



HAL
open science

Implication des porines dans la genèse et le développement des biofilms de *Providencia stuartii*

Mariam El Khatib

► **To cite this version:**

Mariam El Khatib. Implication des porines dans la genèse et le développement des biofilms de *Providencia stuartii*. Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV012 . tel-01689827

HAL Id: tel-01689827

<https://theses.hal.science/tel-01689827>

Submitted on 22 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« Mariam EL KHATIB »

Thèse dirigée par **Jacques Philippe COLLETIER, CNRS**

préparée au sein de l'**Institut de biologie structurale**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Implication des porines dans la génèse et le développement des biofilms de *Providencia stuartii*

Thèse soutenue publiquement le **14 mars 2017**,
devant le jury composé de :

Madame Isabelle BROUTIN

Directrice de recherche, Université Paris Descartes, Rapporteur

Monsieur Christophe BELOIN

Directeur de recherche, Institut Pasteur, Rapporteur

Monsieur Jean-Marie PAGES

Directeur de recherche, Université Aix-Marseille, Examineur

Monsieur Mathias WINTERHALTER

Professeur, Université Jacobs Bremen, Examineur

Madame Maria-Isabel THOULOZE

Directrice de recherche, Institut Pasteur, Présidente

Madame Andrea DESSEN

Directrice de recherche, Institut de biologie structurale, Examineur



Résumé

Les biofilms, communautés multicellulaires bactériennes, sont omniprésents. Malgré leur importance pour l'écosystème, ils présentent une menace pour l'industrie autant que pour la santé humaine. La virulence des biofilms procède surtout de leur résistance élevée aux antibiotiques, qui rend leur éradication quasiment impossible. Ainsi, les biofilms sont impliqués dans la plupart des infections bactériennes chroniques, causant chaque année plus de 4000 décès en France. *P. stuartii* est une bactérie connue pour sa capacité à former des biofilms dans le tractus urinaire humain. Elle est responsable de 10% des INU chroniques et est décrite comme étant la plus résistante de son genre. Malgré ces faits, les études menées sur cette bactérie sont rares, freinant la compréhension du mécanisme de développement et de résistance de ses biofilms et compliquant ainsi l'avancement de nouvelles thérapies pour lutter, prévenir ou éradiquer ces infections. *P. stuartii* exprime au niveau de sa membrane externe deux porines, Omp-Pst1 et Omp-Pst2, qui constituent 70% du contenu protéique membranaire. Ces porines sont le conduit principal permettant à la bactérie de communiquer et d'échanger avec son milieu environnant. Ainsi, les porines sont vitales pour la bactérie.

A ce jour, trois publications sont disponibles qui traitent de ces deux porines, mais aucune n'a exploré leur influence sur la formation des biofilms bactériens. Les travaux effectués au cours de ma thèse ont ainsi visé à réduire le manque de connaissance sur les biofilms de *P. stuartii* et à dévoiler le rôle des porines dans l'établissement et la résistance de ces biofilms. Pour cela, nous avons segmenté notre travail en quatre parties ayant pour objectifs (1) de comprendre la formation des biofilms de *P. stuartii* et leur réponse aux stress du milieu environnant ; (2) de décrire l'effet de la suppression ou la surexpression des porines ; (3) d'étudier à l'échelle moléculaire et atomique le comportement des porines isolées ; et (4) de développer des outils pour étudier les porines à l'échelle moléculaire au sein d'un biofilm de *P. stuartii*.

Abbreviations

2D	Bidimensionnelle
3D	Tridimensionnelle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomic force microscopy: Microscopie à force atomique
BAC	Bacterial artificial chromosome: Chromosome artificiel bactérien
BLSE	Betalactamase à spectre étendu
BM	Biologie moléculaire
CCD	Charge coupled device
CMC	Concentration micellaire critique
D.O.	Densité optique
DLS	Dynamic light scattering: Diffusion dynamique de la lumière
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DOT	Dimer of trimer: Dimère de trimère
EDTA	Acide d'éthylène diamine tétraacétique
EggPC	L- α -phosphatidylcholine
EPS	Exopolysaccharides
ER	Enzymes de restrictions
F	Facteurs de structure
FP	Fluorescent protein: Protéine fluorescente
FPALM	Photoactivated localisation microscopy
GUV	Giant unilamellar vesicle: Vésicules unilamellaire géante
HAC	Human artificial chromosome: Chromosome artificiel humain
INU	Infections nosocomiales urinaires
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
LDAO	N,N-dimethyldodecylamine N-oxide
LPS	Lipopolysaccharides
LUV	Large unilamellar vesicle: Grande vésicule unilamellaire
MCS	Multiple cloning site : Site de clonage multiple
ME	Microscopie électronique
MEC	Matrice extracellulaire
MLV	Multilamellar vesicle: Vésicule multilamellaire
MSP	Membrane scaffold protein
OM	Outer membrane: Membrane externe
OMP	OM protein: Protéines de la membrane externe
OPOE	n-Octyl-poly-oxyéthylène
PAFP	Photoactivable fluorescent protein: Protéine fluorescente photoactivable
PALM	Fluorescent photoactivated localisation microscopy
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCFP	Photoconvertible fluorescent protein: Protéine fluorescente photoconvertible
PCR	Polymerase chain reaction: Réaction en chaîne par polymérase
pcSOFI	photochromic stochastic optical fluctuation imaging

PDB	Protein Data base: Base de données des protéines
PEG	Polyéthylène glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Peptidoglycanes
PSF	Point spread function: Fonction d'étalement du point
PTFP	Phototransformable fluorescent protein: Protéine fluorescente phototransformable
QS	Quorum sensing
REM	Reflection electron microscope: Microscope électronique à réflexion
RESOLFT	Reversible saturable optically linear fluorescence transitions
R_h	Rayon hydrodynamique
Rhod PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Rotations par minute
RSFP	Reversibly switchable fluorescent protein: Protéine fluorescente photocommutable
RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size exclusion chromatography
SEM	Scanning electron microscope: Microscope électronique à balayage
SR	Super-résolution
SSIM	Saturated structured-illumination microscopy
SST	Silicotungstate de sodium
STED	Stimulated emission depletion
STEM	Scanning transmission electron microscope: Microscope électronique à balayage en transmission
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy
SUV	Small unilamellar vesicle: Petite vésicule unilamellaire
TAE	Tampon Tris base, acide acétique et EDTA
TB	Terrific broth
TEM	Transmission electron microscope: Microscope électronique en transmission
ULV	Unilamellar vesicle: Vésicule unilamellaire
UV	Ultraviolet
YAC	Yeast artificial chromosome: Chromosome artificiel de levure
ΔP2	<i>P. stuartii</i> ΔOmp-Pst2
λ	Longueur d'onde

Table des matières

I. Introduction	I-9
1. Les biofilms.....	I-10
1.1. Historique	I-10
1.2. Présentation	I-11
1.3. Impact.....	I-13
1.4. Mécanisme de développement.....	I-15
1.5. Mécanismes de résistances	I-20
1.6. Traitement des biofilms	I-21
2. <i>Providencia stuartii</i>	I-23
2.1. Les bactéries Gram-négatif	I-23
2.2. Le genre <i>Providencia</i>	I-26
2.3. <i>Providencia stuartii</i>	I-26
2.4. Épidémiologie	I-27
2.5. Traitement	I-28
3. Les porines	I-28
3.1. Présentation	I-28
3.2. Rôle physiologique	I-32
3.3. Les porines de <i>P. stuartii</i>	I-35
II. Problématique	II-39
1. Manque d'études sur <i>P. stuartii</i>	II-40
2. Manque d'études sur les porines de <i>P. stuartii</i>	II-41
3. Plan de la thèse.....	II-43
III. Méthodologies	III-45
1. Biologie moléculaire	III-46
1.1. La PCR	III-46
1.2. Le clonage	III-47
1.3. La mutagenèse dirigée	III-51
2. Biochimie des protéines membranaires	III-52
2.1. Les liposomes.....	III-53

2.2. La DLS.....	III-54
3. Cristallographie aux rayons X.....	III-56
3.1. La cristallogénèse.....	III-58
3.2. La diffraction aux rayons X.....	III-61
3.3. Le traitement des données.....	III-62
4. Imagerie cellulaire.....	III-64
4.1. La microscopie de fluorescence conventionnelle.....	III-64
4.2. La microscopie électronique.....	III-69
4.3. La microscopie de super-résolution.....	III-70
IV. Matériels et méthodes.....	IV-76
1. Souches bactériennes.....	IV-77
2. Biologie moléculaire.....	IV-77
2.1. Les plasmides.....	IV-77
2.2. La mutagénèse dirigée.....	IV-78
2.3. L'assemblage par Gibson.....	IV-79
3. Etude de la croissance bactérienne et des biofilms.....	IV-80
3.1. La transformation bactérienne.....	IV-80
3.2. Le suivi de la courbe de croissance.....	IV-81
3.3. L'effet des facteurs environnementaux sur les biofilms.....	IV-81
3.4. L'imagerie des bactéries.....	IV-84
4. Biochimie des protéines membranaires.....	IV-85
4.1. L'expression et la purification des porines.....	IV-85
4.2. Le marquage des porines.....	IV-87
4.3. La formation des liposomes.....	IV-88
4.4. La DLS.....	IV-89
5. Études des protéines fluorescentes.....	IV-90
5.1. L'expression et la purification des FPs.....	IV-90
5.2. La caractérisation photophysique.....	IV-92
5.3. La caractérisation biochimique.....	IV-94
6. Cristallographie aux rayons X.....	IV-95
6.1. La cristallisation.....	IV-95
6.2. La collecte et le traitement des données.....	IV-96
7. Imagerie.....	IV-97

