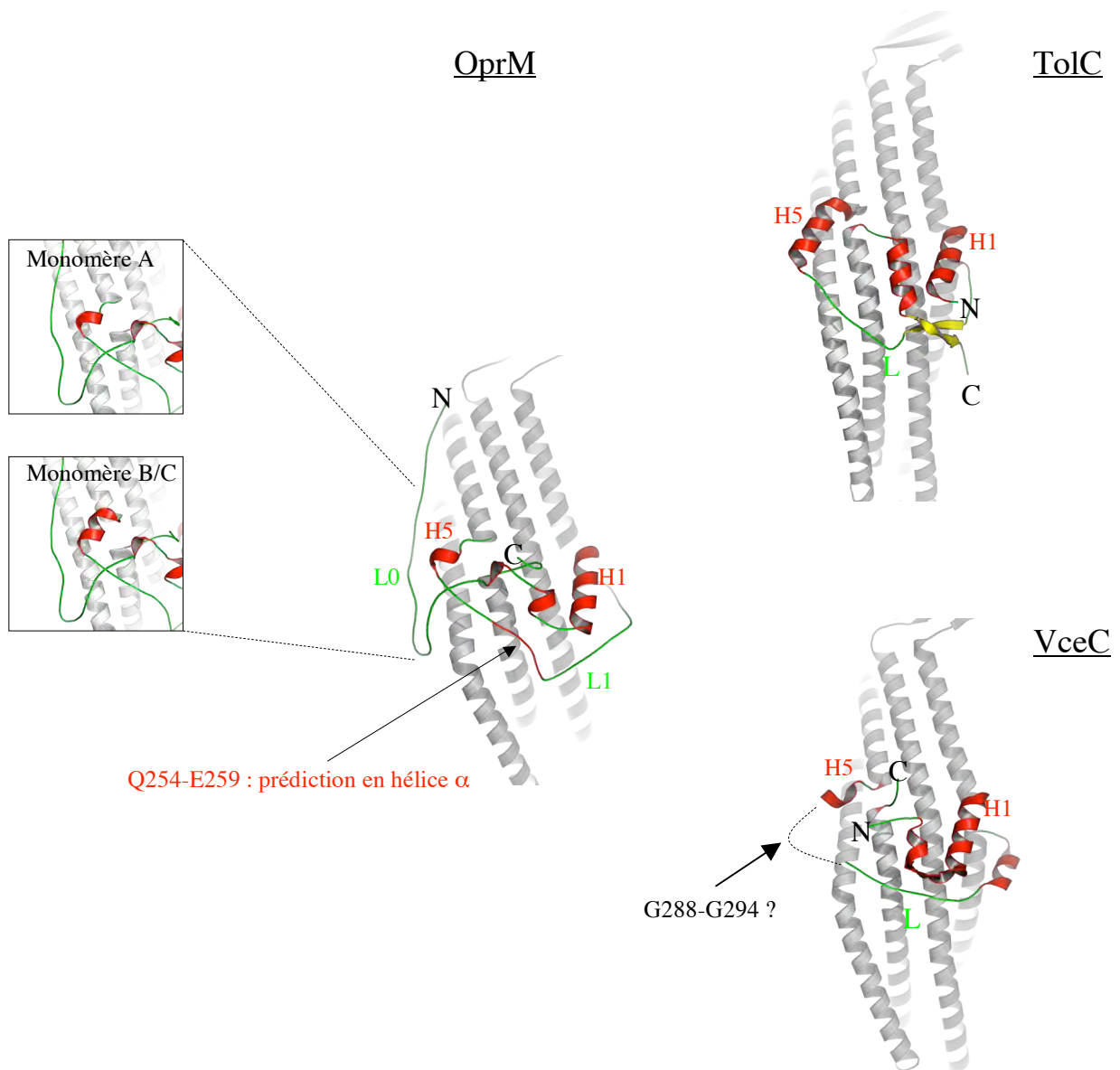


D) Domaine équatorial

Contrairement aux domaines α et β , le domaine équatorial n'apparaît pas comme la duplication d'un même motif structural. Dans le cas d'OprM, il est constitué de deux hélices 3_{10} , de deux grandes boucles (L0 et L1) et de deux hélices α (H1 et H5). Sa partie N-terminale se prolonge parallèlement à l'axe longitudinal de la porine et s'insère dans la membrane externe *via* la cystéine palmitylée (Figure 45). Les dix résidus C-terminaux qui ne sont pas visibles dans notre structure cristallographique d'OprM (V455-A468) se situent probablement dans le domaine équatorial.

Globalement, le domaine équatorial prend une allure singulière selon chaque porine, ce qui n'est pas étonnant puisqu'il s'agit d'une des régions les moins conservées. Cependant, les hélices H1/H5 et la grande boucle L1 semblent être des motifs redondants (Figure 53). Dans TolC, il a été montré qu'une partie de la boucle L1 (Asn188-Lys214) est essentielle pour le fonctionnement de la porine (Yamanaka *et al.*, 2007). Appuyé par des modèles d'assemblage entre TolC et AcrA, cette boucle semble être impliquée dans le recrutement et l'interaction de la porine avec l'adaptateur périplasmique (Fernandez-Recio *et al.*, 2004 ; Lobedanz *et al.*, 2007). Dans le cas d'OprM, notons qu'une partie de la boucle L1 est prédite en hélice α (Figure 53). Ce changement de structure secondaire pourrait se faire à l'issue de l'association d'OprM avec son partenaire périplasmique. Concernant VceC, une partie de la boucle L1 n'est pas visible dans la structure cristallographique (Gly288-Gly294) sans doute en relation à sa grande flexibilité. Dans OprM, cette flexibilité est illustrée par la fusion de l'hélice H5 sur le monomère A par rapport aux monomères B et C (Figure 53).

Figure 53 : Structure secondaire des domaines équatoriaux d'OprM, TolC et VceC. Les hélices et coudes α sont représentés en rouge, les boucles en vert et les brins β en jaune. Sur la base d'une prédiction de structure secondaire par alignement multiple (PredictProtein, Rost et al., 2004), les résidus Q254-E259 d'OprM présentent une forte propension à former une hélice α .



E) **Duplication d'un motif structural**

Comme le montre les topologies d'OprM ou de TolC, chaque monomère d'une OMP de la famille de TolC est une duplication d'un motif structural constitué de deux « épingles à cheveux » (*hair-pin*) α et β . Il y a donc deux motifs structuraux similaires qu'on nommera « motif Nter » et « motif Cter ». Le tableau suivant résume leur séquence, leur pourcentage d'identité et leur divergence structurale moyenne ($\langle RMSD \rangle$) au sein d'OprM, de TolC et de VceC :

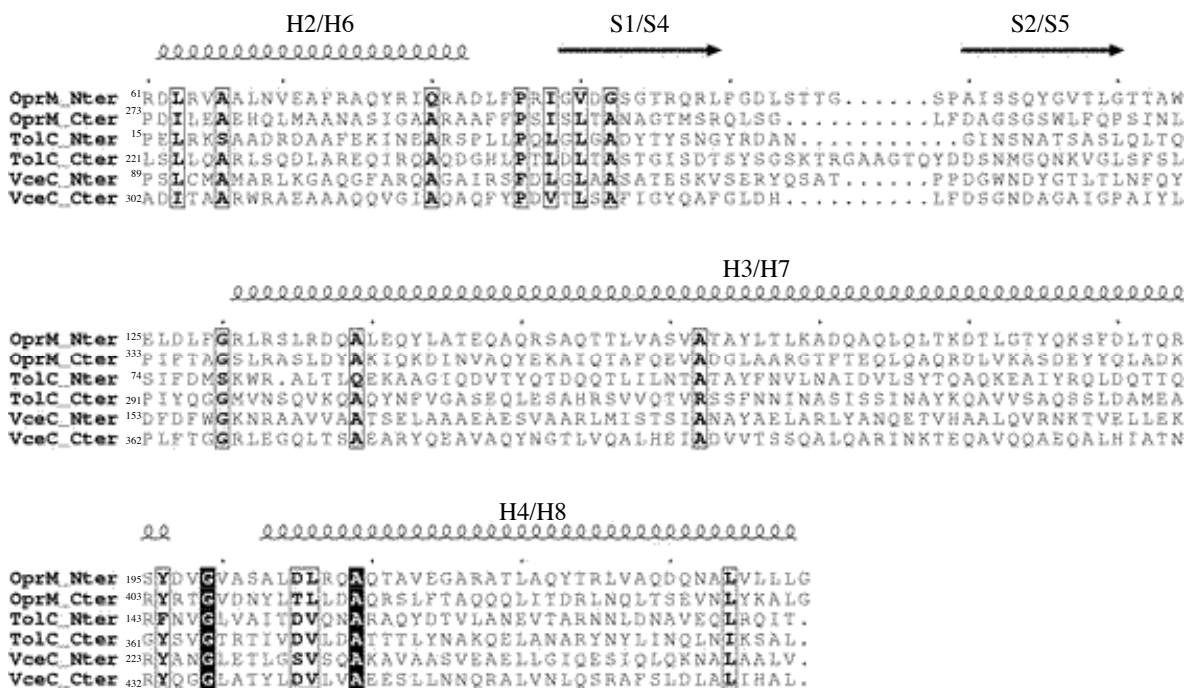
	Motif Nter	Motif Cter	Identité (%)	$\langle RMSD \rangle$ (Å)
OprM	R61-G239	P273-G447	22	3.3
TolC	P15-T186	L221-L404	16	5.5
VceC	P89-V266	A302-L475	13	13

De façon étonnante, l'alignement de séquence des motifs Nter et Cter n'est pas à l'image de leur analogie structurale illustrée par la superposition des motifs entre OprM, TolC et VceC qui divergent de 1 à 6 Å en moyenne (Figure 54).

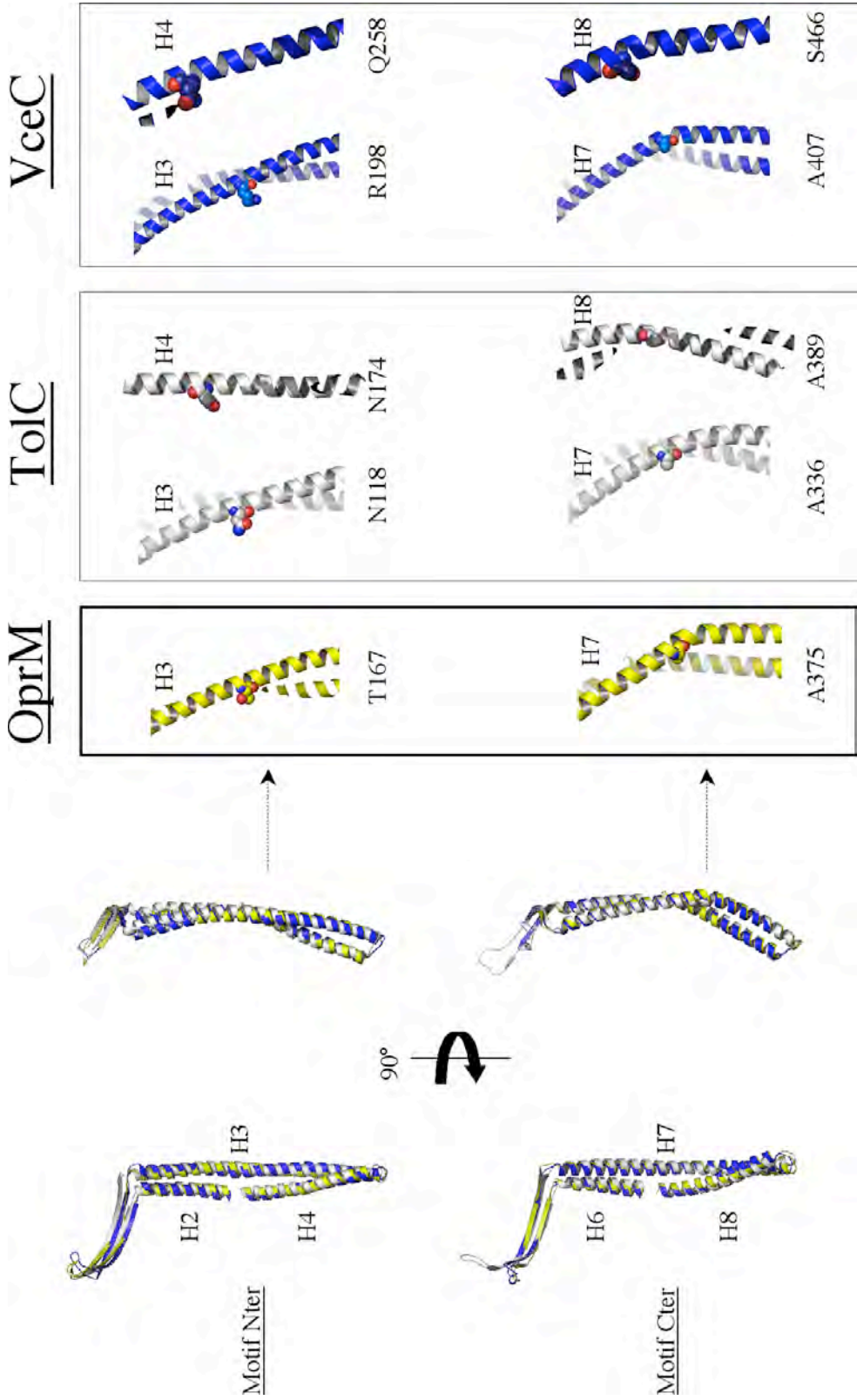
Cependant, on observe deux différences structurales entre les motifs Nter et Cter : d'une part au niveau des boucles β (celle du motif Cter de TolC étant la plus large), et d'autre part entre les hélices H3/H7 et H4/H8. Dans le cas d'OprM par exemple, l'hélice H7 présente un coude d'environ 120° au niveau du résidu A375, ce qui n'est pas le cas de l'hélice H3 dont le même site est occupé par le résidu T167 (Figure 54). De façon évidente, le coude de l'hélice H7 est possible avec un résidu présentant un faible encombrement stérique, comme l'alanine. Ce coude est probablement une charnière-clef dans le mécanisme d'ouverture, donc de la fonction de la porine. Un mutant de délétion de cette région dans OprM (mutant D3, $\Delta A375$ -T378, Wong *et al.*, 2001) présente une résistance fortement atténuée vis-à-vis de différents antibiotiques. On constate également un coude moins prononcé, d'environ 160° , au niveau de l'hélice H8, ce qui n'est pas le cas de son analogue H4. Mais cette observation ne s'applique qu'à TolC et VceC cette fois.

Figure 54 : Comparaison des motifs Nter et Cter d'OprM, TolC et VceC. (a) Alignement de séquence des motifs Nter et Cter des trois porines confondues. Les résidus identiques sont indiqués dans les cases noires et les résidus consensus sont encadrés. Les structures secondaires sont schématisées au-dessus des séquences. (b) Superposition structurale des motifs Nter et Cter. OprM est représentée en jaune, TolC en blanc et VceC en bleu. Un agrandissement permet d'observer les coudes des hélices H7 et H8. Les résidus impliqués dans la formation ou non des coudes α sont représentés en sphère. Notons que la porine OprM ne présente pas de coude sur son hélice H8.

a



b



F) Analyse des résidus conservés

Malgré une grande analogie structurale d'OprM avec ses homologues (TolC, code PDB 1EK9 ; VceC, code PDB 1YC9), l'identité de leur séquence primaire est plutôt faible (19% pour TolC et 23% pour VceC). Un alignement multiple d'OprM et des OMP de différentes espèces permet de mettre en évidence les résidus conservés au cours de l'évolution (Figure 56). Ces résidus jouent probablement un rôle clef dans la structure ou la fonction des OMP de la famille de TolC. La figure 55 montre une répartition préférentielle des résidus consensus, c'est-à-dire aux extrémités des hélices α et au niveau des connections entre le domaine α et le domaine β . Par ailleurs, la majorité des résidus conservés sont localisés sur le motif Cter qui serait alors la séquence ancestrale sur le plan de l'évolution.

Figure 55 : Vues latérales d'un monomère d'OprM. Les résidus représentés en sphères rouge et mauve correspondent respectivement aux résidus identiques et consensus, conservés au cours de l'évolution.

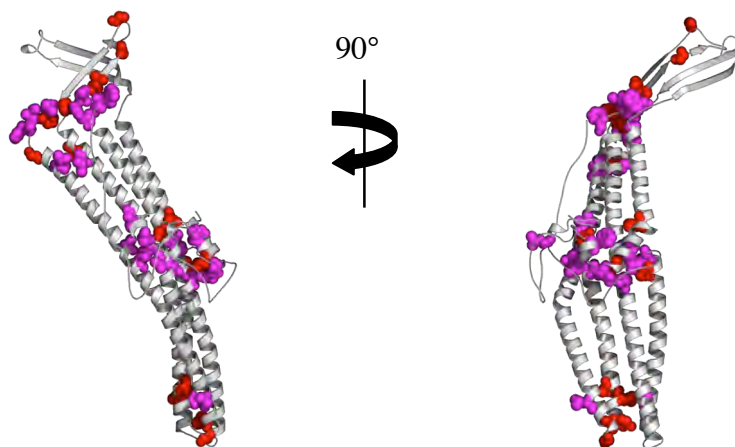
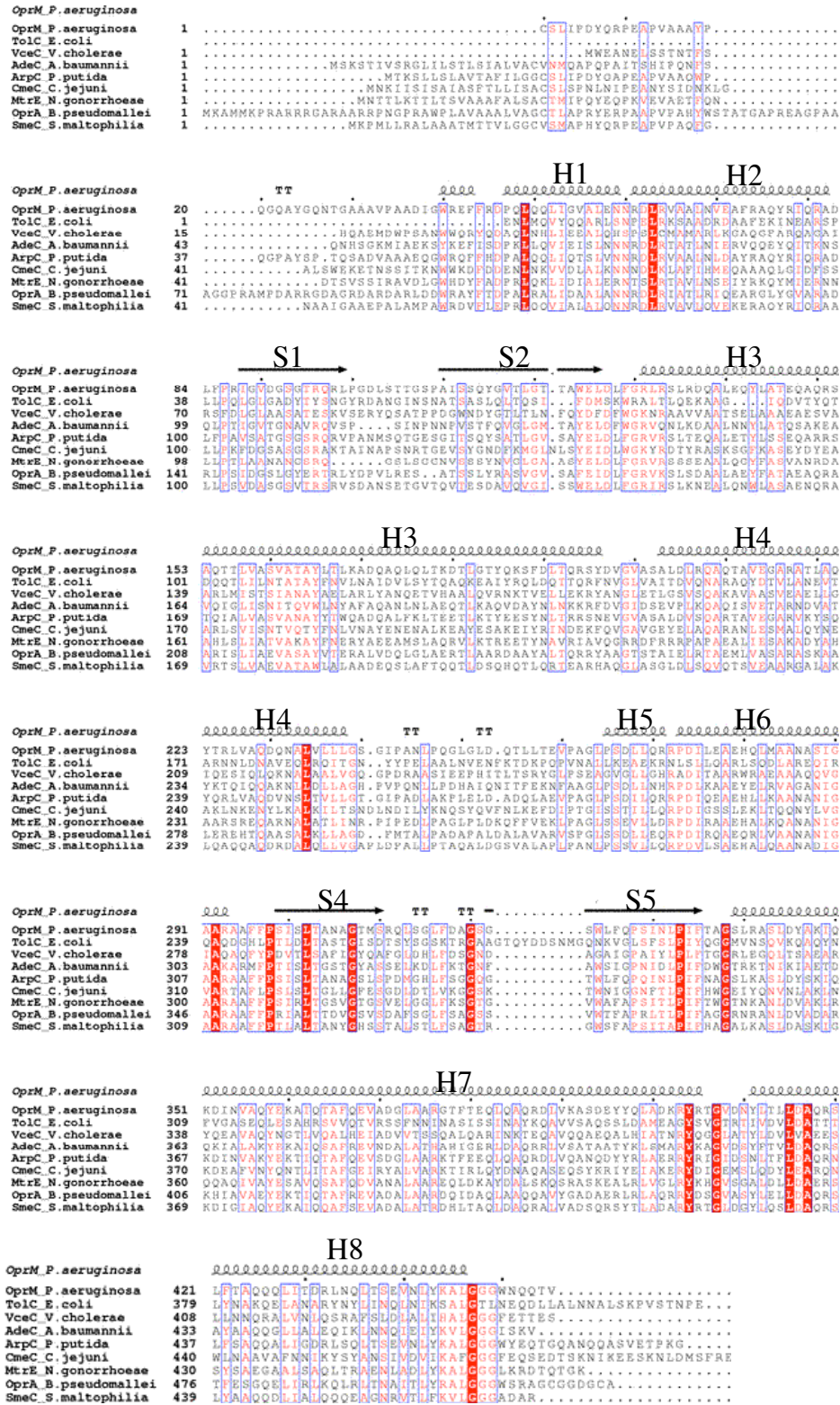


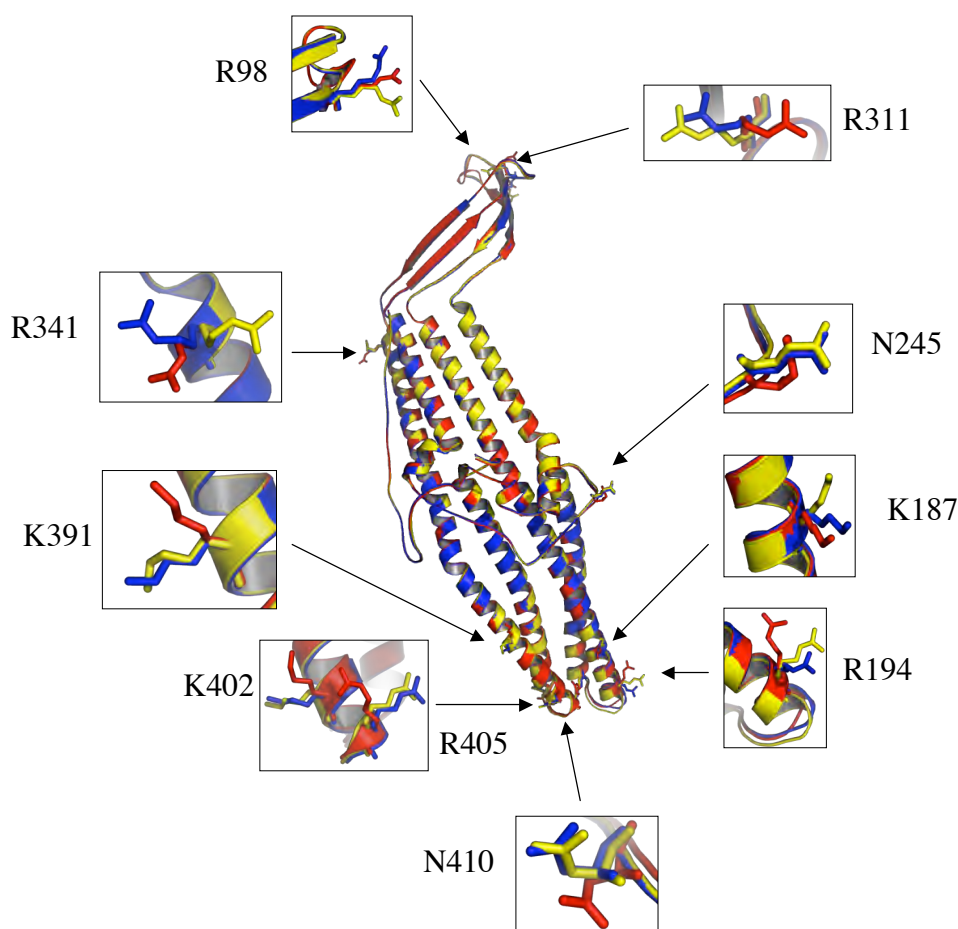
Figure 56 : Alignement des séquences primaires des OMP homologues à OprM. Les résidus conservés sont dans les cases rouges et les résidus consensus sont dans les encadrés bleus. La structure secondaire d'OprM est schématisée au-dessus sa séquence.



G) Comparaison des trois monomères

Nous avons résolu la structure cristallographique d'OprM dans un groupe d'espace sans symétrie d'ordre 3. Cela a permis de construire indépendamment les trois monomères de la protéine. La superposition des trois molécules montre très peu de différences (*figure 4*), les *RMSD* sont en moyenne de 0,32 Å pour les chaînes principales et 0,56 Å pour les chaînes latérales. Cependant, on observe ponctuellement des *rmsd* > 2,5 Å au niveau de la chaîne latérale de certains résidus chargés ou polaires : R98, K187, R194, N245, R311, R341, K391, K402, R405 et N410 (*Figure 57*). Ces asymétries intermoléculaires semblent spécifiques à OprM car elles ne sont pas observées sur les résidus correspondants de TolC.

Figure 57 : Superposition des trois monomères d'OprM (chaîne A en rouge, chaîne B en bleu et chaîne C en jaune). Les résidus dont le *rmsd* est supérieur à 2,5 Å sont indiqués.



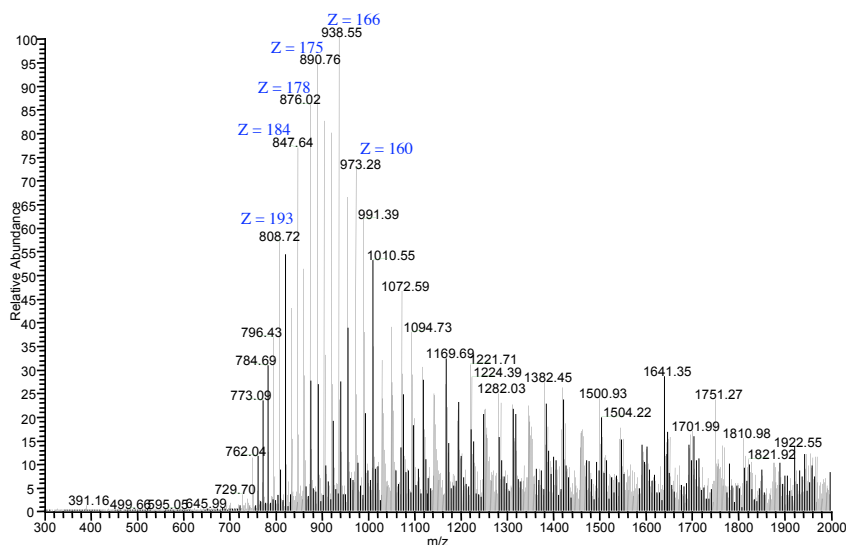
La plupart des différences siègent au niveau de l'extrémité inférieure de la porine qui doit probablement subir des changements conformationnels importants lors de l'ouverture. De plus, il a été montré que les mutations ponctuelles Q142R et I369F sur l'analogue TolC lui permettent d'interagir avec le transporteur MexB (Bokma *et al.*, 2006). Ces mutants correspondent respectivement aux résidus R194 et Y411 (proche de N410) d'OprM d'après l'alignement structural avec TolC (Figure 55). De la même façon, R405 d'OprM correspond à S363 de TolC qui est impliqué dans l'interaction avec l'adaptateur AcrA (Lobedanz *et al.*, 2007). Les différences de conformation observées entre les trois monomères pourraient ainsi indiquer des résidus clés, susceptibles d'interagir avec les partenaires protéiques.

H) Palmylation de la cystéine N-terminale

La protéine OprM mature est une lipoprotéine liée de façon covalente à un palmyl par estérification post-traductionnelle de la cystéine N-terminale. Le palmyl est un acide gras saturé de seize carbones qui joue un rôle physiologique important dans la sécrétion et la localisation transmembranaires d'OprM (Nakajima *et al.*, 2000; Pugsley, 1993). Cette modification post-traductionnelle ne s'applique pas à toutes les protéines de la famille OMF, en l'occurrence l'orthologue TolC chez *E. coli* n'est pas palmylée.

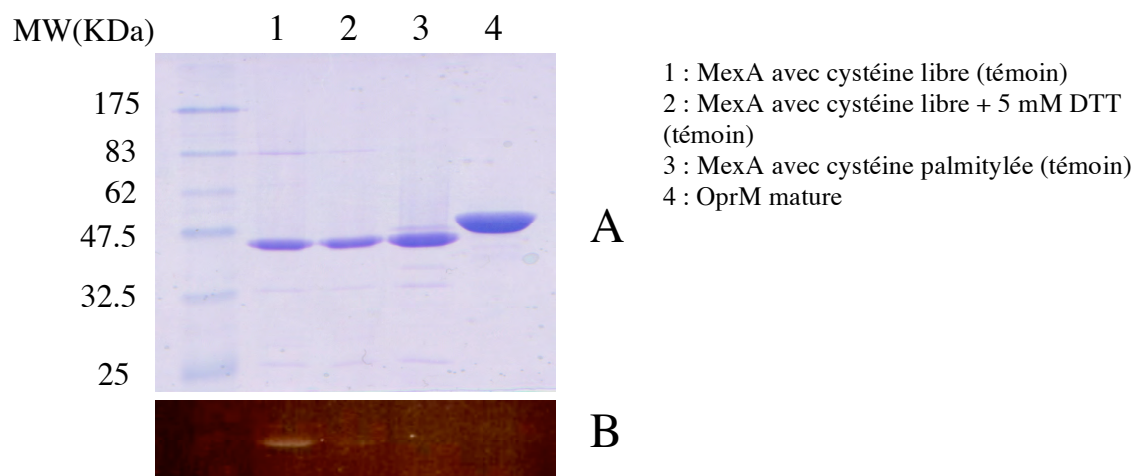
Les poids moléculaires théoriques du trimère d'OprM mature sont de 155 069,7 Da en absence de palmyl (3 x 51 689,9 Da) et 155 828,7 Da en présence de palmyl [3 x (51 689,9 + 255 – 2 car la palmylation implique le départ de deux hydrogènes)]. L'analyse du spectre de masse de la figure 58 est bien en accord avec la présence d'un palmyl sur chaque monomère d'OprM.

Figure 58 : Spectre de masse par électro-nébulisation d'OprM. Les pics observés correspondent à la masse théorique attendue pour le trimère d'OprM palmitylée (~155 828,7 Da).



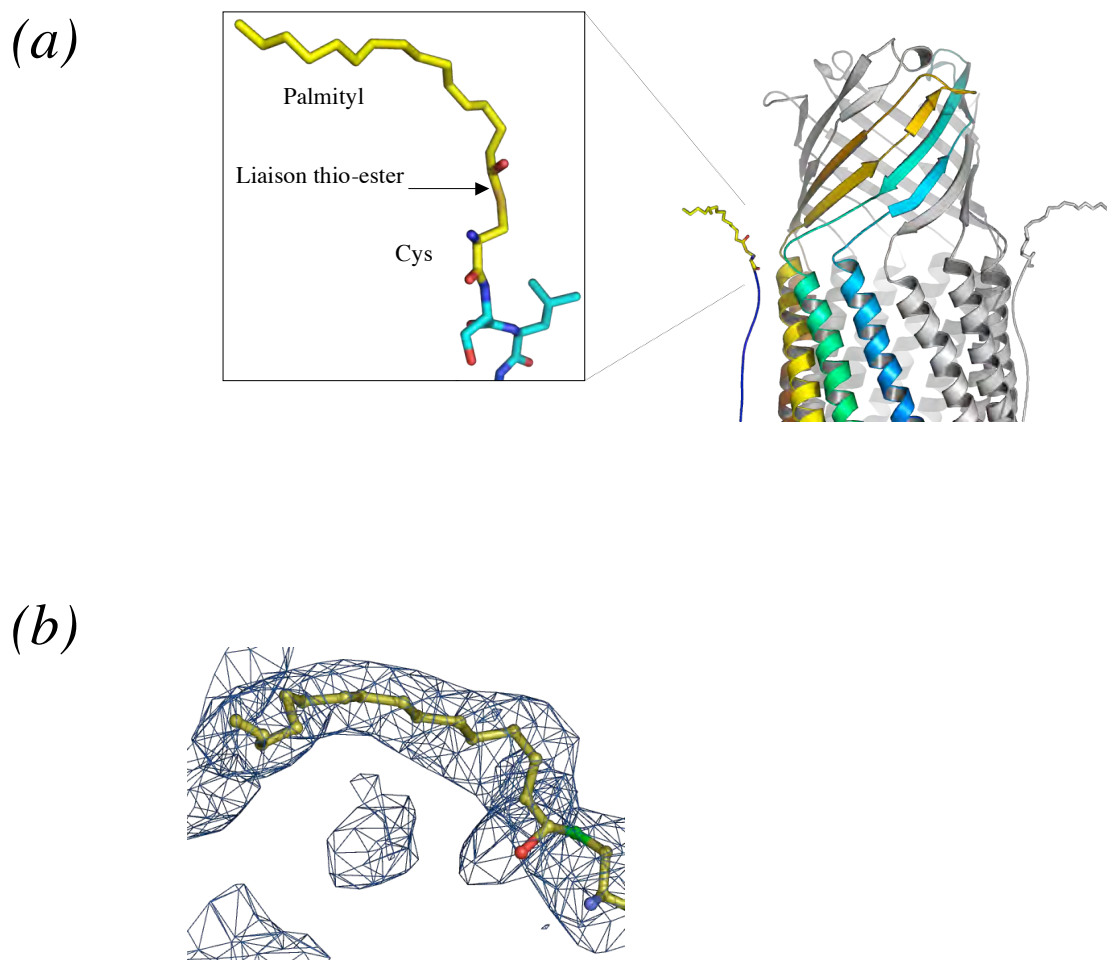
Il n'avait pas encore été montré si le palmitate se liait à la cystéine sur la fonction thiol ou la fonction amine. L'utilisation du marqueur fluorescent spécifique des thiols (MTS-EMCA) nous a permis de répondre à cette question (Figure 59) : l'absence de marquage d'OprM mature montre bien que la fonction thiol de la cystéine terminale est occupée par le palmityle (la cystéine terminale étant la seule fonction thiol de la protéine entière).

Figure 59 : SDS-PAGE des protéines après incubation avec le MTS-EMCA. La protéine MexA est utilisée comme témoin du marquage. (A) Coloration au bleu de coomassie. (B) Visualisation à 312 nm. Seules les protéines liées au MTS-EMCA sont révélées.



Ces résultats sont en accord avec la structure cristallographique C2 d'OprM qui montre la liaison thio-ester du palmytyl sur la cystéine (Figure 60). La chaîne hydro-carbonée entière de l'acide gras n'est pas visible dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ probablement à cause d'une trop grande agitation thermique. Malgré une faible résolution structurale, le palmytyl est stabilisé dans le groupe d'espace C2 et la densité électronique de toute la chaîne carbonée est visible. La figure 60 montre la structure du palmytyl au sein du cristal C2 ainsi que sa liaison au thiol de la cystéine.

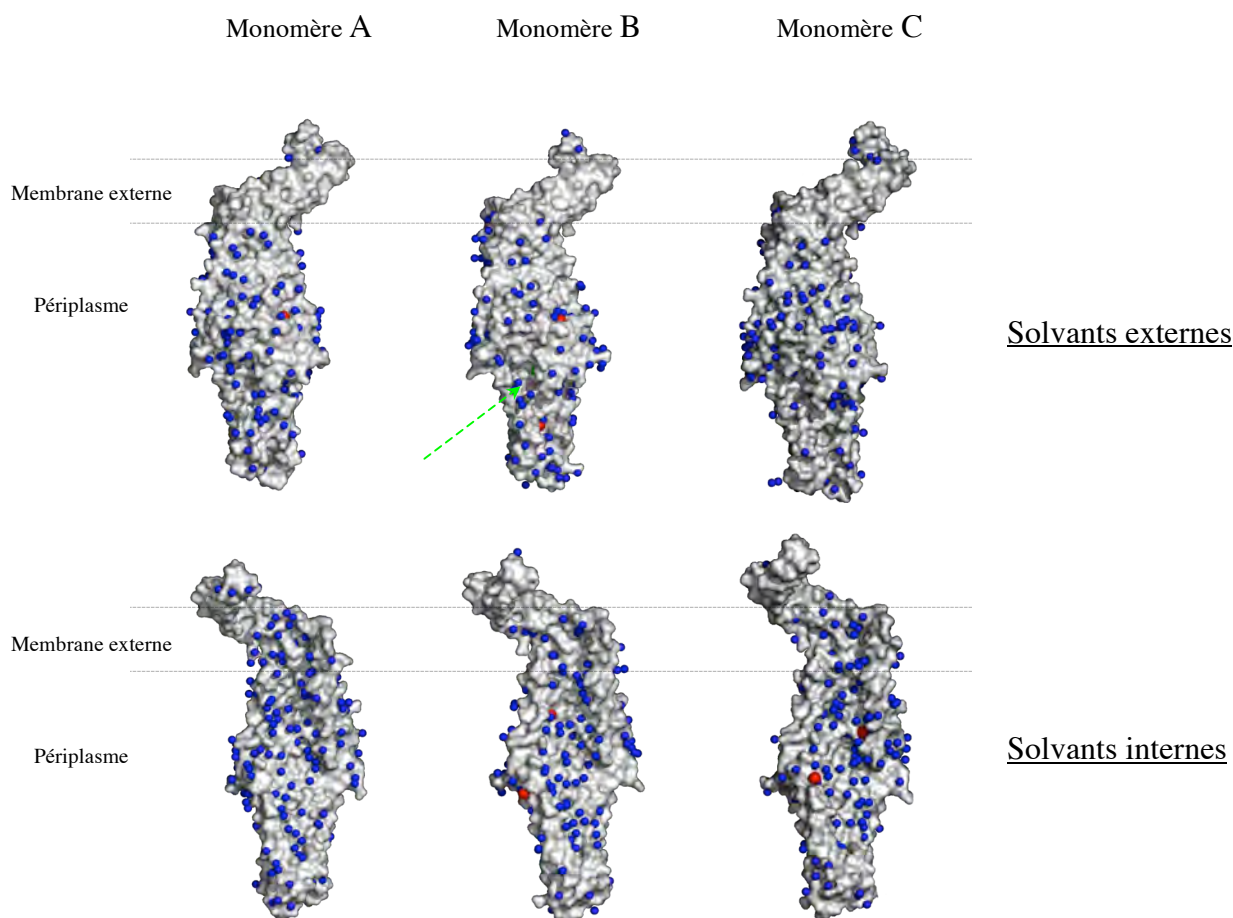
Figure 60 : (a) Structure de la partie haute d'OprM dans le groupe d'espace C2 et focalisation sur le palmytyl d'un monomère. (b) Structure du palmytyl sur le monomère A dans la densité électronique $2fo-fc$ à 1σ .



I) Description du solvant

Contrairement aux autres formes cristallines, la structure cristallographique d'OprM dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ a permis de placer 543 molécules d'eau, 9 ions sodium et 1 ion chlorure. Les molécules d'eau sont réparties sur toute la longueur de la protéine. Des chaînes de molécules d'eau tapissent la paroi interne de la porine de façon transversale. Malgré une grande similitude structurale des trois monomères d'OprM, l'organisation des molécules de solvant est tout à fait asymétrique (Figure 61). On remarquera l'absence attendue de molécule d'eau à l'extérieur de la protéine, au niveau de la partie transmembranaire.

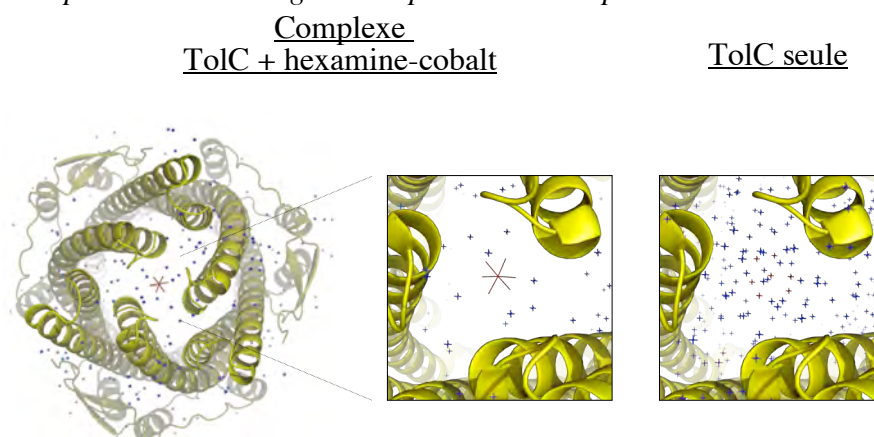
Figure 61 : Organisation du solvant dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$. Les surfaces des trois monomères séparés d'OprM sont représentées en vues extérieure et intérieure. Les molécules d'eau sont en bleues, les ions sodium sont en rouges et l'ion chlorure est en vert (sur le monomère B, au niveau de la flèche verte).



Généralement, la fonction de la porine se résume à une simple ouverture pour permettre le passage des molécules hydrophiles à travers la membrane cellulaire. Cependant, il a été montré que la spécificité de la pompe pour le substrat ne dépend pas exclusivement du transporteur RND, mais aussi de la porine (Chuanchen *et al.*, 2005). La répartition différente des molécules d'eau sur la paroi interne de chaque monomère d'OprM suggère donc une autre fonction qui serait l'acheminement des substrats à travers la porine. Comme nous l'avons vu précédemment, cette hypothèse est supportée par l'obtention de nouvelles conditions de cristallisation d'OprM en présence de différents antibiotiques, dont la tétracycline et le chloramphénicol qui font partie des antibiotiques exportés par les pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM (Li & Nikaido, 2004). Malheureusement, les premiers cristaux obtenus ne diffractent pas suffisamment et sont donc en cours d'amélioration. Il est également envisagé de vérifier la formation d'un complexe éventuel entre OprM et l'antibiotique par d'autres expériences, comme la microcalorimétrie.

La structure de TolC en complexe avec un ligand a déjà été publiée, il s'agit de l'hexamine-cobalt qui a pour effet de bloquer l'entrée de la porine (Higgins *et al.*, 2004). De façon étonnante, lorsqu'on superpose la structure du solvant de TolC seule (code PDB 1EK9) avec celle de TolC complexée (code PDB 1TQQ), on s'aperçoit que l'hexamine-cobalt occupe exactement la place de cinq molécules d'eau (Figure 62). *A posteriori*, les molécules d'eau pourraient être l'empreinte des sites d'interaction éventuels des groupements polaires des ligands avec la protéine, en l'occurrence des antibiotiques avec la porine.

Figure 62 : Vue transversale de l'extrémité inférieure de TolC en complexe avec une hexamine-cobalt représentée en rouge (code PDB 1TQQ, Higgins *et al.*, 2004). Les molécules d'eau sont représentées en bleu. Un agrandissement permet de comparer TolC en présence et en absence (code PDB : 1EK9) de l'hexamine-cobalt. Dans le cas de TolC seule, les molécules d'eau représentées en rouge correspondent à l'emplacement de l'hexamine-cobalt.



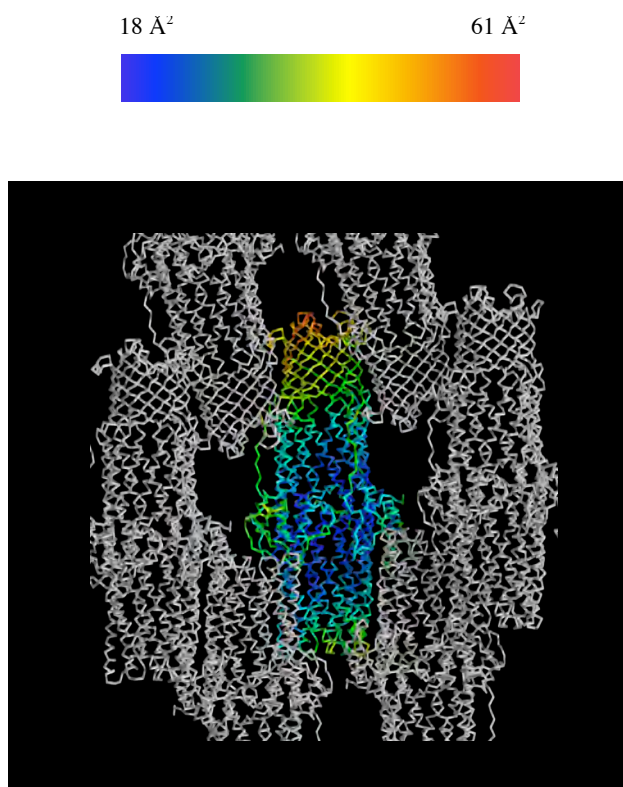
La solvation de TolC apparaît également dans sa structure cristallographique, mais dans notre structure nous n'observons que les molécules de solvant de la première couche d'hydratation qui seraient les molécules d'eau les plus pertinentes dans le cadre d'une interaction éventuelle avec la protéine (Nakasako, 2004). Avec les molécules d'eau, des études par dynamique moléculaire sont envisagées pour modéliser l'interaction et le parcours de différents antibiotiques à travers OprM.

J) Les facteurs de température

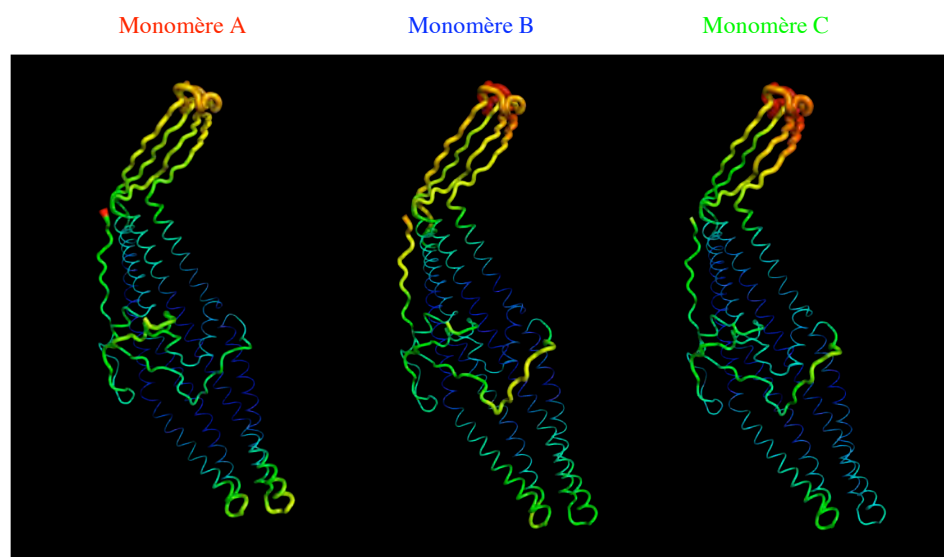
Le facteur de température moyen, c'est-à-dire l'agitation thermique des atomes moyennée sur la protéine entière, de la structure publiée précédemment dans le groupe d'espace $R32$ est de $82,1 \text{ \AA}^2$ (Akama *et al.*, 2004), ce qui est paradoxalement élevé pour une protéine résolue à $2,54 \text{ \AA}$ de résolution. Dans le cas de notre structure résolue dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$, le facteur de température moyen est plus vraisemblable, c'est-à-dire $31,6 \text{ \AA}^2$. Un facteur de température trop grand pourrait être la conséquence d'une mauvaise définition du groupe d'espace lors de l'intégration des données. Dans notre structure, l'agitation thermique est répartie de façon similaire entre les trois monomères (Figure 63). La région la plus stable de la porine correspond au domaine α . Le domaine le plus agité est le domaine β transmembranaire dont les facteurs de température peuvent atteindre $\sim 60 \text{ \AA}^2$. Les zones agitées sont également localisées au niveau des boucles de la bouée, de l'extrémité supérieure et de l'extrémité inférieure de la porine. Cette répartition de l'agitation thermique semble être en accord avec les régions de la porine susceptibles de subir des changements conformationnels importants lors de son ouverture (au niveau de l'entrée et de la sortie) ou lors de son interaction avec ses partenaires, c'est-à-dire la protéine périplasmique qui peut interagir avec les boucles du domaine équatorial (Gerken & Misra, 2004), et la pompe de la membrane interne qui interagit avec l'extrémité inférieure de la porine (Bokma *et al.*, 2006).

Figure 63 : Répartition des facteurs de température sur la structure d'OprM en C α , résolue dans le groupe d'espace P2₁2₁2₁. (a) Empilement cristallin et code couleur utilisé pour représenter les facteurs de température. (b) Représentation des trois monomères séparés. (c) Graphe de la variation des facteurs de température en fonction des résidus.

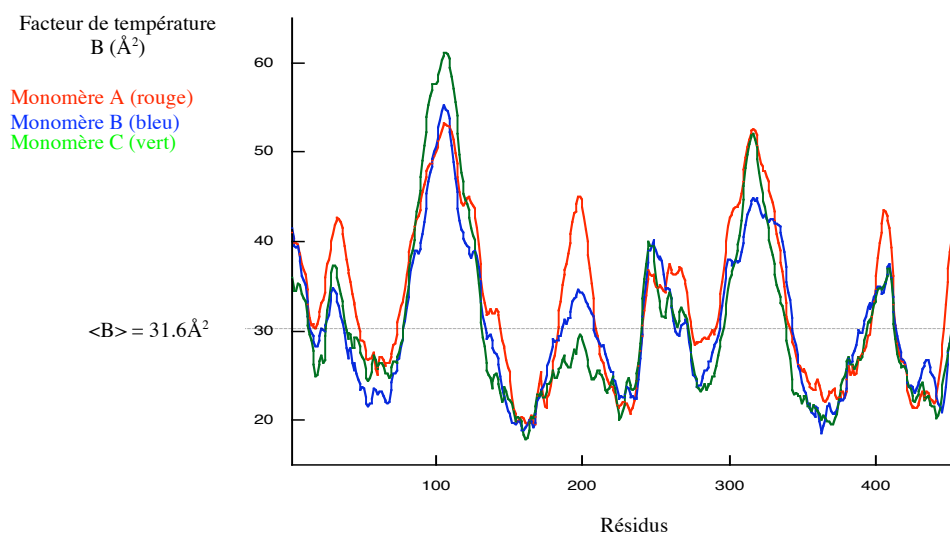
a



b

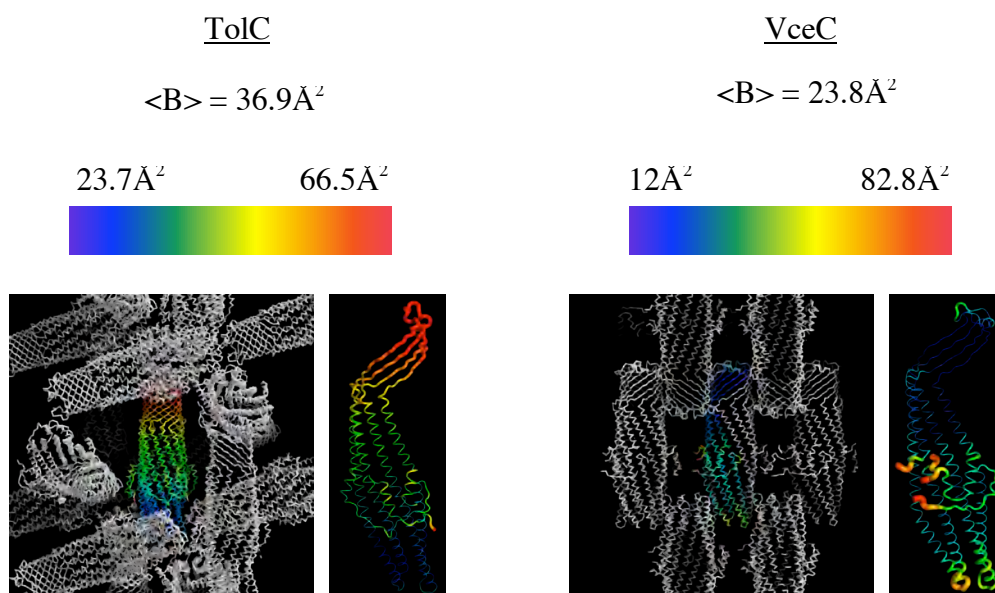


c



La répartition des facteurs d'agitation thermique sur les structures de TolC et de VceC est différente de notre structure d'OprM (Figure 64). On constate que l'extrémité inférieure de TolC correspond à la région la plus stable contrairement à VceC où le domaine β est la structure la moins agitée. Ces répartitions du facteur de température ne concordent pas vers un mécanisme d'ouverture commun avec OprM. Cependant, il est probable que ces résultats soient biaisés par des empilements cristallins qui tendent à stabiliser les parties de la protéine qui ne le sont pas dans l'environnement biologique.

Figure 64 : Répartition des facteurs de température sur les structures en C α de TolC (code PDB 1EK9) et VceC (code PDB 1YC9).



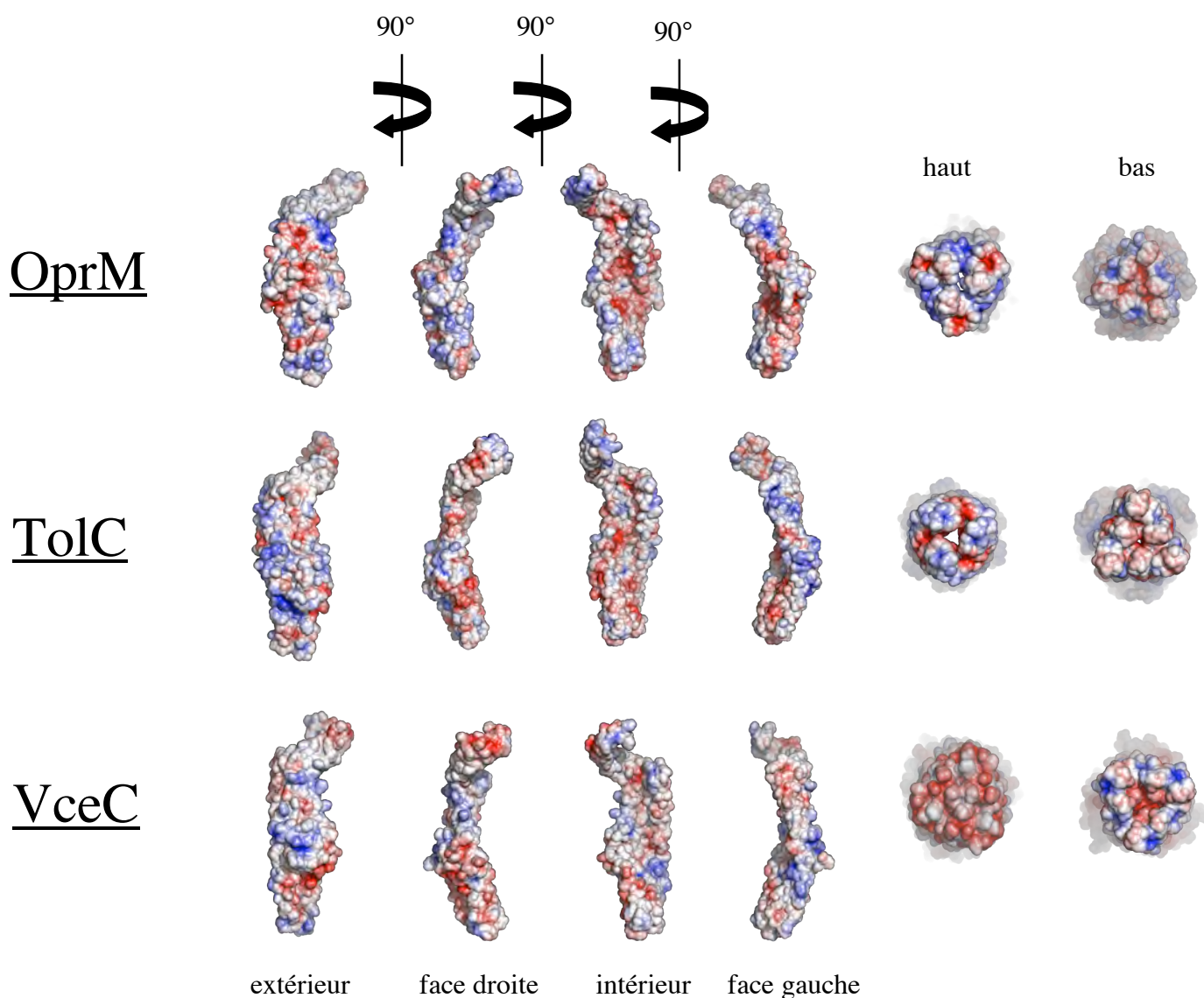
K) Analyse de la surface électrostatique

OprM présente un pH_i calculé de 5. La surface électrostatique accessible au solvant, calculée avec le programme APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*, Baker *et al.*, 2001), montre une répartition majoritairement acide à l'intérieur du canal et une répartition bipolaire à l'extérieur. (Figure 65). L'intérieur exclusivement acide d'OprM n'est pas compatible avec le passage d'un large éventail de molécules de nature chimique et de charge variées. Cependant, la répartition électrostatique est aussi tributaire de la forme globale de la porine qui doit probablement changer de façon significative lors de son ouverture. Cette acidité interne est également observée avec les homologues TolC et VceC (Figure 65) qui présentent respectivement des pH_i calculés de 5,2 et 4,7. On peut alors se demander si cette acidité interne remarquable des OMP ne pourrait pas contribuer au gradient de protons nécessaire au fonctionnement de la pompe proto-motrice à laquelle elles sont associées.