7.1. La microscopie d'épifluorescence	IV-97
7.2. La microscopie confocale	IV-98
7.3. La microscopie électronique	IV-99
7.4. La microscopie de super-résolution.....	IV-100
V. Résultats.....	V-101
1. Caractérisation des biofilms de <i>P. stuartii</i>	V-102
1.1. Résumé.....	V-102
1.2. Le comportement social de <i>P. stuartii</i> et l'implication d'Omp-Pst2 dans la résistance du biofilm aux agressions environnementales.	V-103
1.3. Conclusions et perspectives	V-104
2. Caractérisation des porines de <i>P. stuartii</i>	V-105
2.1. Résumé	V-105
2.2. L'auto-association des porines en DOTs permet le contact cellulaire au sein des communautés bactériennes de <i>P. stuartii</i>	V-106
2.3. Conclusions	V-107
3. Imagerie des porines au sein des biofilms	V-109
3.1. Résumé	V-110
3.2. rsFolders : Nouvelles RSFPs ultrastable pour l'imagerie de SR du périplasme bactérien	V-110
3.3. Conclusions	V-111
VI. Conclusions et perspectives	VI-112
1. Le biofilm de <i>P. stuartii</i> , une communauté soudées.....	VI-114
2. Les porines : un rôle vital et social pour la bactérie.....	VI-115
3. Les DOTs : une structure pour une mission	VI-117
4. rsFolders : un outil potentiel pour l'imagerie des porines	VI-120
VII. Références.....	VII-123

Table des figures

Figure I.1. Les biofilms existent depuis 3 milliards d'années et survivent aux conditions extrêmes.....	I-12
Figure I.2. Les biofilms dans notre vie quotidienne.....	I-13
Figure I.3. Modèle du cycle de vie des biofilms.	I-15
Figure I.4. Représentation schématique de la double membrane d'une bactérie Gram-négatif.....	I-24
Figure I.5. Comparaison de la structure de différents types de porines.....	I-29
Figure I.6. Nombre de publications par année présentes sur la base de données «Pubmed» concernant les biofilms, les bactéries <i>Providencia</i> et les porines.	I-30
Figure I.7. Structures quaternaires de la porine OmpG.	I-30
Figure I.8. Structure d'OmpF montrant les principales caractéristiques communes aux porines.....	I-31
Figure I.9. Structures d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2..	I-36
Figure I.10. Propriétés électrostatiques d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2.	I-38
Figure II.1. Comparaison entre prévalence des INU des différentes bactéries et le nombre d'études correspondantes.	II-41
Figure II.2. Structures des DOTs d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2.	II-42
Figure II.3. La relation entre <i>P. stuartii</i> , ses porines et la formation du biofilm..	II-44
Figure III.1. Les différentes étapes d'une PCR.	III-47
Figure III.2. Représentation schématique des différences entre le clonage par ER et par assemblage de Gibson.....	III-50
Figure III.3. Représentation schématique du principe de la mutagenèse dirigée..	III-51
Figure III.4. Représentation schématique comparative des différentes structures lipidiques adéquates à la stabilisation des protéines membranaires..	III-52
Figure III.5. Représentation schématique des étapes de préparation des LUV.....	III-54
Figure III.6. Représentation schématique d'une mesure de DLS.	III-55

Figure III.7. Le pourcentage et le nombre des structures de protéines publiées dans la PDB en utilisant la cristallographie, la RMN ou la cryo-ME.....	III-56
Figure III.8. L'échelle des différents objets biologiques et les techniques permettant de les observer et les étudier.....	III-58
Figure III.9. Schéma illustrant la méthode de cristallisation par diffusion de vapeur.	III-59
Figure III.10. Schéma du diagramme de phase.....	III-60
Figure III.11. La diffraction des rayons X.	III-62
Figure III.12. Diagramme d'énergie de Jablonski simplifié.....	III-66
Figure III.13. Structure générale des protéines fluorescentes.	III-67
Figure III.14. Illustration de l'image de points limitée en résolution.....	III-68
Figure III.15. Illustration des différentes classes de PTFPs.....	III-72
Figure III.16. Représentation schématique du principe d'imagerie par la microscopie STED ou RESOLFT.....	III-74
Figure III.17. Représentation schématique du principe d'imagerie par la microscopie PALM.....	III-75
Figure IV.1. Protocole d'étude des biofilms.....	IV-83
Figure IV.2. Schéma de la lame de LB-Gelzan®.....	IV-84
Figure IV.3. Extraction et purification de Omp-Pst2.....	IV-87
Figure IV.4. Les différents composants du mini-extruder.	IV-89
Figure IV.5. Extraction et purification de rsFolder.....	IV-91
Figure IV.6. Caractérisation photophysique de rsFolder.....	IV-93
Figure IV.7. Représentation schématique de la préparation de la grille pour la TEM.....	IV-99
Figure VI.1. La formation d'agrégats de protéoliposomes est induite par les DOTs de porines.....	VI-119
Figure VI.2. rsFolder2 est mieux adaptée pour l'imagerie du réticulum endoplasmique.....	VI-120
Figure VI.3. Imagerie PALM d'Omp-Pst1 exprimée au niveau de la membrane externe d'une micro-colonie bactérienne.....	VI-121
Figure VI.4. La formation des biofilms matures commencerait par la formation de communautés cellulaires flottantes.....	VI-122

I. Introduction

1. Les biofilms

Dans la plupart des milieux naturels, les cellules bactériennes se structurent en amas adhérents à une surface et enrobés d'une matrice extracellulaire. Ce phénotype leur permet de survivre dans des conditions environnementales les plus hostiles. Ces structures sont connues sous le nom de « Biofilms ».

1.1. Historique

La première observation de biofilms précède de 250 ans leur nomination comme tels. En 1683, Antonie Van Leeuwenhoek, « le père du microscope », était le premier à les observer dans sa propre plaque dentaire. Dans une lettre adressée à la société royale des sciences britanniques à Londres, il les décrivit comme étant « une pellicule formée d'animalcules plus nombreux que les hommes du Royaume¹ ».

Il a fallu attendre les années 1930s pour découvrir que ces structures sont formées par des colonies de bactéries adhérentes aux surfaces et enrobées d'une matrice extracellulaire (MEC). Arthur Henrici publia, depuis 1933 une série d'articles décrivant les micro-organismes dans le milieu aquatique². Il conclut que ceux ci se développent sur les surfaces submergées plutôt qu'en plancton. Ces observations furent confirmées par les travaux de Claude Zobell, publiés en 1935, qui soulignèrent l'irréversibilité de l'adhésion des bactéries aux surfaces³. Il rapporta qu'il suffisait de quelques minutes pour que les bactéries adhèrent au verre et qu'après deux heures, elles étaient si fermement collées que même un courant d'eau continu ne les détachait pas. Heukelekian et Heller clôturèrent cette belle décennie en décrivant pour la première fois une couche visqueuse qui se développe autour des bactéries attachées aux surfaces⁴.

C'est en 1975 que le mot « Biofilm » fut utilisé pour la première fois par WN Mack⁵. Il utilisa le terme pour décrire les films formés par les « microbes » sur les filtres d'eau. Depuis, l'histoire des biofilms fut marquée par les travaux de William Characklis, mais surtout par ceux William J. Costerton, pionnier de l'étude moderne

des biofilms et qui publia quelques 600 articles fondant ce nouveau paradigme microbiologique⁶.

1.2. Présentation

Depuis la publication de travaux de Claude Zobell³, la combinaison des techniques d'imagerie, de culture bactérienne et de marquage fluorescent a permis de montrer que les biofilms sont des systèmes biologiques très complexes tant au niveau structural que dynamique. Cette complexité contraste avec leur simplicité de formation qui ne nécessite que quatre composantes : le micro-organisme, un milieu humide, une surface et des nutriments. Ces prérequis basiques pour leur développement sont à l'origine de leur diversité et leur prévalence.

Ainsi, les biofilms sont omniprésents. Ils existent depuis l'accrétion de la terre et colonisent tout habitat contenant de l'eau et des nutriments. Des fossiles de biofilms bactériens d'environ 3.2 milliards d'années furent identifiés dans les montagnes de Makhonjwa en Afrique⁷ (Figure I.1A) et dans les rochers hydrothermaux de Pilbara Craton en Australie⁸ (Figure I.1B). Des biofilms extrémophiles furent également découverts dans diverses conditions allant des surfaces glaciales de l'Antarctique⁹ (Figure I.1C) aux sources d'eau chaude du Parc national de Yellowstone¹⁰ (Figure I.1.D) en passant par les grandes profondeurs océaniques¹¹ (Figure I.1.E) et les vernis désertiques¹² (Figure I.1.F). Dans le contexte de l'évolution et l'adaptation, ces découvertes suggèrent les biofilms comme étant un moyen de maintenir l'homéostasie des bactéries face aux fluctuations environnementales et aux conditions extrêmes de température, de pH et de rayons U.V.¹³.

Plus immédiatement, nous rencontrons les biofilms dans notre vie quotidienne. Ils se forment dans presque tous les milieux humides. Ils se développent dans les systèmes de canalisation d'eau (Figure I.2A), les circuits de refroidissement (Figure I.2B), les navires (Figure I.2D) et même les rideaux de notre douche¹⁴ (Figure I.2.C), mais surtout dans les tissus humains, les surfaces dentaires et les implants prothétiques¹⁵ (Figure I.2.E).

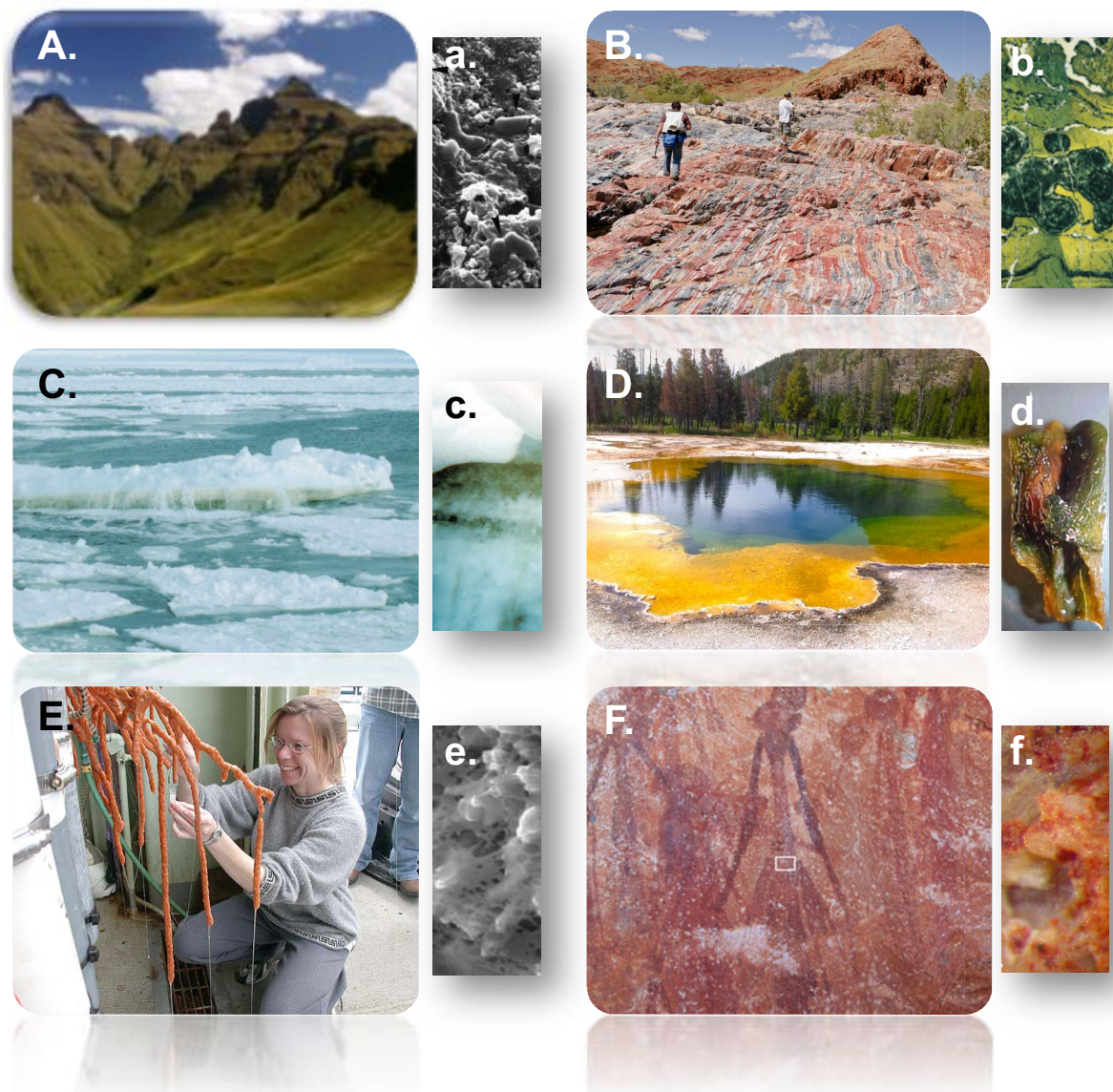


Figure I.1. Les biofilms existent depuis 3 milliards d'années et survivent aux conditions extrêmes. (A) Les montagnes de Makhoniwa (Barberton) en Afrique du Sud, où Westtall et ses collègues ont découvert des microfossiles de biofilms illustrés en (a). (B) Les cratons de Pilbara en Australie, où Rasmussen et ses collègues ont découvert des fossiles de biofilms illustrés en (b). (C) Une surface glaciaire de l'Antarctique où les biofilms (c) peuvent être vus à l'œil nu. (D) Le bassin d'eau chaude « Morning Glory » du parc national Yellowstone aux États-Unis où un échantillon de biofilms (d) a été pris en photo par Boomer et ses collègues. (E) Des biofilms submergés par une couche visqueuse de mucus couvrant des coraux prélevés par Naomi Ward des monts sous-marins de Warwick en Angleterre vus à l'œil nu et sous un microscope électronique (e). (F) Une peinture figurative dite "de Brashaw" sur une roche vernie en Australie où survivent des biofilms illustrés en (f) découverts par Pettigrew et ses collègues.

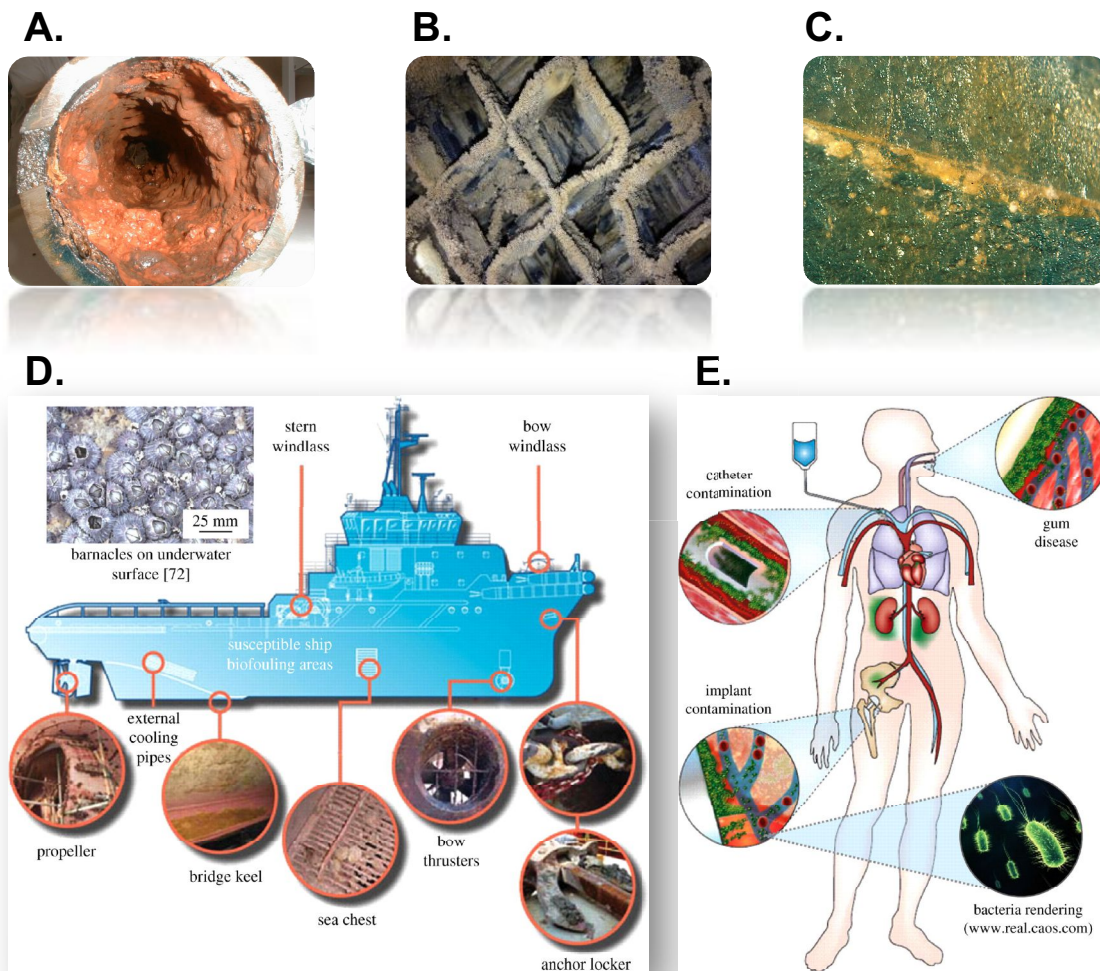


Figure I.2. Les biofilms dans notre vie quotidienne. Les biofilms tapissant (A) une canalisation d'eau (terrymcgarty.blogspot.fr), (B) un condenseur d'un système de refroidissement (amsainc.com) et (C) la partie basse du rideau de douche (biofilm.montana.edu). Des exemples de biofilms colonisant (D) différents endroits d'un navire et (E) différents tissus humains. Les schémas représentés en D et E sont pris de la revue publiée par Bixler et al¹⁶.

1.3. Impact

Les biofilms affectent profondément la santé humaine et la productivité industrielle. Les dépenses annuelles pour la protection de la qualité de l'eau, pour éviter la corrosion des canalisations, maintenir l'efficacité des générateurs d'énergie et traiter les problèmes de santé liés aux biofilms, totalisent, chaque année, plusieurs dizaines de milliards d'euros¹⁷. Les biofilms sont comparativement rares chez l'homme mais caractéristiques d'infections chroniques. Des caries dentaires à la

mucoviscidose en passant par l'ostéomyélite, différents biofilms peuvent se développer sur les tissus humains, impliquant une ou plusieurs espèces bactériennes. Les infections nosocomiales, en milieu hospitalier, restent cependant la cause numéro un d'infections par ces biofilms. En 2012, une étude de l'institut national de veille sanitaire (InVS) a montré qu'un patient hospitalisé sur vingt contracte une infection dans l'établissement où il est soigné. Cela représente, selon l'INSERM, environ 750 000 infections par an, qui seraient la cause directe de 4 000 décès en France.

Si les biofilms peuvent être néfaste à la santé et aux activités humaines, ils ne constituent pas moins une frange entière de notre environnement et sont indispensables à notre survie ainsi qu'à celle de la plupart (sinon tous) des écosystèmes. Le rapport « Global Environmental Change: Microbial Contributions, Microbial Solutions » a souligné l'importance et le rôle majeur des biofilms dans le recyclage des éléments vitaux du globe¹⁸. Ils sont également impliqués dans l'assainissement naturel des sols et des eaux souterraines des contaminants¹⁹ (ex. l'essence et les solvants chlorés). De plus, depuis les années 1980s, la culture contrôlée de biofilm a été envisagée et testée pour le traitement biologique des eaux usées^{20,21}. Ces travaux ont permis l'obtention d'un réacteur formé d'un lit de biofilm appelé MBBR (Moving bed biofilm reactor) utilisé aujourd'hui dans la nitrification et la dénitrification des eaux usées en Europe²¹.