La surface externe transmembranaire du tonneau β ne présente logiquement pas de charge. Par contre, elle est délimitée par des résidus basiques qui interagissent probablement avec les charges négatives des phospholipides de la membrane externe. L'interface des monomères est complémentaire du point de vue des charges puisque OprM présente une « face droite » basique et une « face gauche » acide.

Ces observations s'appliquent aussi aux homologues TolC et VceC, à la différence que les charges sont inversées entre les faces droite et gauche. Ces interactions électrostatiques intermoléculaires contribuent probablement à la grande stabilité du trimère observés *in vitro*. La représentation des extrémités inférieure et supérieure des porines témoigne de leur état fermé. Notons que la surface supérieure de VceC est remarquablement acide.

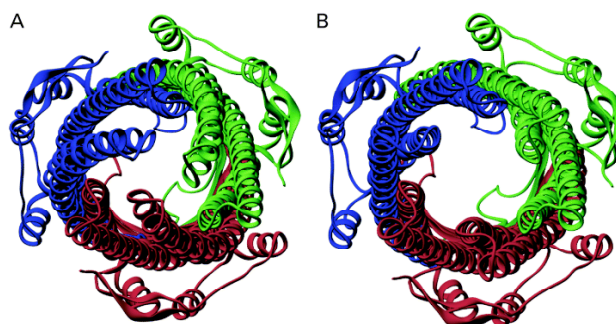
Figure 65 : Différentes vues de la surface électrostatique accessible au solvant d'OprM et de ses homologues TolC (code PDB : 1EK9) et VceC (code PDB : 1YC9). Les charges négatives sont en rouges et les charges positives en bleues. Les représentations latérales sont faites avec les monomères. Les représentations transversales supérieures et inférieures sont faites avec les trimères. La surface de charge accessible au solvant est modélisée avec le programme APBS, en présence de 170 mM NaCl.



4) MODELE D'OUVERTURE DES PORINES PAR LES MODES NORMAUX

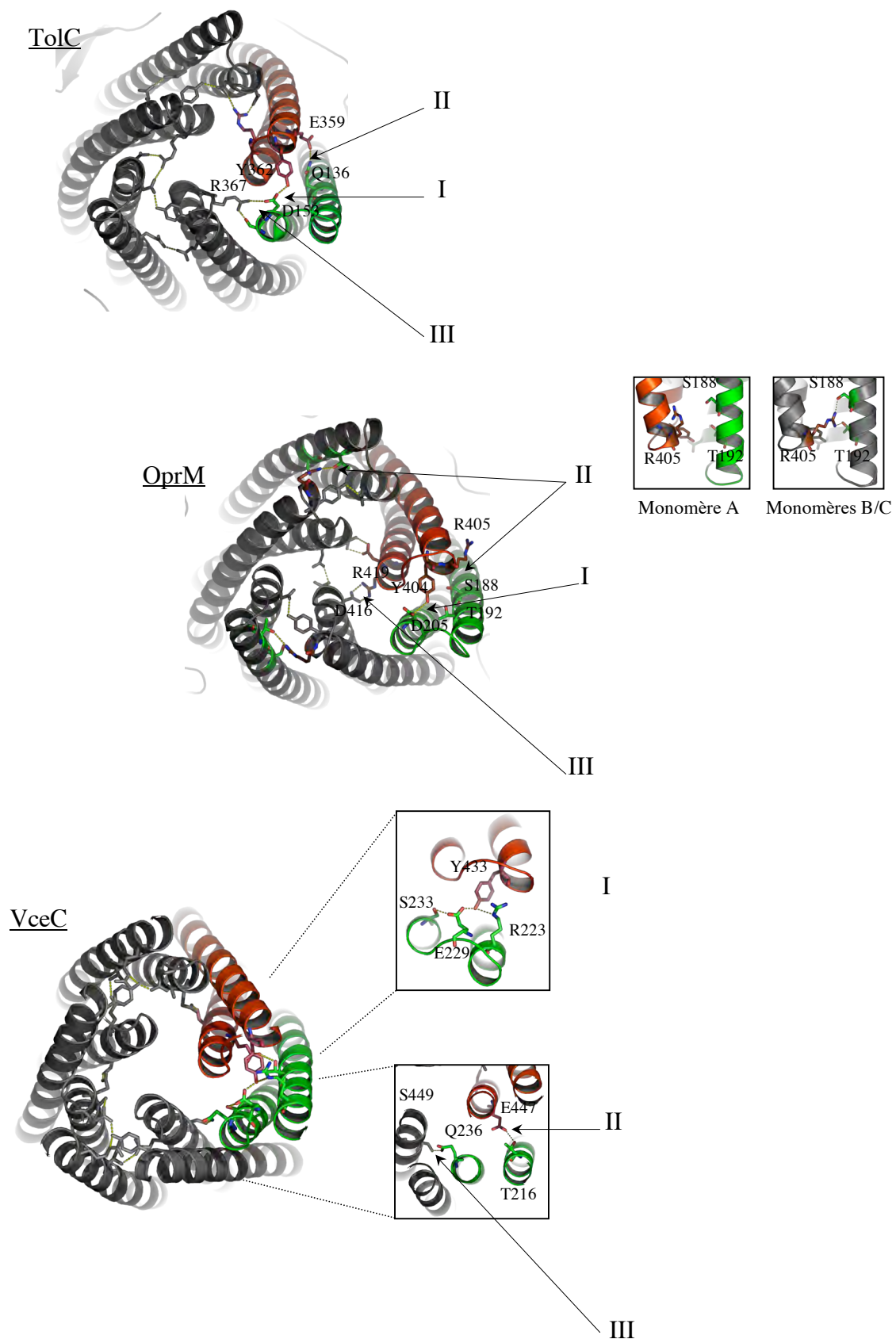
À l'instar des structures cristallographiques des porines homologues TolC (Koronakis *et al.*, 2000) et VceC (Federici *et al.*, 2005), la structure d'OprM a été résolue dans son état fermé. Ce résultat n'est pas surprenant car la reconstitution d'OprM seule dans des bicouches lipidiques planes présente une conductance six fois plus faible que celle de la porine modèle OmpC d'*E. coli* (Wong *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été observés pour TolC (Andersen *et al.*, 2002). Un modèle d'ouverture a été proposé par simple alignement structural du *coiled-coil* externe avec le *coiled-coil* interne, formés respectivement par les hélices H3/H4 et H7/H8 (Figure 66). Il s'agirait d'un processus d'ouverture allostérique comparable à un diaphragme photographique, qui serait induit par l'interaction de la porine avec ses partenaires. Au vu des similitudes structurales entre TolC, OprM et VceC, il est tout à fait envisageable que leur mécanisme d'ouverture soit identique.

Figure 66 : Modèle d'ouverture proposé pour l'extrémité inférieure de TolC en vue transversale (Sharff *et al.*, 2001). Chaque protomère est distingué par une couleur différente. (A) Etat fermé observé dans la structure cristallographique. (B) Etat ouvert modélisé par superposition du *coiled-coil* interne sur le *coiled-coil* externe.



Des expériences d'électrophysiologie et de mutagenèses dirigées ont d'ailleurs conforté ce mécanisme d'ouverture par torsion dans TolC en mettant en évidence les connexions inter et intramoléculaires impliquées dans le maintien des hélices à l'état fermé (Andersen *et al.*, 2002 ; Eswaran *et al.*, 2003). Par analogie structurale, trois connexions clés qui doivent probablement être rompues lors de l'ouverture de TolC sont retrouvées dans OprM et VceC, mais avec des configurations différentes (Figure 67).

Figure 67 : Connexions inter-hélicales impliquées dans l'état fermé de l'extrémité périplasmique des porines TolC, OprM et VceC.



Ces connexions sont résumées dans le tableau suivant :

	Connexion I	Connexion II	Connexion III
TolC (Andersen et al., 2002)	D153-Y362	Q136-E359	D153-R367
OprM	D205-Y404	R405-S188/T192	D416-R419
VceC	Y433-R223/E229	T216-E447	Q236-S449

Dans TolC, il a été montré que les connexions I et III sont les interactions principales qui maintiennent la constriction inter-hélicale de l'extrémité inférieure dans l'état fermé. Leur rupture par mutagenèse dirigée provoque un relâchement des hélices qui tendent à s'ouvrir plus facilement, et ceci de façon significative (les conductances mesurées à l'issue des mutations sont 2,2 à 2,5 fois plus élevées par rapport à la porine sauvage, [Andersen et al., 2002](#)). La connexion I implique une tyrosine très conservée au sein des OMP de la famille de TolC. Il s'agit de Y362 dans TolC, Y404 dans OprM et Y433 dans VceC. La connexion II correspond à l'interaction la plus excentrée. Elle semble accessoire dans la constriction des hélices de TolC, ce qui est conforté par notre structure d'OprM. En effet, la connexion II est présente dans les protomères B et C, et non dans le protomère A (Figure 67). Enfin, la connexion III correspond à un pont salin intermoléculaire, sauf dans le cas de VceC où une liaison hydrogène est en jeu.

Il est probable que des transitions conformationnelles importantes ont lieu au niveau du domaine α lors de l'ouverture de l'OMP. Cependant, rien n'a été décrit pour l'extrémité supérieure, c'est-à-dire le domaine β , qui nécessite également une ouverture pour le passage des différentes molécules. Le haut du tonneau β de TolC ne laisse entrevoir qu'un diamètre moyen de 6 Å, alors qu'il est presque fermé (diamètre moyen 2 Å) dans le cas d'OprM et de VceC (Figure 47).

Nous avons choisi d'étudier de façon dynamique le mécanisme d'ouverture possible d'OprM et de TolC à travers l'analyse des modes normaux. Cette technique de modélisation moléculaire, dite de dynamique vibrationnelle, repose sur l'approximation harmonique de l'énergie potentielle de la protéine où chaque C α est connecté par des oscillateurs harmoniques.

La protéine est donc simplifiée par un système vibrationnel qui va pouvoir osciller autour de sa position d'équilibre. En fonction de la structure étudiée, les couplages interatomiques mettent en évidence différents mouvements collectifs qui sont associés à différentes fréquences : ce sont les modes normaux. Le mouvement global de la protéine est la résultante des différents modes (Tama, 2003), mais sur la base de nombreux exemples de structures issues de la PDB dont on connaît différentes conformations, il a été montré que quelques modes suffisent à expliquer le mouvement global de la protéine. Généralement un ou deux modes dans les basses fréquences ont une pertinence biologique, c'est-à-dire les mouvements qui présentent une grande amplitude (Krebs *et al.*, 2002 ; Tama & Sanejouand, 2001).

Certes, il s'agit d'une modélisation simplifiée où la protéine est réduite à son squelette polypeptidique et l'énergie potentielle à celle d'un système harmonique. Mais étant donné la taille de notre protéine (155 kDa en moyenne), la dynamique vibrationnelle est actuellement la seule approche par modélisation moléculaire qui permette d'obtenir rapidement des résultats significatifs. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas des protéines membranaires puisqu'elles font intervenir une membrane lipidique qui doit être modélisée en plus. Par ailleurs, le mécanisme d'ouverture que nous cherchons à décrire correspond à un mouvement collectif donc « lent », ce qui est adapté à l'approche par les modes normaux.

Enfin, l'analyse des modes normaux a été récemment appliquée avec succès sur des canaux ou des transporteurs membranaires, en l'occurrence le canal mécanosensible MscL (Valadié *et al.*, 2003), le récepteur nicotinique à l'acétylcholine nAChR (Taly *et al.*, 2005 ; Taly *et al.*, 2006), le transporteur Ca^{2+} -ATPase SERCA1a (Reuter *et al.*, 2003) ou encore le transporteur de fer FecA (Sen *et al.*, 2008).

Bien sûr, nous n'avons pas la possibilité d'analyser le mécanisme d'ouverture de l'OMP à l'échelle atomique. Mais les modes normaux vont nous permettre de proposer un modèle d'ouverture en caractérisant les déplacements atomiques en terme de directions et de mouvements associés à des fréquences et des amplitudes.

La problématique de cette approche est de savoir quels sont les mouvements les plus pertinents parmi les nombreux modes générés. Dans notre cas, la sélection des modes pertinents repose sur deux postulats de départ :

- Au niveau des hélices α , l'ouverture de la porine doit être comparable à un diaphragme photographique ;
- La transition conformationnelle de l'état fermé vers l'état ouvert utilise une symétrie d'ordre 3, de façon à conserver la symétrie biologique de la porine.

A) **Calculs des modes normaux**

Les modes normaux ont été générés selon le modèle du réseau élastique de Tirion (1996), simplifié par Hinsen (1998) où seul les C α sont pris en compte dans la dynamique. Cette simplification permet de réduire considérablement le temps de calcul, ce qui constitue une des forces de cette approche. De plus, malgré l'approximation, la description de la flexibilité des protéines dans ce modèle s'avère pertinente (Bahar & Rader, 2005).

Les modes normaux ont été analysés sur notre structure cristallographique d'OprM et celle de TolC (code PDB 1EK9) qui sont les seules structures où chaque protomère a été construit individuellement. De plus VceC présente une structure très proche d'OprM (rmsd $\sim 1,7$ Å), ce qui implique un comportement similaire en analyse des modes normaux.

Le calcul des modes normaux génère des mouvements dans l'ordre des fréquences croissantes. Les 106 premiers modes, qui correspondent donc aux modes de plus basses fréquences, ont donc été calculés pour OprM et TolC. Cela nous a permis d'analyser 100 mouvements différents, les six premiers modes n'ayant pas d'intérêt car ils correspondent aux mouvements globaux de la protéine en « corps-rigide ». Initialement, les paramètres d'entrée pour le calcul des modes normaux ont été choisis de façon arbitraire, c'est-à-dire avec les valeurs habituellement appliquées pour les protéines.

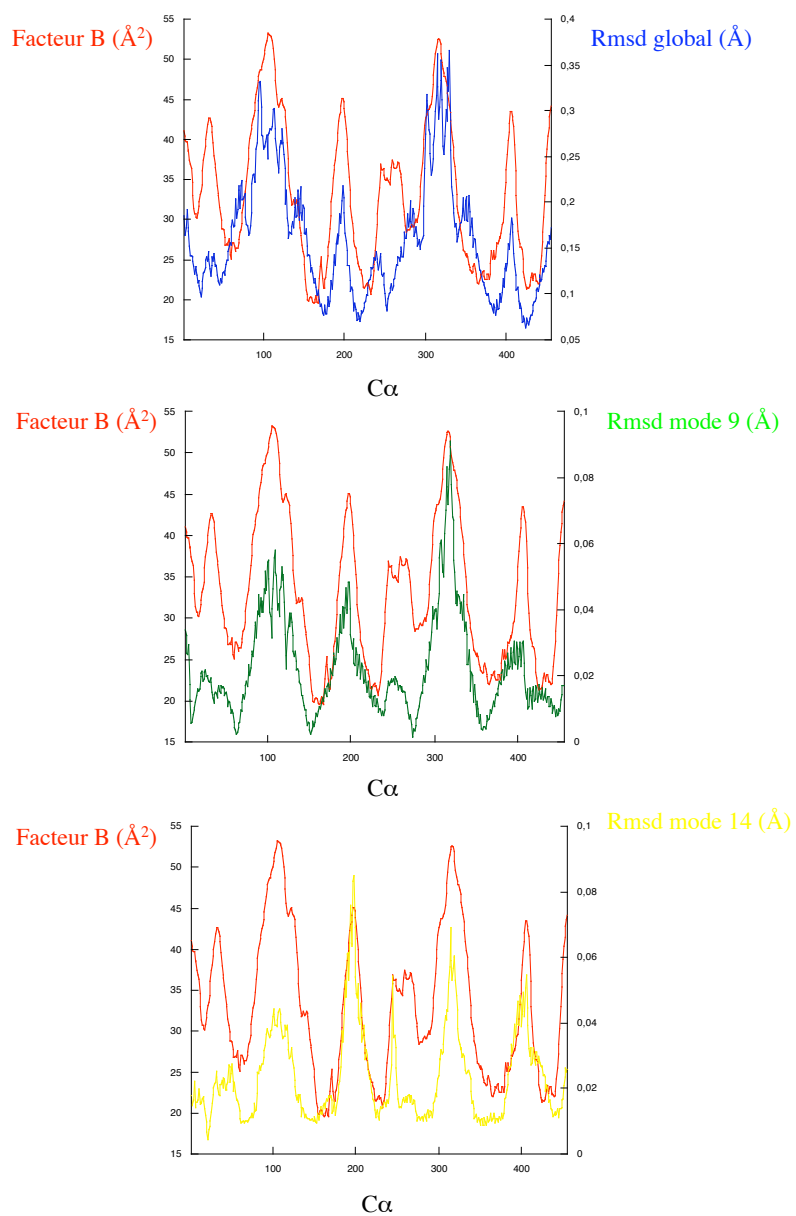
Nous avons choisi un rmsd moyen pour les déplacements finaux de 5 Å afin d'optimiser l'amplitude des mouvements tout en ayant des déformations réalistes. Le paramètre de pondération des distances (proportionnel à la constante de force C) et le *cutoff* Rc sont respectivement de 5 Å et 8 Å. Nous avons utilisé ces valeurs par défaut car elles permettent généralement de définir correctement la fluctuation des protéines autour de leur position d'équilibre.

À l'issue des calculs, les fréquences associées aux modes vont de 10,3 à 52,8 cm^{-1} pour OprM et de 9,7 à 55,9 cm^{-1} pour TolC. Ces valeurs dépendent des paramètres de *cutoff* Rc et de constante de force C qui sont généralement calibrés en confrontant la fluctuation globale des déplacements calculés (*rmsd* global) avec la variation des facteurs de température B de la structure cristallographique (Bahar *et al.*, 1997). Cependant, quelle que soit la valeur des paramètres Rc et C , les fluctuations globales restent les mêmes. Seule la gamme des fréquences calculées change. Dans notre cas, nous avons donc choisi de garder les paramètres fixés arbitrairement puisque nous ne cherchons qu'une description qualitative de l'ouverture de la porine. Dans la suite, chaque mode de vibration sera donc référencé par son numéro de mode (qui correspond à l'ordre de sortie des modes) et non par sa fréquence propre.

Dans le cas d'OprM, on constate que le champ de force est correctement défini car les fluctuations correspondent aux régions les plus agitées de la structure cristallographique (Figure 68). Le même champ de force est utilisé pour TolC.

Cependant, nous remarquons qu'une région relativement agitée de la protéine présente peu de déplacements selon les modes normaux. La région en question est la boucle L1 du domaine équatorial (G239-L264). Il est possible que la flexibilité de la boucle L1 n'apparaisse que dans les modes de plus hautes fréquences que nous n'avons pas explorés.

Figure 68 : Superpositions des facteurs de température B et des rmsd correspondant aux trois modes normaux d'intérêt.



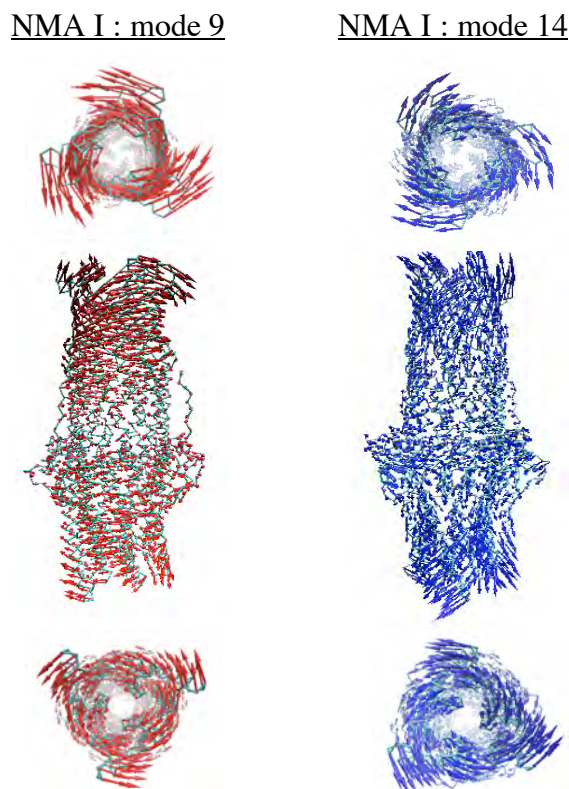
B) Description des modes pertinents impliqués dans l'ouverture d'OprM

Parmi les 100 modes observés lors d'une première analyse (NMA I), deux modes sont sélectionnés car ils vont dans le sens de nos postulats de départ, c'est-à-dire une ouverture symétrique de la porine comparable à un mécanisme de diaphragme photographique (Figure 69). Il s'agit des modes 9 et 14. Ce choix est conforté par la fluctuation des déplacements associés à ces modes (rmsd) qui suivent globalement la même distribution que les facteurs d'agitation thermique de notre structure cristallographique d'OprM (Figure 68).

Le mode 9 correspond à un mouvement de torsion de part et d'autre du domaine équatorial. Les *coiled-coils* internes et externes se déplacent avec la même amplitude. On observe également une ouverture du haut de la porine grâce à l'écartement des coudes β reliant les brins S1 et S2. Cette ouverture laisse entrevoir un diamètre d'environ 10 Å.

Le mode 14 décrit aussi un mouvement de torsion de part et d'autre du domaine équatorial, mais il s'accompagne cette fois d'un mouvement d'extension. L'ouverture du bas de la porine est identique au mode 9, avec une amplitude plus importante pour le *coiled-coil* externe. Par contre, le tonneau β ne s'ouvre pas.

Figure 69 : Représentation des vecteurs de déplacement correspondant aux modes 9 et 14 d'OprM. Les directions sont indiquées par les flèches et l'amplitude de chaque direction est proportionnelle à la taille du vecteur.



Bien que ces premières analyses des modes normaux permettent d'expliquer l'ouverture du haut de la porine, l'ouverture du bas reste insuffisante pour laisser passer les substrats. Nous avons décidé d'ajouter les déplacements des modes 9 et 14 afin d'obtenir un état d'ouverture intermédiaire où nous observons un écartement important des *coiled-coils* externes, mais non des *coiled-coils* internes qui occluent le passage. Partant de ce modèle intermédiaire, nous avons effectué une deuxième analyse des modes normaux (NMA II). Cela nous a permis d'obtenir un modèle final d'ouverture correspondant au mode 12 (Figure 70) où nous observons un balancement important des *coiled-coils* internes cette fois, mouvement qui est probablement permis lorsque l'encombrement des *coiled-coils* externes est levé. L'ouverture du bas de la porine s'effectuerait donc en deux étapes, résumée dans la figure 71.

Figure 70 : Vue transversale inférieure d'OprM associée aux vecteurs de déplacement correspondant à l'ouverture finale (NMA II : mode 12). Les directions sont indiquées par les flèches et l'amplitude de chaque direction est proportionnelle à la taille du vecteur.

NMA II : mode 12

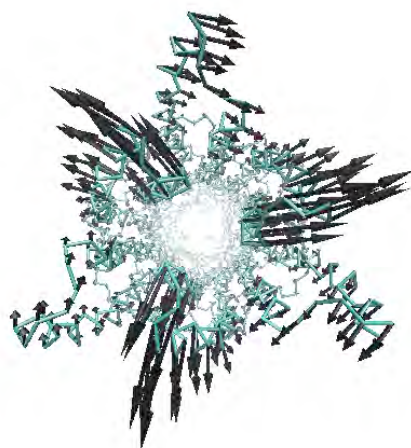
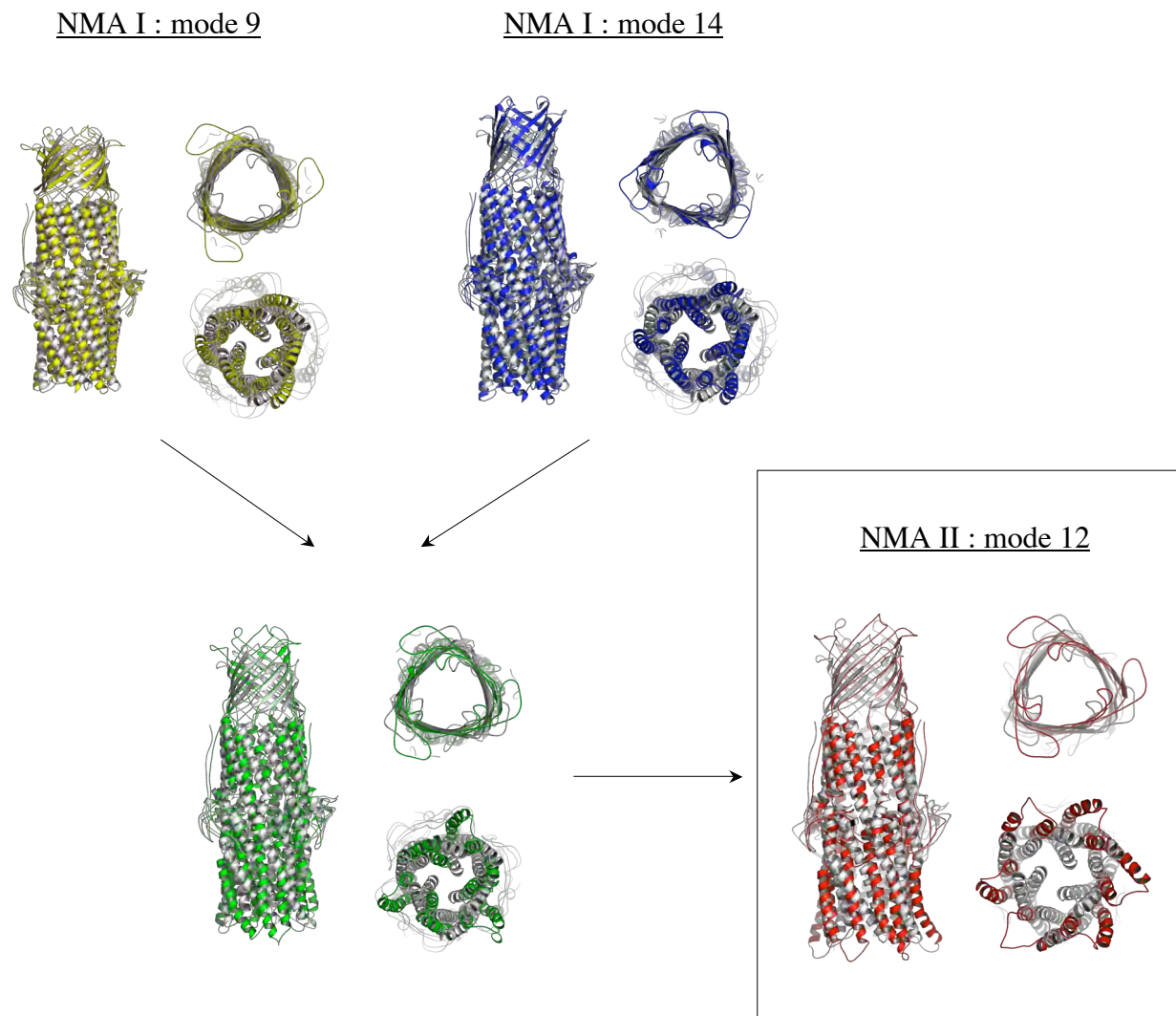
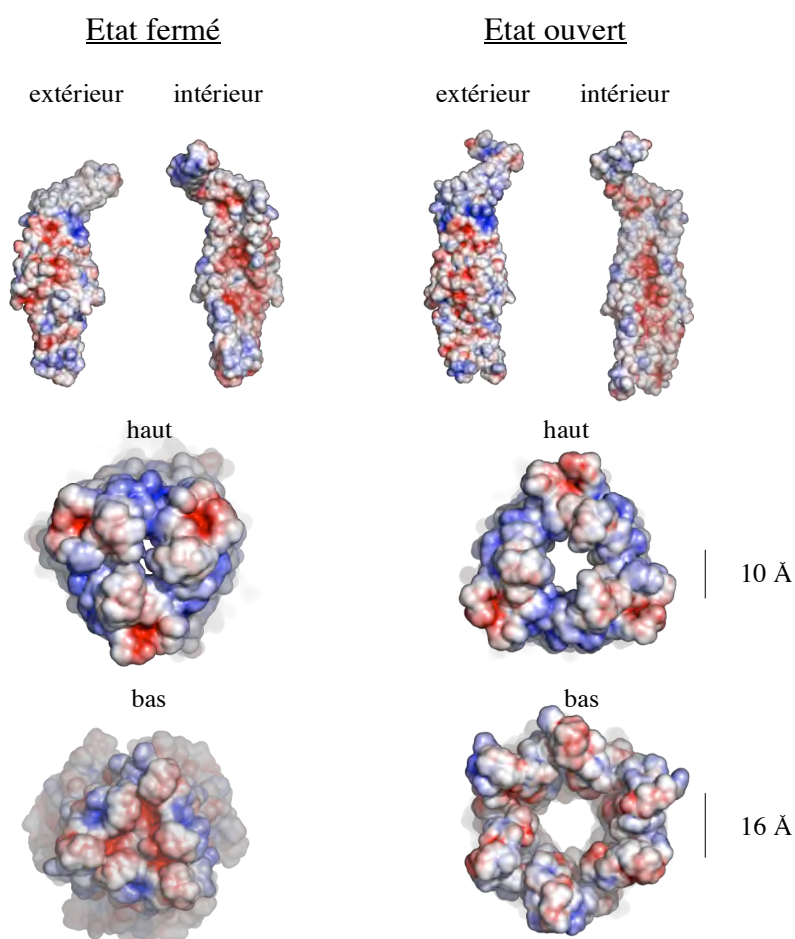


Figure 71 : Modèle final d'ouverture d'OprM à travers deux analyses de modes normaux (NMA I et NMA II). Les différents états d'ouverture issus de ces modes sont superposés avec la structure initiale d'OprM (en blanc). L'état d'ouverture intermédiaire, représenté en vert, est issu de l'addition des vecteurs de déplacement des modes 9 et 14 (NMA I). Le modèle d'ouverture final (NMA II : mode 12) est représenté en rouge.



Dans le modèle d'ouverture final d'OprM, la répartition des charges ne paraît pas très différente de l'état fermé. En l'occurrence, l'intérieur d'OprM reste très électronégatif (Figure 72). Par ailleurs, le diamètre d'ouverture du bas (16 Å) est plus grand que celui du haut (10 Å). Cependant, il est envisageable que les coudes β occluant le haut de la porine puissent s'écartier davantage pour atteindre le même diamètre d'ouverture que le bas.

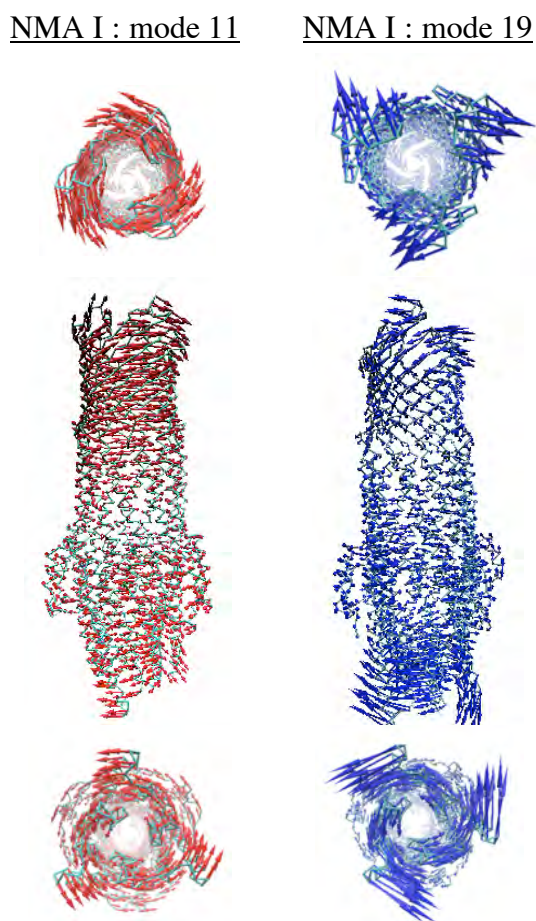
Figure 72 : Comparaison des surfaces électrostatiques d'OprM entre l'état fermé et le modèle ouvert. Les monomères sont représentés en vue latérale et les trimères sont représentés en vue transversale.



C) Modèle d'ouverture de TolC

Un modèle d'ouverture pour TolC a également été recherché à travers l'analyse des modes normaux. Nous avons adopté la même démarche qu'OprM, ce qui nous a amené à sélectionner les modes 11 et 19 (Figure 73). Ils correspondent tous les deux à des mouvements de torsion de part et d'autre du domaine équatorial permettant d'observer un début d'ouverture du bas de la porine. Dans le cas du mode 19, le mouvement de torsion est plus prononcé et s'accompagne d'un mouvement de clapet qui anime les coudes β reliant les brins S1 et S2. Cela permet l'ouverture de la partie extracellulaire de la porine.

Figure 73 : Représentation des vecteurs de déplacement correspondant aux modes 11 et 19 de TolC. Les directions sont indiquées par les flèches et l'amplitude de chaque direction est proportionnelle à la taille du vecteur.



De la même façon que pour OprM, une première analyse des modes normaux de TolC (NMA I) ne permet pas une description complète de l'ouverture de la porine. L'addition des vecteurs de déplacement des modes 11 et 19 permet l'obtention d'un état d'ouverture intermédiaire dont l'analyse des modes normaux (NMA II) a permis d'obtenir un modèle d'ouverture final le long du mode 17 (Figures 74 et 75).

Figure 74 : *Vue transversale inférieure de TolC associée aux vecteurs de déplacement correspondant à l'ouverture finale (NMA II : mode 17). Les directions sont indiquées par les flèches et l'amplitude de chaque direction est proportionnelle à la taille du vecteur.*

NMA II : mode 17

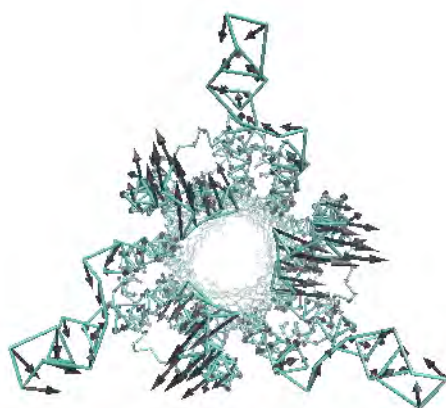
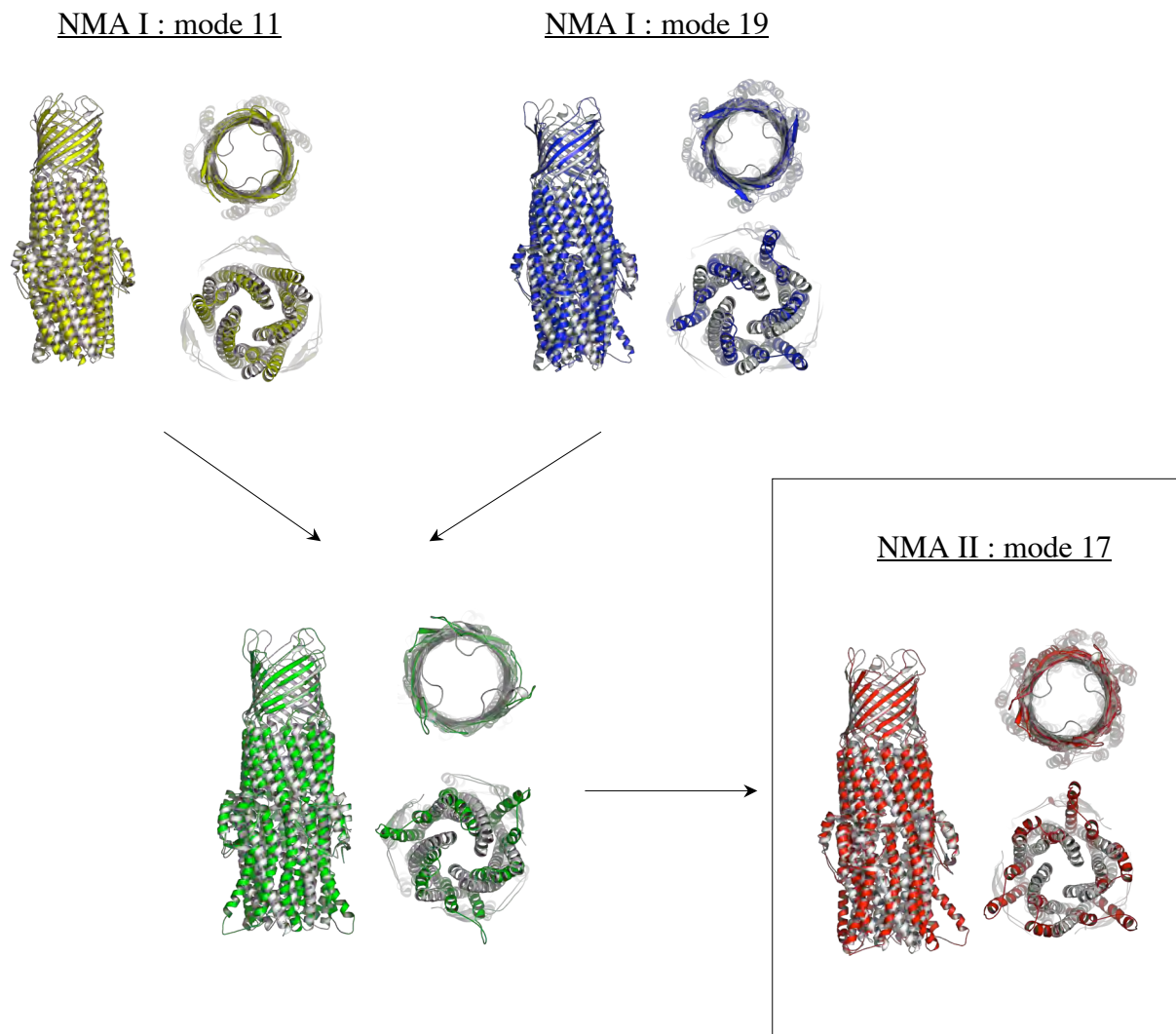
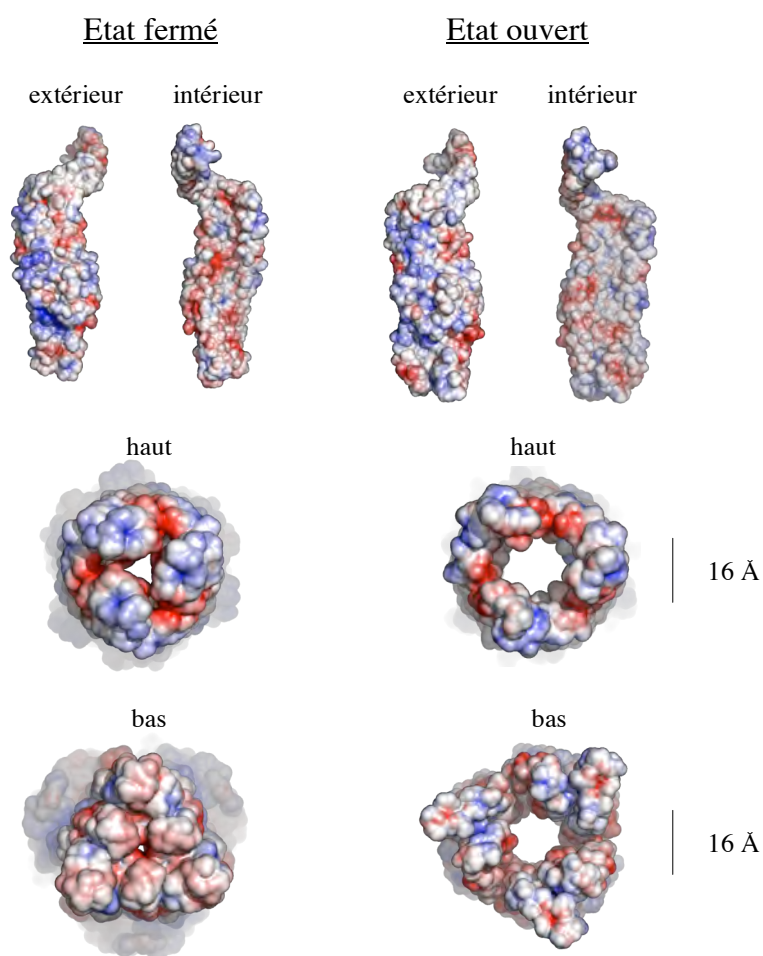


Figure 75 : Modèle final d'ouverture de TolC à travers deux séries d'analyse de modes normaux (NMA I et NMA II). Les différents états d'ouverture issus de ces modes sont superposés avec la structure initiale de TolC (en blanc, code PDB : 1EK9). L'état d'ouverture intermédiaire, représenté en vert, est issu de l'addition des vecteurs de déplacement des modes 11 et 19 (NMA I). Le modèle d'ouverture final (NMA II : mode 17) est représenté en rouge.



Les surfaces électrostatiques diffèrent entre l'état fermé et le modèle ouvert de TolC. L'intérieur de TolC « ouvert » est beaucoup moins électro négatif (Figure 76). Les diamètres d'ouverture des deux extrémités sont d'environ 16 Å.

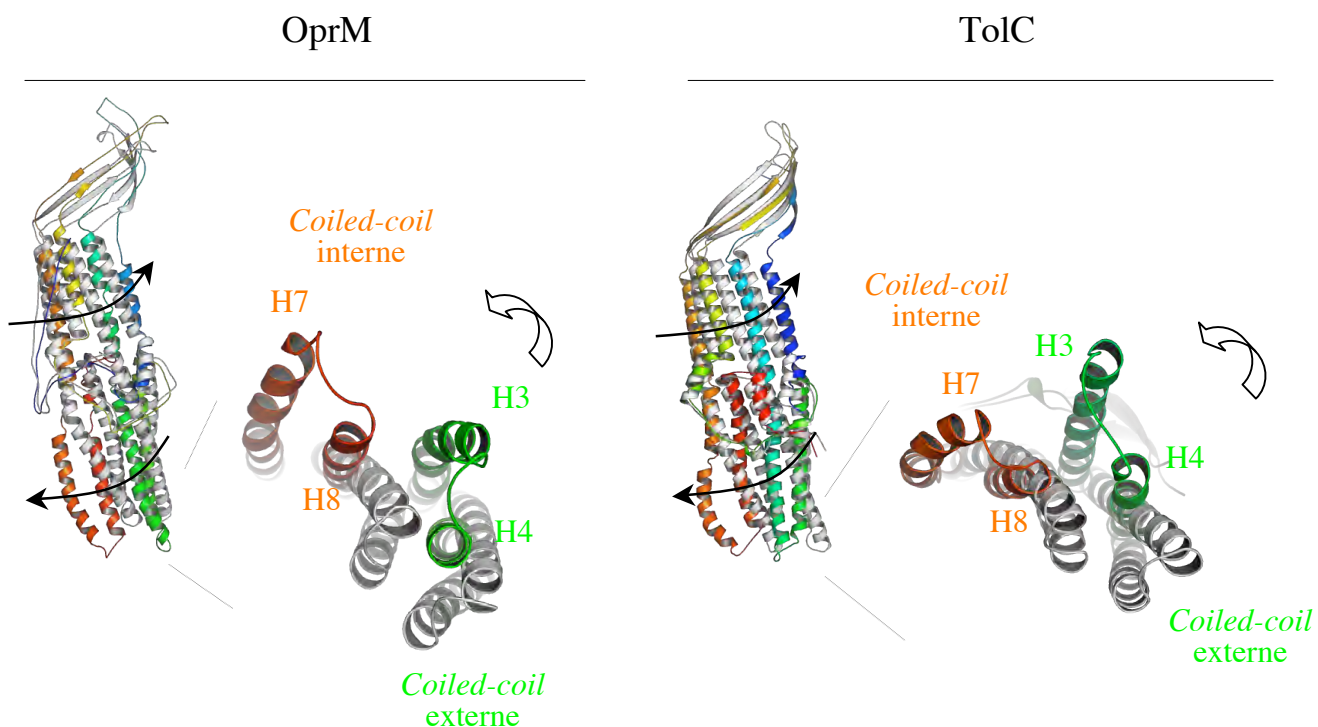
Figure 76 : Comparaison des surfaces électrostatiques de TolC entre l'état fermé et le modèle ouvert. Les monomères sont représentés en vue latérale et les trimères sont représentés en vue transversale.



D) Comparaison des modèles d'ouverture de TolC et d'OprM

Globalement, les mécanismes d'ouverture possibles de TolC et d'OprM, observés le long des modes normaux, présentent une similitude : un mouvement de torsion de part et d'autre de la partie médiane du tonneau α permet une ouverture du bas de la porine par un mouvement comparable à un diaphragme photographique. L'ouverture du *coiled-coil* externe (H3/H4) permettrait ensuite l'ouverture du *coiled-coil* interne (H7/H8) du protomère voisin. Il ne s'agit donc pas d'un simple réalignement du *coiled-coil* interne vers le *coiled-coil* externe du protomère voisin puisque ce dernier subit aussi des remaniements. Les rmsd moyens des déplacements entre l'état fermé et le modèle ouvert sont de 7,5 Å et 6,3 Å respectivement pour OprM et TolC (Figure 77).

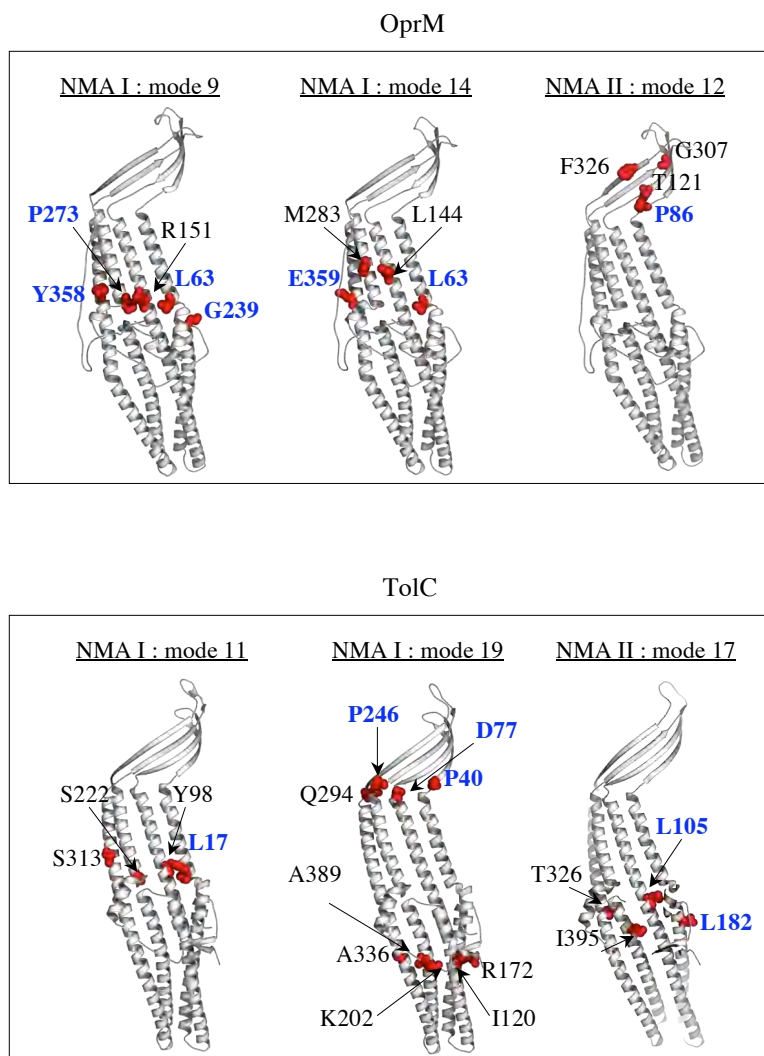
Figure 77 : Comparaison des déplacements entre OprM et TolC au niveau d'un protomère. La structure de l'état fermé est représentée en blanc et la structure du modèle final d'ouverture est représentée avec différentes couleurs. Les flèches indiquent le sens des mouvements. Une vue transversale des extrémités inférieures permet d'observer le déplacement des *coiled-coils* internes et externes, responsables de l'occlusion ou non des porines.



Plusieurs différences sont à noter lorsque l'on compare les modèles d'ouverture d'OprM et de TolC :

- De façon remarquable, la direction des hélices reste plutôt conservée sauf pour l'hélice H3 dans le cas de TolC ;
- Contrairement à TolC, l'ouverture d'OprM fait intervenir un mouvement d'extension comparable à un ressort (NMA I, mode 14) ;
- L'ouverture de l'extrémité extracellulaire des porines est possible par le déplacement des coudes β des brins S1 et S2. Un mouvement de clapet anime ces coudes dans TolC, alors que dans le cas d'OprM il s'agit d'un écartement centrifuge. Cette différence de mouvement était prévisible puisque ces coudes n'adoptent pas la même structure ;
- La distribution des résidus charnières correspondant aux déplacements (rmsd) les plus bas est différente, sauf dans le cas des modes 9 et 11, respectivement pour OprM et TolC, où les charnières sont localisées juste au-dessus du domaine équatorial (Figure 78). Bien que l'analyse des modes normaux ne tienne pas compte des chaînes latérales, notons que la plupart des charnières identifiées correspondent à des résidus conservés au sein des porines de cette famille (Figure 78, résidus indiqués en bleu). Cela concorde avec une pertinence biologique pour les modes sélectionnés dans la description de l'ouverture des porines.

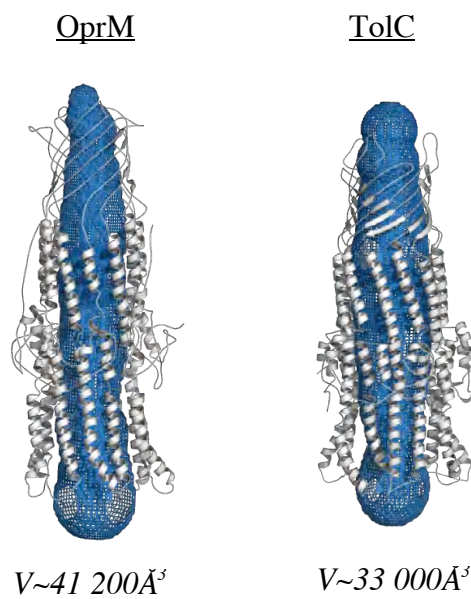
Figure 78 : Localisation des résidus « charnières » (en sphères rouges) pour chaque mode sélectionné dans la description de l'ouverture de TolC ou d'OprM. Les résidus conservés sont indiqués en bleu.



À l'état ouvert, le volume interne accessible des porines a été estimé à l'aide du programme CAVER (Petrek *et al.*, 2006). Dans le cas d'OprM, le rayon maximal des molécules pouvant évoluer dans la porine est de 8,3 Å (extrémité inférieure) ou 5 Å (extrémité supérieure). La longueur du parcours est de 205 Å. Si l'on simplifie le volume interne de la porine à un cylindre, il serait d'environ 29 000 Å³ (le rayon choisi pour le calcul du volume est la moyenne des extrémités supérieure et inférieure, c'est-à-dire à 6,7 Å). Cependant, il est possible que le diamètre de l'extrémité supérieure puisse s'ouvrir davantage.

Si l'on admet un diamètre identique au bas de la porine, c'est-à-dire 16 Å, le volume accessible interne d'OprM « ouvert » serait alors d'environ 41 200 Å³. Pour TolC, le rayon maximal est de 8 Å pour les deux extrémités et la longueur de parcours est de 164 Å. Le volume accessible interne de TolC « ouvert » serait de 33 000 Å³, donc inférieur à celui d'OprM (Figure 79).

Figure 79 : Représentation des volumes accessibles des modèles ouverts de TolC et OprM. L'estimation des volumes internes accessibles V sont indiqués en dessous.



L'ADAPTATEUR MEXX

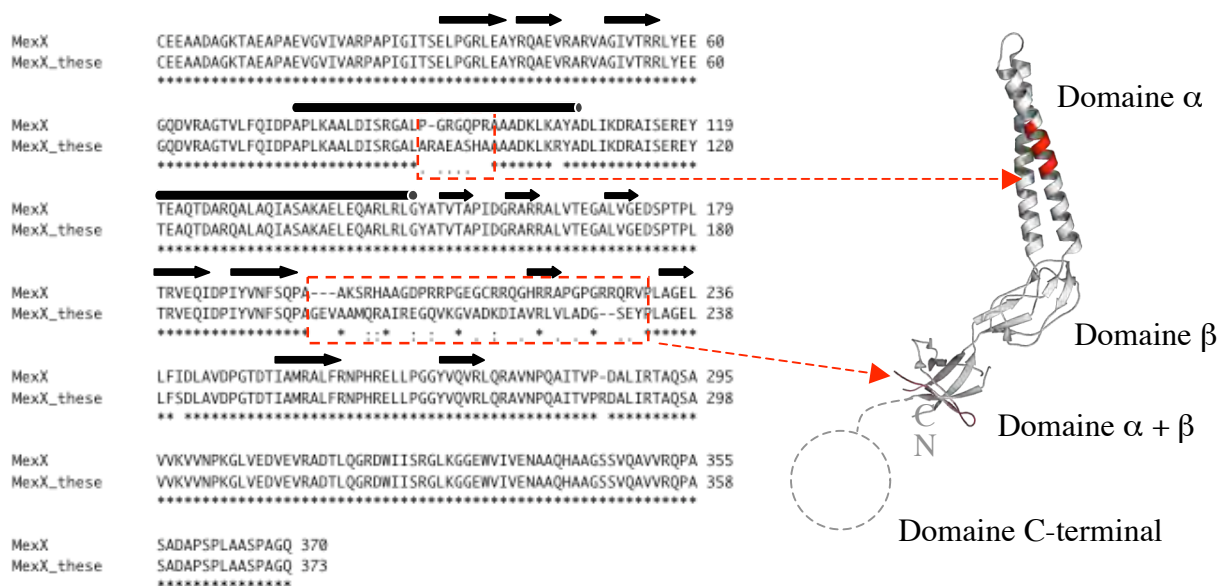
MexX correspond à la protéine MFP (*Membrane Fusion Protein*). Localisée dans le périplasma, la protéine MexX assure l'interaction entre le transporteur MexY et la porine OprM. Contrairement aux autres partenaires, MexX n'est pas une protéine transmembranaire mais ancrée à la membrane interne *via* un lipide N-terminal. La structure de cette famille de protéine n'est que partiellement connue et le nombre de protéines nécessaires à la cohésion du système d'efflux entier est aujourd'hui incertain.

5) UNE ISOFORME DE MEXX

Bien qu'elle soit issue d'une souche sauvage de *P. aeruginosa* (PAO1), nous avons cloné une isoforme de MexX qui présente 88% d'identité avec la séquence déposée dans la banque de donnée (locus PA1920, Aires *et al.*, 1999 ; Mine *et al.*, 1999). Malgré leur identité de séquence élevée, les deux isoformes de MexX ont des p*H*₁ très différents :

	MexX (banque de données)	MexX (thèse)
Nombre de résidus (protéine mature)	370	373
p <i>H</i> ₁	9.8	6.1

Les différences sont essentiellement localisées dans le domaine α *coiled-coil* et le domaine $\alpha+\beta$. La figure suivante présente l'alignement entre les deux isoformes de MexX (les étoiles correspondent aux résidus identiques). Par analogie avec la structure connue de l'homologue AcrA (code PDB 2F1M), les structures secondaires de MexX sont indiquées au-dessus de l'alignement de séquences. Les régions qui diffèrent entre les isoformes de MexX sont indiquées en rouge sur la structure d'AcrA. Nous avons choisi AcrA comme modèle structural car MexX présente 37% d'identité avec AcrA (*E. coli*) contre 33% d'identité avec MexA (*P. aeruginosa*).