C'est donc une des obligations de notre époque que de définir et maintenir le meilleur équilibre, la meilleure « balance », entre effets bénéfiques et nécessité de maintenir des biofilms, et leurs effets négatifs parfois dévastateurs pour la santé humaines. Il s'agit, spécifiquement, d'apprendre comment bénéficier des impacts positifs des biofilms sans les laisser nous envahir, et comment éviter leurs effets néfastes sans pour autant les éradiquer. À l'évidence, un tel dessein réclame une compréhension approfondie de leur mécanisme de développement, une connaissance fine de leur physiologie et une capacité à maîtriser leur développement et à faire échouer leurs mécanismes de résistance. À l'heure actuelle, nous sommes loin de cet objectif et notre connaissance des biofilms se limite à quelques généralités admises sur leur développement, décrites dans les paragraphes suivants de cette introduction, mais qui sont bien pâles et insuffisantes au regard de l'objectif.

1.4. Mécanisme de développement

L'implantation et le développement des biofilms englobent une variété de processus plus ou moins complexes. Ils diffèrent d'une souche bactérienne à une autre, d'une surface à une autre, mais aussi selon les conditions environnementales tels que la température, le pH, la pression et la composition du milieu²². Ceci complique leur étude et empêche la généralisation d'un mécanisme de développement unique. Malgré les différences de structure et de résistance, les biofilms partagent des étapes de développement communes qui peuvent être divisées en cinq : (1) l'adhésion à une surface, (2) la formation d'une microcolonies, (3) la production d'une matrice extracellulaire (MEC), (4) la maturation et (5) la dispersion. Ces étapes sont résumées graphiquement dans la figure I.3 et décrites plus en détail dans les sous-sections qui suivent.

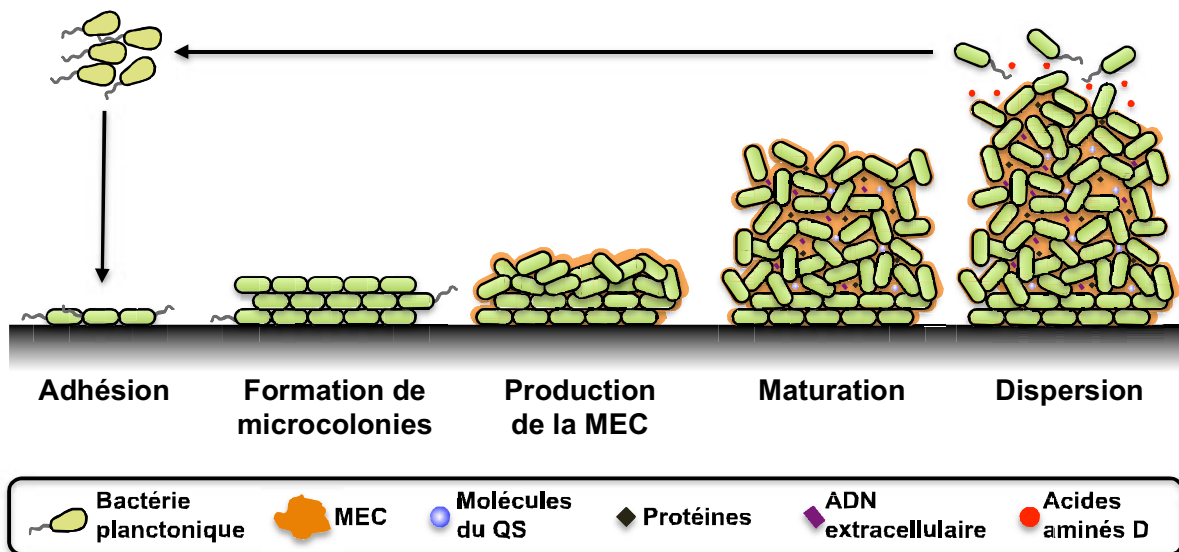


Figure I.3. Modèle du cycle de vie des biofilms. Les bactéries planctoniques s'attachent à la surface, change de phénotype, forment une microcolonie. La production d'une MEC confèrera au biofilm une résistance lui permettant de passer à l'état mature durant lequel différentes molécules du quorum sensing (QS), de protéines et d'ADN seront libérées au sein de cette matrice. La dernière étape est marquée par la sécrétion d'acides aminés de type D qui vont dissoudre localement la MEC et permettront la libération de bactéries capables de s'adhérer à de nouvelles surfaces. La figure est une adaptation du modèle proposé par Valmakis et al.²³

1.4.1. Adhésion à une surface :

La première étape, décrite comme séminale pour la formation d'un biofilm, permet le passage d'un l'état unicellulaire planctonique à un état multicellulaire sédentaire. Peu d'études ont porté sur l'investigation des facteurs déclenchant cette transformation. Les stress thermiques et environnementaux, ainsi que la densité cellulaire des colonies ou le manque de nutriments, ont été rapportés comme pouvant déclencher la transition de l'état planctonique à l'état de biofilm, autorisant ainsi la survie des bactéries en leur permettant d'économiser leur énergie. Cette étape est accompagnée de plusieurs changements phénotypiques chez la bactérie, la vie sédentaire réclamant en effet l'émergence de nouvelles fonctions, notamment pour permettre la communication et les signalisations inter- et intra-cellulaires. Les flagelles et pilis de type IV, d'une part, et les exopolysaccharides (EPS) et les lipopolysaccharides (LPS), d'autre part, ont ainsi été décrits comme essentiels à l'adhésion des bactéries aux surfaces²⁴ et aux cellules hôtes^{25,26} respectivement. Il a été proposé que LPS et EPS servent la sensation de contact chez les bactéries²⁷, permettant à celles ci d'adapter leurs profils transcriptomiques et protéomiques à leur nouvelles conditions de vie et de préparer les étapes suivantes de la transition vers l'état de biofilm.

1.4.2. Formation d'une microcolonie :

Cette étape permet le passage d'un état sédentaire réversible à un état adhérent irréversible, et est donc caractérisée par la perte de mobilité cellulaire. Chez les bactérie Gram-négatives, ce changement phénotypique fait suite à la différenciation des flagelles²⁸ et des pilis de type IV chez les bactéries Gram négatif²⁹. La formation d'une microcolonie autorise ainsi la mise en place d'une architecture tridimensionnelle. Pour assurer la survie de cette nouvelle structure, les bactéries doivent maintenir une communication entre elles et avec leur milieu environnement. Peu de choses sont connues sur la communication et la signalisation cellulaire au sein des microcolonies, la majorité des études sur les biofilms s'étant focalisées sur leur stade mature.

La transition à l'état de micro-colonie est cependant cruciale, en ce qu'elle correspond à l'étape de sédentarisation. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des porines de *Pseudomonas aeruginosa* dans la formation de microcolonie ou biofilm. Finelli et ses collègues ont montré que la porine OpdF est impliquée dans le transport de molécules de signalisation, l'adaptation au changement d'osmolarité au sein de la microcolonie et qu'elle peut même servir comme adhésine³⁰, alors que Yoon et ses collègues ont montré la nécessité de OprF dans le développement du biofilm en condition anaérobie³¹. L'expression d'EPS a été également décrite comme indispensable à l'étape de sécrétion de MEC²⁵.

1.4.3. Production d'une MEC :

Cette étape est probablement la plus caractéristique de la formation de biofilm, et la détermination de la composition de cette MEC est donc le centre d'intérêt de plusieurs groupes de recherche. La production de MEC s'étend et est temporellement corrélée avec les étapes de maturation et de dispersion. Bien que la présence d'EPS³², de protéines³³ et d'acides nucléiques³⁴ ait été établie, la formule de la MEC est loin d'être connue dans ses détails. La production de la MEC résulte de l'activité simultanée de plusieurs enzymes codées par différents opérons tels que *bcs*, *cdg*, *pelA-G* et *pslA-O*. Ensemble, ceux-ci vont permettre la production (ou la dégradation) de la variété de molécules composant la MEC, tels la cellulose³⁵, la guanosine monophosphate (GMP)³⁶, ou des polymères riches en glucose³⁷ ou en mannose³⁸. La MEC confère aux bactéries au sein de la microcolonie une résistance accrue aux facteurs environnementaux comme les antibiotiques³⁹ et le système immunitaire humain⁴⁰. Elle permet également la construction d'une communauté dans laquelle une différenciation cellulaire majeure prendra place²². Différentes adhésines et lectines pourront jouer un rôle dans la stabilisation de la MEC en interférant avec les EPS.

1.4.4. Maturation :

Cette étape est l'aboutissement de tous les processus de différenciation introduits précédemment ; après l'adhésion des cellules à une surface, leur

différentiation sous l'effet de messagers intercellulaires, et la sécrétion d'une matrice dans lesquels les cellules vont se structurer, le biofilm est né et va dès lors mûrir. Cette maturation inclut une croissance du biofilm, essentiellement due au recrutement des bactéries planctoniques, et une nouvelle étape de différenciation cellulaire qui permettra l'apparition d'une variété de phénotypes cellulaires caractérisés par des profils d'expressions génétique et protéique spécifiques. Dans ce contexte, Sauer, Whiteley et coll. ont rapporté une augmentation de l'expression des porines de *P. aeruginosa* durant la formation de biofilms^{41,42}. Cattelan et coll. ont rapporté récemment que la porine OmpQ de *Bordetella bronchiseptica* est requise pour la formation d'un biofilm mature⁴³.

La structuration tridimensionnelle des cellules du biofilm mature, et leur enclassement au sein de la MEC, résultent en une absence de contact direct avec le milieu environnant et donc en un accès aux nutriments réduit. Pour survivre, les cellules du biofilm devront miser sur la communication et la signalisation cellulaires, voire le partage des ressources ; on parle de « quorum sensing » (QS)⁴⁴. Le QS est activé par l'augmentation de la densité bactérienne et peut être décomposé en quatre étapes⁴⁵: (i) la production des molécules chimiques inductrices par des enzymes spécifiques, (ii) la sécrétion de ces molécules, (iii) leur liaison à des récepteurs spécifiques ; et (iv) l'induction de l'expression d'une série de gènes en suite de l'activation desdits récepteurs. La nature de ces molécules et leur concentration dans la MEC varient selon les espèces et les souches (Table I.1). La maturation du biofilm et sa survie sont régulées par le QS^{46,47}.