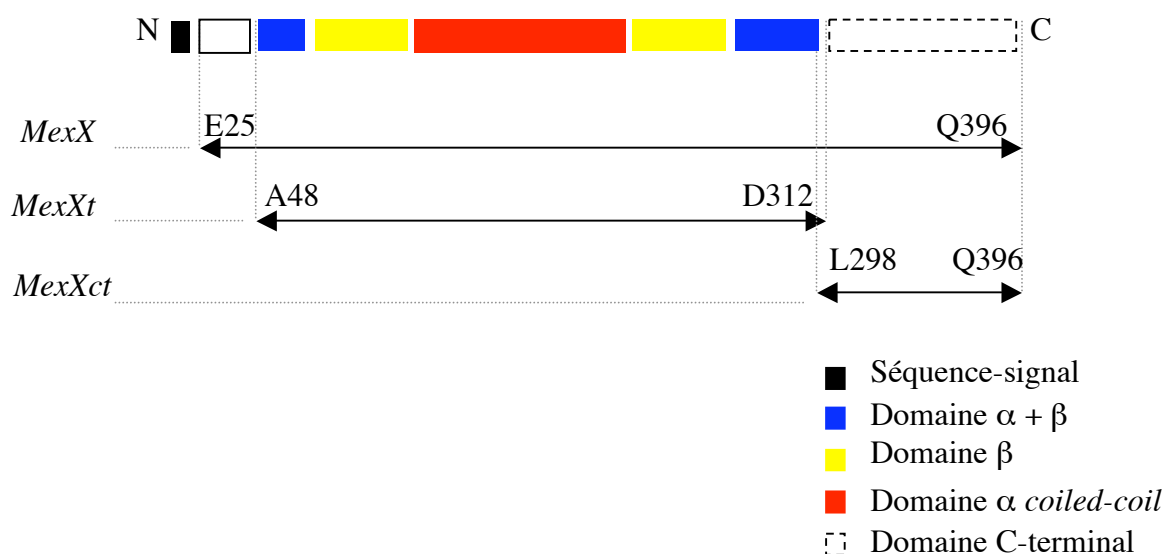


6) PRODUCTION ET PURIFICATION DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS DE MEXX

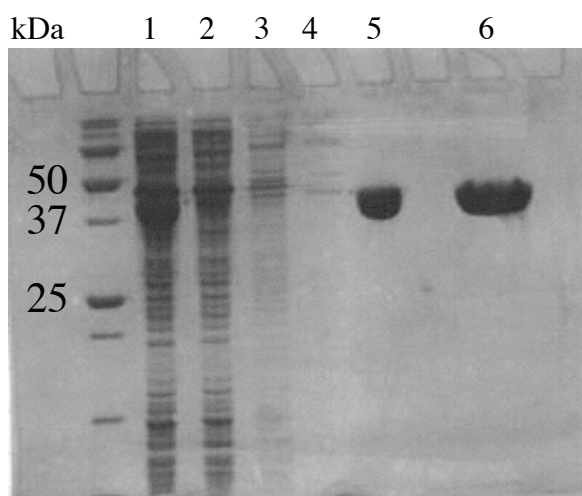
La protéine périplasmique MFP est une protéine soluble mais ancrée à la membrane interne de la bactérie *via* une palmylation N-terminale post-traductionnelle (Yoneyama *et al.*, 2000). Cependant, il est possible de cloner la protéine sans sa séquence-signal d'adressage à la membrane afin de la produire sous une forme soluble dans le cytosol bactérien.

La structure cristallographique de l'homologue MexA a montré que les protéines MFP sont constituées de quatre domaines (Higgins *et al.*, 2004 ; Akama *et al.*, 2004(b)) : un domaine α en *coiled-coil*, un domaine β , un domaine $\alpha+\beta$ (ou β -barrel) et un domaine C-terminal d'environ 100 résidus qui n'est pas visible dans la structure cristallographique, donc *a priori* non structuré ou très flexible. La structure de l'orthologue AcrA d'*E. coli* a pu être résolue par cristallographie lorsqu'ils ont enlevé ce même domaine C-terminal après protéolyse ménagée (Mikolosko *et al.*, 2006). Sur la base de ces résultats, nous avons décidé de cloner et de purifier trois constructions différentes de MexX (Figure 80) : une version soluble (sans le palmyl N-terminal) et entière qu'on appellera *MexX*, une version tronquée correspondant aux domaines structurés qu'on appellera *MexXt*, et le domaine C-terminal *a priori* non structuré qu'on appellera *MexXct*.

Figure 80 : Schéma de la structure primaire de MexX (avant maturation protéolytique) et des différentes constructions produites et purifiées.



Les différentes protéines sont purifiées jusqu'à « homogénéité », c'est-à-dire qu'il ne doit rester qu'une seule espèce moléculaire, donc par exemple qu'une seule bande majoritaire correspondant à la bonne masse moléculaire après électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et coloration au bleu de coomassie. La protéine purifiée représente au moins 95% (w/w) des protéines totales. Le gel SDS-PAGE (acrylamide 12% w/v) ci-dessous résume la purification de MexX entier. Les autres constructions de MexX sont obtenues avec la même pureté.



- 1 : Extrait bactérien soluble
- 2 : Fraction non fixée sur résine Ni²⁺
- 3 : Lavage de la résine Ni²⁺ (imidazole 50 mM)
- 4 : Lavage de la résine Ni²⁺ (imidazole 100 mM)
- 5 : Elution de la résine Ni²⁺ (imidazole 250 mM)
- 6 : Elution de l'échangeuse d'anions (gradient de NaCl)

Le tableau ci-dessous résume les rendements de purification et les concentrations atteintes des différentes constructions de MexX :

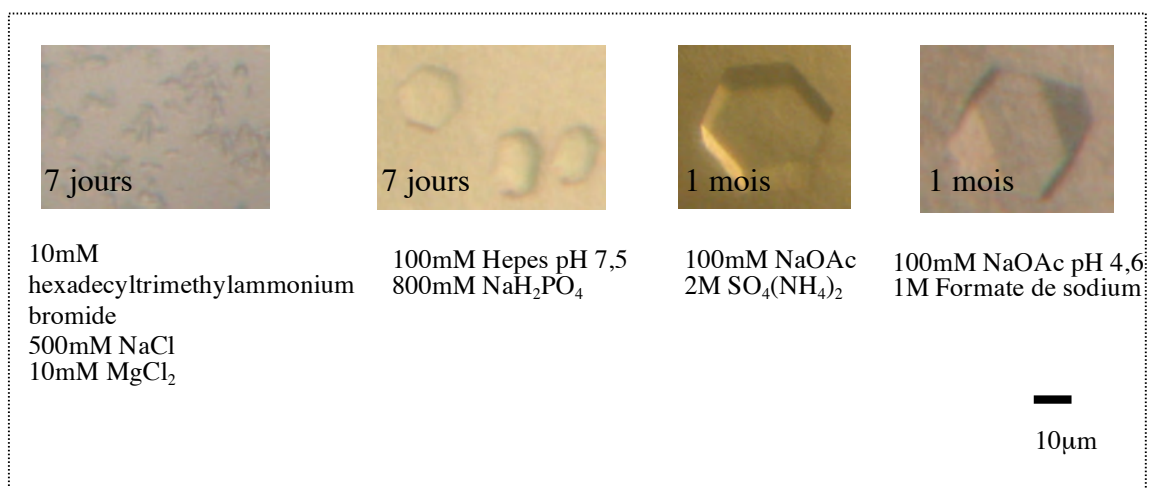
	<i>MexX</i>	<i>MexXt</i>	<i>MexXct</i>
MM (kDa)	40.3	29.5	10.3
Rendement de purification (mg de protéine / L de culture)	26	14	2
Concentration maximale (mg/ml)	30	10	6
Tampon de concentration	TRIS-HCl 20mM pH8 NaCl 50mM	Citrate d'ammonium 20mM pH5 NaCl 50mM	Citrate d'ammonium 20mM pH5 NaCl 50mM

La version entière de MexX est particulièrement soluble contrairement à MexXt qui ne possède plus le domaine C-terminal. Il semblerait alors que ce domaine C-terminal favorise la solubilité de la protéine en augmentant sa surface d'hydratation ou en empêchant son agrégation.

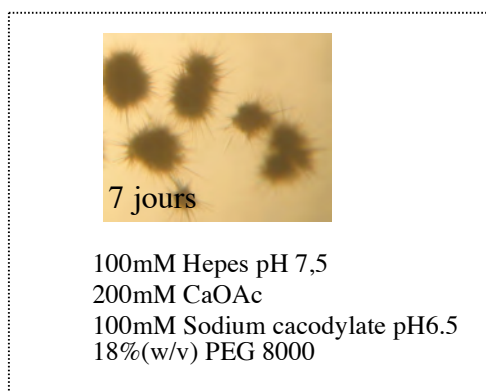
7) CRISTALLISATION DE MEXX

Différentes pistes de cristallisation ont été obtenues lors d'un premier criblage au robot, avec le kit *Crystal screen* (Hampton) :

MexX à 4mg/ml dans Tris-HCl pH8, NaCl 200mM

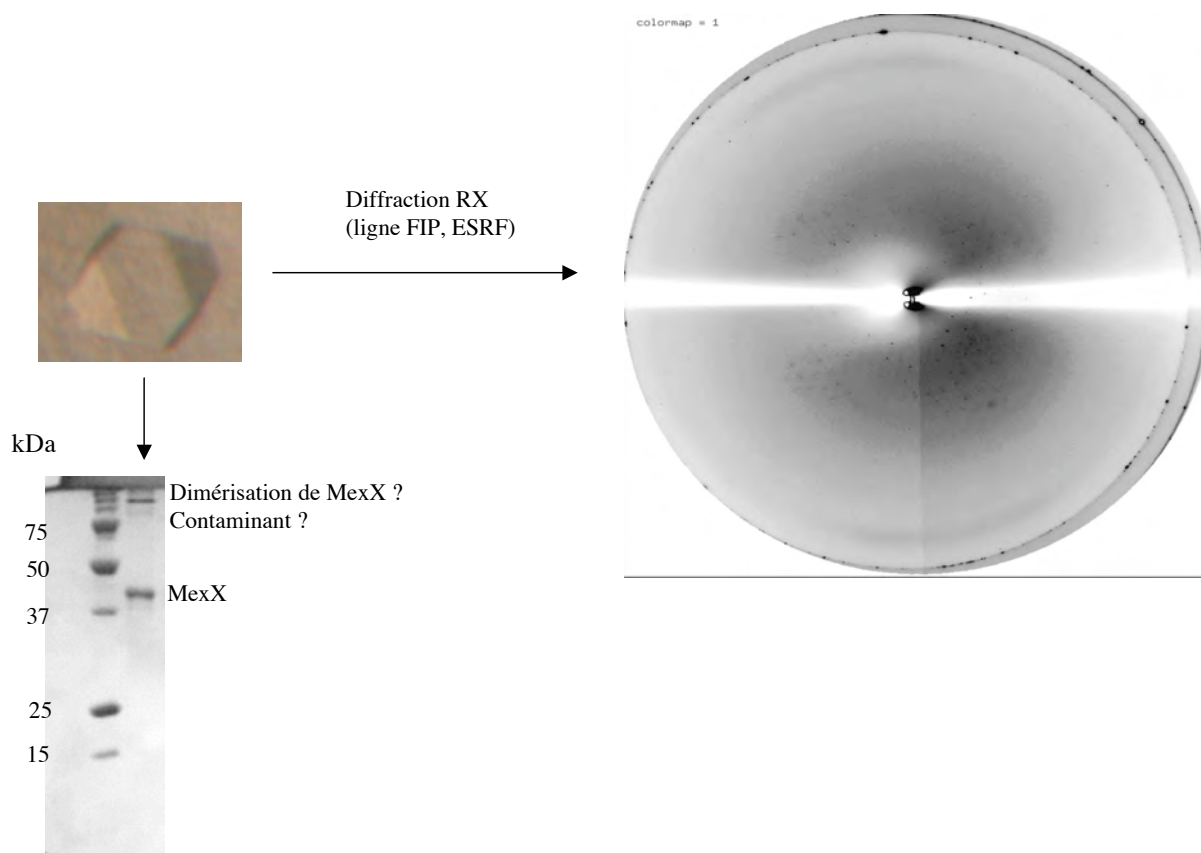


MexX à 10mg/ml dans Citrate d'ammonium 20mM pH5, NaCl 50mM



Un test de diffraction a été réalisé sur l'un des cristaux. Le cliché de diffraction obtenu n'est pas exploitable, mais il montre qu'il s'agit bien d'un cristal de protéine puisqu'on observe un réseau. De plus, le cristal a été récupéré, lavé puis analysé par SDS-PAGE. Le résultat de l'électrophorèse montre une bande correspondant à la taille de MexX, mais également une bande de plus haut poids moléculaire pouvant correspondre à un dimère de MexX (Figure 81).

Figure 81 : Diffraction RX et analyse SDS-PAGE d'un cristal de MexX.

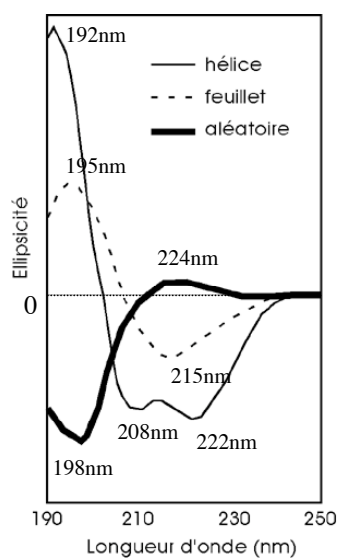


Par la suite, malgré de nombreux essais (cristallisation directement après purification, variation de la concentration en agent précipitant, variation de la concentration en protéine, variation du pH, variation de la température et additifs), nous n'avons pas réussi à reproduire les cristaux ou à améliorer la condition des oursins.

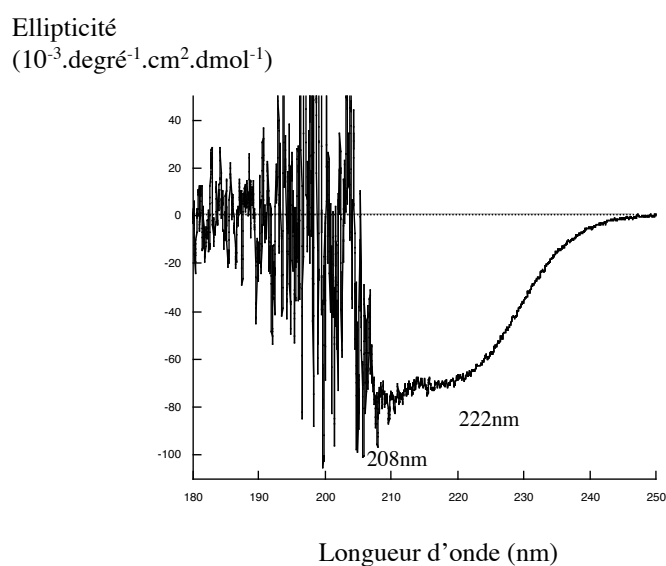
Pourtant, la protéine MexX semble bien repliée d'après son spectre de dichroïsme circulaire (Figure 82). Bien que ce dernier soit très bruité en deçà de 200 nm, on arrive à observer les bandes négatives caractéristiques des hélices α , correspondant au domaine *coiled-coil* des MFP.

Figure 82 : Spectre de dichroïsme circulaire de MexX.

Spectres attendus pour les différentes conformations

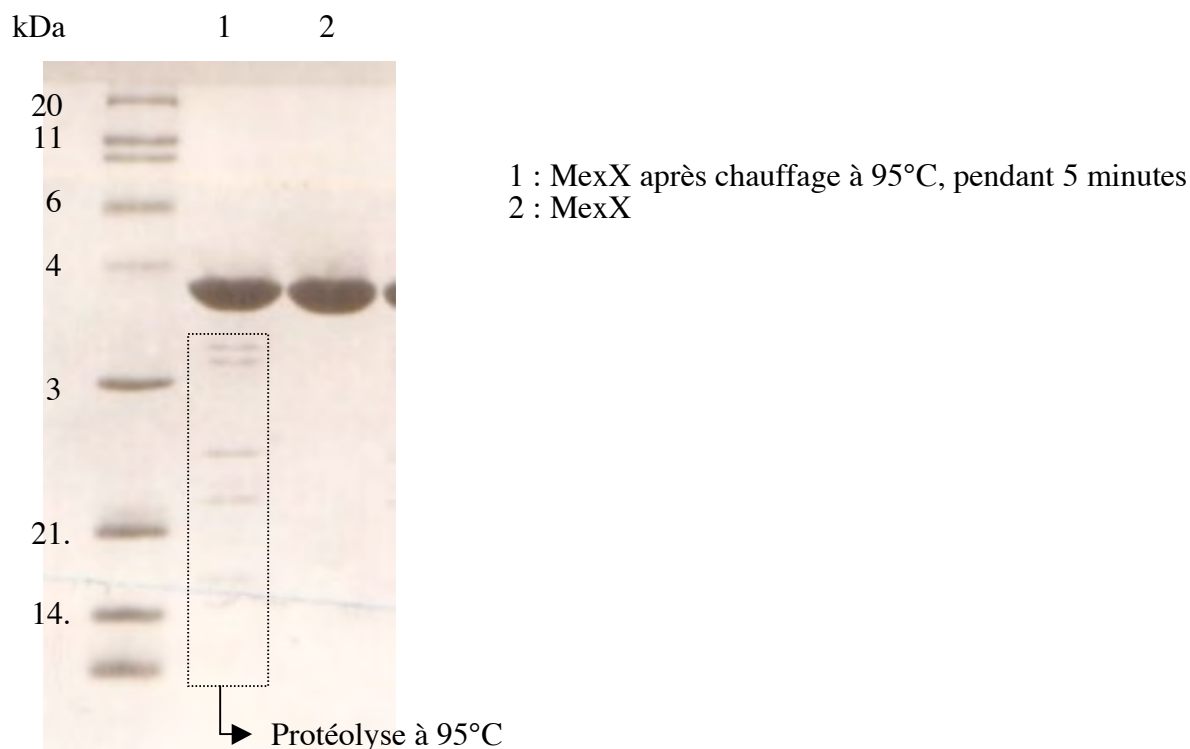


Spectre de dichroïsme circulaire de MexX



Cette difficulté à reproduire les cristaux de MexX est probablement liée d'une part au domaine C-terminal non structuré, d'autre part à la flexibilité de la protéine. En effet, les structures cristallographiques de MexA/AcrA (Higgins *et al.*, 2004 ; Akama *et al.*, 2004(b) ; Mikolosko *et al.*, 2006) et les études de dynamique moléculaire d'AcrA (Vaccaro *et al.*, 2006) ont montré que les protéines MFP sont particulièrement flexibles au niveau du domaine *coiled-coil* et du domaine $\alpha+\beta$. Ceci est conforté par la protéolyse spontanée de MexX lorsqu'on la chauffe à 95°C avant électrophorèse en condition dénaturante (Figure 83).

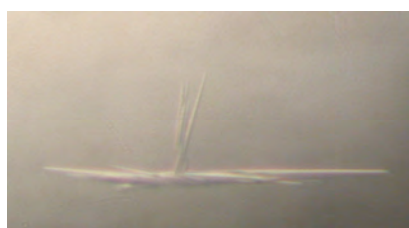
Figure 83 : SDS-PAGE de MexX après et avant incubation à 95°C pendant 5 minutes.



8) CRISTALLISATION DE MEXXt

En se basant sur l'alignement structural de MexX avec AcrA (37% d'identité), nous avons produit et purifié MexXt, une version de la protéine sans le domaine C-terminal non structuré. Cela nous a permis d'obtenir une nouvelle piste de cristallisation reproductible cette fois-ci :

MexXt à 3mg/ml dans Citrate d'ammonium 20mM pH5, NaCl 50mM



100µm

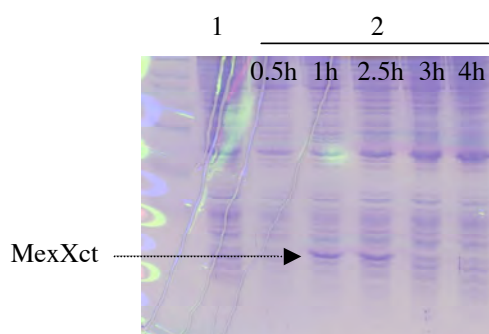
Hepes 100mM pH8
PEG 8000 10% (w/v)
Ethylène glycol 18% (v/v)

Ces cristaux, en forme de fine lamelle, doivent être améliorés car ils ne sont pas suffisamment épais pour être exploitable en cristallographie.

9) CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES DU DOMAINE C-TERMINAL DE MEXX

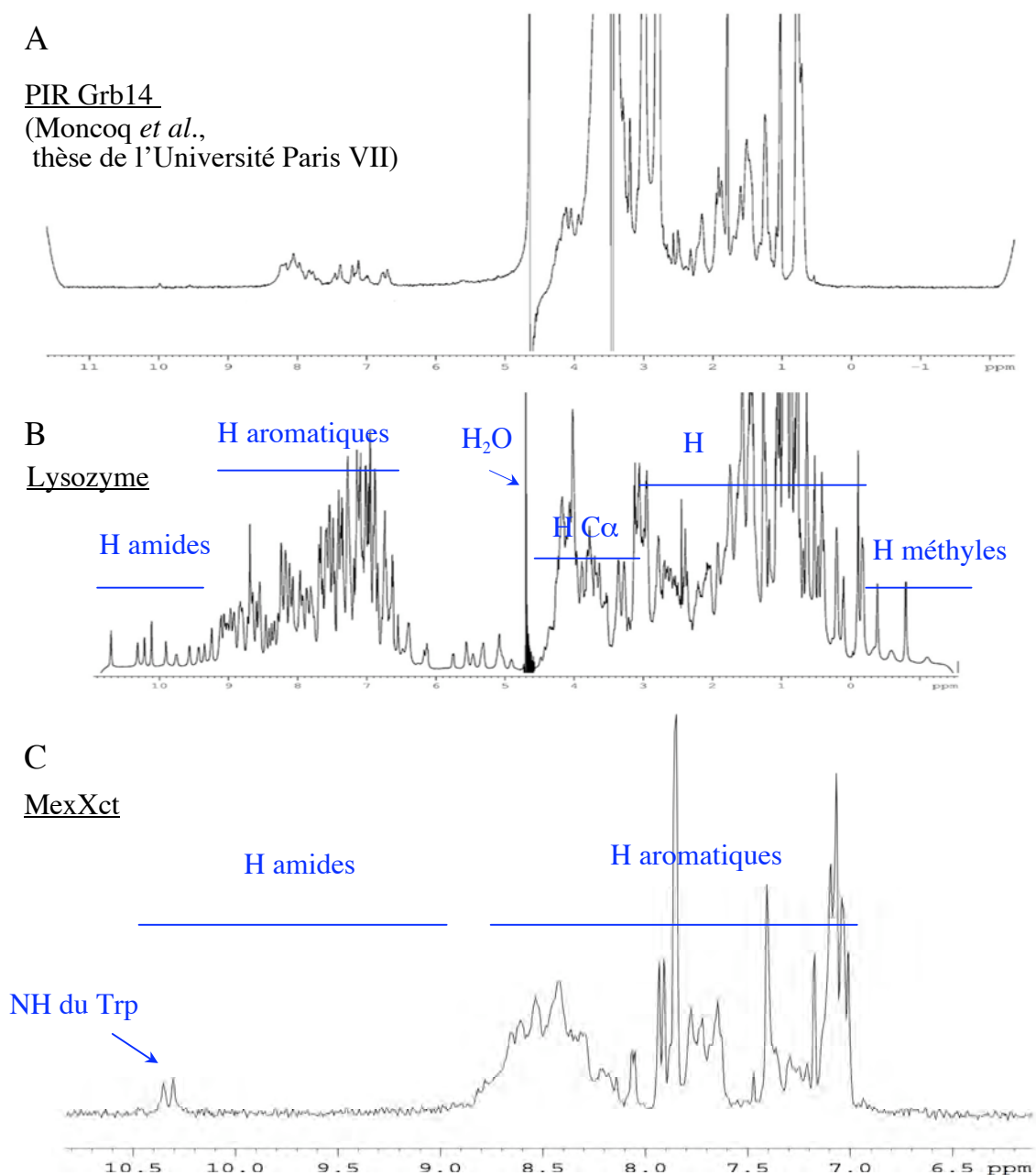
Le domaine C-terminal des protéines MFP est présumé non replié car on ne l'observe pas dans la structure cristallographique de MexA (Higgins *et al.*, 2004 ; Akama *et al.*, 2004(b)). Cependant il joue un rôle essentiel dans l'interaction de la protéine avec ses partenaires RND et OMF (Mikolosko *et al.*, 2006).

Nous avons cloné, produit et purifié le domaine C-terminal de MexX. La production montre que ce domaine est sensible aux protéases endogènes de la bactérie productrice. En effet, au-delà de 2h30 d'induction, la protéine n'est plus visible lorsqu'on analyse l'extrait bactérien total en SDS-PAGE :



1 : extrait bactérien total avant induction
2 : extrait bactérien total après induction à différents temps

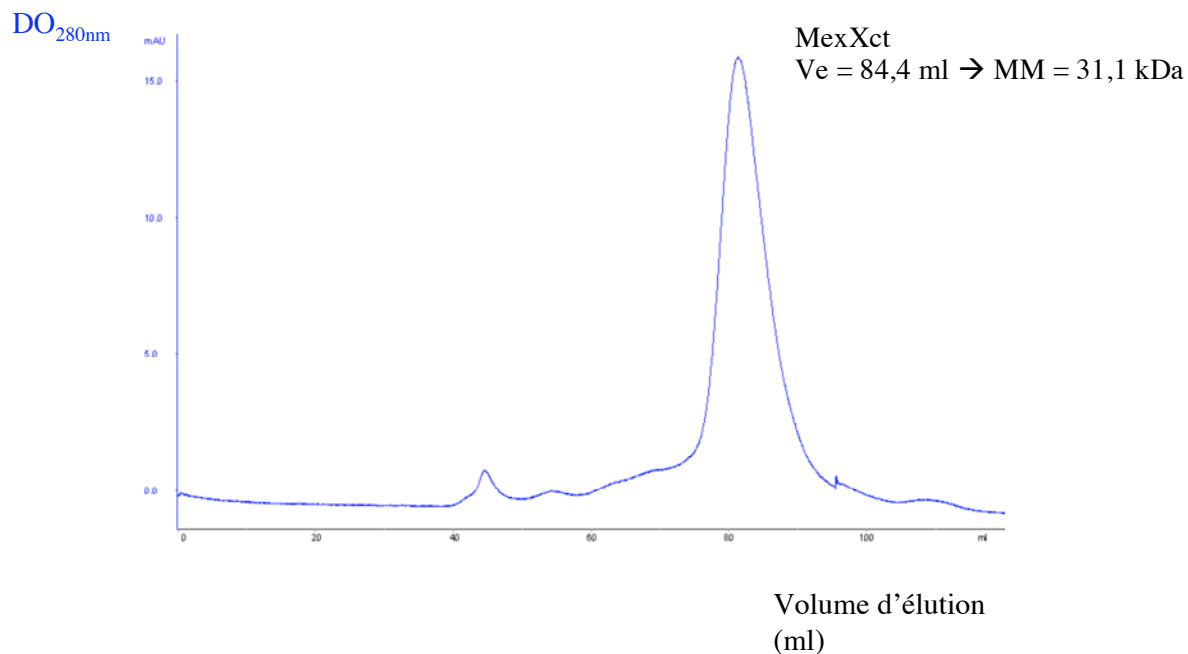
Figure 84 : (A) Spectre RMN ^1H caractéristique d'une IUP (domaine PIR de Grb14), avec des pics larges, peu intenses et une distribution des fréquences de résonance des protons amides/aromatiques sur 2 ppm. (B) Spectre RMN ^1H caractéristique d'une protéine globulaire structurée (lysozyme), avec des pics fins, intenses et une distribution des fréquences de résonance des protons amides/aromatiques sur 3.5 ppm. (C) Spectre RMN ^1H du domaine C-terminale MexXct, focalisé sur les fréquences de résonance des protons amides/aromatiques.



MexXct a une masse moléculaire d'environ 10,3 kDa, ce qui est *a priori* compatible avec la spectroscopie RMN standard (spectromètre de 600 MHz). Le spectre RMN des protons de MexXct (Figure 84) concentrée à 0,6 mM dans un tampon *ad hoc* (phosphate 20 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, imidazole 10 mM) présente les caractéristiques d'une IUP (*intrinsically unstructured protein*), c'est-à-dire d'une protéine soluble sans structure rigide intrinsèque en solution (Uversky, 2002). Cette famille de protéine est essentiellement impliquée dans les fonctions de reconnaissance moléculaire, dont l'interaction avec un autre partenaire protéique ou avec la membrane cellulaire pourrait induire sa structuration (Dyson & Wright, 2002 ; Dunker *et al.*, 2002).

En tamis moléculaire, MexXct semble s'associer en trimère de 31,1 kDa d'après son volume d'élution (Figure 85). Du fait de la grande taille du complexe protéique, il ne serait pas étonnant que le spectre RMN ¹H présente des pics de résonance élargis et peu dispersés. Cependant, la relation entre le volume d'élution et la masse moléculaire d'une protéine en tamis moléculaire n'est plus linéaire si la protéine n'est pas globulaire, ce qui peut être le cas d'une protéine non-structurée comme MexXct. L'étude par RMN de MexXct devra donc être poursuivie seulement si les conditions favorisant le monomère sont trouvées, en jouant sur le pH ou la concentration en sel par exemple. Notons que la protéine homologue AcrA semble s'associer en trimère *in vitro* (Zgurskaya & Nikaido, 2000) lorsqu'elle est entière, mais en absence de son domaine C-terminal c'est le dimère qui paraît favorisé (Mikolosko *et al.*, 2006). Le domaine C-terminal aurait alors un rôle dans l'oligomérisation de la protéine périplasmique.

Figure 85 : Profil d'éluion en chromatographie d'exclusion de MexXct purifié (colonne Superdex 200, Hi-Load). La masse moléculaire est valable si MexXct est une protéine globulaire.



L'analyse de la composition en acides aminés de MexXct va également dans le sens d'une IUP. L'état soluble et dé-structuré est associé à une faible hydrophobicité et une charge nette élevée favorisant la forme étendue de la protéine par répulsion électrostatique. Dans les conditions physiologiques, le domaine C-terminal de MexX est potentiellement très chargé puisque son p*H*_i théorique est de 9,86. Une étude comparative de la composition en acides aminés a montré que les IUP sont appauvries en Trp, Cys, Phe, Ile, Tyr, Val, Leu et Asn (on parlera d'acides aminés « structurants »), et enrichies en Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu et Lys (on parlera d'acides aminés « dé-structurants », [Dunker *et al.*, 2001](#)).

Le tableau ci-dessous montre la composition en acides aminés de MexXct. Les acides aminés « dé-structurants » sont en rouge et les acides aminés « structurants » sont en bleu.

Composition (%)	
Ala	17.2
Arg	7.1
Asn	3.0
Asp	5.1
Cys	0.0
Gln	8.1
Glu	4.0
Gly	7.1
His	1.0
Ile	5.1
Leu	6.1
Lys	3.0
Met	0.0
Phe	0.0
Pro	7.1
Ser	7.1
Thr	3.0
Trp	2.0
Tyr	0.0
Val	14.1

Le tableau suivant montre les proportions moyennes d'acides aminés « structurants » (en bleu) et « dé-structurants » (en rouge) pour les protéines globulaires et les IUP (Dunker *et al.*, 2001).

	<i>Protéines globulaires</i>	<i>IUP</i>	<i>MexXct</i>
AA « dé-structurant » (%)	47.4	63.8	60.7
AA « structurant » (%)	36.2	23.2	30.2

La proportion d'acides aminés « dé-structurants » de MexXct est proche de la valeur moyenne des IUP. Cependant, sa proportion d'acides aminés « structurants » est relativement élevée du fait de la présence de nombreuses Val.

La caractérisation du domaine C-terminal de la protéine périplasmique MexX en tant qu'IUP ne serait pas étonnante puisqu'il s'agit d'une protéine étendue et flexible dont le rôle est d'interagir spécifiquement avec deux autres protéines et de consolider le complexe ternaire ainsi formé.

Cependant, cette caractérisation doit être confirmée par d'autres techniques spectroscopiques ou biochimiques classiquement employées dans l'étude des IUP, comme le dichroïsme circulaire, la protéolyse ménagée ou encore la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

Le rôle du domaine C-terminal de la protéine MFP dans les interactions n'est pas encore bien défini puisqu'il semble aussi important pour le recrutement de la porine OMF que pour le transporteur RND (Mikolosko *et al.*, 2006). L'identification du partenaire d'interaction est nécessaire pour poursuivre l'étude structurale du domaine C-terminal afin d'analyser les conformations structurales qu'il pourrait adopter et de mieux comprendre son rôle au sein de la protéine MFP.

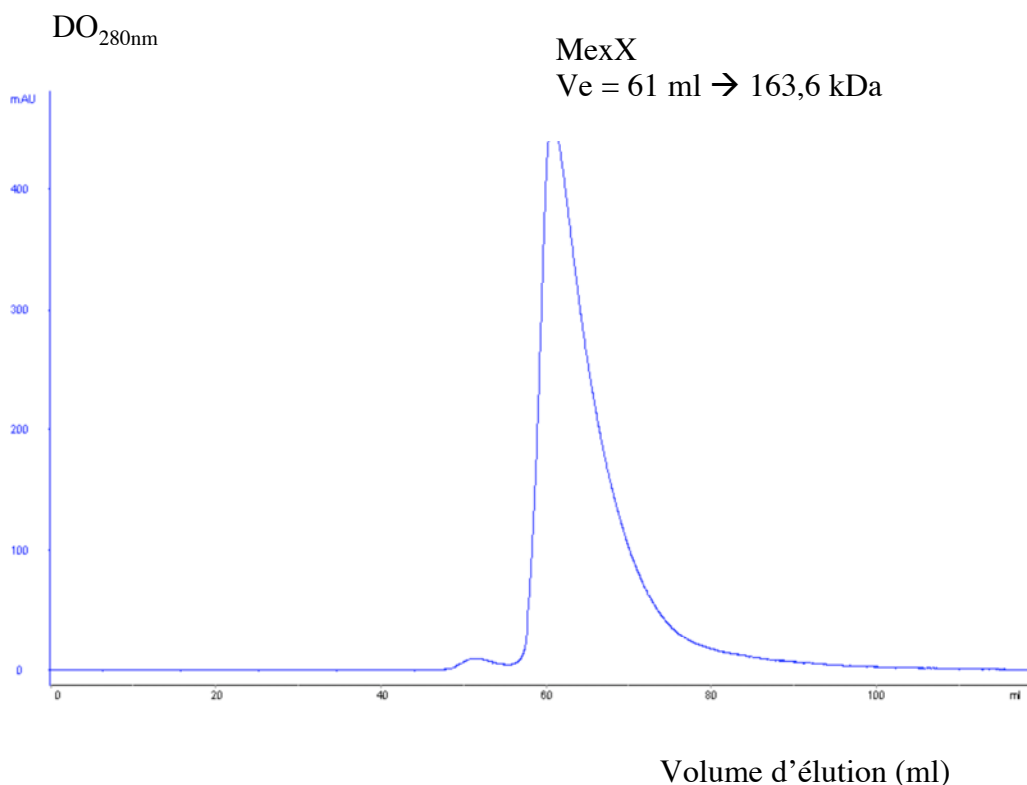
ETUDE PRELIMINAIRE DE L'ASSEMBLAGE

La structure moléculaire des différentes protéines du système d'efflux RND modèle AcrAB-TolC d'*E. coli* est aujourd'hui connue. Mais la stoechiométrie et les interactions précises régissant l'assemblage soulèvent encore bien des questions.

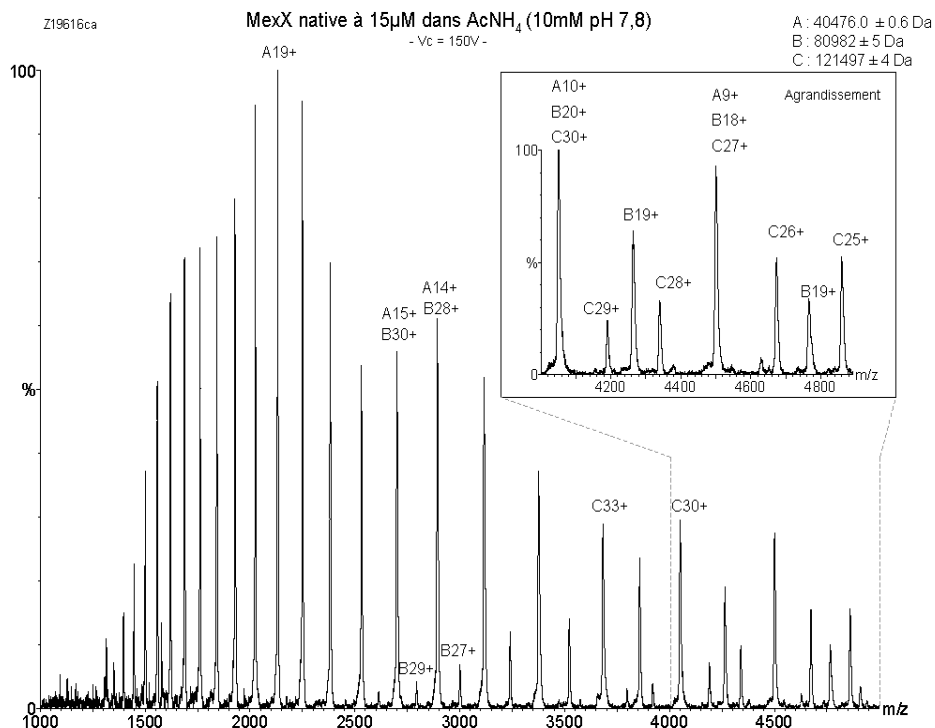
10) OLIGOMERISATION DES PROTEINES MEXA ET MEXX

La connaissance des structures cristallographiques des différents partenaires du système d'efflux a permis de constater que la porine OMF et le transporteur RND s'organisent chacun en homotrimère. Cependant l'incertitude subsiste quant à l'assemblage de la protéine périplasmique MFP. En effet, la structure cristallographique d'une protéine MFP, MexA, montre qu'elle peut s'associer en hexamère ou en heptamère dans le cristal (Akama *et al.*, 2004(b) ; Higgins *et al.*, 2004). Pourtant, des études *in vitro* indiquent qu'une protéine de la même famille, AcrA, est trimérique (Zgurskaya & Nikaido, 2000). La structure cristallographique de cette dernière montre que la protéine peut également se dimériser (Mikolosko *et al.*, 2006). L'ambiguïté d'assemblage de la protéine périplasmique a été retrouvée lorsque nous nous sommes intéressés à la protéine MexX.

En chromatographie d'exclusion (colonne *Superdex 200 Hi-Load*), le volume d'élution de la protéine MexX (~40,3 kDa) correspond à un tétramère si celle-ci se comporte comme une protéine globulaire (tampon TRIS-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM) :

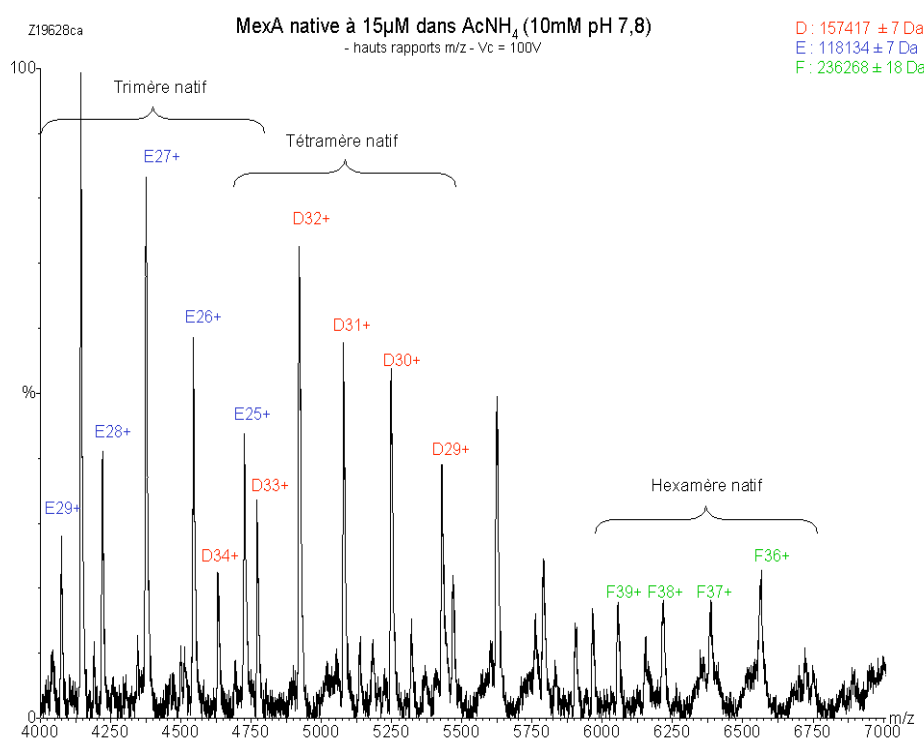
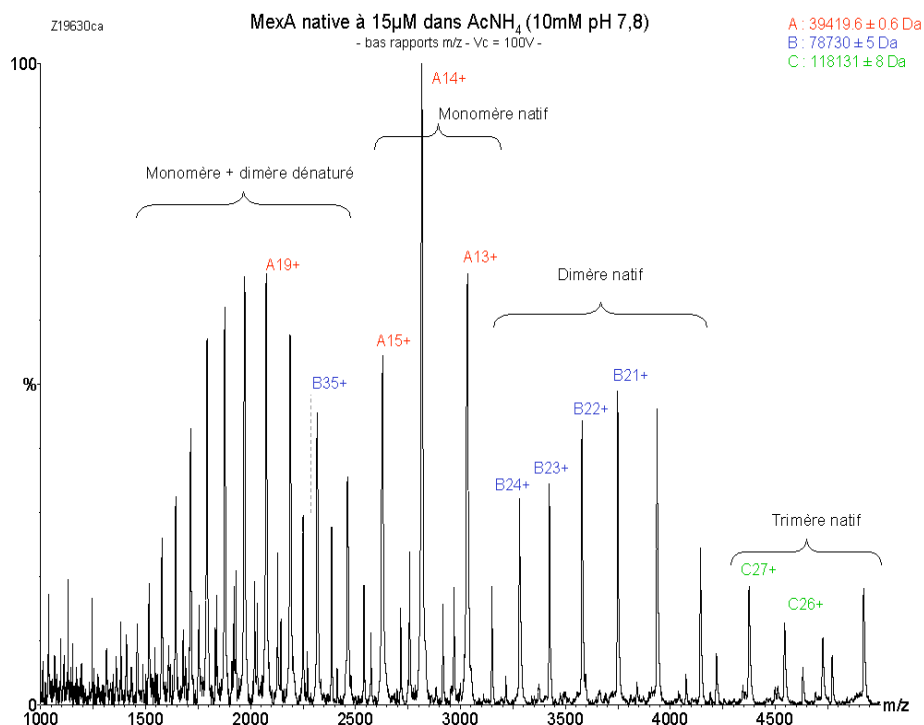


Par contre, une analyse par spectrométrie de masse de la même protéine MexX en condition native montre que la protéine est présente sous forme de monomère, dimère et trimère :



La masse moléculaire de MexX monomérique correspond à la protéine seule avec un adduit de trifluoroacétate (114 Da).

Une analyse par spectrométrie de masse de l'homologue MexA cette fois, en condition native, révèle la présence de la protéine sous forme de monomère, dimère, trimère, tétramère et hexamère :



De plus, les états de charge relativement élevés ainsi que les distributions bimodales des espèces A et B indiquent que la protéine MexA est partiellement dénaturée.

Ces résultats montrent qu'il est difficile d'établir clairement le degré d'oligomérisation de la protéine MFP puisque celui-ci varie d'une technique à une autre, donc des conditions expérimentales (température, pH, force ionique et concentration en protéines), et dépend également de la protéine MFP elle-même. Par ailleurs, il se peut que l'oligomérisation de la protéine périplasmique soit un phénomène dynamique aboutissant à une population hétérogène en solution ce qui est contraignant pour la cristallisation.

11) STOECHIOMETRIE DU COMPLEXE BINAIRE OPRM-MEXA

La protéine périplasmique MFP est indispensable pour que la porine OMF et le transporteur RND puissent s'associer durablement. De plus, il a été montré que la protéine périplasmique MFP peut s'associer indépendamment avec la porine OMF ou le transporteur RND, le complexe binaire MFP-RND étant de loin le plus stable (Mokhonov *et al.*, 2004 ; Touzé *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que la stoechiométrie du complexe binaire MFP-OMF pourrait bien être celui du système d'efflux entier.

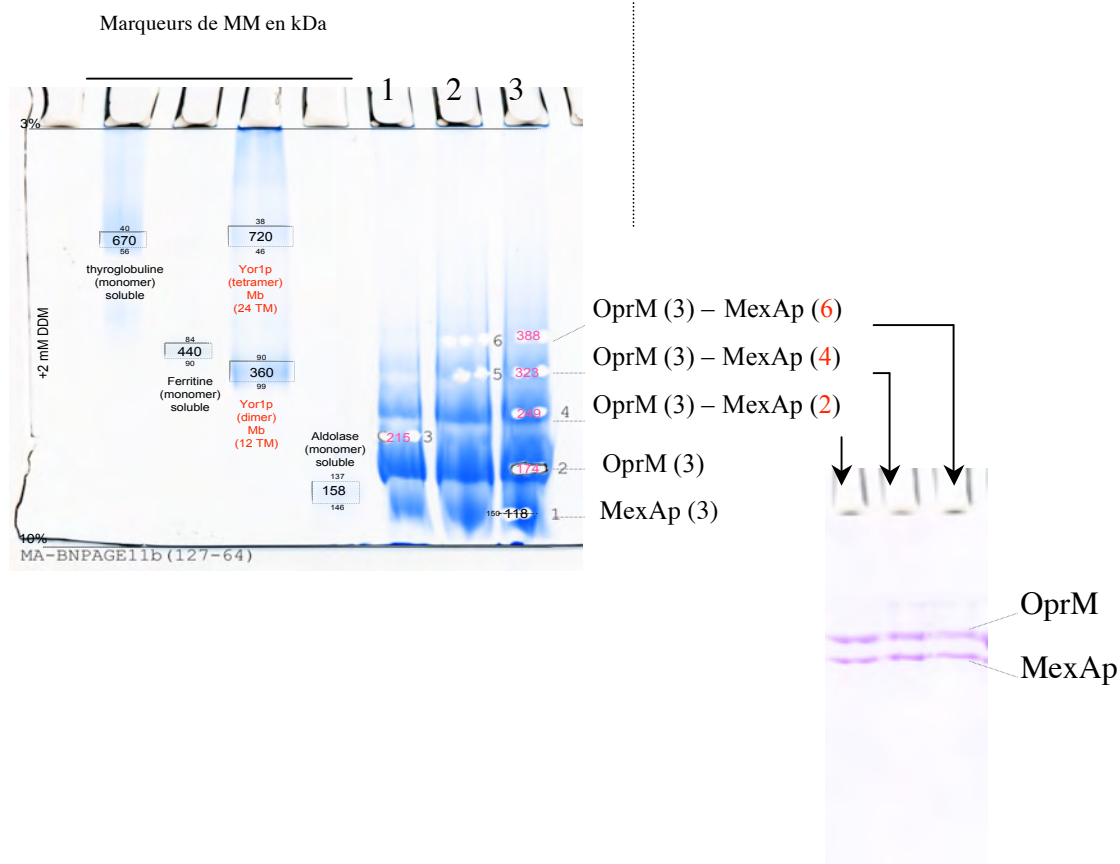
L'étude de l'interaction MFP-OMF a été entreprise avec la porine OprM et la protéine périplasmique palmitylée MexAp par chromatographie d'exclusion. Cependant, les volumes d'élution sont incroyablement biaisés par la présence du détergent. Nous avons donc poursuivi cette étude par électrophorèse en condition native BN-PAGE (*blue native polyacrylamide gel electrophoresis*). Cette technique est particulièrement intéressante dans l'étude de la structure quaternaire des protéines membranaires, puisque les protéines sont séparées seulement en fonction de leur taille et la présence de détergent n'est donc pas un facteur limitant (Heuberger *et al.*, 2002). Le colorant utilisé est le bleu G250. Il permet d'une part de conférer une même densité de charge négative aux protéines sans les dénaturer, d'autre part de solubiliser les protéines membranaires en remplaçant le détergent au cours de la migration. Notons que le détergent utilisé est préférentiellement le DDM car OprM a tendance à former des multimères en présence de β OG.

La figure suivante présente les différentes stoechiométries d'association OprM-MexAp en BN-PAGE, à différents ratios de chaque protéine. Au-delà du ratio 3 MexAp pour 1 OprM, les résultats restent les mêmes. Les bandes correspondant aux complexes sont ensuite prélevées (trous blancs sur le gel du BN-PAGE) et analysées par SDS-PAGE pour s'assurer de la présence des deux protéines MexAp et OprM.

1ère expérience : BN-PAGE

- 1 : ratio 1MexAp / 1OprM
- 2 : ratio 2MexAp / 1OprM
- 3 : ratio 3MexAp / 1OprM

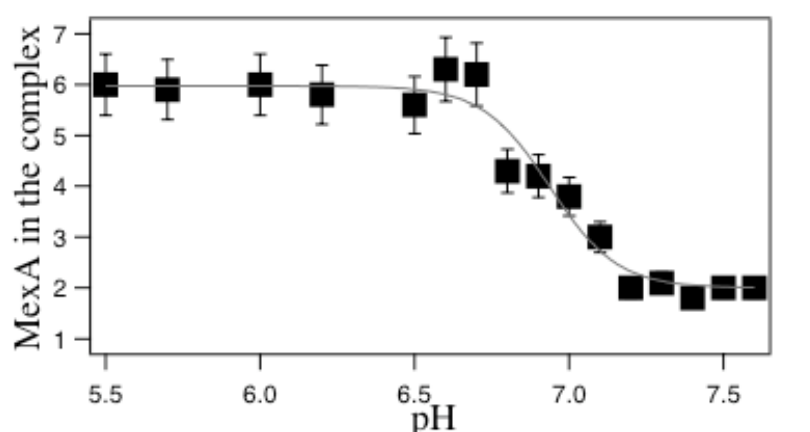
2ème expérience : SDS-PAGE



De la même façon que la protéine périplasmique seule, on constate que la stoechiométrie d'association MexAp-OprM n'est pas figée et qu'il en existerait trois : 2, 4 et 6 MexAp pour un trimère d'OprM. En supposant que la stoechiométrie d'association MFP-OMF reflète celle du complexe d'efflux entier MFP-OMF-RND, nos résultats montrent que le nombre de protéines périplasmiques ne serait pas forcément un multiple de trois et ne dépasserait pas le nombre de six pour un système d'efflux entier contrairement aux différents modèles d'assemblage proposés (Fernandez-Recio *et al.*, 2004 ; Higgins *et al.*, 2004 ; Akama *et al.*, 2004(b)).

Ces résultats concordent avec l'étude de l'interaction MexAp-OprM par la technique du FRAPP (*fluorescence recovery after fringe pattern photobleaching*). Une fois marquées avec un fluorophore (FITC) le recouvrement de fluorescence des protéines permet de remonter à leur coefficient de diffusion, lui-même relié à leur masse moléculaire. Il a été montré d'une part que le nombre de protéines MexAp varie entre 2 et 6 pour un trimère d'OprM, d'autre part que la stoechiométrie d'association dépend du pH : elle est égale à 2 quand le pH > 7,5 et égale à 6 quand le pH < 6,5 (Figure 86, Reffay *et al.*, 2008, voir la partie *Publications* de la thèse).

Figure 86 : Nombres moyens de protéines MexAp pour un trimère d'OprM en fonction du pH, déterminés par la technique du FRAPP.



Bien sûr, ces résultats doivent être confirmés par d'autres techniques comme l'ultracentrifugation analytique, la microcalorimétrie ou la spectrométrie de masse en condition native.

Notons que des spectres de masse en condition native de la porine OprM ont été réalisés mais n'étaient pas concluants à cause de la présence de détergents qui masquent les signaux relatifs à la protéine. Par ailleurs, nous devons poursuivre les analyses de BN-PAGE en présence du troisième partenaire manquant, le transporteur RND (MexB dans notre cas), que nous n'avons pas encore réussi à produire. Bien que la protéine périplasmique MFP interagisse faiblement avec le transporteur RND, il est probable que la stoechiométrie finale de l'adaptateur périplasmique soit tributaire de la présence des deux autres partenaires au même temps.

Cependant, le BN-PAGE est une technique relativement simple et rapide, consommant peu de matériel biologique et adaptée aux protéines membranaires que nous étudions. Elle nous permettra d'étudier les complexes dans différentes conditions, avec différentes mutations ou substrats afin de déterminer les conditions expérimentales qui favorisent la forme la plus stable et d'entamer les essais de cristallisation du système d'efflux entier.

LE TRANSPORTEUR MEXY

MexY est le transporteur de la membrane interne. *A priori*, les inhibiteurs des pompes d'efflux (EPI) ciblent spécifiquement cette protéine de la famille RND (*Resistance Nodulation Division*) dont le rôle est de prendre en charge sélectivement les substrats à expulser. Pour concevoir et optimiser les EPI, il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances structurales sur cette pompe. La seule structure moléculaire connue à l'heure actuelle est celle de l'archétype AcrB de la bactérie *E. coli*. Chez *P. aeruginosa*, MexY a la particularité de transporter spécifiquement les antibiotiques de la classe des aminoglycosides.

12) CLONAGE ET PRODUCTION DE MEXY

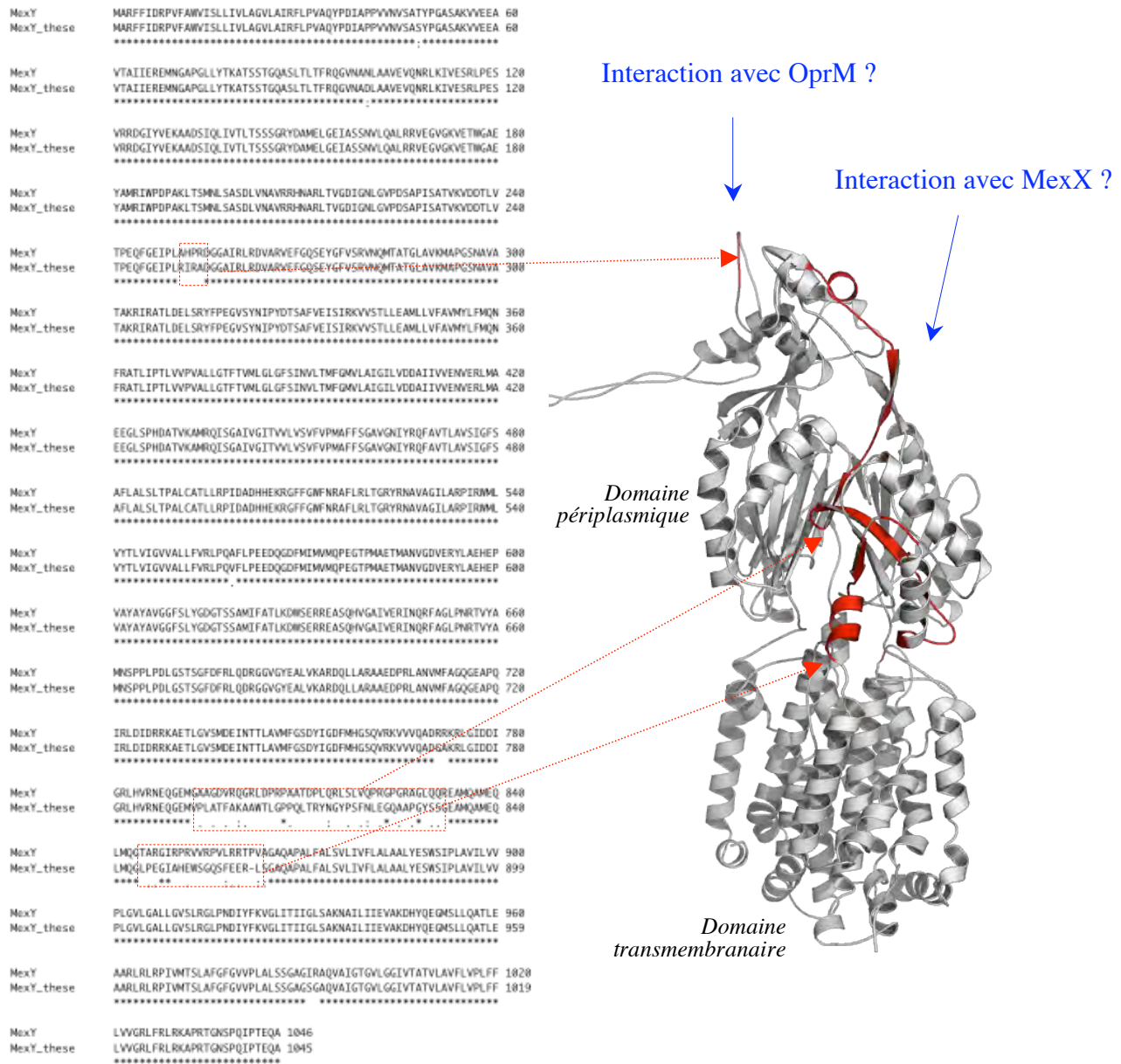
Actuellement, il y a environ 50 000 structures de protéines déposées dans la PDB dont 356 sont des protéines membranaires, soit 0,7%. Bien qu'elle soit en constante augmentation depuis les années 80 (White, 2004), la résolution structurale des protéines membranaires par cristallographie RX reste généralement un défi. La première difficulté est la surexpression des protéines membranaires en quantité suffisante pour les études structurales. Dans le cas du transporteur MexY, nous avons choisi la méthode classique de surexpression recombinante dans *E. coli* puisqu'elle s'est révélée fructueuse pour les homologues AcrB ou MexB (Murakami *et al.*, 2002 ; Mokhonov *et al.*, 2005). Cependant, malgré différentes conditions d'induction (diminution de la température de culture lors de l'induction, variation de la concentration d'inducteur, addition d'éthanol pour favoriser la production de protéines chaperonnes ou utilisation du pET28a comme autre vecteur d'expression), la surexpression de MexY s'est avérée très toxique pour la bactérie.

Il est donc nécessaire de changer la stratégie de surexpression pour MexY et plusieurs solutions sont envisagées pour lever ce problème de toxicité, comme la surexpression dans un système homologue cette fois, c'est-à-dire dans *P. aeruginosa* ou encore la co-expression de MexY avec son partenaire périplasmique MexX (Mokhonova *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans le cas d'une stratégie de production dans *E. coli* et d'une purification *via* une étiquette d'histidines, il serait préférable d'utiliser une souche délétée du gène codant pour AcrB. En effet, celui-ci s'accroche naturellement sur la résine de nickel et peut être un contaminant de la purification (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2007). De plus, cela permettrait de diminuer l'encombrement stérique de la membrane interne qui peut être une des causes de toxicité lors de la surexpression.

13) MODELISATION DE LA STRUCTURE DE MEXY

AcrB est le seul représentant de la famille des transporteurs RND dont 24 structures à haute résolution ont été publiées dans la PDB. Le taux d'identité élevé entre AcrB et MexY (50%) nous a permis d'obtenir un bon modèle structural de ce dernier par homologie à l'aide du programme MODELLER (Sali & Blundell, 1993 ; Fiser & Sali, 2003).

Figure 87 : Alignement de séquences des isoformes de MexY (les résidus identiques sont indiqués par une étoile) et localisation des régions divergentes sur un modèle structural de MexY obtenu avec le programme Modeller.



Nous avons choisi la structure 2DRD (Murakami *et al.*, 2006) comme modèle support qui correspond à la structure asymétrique d'AcrB la plus complète.

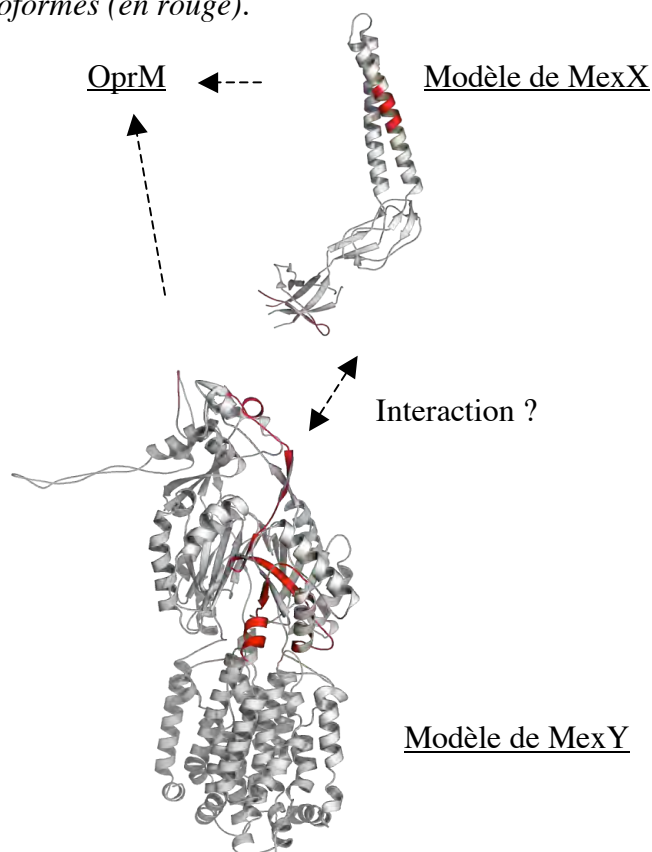
De la même façon que MexX, nous avons une isoforme de MexY qui présente 98% d'identité avec la séquence issue des banques de données. L'alignement de séquences entre les deux isoformes et les régions qui diffèrent sont reportées en rouge sur la figure 87. On note que ces régions peuvent potentiellement interagir avec la porine OprM (boucle de l'extrémité supérieure) ou la protéine périplasmique MexX.

Par ailleurs, malgré le haut taux d'identité des deux isoformes, les pH_i sont très différents :

	MexY (banque de données)	MexY (thèse)
Nombre de résidus	1046	1045
pH_i	9.5	6.1

Les mêmes écarts de pH_i ont été observés dans le cas des isoformes de MexX, suggérant d'une part que ces régions variables soient probablement impliquées dans l'interaction MexX-MexY (Figure 88), d'autre part que cette interaction soit de nature électrostatique.

Figure 88 : Régions d'interaction supposée entre MexX et MexY sur la base des différences de séquence entre les isoformes (en rouge).



14) ANALYSE DES MUTANTS CLINIQUES DE MEXY

Un mutant clinique de *P. aeruginosa* (souche 2804) issu d'un patient atteint de mucoviscidose présente une résistance accrue à la gentamicine (antibiotique de la famille des aminoglycosides) par rapport à la souche sauvage PAO1 (Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI 64 fois plus élevée que la souche sauvage), mais aussi par rapport à la souche MutGR1 qui surexprime le gène de MexY (CMI 2 fois plus élevée que la souche sauvage). Cette résistance est liée à deux substitutions dans MexY : F1018L et T543A.

Souche	CMI de la gentamicine (mg/l)	Mutation dans MexY	Mutation dans MexZ (régulateur)
PAO1 (témoin)	1	-	-
MutGR1	2	-	C307T (surexpression de MexY)
2804	64	F1018L et T543A	-
3066	1	F29S	-

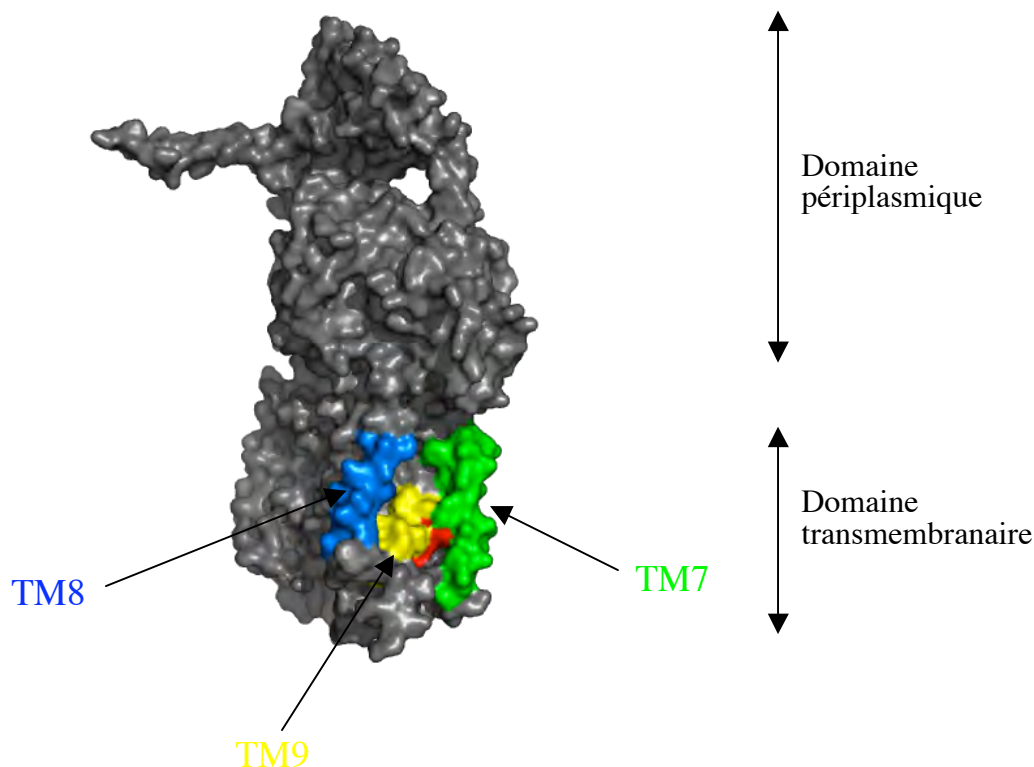
CMI = concentration minimale inhibitrice

(Collaboration avec Catherine Llanes, Laboratoire de Bactériologie, EA 3186, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Besançon).

Pour comprendre comment des mutations ponctuelles dans le transporteur MexY peuvent améliorer considérablement son activité d'efflux, nous avons analysé les résidus en question sur le modèle structural. Les deux résidus sont localisés à proximité, dans le domaine transmembranaire, au niveau d'une cavité délimitée par les hélices TM7, TM8 et TM9 (Figure 89). F1018 est porté par TM12 et T543 se trouve sur TM7. La cavité en question est supposée être une voie d'entrée des substrats issus du cytosol ou de la membrane lipidique (Sennauser *et al.*, 2007).

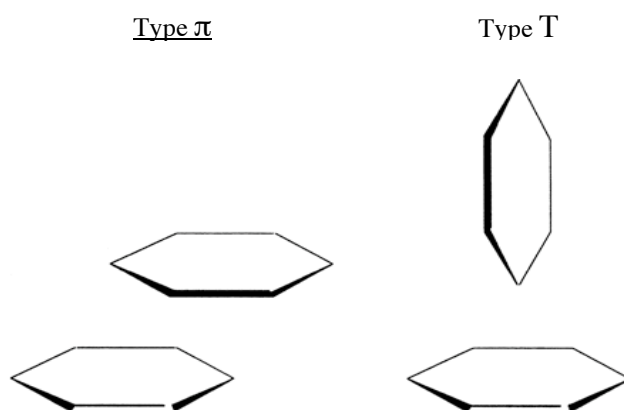
Les facteurs de température des différentes structures cristallographiques d'AcrB sont souvent très élevés, au voisinage de 100 Å². La correction de ces facteurs de température à travers les modes normaux a mis en évidence les régions « réellement » agitées, dont l'hélice α TM7 qui présente un facteur d'agitation moyen supérieur à 50 Å² (Lu *et al.*, 2006). Cette hélice TM7 a probablement un rôle biologique important dans les changements conformationnels du transporteur.

Figure 89 : Localisation des mutants ponctuels F1018L et T543A (en rouge) sur un monomère de MexY représenté en surface de van der Waals.



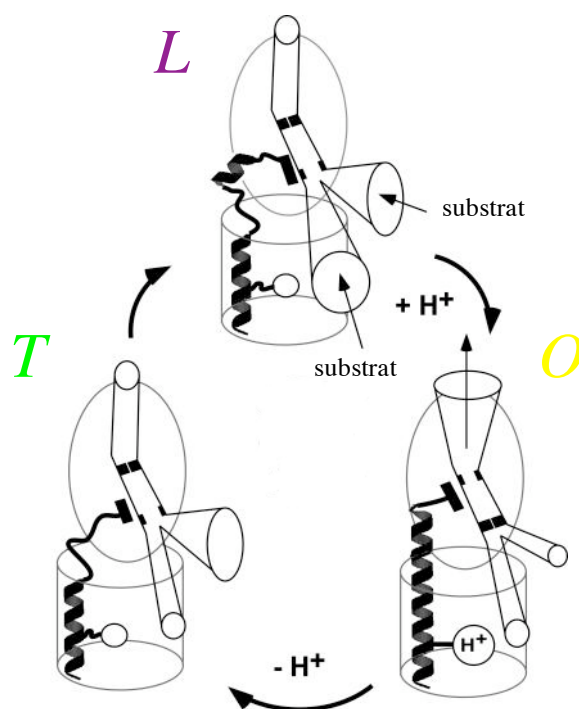
Contrairement à T543, F1018 est un résidu bien conservé (voir la partie *Annexe* de la thèse). Cette phénylalanine interagit avec un autre résidu aromatique conservé, Y542 qui est localisé sur TM7. Les cycles aromatiques dans les protéines interagissent de deux façons : soit par une interaction de type π (empilement parallèle des cycles), soit par une interaction de type T (plan des cycles perpendiculaires). Les interactions de type π sont 0,5 - 0,75 kcal/mole plus stables que les interactions de type T (Figure 90, [McGaughey et al., 1998](#)).

Figure 90 : Schéma des interactions de type π et T entre les cycles aromatiques ([McGaughey et al., 1998](#)).



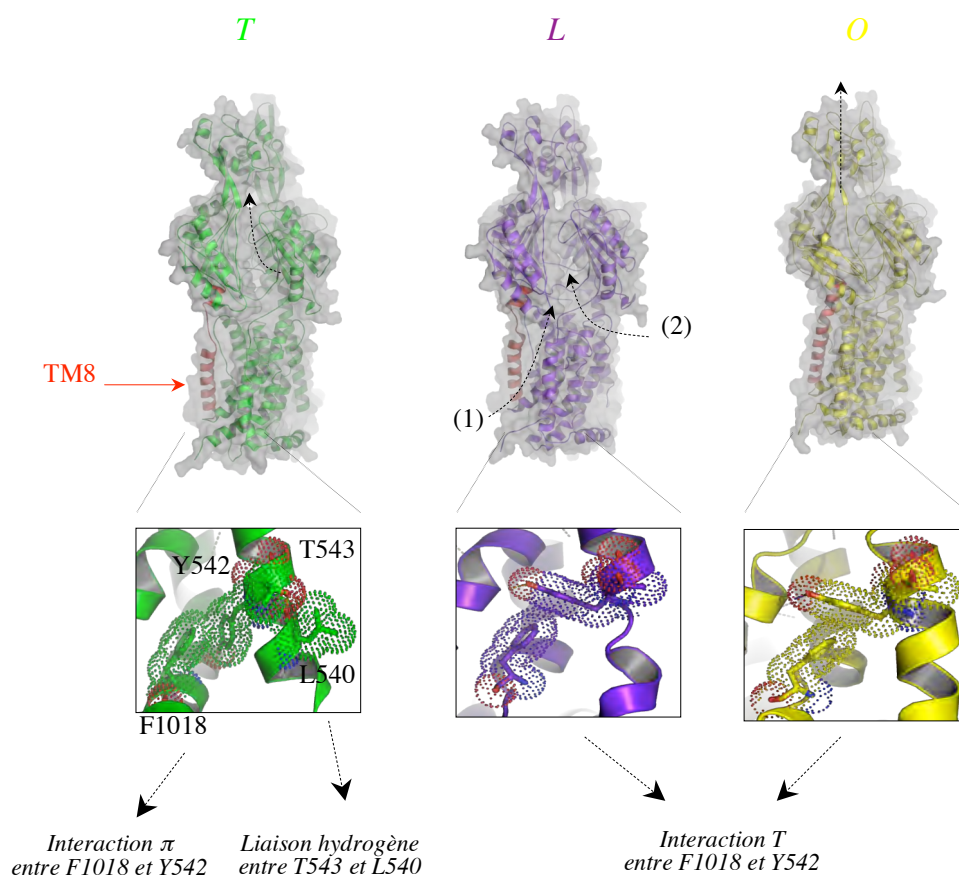
La structure asymétrique du trimère d'AcrB a permis de proposer un mécanisme d'efflux rotatif où chaque protomère alterne avec trois conformations différentes (Murakami *et al.*, 2006 ; Seeger *et al.*, 2006 ; Sennhauser *et al.*, 2007) : une conformation « rigide » (T pour *tight*) où l'entrée des substrats est restreinte, une conformation « relâchée » (L pour *loose*) où les substrats, issus du périplasma ou du cytosol, sont pris en charge et une conformation « ouverte » (O pour *open*) où le pore central s'ouvre pour évacuer le substrat vers l'extérieur de la pompe (Figure 91). Ce modèle d'efflux péristaltique a été conforté par des expériences de *cross-link* à l'interface des domaines en mouvement (Seeger *et al.*, 2008).

Figure 91 : Modèle rotatif d'efflux d'AcrB proposé par Sennhauser *et al.* (2007). Chacun des trois protomères du transporteur adopte la conformation T (*tight*), L (*loose*) ou O (*open*). Chaque conformation est schématisée sur un protomère avec les voies d'entrée et de sortie, ouvertes ou non selon la conformation. L'hélice α TM8 (impliquée dans le flux de protons) est mise en évidence.



Au niveau de la forme T, nous constatons d’une part que les résidus F1018 et Y542 interagissent de façon π , d’autre part que la chaîne latérale de T543 établit une liaison hydrogène intra-hélicale avec le carboxyl du C α de la L540, au sein de TM7 (Figure 92). Ces conformations particulières des résidus sont probablement nécessaires à la stabilisation de la forme T du protomère. Il est donc possible que les substitutions F1018L ou T543A défavorisent cette conformation T, auquel cas seules les conformations L et O seront adoptées. Cela aurait pour conséquence une sur-activation du transporteur où l’efflux des substrats serait accéléré, d’où une résistance accrue aux antibiotiques.

Figure 92 : Représentation des différentes conformations d’un protomère de MexY avec une vue sur les entrées cytosoliques (1) et périplasmique (2) des substrats. Les voies d’acheminement supposées sont indiquées par des flèches en pointillé. L’hélice TM8 est représentée en rouge. Un agrandissement de la région des mutants F1018L et T543A est représenté en dessous.



15) LA SELECTIVITE DES SUBSTRATS

AcrB présente respectivement 70% et 50% d'identité avec MexB et MexY. De la même façon que MexB, AcrB prend en charge différents substrats, de structures très variées, conférant ainsi une résistance multiple aux antibiotiques et aux antiseptiques chez *E. coli*. MexY a un spectre d'action beaucoup moins étendu. Le tableau ci-dessous résume les différents substrats des pompes d'efflux MexAB-OprM, MexXY-OprM et AcrAB-TolC (Li & Nikaido, 2004) :

MFP	RND	OMF	Substrats
MexA	MexB	OprM	BL, CM, ML, NO, TM, TC, FQ. TR, AC. CV, EB. SDS.
AcrA	AcrB	TolC	BL, CM, ML, NO, RF. AC. CV, EB. SB, AG, TX.
MexX	MexY	OprM	AG, ML, TC.

Antibiotiques : BL = β -lactame ; CM = chloramphénicol ; ML = macrolide ; NO = novobiocine ; TM = triméthoprime ; TC = tétracycline ; RF = rifampicine ; FQ = fluoroquinolones ; AG = aminoglycosides.

Antiseptiques : TR = triclosan ; AC = acriflavine.

Colorants : EB = bromure d'éthidium ; CV = cristal violet ; RD = rhodamine.

Détergent : SDS = sodium dodécyl sulfate ; SB = sel biliaire ; AG = acide gras ; TX = triton X100.

Cependant, MexXY-OprM se démarque des autres pompes d'efflux en transportant les aminoglycosides. La raison de cette spécificité vis-à-vis de cette classe d'antibiotiques n'est pas triviale. Par exemple, la distribution électrostatique d'AcrB et de MexY est très semblable (Figure 93). Les cavités de fixation des substrats sont majoritairement neutres au niveau de la cavité centrale et électronégatives au niveau du domaine périplasmique (Figure 94).

Figure 93 : Surfaces électrostatiques de la structure cristallographique d'AcrB (code PDB 2DRD) et du modèle structural par homologie de MexY.

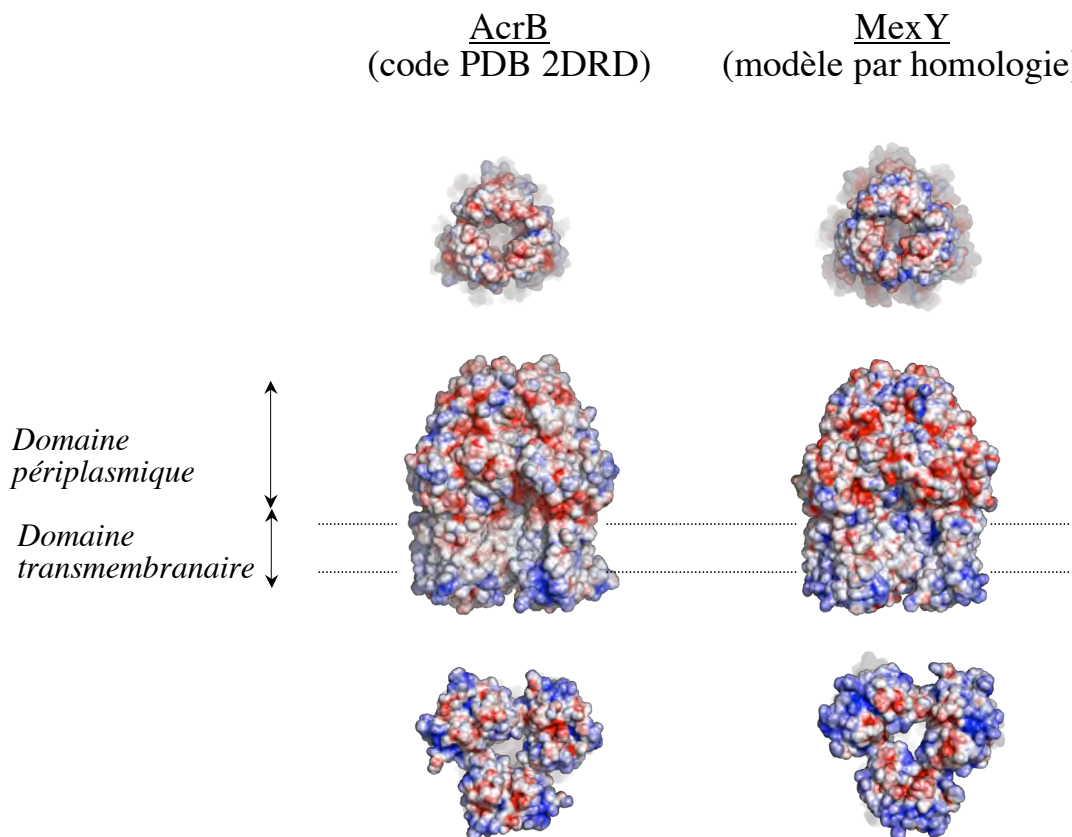
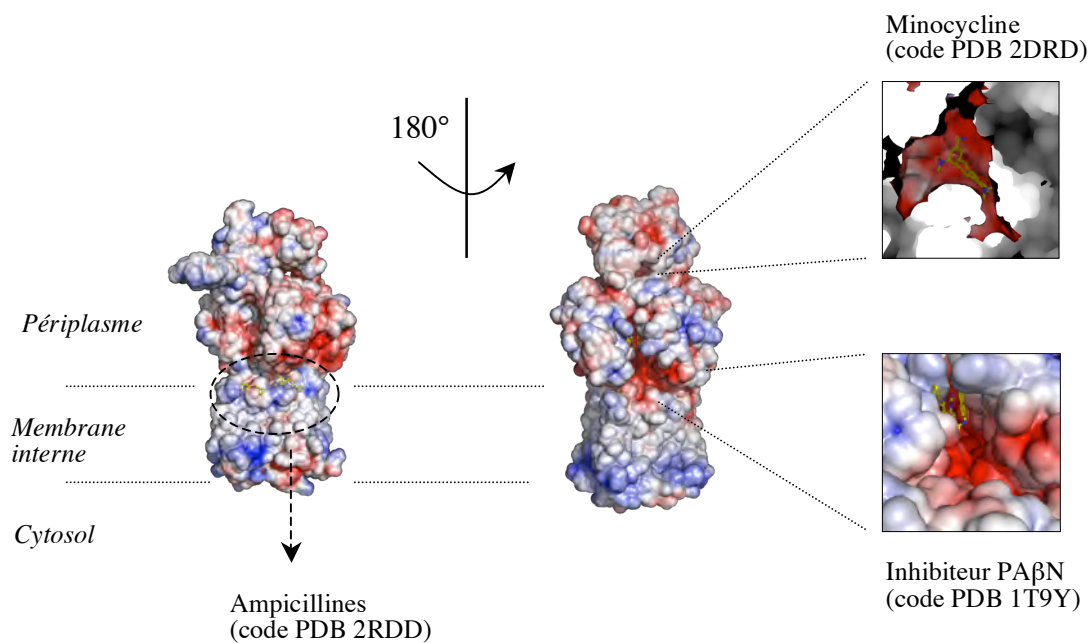


Figure 94 : Localisation des sites de fixation des différents ligands co-cristallisés avec AcrB.

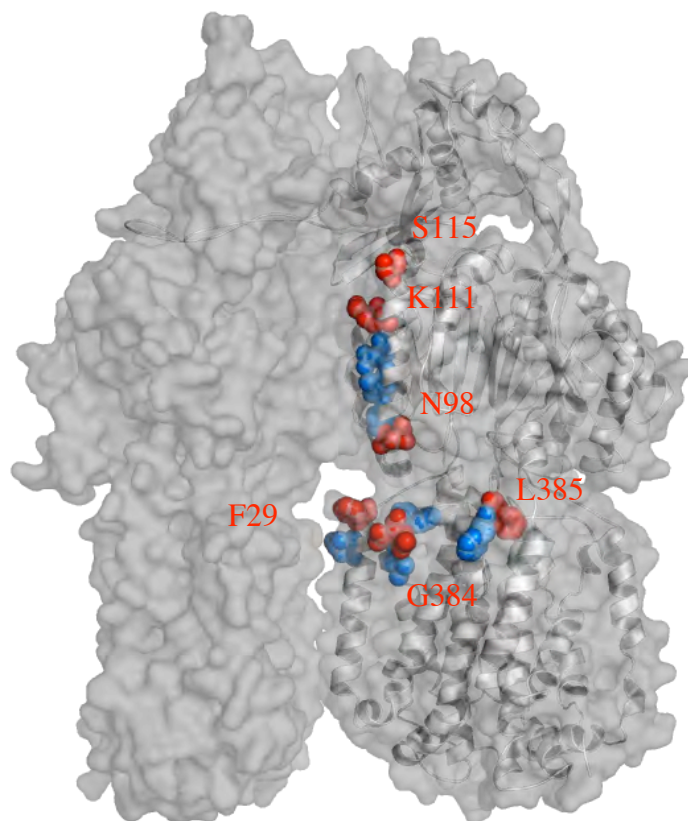


Par ailleurs, lorsque l'on compare les *clusters* des résidus impliqués dans l'interaction avec le substrat entre MexB, AcrB et MexY (Tableau 7, [Hernandez-Mendoza et al., 2007](#)), seulement sept (F29, N98, K111, S115, G384, L385 et F458) sont spécifiques de MexY et ne permettent pas d'expliquer de façon triviale la sélectivité de MexY pour des aminoglycosides. Pour s'en assurer, il serait nécessaire de muter ces résidus et de voir si la pompe est toujours capable d'expulser les aminoglycosides. Cependant, d'autres résidus probablement en contact avec les substrats, comme la cavité périplasmique ou la cavité transmembranaire, ne sont pas inclus dans ce *cluster*.

Tableau 7 : Comparaison des *clusters* de résidus impliqués dans la fixation des ligands au sein des transporteurs AcrB, MexB et MexY ([Hernandez-Mendoza et al., 2007](#)). Les résidus conservés sont indiqués en bleu et les résidus spécifiques à MexY sont en rouge.

AcrB	MexB	MexY
L25	L25	L25
K29	K29	F29
D99	D99	N98
D101	D101	D100
V105	V105	V104
N109	N109	N108
Q112	Q112	K111
P116	P116	S115
V382	V382	V381
A385	A385	G384
F386	F386	L385
F388	F388	F387
F458	F458	F457
F459	F459	F458

La figure ci-dessous représente ces résidus du *cluster* à l'intérieur du modèle structural de MexY. Les résidus conservés sont en bleu et les résidus spécifiques à MexY sont en rouge :



Notons que la substitution F29S, localisée à l'entrée du vestibule périplasmique de MexY, n'affecte pas l'activité du transporteur vis-à-vis de la gentamicine (souche clinique 3066, voir tableau page 218).

Au-delà du transporteur RND seul, la sélectivité des substrats doit probablement être considérée à l'échelle du système d'efflux entier, c'est-à-dire en présence de la protéine périplasmique MFP et de la porine OMF. L'assemblage du système d'efflux entier ne semble pas obéir à une loi de « tout ou rien », mais suit un certain degré de flexibilité (Krishnamoorthy *et al.*, 2008). La spécificité et l'efficacité d'efflux d'une pompe dépendent probablement de cette flexibilité.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est l'une des causes principales des infections nosocomiales. Elle présente une capacité remarquable à acquérir de nouvelles résistances aux antibiotiques, ce qui en fait un agent pathogène redoutable en milieu hospitalier. Cette résistance acquise est essentiellement la conséquence d'une synergie entre la diminution de la perméabilité membranaire, liée à la perte ou à l'altération de la porine OprD, et la surexpression (ou encore l'hyper-activation) des pompes d'efflux membranaire de la famille RND, en particulier les pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM. Une même pompe d'efflux est capable de transporter des substrats de structures et de natures très différentes, contribuant en grande partie au phénotype de multi-résistance aux antibiotiques ou MDR (*MultiDrug Resistance*), donc à l'échec thérapeutique. Face à l'émergence de souches hospitalières résistantes, l'inhibition des pompes d'efflux apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse, permettant de restaurer ou de préserver l'efficacité des antibiotiques existants ou à venir. La conception de ces nouveaux inhibiteurs appelés EPI (*Efflux Pump Inhibitor*) par une approche rationnelle nécessite une connaissance approfondie de la structure moléculaire de ces systèmes d'efflux et de leur interaction avec les différents substrats. Dans le cadre de la thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude structurale du système d'efflux MexXY-OprM qui a la particularité d'être spécifique au transport des aminoglycosides.

La porine OprM est-elle impliquée dans la sélection des antibiotiques ?

La structure cristallographique de la porine OprM dans un groupe d'espace sans symétrie d'ordre 3 a permis de résoudre la structure des trois monomères indépendamment. Contrairement au transporteur AcrB où la même stratégie de résolution structurale a permis d'observer une asymétrie entre les trois protomères et de proposer un mécanisme d'efflux, les monomères d'OprM ne présentent pas de différences structurales significatives sur leur squelette C α . Cependant, des différences ponctuelles sont observées au niveau de la chaîne latérale de quelques résidus, fonctionnellement importants pour certains. Ces différences fines ne sont probablement pas négligeables puisqu'il a été montré que des mutations ponctuelles de la porine OMF suffisent à modifier l'assemblage, donc le fonctionnement du système d'efflux tripartite (Nehme & Poole, 2007 ; Lobedanz *et al.*, 2007 ; Bokma *et al.*, 2006 ; Vedyappan *et al.*, 2006). Des études fonctionnelles de mutagenèse dirigée sont donc à prévoir afin de vérifier l'implication de ces résidus d'OprM nouvellement décrits et potentiellement importants dans l'interaction d'OprM avec ses partenaires.

Par ailleurs, une même porine est capable de fonctionner avec plusieurs pompes transportant des substrats différents. C'est le cas de la porine OprM qui fonctionne avec MexAB, MexJK, MexMN, MexVW ou MexXY. Logiquement, il était admis que la seule fonction de la porine était de former un conduit à travers le périplasma et la membrane externe pour l'expulsion des substrats. Cependant, il a récemment été montré que la sélection du substrat pouvait également se faire en fonction de la porine : c'est le cas du système d'efflux MexJK qui fonctionne principalement avec OprM pour transporter l'érythromycine et la tétracycline, mais n'est capable de transporter le triclosan qu'en association avec la porine OpmH (Chuanhuen *et al.*, 2005). Le rôle de la porine ne serait alors pas si trivial dans la sélection et l'efflux des substrats, des interactions spécifiques à l'intérieur du canal pourraient avoir lieu expliquant ainsi la sélectivité possible des substrats vis-à-vis de la porine, et non du transporteur seul. Cette hypothèse peut paraître étonnante à première vue puisqu'il n'existe pas de cavité dédiée à la fixation du substrat au sein du canal. Mais nous avons obtenu au laboratoire de nouvelles conditions de cristallisation d'OprM en présence de différents antibiotiques, en l'occurrence le chloramphénicol, l'ampicilline, la tétracycline et la kanamycine. En attendant la résolution structurale de ces cristaux, nous faisons l'hypothèse qu'il existe une interaction spécifique entre OprM et les antibiotiques. Cela ouvre donc une nouvelle perspective quant au rôle de la porine dans l'efflux du substrat. Afin de vérifier l'interaction de l'antibiotique avec OprM par cristallographie, les cristaux obtenus doivent être améliorés. En effet, les problèmes redondants des cristaux d'OprM sont leur anisotropie et leur faible pouvoir de diffraction. Cette amélioration pourrait être obtenue en éliminant au cours d'un nouveau clonage les 13 résidus C-terminaux d'OprM qui ne sont pas visibles dans la structure cristallographique native et qui sont donc probablement flexibles et gênants à l'agencement cristallin. Ce cas de figure a déjà été rencontré pour la porine homologue TolC où la suppression de 43 résidus C-terminaux a permis de résoudre sa structure cristallographique (Koronakis *et al.*, 2000). Parallèlement, des expériences de microcalorimétrie sont prévues pour mettre en évidence une interaction spécifique entre OprM et les antibiotiques.

La structure cristallographique d'OprM résolue au cours de ma thèse montre une organisation asymétrique de la couche d'hydratation tapissant la paroi interne de la porine alors que la protéine est homotrimérique. Pourquoi les molécules d'eau s'organisent-elles différemment d'un monomère à l'autre ? La répartition des molécules d'eau peut-elle être l'empreinte des sites de fixation des groupements polaires des substrats ?

Si tel était le cas, la porine ne serait pas simplement une voie de passage, mais acheminerait également les substrats par le biais d'interactions au sein du canal. La modélisation du comportement des molécules d'eau dans la porine par dynamique moléculaire pourrait révéler le mécanisme de transit des substrats si l'on admettait qu'ils suivent le même parcours que les molécules d'eau en contact avec la protéine.

Un nouveau modèle d'ouverture de la porine

Jusqu'à récemment, les structures cristallographiques des OMF, à savoir TolC, OprM et VceC, ont été résolues dans leur état fermé. Des modèles ouverts obtenus par construction manuelle ont été proposés et, très récemment, les structures cristallographiques de deux mutants de TolC ont montré un état d'ouverture partiel de la porine qui conforte un mécanisme d'ouverture comparable à un iris (Bavro *et al.*, 2008). Cependant, aucune étude dynamique sur le mécanisme d'ouverture n'a été proposée jusqu'à présent. En collaboration avec le professeur Catherine Etchebest (Université Paris 7), nous avons réalisé l'analyse de TolC et d'OprM à travers les modes normaux, ce qui nous a permis de proposer un mécanisme d'ouverture sur l'ensemble de la protéine et un modèle final ouvert. Ces nouveaux modèles ouverts permettront d'élaborer des nouveaux modèles d'assemblage du système d'efflux entier dont les structures cristallographiques sont connues, en l'occurrence TolC avec ses partenaires AcrA et AcrB ou OprM avec MexA, par des expériences d'amarrage *in silico* (ou *docking*) et de les comparer aux études précédentes (Fernandez-Recio *et al.*, 2004). En outre, il serait intéressant de confronter notre modèle ouvert de la porine avec une étude de l'ouverture par dynamique moléculaire. L'intérêt de la dynamique moléculaire, par rapport à la dynamique vibrationnelle, est de pouvoir observer le mouvement des boucles potentiellement importantes dans les interactions, notamment au niveau du domaine équatorial et du tonneau β . Mais la modélisation par cette approche d'une protéine de la taille de nos porines, qui plus est dans une membrane lipidique, reste un défi. Il serait alors tentant d'étudier séparément le domaine β du domaine α , deux domaines bien distincts de la porine, et de voir leur mouvement respectif indépendamment l'un de l'autre. Une étude sur l'ouverture du canal mécanosensible MscL par dynamique moléculaire dans une bicouche lipidique modèle a été réalisée avec succès (Debret *et al.*, 2008). Il serait intéressant de transposer cette stratégie dans notre cas, sur le tonneau β d'OprM seul (ou de TolC) qui est le domaine transmembranaire de la protéine, et d'étudier l'influence possible des lipides sur le mécanisme d'ouverture.

La protéine périplasmique serait à la fois structurée et non-structurée

La structure et la fonction du domaine C-terminal, constitué d'une centaine de résidus, restent à élucider. Nos résultats préliminaires sur le domaine C-terminal isolé de MexX nous ont permis de constater qu'il s'agirait d'une protéine de la famille des IUP (*Intrinsically Unstructured Protein*), c'est-à-dire des protéines solubles sans structure intrinsèque en absence de partenaire, donc particulièrement flexibles. Cette constatation est en accord avec la fonction adaptatrice de la protéine périplasmique qui doit être particulièrement flexible pour consolider le système d'efflux entier. De plus, cela expliquerait pourquoi ce domaine C-terminal n'est pas visible dans la structure cristallographique de l'homologue MexA. D'autres expériences, comme le dichroïsme circulaire, la protéolyse ménagée, la résistance à la chaleur ou encore la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) doivent être réalisées sur ce domaine pour mieux caractériser l'absence de structure secondaire et sa faible compacité. Ce domaine C-terminal adopte probablement une structure en présence de ses partenaires protéiques OprM et MexY, et pourquoi pas en présence de la membrane lipidique ou des substrats. Il serait intéressant de rechercher les conditions biochimiques favorisant son repliement *in vitro* en ajoutant par exemple des antibiotiques, des lipides ou des solvants organiques connus pour forcer artificiellement la structure des protéines, comme le TFE (*trifluoroethanol*) ou le méthanol. La taille relativement petite de ce domaine (environ 10 kDa) nous permet d'aborder cette étude par RMN, parallèlement à la cristallographie.

Vers la conception et l'optimisation rationnelles d'inhibiteurs du système d'efflux MexXY-OprM

La première structure cristallographique d'AcrB en 2002 a révélé quatre cavités que les substrats doivent probablement emprunter lors de leur efflux, avec une entrée cytosolique ou périplasmique. Par la suite, plusieurs structures cristallographiques d'AcrB en complexe avec différents ligands dont un inhibiteur, le PA β N (Phe-Arg β -naphtylamide), ont été obtenues. Ces données structurales ouvrent ainsi la voie à la conception et/ou à l'optimisation *in silico* d'inhibiteurs des pompes d'efflux (EPI). Dans le cadre de la thèse, un modèle structural de MexY a été obtenu par homologie avec AcrB. Ce modèle permettra de simuler la fixation des inhibiteurs connus pour agir sur MexY, en l'occurrence les analogues des fluoroquinolones, les peptidomimétiques et les pyridopyrimidines (Mahamoud *et al.*, 2007). On pourrait ainsi identifier des groupes pharmacophoriques clés et proposer des dérivés d'inhibiteurs présentant une affinité améliorée vis-à-vis de cette pompe.

Suite à leur synthèse chimique, l'activité biologique de ces nouvelles molécules devra être testée sur des souches sauvages, des souches mutantes et des isolats cliniques de *P. aeruginosa* surexprimant MexXY-OprM ou exprimant une forme hyperactive de la même pompe, en l'occurrence la souche 2804 (collaboration avec Catherine Llanes de l'équipe du professeur Patrick Plésiat, au CHU de Besançon) qui a été étudiée dans le cadre de la thèse.

Les données structurales actuelles montrent que les interactions entre les ligands et la pompe AcrB sont essentiellement de nature hydrophobe, donc peu spécifique *a priori*. De plus, le positionnement des différents ligands ne révèle probablement pas encore toutes les possibilités de fixation. Il est donc nécessaire de poursuivre nos efforts sur la résolution structurale par cristallographie de MexY, et plus généralement sur les pompes d'efflux chez *P. aeruginosa* et d'obtenir la structure des complexes avec différents substrats ou inhibiteurs afin de mieux caractériser les interactions et de comprendre la spécificité d'action d'une pompe vis-à-vis des antibiotiques. Pour cela, la stratégie de production de MexY doit être modifiée puisque sa surexpression dans *E. coli* est toxique. Ce problème pourrait être levé soit en produisant la protéine dans un système d'expression homologue cette-fois, donc dans *P. aeruginosa*, soit en co-exprimant MexY avec MexX (Mokhonova *et al.*, 2005) ou soit en utilisant une souche d'expression *E. coli* délétée du gène d'AcrB afin de diminuer l'encombrement stérique de la membrane interne de la bactérie.

Par ailleurs, contrairement à ce que l'on pouvait attendre, les structures cristallographiques d'AcrB et le modèle structural par homologie de MexY ne montrent pas de différence suffisamment significative pour expliquer la sélectivité des substrats. Cela nous invite à penser qu'il n'y a pas de contact précis et rationnel, mais plutôt une malléabilité des poches de fixation du transporteur vis-à-vis des substrats, d'où une polyvalence des ligands efflués par le même transporteur. De plus, il est possible que les inhibiteurs des pompes d'efflux ne ciblent pas seulement le transporteur de la membrane interne, mais également les autres partenaires protéiques. Ces inhibiteurs n'entreraient donc pas en compétition avec le substrat, mais fragiliseraient la formation du complexe d'efflux membranaire. À ce jour, les structures cristallographiques de chaque partenaire du système d'efflux archétype AcrAB-TolC sont connues, mais la stoechiométrie d'assemblage de la protéine périplasmique reste incertaine, et cela probablement tant que la structure cristallographique de la pompe entière ne sera pas résolue.

En attendant, nous avons entamé des études d'assemblage, en l'occurrence entre la protéine périplasmique MexA et la porine OprM, par des méthodes adaptées aux macromolécules membranaires (BN-PAGE et FRAPP en collaboration Myriam Reffay du laboratoire de Physique Statistique de l'ENS Ulm, dirigé par le professeur Wladimir Urbach). Les premiers résultats nous ont permis de constater une stoechiométrie d'interaction de 2 à 6 monomères de MexA pour un trimère d'OprM, selon le pH utilisé (Reffay *et al.*, 2008). Ces mêmes expériences devront être réalisées en présence du transporteur RND qui reste à produire. Parallèlement, il serait intéressant de confronter ces résultats avec d'autres techniques d'interaction moléculaire comme la résonance des plasmons de surface (technique du *Biacore*), l'ultracentrifugation analytique ou la microcalorimétrie. L'information sur la stoechiométrie d'assemblage est importante car la conception de futurs inhibiteurs de pompes à efflux ne devrait peut-être pas cibler uniquement le transporteur RND, mais également l'assemblage de la pompe d'efflux entière.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., and Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science N.Y.* 301, 610-615.

Aires, J.R., Kohler, T., Nikaido, H., and Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 2624-2628.

Akama, H., Kanemaki, M., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2005). Preliminary crystallographic analysis of the antibiotic discharge outer membrane lipoprotein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* with an exceptionally long unit cell and complex lattice structure. *Acta crystallographica* 61, 131-133.

Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004(a)). Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *The Journal of biological chemistry* 279, 52816-52819.

Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004(b)). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* 279, 25939-25942.

Andersen, C., Koronakis, E., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C., and Koronakis, V. (2002). Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11103-11108.

B

Babic, M., Hujer, A.M., and Bonomo, R.A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* 9, 142-156.

Bahar, I., Atilgan, A.R., and Erman, B. (1997). Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. *Folding & design* 2, 173-181.

Bahar, I., and Rader, A.J. (2005). Coarse-grained normal mode analysis in structural biology. *Current opinion in structural biology* 15, 586-592.

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10037-10041.

Bavro, V.N., Pietras, Z., Furnham, N., Perez-Cano, L., Fernandez-Recio, J., Pei, X.Y., Misra, R., and Luisi, B. (2008). Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Molecular cell* 30, 114-121.

Beinlich, K.L., Chuanchuen, R., and Schweizer, H.P. (2001). Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* 198, 129-134.

Biswas, S., Mohammad, M.M., Patel, D.R., Movileanu, L., and van den Berg, B. (2007). Structural insight into OprD substrate specificity. *Nature structural & molecular biology* 14, 1108-1109.

Bohnert, J.A., and Kern, W.V. (2005). Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 849-852.

Bokma, E., Koronakis, E., Lobedanz, S., Hughes, C., and Koronakis, V. (2006). Directed evolution of a bacterial efflux pump: adaptation of the *E. coli* TolC exit duct to the *Pseudomonas MexAB* translocase. *FEBS letters* 580, 5339-5343.

Broutin, I., Benabdelhak, H., Moreel, X., Lascombe, M.B., Lerouge, D., and Ducruix, A. (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the outer membrane efflux proteins OprM and OprN from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta crystallographica* 61, 315-318.

Brown, M.H., Paulsen, I.T., and Skurray, R.A. (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology* 31, 394-395.

Brünger, A.T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-474.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921.

Buchanan, S.K. (1999). Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Current opinion in structural biology* 9, 455-461.

C

Calladine, C.R., Sharff, A., and Luisi, B. (2001). How to untwist an alpha-helix: structural principles of an alpha-helical barrel. *Journal of molecular biology* 305, 603-618.

Cao, L., Srikumar, R., and Poole, K. (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Molecular microbiology* 53, 1423-1436.

CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-763.

Charbonnier, F., Kohler, T., Pechere, J.C., and Ducruix, A. (2001). Overexpression, refolding, and purification of the histidine-tagged outer membrane efflux protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein expression and purification* 23, 121-127.

Chevalier, J., Atifi, S., Eyraud, A., Mahamoud, A., Barbe, J., and Pages, J.M. (2001). New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Journal of medicinal chemistry* 44, 4023-4026.

Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260 ; second page, table of contents.

Chothia, C., and Lesk, A.M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *The EMBO journal* 5, 823-826.

Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R., and Schweizer, H.P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 428-432.

Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., and Schweizer, H.P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 2133-2136.

Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *Journal of bacteriology* 184, 5036-5044.

Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature reviews* 2, 363-378.

Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature biotechnology* 14, 315-319.

Crick, F.H.C. (1953). The packing of alpha-helices : simple coiled-coils. *Acta Cryst.* 6, 689-697.

Crowther, R.A., and Blow, D.M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Cryst.* 23, 544-548.

D

D'Argenio, D.A., and Miller, S.I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology (Reading, England)* 150, 2497-2502.

Das, D., Xu, Q.S., Lee, J.Y., Ankoudinova, I., Huang, C., Lou, Y., DeGiovanni, A., Kim, R., and Kim, S.H. (2007). Crystal structure of the multidrug efflux transporter AcrB at 3.1Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids. *Journal of structural biology* 158, 494-502.

Dauter, Z. (2005). Efficient use of synchrotron radiation for macromolecular diffraction data collection. *Progress in biophysics and molecular biology* 89, 153-172.

Dean, C.R., Narayan, S., Daigle, D.M., Dzink-Fox, J.L., Puyang, X., Bracken, K.R., Dean, K.E., Weidmann, B., Yuan, Z., Jain, R., and Ryder, N.S. (2005). Role of the AcrAB-TolC efflux pump in determining susceptibility of *Haemophilus influenzae* to the novel peptide deformylase inhibitor LBM415. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 3129-3135.

Debret, G., Valadie, H., Stadler, A.M., and Etchebest, C. (2008). New insights of membrane environment effects on MscL channel mechanics from theoretical approaches. *Proteins* 71, 1183-1196.

Ding, Z., Atmakuri, K., and Christie, P.J. (2003). The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends in microbiology* 11, 527-535.

Dinh, T., Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1994). A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 176, 3825-3831.

Drenth, J. (1995). *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradovic, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573-6582.

Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., et al. (2001). Intrinsically disordered protein. *Journal of molecular graphics & modelling* 19, 26-59.

E

Economou, A., Christie, P.J., Fernandez, R.C., Palmer, T., Plano, G.V., and Pugsley, A.P. (2006). Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Molecular microbiology* 62, 308-319.

Eda, S., Maseda, H., and Nakae, T. (2003). An elegant means of self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *The Journal of biological chemistry* 278, 2085-2088.

Eda, S., Maseda, H., Yoshihara, E., and Nakae, T. (2006). Assignment of the outer-membrane-subunit-selective domain of the membrane fusion protein in the tripartite xenobiotic efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* 254, 101-107.

Elkins, C.A., and Nikaido, H. (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *Journal of bacteriology* 184, 6490-6498.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Epp, S.F., Kohler, T., Plesiat, P., Michea-Hamzhepour, M., Frey, J., and Pechere, J.C. (2001). C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 1780-1787.

Eswaran, J., Hughes, C., and Koronakis, V. (2003). Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. *Journal of molecular biology* 327, 309-315.

Evans, P., and McCoy, A. (2008). An introduction to molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64, 1-10.

F

Federici, L., Du, D., Walas, F., Matsumura, H., Fernandez-Recio, J., McKeegan, K.S., Borges-Walmsley, M.I., Luisi, B.F., and Walmsley, A.R. (2005). The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution. *The Journal of biological chemistry* 280, 15307-15314.

Fernandez-Recio, J., Walas, F., Federici, L., Venkatesh Pratap, J., Bavro, V.N., Miguel, R.N., Mizuguchi, K., and Luisi, B. (2004). A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS letters* 578, 5-9.

Fiser, A., and Sali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in enzymology* 374, 461-491.

G

Galan, J.E., and Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science (New York, N.Y)* 284, 1322-1328.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. John M. Walker (ed) : *The Proteomics Protocols Handbook*, 571-607.

Gerken, H., and Misra, R. (2004). Genetic evidence for functional interactions between TolC and AcrA proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 54, 620-631.

Girard, V., and Mourez, M. (2006). Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Research in microbiology* 157, 407-416.

Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K., and Vitanza-jack, V.B. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology* 28, 987-991.

Gruber, M., and Lupas, A.N. (2003). Historical review: another 50th anniversary—new periodicities in coiled coils. *Trends in biochemical sciences* 28, 679-685.

Guan, L., and Nakae, T. (2001). Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 183, 1734-1739.

Gutman, N., Steiner-Mordoch, S., and Schuldiner, S. (2003). An amino acid cluster around the essential Glu-14 is part of the substrate- and proton-binding domain of EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 278, 16082-16087.

Guzman, E., Romeu, A., and Garcia-Vallve, S. (2008). Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: A review. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 26, 88-98.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology* 177, 4121-4130.

H

Hadley, E.B., Testa, O.D., Woolfson, D.N., and Gellman, S.H. (2008). Preferred side-chain constellations at antiparallel coiled-coil interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 530-535.

Hakenbeck, R., and Coyette, J. (1998). Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 54, 332-340.

Hancock, R.E. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1, S93-99.

Hancock, R.E., and Brinkman, F.S. (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual review of microbiology* 56, 17-38.

Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 692-744.

Hernandez-Mendoza, A., Quinto, C., Segovia, L., and Perez-Rueda, E. (2007). Ligand-binding prediction in the resistance-nodulation-cell division (RND) proteins. *Computational biology and chemistry* 31, 115-123.

Heuberger, E.H., Veenhoff, L.M., Duurkens, R.H., Friesen, R.H., and Poolman, B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *Journal of molecular biology* 317, 591-600.

Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9994-9999.

Higgins, M.K., Eswaran, J., Edwards, P., Schertler, G.F., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. *Journal of molecular biology* 342, 697-702.

Higgins, P.G., Fluit, A.C., Milatovic, D., Verhoef, J., and Schmitz, F.J. (2003). Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents* 21, 409-413.

Hinsen, K. (1998). Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. *Proteins* 33, 417-429.

Hocquet, D., Muller, A., Blanc, K., Plesiat, P., Talon, D., Monnet, D.L., and Bertrand, X. (2008). Relationship between Antibiotic Use and Incidence of MexXY-OprM Overproducers among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 1173-1175.

Hocquet, D., Roussel-Delvallez, M., Cavallo, J.D., and Plesiat, P. (2007). MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1582-1583.

Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171-1175.

Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 2, S24-28.

Hvorup, R.N., Goetz, B.A., Niederer, M., Hollenstein, K., Perozo, E., and Locher, K.P. (2007). Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science (New York, N.Y)* 317, 1387-1390.

J

Jeannot, K., Sobel, M.L., El Garch, F., Poole, K., and Plesiat, P. (2005). Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *Journal of bacteriology* 187, 5341-5346.

Jo, J.T., Brinkman, F.S., and Hancock, R.E. (2003). Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 1101-1111.

Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G., and Sandkvist, M. (2006). Type II secretion: from structure to function. *FEMS microbiology letters* 255, 175-186.

Join-Lambert, O.F., Michea-Hamzhepour, M., Kohler, T., Chau, F., Faurisson, F., Dautrey, S., Vissuzaine, C., Carbon, C., and Pechere, J. (2001). Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 571-576.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* 47 (Pt 2), 110-119.

K

Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26, 795-800.

Karshikoff, A., Spassov, V., Cowan, S.W., Ladenstein, R., and Schirmer, T. (1994). Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 240, 372-384.

Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses* 36, 78-91.

Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology* 37, 239-253.

Kohler, T., Kok, M., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40, 2288-2290.

Kohler, T., Michea-Hamzhepour, M., Epp, S.F., and Pechere, J.C. (1999). Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 424-427.

Kohler, T., Michea-Hamzhepour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1997(a)). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 23, 345-354.

Kohler, T., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Kahr, A.L., and Pechere, J.C. (1997(b)). Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41, 2540-2543.

Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annual review of biochemistry* 73, 467-489.

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914-919.

Krebs, W.G., Alexandrov, V., Wilson, C.A., Echols, N., Yu, H., and Gerstein, M. (2002). Normal mode analysis of macromolecular motions in a database framework: developing mode concentration as a useful classifying statistic. *Proteins* 48, 682-695.

Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E.B., and Zgurskaya, H.I. (2008). Fitting periplasmic membrane fusion proteins to inner membrane transporters: mutations that enable *Escherichia coli* AcrA to function with *Pseudomonas aeruginosa* MexB. *Journal of bacteriology* 190, 691-698.

Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews* 57, 1486-1513.

L

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lage, H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents* 22, 188-199.

Lambert, O., Benabdelhak, H., Chami, M., Jouan, L., Nouaille, E., Ducruix, A., and Brisson, A. (2005). Trimeric structure of OprN and OprM efflux proteins from *Pseudomonas aeruginosa*, by 2D electron crystallography. *Journal of structural biology* 150, 50-57.

Laskowski, R.A., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *Journal of molecular biology* 231, 1049-1067.

Leclercq, R., and Courvalin, P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35, 1267-1272.

Leeb, M. (2004). Antibiotics: a shot in the arm. *Nature* 431, 892-893.

Leslie, A.G. (2006). The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 48-57.

Leslie, A.G.W. (1990). *Crystallographic Computing*. Oxford University Press 5, 50-61.

Levy, S.B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* 278, 46-53.

- Li, X.Z., and Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64, 159-204.
- Li, X.Z., Zhang, L., and Poole, K. (1998). Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *Journal of bacteriology* 180, 2987-2991.
- Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 52, 572-575.
- Lindahl, E., Azuara, C., Koehl, P., and Delarue, M. (2006). NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic acids research* 34, W52-56.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., and Plesiat, P. (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1797-1802.
- Lobedanz, S., Bokma, E., Symmons, M.F., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2007). A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4612-4617.
- Locher, K.P., Lee, A.T., and Rees, D.C. (2002). The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science (New York, N.Y)* 296, 1091-1098.
- Lomovskaya, O., and Bostian, K.A. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—a vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 71, 910-918.
- Lomovskaya, O., and Lewis, K. (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8938-8942.
- Lu, W.C., Wang, C.Z., Yu, E.W., and Ho, K.M. (2006). Dynamics of the trimeric AcrB transporter protein inferred from a B-factor analysis of the crystal structure. *Proteins* 62, 152-158.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends in biochemical sciences* 21, 375-382.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 1051-1060.
- Lynch, A.S. (2006). Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochem Pharmacol* 71, 949-956.

M

Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., and O'Toole, G.A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306-310.

Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W.V., and Pages, J.M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59, 1223-1229.

Mahamoud, A., Chevalier, J., Davin-Regli, A., Barbe, J., and Pages, J.M. (2006). Quinoline derivatives as promising inhibitors of antibiotic efflux pump in multidrug resistant *Enterobacter aerogenes* isolates. *Current drug targets* 7, 843-847.

Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N., and Lomovskaya, O. (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Molecular microbiology* 46, 889-901.

Markham, P.N., and Neyfakh, A.A. (2001). Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Current opinion in microbiology* 4, 509-514.

Mascaretti, O. (2003). *Bacteria versus Antibacterial Agents, an Integrated Approach*. American Society for Microbiology Press.

Masterton, R.G., and Turner, P.J. (2006). Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997-2002). *International journal of antimicrobial agents* 27, 69-72.

Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-*oprM* efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 2242-2246.

Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of molecular biology* 33, 491-497.