1.4.5. Dispersion :

Bien qu'il soit très résistant, un biofilm mature souffre d'un manque de ressources. Cela favorisera la dispersion des bactéries. Cette étape survient par la production d'un mélange d'acides aminés série D et de fibres amyloïdes TasA qui vont localement interagir avec les EPS et entraîner leur effondrement⁴⁸. Les bactéries s'échappant du biofilm mature ont la capacité de coloniser de nouvelles surfaces et de former à leur tour des biofilms matures.

Bactéries		Gram négatif		Gram positif	
Système QS	Lux		Quinolone	Agr	
Bactéries modèles	<i>P. aeruginosa</i> <i>B. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i> <i>V. cholera</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	
Enzyme de synthèse	LuxI	LuxS	MvfR	AgrD	
Molécule inductrice	AHLs	Diester de furanosyl borate	HAQs	AIPs	
Régulateurs de réponse	LuxR	Lux P, LuxQ, Lux U et LuxO	PQS	AgrA, AgrC, AgrB	
Molécules produites	OdDHL (Voie las)	ARNs non codants	BHL (Voie rhl)	α-hemolysin	Protein A
	↑ Virulence ↑ Production de toxine + Formation de biofilm			↑ Virulence ↑ Production de toxine + Formation de niche	
Effets	↑ Virulence ↑ Production de toxine + Formation de biofilm	↑ Virulence ↑ Mobilité ↑ Division cellulaire	↓ Réponse immunitaire ± Mort cellulaire		

Table I.1. Les différents types de QS les plus étudiés. Les données présentées dans cette table sont prises de deux revues décrivant le QS (Sifri 2008, Banerje 2016) AHL : N-acylhomoserine lactone, OdDHL : N-3-oxododecanoyl homoserine lactone, BHL : N-butanoyl homoserine lactone, HAQ : 4-hydroxy-2-alkylquinoline, PQS : *Pseudomonas* quinolone signal, Agr : Accessory gene regulator AIP : autoinducing peptide, (↑) : Augmentation, (↓) : Diminution, (⊕) : Favorisation, (±) : Régulation.

1.5. Mécanismes de résistances

Comme mentionné précédemment, les bactéries au sein d'un biofilm sont connues pour être très résistantes aux antibiotiques⁴⁹, mais aussi à d'autres facteurs environnementaux comme la température⁹ et le système immunitaire humain⁴⁰. Plusieurs recherches visent à découvrir l'origine de cette résistance pouvant diminuer la susceptibilité des bactéries jusqu'à 1000 fois⁵⁰.

Le QS est décrit comme le principal acteur favorisant la résistance des bactéries au sein des biofilms. Il est impliqué dans la virulence⁵¹, la compétence, la conjugaison, la motilité, la sporulation⁵² et la coordination de la formation de divers biofilms⁵³. Leur augmentation ou diminution de la concentration de la MEC en molécules signales « auto-inductrices » serviront à la régulation de l'expression de gènes en réponse aux fluctuations des multiples signaux environnementaux notamment la densité bactérienne et la concentration en éléments nutritifs. Ce phénomène souligne l'importance de la communication entre les bactéries coexistant à l'intérieur du biofilm pour la survie et la résistance au milieu extérieur de celui-ci.

La communication et la signalisation cellulaire ne se font pas uniquement par QS. Contrairement à ce dernier qui nécessite une densité bactérienne suffisamment élevée, plusieurs études ont montré la présence d'une signalisation cellulaire précoce jouant un rôle déterminant dans la différenciation, la maturation et la résistance cellulaire⁵⁴⁻⁵⁶. Whitchurch et al.³⁴ ainsi que Lasa et al.⁵⁷ ont respectivement montré que l'ADN extracellulaire et les protéines BAP sont impliqués dans la formation du biofilm et sa résistance.

La structure et la composition de la MEC sont également un élément majeur dans la régulation de la résistance des biofilms³². Cette matrice ne joue pas un rôle direct dans le contrôle de la densité bactérienne ni dans la signalisation, mais un rôle protecteur mécanique pour l'ensemble du biofilm. Elle agit comme une barrière empêchant la diffusion des facteurs indésirables comme les agents antimicrobiens, les facteurs immunogènes ou le surplus d'ions. La MEC peut également agir comme chélateur de certains agents antimicrobiens grâce à leurs charges électrostatiques à la surface.

Finalement, ce n'est ni l'un ni l'autre de ces facteurs qui sera seul responsable de la résistance des biofilms, mais plutôt leur action synergétique. Les mécanismes de résistances sont aussi variés que les biofilms donc que les bactéries ce qui complique les études et les recherches dans ce domaine.

1.6. Traitement des biofilms

Les infections causées par les biofilms ne peuvent pas être prises en charge par le système immunitaire de l'hôte. Il est connu depuis plus d'une vingtaine d'années que même un système immunitaire cellulaire et humoral en parfait état est déficient face à la résistance des biofilms⁵⁸. L'antibiothérapie a ainsi échoué à éradiquer ce type d'infections. Généralement, elle permet d'agir sur les symptômes causés par les bactéries planctoniques dispersées à partir du biofilm mature, mais échoue dans l'éradication du biofilm en soi²⁷. Du fait de cette inefficacité, les recherches actuelles sont plus ciblées vers des alternatives aux traitements antimicrobiens classiques.

Malgré l'absence de traitement, plusieurs stratégies anti-biofilms sont en cours de développement. La liste des molécules, peptides et protéines décrits dans la littérature comme ayant un effet antimicrobien pourrait s'étendre sur des dizaines de pages et nous ne le ferons pas ici. La majorité de ces stratégies reposent sur des inhibiteurs du QS²² ou sur des molécules ciblant la MEC et notamment les EPS⁵⁹. D'autres études ont opté pour des stratégies moins conventionnelles. Cela est le cas de Mishra et ses collègues⁶⁰ ainsi que Ostrowska et ses collègues⁶¹ qui ont utilisé

des peptides comme agents antimicrobiens. Chapman et ses collègues⁶² ont diminué l'efficacité d'adhésion des bactéries en utilisant des souches probiotiques.

Néanmoins, ces stratégies sont encore au stade d'études fondamentales et pas de développement. Elles restent, malheureusement, défectueuses sur plusieurs lignées bactériennes différentes de celle des résultats publiés, mais surtout déficientes en terme d'efficacité clinique. Un exemple criant est celui de la mucoviscidose, dont les complications fatales résultantes de la formation de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans le mucus pulmonaire. Malgré la prolifération des études sur ce système, nous ne réussissons toujours pas à influencer sur la formation de biofilm au cours de cette maladie.

Globalement, notre compréhension de la biologie du biofilm a bien évolué et s'est bien enrichie depuis les années 1970s. Elle nous a permis de décrypter le fonctionnement général des biofilms, mais elle a surtout mis en lumière la complexité et la diversité de cette structure. C'est donc avec certitude que nous pouvons affirmer qu'un contrôle efficace des biofilms nécessitera beaucoup plus d'études globales, mais aussi détaillées décrivant et visant le phénotype du biofilm, la signalisation au sein de la communauté bactérienne et l'irréversibilité de l'adhésion.

2. *Providencia stuartii*

Providencia stuartii, décrite pour la première fois par Buttiaux en 1954⁶³, est une bactérie Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae dotée d'un fort pouvoir à former des biofilms. Responsable de 9% des infections nosocomiales urinaires (INU)⁶⁴, *P. stuartii* est la plus répandue et la plus importante du genre *Providencia*⁶⁵.

2.1. Les bactéries Gram-négatif

Escherichia coli, *Salmonella enterica*, *Vibrio choléra*, *Pseudomonas aeruginosa*... sont les bactéries Gram négatif les plus connues. Cependant, cette classe regroupe un vaste nombre de bactéries appartenant à plusieurs familles et genres très variés tant en ce qui concerne leur génotype, phénotype, milieu de vie et conditions optimales de survie. Le point commun caractéristique de toutes les bactéries gram négatif est la présence d'une double membrane lipidique, interne et externe, délimitant un espace de transit entre le milieu extérieur et la membrane périplasmique, et qu'on appelle le périplasme. Hors mécanismes d'efflux, le périplasme baigne dans une solution de composition chimique similaire au milieu extérieur, et donc oxydant, en comparaison au milieu cytosolique. À contrario, les bactéries Gram positif ne possèdent qu'une seule membrane lipidique et s'aménagent une zone de transit avec le milieu extérieur par la formation d'une matrice de peptidoglycanes (PG).

Le périplasme étant l'espace intermembranaire, il est le lieu de nombreux phénomènes biochimiques. Il représente 20 à 40% du volume cellulaire. Il contient une couche de PG et plusieurs protéines périplasmiques impliquées dans la synthèse des constituants de l'enveloppe (PG, LPS...), la mise en place du flagelle, la détoxification, mais surtout dans la signalisation. Malgré son importance majeure dans le cycle de vie bactérien et le nombre élevé d'études sur ce compartiment, bien peu de choses sont connues sur les protéines périplasmiques, leur distribution et leur régulation, et ce du fait de la nature oxydante de ce compartiment en comparaison au cytosol.

Contrairement à la membrane interne formée de phosphatidyléthanolamine, de phosphatidylglycérol et de cardiolipine distribués de façon symétrique entre le feuillet interne et externe, la membrane externe (OM : Outer Membrane) est asymétrique avec un feuillet interne semblable aux feuillet de la membrane interne⁶⁶ et un feuillet externe principalement formé par des lipopolysaccharides⁶⁷ (LPS) (Figure I.4). Ces LPS constituent une barrière sélective et imperméable formant ainsi la première ligne de défense et de virulence de la bactérie. La OM est parsemée de protéines canal dont la portion transmembranaire est exclusivement formée par des feuillet β . Ces protéines (OMP : Outer membrane proteins) seront plus ou moins spécifiques autorisant le transport plus ou moins facilité de différentes classes de molécules.