McCoy, A.J. (2004). Liking likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2169-2183.

McCoy, A.J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 32-41.

McGaughey, G.B., Gagne, M., and Rappe, A.K. (1998). π -Stacking interactions. Alive and well in proteins. *The Journal of biological chemistry* 273, 15458-15463.

- Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., et al. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13, 560-578.
- Middlemiss, J.K., and Poole, K. (2004). Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 186, 1258-1269.
- Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H.I., and Ghosh, P. (2006). Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* 14, 577-587.
- Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., and Schweizer, H.P. (2007). Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *Journal of bacteriology* 189, 7600-7609.
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and immunology* 49, 999-1002.
- Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 415-417.
- Minor, D.L., Jr. (2007). The neurobiologist's guide to structural biology: a primer on why macromolecular structure matters and how to evaluate structural data. *Neuron* 54, 511-533.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* 260, 289-298.
- Mokhonov, V., Mokhonova, E., Yoshihara, E., Masui, R., Sakai, M., Akama, H., and Nakae, T. (2005). Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization. *Protein expression and purification* 40, 91-100.
- Mokhonov, V.V., Mokhonova, E.I., Akama, H., and Nakae, T. (2004). Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 483-489.
- Mokhonova, E.I., Mokhonov, V.V., Akama, H., and Nakae, T. (2005). Forceful large-scale expression of « problematic » membrane proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 327, 650-655.

Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 1778-1782.

Morita, Y., Komori, Y., Mima, T., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001). Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS microbiology letters* 202, 139-143.

Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T., and Tsuchiya, T. (2003). Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51, 991-994.

Morita, Y., Sobel, M.L., and Poole, K. (2006). Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *Journal of bacteriology* 188, 1847-1855.

Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordenez, C.L., Lory, S., et al. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science (New York, N.Y)* 312, 1526-1530.

Mouneimne, H., Robert, J., Jarlier, V., and Cambau, E. (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 62-66.

Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173-179.

Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587-593.

Murakami, S., and Yamaguchi, A. (2003). Multidrug-exporting secondary transporters. *Current opinion in structural biology* 13, 443-452.

Murray, I.A., and Shaw, W.V. (1997). O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41, 1-6.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of molecular biology* 247, 536-540.

N

Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2000). Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* 275, 30064-30068.

Nakasako, M. (2004). Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 359, 1191-1204; discussion 1204-1196.

Nehme, D., Li, X.Z., Elliot, R., and Poole, K. (2004). Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in mexA compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *Journal of bacteriology* 186, 2973-2983.

Nehme, D., and Poole, K. (2007). Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors. *Journal of bacteriology* 189, 6118-6127.

Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70, 461-477.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593-656.

Normark, B.H., and Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine* 252, 91-106.

O

Ochs, M.M., McCusker, M.P., Bains, M., and Hancock, R.E. (1999). Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1085-1090.

Overbye, K.M., and Barrett, J.F. (2005). Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today* 10, 45-52.

P

Pages, J.M., Masi, M., and Barbe, J. (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in molecular medicine* 11, 382-389.

Pai, H., Kim, J., Kim, J., Lee, J.H., Choe, K.W., and Gotoh, N. (2001). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 480-484.

Pelaez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat? *Biochem Pharmacol* 71, 981-990.

Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J., and Damborsky, J. (2006). CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC bioinformatics* 7, 316.

Petrey, D., and Honig, B. (2005). Protein structure prediction: inroads to biology. *Molecular cell* 20, 811-819.

Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 3, 255-264.

Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10, 12-26.

Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 479-487.

Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X.Z., and Nishino, T. (1996). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 21, 713-724.

Poole, K., Krebes, K., McNally, C., and Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of bacteriology* 175, 7363-7372.

Postle, K., and Vakharia, H. (2000). TolC, a macromolecular periplasmic 'channel'. *Nature structural biology* 7, 527-530.

Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological reviews* 57, 50-108.

Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 672-693.

R

Reffay, M., Gambin, Y., Benabdelhak, H., Phan, G., Taulier, N., Ducruix, D., and Urbach, W. (2008). Tracking membrane protein association in model membranes (*en cours de soumission*).

Remaut, H., and Waksman, G. (2004). Structural biology of bacterial pathogenesis. *Current opinion in structural biology* 14, 161-170.

Reuter, N., Hinsén, K., and Lacapere, J.J. (2003). Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: a normal mode study. *Biophysical journal* 85, 2186-2197.

Ricci, V., Tzakas, P., Buckley, A., and Piddock, L.J. (2006). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 38-42.

Rosenberg, E.Y., Ma, D., and Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *Journal of bacteriology* 182, 1754-1756.

Rossmann, M.G., and Blow, D.M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* 15, 24-31.

Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic acids research* 32, W321-326.

Rowell, S., Pauptit, R.A., Tucker, A.D., Melton, R.G., Blow, D.M., and Brick, P. (1997). Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure* 5, 337-347.

S

Saier, M.H., Jr., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., Liu, J., et al. (1999). The major facilitator superfamily. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1, 257-279.

Saito, K., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1999). nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS microbiology letters* 179, 67-72.

Sali, A., and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology* 234, 779-815.

Sanchez, R., and Sali, A. (1997). Advances in comparative protein-structure modelling. *Current opinion in structural biology* 7, 206-214.

Schagger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* 199, 223-231.

Schuldiner, S. (2006). Structural biology: the ins and outs of drug transport. *Nature* 443, 156-157.

Schulz, G.E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1565, 308-317.

Schweizer, H.P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2, 48-62.

Seeger, M.A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K.M. (2006). Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science (New York, N.Y)* 313, 1295-1298.

Seeger, M.A., von Ballmoos, C., Eicher, T., Brandstatter, L., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K.M. (2008). Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. *Nature structural & molecular biology* 15, 199-205.

Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI-opmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 2990-2992.

Sen, T.Z., Kloster, M., Jernigan, R.L., Kolinski, A., Bujnicki, J.M., and Kloczkowski, A. (2008). Predicting the complex structure and functional motions of the outer membrane transporter and signal transducer FecA. *Biophysical journal* (un-edited manuscript, available on BioFast at www.biophysj.org).

Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., and Grutter, M.G. (2007). Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors. *PLoS biology* 5, e7.

Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C., and Luisi, B. (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 5011-5026.

Sobel, M.L., McKay, G.A., and Poole, K. (2003). Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3202-3207.

Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E. (1996). Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science (New York, N.Y)* 274, 1859-1866.

Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., and Poole, K. (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 65-71.

Stegmeier, J.F., Polleichtner, G., Brandes, N., Hotz, C., and Andersen, C. (2006). Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps. *Biochemistry* 45, 10303-10312.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.

Su, C.C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H., and Yu, E.W. (2006). Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *Journal of bacteriology* 188, 7290-7296.

Sulavik, M.C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K.J., Miller, G.H., Hare, R., and Shimer, G. (2001). Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 1126-1136.

T

Takatsuka, Y., and Nikaido, H. (2006). Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli* is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. *Journal of bacteriology* 188, 7284-7289.

Taly, A., Corringer, P.J., Grutter, T., Prado de Carvalho, L., Karplus, M., and Changeux, J.P. (2006). Implications of the quaternary twist allosteric model for the physiology and pathology of nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16965-16970.

Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novere, N., Corringer, P.J., and Changeux, J.P. (2005). Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophysical journal* 88, 3954-3965.

Tama, F. (2003). Normal mode analysis with simplified models to investigate the global dynamics of biological systems. *Protein and peptide letters* 10, 119-132.

Tama, F., and Sanejouand, Y.H. (2001). Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein engineering* 14, 1-6.

Tamber, S., Ochs, M.M., and Hancock, R.E. (2006). Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188, 45-54.

Taylor, G. (2003). The phase problem. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1881-1890.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 211-222.

Thomson, K.S., and Smith Moland, E. (2000). Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 1225-1235.

Thorarensen, A., Presley-Bodnar, A.L., Marotti, K.R., Boyle, T.P., Heckaman, C.L., Bohanon, M.J., Tomich, P.K., Zurenko, G.E., Sweeney, M.T., and Yagi, B.H. (2001). 3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11, 1903-1906.

Tikhonova, E.B., Wang, Q., and Zgurskaya, H.I. (2002). Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 184, 6499-6507.

Tirion, M.M. (1996). Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. *Physical review letters* 77, 1905-1908.

Tornroth-Horsefield, S., Gourdon, P., Horsefield, R., Brive, L., Yamamoto, N., Mori, H., Snijder, A., and Neutze, R. (2007). Crystal structure of AcrB in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist. *Structure* 15, 1663-1673.

Touze, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Molecular microbiology* 53, 697-706.

Trias, J., and Nikaido, H. (1990). Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of biological chemistry* 265, 15680-15684.

Tronrud, D.E. (2004). Introduction to macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2156-2168.

Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., and Saier, M.H., Jr. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1, 107-125.

U

Uversky, V.N. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* 11, 739-756.

V

Vaccaro, L., Koronakis, V., and Sansom, M.S. (2006). Flexibility in a drug transport accessory protein: molecular dynamics simulations of MexA. *Biophysical journal* 91, 558-564.

Valadie, H., Lacapre, J.J., Sanejouand, Y.H., and Etchebest, C. (2003). Dynamical properties of the MscL of *Escherichia coli*: a normal mode analysis. *Journal of molecular biology* 332, 657-674.

Vediyappan, G., Borisova, T., and Fralick, J.A. (2006). Isolation and characterization of VceC gain-of-function mutants that can function with the AcrAB multiple-drug-resistant efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188, 3757-3762.

Vogne, C., Aires, J.R., Bailly, C., Hocquet, D., and Plesiat, P. (2004). Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1676-1680.

W

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406, 775-781.

Walsh, C. (2003). *Antibiotics, actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology Press.

Walshaw, J., and Woolfson, D.N. (2001). Open-and-shut cases in coiled-coil assembly: alpha-sheets and alpha-cylinders. *Protein Sci* 10, 668-673.

Walshaw, J., and Woolfson, D.N. (2001). Socket: a program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures. *Journal of molecular biology* 307, 1427-1450.

Waugh, D.S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in biotechnology* 23, 316-320.

Weber, K., Pringle, J.R., and Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods in enzymology* 26 PtC, 3-27.

Weldhagen, G.F., Poirel, L., and Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 2385-2392.

Westbrock-Wadman, S., Sherman, D.R., Hickey, M.J., Coulter, S.N., Zhu, Y.Q., Warrenner, P., Nguyen, L.Y., Shawar, R.M., Folger, K.R., and Stover, C.K. (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 2975-2983.

White, S.H. (2004). The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci* 13, 1948-1949.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860-864.

Williams, R.J., Livermore, D.M., Lindridge, M.A., Said, A.A., and Williams, J.D. (1984). Mechanisms of beta-lactam resistance in British isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology* 17, 283-293.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., and Jaskolski, M. (2007). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *The FEBS journal* 275, 1-21.

Wolter, D.J., Hanson, N.D., and Lister, P.D. (2004). Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS microbiology letters* 236, 137-143.

Wong, K.K., Brinkman, F.S., Benz, R.S., and Hancock, R.E. (2001). Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *Journal of bacteriology* 183, 367-374.

Wong, K.K., and Hancock, R.E. (2000). Insertion mutagenesis and membrane topology model of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM. *Journal of bacteriology* 182, 2402-2410.

Woods, D.E. (2004). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends in microbiology* 12, 437-439.

Wright, G.D. (1999). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Current opinion in microbiology* 2, 499-503.

X

Xie, K., and Dalbey, R.E. (2008). Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nature reviews* 6, 234-244.

Y

Yamanaka, H., Tadokoro, S., Miyano, M., Takahashi, E., Kobayashi, H., and Okamoto, K. (2007). Studies on the region involved in the transport activity of *Escherichia coli* TolC by chimeric protein analysis. *Microbial pathogenesis* 42, 184-192.

Yan, M., Sahin, O., Lin, J., and Zhang, Q. (2006). Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58, 1154-1159.

Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., and Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362, 1888-1893.

Yoneyama, H., Maseda, H., Kamiguchi, H., and Nakae, T. (2000). Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *The Journal of biological chemistry* 275, 4628-4634.

Yoshida, K., Nakayama, K., Ohtsuka, M., Kuru, N., Yokomizo, Y., Sakamoto, A., Takemura, M., Hoshino, K., Kanda, H., Nitani, H., et al. (2007). MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorganic & medicinal chemistry* 15, 7087-7097.

Yoshihara, E., and Eda, S. (2007). Diversity in the oligomeric channel structure of the multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and immunology* 51, 47-52.

Yu, E.W., Aires, J.R., McDermott, G., and Nikaido, H. (2005). A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *Journal of bacteriology* 187, 6804-6815.

Yu, E.W., McDermott, G., Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., and Koshland, D.E., Jr. (2003). Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science (New York, N.Y)* 300, 976-980.

Z

Zgurskaya, H.I. (2002). Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 292, 95-105.

Zgurskaya, H.I., Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E.B., Lau, S.Y., and Stratton, K.L. (2003). Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 8, s862-873.

Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (1999). AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *Journal of molecular biology* 285, 409-420.

Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (2000(a)). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular microbiology* 37, 219-225.

Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (2000(b)). Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 182, 4264-4267.

Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., Pechere, J.C., and Plesiat, P. (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 287-291.

ANNEXE

ALIGNEMENT MULTIPLE DE DIFFERENTS TRANSPORTEURS RND

Les résidus conservés sont indiqués dans les cases rouges et les régions consensuelles sont dans les encadrés bleus. L'alignement a été réalisé avec le programme *ESPrpt*.

AcrB_E-coli

α1 α2 β1 α3 α4

```

AcrB_E-coli      1  ..MPNFFIIDRFIFAWVIAIITIMLAGLAILKLPVAQYPTIAPFAVTISASYPGADAKTVQDVTQVIEQN
MexY_P-aeruginosa 1  ..MARFFIIDRFIFAWVIALVIVLAGVLAIRFLPVAQYPTIAPFAVTISASYPGASAKVVVEAVTAIIERE
MexB_P-aeruginosa 1  ..MSKFFIIDRFIFAWVIALVIVLAGVLSILSLPVAQYPTIAPFAVTISASYPGASAKTVQDVTQVIEQQ
MexD_P-aeruginosa 1  ..MSEFFIIDRFIFAWVIALVIVLAGVLSILSLPVAQYPTIAPFAVTISASYPGASAKVLDVDSVTSVLEES
MexF_P-aeruginosa 1  MNFSQFFIQRPIFAAVLSLLILIGGATSLFQLPISEYPEVVPPTVVVRRANFPGANPKVVIGETVASFLEQA
AdeB_A-baumannii 1  .....
CmeB_C-jejuni    1  ..MFSKFFIIEERPVFASVVAIITISLAGAIGLTNLPVIEYPSLTPTVVKVSAATYTGADAOQIASTVAFIEDA
MtrD_N-gonorrhoeae 1  ..MAKFFIIDRFIFAWVIAIIVIAAGIFGIKSLPVSQYPSVAAPTITLHAIYTPGASAOQVMESVLSVIERN
SmeB_S-maltophilia 1  ..MVRFFIIDRFIFAWVIAIIVSLLGLLAILLIPVDRYQPIAPPTITIRATYTPGASAOQTVENAVTQVIEQS
AmeB_A-tumefaciens 1  ..MAHFFIIRRFIFAWVIAIVLMLGGLVLAIVTLLISQYPTIAPFAVTISASYPGASAKTVQDVTQVIEQD

```

AcrB_E-coli

β2 β3 β4 TT α5 η1 α6 β5

```

AcrB_E-coli      69  MNGIDNLMYMSNSDSTGTQVITLTFESGTDADIAQVQVONKQLAMPLEFQEVQQQGVSVKSSSSFLM
MexY_P-aeruginosa 69  MNGAPGLLYTKATS.STGQASLTLTFEQGVNADLAQVEVONKRLKIVESRLEFESVRRDGIYVEKADSIFL
MexB_P-aeruginosa 69  MNGIDNLMYMSNSDSTGTQVITLTFEQGVNADLAQVQVONKQLAMPLEFQEVQQQGVSVKSSSSFLM
MexD_P-aeruginosa 69  LNGAKGLLYFESTNNSNGTAEIVVTFEQGTDPLAQVQVONKRLKKAEARMPQAVLTQGLQVEQTSAGFLL
MexF_P-aeruginosa 71  ITGVENMLYMSQSTSDGKLTITITFALGTDLDNAQVQVONKRLTRTEPKLPEEVTRIGITVDKASPDFTM
AdeB_A-baumannii 27  LSGVKNLLYSATTTDSTGTAEITATFKPFGTDVEMAQVQVONKIKAVEARLPQVVRQGLQVEASSSGFLM
CmeB_C-jejuni    70  INGADNMIMYMSSTSSSSGMSLTVYFDIGTDPDQATIDVNNRISAAATKMPDQAVKGLVTVRKTSSFTLA
MtrD_N-gonorrhoeae 69  MNGVEGLDYMSSTASDSSGSSVSLTFPTDDEINLAQVQVONKRLSEVLRTPATVQQKGVTVSARSNFLM
SmeB_S-maltophilia 69  QQLDHLDMYMTSTASDQSAQVNLVVFATGTNPDIAQVQVONKRLQAAMATLQAVQQNGLTITKSSGSIFE
AmeB_A-tumefaciens 69  MTLGLDDLTYMTSSS.STGSAEVTLTFEGNSILPDIQVQVONKQLVQSQLEFDTVQQQGLQVSRSTSSILM

```

AcrB_E-coli

β6 α7 α8 β7 β8 α9 α10

```

AcrB_E-coli      139  VVGVINTD..GTMTOEDISDYVAANMKDAISRRTSVCVDVQLFG.SQYAMRIWMPNPNELNKFQLETPVDVIT
MexY_P-aeruginosa 138  IVTLTSS..GRYDAMELGEIASSNVLQALRRVVEGVGKVEETWG.AEYAMRIWDPKAKLTSMNLSASDLVN
MexB_P-aeruginosa 139  VVGVVSTD..GSMTKDELNSYIVNSIQDELPSRTKVGDFQVFG.SQYSMRIWLDPAKLNYSQLETPGDIVSS
MexD_P-aeruginosa 139  IYALSYKEGASRSDTTALGDYAAARNINDELLRRLPVGKGLQFSS.EAAMRWIWDIDPKLNSVYGLSIDVSN
MexF_P-aeruginosa 141  VVHLTSPD..NRYDMLYLSNYAVLNVKDEELARLDVGVQVQLPGLGDYSLRVWLDPNKVASRNLTATDVVN
AdeB_A-baumannii 97  LVGINSNP..NQYSEVDLSYLVNRVVEELKRVEGVGKQVQSFQ.AEKAMRIWVDPNKLVSYGLSISDVNN
CmeB_C-jejuni    140  AISMYSSD..GMSAVDVYNYITLNVDEELKRVEGVGKQVQSFQ.AEYAMRIWDPKAKLNSVYGLTATDVIS
MtrD_N-gonorrhoeae 139  IVMLSSD..DVQSTEEANDYAEQRNVVEELQRIEVSQVRLFG.AQRAMRIWVDPKMLQNYNSLFAVDGVS
SmeB_S-maltophilia 139  VLSFTSED..GSMDFVAVNFMEARIDDPQISRSVGVGNIQPIG.QEYAMRIWLDPEKMRQYALMPWDIET
AmeB_A-tumefaciens 138  VGALISTD..GKRNSADLGDVVFSSRVEDQIKRLEGVGSIINVFQ.SEYAMRIWLDPEFKLNKYQLTTADVITG

```

AcrB_E-coli

TT α11 β9 β10 α12 β11

```

AcrB_E-coli      206  AIKAKNAQVAAAGCGTCTFPVKGQQLNASIIAQTRTSTEEFGKILKLVNQDCSRVLRDVAKTEIEGGENY
MexY_P-aeruginosa 205  AVRRHNAARLTVDITGNLGPVDSAPISATVKKVDDTIVTPEQFGEIPLRIRADGGAIRLDRDVARVEFGQSEY
MexB_P-aeruginosa 206  AIQAQNVQISSGQLGGLPAVKGQQLNATIIIGKTRIQTAEQFENILKLVNPDGSQLRLEKDVADVGLGQDY
MexD_P-aeruginosa 208  AIRGQNVQVPAAGFAGSAPGSSAQELTATLAVKGTLDQDFEQVQVLRANDEGSLVRLADVARLEFGKESY
MexF_P-aeruginosa 209  AIREQNRQVAACTLGAPPAPSDTSFQLSINTQGRVTEEEFENIIIRAGANGEIITRRLDARVELEKSNQY
AdeB_A-baumannii 164  AIRENNVEIAPCRGLDPLPAEKGQLITPLSAQGGSSLEQFKNISLKSKTNGSVIKISDVAIVEIGSQAY
CmeB_C-jejuni    208  AVNDQNAQYATCKICEEPVTKQSPYVYSITMQGRQNPSEFENILRNTNNGSFLRLEKDVADVEIGSQY
MtrD_N-gonorrhoeae 204  ALSAQNIIISAGSISLPAVRKQPTVATVTAQGLGTAEEFQNVILRANTDGSNIRLEKDVAKVIGSMEDY
SmeB_S-maltophilia 206  ALQAQNTDVSAGELGGQPALKGQQLDQVTVARSRLHTPEQFAQVLLKADANGSVIRLGDVAKIIGFPESY
AmeB_A-tumefaciens 205  AIQSQNTQVSVGSLGAVPAPVKGQQLNVTVTAQSLTQTVADFQKVIKVEKDGATVRLSDVARLEIGQET

```

AcrB_E-coli

β12 β13 β14 α13 β15 α14

```

AcrB_E-coli      276  DIIAEFNGQFASGLGIKLATGANALDTAAATRAETLAKMEPFPSGLKIVYPYDTPFVVKISISHEVVKTLV
MexY_P-aeruginosa 275  GFVSRVNMQTATGLAVKMAPGNSNAVAKRIRATLDELSRYFPEGVSYNIPYDTSAVVEISIRKVVSTLL
MexB_P-aeruginosa 276  SINAQFNGSPASGAIKLTGANALDTAKAIRQTIANLEPFMPQGMKVVPYDTPVVSASISHEVVKTLG
MexD_P-aeruginosa 278  NISSRLNGPTVGGAIQILSPGANAIQTATLVKQRLAESAFPEDMQYSVPYDTSREDFVVAIEKVIHTLI
MexF_P-aeruginosa 279  ALRSLNKKPVAVAIPFQRPFGSNAIETSNLVREKMAELKHSFQGMQDYSIVYDPTIEVRSIEAVVHTLFL
AdeB_A-baumannii 234  NFALLENKPPATAAAIQLSFGANAVKTAEGVRAKIEELKLNLEPGEFESIPYDTPAVKISIEKVIHTLFL
CmeB_C-jejuni    278  SSQGRNLGNDAVPIIMINLQSGANAHTAELVQAKMQELSKNPKGLTYKIPYDTPKVEISIEKVIHTLFL
MtrD_N-gonorrhoeae 274  SSTRNLGNVNTTGMVMLNSNGNAMATAKAVKERLAVLEKYRPEQMSWKTIPYDTSKVEISIEKVIHTLFL
SmeB_S-maltophilia 276  DSISFTNCKPSSASLGIELNAGANAVSKAIDARLQQLQKYWPHGCTAHVAFVTTTTPVVTISLKEVVIHTLI
AmeB_A-tumefaciens 275  GGDSRSNGRPASGFAVNLATGANALDTAAARVKAALTNVEGSLPEGVSI EYYPYDTPFVVKLSIEKVIHTLI

```

AcrB_E-coli

α15 η2 α16

```

AcrB_E-coli      346  EAIILVFLVMYFLQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGLLVDDAIVVVEN
MexY_P-aeruginosa 345  EAMLVFAVMYFLMQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGLLVDDAIVVVEN
MexB_P-aeruginosa 346  EAIILVFLVMYFLQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGLLVDDAIVVVEN
MexD_P-aeruginosa 348  EAMLVFLVMYFLQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGLLVDDAIVVVEN
MexF_P-aeruginosa 349  EALVFLVFLVMYFLQNTWRASIPPLAAVPPVSLIGTFVAVMHMLGRSINLALSIFGLVLAIGIVDDAIVVVEN
AdeB_A-baumannii 304  EAMLVFLVMYFLHNFRTLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGIVDDAIVVVEN
CmeB_C-jejuni    348  EALVFLVIVMYFLKNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGIVDDAIVVVEN
MtrD_N-gonorrhoeae 344  EAMVFLVFLVMYFLQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGIVDDAIVVVEN
SmeB_S-maltophilia 346  EAIILVFLVMYFLQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGLLVDDAIVVVEN
AmeB_A-tumefaciens 345  EAIILVFLVFLVFLQNFRATLIPPTIAVPPVLLGTFVAVLAAFGRSINTLTMFGMVLATIGLLVDDAIVVVEN

```


AcrB_E-coli α17 α18 α19 α20

0000 00000000 0000 000000 TTT00000000000000000000

AcrB_E-coli 416 VERVMAE . EGLPFAK EATRKSMG QIQGALVGI AMVLS AVFVPMAF FGSSTGA IYRQFS ITTIVSAMALS SVLV

MexY_P-aeruginosa 415 VERLMAE . EGLSPHDATVKAMR QISGALVGI TVVLS AVFVPMAF FGSSTGAVN IYRQFAS ITTIVSAMALS SVLV

MexB_P-aeruginosa 416 VERVMAE . EGLSPREAAARKSMG QIQGALVGI AMVLS AVFVPMAF FGSSTGAVN IYRQFAS ITTIVSAMALS SVLV

MexD_P-aeruginosa 418 VERVMAE . EGLSPEAATVKAMR QVSGALVGI TVVLS AVFVPMAF FGSSTGAVN IYRQFAS ITTIVSAMALS SVLV

MexF_P-aeruginosa 419 VERNIGLG . . LKPV EATKRAMREVT GPTIATALVY CAVFLPFAF ISGLTGQFYRQFALTTIAIS TTVISAFN

AdeB_A-baumanii 374 VERIMAT . EGLNPKDATKRAMKEIT SPIIGITLVYCAVFLPMAF ASGSVGV IYRQFALTTMSSVLSIFLSALL

CmeB_C-jejuni 418 IDRILHEN EQISVKDAAIQAMQEV SPSVIVLVYCAVFPVVSF ISGFVGEIQRQFALTTLAISSVTISGFV

MtrD_N-gonorrhoeae 414 VERIMAG . EGLPFAK EATKRAMG QISGALVGI TVVLS AVFVPMAF FGSSTGAVN IYRQFAS ITTIVSAMALS SVLV

SmeB_S-maltophilia 416 VERVMTF . EGLAPK PATL KAMG QITGALVGI TVVLS AVFVPMAF FGSSTGAVN IYRQFAS ITTIVSAMALS SVLV

AmeB_A-tumefaciens 415 VERV MSE . EGLSEV EATK E KSMG EITGALVGI TVVLS AVFVPMAF FGSSTGAVN IYRQFAS ITTIVSAMALS SVLV

AcrB_E-coli α21 α22

0000 TTT 00000000 TT 00000

AcrB_E-coli 485 ALITLPALCATM LKPIAKGDH GEGKKG FFGWFNRF EKSTHHY TDSVGG ILLRSTGRY LVLYL

MexY_P-aeruginosa 484 ALSLPALCATL LRPIDADH E.KR GFFGWFNRF LRLTGRYRNAVAG ILLARPIRMLVYT

MexB_P-aeruginosa 485 ALITLPALCATM LKPIEKGDH GEHKG FFGWFNRF LSTTHGYRNGVAS ILLKRRAPYLLIYT

MexD_P-aeruginosa 487 ALITLPALCATL LKPIEGHHE .KR GFFGAFNRGFARV TERYSLNSLV ARAGRFMLVYA

MexF_P-aeruginosa 487 SLTLPALCAAVL LKGHHEPKDRFSVFLDK .LLGSWLF RPFNRF FDRA SHGYVGTVNR VLRGSSIALLVYG

AdeB_A-baumanii 443 ALITLPALCATL LKPIDG .HK GFFAWFDRSFDKVTKKYELMLLKI IKHTVPMVIFL

CmeB_C-jejuni 488 ALITLPALCATL LK RNE .GEPFK FVKKFNDF DWS TSVF SAGVA YLLKRTFRVLIIFC

MtrD_N-gonorrhoeae 483 ALITLPALCATM LKTIKPIKHH EKK GFFGWFNRF DSW THGYEGRVAVL RKTFRMVFYI

SmeB_S-maltophilia 485 AMTITPALCGS I LKQIPKGG PHGDHGGEP SLLGK FFIWFNRH RPERT SNGLRHRVDR FLGRRTLGVLFYI

AmeB_A-tumefaciens 484 AIVLPALCATM LKPIDHKK KRGPGAWFNRF GKTDG YVSSIGY LLKRPLRVMIFIA

AcrB_E-coli α23 β16 TT α24 β17

000000000000 → → 000000000000 →

AcrB_E-coli 547 IIVGMYAL FVRLPSS FLPE DQG VFM TMVQL PAQATQER TQKVLNEVTHYYLTKEKNVSVFAVN GFG

MexY_P-aeruginosa 544 LIVGVVALL FVRLPQV FLPE DQGD FMI MVMP EGT PMAE TMANVGDVERYLAEH . . EPVAYAYAVG GFS

MexB_P-aeruginosa 547 LIVAGMIWM FTRIP TAF LPE DQGV LFAVQV QTP PGSSAE R TQVVVDSMR EYLLKEKSSSVSVFTVF GFN

MexD_P-aeruginosa 547 GLVAMLGYF YLRLPEA FLPE DQGV LFAVQV QTP PGASVR T DATGEELERFLKSR . . EAVASVLTGS GFS

MexF_P-aeruginosa 556 GLMVLT YFG FSSSTP TG FV P QD KQYLVAFA QLP DAASLD R TEAVIKQMS EIALAQPGVADSVAFPGL SIN

AdeB_A-baumanii 502 VITGITFAG MKYWP TAF LPE DQGM FMTS FQL PS DAE R TRNVVNQ FENNLKDN . . PDVKSNTTIL GWG

CmeB_C-jejuni 545 IMLGAI FYLY KAV P NS LPE DQGL MTSI INL PSASALH R RTISEVDHISQ EVLKTNGVKDAMAMTGF DLF

MtrD_N-gonorrhoeae 544 GLAVVGVFL FMR LPTS FLPE DQGM FVMVSV QLP AGATKE R DATLAQVTQLAKSI . . PEIENITVSG GFS

SmeB_S-maltophilia 555 LSVATGLL LWHLP GAF LPE DQGL MNLALV KLP AGSTLE Q TRAVMDRLS AVAVKDD . . GVLISQATV GFS

AmeB_A-tumefaciens 543 VVIGGCVWF FSKLPSS FLPE DQGV LTTI IQTP TSNIE R TNEVVKQVENYFREKEANVESVFGVL GFS

AcrB_E-coli β18 η3 α25 β19 TT β20

→ 000 000000000000 T . T → TT →

AcrB_E-coli 617 FAGRQNTGIA FVSLKDWAE R PGEENKVEA ITMRATRAFSQIK . DAMVFAFNLPAITVE LGTATGFD FETLI

MexY_P-aeruginosa 612 LYGDGTSSAMIFAT LKDWAE R PREASQHVGA IVERIN . QRFAGLP NRTVYAMNS PPLPDLG STSGDFR LQ

MexB_P-aeruginosa 617 FAGRQSSGMAITMLKPWE R PGGENSVFELAKRAQMFFSFK . DAMVFAFAPPSVLELGNATGDFLFLQ

MexD_P-aeruginosa 615 FSGQGDNAALAPT FKWDE R RGAEQSAAE IA . . ALNEHFALPD DGTVMVAVSP PINGLGNSG GFDLRLM

MexF_P-aeruginosa 626 GFTNSPNSGIVRTP LKPFDE R RKDPSQSAGA IAAALNAKYADIQ . DAYIAIFPPP PVQGLTIGGFRVQIE

AdeB_A-baumanii 570 FSGAQNVAVAPT T LKDWK R . . TSSASKMTS . . AVNTSMANST EGETMAVLP PAIDELGTFSGSLRLQ

CmeB_C-jejuni 615 TSSLKENAAAMF IGLQDWK R . . NVSADQ IIAELNKKFAFDR . NASSVFIGLPP IGLSITGGE EMYVQ

MtrD_N-gonorrhoeae 612 FSGSQNMAMGFAI FKWDE R TAGSDAVAVAGKLTGMMMGTLK DGFIAVVPPI IGLGNGSGLSINLQ

SmeB_S-maltophilia 623 VTGSQNVGQAFTR LKDW R . . KDDADT IAAARLTRAMASVP . DAQVFITSPPA IGLGDAGGFTLELQ

AmeB_A-tumefaciens 613 FSGSQNNAI VFTK LKDFAE R TAPDQHAGA IVQRAMGTFFGFR . DAQVFP LLLP PAIQGMGTSS GFSMYLV

AcrB_E-coli α26 η4 β21 β22 α27 α28

000000000000 000 → → 000000 000000000000

AcrB_E-coli 686 DQAGLGHEKLTQARNQL LAEAAKH PDMLT SVRPNGL EDTPQFKID IDQEKQAALGV SIN DINTTIGA AW

MexY_P-aeruginosa 681 DRGGVGYEALVKARDQL LARAAD PRLANVMFAG . QGEAPQIRLD IDRRKAETLGV SMD EINTTILAVMF

MexB_P-aeruginosa 686 DQAGVGHEVLLQARNFLMLAAQN PALQR . VRPNG . MSDEPQYKLE IDDEKASALGVSLA DINSTVSI AW

MexD_P-aeruginosa 683 DRSGVREALLQARDTLLG EIQTNPKFLYAMMEG . LAEAPQLRLL IDREKARALGV SFETISGTL SAAF

MexF_P-aeruginosa 695 DRNQGYEELFKQTQNIITKARALPELEPSSVFSSYQVNVPIDAD IDREKAKTHGV AISDI FDTLQVYL

AdeB_A-baumanii 636 DRANLGMPALLAAQDELMAMAANKPKFYMVWNEG . LPQGDNISLKI DREKLSALGVKFS DVS DIIISTMS

CmeB_C-jejuni 681 NKSGKSYDEIQKD VNKLVAAANQRKELSR . . VRTLDTTFPQYKLI IDRKLLKHYNLNMQDVFNTMNATI

MtrD_N-gonorrhoeae 682 DRNNTGHTG IAGEGNE LIOKMRAS GLPDPSTVRAGGLEDS PQLKID INRAAAAQ ICSFADIR TALAASAL

SmeB_S-maltophilia 689 DEGGAHAAVAARNTLLKEAAKDPKLVN . VRYAS . LEDA P VYAVK VDDAKAQAMGVNPQD VVNDT LNAAL

AmeB_A-tumefaciens 682 DSGRNGTDA L TASSKE LIALATGNPKISS . LRSDS . QDNE TQMKIV LDQEKMGAMGV DLSVNLMLSTIF

AcrB_E-coli β23 β24 η5 η6 β25 β26 η7 β27 β28

0 → → 000 000 → → 000 → → TT

AcrB_E-coli 755 GGSVYNDFIDRGRVKKVYV M SEAKY RMLPDI GDWYVRAADGMVVPFSAFSSSRWEYSG PRLERYNGLP

MexY_P-aeruginosa 749 GSDYIGDFMHGQVVRKVVQADGAKRLGIDIDIGRLHVRNEQCEMVPPLATFAKAAWTLGPPQLR YMGYP

MexB_P-aeruginosa 754 GSSVYNDFIDRGRVQRVY LQGRPDANMPD LSKWYVRNDKCEMVPFNATGKWEYSGPKLERYMGYP

MexD_P-aeruginosa 751 GSEVINDFTNAGRQRRVVIQAEQGNRTPPE SVLELVVPPNAAENLVPLSARFVSVKWE EGFQVLVRYMGYP

MexF_P-aeruginosa 765 GSLYANDFNRFGRITYQVNVQAEQQFRLEPEQIQGLKVRNNLCEMVPPLASFIKVS DTS GPD RVMHYMGFIT

AdeB_A-baumanii 704 GSMYINDFPNQGRMQQVIVQEA KSRMLQLDILNLKVMGSSQLVSLSEVVTTPQWNAKAPQYNYRNGRPS

CmeB_C-jejuni 749 GTYVYNDFSMLGKNFQVNRAGGDFRMTQDALKNIFVRSNDKFMIPLSDFLTLQRS GPD DDKRNLFP

MtrD_N-gonorrhoeae 752 SSSVYNDFPNQGR LQRVVMQADEADLQVADILNLVTPNKSQAVPLSTIATVSWENGT EQSVRENGYPS

SmeB_S-maltophilia 757 GMRVYNDFIYKGR I KKVYIQGTAEARMQPQDILERWSVRNQAGMVPPLSSLSI THWTSABA AVAQR YMGISA

AmeB_A-tumefaciens 750 AGRDVNDFTLNGLKPVYVQGDAPYRMPQD DLKYWYARNTTCEMVPFSSSEVKKWVNAF PSLARFNGTGA

AcrB_E-coli β29 → α29 TT β30 → α30 α31

825 MEITLQQAAPGKSTCEAMELMEQLASKLP.TGVGYDWTGM^{SYQER}LSGNQAPS^{LYAT}SLIVVFLCLLAALYE

819 FNLEGGQAAPGYSSGDAMA^{VEE}IVKQLP.KGVGYSWTGL^{SYEE}R^{LSGS}QAPALFALSLLVFLCLLAALYE

824 MEITLGEPAAPGLSSGDAMA^{AVEE}IVKQLP.KGVGYSWTGL^{SYEE}R^{LSGS}QAPALFALSLLVFLCLLAALYE

821 IRIVGDAPAGFSTGEAMA^{AVEE}IVKQLP.AGIGYBWTGL^{SYQE}KV^{SAG}QATS^{LFAL}AILLVFLCLLAALYE

835 AELNGAPAAAGYSSGQA^{AAIE}KLLKEELPN^GMTYBWT^{ELTYQ}ILLAGNTALFVFLC^{VLL}LAFLVLAALYE

774 LSIAIGIPNFDTS^{SGEAM}REMEQLIAKLP.KGIGYBWTGI^{SLOEK}QSES^{QMAF}LLGLSMLLVFLVLAALYE

819 AQVQGGPAPGYTSGQA^{IEAIA}QVAKETLGD^{DYSIA}W^{SGS}AYQEV^{SSKG}TASYAFALGMIFVFLVLAALYE

MtrD_N-gonorrhoeae 822 MKLSASPATGVSTGQA^{EAIV}KRVDELG.GY^{SF}EW^{GQ}SS^{EEAK}GSQTLI^{LYGL}AVAAVFLVLAALYE

SmeB_S-maltophilia 827 MEITLQQAAPG^{VSS}GEAMA^{ETAR}LADTLP.EG^{FS}HAW^{DM}AY^QQLSGN^{QAMP}LYAT^{LSLL}FVFLCLLAALYE

AmeB_A-tumefaciens 820 ISLEGTAGTGVAS^{GEAM}NE^{MER}LITASLP.G^YTVAW^{QGI}SY^{QER}RLS^{GS}QA^{QM}LYALSVLIVFLVLAALYE

AcrB_E-coli α32 α33 α34

894 SWSIFFSVMLV^{VPL}GLVI^{GALLA}ATFRGL^{TN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}DL

MexY_P-aeruginosa 888 SWSIFLAVILV^{VPL}GLV^{GALLG}VSLRGL^{PN}.....D^{IYFKV}GL^{IT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}DH

MexB_P-aeruginosa 893 SWSIFFSVMLV^{VPL}GLVI^{GALLA}TSMRGL^{SN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

MexD_P-aeruginosa 890 SWSIFLAVMLV^{VPL}GLVI^{GALLA}VMVSG^{MSN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

MexF_P-aeruginosa 905 SWSIFLAVILV^{VPL}GLVI^{GALLA}TSMRGL^{SN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

AdeB_A-baumanii 843 SWAIFLAVMLV^{VPL}GLVI^{GALLA}TSMRGL^{SN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

CmeB_C-jejuni 889 RWLIFLAVVTV^{VPL}GLVI^{GALLA}TSMRGL^{SN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

MtrD_N-gonorrhoeae 891 SWSIFLAVILV^{VPL}GLVI^{GALLA}TSMRGL^{SN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

SmeB_S-maltophilia 896 SWAVPFAVMLV^{VPL}GLVI^{GALLA}TSMRGL^{SN}.....D^{VYFQV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}EL

AmeB_A-tumefaciens 889 SWSIFFSVILV^{VPL}GLVI^{GALLA}TAAHFFG^{TN}.....D^{VYFKV}GL^{LT}IT^{IGLSAKNA}IL^{IV}EF^{AK}ER

AcrB_E-coli α35 α36 TTT α37 α38

953 MDKEGKGLIEATL^{DAV}RM^{RLR}PI^{IMT}SL^{AF}IL^{GV}PL^{VI}ST^{GAGS}GA^{QNA}V^{GT}GV^MGM^VTAT^{VLA}IFFV

MexY_P-aeruginosa 947 YQ.EGMSLLQATLEA^{ARLR}RP^{IVMT}SL^{AF}GF^{GV}PL^{LAL}SS^{GAGS}GA^{QNA}V^{GT}GV^MGM^VTAT^{VLA}IFFV

MexB_P-aeruginosa 952 HE.QCKGIVEA^{ALAE}AC^{RRMR}RP^{IVMT}SL^{AF}IL^{GV}PL^{LAI}ST^{GAGS}GS^{QNA}V^{GT}GV^MGM^VTAT^{VLA}IFFV

MexD_P-aeruginosa 949 WE.QCHSLRDA^{ALAE}AA^{RLR}RP^{IVMT}SL^{AF}IL^{GV}PL^{LAL}AS^{GAGA}AS^{QRA}IG^{TGVI}GM^{LSAT}FL^{GV}LV

MexF_P-aeruginosa 964 QEE.GMDRVAA^{VLE}AC^{RLR}RP^{IVMT}SL^{AF}IM^{GV}PL^{VI}ST^{GAGA}EM^{RHAM}CV^{VAF}SG^{MIGV}TFF^GLLLT

AdeB_A-baumanii 902 KE.EGMSLI EA^{TVA}AA^{KLR}RP^{IVMT}SL^{AF}TC^{GV}PL^{VI}AS^{GAS}SET^{QH}AL^{GT}GV^FGM^{ISAT}IL^{LA}IFFV

CmeB_C-jejuni 948 RFKKCKGVFEA^{AVAA}AA^{KLR}RP^{IVMT}SL^{AF}TF^{GV}PM^{IFAT}G^{AS}SAR^{HSL}GT^{GLI}GM^{IAAS}T^{LA}IFFV

MtrD_N-gonorrhoeae 961 QA.QCKSAVEA^{ALAE}AA^{RLR}RP^{IVMT}SL^{AF}IL^{GV}PL^{YIA}AG^{AS}SAS^{QRA}IG^{TTV}WG^{ML}VG^{TLL}SV^{FLV}

SmeB_S-maltophilia 955 EQ.QCKSTR EA^{ILQ}AV^{LR}RP^{IVMT}SL^{AF}LM^{GV}PL^{VFAT}G^{AS}AA^{RSI}GT^{GV}AG^{TV}AS^{MV}L^GM^{FFV}

AmeB_A-tumefaciens 948 QE.HGLSLV EA^{ALAE}AA^{KLR}RP^{IVMT}SL^{AF}IL^{GV}PL^{LAI}AT^{GAGS}AA^{QNA}IG^{IGV}L^GML^{SAT}IL^{LA}IFFV

AcrB_E-coli

AcrB_E-coli 1023 FVFFV^VRRRFSRKNEDIEHSHTVDH.....

MexY_P-aeruginosa 1016 PLFLV^VGRLFR^LRKAPR^TGN^SPQIP^TEQA.....

MexB_P-aeruginosa 1021 PLFYV^VAVSTLFR^KDEASKQ^QASVEK^GQ.....

MexD_P-aeruginosa 1018 PICFV^VL^LLSL^LR^SKPAP^IEQAAS^AGE.....

MexF_P-aeruginosa 1033 PVFV^VL^IRRFVEN^REARRA^NDKGLP^EVHA.....

AdeB_A-baumanii 971 FVFFI^FILGAVE^KL^FSS^KK^KISS.....

CmeB_C-jejuni 1018 PLFFV^VLLENFNE^WL^DKKR^GKV^HE.....

MtrD_N-gonorrhoeae 1030 PLFYV^VVRK^FFKETA^HEHE^MAVR^HASKAGIT^GSD^DK^QY.....

SmeB_S-maltophilia 1024 PLFYV^VLRRL^FPGRAP^ADAT^VPET^SP.....

AmeB_A-tumefaciens 1017 PSF^FV^IIRRLS^RR.....

PUBLICATIONS

- (1) **Phan G**, Benabdelhak H, Lascombe MB, Benas P, Rety S, Picard M, Ducruix A, Etchebest C, Broutin I. *Structural and dynamical insights into the opening mechanism of P. aeruginosa OprM channel*. **Structure**. 2010 Mar 14;18(4):507-17.
- (2) Reffay M, Gambin Y, Benabdelhak H, **Phan G**, Taulier N, Ducruix A, Hodges RS, Urbach W. *Tracking membrane protein association in model membranes*. **PLoS One**. 2009;4(4):e5035.
- (3) Vettoretti L, Plésiat P, Muller C, El Garch F, **Phan G**, Attrée I, Ducruix A, Llanes C. *Efflux unbalance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2009 May;53(5):1987-97.

Structural and Dynamical Insights into the Opening Mechanism of *P. aeruginosa* OprM Channel

Gilles Phan,¹ Houssain Benabdelhak,^{1,3} Marie-Bernard Lascombe,¹ Philippe Benas,¹ Stéphane Rety,¹ Martin Picard,¹ Arnaud Ducruix,¹ Catherine Etchebest,² and Isabelle Broutin^{1,*}

¹Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes, UMR 8015 CNRS, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

²Equipe Dynamique des Structures et des Interactions des Macromolécules Biologiques INSERM UMR S665, Université Paris Diderot, INTS, 6 rue Alexandre Cabanel, 75015 Paris, France

³Present address: Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UMR 7623 CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 15 rue de l'École de médecine 75006 Paris, France

*Correspondence: isabelle.broutin@parisdescartes.fr

DOI 10.1016/j.str.2010.01.018

SUMMARY

Originally described in bacteria, drug transporters are now recognized as major determinants in antibiotics resistance. For Gram-negative bacteria, the reversible assembly consisting of an inner membrane protein responsible for the active transport, a periplasmic protein, and an exit outer membrane channel achieves transport. The opening of the outer membrane protein OprM from *Pseudomonas aeruginosa* was modeled through normal mode analysis starting from a new X-ray structure solved at 2.4 Å resolution in P2₁2₁2₁ space group. The three monomers are not linked by internal crystallographic symmetries highlighting the possible functional differences. This structure is closed at both ends, but modeling allowed for an opening that is not reduced to the classically proposed “iris-like mechanism.”

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium that causes opportunistic infections in immunocompromised patients and exhibits natural and acquired resistance to diverse antibiotics (Nakae, 1997). The analysis of the genome sequence of this bacterium has revealed the existence of 12 potential resistance-nodulation-cell division (RND) efflux systems (Stover et al., 2000), 11 of which have been biochemically described (Aendekerk et al., 2002; Aires et al., 1999; Chuanchuen et al., 2002; Hassan et al., 1999; Kohler et al., 1997; Kumar and Schweizer, 2005; Mima et al., 2005, 2007; Poole et al., 1993, 1996). Among these, the MexAB-OprM efflux system is the only one being constitutively produced in wild-type strains (Nakajima et al., 2002). The operon is controlled by a transcription regulator MexR. The first gene of each operon encodes MexA (MW 38,592 Da/monomer) a periplasmic membrane fusion protein (MFP); the second encodes MexB (MW 112,790 Da/monomer), a cytoplasmic membrane RND protein presumed to act as a drug-proton antiporter; and the third gene encodes OprM (MW 50,867 Da/monomer), an outer membrane channel-forming

factor (OMF). All three proteins are believed to form a complex channel that goes across both membranes and allows the extrusion of drugs directly into the extracellular medium (Mokhonov et al., 2004; Tikhonova et al., 2002; Zgurskaya and Nikaido, 2000), bypassing the periplasmic space. Whereas OprM can function with different RND transporter/MFP complexes from *P. aeruginosa*, other outer membrane proteins such as OprN are more discriminative and do not interact with MexAB (Maseda et al., 2000) although sharing 48% amino acid sequence homology with OprM. The most similar homolog of the MexAB-OprM efflux system is the extensively studied AcrAB-TolC system (Okusu et al., 1996) found in *Escherichia coli*, which is also involved in multiple antimicrobial resistance through an energy-dependent efflux mechanism (Fralick, 1996). One other homologous porin from *Vibrio cholerae* is the VceC from VceABC system, for which only the VceC crystal structure has been solved (Federici et al., 2005).

The sequence identity between MexA-MexB-OprM and AcrA-AcrB-TolC are 55%, 69%, and 19%, respectively. The X-ray structures of the three components of the *E. coli* pump have already been determined. Four structures have been published for the homotrimer TolC (Koronakis et al., 2000; Higgins et al., 2004; Bavro et al., 2008), one for AcrA (Mikolosko et al., 2006) and more than 20 for AcrB (Murakami et al., 2002, 2006; Yu et al., 2003, 2005; Su et al., 2006; Seeger et al., 2006; Sennhauser et al., 2007; Das et al., 2007; Törnroth-Horsefield et al., 2007; Drew et al., 2008; Veesler et al., 2008). The AcrB protein also forms a homotrimer that corresponds to the functional unit (Murakami et al., 2004). The first structures of AcrB were determined in space groups in which the three monomers were linked by internal three-fold crystallographic symmetry. Those constrained structures could not help explaining the mechanism of the pump. Only when the nonsymmetrical structure of Murakami and Seeger was published in 2006 (Murakami et al., 2006) could they visualize the differences among the three monomers, leading to the peristaltic pump mechanism concept.

Here, we report a new OprM X-ray structure that, in contrast to the previously published one by Akama et al. (2004), does not present internal crystallographic symmetry, thereby allowing us to build each protomer independently and highlight subtle differences between each protomer within the trimer. The relatively low thermal factor of this OprM structure allowed us to observe most of the first hydration layer, inside and outside the channel.

As observed for TolC, the crystal structure of OprM shows a closed channel within the protein. Mutagenesis, coupled to functional assays based on electrophysiology measurements, have allowed depicting key residues for maintaining the closed state (Andersen et al., 2002), but at present, no study has ever been able to give strong evidence demonstrating the periplasmic opening mechanism. We assumed that *in silico* molecular modeling would offer the possibility of exploring the dynamics of the residues implicated in the opening. In this context, normal mode analysis (NMA) already proved to be a powerful and relevant tool: trajectories along low-frequency modes give insights into large conformational changes occurring within large proteins. Using our OprM high-resolution X-ray structure coordinates, we have indeed successfully identified normal modes liable to describe the periplasmic opening of the protein. Importantly, in contrast to other *in silico* studies, for which mutants were required to simulate open structures, the opening mechanism presented here is obtained for the wild-type forms of OprM and TolC. Hence, besides a high-resolution structure of OprM, this study yields new insights in the OprM protein gating and enlightens subtle differences that exist between TolC and OprM.

RESULTS AND DISCUSSION

Structure of the Trimer of OprM Not Constrained by a Three-Fold Symmetry Axis and Comparison with TolC

Here we present the crystal structure of OprM homotrimer in P2₁2₁2₁ space group without three-fold crystal symmetry at a resolution of 2.4 Å. Phases were solved by molecular replacement with the previously published OprM structure (Akama et al., 2004; Protein Data Bank [PDB] code 1WP1), using a poly-alanine model in order to reveal potential differences among the three monomers. Probably due to high flexibility, the electron density of each monomer is missing the 13 residues at the C terminus.

Structural comparison of OprM with TolC (Koronakis et al., 2000) (Figure 1) shows similar folding (root-mean-square deviation [rmsd] of 1.6 Å calculated from C- α) in spite of a relatively low sequence identity (19%) (Figure 2). A common gene duplication concerning this porin family is suggested by a structural repeat of a two-stranded β sheet and a coiled-coil α -helical pair, within one monomer. In OprM, the N-terminal half (residues 61 to 239, Figure 1 numbering) and the C-terminal half (residues 273 to 447) can be aligned with a sequence identity of 22% and superposed with an rmsd calculated using C- α of 3.3 Å. The α -helical pair H7/H8 of the C-terminal half presents an additional kink at A375 in OprM as opposed to its counterpart, the α -helical pair H3/H4 of the N-terminal half. This kink only appears as a more pronounced curvature change in H7 of TolC. This difference may suggest a functional implication as a hinge region during the opening mechanism of the channel, as will be discussed along normal modes analysis.

The topology of the equatorial domains of OprM and TolC is quite different and does not show a duplication of a structural pattern. Common features are two α helices (H1 and H5 in Figure 1) and a large loop between H4 and H5 implicated in the recruitment of the MFP partner (Yamanaka et al., 2007). It also has to be noticed that the two helices, η 2-OprM and H9-TolC, are at the same exact location (Figure 1).

In agreement with a low single-channel conductance in planar lipid bilayer experiments (Wong and Hancock, 2000), the native structures of OprM and TolC reveal a common closed state. It probably corresponds to the most stable conformation of this porin family in the absence of the other proteins of the pump or ligand. This closed state concerns the periplasmic entrance as well as the β -barrel exit side. Indeed, accessible diameters at the exit side, delimited by extracellular loops, are 3 Å for OprM at T105 and 6 Å for TolC at G271 (Figure 3). Yet the opening needs to be larger than 10 Å for the traffic of molecules such as antibiotics. OprM also presents a constriction formed by a triplet of leucine (L412) in van der Waals contacts, whereas the diameter of the TolC entrance is minimum (4 Å diameter) at the G365 level.

The periplasmic entrance commonly shows a constriction formed by the two α -helical coiled-coils H7/H8 called “inner coiled-coil” from each monomer. The other coiled-coil formed by H3/H4 is called the “outer coiled-coil.” According to an electrophysiological and mutagenesis analysis of TolC (Andersen et al., 2002; Bavro et al., 2008), one hydrogen bond between the inner and outer coiled-coil has been shown to be essential to maintain periplasmic entrance in closed conformation. It involves a highly conserved tyrosine localized on the inner coiled-coil, establishing hydrogen bond with an acidic residue localized on the outer coiled-coil (Y404-D205 in OprM and Y362-D153 in TolC, as shown in Figure 3). Disruption of these key interactions and opening of the porin probably involves interaction and energy from its RND and MFP partners.

Contrary to previous results (Akama et al., 2004), the present structure of OprM has a relatively low thermal factor ($< 31.6 \text{ \AA}^2$) that allowed us to localize 543 water molecules of the first hydration layer, outside as well as inside the channel, the distribution of which being different in each monomer. None of the detergent molecules has been observed in the electron density. This asymmetric water network, in particular inside the pore, could participate in substrates trafficking, but no clear pathway could be detected although some chains comprise more than five water molecules.