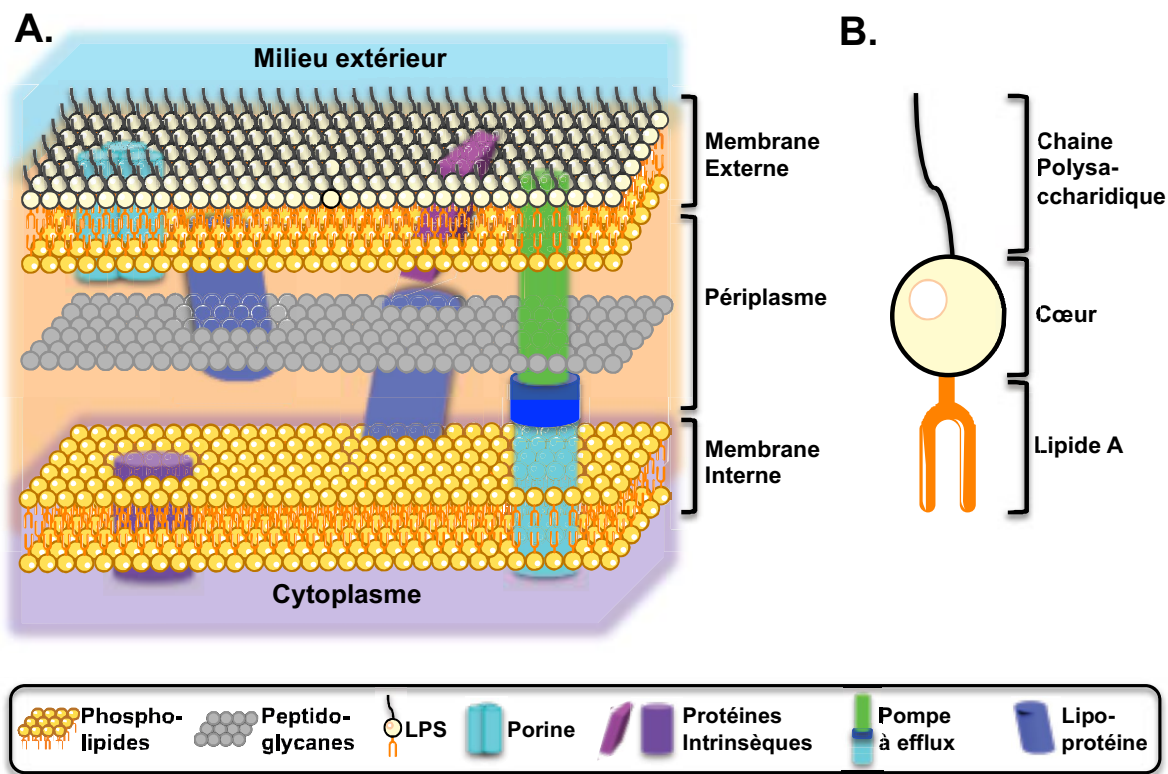


Figure I.4. Représentation schématique de la double membrane d'une bactérie Gram-négatif. (A) La double membrane formée essentiellement de phospholipides et de protéines membranaires permettant la communication de la bactérie avec son environnement. (B) Une molécule de lipopolysaccharide qui constitue la couche supérieure de la membrane externe des bactéries Gram-négatif, caractérisée par la présence d'une chaîne polysaccharidique de longueur variable.

Les LPS jouent un rôle central dans la pathogénicité et la perméabilité. Ce sont des molécules tripartites (Figure I.4.B) formées par : (1) un lipide A ancrant les LPS à la membrane, (2) un cœur contribuant à l'intégrité de la membrane et (3) la chaîne polysaccharidique, aussi nommée l'antigène O, conférant la spécificité antigénique de la bactérie. La présence ou l'absence de l'antigène O détermine le type de LPS. Alors qu'un LPS type S « smooth » (lisse) n'en contient pas, un LPS type R « rough » (rugueux) contient un antigène O dont la composition et la longueur varient selon l'espèce, le milieu extérieur de la bactérie et son cycle de vie. Durant l'infection bactérienne et l'installation du biofilm, le LPS change de structure et passe du type R au type S⁶⁸. Ce changement est particulièrement important pour diminuer le potentiel immunostimulateur des LPS et assurer une protection supplémentaire aux bactéries au cours de l'infection chronique²⁶. Par ailleurs, ces chaînes chargées négativement induiraient une répulsion électrostatique entre cellules, incompatible avec la formation d'une colonie.

Les OMPs constituent l'essentielle porte d'influx des molécules du milieu extérieur au sein de la bactérie. Ce passage peut être passif ou actif, spécifique ou non spécifique selon la protéine. Les OMPs principales des bactéries Gram-négatif sont les porines (détaillées dans le chapitre I.3) constituant jusqu'à 70% des OMPs totales. Plusieurs autres protéines sont également exprimées de façon temporaire selon les signaux d'induction cellulaire⁶⁶. Ces protéines ont été pour longtemps associées à une palette de fonctions assez réduite, n'incluant que le maintien de l'intégrité de la membrane externe et l'influx plus ou moins passif de petites molécules et nutriments. Récemment, de nouvelles fonctions ont été proposées pour les OMPs. Celles-ci s'étendent sur un spectre relativement large allant de la régulation cellulaire à l'adhésion aux cellules hôtes en passant par la réception de signaux extracellulaires et la résistance aux antibiotiques (Chapitre I.3.2).

C'est pour ces caractéristiques structurales, dynamiques et fonctionnelles que la membrane externe des bactéries Gram négatif joue un rôle indispensable et critique pour leur survie, le développement des biofilms, l'installation des infections, mais surtout dans la persistance de ces infections. C'est la porte d'échange entre la bactérie et son milieu extérieur et le siège de nombreuses adaptations phénotypiques en réponse à l'environnement.

2.2. Le genre *Providencia*

Les *Providencia*⁶⁵ sont des bactéries Gram négatif BLSE (betalactamases à spectre étendu, ESBL en anglais), productrices d'uréase et responsable des infections nosocomiales urinaires (INU) associées aux cathéters. Les infections par *Providencia* constituent un problème de santé publique émergent du fait de leur résistance élevée aux antibiotiques⁶⁹. Bien que le genre *Providencia* ne soit pas impliqué dans de nombreuses infections chez les personnes en bonne santé, elles présentent une mortalité élevée chez les personnes hospitalisées et sous cathétérisation longue, généralement des personnes âgées ou des victimes d'accidents vasculaires cérébrales^{70,71}.

Les différentes espèces *Providencia* ont été isolées chez plusieurs animaux notamment les mouches, les oiseaux, les chats, les chiens, les bovins, les moutons, les pingouins, les vipères... Elles se trouvent aussi dans le sol, l'eau et notamment dans les eaux usées. Chez les humains, les *Providencia* ont surtout été isolées de l'urine, mais aussi des selles, du sang, des crachats, de la peau et des plaies.

En 1904, Rettger isola la première espèce du genre *Providencia* dans les poules et l'associa au choléra aviaire sans lui donner un nom⁷². Hadley la nomma, en 1918, *Bactéria rettgerii*⁷³. Les différentes bactéries *Providencia* isolées et décrites ont subi plusieurs changements taxonomiques jusqu'à 1951. Durant cette année, Kauffman proposa le nom du genre *Providencia* en référence à l'Université Brown à Providence, Rhode Island⁷⁰. Aujourd'hui, *Providencia* compte 5 espèces : *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens*, *P. rustigianii* et *P. stuartii* qui demeure la plus répandue et la plus importante⁶⁵.

2.3. *Providencia stuartii*

P. stuartii est une bactérie opportuniste et un isolat clinique rare en dehors des INU. Elle a été décrite en détail pour la première fois par Buttiaux et al.⁶³ et nommée « *stuartii* » en référence au bactériologiste C.A. Stuart qui a fait une grande partie des premiers travaux sur le genre *Providencia*⁷⁰. Parmi les uropathogènes, *P. stuartii*

reste, avec *E. coli*, *P. mirabilis* et *P. aeruginosa*, l'une des bactéries les plus fréquentes^{64,74}. Bien que *P. stuartii* colonise surtout le tractus urinaire, des études l'ont décrite dans les reins⁷⁵, l'endocarde⁷⁶, le péricarde⁷⁷ et le péritoine⁷⁸. De plus, elle a été décrite comme cause de diarrhée néonatale chez les vaches laitières⁷⁹.

L'implantation d'un cathéter à long terme (>28 jours) dans le tractus urinaire chez les patients hospitalisés constitue la niche la plus favorable à l'installation de *P. stuartii* mais aussi au développement de son biofilm. Sa forte résistance aux antibiotiques⁸⁰ ainsi que sa capacité à former des biofilms rendent l'infection persistante même après le retrait du cathéter. Krake et ses collègues ont montré que la durée moyenne de la colonisation de *P. stuartii* dans le tractus urinaire est de 6,4 mois⁷⁶ à cause de la forte adhésion des bactéries au tissu uroépithélial en sus des cathéters⁸¹.

2.4. Épidémiologie

Très peu de statistiques et d'études sont menées sur *P. stuartii* ce qui a causé dernièrement, l'exaspération de plusieurs spécialistes dans le milieu hospitalier^{69,82}. La prévalence des infections par *P. stuartii* varie d'une étude à une autre, d'un hôpital à un autre et d'une année à une autre. Warren, en 1986, la décrit comme aussi fréquente qu'*E. coli* dans les INU⁷⁴. Selon une étude menée par Tumbarello, en 2004, 62% des INU causées par les bactéries BLSE sont des infections de *P. stuartii*⁸³. L'étude la plus récente publiée par De Vecchi, en 2013, classe *P. stuartii* troisième en terme de prévalence dans les INU après *E. coli* et *P. mirabilis*⁶⁴.

Ainsi, et malgré leur sous-représentation dans les statistiques, les infections de *P. stuartii* sont loin d'être des cas isolés parmi ceux qui franchissent les portes des hôpitaux. Ces infections sont fréquentes et leur prévalence est en augmentation. Ceci souligne la nécessité de nouvelles études ; quoique celles-ci restent aujourd'hui rarissimes.

2.5. Traitement

Le traitement des INU causées par *P. stuartii* est identique à celui de toutes autres infections bactériennes, à savoir le recours aux antibiotiques. Néanmoins *P. stuartii* est très résistante aux antibiotiques comparée à *E. coli*⁸⁴ et la plus résistante parmi les *Providencia*, ce qui explique l'inefficacité du traitement^{61,85}. Malheureusement, le manque de recherches cliniques et surtout fondamentales ne permet ni la découverte de nouvelles cibles cellulaires ni le développement de nouvelles thérapies.

3. Les porines

Découvertes depuis 1976⁸⁶, les porines sont aujourd'hui les protéines membranaires emblématiques des bactéries Gram-négatif mais aussi des mitochondries dans les cellules eucaryotes⁸⁷ (connues sous le nom de VDAC : voltage-dependent anion channels, ou TOM : translocator of the outer mitochondrial membrane). Elles sont hautement abondantes et sont impliquées dans un large spectre de rôles physiologiques les rendant essentielles au fonctionnement et à la survie cellulaire. Dans ce qui suit, nous nous focaliserons sur les porines bactériennes uniquement.

3.1. Présentation

Les porines sont des pores ancrés dans la membrane externe des bactéries Gram-négatif permettant le passage (souvent passif, mais aussi actif) des petits substrats et solutés (<600 Da) sans les lier.

La structure générale des porines a été étudiée depuis les années 1980s. Les études de spectroscopie⁸⁸, de microscopie électronique^{89,90} et de rayons X⁹¹ ont d'abord permis l'obtention d'une structure à basse résolution ($\approx 5\text{\AA}$) montrant que les porines sont exprimées sous forme de trimères de tonneau β transmembranaires.

La première structure à haute résolution (3Å) fut résolue en 1990⁹² et correspondait à la porine Gdp de *Rhodobacter capsulatus* (Figure I.5A). Cette structure confirma la structuration des porines en tonneau β , leur trimérisation et leur localisation transmembranaire. Mais surtout, elle montra que chaque monomère est formé de 16 feuillets β connectés par des tours courts au niveau périplasmique et de comparativement longues boucles sur leur versant extracellulaire. Parmi celles ci, la boucle L3 particulièrement longue, se distingue par son repliement caractéristique au sein du canal générant une zone de constriction à mi hauteur (Figure I.5A). Les structures de différentes porines ont été déterminées révélant une grande similitude dans l'architecture et de petites variations, surtout au niveau de la topologie des boucles et la charge de la protéine⁹³. Sur cette base structurale, les porines ont été classées en deux grands groupes : (1) Porines générales non-spécifiques à 16 feuillets β (ex : OmpF Figure I.5B) et (2) porines spécifiques à 18 feuillets β (ex : LamB Figure I.5C).

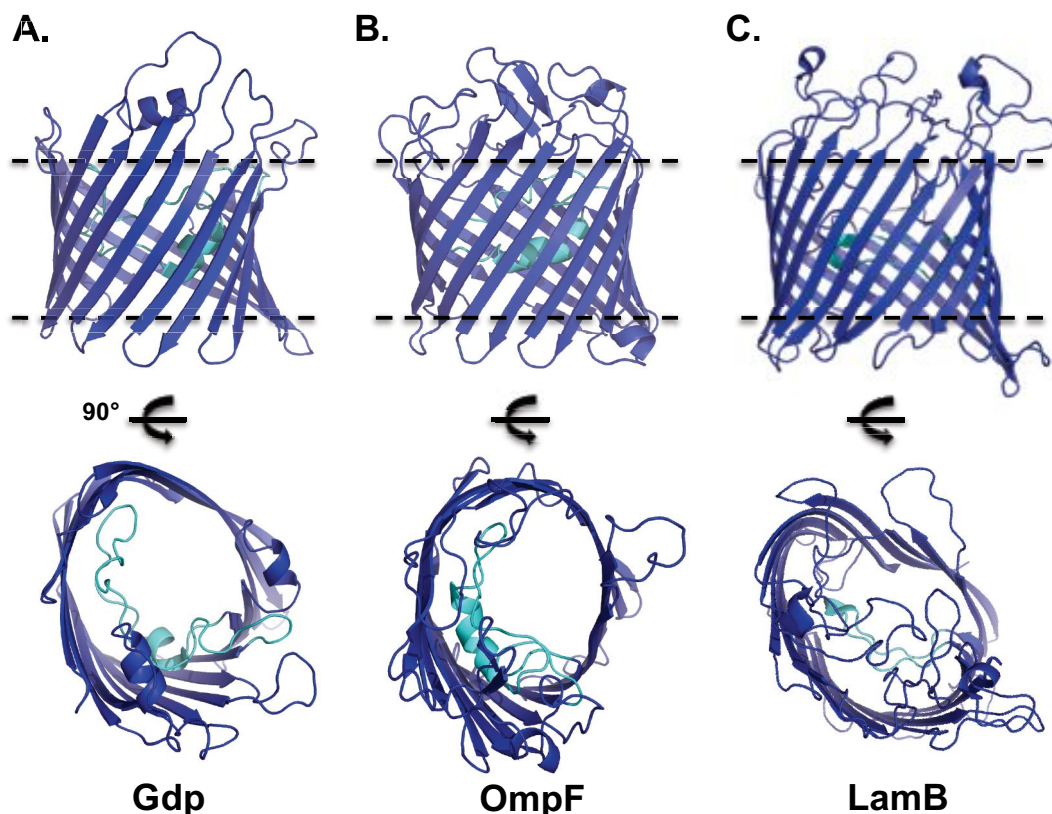


Figure I.5. Comparaison de la structure de différents types de porines. Vue de face et du côté extracellulaire du tonneau β (bleu) et de la boucle L3 (cyan) des porines (A) Gdp (3 Å, référence pdb: 2por) formée de 16 feuillets β ; (B) OmpF (2,4 Å, référence pdb: 2omf) formée également de 16 feuillets β et des boucles extracellulaires larges; (C) LamB (3,1Å, référence pdb: 1mal) formée de 18 feuillets β .

Récemment la recherche sur les porines a connu nouvel engouement, illustré par le nombre et la variété des recherches menées (Figure I.6) (5362 publications avant 2006 vs >7500 publications entre 2006 et 2016), lesquels pointent la complexité et la diversité de ces protéines. Des porines, comme OmpG, sont décrites comme formées de 14 feuillets β avec deux structures quaternaires différentes⁹⁴ (Figure I.7). D'autres porines comme Omp32⁹⁵ et OprP⁹⁶ formées de 16 feuillets β et classifiées comme porines non-spécifiques ont montré une spécificité pour des métabolites anioniques. Ceci rend une simple classification insuffisante et une classification globale difficile.

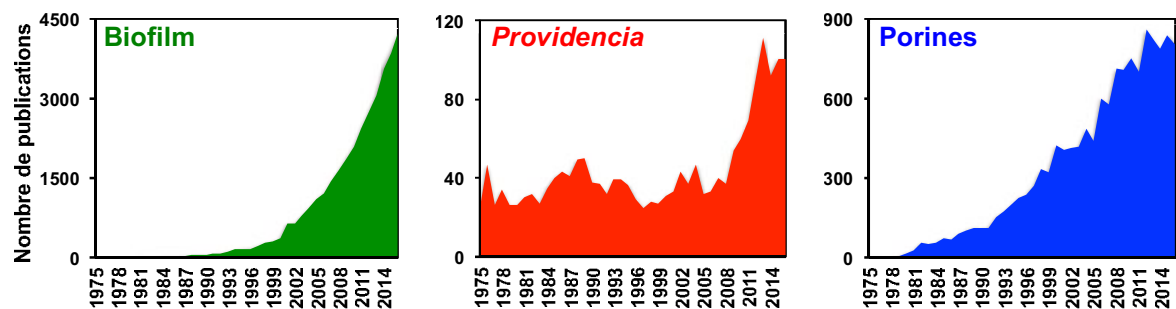


Figure I.6. Nombre de publications par année présentes sur la base de données « Pubmed » concernant les biofilms, les bactéries *Providencia* et les porines.

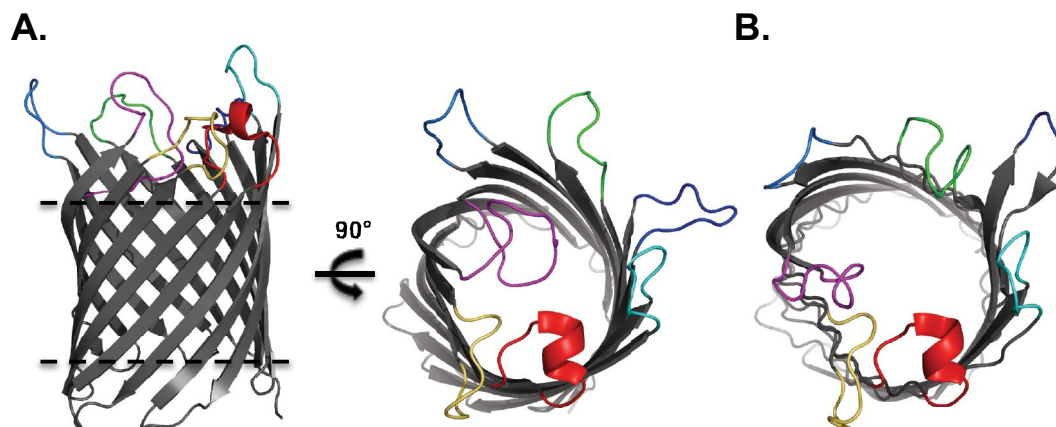


Figure I.7. Structures quaternaires de la porine OmpG. (A) Vues de face et du côté extracellulaire de la structure fermée d'OmpG (2,7 Å, référence pdb: 2iww) constituée de 14 feuillets β . Contrairement aux porines générales, la boucle L3 (cyan) n'est pas structurée et reste du côté extracellulaire (B) Vue du côté extracellulaire de la structure ouverte d'OmpG (2,3 Å, référence pdb: 2iww) montrant le mouvement des boucles extracellulaires L1 (vert), L2 (bleu foncé), L3 (cyan), L4 (rouge), L5 (jaune), L6 (magenta) et L7 (bleu marine) durant l'ouverture du canal.