In contrast to the homotrimer AcrB (RND partner) where crystal structures in nonsymmetrical space group revealed different conformations between monomers (Murakami et al., 2006; Seeger et al., 2006) suggesting a peristaltic efflux system, there is very little difference between monomers of OprM or TolC. Nevertheless, we observed some local differences between monomers in the case of OprM that exclusively concern polar side chains (rmsd from 2.5 to 4 Å). These residues are R98, K187, R194, N245, R311, R341, K391, K402, R405 (the only amino acid involved in a salt bridge), and N410 (Figure 4). For four of them the differences may be attributed to either a high temperature factor (R98, R311, R341) or a poorly structured region (N245). The other five residues are localized at the periplasmic entrance, with a relatively low thermal motion. Moreover, functional studies of TolC mutants suggest that some of these residues could be key residues involved in interaction of OprM with its RND partner. According to *in vitro* experiment (Stegmeier et al., 2006), mutated OprM can replace TolC into a “AcrAB-OprM” efflux system supporting a detailed comparison between the two proteins. Superimposition of structures shows R194 from OprM to be at the same location than Q142 in TolC, a key residue

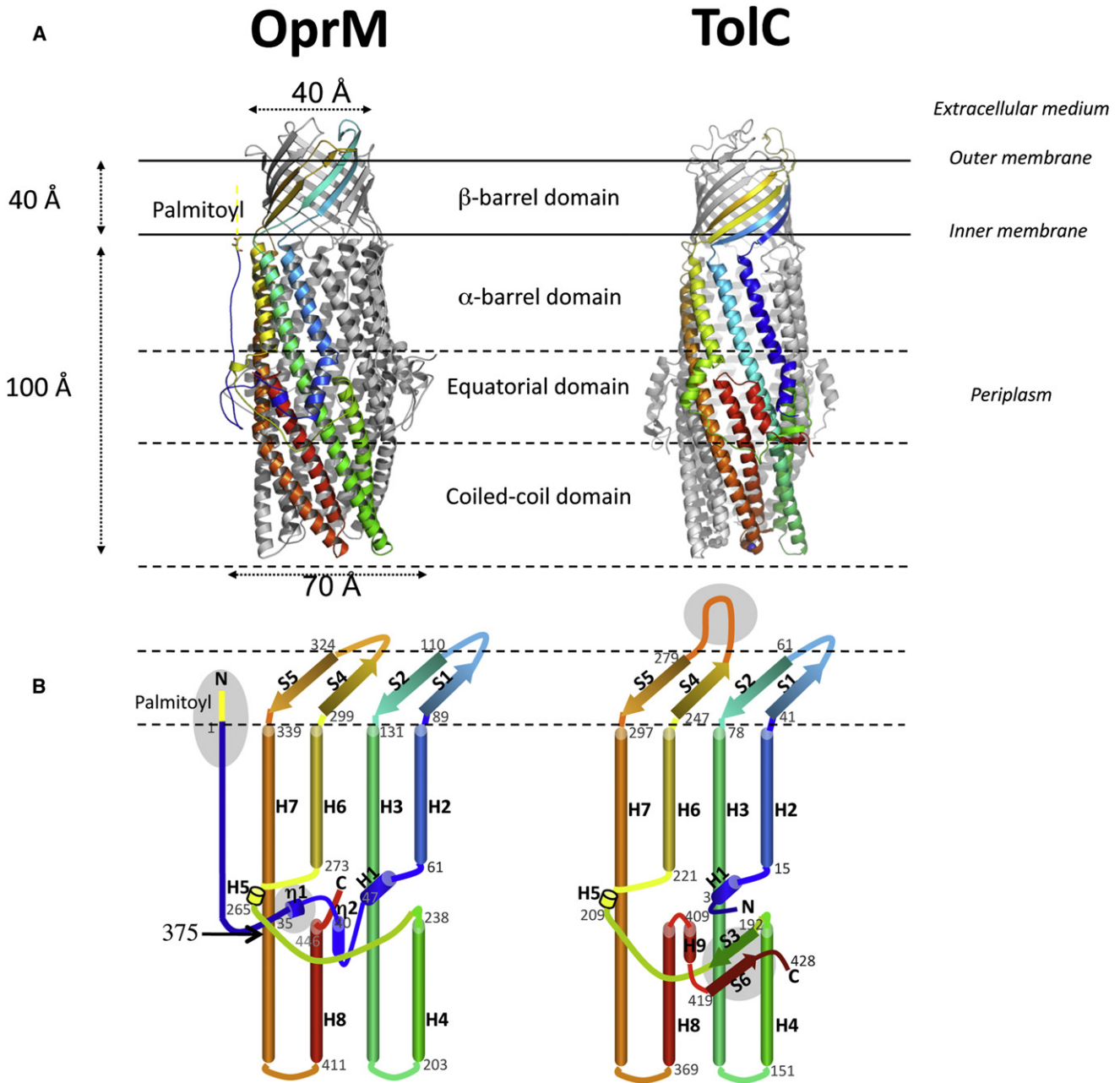


Figure 1. Overall Structures of OprM and TolC

(A) Ribbon C-alpha trace representation with one monomer colored in rainbow. Both porins are constituted of α - and β -barrel domains. The α domain can be subdivided in three subdomains: α -barrel, equatorial, and coiled-coil domains. The threefold axis symmetry of the homotrimer is perpendicular to the outer membrane plane.

(B) Cartoon representation of the secondary structure with the nomenclature from Koronakis et al., 2000.

allowing mutated TolC to function with MexAB (Bokma et al., 2006). R405 in OprM corresponds to the key residue S363 in TolC, involved in the interaction with AcrA (Lobedanz et al., 2007).

Opening Mechanism of OprM through Normal Mode Analysis

In our OprM structure, like in the previously determined one, the porin domain is closed at both ends. The fact that the cavity is

closed at the exit side (extracellular part) is plausible since ground state of OprM should not allow access of xenobiotics to the interior of the cell.

Therefore, opening of the porin must occur during drug transport and probably implicates different movements such as an iris-like mechanism, as postulated by Koronakis et al. (2000). Such a mechanism has recently been highlighted by mutagenesis experiments and by the determination of a crystal structure

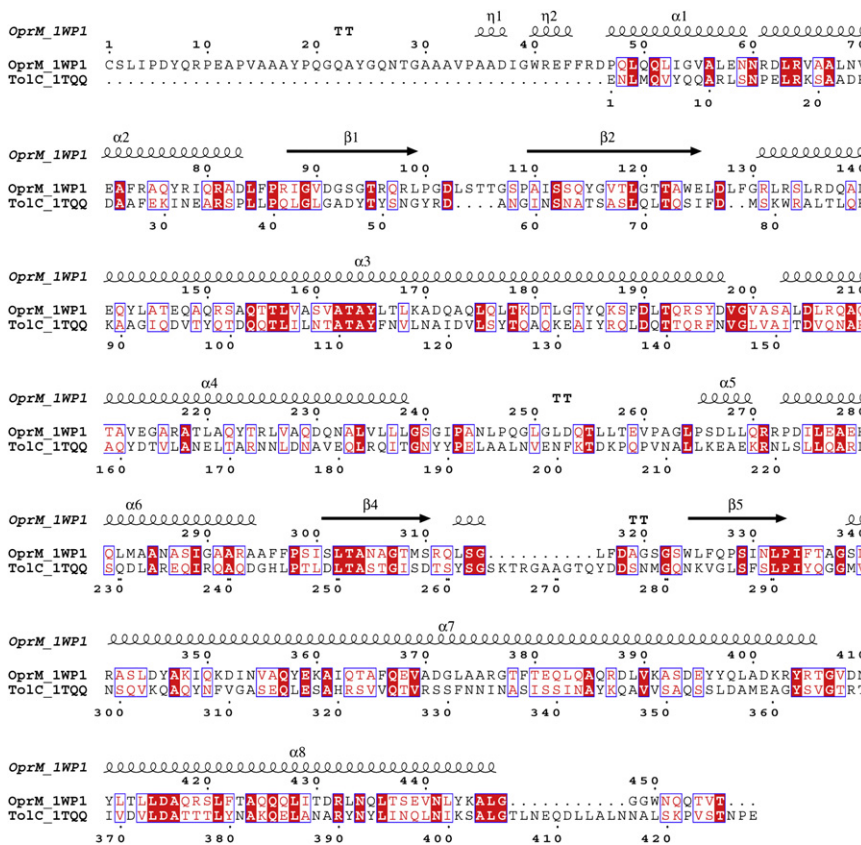


Figure 2. Sequence Alignment between OprM and TolC with the Sequence Numbering as in the Respective PDB Files

Drawing generated by the program ESPript (Gouet et al., 1999). Alpha helices are indicated as α and beta strands as β .

Here we deformed the initial crystal structure of OprM along selected modes to produce new structures and propose a model for the open state. For each mode, the applied movement amplitude corresponds to an rmsd value of 8 Å between the initial and the distorted structure because it produces realistic deformation with the highest amplitude. The choice of the 8 Å limit was governed by the expected amplitude (upper value of 10 Å) of the aperture of the pore. In addition, the final structures were further regularized by energy minimization using an all-atom force field. Accordingly, the open models can be discussed in detail.

Description of the Relevant Modes Leading to the Open State of OprM

Among the 100 lowest modes generated and analyzed, only two symmetrical modes lead to a plausible opening of the

porin: a “twist” (mode number 9) and a “spring-like” extension (mode number 14) (Figure 5). The other modes correspond to asymmetric displacements that involve motion of two monomers with respect to the third one and swing or local motions that are beside our point. In the two relevant modes, the motions of protomers are mostly symmetrical, reflecting the trimeric structure of OprM, even though the slight differences among the three monomers in the initial structure are magnified in the final open states. In addition, the profiles of displacement of each selected mode fit well with the B-factors fluctuation of OprM P2₁2₁2₁ crystal structure (see Figure S1 available online).

of TolC in its partially open state (Andersen et al., 2002; Bavro et al., 2008). The first model for the opening suggested that only the distal inner α -helical tips are implicated in the iris-like motion (Sharff et al., 2001). Recent molecular dynamic studies of TolC and OprM have predicted that the mechanism could be more complex, in particular with the movement of the complete protein and the rearrangement of extracellular loops (Vaccaro et al., 2008). However, there is neither a model for the final open state of this porin family nor a description for the external way-out opening of the channel, so the transition mechanism remains to be understood.

Recently, NMA has been used to efficiently analyze membrane channels or transporters such as the mechanosensitive channel MscL (Valadié et al., 2003), the nicotinic receptor nAChR (Taly et al., 2005; Taly et al., 2006), the calcium-ATPase transporter SERCA1a (Reuter et al., 2003), and the FecA transporter (Sen et al., 2008). More generally it was previously shown that many protein conformational transitions documented in the PDB could be described by a few low-frequency normal modes (Krebs et al., 2002; Tama and Sanejouand, 2001). We investigated the conformational transition to the open state of OprM by NMA using the elastic network model first developed by Tirion (1996). Normal mode analysis used here includes several approximations such as the absence of solvent, the absence of membrane, and a simplified force field. However, this method allows simulating motions trajectories and leads to collective and biologically relevant motions without requiring time-consuming computations to integrate Newton equations as in molecular dynamics simulations.

Among the 100 lowest modes generated and analyzed, only two symmetrical modes lead to a plausible opening of the

i) Twist mode (mode 9)

In this mode, the α -helix domains (Figure 5) clearly move in a concerted manner, with a hinge region at the interface of the upper and lower α -domains. When observed along the axis of the porin domain from the lumen side, the twist movement can be related to an iris-like aperture leading to an enlargement of 2 Å in diameter for the outer coiled-coil and an enlargement of only 1 Å in diameter for the inner coiled-coil. In this final position, there is a strong hydrogen bond joining the monomers two by two. This interaction involves the key residues R419 from one monomer and D416 from another one, keeping the inner coiled-coils in a close position. Concerning the opposite side, identical and synchronized twist motion of the α -barrel domain from each protomer contributes to a rotation of all the β -barrel and the extracellular loops, which enlarges the lumen side of the pore from ~3 Å to ~10 Å. As a proof of its hinge role, the diameter of the equatorial domain is kept equal

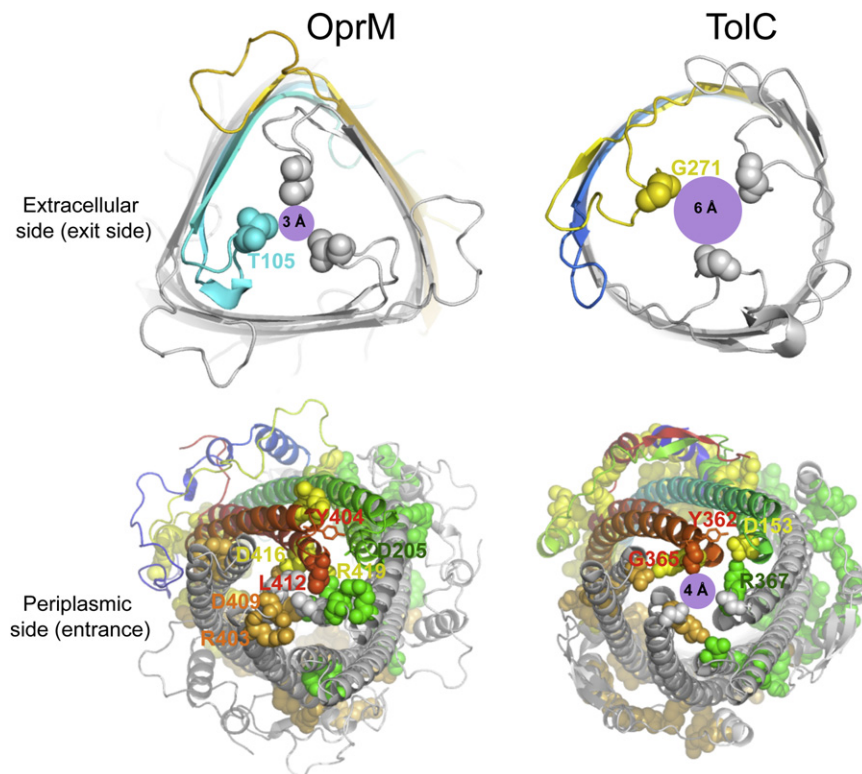


Figure 3. Periplasmic and Extracellular Apertures of OprM and TolC

The two crystal structures are in closed state: the periplasmic entrance is completely occluded by a triplet of leucine (L412) in OprM and limited to ~ 4 Å aperture in TolC. Residues involved in salt bridges are presented in yellow, orange, and green for the three adjacent molecules. The diameter at the β -barrel exit side is limited to ~ 3 Å by a triplet of threonine in OprM and slightly larger for TolC (~ 6 Å).

during the complete movement (see [Movie S1](#) in [Supplemental Information](#)).

ii) Spring-like Movement (mode 14)

This mode ([Figure 5](#)) amplifies the difference among the three monomers, especially at both ends of the porin domain, with the difference between the extremities of the outer coiled-coil reaching 2.5 Å between two adjacent molecules. The upper α -domain extends as a spring along the axis of each helix. This motion is accompanied by a tilt of the helices in the coiled-coil domain and of the strands of the β -barrel. When observed along the axis of the porin domain, this movement results in an apparent rotation of the two extremities in the same direction contrarily to the twist mode motion. The block formed by the equatorial added to the α -barrel domain rotates the other way around. When observed perpendicular to the pore axis, the motion is similar to a “breathing” that is accompanied by a reduction of the diameter of the pore by 4 Å in the extension movement and an enlargement by 5 Å during the compression. The movement of the β -barrel contributes very weakly to the lumen side opening when compared with the twist mode, enlarging the pore by only 6 Å. Concerning the entrance, the inner coiled-coils are kept in a close position as for the twist mode.

iii) Combination of the Two Modes

Each mode matches with an iris-like opening mechanism. Twist motion on both sides, with a supplementary spring-like (expansion-compression) motion for mode 14, characterizes these deformations. It also shows a shift of the extracellular loops required for the opening and therefore the efflux of substrates at the β -barrel side, but none of the two modes by itself allows opening of the periplasmic entrance of the channel. Therefore,

we decided to combine appropriately these two modes (see [Experimental Procedures](#)) and obtained an open state of the porin domain ([Figure 5](#)). Using the morphing method ([Krebs and Gerstein, 2000](#)), a pathway is proposed for the complete aperture (see [Movie S2](#) in [Supplemental Information](#)).

The global opening is obtained through a strong swing of the coiled-coils domain. The hinge region is localized just below the equatorial domain and includes the α -helix kink localized at A375, in the long H7 helix. This movement leads to a repositioning of the coiled-coil domain part of the H7 helix that abolishes the kink. With the present imposed amplitude, the final opening diameter at the periplasmic entrance reaches ~ 7 Å. It could be easily increased if the inner coiled-coil movement is prolonged along its displacement vector (i.e., supplemental energy is provided). Thus, the complete opening of the pore can easily be achieved by the realignment of all the helices that leads to an opening as large as the equatorial domain (~ 27 Å).

Extension of NMA Analysis to TolC and Comparison with OprM

Following the same procedure, a model for TolC open state was built up along two NMA modes supporting the iris-like mechanism at the periplasmic entrance. Following the OprM modeling, it also reveals a twist mode (mode 11), but the second mode (mode 19) differs from the OprM spring-like mode 14. The only resemblance lies in an apparent rotation of the two extremities in the same direction. In this motion, the extracellular loops collapse similarly to the molecular dynamics (MD) simulation performed on TolC by [Vaccaro et al. \(2008\)](#). However, in contrast to MD study, in which the pore radius decreases all along the structure, the NMA combination of motions allows pore opening. Moreover, in our modeled structure, the overall prism shape conformation of the β -barrel obtained in MD is now rounded.

In spite of a similar fold, the opening mechanism of OprM and TolC presents some differences. i) One remarkable difference concerns the gating of the extracellular loop (residues P100 to P109 in OprM and residues S264 to Q273 in TolC) that adopts a drift motion in OprM and a valve-like movement in the spring-like mode of TolC. Based on sequence alignment, this

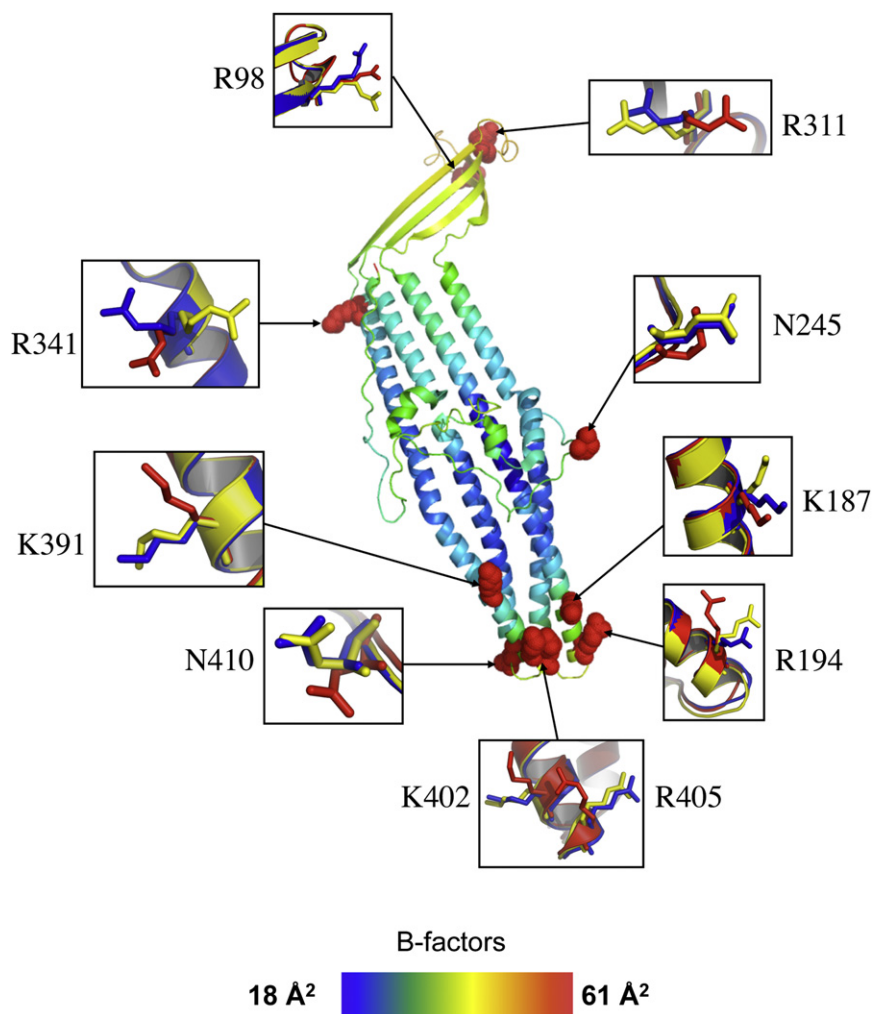


Figure 4. Differences within the OprM Homotrimer

One monomer of OprM from the structure solved in the $P2_12_12_1$ space group is presented in ribbon representation and colored according to B factors. Blow-up corresponds to lateral chains of each superimposed monomer (colored in red, yellow, and blue) for residues with rmsd upper 2.5 Å.

Evolution of the Key Locking Residues

The overall motion for OprM and TolC is similar. For both, the hindrance to opening is due to H8 helix. When comparing the closed and open states, it clearly appears a putative binding groove involving H8 helix for the coiled-coil of the MFP protein (i.e., MexA or AcrA) as highlighted by the mutated R367E-Y362F-TolC structure (Bavro et al., 2008). This TolC double mutation is necessary to increase *E. coli* sensitivity to vancomycin. Another double mutant of TolC (R367S-D153A) leading to the abrogation of the same hydrogen bond resulted in an increase in conductance from 80 pS to 1000 pS (Andersen et al., 2002). These three residues are involved in a hydrogen bond network and form intra- or intermonomer links.

In the case of TolC this hydrogen bond network is intermolecular, whereas for OprM it connects residues from the inner and the outer coiled-coils from the same monomer. The intermonomer link between H8 and an adjacent monomer

loop corresponds to an insertion in TolC that requires a larger motion for the aperture to be accomplished; ii) the second notable difference is the aperture of the equatorial domain that is almost constant during all the motion in TolC contrary to OprM for which it is submitted to a “breathing” motion (vide supra). This is due to the absence of extension movement in TolC. It has to be noticed that 9 salt bridges are present in the equatorial domain of TolC against 3 for OprM (see Figure 3). Consequently, the equatorial domain behaves as a hinge for the global opening mechanism in the present NMA as observed for the mutant Y362F-R367D-TolC with MD simulations (Schulz and Kleinekathofer, 2009).

In OprM, hinges are rather located below the equatorial domain and include the kink (A375) from H7 helix. iii) Another difference is in the amplitude of each side aperture. In TolC the β -barrel enlargement is much higher than that of the periplasmic entrance, whereas for OprM both sides enlarge almost equally. Consequently, the inner volume of the open duct resembles a cylinder for OprM and a funnel with the larger diameter at the extracellular exit for TolC. This inner accessible volume is increased by more than 30% by the opening for both proteins.

is performed in OprM via a salt bridge between R419 and D416. This salt bridge required large energy (NMA amplitude) to be broken in the final structure. For TolC, this salt bridge is not present. The position D416 in OprM is occupied by residue D374, (Higgins et al., 2004) in TolC. Interestingly, when the coiled-coils are cross-linked between D374 of adjacent monomers, TolC dependent export is abolished (Eswaran et al., 2003). This clearly highlights the importance of this key residue.

The superimposition of the two open structures shows that the axis of the H7 helix of each protein are superposed all along the coiled-coil domain up to D416/OprM, which reinforces the hypothesis that this residue all together with R419/OprM is one of the most important clue locking residues. Some mutagenesis experiments would be necessary to really prove the role of those residues in the opening mechanism.

In summary, the opening mechanism proposed here gives for the first time, a model for the open state for OprM. In addition, it complements and refines previous opening models proposed for TolC. It shows that OprM or TolC gating can be easily reached by combining two major motion directions. In silico previous studies (Vaccaro et al., 2008) failed to reach an open state for the TolC wild-type, even if principal directions deduced from essential

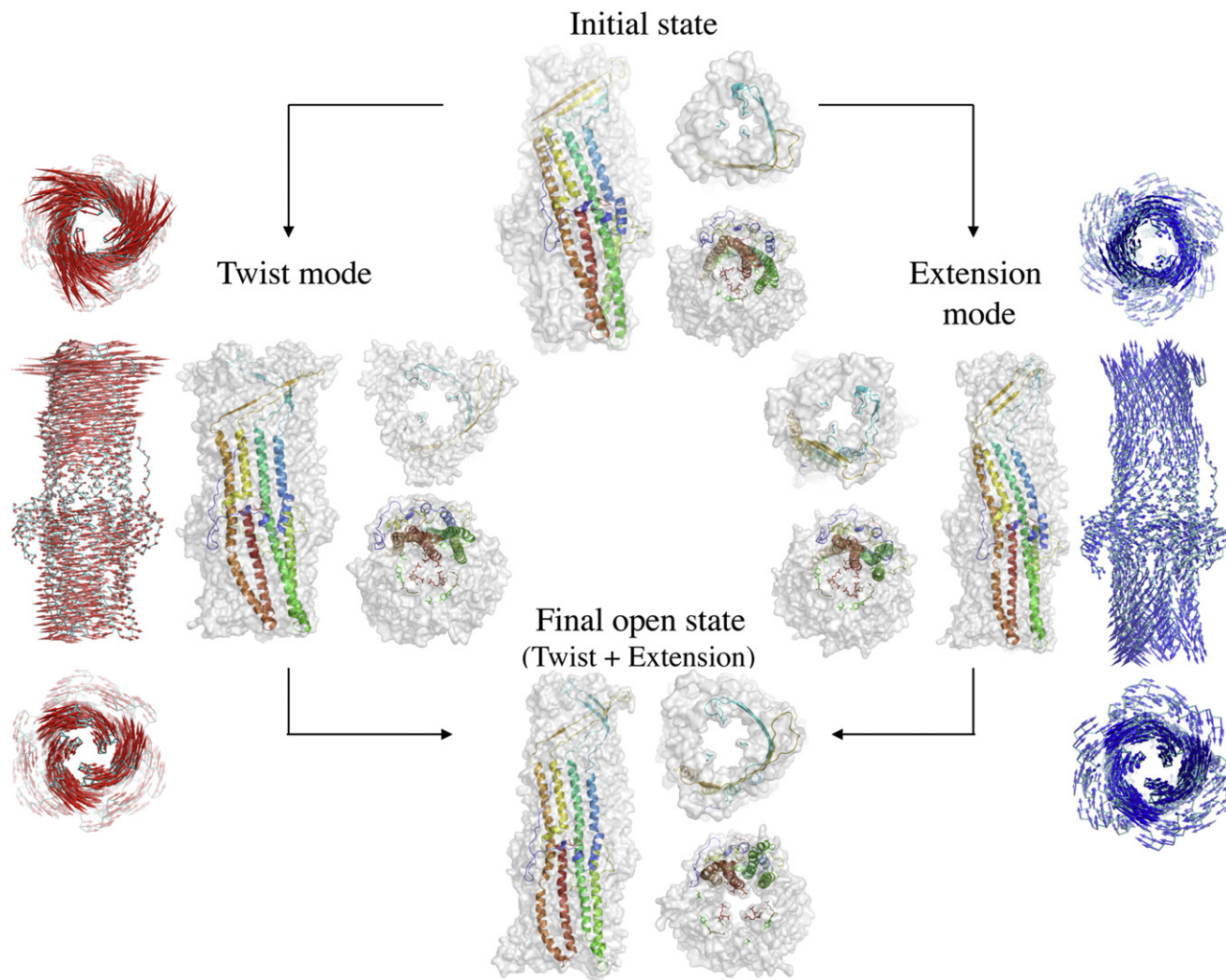


Figure 5. Opening Mechanism of OprM through Normal Mode Analysis

From the initial closed state, NMA shows twist and spring-like motions that could only explain opening at the extracellular side. A weighted sum of these two modes shows an open state. OprM is represented as a van der Waals surface with one monomer in ribbon $C\alpha$ trace colored in rainbow. Top and bottom views show inner diameter of the porin. Lateral chains are represented in stick model for T105 (cyan), D205-Y404 intramolecular hydrogen bond (green), D409-R403 intramolecular salt bridge (yellow), and D416-R419 intermolecular salt bridge (red). Vector representations show amplitude and direction of $C\alpha$ displacements along normal modes. See also [Figure S1](#) and [Movies S1 and S2](#).

dynamics were used to drive to the Koronakis's open structural model. Open state was only obtained when mutants were considered. In the present structures, besides the well-known iris-like mechanism, kink in α helices play an important role along the gating. Such a role was also suggested in gating mechanisms of MscS, for instance ([Akitake et al., 2007](#)), even though the environment of the helical bundle is different.

Conclusion and Perspective

We present in this article a three-dimensional structure of OprM at 2.4 Å resolution in the $P2_12_12_1$ space group for which the three monomers forming the pore are not linked by a crystallographic three-fold axis. This highlighted some structural differences among the three monomers, some of them being located on amino acids shown to be involved in the architecture of the pump. Nevertheless, as for the R32 space group structure of

OprM determined by [Akama et al. \(2004\)](#), the pore is closed at both ends, avoiding any efflux. The good quality of electron density and the low thermal factors of our model led us to explore its conformational space using the NMA based on the elastic network model. A wide opening of the extracellular exit channel was observed in the first modes but the periplasmic entrance remained closed. Finally, the combination of two opening modes led to the complete opening of both ends, with a final aperture consistent with the dimensions of the expelled molecules. The same analysis was performed on the TolC X-ray structure for comparison, bringing out some differences in the compartment of the two pumps. Nevertheless, the global aperture of the two proteins is very similar. It shows that opening mechanism concerns both ends of the porin domain and implicates deformation of the complete protein instead of the coiled-coil tips. The transition from closed to open state could be realized in two

steps: one that needs the supply of energy, and the second that is more passive. The first part of the movement leads to the opening of the coiled-coils domain mediated by the two partners in an iris-like motion, followed by an alignment of the axis of the α -barrel domain helices. In the second part of the motion, the alignment of the helices drives the twist of the β -barrel with a final aperture of the extracellular loops.

Mutagenesis experiments performed with ToIC showed the importance of key residues and emphasize the importance of some of the hydrogen bonds. It is especially true for R419-D416 (OprM) from adjacent monomers, which are localized at the same location as the triplet of D374/ToIC, the later locking the pore as proved by cross-link experiments. This salt bridge required increasing the amplitude limit in the NMA calculation, i.e., supplemental energy, to be broken. The conjugation of X-ray structure and NMA fit together to give a plausible overview of the opening mechanism of the outer-membrane duct of the efflux pump.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning, Expression, and Purification

A protocol based on the heterologous expression of OprM cloned in pET28a and pET28b vectors (Novagen) has been previously designed in our laboratory (Charbonnier et al., 2001). However the purified protein, produced in inclusion body and subsequently refolded, could not be crystallized. Hence, we have resorted to another production protocol based on the L-arabinose inducible expression vector pBAD33-GFPuv (Bohn et al., 2002; H.B., Blight, M.A., and Holland, I.B., unpublished data). This alternative strategy takes advantage of a weaker induction potency and hence to a decreasing of the anarchistic expression of the proteins into inclusion bodies. The *oprM* gene of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 strain) was generated as an NdeI/XmaI fragment using polymerase chain reaction (PCR). The template DNA was extracted from plasmid pOM1 "mexAB-oprM" (Kohler et al., 1997) and primers of the PCR were 5'-GGAATTCATATGAAACGGTCCTTCCTTCC-3' for the forward and 5'-TCCCCCGGGTCAGTGATGGTGATGGTGATGAGCCTGGGGATCTTCTTCTTCGCGTCTG-3' for the reverse.

OprM is heterologously expressed in a C43-DE3 *E. coli* strain (Miroux and Walker, 1996) with a C-terminal 6-histidine tag, the N-terminal extremity being dedicated to the membrane addressing (Nakajima et al., 2000).

Cultures were grown at 37°C in LB medium containing 25 μ g/ml chloramphenicol. Cells were induced at $A_{600} = 0.6-0.8$ by the addition of 1 mM L-arabinose and grown for 2 hr at 30°C before centrifugation. The cell pellet was resuspended in 45 ml buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 1 μ M cocktail of anti-protease inhibitors set III (Calbiochem), and 50 U benzonase (Promega). Cells were broken by a French pressure cell at 69 MPa and then centrifuged twice for 30 min at 8500 g to remove the inclusions bodies and unbroken cells. The soluble fraction was applied on a sucrose step gradient (0.5 and 1.5 M) and then centrifuged for 3 hr at 200 000 g, 4°C. The pellet, corresponding to the outer membrane fraction, was resuspended in a solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol (v/v), 2% n-octyl- β -D-glucopyranoside (β OG) (w/v) (Sigma), then stirred overnight at 23°C. The solubilized membrane proteins were recovered by centrifugation for 30 min at 50 000 g and further loaded onto a Ni-NTA resin column pre-equilibrated in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 10% glycerol (v/v), 0.9% β OG (w/v). The column was washed with the same buffer plus 10 mM imidazole. The protein was eluted by a linear gradient of imidazole (10 to 400 mM). The fractions containing the OprM protein, eluted between 100 to 250 mM imidazole, were desalted and concentrated up to 8 mg/ml by a 30 kDa cutoff Amicon system (Millipore). Imidazole was reduced to 30 mM through an overnight dialysis. Pure protein was obtained with a final yield of 5 mg protein per liter of culture.

All along the procedure, samples were analyzed on acrylamide gels electrophoresis (Laemmli, 1970). As a final step, the protein samples were loaded with and without heating in order to reveal the different oligomeric forms of the protein that appeared as a trimer. The quality of the protein was also analyzed by western blotting using an anti-histidine antibody.

Table 1. Crystallographic Data and Refinement Statistics

Data Collection	
Beamline	ESRF ID14-1
X-ray wavelength (Å)	0.9310
Crystal-detector distance (mm)	230
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	73.9, 70.2, 344.5
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	2.88
Solvent content (%)	51.3
Resolution (Å) ^a	35 - 2.4 (2.54 - 2.4)
Number of reflections	439 539
Number of unique reflections	69 761
R _{merge} (%) ^{a,b}	9.3 [28.8]
Completeness (%) ^a	98.7 [94.4]
Redundancy ^a	6.3 [6.1]
I/ σ ^a	15.12 [7.57]
Refinement	
R _{work} / R _{free} (%) ^{c,d}	23.6 / 29.3
Number of residues	1365
Number of solvent molecules	
Waters	543
Ions	10
Rmsd from ideal values	
Bonds (Å)	0.006
Angles (°)	0.888
Mean B-factor (Å ²)	31.6

Crystallization and Data Collection

Crystals were grown by vapor diffusion with hanging drop method. As previously described (Broutin et al., 2005), the first OprM crystals were obtained at 6 mg/ml in 100 mM sodium acetate (pH 4.5), 6% PEG 20 000 (w/v), 300 mM ammonium citrate, 25%-30% glycerol (v/v), and 0.9% β OG (w/v). Rhombohedral crystals (100 × 100 × 30 μ m) belong to C2 space group and diffracted to 3.8 Å resolution. P2₁2₁2₁ crystals were obtained from a 4.4 mg/ml protein stock and a 1M sodium citrate (pH 5-6) precipitating solution. Among the hundreds of crystals tested, one diffracted to high resolution (2.4 Å). A complete dataset was collected on beamline ID14-1 (ESRF, Grenoble) with an exposure time of 60 s per degree of oscillation.

Data Processing, Model Building, and Refinement

Reflections were integrated, scaled and reduced using program XDS (Kabsch, 1993) and TRUNCATE from the CCP4 suite (CCP4, 1994). Our latest data set turned out to organize under P2₁2₁2₁ space group, different from the R32 obtained previously (Akama et al., 2004; PDB code 1WP1). Data collection statistics are summarized in Table 1.

We have solved the structure of OprM by molecular replacement with PHASER (McCoy, 2007) in automatic mode, using a polyaniline backbone derived from the PDB code 1WP1 as search model. The structure was then modeled from the polyaniline backbone in the electron density map with O (Jones et al., 1991) and then COOT (Emsley and Cowtan, 2004).

At first, refinements were conducted using maximum likelihood with CNS (Brünger et al., 1998). Side chains were introduced and a mask was computed around the protein using the module “model_mask” of CNS. Solvent flattening was performed after extending the mask manually along the region presumably occupied by the N-terminal palmitoyl. The last 13 C-terminal residues could not be assigned, probably because of a large flexibility.

The complete model was then subjected to refinement using REFMAC (Murshudov et al., 1997). A total of 543 water molecules were located using ARP/WARP and verified manually using COOT. Na⁺ or Cl⁻ ions were added on the basis of hexa- or divalent coordination respectively.

Validity of our model was checked using MolProbity (Davis et al., 2007). Ramachandran diagram analysis reveals that 98.7% of the modeled residues are located in the most favored regions.

Normal Mode Analysis

Normal mode analysis is based on a harmonic approximation of the potential energy function. In NMA, the main step consists in diagonalizing the Hessian matrix. The resulting eigenvectors are the normal modes while the eigenvalues are related to the frequencies. The amplitude of motions are related to the frequencies and classically obtained from the equipartition theorem. In the present study, the potential energy is based on Tirion's model (Tirion, 1996) further improved by Hinsen (Hinsen, 1998). In this model, springs connect pairs of atoms located below a chosen threshold distance (R_c cut-off). Springs stiffness is proportional to this distance. Calculations were performed on all-atom crystallographic structures, using the NOMAD-Ref web server (Lindahl et al., 2006). Distance weight and R_c cut-off parameters have been set to 5 Å and 8 Å respectively. Comparing fluctuation profiles deduced from normal mode trajectories and experimental B-factors allowed us to assess parameters choice. Considering the crudeness of the potential energy model, only the ranking of the normal mode rather than its frequency value is discussed. As a consequence, instead of being deduced from the equipartition theorem, the amplitude of motions was chosen so that average rmsd in output trajectories was equal to 8 Å. The three-fold symmetry was not imposed but clearly identified by NMA, some modes being degenerated, i.e., with identical frequencies.

The strategy we used to construct the opened structure echoes previous work (Mouawad and Perahia, 1996; Gorba et al., 2008). Indeed, Gorba et al. proposed a strategy that allowed constructing structures using a linear combination of few modes to target a structure compatible with low-resolution electron microscopy data. The coefficients of the combination are variables optimized to better fit the targeted data. In our case, an increase of the minimal pore radius and an overall rmsd between the initial and the final structure are the only targeted data because the final structure is unknown. Hence, we first identified “productive” modes, i.e., modes that supply a symmetrical motion and participate to enlargement of the pore, and a new structure was deduced from a weighted sum of these modes. In contrast to Gorba's work, no optimization of the coefficients was conducted (and was not necessary). Indeed, considering that all coefficients of the linear combination equal 0, except those corresponding to symmetrical motions allows generating an opened structure with a larger pore radius. The weighting scheme for the latter is simply proportional to the ratio of the frequencies of the respective modes.

In the case of TolC, a phase shift was applied to the second mode. The resulting structure was further regularized with few minimization steps in vacuo using Charmm force field with CNS software (Brünger et al., 1998), leading to a model of the open state.

Finally, a movie of a plausible transition between the initial crystal structure and the proposed open state of the porin was generated using a morphing method (Krebs and Gerstein, 2000).

ACCESSION NUMBERS

The OprM structural model of the P2₁2₁2₁ crystal has been deposited in the Protein Data Bank under ID code 3D5K.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes one figure and two movies and can be found with this article online at doi:10.1016/j.str.2010.01.018.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dimitri Lerouge for his technical assistance in preparing OprM samples, Gaëlle Debret for her assistance in normal mode analysis, and Thierry Prangé, Patrice Vachette, and Frédéric Dardel for their comments of the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-07-blan-263) and a fellowship from French government. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for providing the synchrotron radiation facilities and would like to thank technical staff for assistance in using beam lines ID14-1 and ID29. G.P. was supported by a grant of Ministère de l'éducation nationale.

Received: September 21, 2009

Revised: January 22, 2010

Accepted: January 26, 2010

Published: April 13, 2010

REFERENCES

- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148, 2371–2381.
- Aires, J.R., Kohler, T., Nikaido, H., and Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2624–2628.
- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004). Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J. Biol. Chem.* 279, 52816–52819.
- Akitake, B., Anishki, A., Liu, N., and Sukharev, S. (2007). Straightening and sequential buckling of the pore-lining helices define the gating cycle of MscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1141–1149.
- Andersen, C., Koronakis, E., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C., and Koronakis, V. (2002). Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11103–11108.
- Bavro, V.N., Pietras, Z., Furnham, N., Perez-Cano, L., Fernandez-Recio, J., Pei, X.Y., Misra, R., and Luisi, B. (2008). Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Mol. Cell* 30, 114–121.
- Bohn, C., Binet, E., and Boulouc, P. (2002). Screening for stabilization of proteins with a trans-translation signature in *Escherichia coli* selects for inactivation of the ClpXP protease. *Mol. Genet. Genomics* 266, 827–831.
- Bokma, E., Koronakis, E., Lobedanz, S., Hughes, C., and Koronakis, V. (2006). Directed evolution of a bacterial efflux pump: adaptation of the *E. coli* TolC exit duct to the *Pseudomonas MexAB* translocase. *FEBS Lett.* 580, 5339–5343.
- Brouin, I., Benabdelhak, H., Moreel, X., Lascombe, M.B., Lerouge, D., and Ducruix, A. (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the outer membrane efflux proteins OprM and OprN from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 315–318.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4). (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- Charbonnier, F., Kohler, T., Pechere, J.C., and Ducruix, A. (2001). Overexpression, refolding, and purification of the histidine-tagged outer membrane efflux protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr. Purif.* 23, 121–127.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* 184, 5036–5044.
- Das, D., Xu, Q.S., Lee, J.Y., Ankoudinova, I., Huang, C., Lou, Y., DeGiovanni, A., Kim, R., and Kim, S.H. (2007). Crystal structure of the multidrug efflux

- transporter AcrB at 3.1 Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids. *J. Struct. Biol.* **158**, 494–502.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall, W.B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **35**, W375–WW383.
- Drew, D., Klepsch, M.M., Newstead, S., Flaig, R., De Gier, J.W., Iwata, S., and Beis, K. (2008). The structure of the efflux pump AcrB in complex with bile acid. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 677–682.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- Eswaran, J., Hughes, C., and Koronakis, V. (2003). Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. *J. Mol. Biol.* **327**, 309–315.
- Federici, L., Du, D., Walas, F., Matsumura, H., Fernandez-Recio, J., McKee-gan, K.S., Borges-Walmsley, M.I., Luisi, B.F., and Walmsley, A.R. (2005). The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **280**, 15307–15314.
- Fralick, J.A. (1996). Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 5803–5805.
- Gorba, C., Miyashita, O., and Tama, F. (2008). Normal-mode flexible fitting of high-resolution structure of biological molecules toward one-dimensional low-resolution data. *Biophys. J.* **94**, 1589–1599.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308.
- Hassan, M.T., van der Lelie, D., Springael, D., Romling, U., Ahmed, N., and Mergeay, M. (1999). Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238**, 417–425.
- Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9994–9999.
- Hinsen, K. (1998). Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. *Proteins* **33**, 417–429.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110–119.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800.
- Kohler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**, 345–354.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914–919.
- Krebs, W.G., and Gerstein, M. (2000). The morph server: a standardized system for analyzing and visualizing macromolecular motions in a database framework. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1665–1675.
- Krebs, W.G., Alexandrov, V., Wilson, C.A., Echols, N., Yu, H., and Gerstein, M. (2002). Normal mode analysis of macromolecular motions in a database framework: developing mode concentration as a useful classifying statistic. *Proteins* **48**, 682–695.
- Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1486–1513.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lindahl, E., Azuara, C., Koehl, P., and Delarue, M. (2006). NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic Acids Res.* **34**, W52–W56.
- Lobedanz, S., Bokma, E., Symmons, M.F., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2007). A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4612–4617.
- Maseda, H., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2000). Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 658–664.
- McCoy, A.J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 32–41.
- Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H.I., and Ghosh, P. (2006). Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* **14**, 577–587.
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **49**, 999–1002.
- Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., and Schweizer, H.P. (2007). Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 7600–7609.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298.
- Mokhonov, V.V., Mokhonova, E.I., Akama, H., and Nakae, T. (2004). Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 483–489.
- Mouawad, L., and Perahia, D. (1996). Motions in hemoglobin studied by normal mode analysis and energy minimization: evidence for the existence of tertiary T-like, quaternary R-like intermediate structures. *J. Mol. Biol.* **258**, 393–410.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587–593.
- Murakami, S., Tamura, N., Saito, A., Hirata, T., and Yamaguchi, A. (2004). Extramembrane central pore of multidrug exporter AcrB in *Escherichia coli* plays an important role in drug transport. *J. Biol. Chem.* **279**, 3743–3748.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**, 173–179.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.
- Nakae, T. (1997). Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Microbiologia* **13**, 273–284.
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2000). Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **275**, 30064–30068.
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2002). High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol. Immunol.* **46**, 391–395.
- Okusu, H., Ma, D., and Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**, 306–308.
- Poole, K., Krebes, K., McNally, C., and Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175**, 7363–7372.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X.Z., and Nishino, T. (1996). Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **21**, 713–724.
- Reuter, N., Hinsen, K., and Lacapere, J.J. (2003). Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: a normal mode study. *Biophys. J.* **85**, 2186–2197.

- Schulz, R., and Kleinekathofer, U. (2009). Transitions between closed and open conformations of TolC: the effects of ions in simulations. *Biophys. J.* 96, 3116–3125.
- Seeger, M.A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K.M. (2006). Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* 313, 1295–1298.
- Sen, T.Z., Kloster, M., Jernigan, R.L., Kolinski, A., Bujnicki, J.M., and Kloczkowski, A. (2008). Predicting the complex structure and functional motions of the outer membrane transporter and signal transducer FecA. *Biophys. J.* 94, 2482–2491.
- Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., and Grutter, M.G. (2007). Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPIn inhibitors. *PLoS Biol.* 5, e7.
- Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C., and Luisi, B. (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur. J. Biochem.* 268, 5011–5026.
- Stegmeier, J.F., Polleichtner, G., Brandes, N., Hotz, C., and Andersen, C. (2006). Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps. *Biochemistry* 45, 10303–10312.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warren, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Su, C.C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H., and Yu, E.W. (2006). Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J. Bacteriol.* 188, 7290–7296.
- Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novère, N., Corringer, P.J., and Changeux, J.P. (2005). Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophys. J.* 88, 3954–3965.
- Taly, A., Corringer, P.J., Grutter, T., Prado de Carvalho, L., Karplus, M., and Changeux, J.P. (2006). Implications of the quaternary twist allosteric model for the physiology and pathology of nicotinic acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16965–16970.
- Tama, F., and Sanejouand, Y.H. (2001). Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein Eng.* 14, 1–6.
- Tikhonova, E.B., Wang, Q., and Zgurskaya, H.I. (2002). Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 184, 6499–6507.
- Tirion, M.M. (1996). Large amplitude elastic motions in proteins from a single-parameter, atomic analysis. *Phys. Rev. Lett.* 77, 1905–1908.
- Törnroth-Horsefield, S., Gourdon, P., Horsefield, R., Brive, L., Yamamoto, N., Mori, H., Snijder, A., and Neutze, R. (2007). Crystal structure of AcrB in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist. *Structure* 15, 1663–1673.
- Vaccaro, L., Scott, K.A., and Sansom, M.S. (2008). Gating at both ends and breathing in the middle: conformational dynamics of TolC. *Biophys. J.* 95, 5681–5691.
- Valadié, H., Lacapre, J.J., Sanejouand, Y.H., and Etchebest, C. (2003). Dynamical properties of the MscL of *Escherichia coli*: a normal mode analysis. *J. Mol. Biol.* 332, 657–674.
- Veesler, D., Blangy, S., Cambillau, C., and Sciara, G. (2008). There is a baby in the bath water: AcrB contamination is a major problem in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 880–885.
- Wong, K.K., and Hancock, R.E. (2000). Insertion mutagenesis and membrane topology model of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM. *J. Bacteriol.* 182, 2402–2410.
- Yamanaka, H., Tadokoro, S., Miyano, M., Takahashi, E., Kobayashi, H., and Okamoto, K. (2007). Studies on the region involved in the transport activity of *Escherichia coli* TolC by chimeric protein analysis. *Microb. Pathog.* 42, 184–192.
- Yu, E.W., McDermott, G., Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., and Koshland, D.E., Jr. (2003). Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* 300, 976–980.
- Yu, E.W., Aires, J.R., McDermott, G., and Nikaido, H. (2005). A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J. Bacteriol.* 187, 6804–6815.
- Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* 37, 219–225.

Tracking Membrane Protein Association in Model Membranes

Myriam Reffay¹, Yann Gambin¹, Houssain Benabdelhak^{2,3}, Gilles Phan⁴, Nicolas Taulier^{2,3}, Arnaud Ducruix⁴, Robert S. Hodges⁵, Wladimir Urbach^{1,2*}

1 Laboratoire de Physique Statistique, École Normale Supérieure, UMR 8550 CNRS-UPMC, Université Paris 06, Paris, France, **2** UPMC Université Paris 06, UMR 7623, Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, Paris, France, **3** CNRS, UMR 7623, LIP, Paris, France, **4** Laboratoire de Cristallographie et R.M.N. Biologiques, Université Paris Descartes, UMR8015 CNRS, Paris, France, **5** Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado at Denver, Denver, Colorado, United States of America

Abstract

Membrane proteins are essential in the exchange processes of cells. In spite of great breakthrough in soluble proteins studies, membrane proteins structures, functions and interactions are still a challenge because of the difficulties related to their hydrophobic properties. Most of the experiments are performed with detergent-solubilized membrane proteins. However widely used micellar systems are far from the biological two-dimensions membrane. The development of new biomimetic membrane systems is fundamental to tackle this issue. We present an original approach that combines the Fluorescence Recovery After fringe Pattern Photobleaching technique and the use of a versatile sponge phase that makes it possible to extract crucial informations about interactions between membrane proteins embedded in the bilayers of a sponge phase. The clear advantage lies in the ability to adjust at will the spacing between two adjacent bilayers. When the membranes are far apart, the only possible interactions occur laterally between proteins embedded within the same bilayer, whereas when membranes get closer to each other, interactions between proteins embedded in facing membranes may occur as well. After validating our approach on the streptavidin-biotinylated peptide complex, we study the interactions between two membrane proteins, MexA and OprM, from a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump. The mode of interaction, the size of the protein complex and its potential stoichiometry are determined. In particular, we demonstrate that: MexA is effectively embedded in the bilayer; MexA and OprM do not interact laterally but can form a complex if they are embedded in opposite bilayers; the population of bound proteins is at its maximum for bilayers separated by a distance of about 200 Å, which is the periplasmic thickness of *Pseudomonas aeruginosa*. We also show that the MexA-OprM association is enhanced when the position and orientation of the protein is restricted by the bilayers. We extract a stoichiometry for the complex that exhibits a strong pH dependance: from 2 to 6 MexA per OprM trimer when the pH decreases from 7.5 to 5.5. Our technique allows to study membrane protein associations in a membrane environment. It provides some challenging information about complexes such as geometry and stoichiometry.

Citation: Reffay M, Gambin Y, Benabdelhak H, Phan G, Taulier N, et al. (2009) Tracking Membrane Protein Association in Model Membranes. PLoS ONE 4(4): e5035. doi:10.1371/journal.pone.0005035

Editor: Laurent Kreplak, Dalhousie University, Canada

Received: December 2, 2008; **Accepted:** February 26, 2009; **Published:** April 1, 2009

Copyright: © 2009 Reffay et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MR and GP were supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie (MERT). Financial support from ANR-BLANC "eFFLUX" 0263-01 is acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: urbach@lps.ens.fr

Introduction

Protein association is involved in a large array of biological processes: ligand-receptor interactions associated with cellular response to its environment, trafficking through export and fusion proteins, and antibiotic resistance mechanisms induced by efflux pumps [1–4]. If the detection of interactions between proteins constitutes the first step to characterize potential association, the most challenging and interesting problems remain the determination of the stoichiometry and the conformation of the protein complex. There is a plethora of techniques allowing the study of protein association such as Quartz Crystal Microbalance [5], Surface Plasmon Resonance [6], Blue Native Page [7,8], ultracentrifugation [9–11] and structural biology. But none of these techniques can probe the interactions between membrane or transmembrane proteins as well as their organization in complex

assemblies. So far, most techniques cannot do better than probing interactions between a membrane protein embedded into a bilayer and another protein solubilized in micelles. An exception is the Surface Force Apparatus technique. However these methods are using functionalized supported bilayers that considerably restrict membrane movements and protein mobility [12]. Consequently, it is difficult to access the geometry of freely moving membranes on transmembrane protein association.

We develop an original approach to characterize the association between membrane or transmembrane proteins embedded within the same membrane or located in different membranes. Our approach can provide the conditions inducing the association (e.g. on membrane properties, pH...), the geometry and the stoichiometry of the protein association. Moreover our technique uses a two-dimensionnal environment close to the biological geometry.

Principles of the experimental approach

The first step is to incorporate membrane proteins inside bilayers whose separation can be controlled at will in a kind of “soft” Surface Force Apparatus geometry. To do so, we use a system of model bilayers, called “sponge” phase (or L_3) [13], some of which have been successfully used to crystallize membrane protein [14]. This phase consists of a randomly connected, continuous membrane. The L_3 phase arises when the L_α (or lamellar) phase, comprised of alternating bilayers, is sufficiently dilute so that long-range positional and orientational (smectic) order is lost, but a bilayered membrane remains intact [15–17]. A transition from L_3 to L_α phase can also be obtained by shear experiments [18]. The proposed L_3 structure consists of locally sheetlike sections of semi-flexible surfactant bilayers, connected up at larger distances into a multiple connected random surface [19]. The radius of curvature R of a sponge phase can be approximated by $R \approx 0.5 \frac{\delta_m}{\phi_m}$ [20] where ϕ_m is the membrane volume fraction and δ_m designates the bilayer thickness. In our sponge phase, made of aqueous solvent, a non ionic surfactant (penta-monododecylether $C_{12}E_5$) and a co-surfactant (β -octylglucoside β -OG), the bilayer thickness is $\delta_m = 32 \text{ \AA}$ and the bilayer volume fraction is in the range $0.03 < \phi_m < 0.08$ thus the radius of curvature is very large $0.2 \text{ \mu m} < R < 1.6 \text{ \mu m}$. In addition we calculate the persistence length of the bilayer ξ_K defined as [21]: $\xi_K = a \exp\left(\frac{4\pi\kappa}{3k_B T}\right)$ where a is a molecular size of the order of 10 \AA , κ is the mean curvature rigidity modulus. In our case, κ is in the range of a few $k_B T$ [22] leading to a persistence length around 1 \mu m , larger than the size of a membrane protein. Thus locally (around the protein) L_3 looks like the disoriented lamellar phase over distance of the persistence length.

In such a system, the bilayer separation, precisely adjusted by adding the correct amount of aqueous solvent to the sample [23–25], is checked by Small Angle X-ray Scattering (SAXS) measurements (Supplementary data figure S1). Sponge phase gives a broad peak which position is related to the spacing between bilayers and the width to the thermal position fluctuations and the random pore structure. Moreover the asymptotic behavior at small d (or at large scattering vector) is described by a d^2 variation law as expected for a local bilayer structure [23].

The choice of a sponge phase lies in the fact that $C_{12}E_5$ and β -OG are extensively used for membrane and transmembrane protein solubilization and crystallography [26–29] and in particular for the OprM and MexA proteins studied in this article. However the approach described here can be applied with any sponge phase. The use of a non-ionic surfactant instead of lipids ensures the stability of the L_3 system over a wider range of separation distances (from 50 to 500 \AA), temperatures (from 6 to 30°C), ionic strength, and pH [30]. This phase allows the insertion of a wide range of membrane objects (peptides, anchored lipids and transmembrane proteins) [29] (see Materials and Methods). The capacity of the sponge phase to retain the biological activity of the transmembrane protein bacteriorhodopsin was previously demonstrated [31].

We use the Fluorescence Recovery After Fringe Pattern Photobleaching (FRAPP) technique [32] to measure the recovery of fluorescence intensity, $I(t)$, of the signal emitted by FITC (Fluoresceine IsoThioCyanate)-labeled proteins inserted into the sponge phase. $I(t)$ is well fitted by single or multiple exponentials $I(t) = \sum_j I_j e^{-t/\tau_j}$, where τ_j is the recovery time characteristic of the diffusing fluorescent species j (Figure 1). Recovery times are used to derive the diffusion coefficients, D_j , of each protein species, j . It has been recently demonstrated that the diffusion coefficient of diffusing molecules within a two-dimensional surface is proportional to their size according to the Stokes-Einstein like equation

[29]: $D = (k_B T \lambda) / (4\pi \mu_m h R)$, where R is the radius of the diffusing molecule or assembly of molecules, h the membrane thickness, μ_m the membrane viscosity, λ a characteristic length related to enhanced membrane dissipation [33], k_B the Boltzmann constant, and T the temperature. Consequently, when studying a protein of known size, we can readily determine if the protein is effectively embedded within the membrane (the diffusion coefficient on a two-dimensional surface should be an order of magnitude smaller than the same object in three dimensions), and if it is a monomer, dimer, or whether it forms a larger complex.

We focus our investigation on the interaction between two different transmembrane or membrane proteins. In our approach, the first step consists to determine the diffusion coefficient D of each protein species. The D value of a free fluorescently labeled protein is measured at a low concentration, in the absence of the other protein, and for a separation distance between bilayers d_W that is very large. In this case, the D value is inversely proportional to its radius according to the above equation. The deduced radius compared with the crystallographic data gives the oligomerization state of the protein. Next, studies are performed in the presence of the two proteins where only the more mobile one is labeled. In such a way, any interaction will be reflected in a decrease of the diffusion coefficient of the labeled protein as any protein complex (that includes at least one labeled protein) will move slower than the free protein. Large d_W values will permit to screen only lateral interactions between proteins embedded into the same bilayer. Interactions between proteins embedded in facing bilayers will be investigated by studying samples exhibiting a d_W dependence. In these measurements, we will determine various diffusion coefficients: one will correspond to the free labeled protein (with a value identical in the absence or in the presence of the unlabeled protein) and the other ones to bound protein species. These measurements also provide the d_W range at which protein interactions occur from facing bilayers. Once all diffusion coefficients have been ascribed to a protein species, concentration-dependent measurements allow us to extract the stoichiometry of the various observed complexes.

We have applied this approach to two systems. The first one is the well-known streptavidin-biotinylated peptide system and the second one is composed of two proteins from an efflux pump where little is known about their interactions.

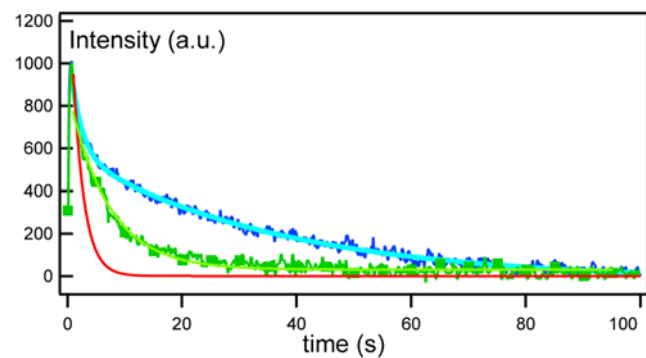


Figure 1. Example of recovery signals. The graph represents the fluorescence recovery signals obtained for different molar ratios $r = [B-L_2]/[S]$: $r=0$ (red solid line), $r=0.2$ (green squares), $r=1.9$ (blue solid line). These signals are well-fitted by a single exponential law for $r=0$ (corresponding to $D_0 = 50 \text{ \mu m}^2 \text{ s}^{-1}$), a double exponential for $r=0.2$ (corresponding to $D_0 = 50 \text{ \mu m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $D_1 = 3.2 \text{ \mu m}^2 \text{ s}^{-1}$), a triple exponential for $r=1.9$ (related to $D_0 = 50 \text{ \mu m}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_1 = 3.2 \text{ \mu m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $D_2 = 1.6 \text{ \mu m}^2 \text{ s}^{-1}$).

doi:10.1371/journal.pone.0005035.g001

Results and Discussion

Model system: the streptavidin-biotin association

In order to validate our approach, we study a model system: the association between the soluble protein streptavidin (S) and a biotinylated transmembrane peptide (B-L₁₂), whose α -helix is made of twelve leucine residues. The binding of streptavidin to biotin is a very well characterized process [34–36]. Streptavidin protein is composed of four monomers, each containing a binding site for biotin. The general shape of streptavidin can be approximated as a parallelepiped, with two opposite sides (separated by 55 Å) each containing two binding sites [36,37]. Furthermore, we have demonstrated in a previous work [29] that, after incorporation into the sponge phase, the transmembrane peptide was effectively embedded into the surfactant bilayer. Consequently, the streptavidin-biotin association represents a good model for the association between proteins embedded in the same bilayer or in facing ones. In this section, we show how to perform and interpret the well-designed FRAPP measurements to extract information about the protein-biotinylated peptide association.

Functional distances for streptavidin-biotinylated peptide binding

In the following measurements, a sponge phase with a constant spacing distance between bilayers of $d_W = 120$ Å is used.

The measurement of $I(t)$ from FITC-labeled transmembrane peptides L₁₂ in the sponge phase results in a single diffusion coefficient of $D_{L_{12}} = 3.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Figure 2). The measurement performed on FITC-labeled streptavidins in the sponge phase also yields a single diffusion coefficient but with a larger value: $D_S = 50 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Figure 1). Since the longest dimension of streptavidin [36,37] is much smaller than the spacing distance d_W , the value for D_S should be characteristic of streptavidins that mainly freely diffuse between the bilayers of the sponge phase.

The investigation of the association between streptavidin and biotinylated peptides requires that the fastest diffusing molecule is labeled with FITC while the slowest one is kept unlabeled. Any binding between the two molecules will result in a drastic decrease in the diffusion coefficient of the labeled one. Therefore, $I(t)$ is measured at a constant concentration (5.76 μM) of FITC-labeled streptavidin but with different concentrations of non-labeled and biotinylated L₁₂ peptides, B-L₁₂, added to the sponge phase.

For a molar concentration ratio $[\text{B-L}_{12}]/[\text{S}] < 0.2$, the recovery intensity is well fitted by a sum of two exponentials, $I(t) = I_0 e^{-t/\tau_0} + I_1 e^{-t/\tau_1}$, that provides two diffusion coefficients: $D_0 = 50 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ and $D_1 = 3.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. A straightforward comparison with the above values, D_S and $D_{L_{12}}$, indicates that D_0 and D_1 are characteristic of a non-bound streptavidin and a streptavidin bound to a B-L₁₂ peptide, respectively. It may appear surprising that a streptavidin bound to a B-L₁₂ peptide has the same diffusion coefficient as a free L₁₂ peptide. The reason originates from the much higher viscosity of the bilayer as compared to the surrounding aqueous medium [29,38].

For $2 \geq [\text{B-L}_{12}]/[\text{S}] > 0.2$, the analysis of the recovery signal leads to three diffusion coefficients (Figure 1): $D_0 = 50 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $D_1 = 3.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, and $D_2 = 1.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Finally, for $[\text{B-L}_{12}]/[\text{S}] \geq 2$, the recovery intensity is perfectly fitted by a single exponential $I(t) = I_2 e^{-t/\tau_2}$ that leads to $D_2 = 1.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. If we consider that the spacing distance between bilayers (≈ 120 Å) is large enough to prevent streptavidin from binding peptides embedded in facing bilayers, then D_2 should characterize the diffusion of streptavidin bound to two biotinylated peptides embedded in the same bilayer. To confirm this assumption we perform measurements for d_W varying from 125

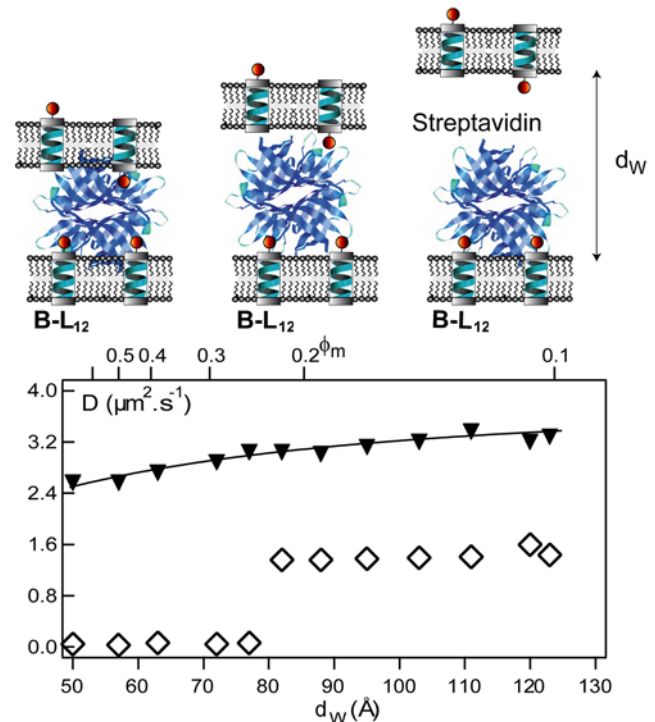


Figure 2. Evolution of the diffusion coefficient of bound streptavidin with the distance between bilayers. The top sketch represents a FITC-labeled streptavidin that is bound to two biotinylated peptides for large d_W values, and that bridges peptides from two different bilayers when $d_W < 80$ Å as seen below for (empty diamonds). The bottom graph displays the diffusion coefficients, D , versus the separation distance between bilayers, d_W . (black triangles down) represents the diffusion coefficient, $D_{L_{12}}$, of FITC-labeled L₁₂ peptides embedded in the bilayers of the L₃ phase devoid of streptavidin. This result is well described by the equation 1 (black solid line) as predicted for a surface diffusing object. (empty diamonds) are for FITC-labeled streptavidin proteins inserted in the sponge phase in the presence of biotinylated peptides, B-L₁₂, at the molar ratio $[\text{B-L}_{12}]/[\text{S}] = 10$. For $d_W > 80$ Å, streptavidins bind biotinylated peptides embedded in the same bilayers and for $d_W < 80$ Å, streptavidins bind biotinylated peptides embedded from opposite bilayers. Error bars are smaller than symbol size. The membrane volume fraction ϕ_m corresponding to each size is indicated at the top of the graph.
doi:10.1371/journal.pone.0005035.g002

to 50 Å. When streptavidin is inserted into the sponge phase devoid of B-L₁₂ peptides, we observe a single diffusion that smoothly decreases from 50 to 11 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ when d_W decreases from 120 Å to 80 Å (data not shown). Below 80 Å the value stays constant to 11 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. We interpret these data as the effect of confinement due to bilayers proximity, which appears to be maximum for $d_W < 80$ Å, when streptavidin is entrapped in between the two surrounding bilayers. The variations are consistent with the model of Anderson and Wennerström [39] for hydrophilic object diffusion in a sponge phase, they scaled a linear variation with the membrane volume fraction ϕ_m [40]. In the same phase, the diffusion coefficient of the transmembrane peptide is studied (Figure 2). Its diffusion coefficient decreases from 3.2 to 2.4 as d_W decreases from 120 to 80 Å. This variation is well fitted by ϕ_m^2 :

$$D_{Surf} = D_0 \left(\frac{2}{3} - b\phi_m^2 \right) \quad (1)$$

where D_0 is the diffusion coefficient in a bilayer (in a lamellar phase) and b is related to the topology of the sponge phase. This law is characteristic of an object diffusing in the bilayer of the sponge phase (Figure 2) and has been successfully used in several sponge phases [41].

Next, streptavidin is inserted in the sponge phase with an excess molar ratio, $[B-L_{12}]/[S]=10$, to ensure that all streptavidin proteins bind at least two B-L₁₂ peptides (Figure 2) from the same bilayer. No change in the single diffusion coefficient is observed from $d_W=120$ to 80 Å and its value is of the order of the previously measured D_2 . Below 80 Å, it dramatically drops to $0.05 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ and maintains this value down to $d_W=50$ Å. At this concentration ratio and bilayer separation distance, we can reasonably assume streptavidin to bridge two bilayers by binding biotinylated peptides embedded in facing bilayers. The diffusion coefficient value ($0.05 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) of a bilayer-bridging streptavidin is much smaller than for a confined streptavidin ($11 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) and than D_2 ($=1.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Thus, this result confirms that D_2 is effectively reflecting a diffusion coefficient of a streptavidin bound to two peptides embedded into the same bilayer. We also observe that the bridging event appeared for $d_W < 80$ Å when streptavidin starts to be confined by two bilayers.

In conclusion, the concentration and d_W -dependence measurements of the diffusion coefficient make it possible to discriminate between the free streptavidin and the peptide-bound streptavidins and to determine the characteristics of each species.

Stoichiometry of streptavidin-biotinylated peptide complex

For all our measurements, we keep an identical gain and detection sensitivity and use concentrations smaller than $60 \mu\text{M}$ for the diffusing molecules. By doing so, fluorescent intensities are proportional to concentrations of fluorescent-labeled molecules: the higher the intensity I_j , the larger the population of protein species j . The stoichiometry is derived by plotting the behavior of the intensity of each protein species as a function of the molar ratio r , as shown in Figure 3. The intensity, I_1 , of the first species is characterized by a broad and very small peak centered approximately at $r=1$. For $r > 2$, we observe that $I_1=0$. The intensity I_2 of the second species increases with r at the same rate than I_1 for $r < 1$. But I_2 continuously increases for $1 < r < 2$, whereas I_1 decreases, and reaches its maximum at $r=2$ when I_1 becomes null. These results reflect the non-cooperative binding of a streptavidin with biotinylated peptides embedded in the same bilayer surface. When the concentration of biotinylated peptides increases, the populations of streptavidins bound to one B-L₁₂ peptide (species 1) and to two B-L₁₂ peptides (species 2) simultaneously increase. When all streptavidins are bound to at least one peptide, the species 1 starts to disappear as these streptavidins are now binding a second peptides to form the species 2. The species 2 is at its maximum at the ratio $r=2$ when no more binding occurs.

Interaction between membrane proteins of an efflux pump

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacterium known to be highly resistant to antibiotics. This resistance is believed to be partly related to efflux pumps expressed by *P. aeruginosa*. The function of these efflux pumps is to transport various molecules like antimicrobials out of the cell through a double membrane using a recently described mechanism [1–4]. The double membrane contains a periplasm whose thickness is close to 200 Å [42]. Twelve genetically distinct efflux pump assemblies (each

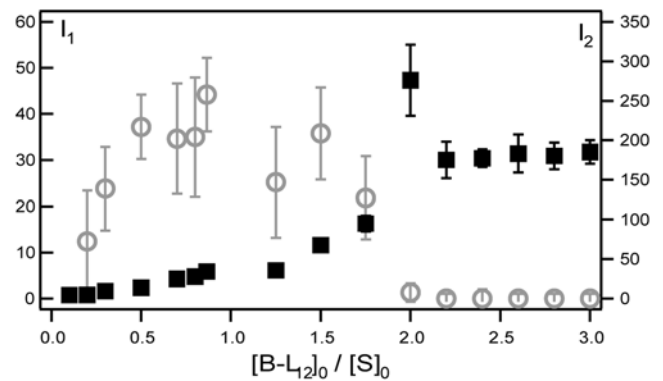


Figure 3. Determination of the number of interaction sites of the streptavidin: Variation of intensities of the free and bound streptavidin with the molar ratio r . The graph shows the behavior of intensities I_1 (grey circles) and I_2 (black squares) as a function of the signal corresponding to the diffusion coefficient $D_1=3.2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ whereas I_2 refers to the intensity of the signal corresponding to the $D_2=1.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ diffusion coefficient. This graph reflects the stoichiometry of the corresponding proteins species. The first species is characterized by a small and broad peak centered around 1 that suggests that streptavidin is bound to one biotinylated peptide. The intensity of the second species increases as r increases to reach a plateau at $r=2$ which suggests a stoichiometry of two biotinylated peptides per streptavidin.

doi:10.1371/journal.pone.0005035.g003

composed of three proteins) are described in *P. aeruginosa* genome. The protein assembly MexA-MexB-OprM is the only one that is constitutively expressed, whereas the others are expressed under special circumstances. MexB [43] and OprM [44] are trimeric transmembrane proteins located at the inner and outer membrane, respectively. While both MexA and OprM are lipoproteins with a palmitoyl moiety, OprM is an integral transmembrane protein. The periplasmic component MexA is assumed to bridge MexB to OprM [43–48] (Figure 4). MexB is the only active part of the pump. The exact organization and mechanism of the efflux pump assembly MexA-MexB-OprM is still unknown. In particular, the exact degree of MexA oligomerization within a single efflux pump is unclear. The crystallographic structure of MexA leads to a model where six or seven MexA proteins are assembled in a horseshoe manner. Three different models for the MexB-MexA-OprM assembly suggest that 3, 6, or 9 MexA monomers could participate in the assembly, respectively [46–48]. Furthermore, it has not yet been determined if MexA interacts either with OprM or MexB or with both proteins. Finally, the anchoring of MexA to the membrane and its conformation when anchored has not been established [47]. In this article, we focus our study on the assembly between MexA and OprM proteins by using the approach described in the previous section. As MexA and OprM are not active in the efflux process, their functionality is still unclear, the only available data are crystallographic structures. To monitor the insertion of the two proteins inside the bilayers their secondary structure inside the sponge phase is compared with the one in their initial detergent β -OG (supplementary data Figure S3) and with their published crystallographic structures [44–46]. The Circular Dichroism (CD) spectra of either MexA and OprM proteins indicate that their general structure is similar between the protein in solution and in sponge phase. The quantities of α -helices and β -sheets measured from the spectra are also compatible with the crystallographic data of the proteins.

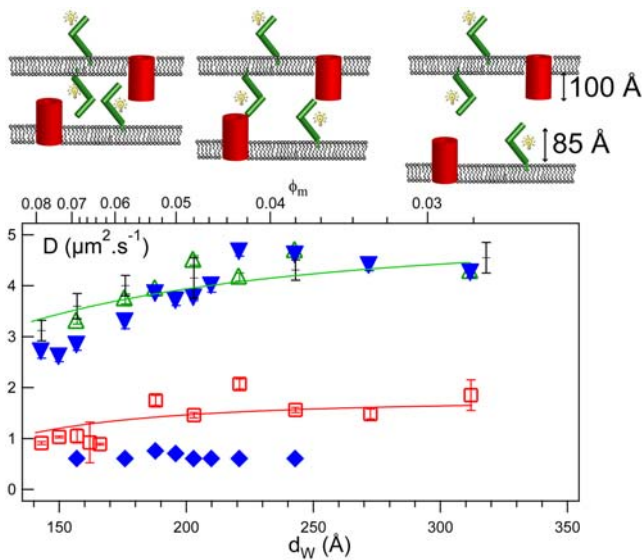


Figure 4. Interaction between MexA and OprM: Evolution of the diffusion coefficient of the proteins with the distance between bilayers. The top sketch represents OprM trimer (barrel) and MexA (sticks) protein diffusing in the bilayers. The bottom plot represents the variation of diffusion coefficients vs bilayer distance d_W : for FITC-labeled MexA (green triangles up), FITC- C_{16} (a SOPC lipid) (black crosses) and OprM (red empty squares) in the sponge phase devoid of OprM and MexA, respectively, for free (blue triangles down) and bound (blue diamonds) MexA inserted in a sponge phase containing OprM trimers. The results are compared with the expected ϕ_m^2 variation law (equation 1) for MexA (green solid line) and for OprM (red solid line). The only change compared with the peptide variation is the value of the asymptotic diffusion coefficient. Error bars are smaller than symbol size. The corresponding volume fraction ϕ_m is indicated at the top of the graph.

doi:10.1371/journal.pone.0005035.g004

Functional distances for MexA-OprM association

We study sponge phase samples with a spacing distance between bilayers, d_W , ranging from 90 to 320 Å. Crystallographic data show that the hydrophilic domains of the rather rigid OprM and the rather flexible MexA are 100 Å and 85 Å long, respectively [44–46]. Furthermore, it has been proposed that OprM and MexA could dock together in the same way that has been proposed for TolC-AcrA [49].

When only FITC-labeled MexA bearing a palmitoyl moiety is inserted into the sponge phase, FRAPP measurements give a single diffusion coefficient, D_{MexA} , whatever the distance d_W (Figure 4). Interestingly, the behavior of D_{MexA} is identical to that of D_{C16} of a FITC-labeled SOPC lipid (FITC- C_{16}) inserted in the sponge phase under the same conditions (Figure 4). The SOPC lipid and the MexA palmitoyl moiety possess the same aliphatic chain length. We also measure the diffusion coefficient of a mutant of MexA, called mMexA, in which the unique N-terminal cysteine is deleted (hence precluding the formation of the hydrophobic moiety) [47]. We observe that the diffusion coefficient of the soluble mMexA protein, $D_{mMexA} = 25 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, is about ten times larger than that of MexA protein. These results indicate that MexA is effectively anchored to the bilayers by its single sixteen-carbon chain and is in a monomeric state (otherwise D_{MexA} would be larger than D_{C16} according to [29]). The observed decrease in diffusion coefficient from 4.2 to $2.3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Figure 4) is well described by the equation 1. The variation law is similar with the one found for the peptide B- L_{12} as expected for a diffusion inside the same phase [39,41].

When FITC-labeled OprM is inserted into the sponge phase, a single diffusion coefficient D_{OprM} is observed that follows a similar behavior to MexA except that OprM is much less mobile with $D_{OprM} = 1.4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for $d_W > 170$ Å. This value leads to a hydrodynamic radius of $R_{OprM} = 17 \pm 2$ Å for the OprM trimer [27], in good agreement with crystallographic and electron microscopy data [44,50,51]. These results present the evidence that OprM is embedded into the surfactant bilayers of the sponge phase. The fit of OprM diffusion coefficient by equation 1 for $d_W > 130$ Å confirmed this anchorage. For $d_W < 130$ Å, a significant decrease of D_{OprM} is observed, dropping to $0.1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ at $d_W < 100$ Å, i.e. when d_W is smaller than the OprM trimer hydrophilic length. So this last behavior reflects the hindrance of OprM mobility due to confinement.

The investigation of interactions between MexA and OprM trimer is performed by incorporating FITC-labeled MexA into a sponge phase containing unlabeled OprM. As MexA protein is more mobile than OprM trimer (i.e. $D_{MexA} > D_{OprM}$), any association between MexA and OprM will be reflected by a decrease in the diffusion coefficient of the FITC-Labeled MexA protein. The concentration of MexA ($C_{MexA} = 0.1 \mu\text{M}$) is ten times smaller than that for OprM trimer ($C_{OprM} = 1 \mu\text{M}$). We measure the behavior of the diffusion coefficient of MexA for d_W ranging from 320 to 140 Å (see Figure 4 and Table 1).

For $d_W > 250$ Å, MexA exhibits a single diffusion coefficient value which experiences the same behavior as when no OprM is present into the sponge phase. This is evidence that no interaction takes place between MexA and OprM trimer, either laterally on the same bilayer or from two facing bilayers.

From $d_W \approx 250$ Å to 150 Å, two diffusion coefficients are observed. The first coefficient is still equal to the value of D_{MexA} found in the absence of OprM, the second one exhibits a value equal to $0.6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, which is close to but smaller than D_{OprM} . This last diffusion coefficient should be associated with MexA bound to OprM trimers. Indeed, the complex MexA-OprM trimer is moving with a slower mobility than the respective free protein and trimer. We also check that this value is independent of protein concentration, so we can rule out the possibility of aggregation.

For $d_W < 150$ Å, we again observe a single diffusion coefficient the value of which is similar to a free MexA diffusing in a sponge phase devoid of OprM.

From these results, we conclude that MexA and OprM trimer can interact only when embedded within two facing bilayers and only when these bilayers are separated by a distance of $150 < d_W < 250$ Å. We observe in figure 5 that the population of bound MexA-OprM is at its maximum at $d_W \approx 200$ Å. Interestingly, this value is similar to the periplasm thickness of *P. aeruginosa*. Our results are in favor of the docking sites being located at the end of the hydrophilic periplasmic loops of OprM trimer and on the α -helical hairpin of MexA [44,45,52].

The intensity variations of free and bound MexA versus d_W are well fitted by gaussian curves $A \cdot \exp\left(-\frac{(d_W - d_0)^2}{2\sigma^2}\right)$ where the fits give $\sigma \approx 21$ Å (Figure 5). These behaviors reflect the fact that, due to bilayers fluctuations, the bilayer separation is not everywhere equal to d_W , the mean distance obtained from SAXS.

For comparison, we perform analogue experiment at $d_W \approx 200$ Å with mMexA, the soluble mutant of MexA. We observe that D_{mMexA} drops from $28 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ to $1.4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ which is, this time, identical to the diffusion coefficient of a free OprM trimer. This brings evidences that mMexA binds the OprM trimer and that there is no “bridging effect”. Moreover, the intensity due to the bound fraction of mMexA protein increases and reaches a steady state only one hour after the beginning of the experiment, as

Table 1. The first column gives the values of the separation distance between bilayers and the second one the molar ratio of MexA over OprM protein.

dw (Å)	r = [MexA]/[OprM]	Number of exponential	D _I (μm ² /s)	D _{II} (μm ² /s)
dw < 240	0.1	1	D _{MexA}	
140 < dw < 240	0.1	2	D _{MexA}	≈ 0.6
dw < 140	0.1	1	D _{MexA}	

The number of exponentials used to fit the fluorescent intensities data is given in the third columns along with the values of each diffusion coefficient in the following columns. D_{MexA} is the value of the diffusion coefficients of a free labeled MexA measured in the absence of OprM. The value 0.6 μm²/s is characteristic of MexA bound to OprM from two facing bilayers.

doi:10.1371/journal.pone.0005035.t001

compared to the short delay of two minutes for MexA protein. This result suggests that the orientation and anchoring of MexA protein to the membrane is a key condition for the dynamic of the interaction.

Stoichiometry of the MexA-OprM complex

In order to determine the stoichiometry of the MexA-OprM complex, we use the sponge phase at $d_W \approx 200$ Å, which is the prerequisite for an optimal MexA to OprM trimer binding, as shown above. Samples are prepared with different molar ratios, r , of FITC-labeled MexA protein to unlabeled OprM trimer. The concentration of OprM trimer is kept constant to $C_{OprM} = 1$ μM. The aqueous solution of the sponge phase has a pH value of 7.5. For all molar ratios, FRAPP measurements give two diffusion coefficients D_I and D_{II} . D_I is equal to the diffusion coefficient, D_{MexA} , of a free MexA protein in the sponge phase, whereas the value of D_{II} is equal to $D_{MexA-OprM} = 0.6$ μm² s⁻¹ which is associated with MexA proteins bound to OprM trimers, as previously shown (Table 1).

The stoichiometry of the MexA-OprM complex is derived by monitoring the behavior of the fluorescence intensity variation. A quenching phenomenon appears for I_{AM} , associated with OprM-bound MexA proteins, that is probably due to a close proximity between MexA proteins. This effect prevents the use of I_{AM} in the determination of the stoichiometry. We consider the variation of the fluorescence intensity I_0 associated with free MexA (Figure 6a).

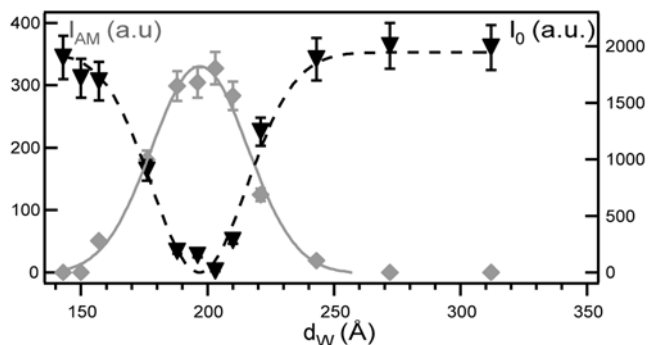


Figure 5. Determination of the best interaction condition : Evolution of bound MexA with the distance between bilayers.

Variation of fluorescence intensities I_0 and I_{AM} of free MexA (black triangles down) and MexA bound to OprM trimers (grey diamonds), respectively. Since fluorescence intensity is proportional to a MexA species population, we observe a shift in population from the free to the OprM-bound MexA species as the spacing distance approaches $d_W = 200$ Å. At $d_W \approx 200$ Å, almost all MexA proteins are bound to OprM trimers. These data are fitted by two gaussian curves.

doi:10.1371/journal.pone.0005035.g005

For $r < 2$ the intensity I_0 is almost null, indicating that most MexA proteins are bound to OprM. For $r > 2$, the linear behavior of I_0 with MexA concentration suggests that no more MexA proteins bind to OprM, since all new additions of MexA contribute to I_0 . Consequently, under the experimental conditions the variation of I_0 suggests a stoichiometry of two MexA proteins bound to one OprM trimer at pH 7.5. The pH-dependence of the stoichiometry has been investigated and the result is reported in Figure 6b where the stoichiometry increases from 2 to 6 when the pH decreases from 7.5 to 5.5. This is in agreement with blue native gel experiments (to be published) and with immuno-blotting experiments [53]. From these results, we conclude that the number of

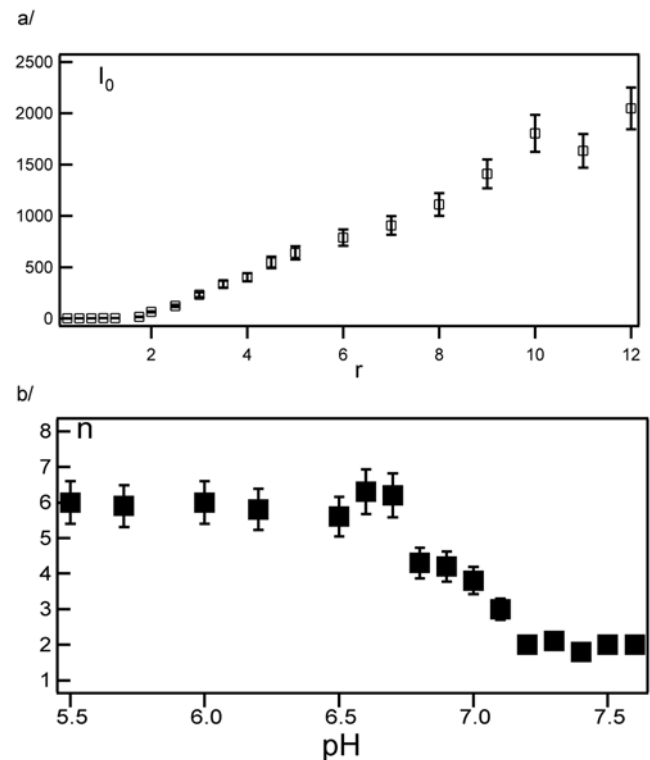


Figure 6. Determination of the stoichiometry of the complex MexA-OprM: Evolution of the intensities of free MexA with the molar ratio r and the evolution of the stoichiometry with pH. (a) Variation of the intensity I_0 associated to free FITC-labeled MexA proteins as a function of molar ratio r . In this experiment, $d_W = 200$ Å and pH = 7.5. This variation provides the stoichiometry number equal to $n_{MexA}/n_{OprM} = 2$. (b) Variation of the stoichiometry number with pH.

doi:10.1371/journal.pone.0005035.g006

binding sites on each OprM trimer is governed by acid-base equilibria.

pH-dependent conformational changes of AcrA, a protein analogous to MexA within the AcrA/B TolC *E. coli* efflux pump have been reported [54] and a similar behavior can be presumed for MexA. Our result correlates these observed conformation changes with a variation in the stoichiometry of the interaction with OprM.

Conclusion

An original approach is developed combining the FRAPP technique and the use of a versatile L_3 sponge phase that makes it possible to extract crucial information about interactions between membrane proteins embedded in the bilayers of the sponge phase. The clear advantage lies in the ability to adjust at will the spacing between two adjacent bilayers. After validating our approach on the streptavidin-biotinylated peptide complex, we study the interactions between two membrane proteins, MexA and OprM, from bacterial efflux pump. The mode of interaction, the size of the protein complex and its potential stoichiometry are determined. In particular, we demonstrate that: MexA is effectively embedded in the bilayers; MexA and OprM interact only if they are embedded in opposite bilayers separated by a distance close to the periplasmic thickness in *P. aeruginosa*. We also show that the MexA-OprM association is enhanced when the position and orientation of the protein is restricted by the bilayers. The stoichiometry of the complex exhibits a strong pH dependence in the range 2 to 6 MexA per OprM trimer. Our approach can be extended to different transmembrane protein complexes that are difficult to investigate by other methods. The method is not limited by the number of proteins so the association of several proteins can be studied in the same way. It can also be expanded to other areas, opening new avenues: for example to co-crystallize proteins or to study protein-DNA interactions by screening the experimental conditions governing the complex formation.

Materials and Methods

Proteins, peptides and probes

FITC (Fluoresceine IsoThioCyanate)-labeled streptavidin was purchased from Interchim and used as received. The twelve-leucine α -helix transmembrane peptide (L_{12}) whose sequence is AKK-(L_{12})-GKK was synthesized and biotinylated (B- L_{12}) in the Department of Biochemistry and Molecular Genetics (University of Colorado, Denver). FITC-hexadecylcarbonyl (FITC- C_{16}) was purchased from Molecular Probes and used as received. The periplasmic protein MexA was expressed and purified according to [55] in its mature form and in a mutant form (with the N-terminal cysteine deleted) [47]. The outer membrane protein OprM was expressed and purified as previously described [50]. Depending of the experiments, OprM and MexA could be labeled with FITC (Molecular Probes). All proteins were solubilized in a solution S_1 of composition: 1% (w/w) β -octylglucoside (β -OG) (from Sigma), 100 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 pH 7.5, and 5% (v/v) glycerol. The L_3 phase [56,57] was prepared by mixing altogether a non-ionic surfactant [penta-monododecylether ($C_{12}E_5$, from Nikko Chemicals- Jan Dekker)], a co-surfactant β -OG (molar ratio [$C_{12}E_5$] / [β -OG] = 7) and an aqueous solution (100 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 pH 7.5, 5% (v/v) glycerol). In such a system, although bilayers are randomly connected, a mean distance between bilayers can be locally defined. A volume of solution S_1 , containing the proteins, was then added and mixed with the sponge phase so that the $C_{12}E_5$ to β -OG molar ratio equals 7. The membrane volume fraction ϕ_m is defined by the ratio

$(V_{\beta OG} + V_{C_{12}E_5}) / V_{solution}$. The separation distance between bilayers can be very precisely tuned by simply varying ϕ_m . The L_3 phase is prepared within a minute and remains stable at least for several months. The protein concentration in the L_3 phase was controlled during the sample preparation. In this study, measurements were performed on individual samples for each protein concentration and bilayer separation distance.

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) technique

The separation distance between bilayers, (d_{11}), has been determined using small angle X-ray scattering (SAXS) technique. Measurements were performed using a rotating anode generator. The Cu- $K_{\alpha 1}$ wavelength (1.54 Å) was selected by a gold-coated quartz mirror. The scattering intensity was recorded as a function of the scattering vector q ($= \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$) using a detector with a spatial resolution of 0.2 mm. The distance from the detector to the sample was 770 mm. The final resolution of the set-up was 0.02 nm. Samples were placed in sealed glass capillaries and positioned in a thermostated holder ($T=296$ K). All spectra exhibited a broad peak indicating that the material has a well defined characteristic spacing (Supplementary data figure S1) with an intensity decay scaling asymptotically as d^{-2} with $d = \frac{2\pi}{q}$ for small d resulting from the bilayer structure [56]. The peak position provided the characteristic distance $d_B = \frac{2\pi}{q_{max}}$ with a precision of 5%. Sponge phases have also been observed by freeze-fracture electron microscopy (Supplementary data figure S2) and the distance between bilayers extracted from these micrographs matches the values obtained by SAXS [57]. The separation distance between bilayers, d_{11} , was deduced by subtracting the bilayers thickness $\delta_m = 32$ Å [58] to d_B which is kept constant. The asymptotic behavior is checked in the insert of the supplementary figure S1 to assess the existence of bilayers. The insertion of membrane or soluble proteins in the phase at concentrations below 60 μ M does not modify the parameters of the phase (Supplementary data Figure S1). This result is the same for interacting proteins inserted in the sponge phase. Moreover, freeze fracture electron micrographs of the L_3 phase do not show segregation process in the protein localization and show no change in the L_3 phase structure after protein incorporation.

Circular Dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were recorded at 25°C using a JASCO J-810 spectropolarimeter. The far UV CD spectroscopic measurements were carried out in a 1 mm path-length cuvette (110-QS P, from Hellma). For these measurements we used a protein concentration of 50 μ M. The secondary structure contents of MexA and OprM were calculated from their far UV CD spectra using the K2D software. For a protein concentration error in sponge phase of less than 4%, we determined that the contents of α -helix and β -sheet of both proteins were similar to that found in their respective crystallographic structures. Furthermore, we observe in Figure S3 (Supplementary data) only small differences between the spectra of the proteins (the transmembrane OprM and the membrane MexA proteins) solubilized in solution (with β -OG) and incorporated into the sponge phase, as observed for other proteins [59]. This shows that the conformation of both proteins is conserved after incorporation into the sponge phase.

Fluorescence Recovery After fringe Pattern Photobleaching (FRAPP)

Proteins were incorporated into the L_3 phase at concentrations varying from 0.1 to 5 μ M. A fringe pattern was produced by two Argon ion laser beams (Spectra-Physics) set to a wavelength of

488 nm, and focused onto the capillary containing a 10 μL sample. Fringe spacing, i , was controlled and varied from 5 to 100 μm . A 50 ms long exposure under a 400 mW laser illumination resulted in the bleaching of the fluorescent molecules located in the bright fringes, whereas the other molecules retained their fluorescence. The diffusion of the fluorescent molecules resulted in the recovery of the initial intensity in the bright fringes that was monitored by a probe laser and collected over a wide area by a photomultiplier. Because the detection was carried out over a large number of bilayers and of proteins, a high signal to noise ratio was achieved. In a single pulse, measurements were actually averaged over 10^8 proteins. If a single molecule species was diffusing, the recovery signal was characterized by a single exponential decay with a characteristic recovery time τ [32]. If the sample contained several molecular species, the recovery intensity was a sum of exponentials (Fig. 1). The recovery time associated with each exponential gave a diffusion coefficient characteristic of one species. The intensity associated with each exponential was also proportional to the associated molecular species. The systematic use of at least 4 interfringe sizes i ($1 \mu\text{m} < i < 200 \mu\text{m}$) allowed us to check the Brownian diffusion of all peptides, and to obtain the diffusion coefficient from $D = \frac{i^2}{4\pi^2\tau^2}$, with a precision better than 4%. Five different samples per experiment were used to extract statistics on diffusion coefficients.

Supporting Information

Figure S1 X-ray spectra of the L3 phase with and without proteins. X-ray spectra realized for a L3 phase of $\phi_m = 0.3$ with (- -) and without (-) MexA protein. The insert shows a graph of the

intensity vs d^2 for small d values. The results are well-fitted by a d^2 variation characteristic of bilayer structure.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005035.s001 (0.18 MB TIF)

Figure S2 Freeze fracture electron micrograph of the L3 phase. Freeze-fracture electron microscopy realized for a L3 phase of $\phi_m = 0.25$.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005035.s002 (0.96 MB TIF)

Figure S3 Ultraviolet CD spectra of proteins MexA and OprM. Far UV CD spectra performed on: (i) lipid anchored membrane protein MexA in a solution of β -OG (- - (black)) (ii) MexA incorporated into the L3 phase (- - (grey)), (iii) the transmembrane protein OprM in a solution of β -OG (black solid line) and (iv) OprM incorporated into the L3 phase (grey solid line).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005035.s003 (0.21 MB TIF)

Acknowledgments

We are grateful to A. Maldonado for freeze-fracture electron microscopy experiments. We thank M.-A. Badet for the use of her CD spectropolarimeter and F. Pinet for fruitful discussions. We wish to thank D. Lerouge for his technical assistance and P. Vachette for comments on the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MR. Performed the experiments: MR HB. Analyzed the data: MR NT AD WU. Contributed reagents/materials/analysis tools: YG HB GP RSH. Wrote the paper: MR YG NT AD WU.

References

- Andersen C, Hughes C, Koronakis V (2000) Chunnel vision - Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO reports* 1(4): 313–318.
- McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR (2003) The structure and function of drug pumps: an update. *Trends in Microbiology* 11: 21–29.
- Poole K (2001) Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 500–508.
- Zgurskaya H, Nikaido H (1999) Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13): 7190–7195.
- Cooper MA, Singleton VT (2007) A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *J Mol Recognit* 20(3): 154–184.
- Katsamba PS, Park S, Laird-Offringa IA (2002) Kinetic studies of RNA-protein interactions using surface plasmon resonance. *METHODS* 26(2): 95–104.
- Schagger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane-protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199(2): 223–231.
- Camacho-Carvajal MM, Wollscheid B, Aebersold R, Steimle V, Schamel WW (2004) Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates - A proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 3(2): 176–182.
- Ebel C, Eisenberg H, Ghirlando R (2000) Probing protein-sugar interactions. *Biophys J* 78(1): 385–393.
- Rivas G, Stafford W, Minton AP (1999) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* 19(2): 194–212.
- Lebowitz J, Lewis MS, Schuk P (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science* 11: 2067–2079.
- Kalb E, Tamm LK (1992) Incorporation of cytochrome b5 into supported phospholipid bilayers by vesicle fusion to supported monolayers. *Thin Solid Films* 210/211: 763–765.
- Kleman M (1999) The lamellar and sponge phases of dilute surfactant systems: Structures and defects at equilibrium and under shear. *Pramana* 53(1): 107–119.
- Wadsten P, Wöhri AB, Snijder A, Katona G, Gardiner AT, et al. (2006) Lipidic sponge phase crystallization of membrane proteins. *J Mol Biol* 364: 44–53.
- Porte G, Appell J, Bassereau P, Marignan J (1989) L α to L3 : a topology driven transition in phases of infinite fluid membranes. *J Phys France* 50: 1335–1347.
- Coulon C, Roux D, Bellocq AM (1991) Second-order symmetric-asymmetric phase transition of randomly connected membranes. *Phys Rev Lett* 66: 1709–1712.
- Laurer JH, Fung JC, Sedat JW, Smith SD, Samseth J, et al. (1997) From Micelles to Randomly Connected, Bilayered Membranes in Dilute Block Copolymer Blends. *Langmuir* 13: 2177–2180.
- Mahjoub HF, Bourgaux C, Sergot P, Kleman M (1998) Evidence of a Sponge-to-Lamellar Phase Transition under Shear by X-Ray Scattering Experiments in a Couette Cell. *Phys Rev Lett* 81: 2076–2079.
- Cates ME, Roux D, Andelman D, Milner ST, Safran SA (1988) Random Surface Model for the L3-Phase of Dilute Surfactant Solutions. *EuroPhys Lett* 5: 733–739.
- Balinov B, Olsson U, Soederman O (1991) Structural similarities between the L3 and bicontinuous cubic phases in the AOT-brine system. *J Phys Chem* 95: 5931–5936.
- Skouri M, Marignan J, Appell J, Porte G (1991) Fluid membranes in the « semi-rigid regime » : scale invariance. *J Phys II Fr* 1: 1121–1132.
- Kurtisovski E, Taulier N, Ober R, Waks M, Urbach W (2007) Molecular Origin of Model Membrane Bending Rigidity. *Phys Rev Lett* 98: 258103.
- Cates ME, Roux D (1990) Random bilayer phases of dilute surfactant solutions. *J Phys: Condens Matter* 2: SA339–SA346.
- Roux D, Coulon C, Cates ME (1992) Sponge phases in surfactant solutions. *J Phys Chem* 96: 4174–4187.
- Freyssingas E, Nallet F, Roux D (1996) Measurement of the membrane flexibility in lamellar and “sponge” phases of the C₁₂E₅/hexanol/water system. *Langmuir* 12(25): 6028–6035.
- Savage DF, Egea PF, Robles-Colmenares Y, O’Connell JD 3rd, Stroud RM (2003) Architecture and Selectivity in Aquaporins: 2.5 Å X-ray Structure of Aquaporin Z. *PLoS Biol* 1: 334–340.
- Morais-Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, et al. (1998) Crystal Structure and Functional Analysis of the HERG Potassium Channel N-terminus: A Eukaryotic PAS Domain. *Cell* 95: 649–655.
- Van Ede J, Nijmeijer JRJ, Welling-Wester S, Orvell C, Welling GW (1989) Comparison of non-ionic detergents for extraction and ion-exchange high-performance liquid chromatography of Sendai virus integral membrane proteins. *J Chromatogr* 476: 319–327.
- Gambin Y, Lopez-Esparza R, Refay M, Sieracki E, Gov NS, et al. (2006) Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Aca Sci USA* 103: 2098–2102.
- Refay M (2007) Caractérisation de complexes protéiques : Etude statique et dynamique d’associations entre protéines membranaires. Thesis UPMC Paris.
- Gambin Y (2006) Dynamique en milieux confinés. Peptides et protéines en interaction avec des bicouches modèles. Thesis UPMC Paris.

32. Davoust J, Devaux PF, Leger L (1982) Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological membranes. *EMBO J* 1(10): 1233–1238.
33. Naji A, Levine AJ, Pincus PA (2007) Corrections to the Saffman-Delbrück Mobility for Membrane Bound Proteins. *Biophys J* 93: L49–L51.
34. Florin EL, Moy VT, Gaub HE (1994) Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 264(5157): 415–417.
35. Helm CA, Knoll W, Israelachvili JN (1991) Measurement of Ligand-Receptor Interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(18): 8169–8173.
36. Lívnaš O, Bayer EA, Wilchek M, Suzzman JL (1993) Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(11): 5076–5080.
37. Hendrickson WA, Pähler A, Smith JL, Satow Y, Merritt EA, et al. (1989) Crystal-structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2190–2194.
38. Stone HA, Ajdari A (1998) Hydrodynamics of particles embedded in a flat surfactant layer overlying a subphase of finite depth. *J Fluid Mech* 369: 151–173.
39. Anderson DM, Wennerstroem H (1990) Self-diffusion in bicontinuous cubic phases, L3 and microemulsion. *J Phys Chem* 94: 8683–8694.
40. Maldonado A, Nicot C, Waks M, Ober R, Urbach W, et al. (2004) Confined Diffusion in a Sponge Phase. *J Phys Chem* 108: 2893–2897.
41. Maldonado A, Urbach W, Ober R, Langevin D (1996) Swelling behavior and local topology of an L3 (sponge) phase. *Phys Rev E* 54: 1774–1778.
42. Graham LL, Beveridge TJ, Nanninga N (1991) Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends Biochem Sci* 16(9): 328–329.
43. Mokhonov V, Mokhonova E, Yoshihara E, Masui R, Sakai M, et al. (2005) Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization. *Protein Expr Purif* 40(1): 91–100.
44. Akama H, Kanemaki M, Nakae T (2004) Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa* - Dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* 279(51): 52816–52819.
45. Akama H, Matsuura T, Kashiwagi S, Yoneyama H, Tsukihara T, et al. (2004) Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 25939–25942.
46. Higgins MK, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V (2004) Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(27): 9994–9999.
47. Yoneyama H, Maseda H, Kamiguchi H, Nakae T (2000) Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *J Biol Chem* 275(7): 4628–4634.
48. Fernandez-Recio J, Walas F, Federici L, Venkatesh Pratap J, Bavro VN, et al. (2004) A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* 578(1–2): 5–9.
49. Touzé T, Eswaran J, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, et al. (2004) Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Molec Microbiol* 53: 697–706.
50. Broutin I, Benabdelhak H, Moreel X, Lacombe M-B, Lerouge D, et al. (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the outer membrane efflux proteins OprM and OprN from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. , Section F: Struct. Biol Cryst Commun* 61(3): 315–318.
51. Lambert O, Benabdelhak H, Chami M, Jouan L, Nouaille E, et al. (2005) Trimeric structure of OprN and OprM efflux proteins from *Pseudomonas aeruginosa*, by 2D electron crystallography. *J Struct Biol* 150: 50–57.
52. Bokma E, Koronakis E, Lobedan S, Hughes C, Koronakis V (2006) Directed evolution of a bacterial efflux pump: Adaptation of the *E-coli* TolC exit duct to the *Pseudomonas MexAB* translocase. *FEBS Lett* 580(22): 5339–5343.
53. Narita SI, Eda S, Yoshira E, Nakae T (2003) Linkage of the efflux-pump expression level with substrate extrusion rate in the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 922–926.
54. Ip H, Stratton K, Zgurskaya H, Liu J (2003) pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of *Escherichia coli* multidrug efflux system. *J Biol Chem* 278(50): 50474–50482.
55. Trépout S, Mornet S, Benabdelhak H, Ducruix A, Brisson AR, et al. (2007) Membrane protein selectively oriented on solid support and reconstituted into a lipid membrane. *Langmuir* 23(5): 2647–2654.
56. Porte G (1992) Lamellar phases and disordered phases of fluid bilayer-membranes. *J Phys Cond Matter* 4: 8649–8670.
57. Strey R, Jahn W, Porte G, Bassereau P (1990) Freeze-fracture electron-microscopy of dilute lamellar and anomalous isotropic (L3) phases. *Langmuir* 6: 1635–1639.
58. Lu JR, Li ZX, Thomas RK, Binks BP, Crichton D, et al. (1998) The structure of monododecyl pentaethylene glycol monolayers with and without added dodecane at the air/solution interface: A neutron reflection study. *J Phys Chem B* 102(30): 5785–5793.
59. Swords NA, Wallace BA (1993) Circular-dichroism analyses of membrane proteins : examination of environmental effects on bacteriorhodopsin spectra. *Biochem J* 289: 215–219.

Efflux Unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients[∇]

Lucie Vettoretti,¹ Patrick Plésiat,^{1*} Cédric Muller,¹ Farid El Garch,² Gilles Phan,³ Inna Attrée,⁴ Arnaud Ducruix,³ and Catherine Llanes¹

Department of Bacteriology, University of Franche-Comté, Faculty of Medicine, F-25030 Besançon, France¹; Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium²; Laboratoire de Cristallographie, RMN Biologique, UMR CNRS 8015, Faculté de Pharmacie, Paris V, F-75270 France³; and Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés, F-38054 Grenoble, France⁴

Received 31 July 2008/Returned for modification 10 October 2008/Accepted 18 February 2009

Retrospective analysis of 189 nonredundant strains of *Pseudomonas aeruginosa* sequentially recovered from the sputum samples of 46 cystic fibrosis (CF) patients over a 10-year period (1998 to 2007) revealed that 53 out of 189 (28%) samples were hypersusceptible to the β -lactam antibiotic ticarcillin (MIC \leq 4 μ g/ml) (phenotype dubbed Tic^{hs}). As evidenced by *trans*-complementation and gene inactivation experiments, the mutational upregulation of the efflux system MexXY was responsible for various degrees of resistance to aminoglycosides in a selection of 11 genotypically distinct strains (gentamicin MICs from 2 to 64 μ g/ml). By demonstrating for the first time that the MexXY pump may evolve in CF strains, we found that a mutation leading to an F1018L change in the resistance-nodulation-cell division (RND) transporter MexY was able to increase pump-promoted resistance to aminoglycosides, cefepime, and fluoroquinolones twofold. The inactivation of the *mexB* gene (which codes for the RND transporter MexB) in the 11 selected strains showed that the Tic^{hs} phenotype was due to a mutational or functional loss of function of MexAB-OprM, the multidrug efflux system known to contribute to the natural resistance of *P. aeruginosa* to β -lactams (e.g., ticarcillin and aztreonam), fluoroquinolones, tetracycline, and novobiocin. Two of the selected strains synthesized abnormally low amounts of the MexB protein, and 3 of 11 strains expressed truncated MexB ($n = 2$) or MexA ($n = 1$) polypeptide as a result of mutations in the corresponding genes, while 7 of 11 strains produced wild-type though nonfunctional MexAB-OprM pumps at levels similar to or even higher than that of reference strain PAO1. Overall, our data indicate that while MexXY is necessary for *P. aeruginosa* to adapt to the hostile environment of the CF lung, the MexAB-OprM pump is dispensable and tends to be lost or inactivated in subpopulations of *P. aeruginosa*.

The chronic colonization of the airways by *Pseudomonas aeruginosa* is often associated with a decline in respiratory function and higher rates of morbidity in cystic fibrosis (CF) patients (44). As antibiotic chemotherapy remains the cornerstone of the management of CF lung infection, many studies have attempted to correlate the results of *in vitro* methods for susceptibility testing to patients' outcomes in order to optimize individual treatments. However, clinical practice brings evidence that the administration of antibiotics predicted to be poorly efficient by *in vitro* susceptibility tests may actually improve the condition of some CF patients (16, 67, 73). On the other hand, strains that are susceptible to many antibiotics *in vitro* may turn out to be impossible to eradicate *in vivo* by "appropriate" antibiotic regimens. The reasons why conventional parameters (MIC and MBC) fail to reliably predict clinical success in the treatment of pulmonary exacerbations are complex and related to both host and bacterial factors (21). For instance, the mode of life of *P. aeruginosa* in CF airways is believed to contribute to the higher resistance of the pathogen *in vivo* (recently discussed in reference 55). Alternatively, the

great phenotypic diversity of bacterial populations at the stage of chronic infection may be underestimated when routine susceptibility tests are performed on a colony morphotype basis (14, 30, 61, 69).

More than three decades ago, May and Ingold (51) reported the existence of an intriguing subpopulation of *P. aeruginosa* in the sputum samples of CF patients that is hypersusceptible to carbenicillin *in vitro* (MIC \leq 6 μ g/ml). The strains exhibiting this particular phenotype, dubbed Tic^{hs} in the present paper (for hypersusceptibility to ticarcillin), accounted for 33% of the selected isolates. A subsequent study confirmed the high prevalence of these strains (45%) and their even distributions among the mucoid and nonmucoid populations of *P. aeruginosa* (30). The Tic^{hs} phenotype, which extends to other penicillins (e.g., azlocillin and piperacillin), tetracycline, and trimethoprim but not to aminoglycosides, was attributed to qualitative variations in outer membrane proteins (30) and later on was associated with mutations in a genetic locus closely linked to *nalB* (15). Interestingly, studies in the 1990s demonstrated that the *nalB* gene encodes a negative regulator of MexAB-OprM (63), a polyspecific efflux system which contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* toward a wide range of antibiotics including β -lactams, tetracyclines, trimethoprim, fluoroquinolones, and novobiocin (36, 40). In parallel, another efflux pump, MexXY, which is encoded by a distinct operon (*mexXY*) on the bacterial chromosome, was found to provide CF isolates with moderate resistance to amino-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie, EA 3186, UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France. Phone: (33) 3 63 08 22 06. Fax: (33) 3 63 08 22 32. E-mail: patrick.plesiat@univ-fcomte.fr.

[∇] Published ahead of print on 2 March 2009.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids^a

Strain or plasmid	Phenotype or genotype	Reference or source
Strains		
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type reference strain	82
MutGR1	<i>mexXY</i> overexpressing mutant of PAO1	83
FE60	Δ <i>mexXY</i> mutant of PAO1	12
PT629	<i>mexAB-oprM</i> overexpressing mutant of PAO1	11
FB1	<i>mexB::FRT</i> mutant of PAO1	This study
K1119	Δ <i>mexAB-oprM</i> mutant of PAO1	39
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid-free derivative of strain mt-2; <i>hsdR1</i> ($r^- m^+$)	2
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>recA thi pro hsdR⁻M⁺</i> RP4-2-Tc::Mu Km::Tn7 Tp ^r Sm ^r	72
DH5 α	F ⁻ <i>supE44 endA1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>thi-1 recA1</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) <i>U169</i> ϕ 80 <i>dlaCZ</i> Δ M15 <i>phoA gyrA96 relA1 deoR</i> λ^-	Invitrogen
Plasmids		
pAK1900	Broad-host-range expression vector; Amp ^r Tic ^r	62
pRK2013	Broad-host-range helper plasmid; Tc ^r	35
pRSP17	<i>mexAB-oprM</i> operon cloned into broad-host-range vector pRK415; Tc ^r	79
pAZ17	<i>mexZ</i> gene cloned into pAK1900; Amp ^r Tic ^r	83
pAGH97	<i>mexXY</i> operon cloned into pAK1900; Amp ^r Tic ^r	65
pAGH29	pAGH97 encoding an F29S substitution in MexY; Amp ^r Tic ^r	This study
pAGH1018	pAGH97 encoding an F1018L substitution in MexY; Amp ^r Tic ^r	This study
pEX100Tlink	Gene replacement vector with multiple-cloning site from pUC18; <i>oriT⁺ sacB⁺</i> Amp ^r	64
pPS858	Source of FRT gene sequences, green fluorescent protein gene, and Gen ^r cassette; Amp ^r	24
pFLP2	Source of Flp recombinase; Amp ^r	24
pEXB	1-kb PCR fragment of the <i>mexB</i> gene cloned into pEX100Tlink; Amp ^r	This study
pEXBR	FRT cassette from pPS858 inserted into pEXB; Amp ^r	This study
pUC18	Multipurpose cloning vector; Amp ^r	85
pUCAY	1.1-kb internal fragment of <i>mexY</i> cloned into pUC18; Amp ^r	This study

^a Abbreviations: Tp^r, trimethoprim resistance; Sm^r, streptomycin resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Tic^r, ticarcillin resistance; Tc^r, tetracycline; Gen^r, gentamicin resistance.

glycosides, fluoroquinolones, and the zwitterionic cephalosporin cefepime when stably overproduced upon various mutations (31, 50, 83, 84).

The present study revisits the prevalence of Tic^{hs} subpopulations of *P. aeruginosa* in a cohort of 46 CF patients. Analysis of 11 representative Tic^{hs} strains shows the divergent roles played by the efflux systems MexAB-OprM and MexXY in the adaptation of *P. aeruginosa* to the specific environment of CF lungs.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria, growth conditions, and drug susceptibility tests. The laboratory strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Strains 72.1 and 100.1 were isolated during a French national survey of *P. aeruginosa*-associated bloodstream infections and were found to be genotypically different (25). An environmental strain, *P. aeruginosa* E1, was isolated from surface waters in the east of France. The 189 CF strains of *P. aeruginosa* cited in the text were obtained from 19 children and 27 adult CF patients monitored at the Besançon teaching hospital in France between 1998 and 2007. These nonredundant isolates were selected from standard sputum cultures on the basis of both patient and resistance profiles. We considered all the strains from the same individual patient that differed by at least one major difference (from the category "susceptible" to the category "resistant") in their profiles of susceptibility to a panel of 16 antibiotics according to the breakpoints defined by the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (<http://www.sfm.asso.fr/>) to be nonredundant. Routine susceptibility testings with the disk diffusion method were performed on Mueller-Hinton agar (MHA) plates (Bio-Rad) as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (8). Strains 615R, 3020R, 2715, 2716, 2721, 2729, 2804, 2858, 2933, 2998, and 3066 were selected for further analysis because of their hypersusceptibility to ticarcillin (MIC \leq 2 μ g/ml). All

these isolates exhibited very different random amplified polymorphic DNA banding patterns (data not shown) (46). Random amplified polymorphic DNA banding pattern analysis showed that 615R was clonally related to an aminoglycoside-susceptible isolate, 615S, occurring in a same sputum sample (83). Similarly, 3020R was found in mixed populations with a genotypically identical counterpart, 3020S, exhibiting wild-type susceptibility to antibiotics. Lipopolysaccharide O serotyping was performed by slide agglutination with fresh colonies and specific antisera supplied by Bio-Rad. The strains were routinely cultured at 37°C in Mueller-Hinton broth (MHB; Bio-Rad) or on MHA plates. Where necessary and unless otherwise stated, the media were rendered selective by the addition of 50 μ g/ml ampicillin for *Escherichia coli* and 150 μ g/ml ticarcillin or 200 μ g/ml gentamicin for *P. aeruginosa*. Electrotransformation of competent cells with plasmid DNA was performed as reported elsewhere previously (74). The MICs of selected antibiotics were determined by the conventional serial twofold macrodilution method in MHA with adjusted concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺ (BBL, Cockeysville, MD), by using a Steers replicator and inocula of ca. 10⁴ CFU per spot (7). Inoculated plates were incubated for 18 h at 37°C \pm 1°C before bacterial growth was assessed visually.

Complementation experiments. The complementation of MexAB-OprM deficient strains 2804, 2933, and K1119 with broad-host-range plasmid pRSP17(Tc^r), which carries the wild-type *mexAB-oprM* operon from PAO1 (79), was carried out by triparental mating essentially as indicated previously by Srikumar et al. (80). In short, cultures of donor strain *E. coli* S17-1(pRSP17), of helper strain *E. coli* HB101(pRK2013), and of a recipient *P. aeruginosa* strain grown overnight were mixed together (50 μ l:50 μ l:100 μ l, respectively); pelleted in a microcentrifuge for 20 s; and resuspended in 25 μ l of MHB. The bacterial mixture was spotted onto the surface of an MHA plate and left during 4 h at 37°C before dispersion in 1 ml MHB. MHA plates containing 200 μ g/ml cetrizime (to counterselect the *E. coli* strains) and tetracycline at twofold the MIC (to select for the *P. aeruginosa* transconjugants) were inoculated with 100- μ l fractions of the suspension and incubated for 48 to 72 h at 37°C. The presence of plasmid pRSP17 in selected colonies was checked by agarose gel electrophoresis after small-scale

TABLE 2. Primers used in the study

Function and primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Reference or source
Gene expression		
mexB1	ATC CGC CAG ACC ATC GCC A	27
mexB2	CAT CAC CAG GAA CAC GAG GAG G	27
mexC3	GTA CCG GCG TCA TGC AGG GTT C	11
mexC4	TTA CTG TTG CGG CGC AGG TGA CT	11
mexE4	CCA GGA CCA GCA CGA ACT TCT TGC	11
mexE5	CGA CAA CGC CAA GGG CGA GTT CAC C	11
mexG1	GCA ACT GGC TCT GGC TGA CC	27
mexG2	ACG GCG GTG GCG ATG TTG AA	27
mexJ1	GCC CTG TCC CTG TTT TCC TCC C	27
mexJ2	CCT TCT TTA CCC GCT CGC CG	27
mexV1	CGT CAG CAG ATC GCC CTT TTC AGC	42
mexV2	CGC TTT TCG AGA TGG CCT TGC TGC	42
mexY1a	TTA CCT CCT CCA GCG GC	33
mexY1b	GTG AGG CGG GCG TTG TG	33
uvrD1	CAC GCC TCG CCC TAC AGC A	34
uvrD2	GGA TCT GGA AGT TCT GCT CAG C	34
Gene inactivation^a		
mexBrec1	CTC <u>GGA TCC</u> GTC GGT GAC TTC CAG GTG TT (BamHI)	This study
mexBrec2	CTC <u>AAG CTT</u> GAA AGG AAC ATC CGG TTG AA (HindIII)	This study
mexYb1	CTC <u>GGA TCC</u> GGT CTA CAC CCT GGT CAT CG (BamHI)	This study
mexYb2	CTC <u>AAG CTT</u> GGC CGA CCT TGA AGT AGA TG (HindIII)	This study
Mutagenesis experiments^b		
F29S sup	GCG ATC CGC TCC CTG CCG GTC	This study
F29S down	GAC CGG CAG GGA GCG GAT CGC	This study
F1018 up	CTG GTA CCG CTG CTC TTC CTG GTG GTC	This study
F1018 down	GAC CAC CAG GAA GAG CAG CGG TAC CAG	This study

^a The restriction sites introduced into primers are underlined in the sequences, with the corresponding endonucleases indicated in parentheses.

^b The nucleotide substitutions introduced into primers are indicated in boldface type in the sequences.

extraction. The susceptibility of transconjugants to ticarcillin and aztreonam, two specific substrates of the MexAB-OprM pump (49), was subsequently assayed in MHB without IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) since *mexAB-oprM* is constitutively expressed from the *Plac* promoter in pRSP17 (79).

Molecular biology methods. Standard protocols were used for DNA restriction, fragment ligation, plasmid transformation, and agarose gel electrophoresis (1). Plasmids were extracted and purified with the Qiagen (Hilden, Germany) Midi kit. Chromosomal DNA was prepared with the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI). PCR amplifications were carried out in a 50- μ l final volume with 0.5 U of BioTaq Red (Bioline, Paris, France). The reactions were performed using a DNA thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany) for 35 cycles, each consisting of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 1 min at 72°C. DNA amplicons were sequenced on both strands in a 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the BigDye Terminator v3 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Data were subsequently edited with SeqScape software v2.5 (Applied Biosystems).

QRDR sequencing. The search for mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) encoded by the genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* was carried out in strains 2716, 2804, and 3066, as described previously (26). Isolates 2716 and 3066 exhibited wild-type QRDRs, while 2804 showed the canonical T83I substitution in GyrA that is known to confer fluoroquinolone resistance (56).

Quantitative real-time PCR. The expression levels of the operons *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexGHI-opmD*, *mexJK*, *mexVW*, and *mexXY* were assessed by reverse transcription real-time PCR (RT-PCR) with the fluorescent dye Sybr green (Qiagen Sciences, MD) in a RotorGene RG3000 apparatus (Corbett Research, Sydney, Australia), as described previously by Dumas et al. (11). The primers used for the amplification of the *mexB* (primers mexB1 and mexB2), *mexC* (mexC3 and mexC4), *mexE* (mexE4 and mexE5), *mexG* (mexG1 and mexG2), *mexJ* (mexJ1 and mexJ2), *mexV* (mexV1 and mexV2), and *mexY* (mexY1a and mexY1b) genes are listed in Table 2. The gene transcription levels were normalized in each strain to that of the housekeeping gene *uvrD* (34) and expressed as ratios to the values of strain PAO1 (by definition set at 1). The RT-PCR data presented here are means of four determinations from two independent experiments. Well-characterized mutants overexpressing MexAB-OprM

(PT629) (38), MexCD-OprJ (EryR) (52), MexEF-OprN (PAO7H) (37), MexJK (PAO318) (6), and MexXY (MutGR1) (83) were used as positive controls. None of the CF isolates exhibited mRNA levels of the *mexC* and *mexE* genes greater than 5% of those of EryR and PAO7H, respectively. The transcript levels of the *mexG* and *mexV* genes in the CF strains were found to be identical or rather close to those of wild-type strain PAO1 (from 1- to 3.8-fold and from 0.4- to 1.7-fold, respectively).

Immunodetection of MexB, MexY, and OprM. Bacterial membranes (whole-membrane fractions for MexB and MexY and outer membrane fractions for OprM) were isolated, subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and analyzed by Western blotting with MexB-, MexY-, and OprM-specific polyclonal antisera (diluted 1:1,000, 1:20,000, and 1:5,000, respectively), as reported previously (28).

Gene inactivation experiments. The *sacB*-based strategy described previously by Hoang et al. (24) was used here to inactivate the *mexB* gene. Briefly, a ca. 1-kb BamHI-HindIII PCR fragment carrying *mexB* from strain PAO1 (primers mexBrec1 and mexBrec2) (Table 2) was cloned into BamHI-HindIII-restricted vector pEX100Tlink(*sacB*⁺), yielding pEXB. This plasmid was cleaved inside the insert with endonuclease SphI, and the resultant fragment was blunt ended with Klenow enzyme. The 1.7-kb SmaI fragment, which contains the gentamicin cassette, the green fluorescent protein gene, and the Flp recognition target (FRT) gene sequences from plasmid pPS858 (24), was then ligated into linearized pEXB. This recombinant plasmid, named pEXBR, was conjugally transferred from *E. coli* S17.1 to the *P. aeruginosa* strains. Recombinant clones were selected on M9 minimal medium (1) supplemented with gentamicin, and merodiploids were subsequently resolved by culture on MHA medium containing 5% (wt/vol) sucrose and gentamicin. Flippase-promoted excision of the chromosomally integrated FRT cassette (gentamicin resistance and green fluorescent protein markers) was finally achieved by the transfer of plasmid pLFP2, as described previously (12). The disruption of *mexB* by the FRT sequences was verified by PCR and DNA sequencing experiments.

For unknown reasons, the above-described *sacB*-based strategy with plasmid pEX Δ XYR (12) failed to inactivate the *mexXY* operon in the CF strains. A suicide plasmid derived from multicopy vector pUC18(Tic^r) was thus constructed in *E. coli* DH5 α cells by cloning a ca. 1.1-kb BamHI-HindIII PCR fragment

internal to the *mexY* gene (primers *mexYb1* and *mexYb2*) (Table 2). Transformants of CF isolates 3020S, 3020R, and 2804 with crossover recombination of the resultant plasmid pUCΔY with the chromosomally located *mexY* gene were obtained on MHA medium supplemented with ticarcillin. PCR experiments confirmed the disruption of *mexY* by pUCΔY in these bacteria.

Mutagenesis experiments. Site-directed mutagenesis of the *mexY* gene was performed with the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Plasmid pAGH97, which carries the *mexXY* operon from strain PAO1 (65), was used as the target DNA. The oligonucleotide primers, each complementary to opposite strands of pAGH97 and harboring the desired nucleotide substitution (Table 2), were extended during temperature cycling by *Pfu* Turbo polymerase (Stratagene). Two pairs of primers, designated F29S-up/F29S-down and F1018L-up/F1018L-down (Table 2), were used to introduce the amino acid substitutions F29S and F1018L, respectively, in plasmid-encoded MexY in vitro. DNA sequence analysis confirmed that the proper nucleotide changes had been successfully engineered in the resultant plasmids pAGH29 and pAGH1018, respectively. Transformants of a Δ*mexXY* mutant from PAO1, named FE60, and of *Pseudomonas putida* reference strain KT2440 were obtained by electrotransformation and subsequent selection on MHA with ticarcillin. We used the same strategy to generate additional mutations in pAGH1018, leading to K329Q and W358R substitutions in the MexX protein and T543A substitution in the MexY protein (data not shown).

β-Lactamase activities. Enzymatic activities were measured on crude French press lysates by a spectrophotometric assay using nitrocefin as a chromogenic substrate (26). Briefly, CF strains were cultured to mid-log phase both in 200 ml MHB (uninduced culture) and in 200 ml MHB (induced culture) supplemented with 50 μg/ml cefoxitin, a β-lactam antibiotic that is able to strongly induce the expression of chromosomally encoded AmpC β-lactamase in *P. aeruginosa* cells. Spectrophotometric measurements were performed on each bacterial lysate in triplicates.

RESULTS

Prevalence of ticarcillin-hypersusceptible strains among CF patients. Forty-six CF patients with *P. aeruginosa*-positive sputum samples (19 children and 27 adults) were monitored on a regular basis between 1998 and 2007 at the teaching hospital of Besançon, France. Analysis of the drug resistance patterns of 189 nonredundant (as defined in Materials and Methods) isolates sequentially collected from these patients during the survey showed that 25 of 46 patients (54.3%) were colonized with *P. aeruginosa* strains that were hypersusceptible to ticarcillin (at least fourfold more susceptible than wild-type strains such as PAO1) (MIC ≤ 4 μg/ml) (Fig. 1). Interestingly, many of the strains displaying this particular phenotype, named Tic^{hs}, appeared to exhibit various degrees of resistance to aminoglycosides (gentamicin, amikacin, tobramycin, and netilmicin) (data not shown). For instance, 32 of 53 (60.4%) of the Tic^{hs} isolates were at least fourfold more resistant to tobramycin than was PAO1 (i.e., MIC ≥ 2 μg/ml). However, these rates were not very different from those of the isolates with ticarcillin MICs of ≥8 μg/ml (98/136 isolates; 72%), supporting the notion that the Tic^{hs} phenotype and aminoglycoside resistance result from independent mechanisms. In order to further characterize the Tic^{hs} subpopulation, we selected 11 genotypically distinct Tic^{hs} strains showing various levels of resistance to aminoglycosides from different patients. In four patients, the Tic^{hs} strains constituted the only *P. aeruginosa* population detected in the sputum samples over the course of the survey. In the other seven patients, the Tic^{hs} isolates were found in mixed populations with one (*n* = 3), two (*n* = 1), or more (*n* = 3) strains for which ticarcillin MICs were ≥8 μg/ml. In one case, a Tic^{hs} isolate with moderate resistance to aminoglycosides (615R) was present in a mixed culture with a genotypically identical counterpart (615S) showing wild-type susceptibility to these anti-

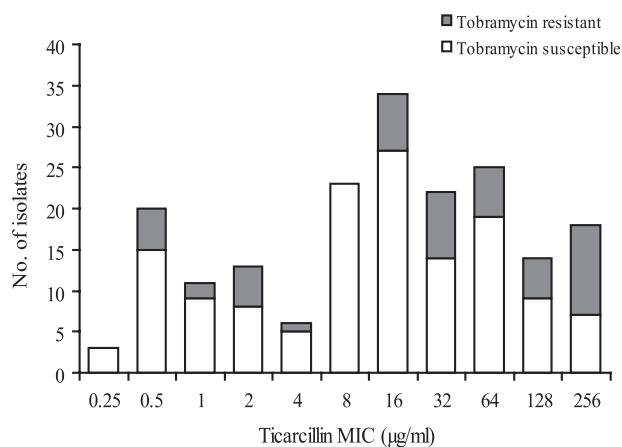


FIG. 1. Susceptibilities of selected CF isolates to ticarcillin and tobramycin. One hundred eighty-nine isolates recovered from 46 patients were tested for drug susceptibility with the standard agar dilution method. White and gray bars represent isolates that are susceptible (MIC ≤ 4 μg/ml) and resistant (MIC ≥ 8 μg/ml) to tobramycin according to CLSI breakpoints, respectively.

biotics. Finally, in another patient, the Tic^{hs} isolate (3020R) was cocultured with a clonally related parent exhibiting wild-type susceptibility to both ticarcillin and aminoglycosides (3020S). As expected from long-term colonizing strains (23), only 2 of 11 of the selected isolates were serotypeable (O:3 and O:11 for 2716 and 2729, respectively), while 3 of 11 isolates produced mucoid colonies (2715, 2858, and 2933). These data confirmed that the Tic^{hs} phenotype is not necessarily associated with a loss of O-type lipopolysaccharides or mucoidy.

Role of the MexXY-OprM pump in aminoglycoside resistance. As indicated in Table 3, the selected Tic^{hs} strains exhibited various levels of resistance to antipseudomonal aminoglycosides such as gentamicin (2- to 64-fold), amikacin (4- to 64-fold), and tobramycin (2- to 128-fold) as well as to enzyme-recalcitrant test compounds like fortimicin (2- to >16-fold) (data not shown) and apramycin (2- to 64-fold) (data not shown) (71). These results were fully consistent with previously published data showing the absence of horizontally acquired aminoglycoside-modifying enzymes in most CF isolates of *P. aeruginosa* (29, 45, 70, 83). As the efflux system MexXY-OprM is known to play a major role in emergence of aminoglycoside resistance in CF strains (31, 83, 84), we assessed its expression at the gene (*mexY*) and the protein (MexY) levels by reverse transcription RT-PCR and Western blotting, respectively. As expected, all the Tic^{hs} strains were found to overexpress both the *mexY* gene (11.4- to 58.8-fold) (data not shown) and the MexY protein compared with aminoglycoside-susceptible strains PAO1, 615S, and 3020S (Fig. 2).

An upregulation of the *mexXY* operon may result from mutations occurring in the regulatory gene *mexZ*, which codes for a TetR-like repressor, or in as-yet-undetermined loci (31, 43, 77, 83, 84). Modulating previous conclusions that CF strains overexpress *mexXY* mostly as a result of mutations in the *mexZ* gene (31, 83), only 5 of 11 strains exhibited alterations (frame-shifts) in the coding sequence of *mexZ* (Table 4). The nucleotide sequences of *mexZ* and of the *mexZ-mexXY* intergenic region were identical to that of PAO1 in the other six strains.

TABLE 3. Drug susceptibilities of the *P. aeruginosa* strains

Strain	MIC (µg/ml) ^a								
	GEN ^b	AMK	TOB	TIC	ATM ^c	CAZ	FEP	CIP	NOV ^c
PAO1 and derivatives									
PAO1	1 (0.125)	2	0.5	32	4 (0.12)	1	2	0.25	512 (32)
MutGR1	2	8	1	32	4	1	8	0.5	512
FE60(pAK1900)	0.125	0.5	0.06	ND	ND	ND	2	0.25	ND
FE60(pAGH97)	1	4	0.5	ND	ND	ND	8	0.5	ND
FE60(pAGH29)	1	4	0.5	ND	ND	ND	8	0.5	ND
FE60(pAGH1018)	2	8	1	ND	ND	ND	16	1	ND
Clinical strains									
615S	1 (0.125)	2	0.25	1	0.12 (—) ^d	1	2	4	64 (—)
615R	8 (0.125)	16	2	2	0.25 (0.25)	1	4	1	4 (4)
3020S	2 (0.125)	2	0.5	16	2 (0.25)	1	2	0.25	512 (8)
3020R	16 (0.25)	32	4	2	0.25 (0.25)	1	4	0.5	16 (16)
2715	4 (0.125)	8	2	2	0.5 (0.25)	1	16	1	16 (8)
2716	2 (0.125)	8	1	2	0.25 (0.25)	1	8	2	32 (32)
2721	16 (0.125)	32	4	2	0.25 (0.12)	0.5	8	1	32 (32)
2729	8 (0.25)	16	2	0.5	0.25 (0.25)	1	8	1	32 (32)
2804	64 (0.5)	128	64	0.5	0.25 (—)	2	32	16	8 (—)
2858	4 (0.125)	8	1	2	0.25 (—)	4	4	0.5	64 (—)
2933	16 (—)	32	4	0.5	0.25 (0.12)	0.5	16	0.5	8 (4)
2998	8 (0.125)	16	4	0.5	0.12 (0.12)	0.5	8	1	32 (32)
3066	64 (0.125)	128	16	2	0.25 (0.25)	>8	32	16	32 (32)

^a Values in boldface type (or underlined) are at least fourfold higher (or fourfold lower) than those for wild-type strain PAO1. Abbreviations: GEN, gentamicin; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; TIC, ticarcillin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; NOV, novobiocin; ND, not determined.
^b Values in parentheses indicate MICs after the *mexXY* operon has been repressed in *trans* by plasmid pAZ17 (in isolates 3020S and 3020R, the inactivation of *mexXY* was achieved by the chromosomal integration of plasmid pUCΔY). Preliminary experiments showed that the addition of 50 µg/ml ticarcillin to selectively maintain pAZ17 in cultures did not influence MICs.
^c Values in parentheses indicate MICs after the *mexB* gene has been inactivated by the FRT cassette from plasmid pEXBR.
^d —, the inactivation of *mexXY* or *mexB* was unsuccessful in these strains.

Variations in the amino acid sequence of the MexXY pump. While stable MexXY overproduction is usually associated with a modest two- to fourfold increase in aminoglycoside MICs in *in vitro* mutants such as MutGR1 (as seen here for CF strains 2715, 2716, and 2858) (Table 3), most of the selected Tic^{hs} isolates displayed much stronger resistance to these antibiotics (for example, 2804 and 3066 fall into the “resistant” category according to CLSI breakpoints). To evaluate the contribution of the upregulated MexXY proteins to aminoglycoside resistance, we turned off the expression of the *mexXY* operon in the Tic^{hs} strains by *trans*-complementation with a plasmid-encoded repressor, MexZ (construct pAZ17). The transformation of the strains with pAZ17 was successful in all the strains but 3020R and 2933. Subsequent RT-PCR experiments provided evidence that the *mexY* gene was strongly repressed following

pAZ17 transfer (data not shown). As expected, the MexZ-dependent repression of *mexXY* resulted in a decrease in aminoglycoside MICs in the pAZ17-transformed strains (Table 3). The residual resistance that was supposed to result from MexXY-independent mechanisms was actually very low and comparable between the CF isolates and PAO1(pAZ17) (gentamicin MICs from 0.125 to 0.5 µg/ml versus 0.125 µg/ml, respectively), thus suggesting a major role of the efflux process in the high level of aminoglycoside resistance exhibited by some strains (2721, 2804, and 3066). Of note, pAZ17-dependent repression of *mexXY* also strongly reduced the MIC of ciprofloxacin (from 16 to 0.5 µg/ml) in 3066, a strain showing wild-type QRDRs in the DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes. The transfer of pAZ17 had similar effects on ciprofloxacin resistance (from 16 to 1 µg/ml) in 2804, which contains

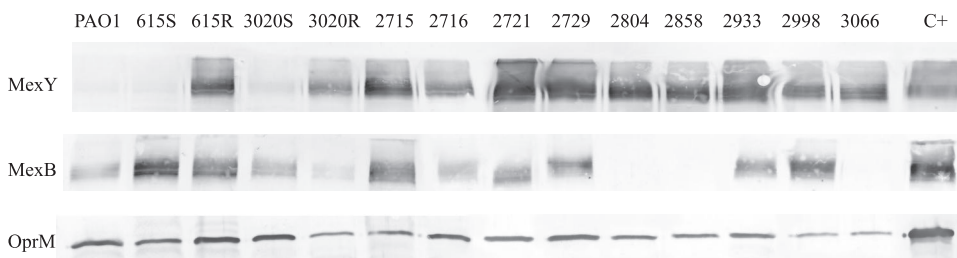


FIG. 2. Expression of efflux pumps in CF isolates. The production of the MexY, MexB, and OprM proteins was assessed by Western blotting with specific antibodies after extraction of cell membranes and SDS-PAGE. Mutants MutGR1 and PT629 were used as positive controls (C+) for the overexpression of MexXY and MexAB-OprM efflux systems, respectively. Twenty micrograms of whole (outer and inner) membranes was subjected to SDS-PAGE for detection of MexY and MexB. Ten micrograms of outer membrane protein was used per lane for immunodetection of OprM.

TABLE 4. Mutations and amino acid changes in CF strains

Strain	Alteration(s) ^a				
	<i>mexZ</i>	MexX	MexY	<i>mexA</i>	<i>mexB</i>
Control strains					
E1	— ^b	— ^{c,d,e,f}	— ^{g,h,i,j}	ND	ND
72.1	+6 nt at position 166	— ^b	— ^h	ND	ND
100.1	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^{g,h,i}	ND	ND
CF strains					
615S	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
615R	Δ386 nt (from A248 to A633)	— ^{d,e,f}	A254G, Q282R ^h	— ^b	— ^b
3020S	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
3020R	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
2715	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
2716	— ^b	R351S ^{d,f}	E152D ^h	— ^b	— ^b
2721	— ^b	L22M, D135Y ^{d,e,f}	S46G, Q282R, A596V, K692M ^k	— ^b	— ^b
2729	Δ15 nt (from C595 to C609)	— ^{d,e,f}	I536P ^h	— ^b	— ^b
2804	Δ81 nt (from C217 to C297) IS <i>Pa1635</i>	— ^{d,f}	F1018L ^h	— ^b	Δ1 nt at position 2147
2858	— ^b	— ^{c,d,e,f}	G1002A ^{h,j}	— ^b	— ^b
2933	— ^b	— ^{c,d,e,f}	— ^h	Δ1 nt at position 870	— ^b
2998	+1 nt at position 27	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
3066	Δ25 nt (from C217 to G241)	— ^{d,e,f}	F29S	— ^b	G2364A (nonsense)

^a Nucleotide or amino acid positions refer to strain PAO1. Abbreviations: nt, nucleotide; ND, not determined.

^b Sequence identical to that of PAO1.

^c Contains amino acid substitution A30T of PA14.

^d Contains amino acid substitution K329Q of PA14.

^e Contains amino acid substitution L331V of PA14.

^f Contains amino acid substitution W358R of PA14.

^g Contains amino acid substitution I536V of PA14.

^h Contains amino acid substitution T543A of PA14.

ⁱ Contains amino acid substitution G589A of PA14.

^j Contains amino acid substitution Q840E of PA14.

^k Contains amino acid substitution N1036T of PA14.

a T83I substitution in the QRDR of GyrA. However, one could argue that pAZ17-encoded MexZ may well sensitize *P. aeruginosa* to antibiotics by mechanisms other than repressing *mexXY*. To address this issue, we carried out the inactivation of the *mexY* gene in several isolates (PAO1, 3020S, 3020R, and 2804) by homologous recombination with suicide plasmid pUCΔY. As with the pAZ17 strategy, the disruption of *mexY* rendered 3020R (MIC equal to 0.25 μg/ml) and 2804 (0.5 μg/ml) almost as susceptible to gentamicin as 3020S::pUCΔY (0.125 μg/ml) and PAO1::pUCΔY (0.125 μg/ml), thereby confirming the absence of mechanisms other than drug efflux providing significant resistance to aminoglycosides (more than fourfold) in the Tic^{hs} strains. Residual resistance to ciprofloxacin in 2804 following the inactivation of *mexY* (1 μg/ml) was identical to that provided by pAZ17.

Since our RT-PCR and immunoblotting experiments did not show evident differences in levels of MexXY expression among the clinical strains, we wondered whether specific amino acid substitutions in these proteins would account for the variations in aminoglycoside MICs. We thus sequenced the *mexXY* operon in all the 11 CF strains as well as in the two susceptible strains 615S and 3020S (Table 4). We next aligned these sequences with those of reference strains PAO1 and PA14 (available at <http://v2.pseudomonas.com/>), those of two bacteremic, non-CF isolates (72.1 and 100.1) (25), and that of one environmental strain, named E1. Interestingly, all the CF strains appeared to contain the same amino acid substitutions in the predicted proteins MexX (A30T, K329Q, L331V, and/or

W358R) and MexY (T543A, Q840E, and/or N1036T) compared with PAO1 (Table 4). However, since these variations were present in susceptible strains PA14, 100.1, and E1, they were considered to be nonsignificant with respect to aminoglycoside resistance. On the other hand, a number of strain-specific changes in MexXY could be identified in bacteria exhibiting low to moderate resistance to gentamicin such as 615R (MIC of 8 μg/ml), 2716 (2 μg/ml), 2721 (16 μg/ml), 2729 (8 μg/ml), and 2858 (4 μg/ml). While it remains unclear whether these amino acid changes in the MexXY translocase actually improve the efflux of aminoglycosides and resistance, this finding demonstrates that the MexXY proteins may be subject to evolution in CF strains (compare 615S and 615R in Table 4).

To gain an insight into the adaptation of the pump to the CF lung environment, we focused our attention on strains 2804 and 3066, which combine a strong resistance to aminoglycosides (gentamicin MIC of 64 μg/ml) with a single-amino-acid substitution in MexY (F1018L and F29S, respectively). These strain-specific mutations were engineered by directed mutagenesis into the *mexXY* operon from PAO1 previously cloned in a proper orientation downstream of the *lac* promoter on broad-host-range vector pAK1900 (yielding construct pAGH97) (65). The resultant constructs, named pAGH1018 (encoding an F1018L change) and pAGH29 (encoding an F29S change), and their parent plasmid, pAGH97, were transferred by electroporation into a Δ*mexXY* mutant, FE60, derived from PAO1. Control RT-PCR experiments confirmed that the three trans-

formants of FE60 expressed similar mRNA levels of the *mexY* gene (56.6 ± 6 times that of PAO1). As indicated in Table 3, FE60(pAGH1018) turned out to be consistently more resistant (twofold) than FE60(pAGH97) or FE60(pAGH29) to all of the MexXY substrates including aminoglycosides, cefepime, and ciprofloxacin. To confirm these results, we introduced pAGH97 and pAGH1018 into *P. putida* reference strain KT2440 (2) and measured the levels of resistance of the resultant transformants to gentamicin and cefepime. Again, pAGH1018 provided levels of resistance to both agents that were twofold greater than that provided by pAGH97 (4 versus 2 $\mu\text{g/ml}$ and 4 versus 2 $\mu\text{g/ml}$, respectively). These data provide clear evidence that specific mutations may improve the drug transport activity of the MexXY translocase. However, since the resistance levels of FE60(pAGH1018) were much lower than those of 2804, we wondered whether the additional substitutions detected in the MexX (K329Q and W358R) and MexY (T543A) proteins from 2804 might cooperatively improve the efflux activity provided by the F1018L mutation (as pAGH1018 carries the *mexXY* operon from strain PAO1). The K329Q, W358R (MexX), and T543A (MexY) changes were thus engineered into pAGH1018 in addition to F1018L. The resultant plasmid was found to confer the same levels of resistance to mutant FE60 as pAGH1018, ruling out a cooperative effect of the four amino acid residues in pump functioning (data not shown).

Role of the MexAB-OprM pump in the Tic^{hs} phenotype. As indicated in Table 3, the hypersusceptibility of the 11 selected strains to ticarcillin (16- to 64-fold more than reference strain PAO1) also extended to other antipseudomonal β -lactams such as aztreonam (8- to 32-fold) and piperacillin (four- to eightfold) (data not shown) but was not correlated with lower resistance to ceftazidime or cefepime. Since the MexAB-OprM efflux system strongly contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* to ticarcillin, carbenicillin, aztreonam, and piperacillin but has a poor impact on intrinsic resistance to ceftazidime (40, 58), we hypothesized that the selected Tic^{hs} strains might have impaired MexAB-OprM pumps. Supporting this notion, all the strains proved to be highly susceptible to novobiocin, a hydrophobic antibiotic known to be specifically extruded by the pump (41, 47) (Table 3). Furthermore, a disruption of the *mexB* gene in these bacteria (except 615S, 2804, and 2858, for which the inactivation experiments with plasmid pEXBR were unsuccessful) did not result in a more-than-twofold reduction in MICs of ticarcillin (data not shown), aztreonam, and novobiocin (Table 3). In comparison, *mexB* null mutant FB1 was 64-, 32-, and 16-fold more susceptible than its parent, PAO1, to these agents, respectively (data not shown). It should be mentioned here that cefepime MICs may be influenced by the expression of other efflux systems such as MexCD-OprJ and MexXY-OprM independently of MexAB-OprM (49).

Because the activity of MexAB-OprM is thought to be impaired when the MexCD-OprJ (20, 32) or MexEF-OprN (47) pump is upregulated, we measured the transcript levels of the *mexC* and *mexE* genes (as representatives of the *mexCD-oprJ* and *mexEF-oprN* operons, respectively) by reverse transcription RT-PCR. However, none of the 11 CF strains significantly overexpressed these operons compared to wild-type strain PAO1 (data not shown). Similar negative results were obtained

when the transcript levels of the *mexGHI-opmD*, *mexJK*, and *mexVW* operons, which code for other efflux systems operating with resistance-nodulation-cell division (RND) transporters (data not shown), were assessed.

More interestingly, immunoblotting analysis of bacterial membranes revealed the presence of smaller amounts of the MexB and OprM proteins in strain 3020R compared with its wild-type counterpart, 3020S, and the lack of visible MexB bands in strains 2804, 2858, and 3066 (Fig. 2). Surprisingly, the latter bacteria were able to express the OprM protein, the exit duct which, together with MexAB, enables the extrusion of substrates to the external milieu. The other 7 of 11 Tic^{hs} strains (namely, 615R, 2715, 2716, 2721, 2729, 2933, and 2998) were found to produce significant amounts of both MexB and OprM. Assessment of gene transcription by RT-PCR confirmed that *mexB* was underexpressed in 3020R (0.2-fold) and 2858 (0.3-fold) compared with PAO1 or 3020S (onefold) and was expressed at wild-type levels or higher (0.9- to 2.3-fold) in the other strains (data not shown). However, RT-PCR experiments also showed significant levels of *mexB* transcripts in MexB-deficient isolates 2804 and 3066 (0.9- and 3.1-fold that of PAO1, respectively), suggesting the presence of mutations disrupting *mexB* in these bacteria.

Nucleotide sequencing of (i) the repressor gene *mexR*, whose product downregulates the *mexAB-oprM* operon (63); (ii) the intergenic region between *mexR* and *mexA*, which carries the two promoters of *mexAB-oprM* (13, 68); (iii) the PA3721 gene (5), which negatively controls the expression of a protein (coded by PA3719) that is able to bind and inactivate MexR (9); and (iv) the PA3574 gene, which codes for a second repressor of *mexAB-oprM* (76), did not show significant mutations in strains 2858 and 3020R, compared with PAO1 and 3020S, that would explain their reduced levels of expression of MexB. In addition, no differences were observed between strains 2858, 3020S, 3020R, and PAO1 with respect to mRNA levels of the *mexR*, PA3719, and PA3574 genes (data not shown).

Alterations in the MexAB-OprM pump. Several studies have shown that amino acid substitutions in the transporter MexB at positions essential for proton translocation (22), proper compaction of transmembrane stretches (TMSs) (86), trimerization (53), or interactions with the periplasmic adaptor MexA (53, 60) may impair the transport activity of MexAB-OprM and thus increase the susceptibility of resultant mutants to the pump substrates. Similarly, mutations in the *mexA* gene may compromise the oligomerization of MexA or its binding to MexB and thus alter the functioning of the efflux system (59). To determine if such alterations could be responsible for the Tic^{hs} phenotype, we sequenced the *mexAB-oprM* operon in the 11 CF strains as well as in 615S and 3020S. This operon appeared strictly conserved and identical to that of reference strain PAO1 in all the isolates except in three strains (Table 4). Strains 2804 and 3066 exhibited mutations in *mexB* resulting in premature stop codons and truncated polypeptides of 719 and 787 amino acids, respectively, instead of 1,046 residues for the wild-type MexB protein. These polypeptides, which lacked 5 of 12 transmembrane segments (from TMS-8 to TMS-12) were not detected in whole-membrane extracts by Western blotting (Fig. 2), likely because of their inability to insert into the cytoplasmic membrane. As mentioned above, mRNAs of the

corresponding *mexB* genes were amplified by RT-PCR. Strain 2933 displayed a C870 deletion in the *mexA* gene, generating a truncated polypeptide of 311 amino acids lacking 72 residues at the C-terminal end of the MexA protein. Finally, nucleotide sequencing of the *oprM* genes demonstrated that all of the Tic^{hs} isolates produced a strictly conserved OprM protein that was 100% identical to that of PAO1.

To confirm the impact of mutations on pump activity in strains 2933, 2804, and 3066, we attempted to complement the bacteria with plasmid pRSP17, which carries the entire *mexAB-oprM* operon from PAO1 in the proper orientation downstream of the *Plac* promoter. The transfer of pRSP17 was successful with 2933, 2804, and a Δ *mexAB-oprM* derivative of PAO1 named K1119 but not with 3066. The overexpression of *mexAB-oprM* from pRSP17 dramatically increased the resistance to ticarcillin (from 0.5 to 64 μ g/ml) and aztreonam (from 0.25 to 16 to 32 μ g/ml) in 2933, 2804, and K1119, thus clearly indicating that in these strains, the MexAB-OprM function was lost mutationally.

Because the chromosomally encoded, large-spectrum AmpC β -lactamase contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* to many β -lactam antibiotics together with MexAB-OprM (48), we measured the β -lactamase activities expressed by the CF strains. Both their basal (from 9 to 51 nmol nitrocefin hydrolyzed $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) and cefoxitin-induced (from 1,241- to 6,604 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) enzymatic levels were comparable to those of reference strain PAO1 (33 and 3,900 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, respectively). These results provide evidence that the Tic^{hs} phenotype was not associated with deficient production in AmpC β -lactamase, especially in those strains producing intact MexA, MexB, and OprM proteins.

DISCUSSION

This study shows that many CF patients are colonized and/or infected by populations of *P. aeruginosa* that are strongly deficient in MexAB-OprM-dependent efflux activity. Bacteria expressing the typical phenotype (Tic^{hs}) due to inactive MexAB-OprM are mostly recovered during chronic colonization but may also emerge rapidly at the stage of early colonization (e.g., strain 3020R). For instance, we observed that 17 of 27 adults (63%) versus 8 of 19 children (42%) harbored Tic^{hs} isolates. This bacterial adaptation to the CF lung is intriguing, as the loss of MexAB-OprM function results in *in vitro* hypersusceptibility to a number of antibiotics that are widely prescribed for the treatment of exacerbations of pulmonary infection, such as ticarcillin, aztreonam, piperacillin, and ciprofloxacin (66). It is interesting that the increasing use of "newer" β -lactam molecules (e.g., ceftazidime, cefepime, and meropenem) over the years has not reduced the prevalence of Tic^{hs} strains compared with data reported in the initial article by May and Ingold in the early 1970s (51). There is little doubt that the Tic^{hs} phenotype expressed *in vitro* by so many persistent *P. aeruginosa* isolates does not reflect the real susceptibility of bacteria in CF hosts. It has been well documented that some lung populations of *P. aeruginosa* adapt to the strong selective pressure exerted by repeated cures of β -lactams through the stable or transient upregulation of intrinsic AmpC β -lactamase (3, 17), decreased outer membrane permeability (4), or alterations in penicillin

binding proteins (19). Preexisting subpopulations with stable, partially derepressed AmpC may thus rapidly expand under treatment with agents such as ceftazidime, piperacillin, or imipenem (17). Partial release of their β -lactamase content in sputum samples could contribute to antibiotic inactivation *in situ* (18). Whether these partially derepressed mutants would provide more susceptible bacterial populations with efficient protection against β -lactams is unclear. AmpC-overproducing mutants were not detected in the sputum samples of 10 of 25 of our patients, suggesting that at least in these patients, the persistence of Tic^{hs} populations involves nonhydrolytic mechanisms. It is conceivable that hypersusceptible bacteria may survive in the CF lung if physically protected from antibiotics by mucus and/or biofilm-like materials (10). However, our observation that most of the Tic^{hs} isolates were resistant to aminoglycosides, a class of antibiotics known to diffuse poorly in copolymer matrices (10), does not support this hypothesis (Table 3). In addition, strain 3066 turned out to be highly resistant to ceftazidime as a consequence of repeated courses of chemotherapy with this product. Because of the high prevalence of the Tic^{hs} populations, the loss of MexAB-OprM is likely to confer a decisive advantage to *P. aeruginosa* for its survival in the hostile environment of CF airways. Time-kill studies with ticarcillin in our laboratory failed to demonstrate a tolerance of the selected isolates to β -lactams under standard laboratory conditions (i.e., exponentially growing bacteria in rich medium) (data not shown). However, other conditions that more closely resemble those of the CF lung (microaerobiosis, biofilm mode of growth, and nutrient limitation) should be tested to determine which factors specifically contribute to the resistance of Tic^{hs} strains *in vivo* (78, 81).

Confirming the results of previous studies on CF strains (31, 83, 84), all the Tic^{hs} strains exhibiting some degree of resistance to aminoglycosides (at least twofold that of reference strain PAO1) (Table 3) proved to overproduce the MexXY proteins, which interact with OprM to form a functional tripartite efflux system (65). However, strain 615S provides evidence that the Tic^{hs} phenotype is not linked to MexXY upregulation (Tables 3 and 4). RT-PCR analysis of another strain, named 1710, exhibiting wild-type susceptibility to tobramycin (MIC of 0.25 μ g/ml) and hypersusceptibility to ticarcillin (MIC of 0.25 μ g/ml) (Fig. 1) confirmed this result (data not shown). More importantly, complementation experiments with plasmid pAZ17 (the *mexZ* gene) demonstrated for the first time that MexXY can be responsible for strong aminoglycoside resistance in CF strains (2804 and 3066). Although the factors that modulate MexXY-OprM functioning remain poorly understood (77, 83), we could establish that specific mutations in the transporter MexY are able to increase the efflux of aminoglycosides, cefepime, and fluoroquinolones [compare FE60(pAGH97) and FE60(pAGH1018) in Table 3]. The F1018L substitution of strain 2804 is located in TMS-12 of MexY, at the groove delimited by TMS-7, TMS-8, and TMS-9. Based on the crystal structure of the homolog transporter AcrB, this groove is supposed to be an efflux pathway for substrates from the cytosol or inner membrane (57). Additional site-directed mutagenesis studies have been carried out to elucidate how the F1018L mutation may facilitate the export of antibiotics predicted to be captured from the periplasm (87).

To our knowledge, this is the first example of the *in vivo*

emergence of resistant mutants overproducing a “modified” efflux pump. Interestingly, in this study, the two Tic^{hs} strains displaying the highest levels of resistance to aminoglycosides (2804 and 3066) both appeared to lack the MexB protein. It is tempting to assume that these strains form chimeric MexAY-OprM pumps that contribute to the resistance in addition to MexXY-OprM. Against this hypothesis, pull-down assays reported previously by Mokhonov et al. (54) did not evidence an interaction between MexA, MexY, and OprM. Alternatively, the loss of MexB might allow more recruitment of OprM by the tandem MexXY.

The suppression of MexAB-OprM drug transport activity was associated with mutations disrupting the *mexA* (2933) and *mexB* (2804 and 3066) genes in 3 of 11 of our strains. Consistent with our conclusions that pulmonary populations of *P. aeruginosa* tend to abolish MexAB-OprM efflux during long-term colonization, another study showed that isolates from 11 of 29 (38%) CF patients harbored nonsynonymous mutations in the *mexA* gene (75). Whereas 2 of 11 of our Tic^{hs} strains (3020R and 2858) were partially deficient in MexB production, 6 of 11 were unexpectedly found to express the wild-type pump at levels similar to those of PAO1. Reminiscent of this, recent data from our laboratory strongly suggest that, while normally produced, the MexAB-OprM system is functionally impaired in MexCD-OprJ-overproducing *nfxB* mutants (32). In the present study, none of the Tic^{hs} strains appeared to overexpress the *mexC* gene; nevertheless, it is clear that still unknown factors may strongly influence the drug transport activity of MexAB-OprM. Ongoing experiments are investigating the role of TonB1 in the emergence of the Tic^{hs} phenotype, since mutations in defined regions of this energy-coupling periplasmic protein may compromise the operation of the MexAB-OprM efflux pump without affecting iron acquisition (88).

In conclusion, our data demonstrate the existence in CF strains of an unbalance between the efflux system MexAB-OprM, which seems to be dispensable in the context of the CF lung environment, and MexXY-OprM, whose upregulation is necessary for *P. aeruginosa* to stand the strong selective pressure exerted by aminoglycosides. We believe that the MexXY-OprM pump should be the primary target for the development of efflux inhibitors in adjunctive therapy of CF pulmonary infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Cystic Fibrosis Association Vaincre la Mucoviscidose and the Conseil Régional de Franche Comté.

We are grateful to Christiane Bailly for collecting the *P. aeruginosa* CF isolates, Gérard Couetdic for recovery of clinical data, Thilo Köhler for providing strain PT629, Keith Poole for sharing strain K1119 and plasmid pRSP17, Fabrice Poncet for DNA sequencing, and Katy Jeannot for helpful assistance.

REFERENCES

1. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 2000. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
2. Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Rückert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**:237–247.
3. Bagge, N., M. Hentzer, J. B. Andersen, O. Ciofu, M. Givskov, and N. Høiby. 2004. Dynamic and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1168–1174.
4. Ballesteros, S., A. Fernández-Rodríguez, R. Villaverde, H. Escobar, J. C. Pérez-Díaz, and F. Baquero. 1996. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:39–45.
5. Cao, L., R. Srikumar, and K. Poole. 2004. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol. Microbiol.* **53**:1423–1436.
6. Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. P. Schweizer. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* **184**:5036–5044.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 7th ed. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 9th ed., M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Daigle, D. M., L. Cao, S. Fraud, M. S. Wilke, A. Pacey, R. Klinoski, N. C. Strynadka, C. R. Dean, and K. Poole. 2007. Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **189**:5441–5451.
10. Drenkard, E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5**:1213–1219.
11. Dumas, J.-L., C. vanDelden, K. Perron, and T. Köhler. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:217–225.
12. ElGarch, F., K. Jeannot, D. Hocquet, C. Llanes-Barakat, and P. Plésiat. 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1016–1021.
13. Evans, K., L. Adewoye, and K. Poole. 2001. MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* **183**:807–812.
14. Foweraker, J. E., C. R. Laughton, D. F. J. Brown, and D. Bilton. 2005. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:921–927.
15. Fyfe, J. A., and J. R. Govan. 1984. Chromosomal loci associated with antibiotic hypersensitivity in pulmonary isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **130**:825–834.
16. Gaillard, J. L., P. Cahen, C. Delacourt, C. Silly, M. Le Bourgeois, C. Coustère, J. de Blic, G. Lenoir, and P. Scheinmann. 1995. Correlation between activity of beta-lactam agents in vitro and bacteriological outcome in acute pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:291–296.
17. Givercman, B., P. A. Lambert, V. T. Rosdahl, G. H. Shand, and N. Høiby. 1990. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed β -lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**:247–259.
18. Givercman, B., C. Meyer, P. A. Lambert, C. Reinert, and N. Høiby. 1992. High-level β -lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:71–76.
19. Godfrey, A. J., L. E. Bryan, and H. R. Rabin. 1981. β -Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:705–711.
20. Gotoh, N., H. Tsujimoto, M. Tsuda, K. Okamoto, A. Nomura, T. Wada, M. Nakahashi, and T. Nishino. 1998. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in delta *mexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1938–1943.
21. Govan, J. W. R. 2006. Multidrug-resistant pulmonary infection in cystic fibrosis—what does “resistant” mean? *J. Med. Microbiol.* **55**:1615–1617.
22. Guan, L., and T. Nakae. 2001. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**:1734–1739.
23. Hancock, R. E. W., L. M. Mutharia, L. Chan, R. P. Darveau, D. P. Speert, and G. B. Pier. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypeable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* **42**:170–177.
24. Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, and H. P. Schweizer. 1998. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**:77–86.
25. Hocquet, D., P. Berthelot, M. Roussel-Delvallee, R. Favre, K. Jeannot, O. Bajolet, N. Marty, F. Grattard, P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen, M.-O. Husson, G. Couedic, and P. Plésiat. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3531–3536.
26. Hocquet, D., X. Bertrand, T. Köhler, D. Talon, and P. Plésiat. 2003. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1887–1894.

27. Hocquet, D., P. Nordmann, F. El'Garch, L. Cabanne, and P. Plésiat. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1347–1351.
28. Hocquet, D., C. Vogne, F. El'Garch, A. Vejux, N. Gotoh, A. Lee, O. Lomovskaya, and P. Plésiat. 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1371–1375.
29. Hurley, J. C., G. H. Miller, and A. L. Smith. 1995. Mechanism of amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:331–336.
30. Irvin, R. T., J. W. R. Govan, J. A. M. Fyfe, and J. W. Costerton. 1981. Heterogeneity of antibiotic resistance in mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from cystic fibrosis patients: role of outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:1056–1063.
31. Islam, S., S. Jalal, and B. Wretling. 2004. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:877–883.
32. Jeannot, K., S. Elsen, T. Köhler, I. Attree, C. vanDelden, and P. Plésiat. 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2455–2462.
33. Jeannot, K., M. L. Sobel, F. El Garch, K. Poole, and P. Plésiat. 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J. Bacteriol.* **187**:5341–5346.
34. Jo, J. T. H., F. S. L. Brinkman, and R. E. W. Hancock. 2003. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1101–1111.
35. Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191–197.
36. Köhler, T., M. Kok, M. Michéa-Hamzhepour, P. Plésiat, N. Gotoh, T. Nishino, L. K. Curty, and J. C. Pechère. 1996. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2288–2290.
37. Köhler, T., M. Michéa-Hamzhepour, U. Henze, N. Gotoh, L. Kocjancic Curty, and J.-C. Pechère. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**:345–354.
38. Köhler, T., M. Michéa-Hamzhepour, P. Plésiat, A. L. Kahr, and J. C. Pechère. 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2540–2543.
39. Li, X.-Z., L. Zhang, R. Srikumar, and K. Poole. 1998. β -Lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:399–403.
40. Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1948–1953.
41. Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole. 2000. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:433–436.
42. Li, Y., T. Mima, Y. Komori, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 2003. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:572–575.
43. Llanes, C., D. Hocquet, C. Vogne, D. Benali-Baitich, C. Neuwirth, and P. Plésiat. 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1797–1802.
44. Lyczack, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:194–222.
45. MacLeod, D. L., L. E. Nelson, R. M. Shawar, B. B. Lin, L. G. Lockwood, J. E. Dirk, G. H. Miller, J. L. Burns, and R. L. Garber. 2000. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J. Infect. Dis.* **181**:1180–1184.
46. Mahenthalingam, E., M. E. Campbell, J. Foster, J. S. Lam, and D. P. Speert. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1129–1135.
47. Maseda, H., H. Yoneyama, and T. Nakae. 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:658–664.
48. Masuda, N., N. Gotoh, C. Ishii, E. Sakagawa, S. Ohya, and T. Nishino. 1999. Interplay between chromosomal β -lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:400–402.
49. Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3322–3327.
50. Matsuo, Y., S. Eda, N. Gotoh, E. Yoshihara, and T. Nakae. 2004. MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**:23–28.
51. May, J. R., and A. Ingold. 1973. Sensitivity of respiratory strains of *Pseudomonas aeruginosa* to carbenicillin. *J. Med. Microbiol.* **6**:77–82.
52. Michéa Hamzhepour, M., J. C. Pechère, P. Plésiat, and T. Köhler. 1995. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2392–2396.
53. Middlemiss, J. K., and K. Poole. 2004. Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**:1258–1269.
54. Mokhonov, V. V., E. I. Mokhonova, H. Akama, and T. Nakae. 2004. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **322**:483–489.
55. Moreau-Marquis, S., B. A. Stanton, and G. A. O'Toole. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **21**:595–599.
56. Mounieinné, H., J. Robert, V. Jarlier, and E. Cambau. 1999. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:62–66.
57. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587–593.
58. Nakae, T., A. Nakajima, T. Ono, K. Saito, and H. Yoneyama. 1999. Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1301–1303.
59. Nehme, D., X.-Z. Li, R. Elliot, and K. Poole. 2004. Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in mexA compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *J. Bacteriol.* **186**:2973–2983.
60. Nehme, D., and K. Poole. 2005. Interaction of the MexA and MexB components of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexA extragenic suppressors of a T578I mutation in MexB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4375–4378.
61. Perry, J. D., L. Laine, S. Hughes, A. Nicholson, A. Galloway, and F. K. Gould. 2008. Recovery of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputa of cystic fibrosis patients by culture on selective media. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1057–1061.
62. Poole, K., D. E. Heinrichs, and S. Neshat. 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **10**:529–544.
63. Poole, K., K. Tetro, Q. X. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco. 1996. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2021–2028.
64. Quencee, L., D. Lamotte, and B. Polack. 2005. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**:63–67.
65. Ramos Aires, J., T. Köhler, H. Nikaido, and P. Plésiat. 1999. Involvement of an efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2624–2628.
66. Ramsey, B. W. 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **335**:179–188.
67. Ramsey, B. W., M. S. Pepe, J. M. Quan, K. L. Otto, A. B. Montgomery, J. Williams-Warren, M. Vasiljev, D. Borowitz, J. L. Burns, J. C. Marshall, S. Marshall, and A. L. Smith. 1999. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **340**:23–30.
68. Saito, K., S. Eda, H. Maseda, and T. Nakae. 2001. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:23–28.
69. Seale, T. W., H. Thirkill, M. Tarpay, M. Flux, and O. M. Rennert. 1979. Serotypes and antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from single sputa of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **9**:72–78.
70. Shawar, R. M., D. L. MacLeod, R. L. Garber, J. L. Burns, J. R. Stapp, C. R. Clausen, and S. K. Tanaka. 1999. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2877–2880.
71. Shimizu, K., T. Kumada, W.-C. Hsieh, H.-Y. Chung, Y. Chong, R. S. Hare, G. H. Miller, F. J. Sabatelli, and J. Howard. 1985. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:282–288.
72. Simon, R., U. Prieffer, and A. Pühler. 1983. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of gram-negative bacteria, p. 98–106. In A. Pühler (ed.), *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
73. Smith, A. L., S. B. Fiel, N. Mayer-Hamblett, B. Ramsey, and J. L. Burns.

2003. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration. *Chest* **123**:1495–1502.
74. **Smith, A. W., and B. H. Iglewski.** 1989. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**:10509.
75. **Smith, E. E., D. G. Buckley, Z. Wu, C. Saenphimmachak, L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, S. I. Miller, B. W. Ramsey, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Burns, R. Kaul, and M. V. Olson.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:8487–8492.
76. **Sobel, M. L., D. Hocquet, L. Cao, P. Plésiat, and K. Poole.** 2005. Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1782–1786.
77. **Sobel, M. L., G. A. McKay, and K. Poole.** 2003. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3202–3207.
78. **Spoering, A. L., and K. Lewis.** 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**:6746–6751.
79. **Srikumar, R., T. Kon, N. Gotoh, and K. Poole.** 1998. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:65–71.
80. **Srikumar, R., X. Z. Li, and K. Poole.** 1997. Inner membrane efflux components are responsible for β -lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**:7875–7881.
81. **Sriramulu, D. D., H. Lünsdorf, J. S. Lam, and U. Römling.** 2005. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* **54**:667–676.
82. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959–964.
83. **Vogne, C., J. Ramos Aires, C. Bailly, D. Hocquet, and P. Plésiat.** 2004. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1676–1680.
84. **Westbrock-Wadman, S., D. R. Sherman, M. J. Hickey, S. N. Coulter, Y. Q. Zhu, P. Warrener, L. Y. Nguyen, R. M. Shawar, K. R. Folger, and C. K. Stover.** 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2975–2983.
85. **Yanisch-Perron, C., J. Viera, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103–119.
86. **Yoneyama, H., H. Maseda, T. Yamabayashi, S. Izumi, and T. Nakae.** 2002. Secondary-site mutations restore the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of the xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **292**:513–518.
87. **Yu, E. W., J. Ramos Aires, and H. Nikaido.** 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* **185**:5657–5664.
88. **Zhao, Q., and K. Poole.** 2002. Differential effects of mutations in *tonB1* on intrinsic multidrug resistance and iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **184**:2045–2049.

Titre :

Étude structurale du système d'efflux membranaire MexXY-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Résumé :

La bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste impliqué dans les infections nosocomiales et touchant essentiellement les individus immunodéprimés. Parmi les mécanismes de résistance aux antibiotiques, leur efflux actif par un système de transport transmembranaire appelé Mex (*Multi-drug Efflux pump*) a pris une grande importance clinique. Ces systèmes d'efflux sont constitués d'un assemblage de trois protéines différentes : une porine de la famille OMF (*Outer Membrane Factor*), un transporteur de la famille RND (*Resistance Nodulation Division*) localisé dans la membrane interne et un adaptateur périplasmique de la famille MFP (*Membrane Fusion Protein*) assurant la cohésion du système. Le sujet de thèse porte sur l'étude structurale, essentiellement par cristallographie des rayons X, de la pompe d'efflux MexXY-OprM qui présente la particularité d'être spécifique aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides.

Title :

Structural study of the antibiotics resistance mediated by membrane efflux pump MexXY-OprM from Pseudomonas aeruginosa.

Summary :

The Gram-negative bacteria Pseudomonas aeruginosa is a notoriously opportunistic human pathogen mainly implied in hospital infection. It has been largely shown that this organism exhibits resistance to multiple antimicrobial agents, generally attributable to the expression of a membrane efflux pump called Mex (Multi-drug Efflux pump). A representative efflux pump consists in tripartite assembly: an outer membrane channel-forming protein of the OMF family (Outer Membrane Factor), an inner membrane drug-proton antiporter belonging to the RND transporter family (Resistance Nodulation Division) and a periplasmic protein of the MFP family (Membrane Fusion Protein) which consolidates the whole system. Mainly by X-ray crystallography method, the thesis focuses on the structurally uncharacterized MexXY-OprM efflux pump and its specific resistance toward aminoglycoside antibiotic family.

Discipline : Biologie Structurale

Mots-clefs : protéines membranaires ; pompe d'efflux ; résistance aux antibiotiques ; cristallographie RX ; analyse des modes normaux.

Adresse électronique : gilles.phan@free.fr