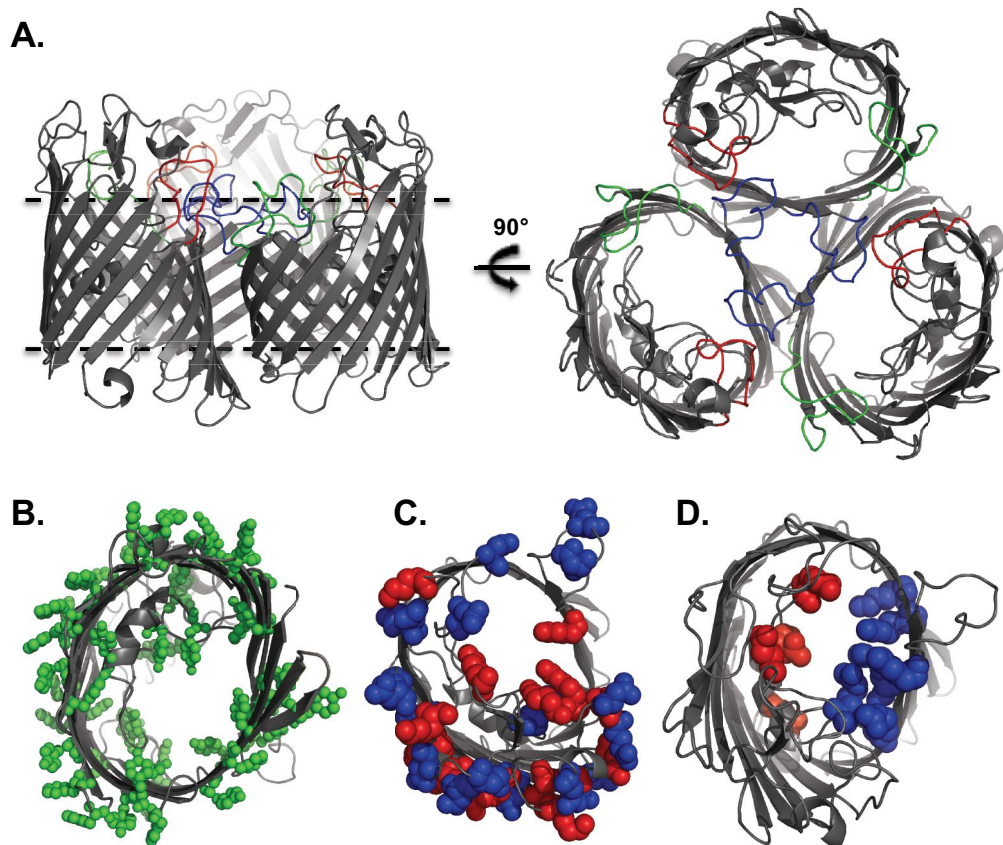


Figure I.8. Structure d'OmpF montrant les principales caractéristiques communes aux porines. (A) Vues de face et du côté extracellulaire du trimère d'OmpF montrant les boucles L1 (vert), L2 (bleu) et L4 (rouge) impliquées dans l'interaction monomère-monomère. (B) La ceinture de résidus aromatiques (sphères verts) autour du tonneau β du monomère d'OmpF vue du côté périplasmique. (C) L'abondance des résidus chargés au niveau des boucles extracellulaires permettant l'interaction des porines avec les LPS. (D) Vue extracellulaire du tonneau β montrant les charges négatives (sphères rouges) au niveau de la boucle L3 et les charges positives (sphères bleues) du côté opposé permettant la diffusion des molécules chargées à travers le canal.

Malgré leur diversité, la majorité des porines partagent plusieurs propriétés biochimiques, structurales et fonctionnelles communes^{93,97} dont leur l'abondance avec environ 100 000 copies par bactérie constituant ainsi 50% de la masse membranaire et 70% de son contenu protéique. Les porines partagent également leur stabilité thermique, leur repliement en feuillets β , la constriction de leur tonneau β par la boucle L3 repliée en hélice α dans le cœur du canal et l'implication des boucles L2 d'une part et L1 et L4 de l'autre dans l'interaction monomère-monomère centrale et périphérique respectivement (Figure I.8A). De plus, la présence d'une ceinture de résidus aromatiques impliquées dans la structuration secondaire (Figure I.8B), d'une ceinture de résidus chargés au niveau

extracellulaire impliquée dans l'interaction avec les LPS (Figure 1.8C) et d'une phénylalanine au niveau du C-terminal prérequis à l'importation de la protéine dans la membrane et son bon repliement caractérisent l'ensemble des porines. Du point de vue fonctionnel, les porines se distinguent par leurs boucles externes qui sont déterminantes de leur activité biologique. Ces boucles sont le siège de nombreuses mutations rapides en réponse aux facteurs environnementaux, notamment la présence d'antibiotiques⁹⁷. Ces derniers font partie des solutés de faible polarité face auxquels le champ électrique au sein du tonneau β des porines (Figure 1.8D) forme une barrière énergétique à leur diffusion. Il est finalement important de signaler que la charge globale des porines affecte leur sélectivité et leur tensio-dépendance.

3.2. Rôle physiologique

Le rôle principal des porines est essentiellement d'assurer l'échange de nutriments à travers la membrane externe des bactéries. Ce rôle est bien étudié et décrit dans la littérature notamment grâce à l'élucidation de la structure de nombreuses porines à résolution atomique. Cependant, le spectre de rôles physiologiques des porines est aussi large et varié que leur diversité. Ci-dessous, nous présentons une liste non exhaustive des principaux rôles des porines décrits dans la littérature. Il est intéressant de noter qu'une même porine peut accomplir un ou plusieurs rôles et que cette liste s'élargira certainement au cours des années.

3.2.1. Diffusion générale

La diffusion des solutés à travers les porines est limitée aux petites molécules <600 Daltons. Ceci inclut les ions, les acides aminés, les sucres simples et les antibiotiques, mais exclut les disaccharides et autres molécules qui, pour passer, utiliseront d'autres voies dédiées de la membrane externe^{97,98} comme ScrY (transporteur de sucrose), Tsx (transporteur de nucléosides), FadI (transporteur des longues chaînes d'acide gras) ou les récepteurs TonB-dépendants (transporteur de sidérophores et de vitamines B12).

Malgré la faible sélectivité de la majorité des porines, le courant ionique interne reste élevé à cause de la grande taille de son pore. Des études de modélisation suggèrent que le trajet des anions et celui des cations à travers le pore sont divergents. Les cations passeraient près du cluster de charges négatives de la boucle L3 tandis que les anions passeraient quant à eux du côté opposé du pore où se trouve un cluster de charges positives^{99,100} (zone anti-L3 du tonneau β) (Figure I.8D). Des études de conductance, parfois menées à l'échelle de la molécule unique, ont montré que les propriétés et la sélectivité des porines pourraient évoluer selon les conditions du milieu extérieur comme la force ionique, le pH, la température^{98,101} ... suggérant ainsi un rôle important des porines dans la réponse aux conditions environnementales.

3.2.2. Résistance aux antibiotiques

La majorité des études sur les porines porte sur le rôle joué par ces derniers dans la résistance des bactéries aux antibiotiques^{98,102-104}. La résistance aux antibiotiques est un emblème de la recherche médicale et une épée de Damoclès planant au-dessus de la santé humaine avec plus que 25 000 décès/an dans l'Union européenne selon le rapport de l'Organisation mondiale de la santé en 2015. Afin de survivre à un traitement aux antibiotiques, les bactéries exploitent trois grandes lignes d'action, ou des mécanismes de résistance: (1) la mutation de la cible de l'antibiotique, (2) la dégradation de l'antibiotique par une machinerie enzymatique, ou (3) la réduction de la perméabilité aux antibiotiques. Ce dernier mécanisme de résistance est essentiellement mis en place par les LPS, les pompes à efflux, ainsi que les porines.

Étant la porte d'entrée des antibiotiques dans la bactérie et ayant la capacité d'acquérir des mutations rapides au niveau de leurs boucles externes, les porines contrôlent l'influx des antibiotiques au sein de la bactérie. Ainsi, la diminution de la perméabilité de ces porines pourra causer une résistance élevée aux antibiotiques. Les études menées sur différents isolats cliniques de bactéries résistantes ont permis d'explorer les multiples réponses adaptatives des bactéries en réponse aux antibiothérapies. La majorité de ces isolats présente une diminution du taux

d'expression des porines ou des mutations au sein du tonneau β affectant la taille du pore et la sélectivité de la porine ce qui diminue l'influx d'antibiotiques. Ces études ont mis en avant les porines comme une cible phare pour le développement d'antibiotiques de nouvelles générations.

3.2.3. Activité immunologique

Le rôle des porines dans la pathogénicité et l'infection bactérienne a été élucidé durant la dernière décennie. J. Rebière-Huet et ses collègues ont montré le rôle de OprF (porine de *Pseudomonas fluorescens*) dans l'adhésion aux surfaces biologiques¹⁰⁵ facilitant ainsi l'invasion cellulaire⁹³. D'autres études ont montré que certaines porines comme celles de la bactérie *Neisseria* ont une activité pro-inflammatoire via leur reconnaissance par les récepteurs cellulaires TLRs (toll-like receptors) de l'hôte¹⁰⁶. La porine PorB de *Neisseria gonorrhoeae* est particulièrement intéressante puisqu'elle permet l'invasion par fusion de la bactérie avec la membrane de l'hôte^{106,107}. De plus, des porines comme celles de *Salmonella enterica* sont impliquées dans l'induction de l'expression des interleukines IL-1 et IL-6 par les macrophages et IL-4 par les lymphocytes⁹³ soulignant ainsi un rôle important des porines dans la signalisation au sein des cellules du système immunitaire. Des études basées sur ces découvertes ont visé à utiliser des porines purifiées dans l'immunisation des souris⁹³. Ces études élargissent le spectre d'utilité des porines dans la recherche fondamentales et appliquée.

3.2.4. Survie de la bactérie

Le taux d'expression des porines est largement dépendant de l'environnement bactérien. Les deux porines les mieux caractérisées sont OmpC et OmpF, les deux porines majeures d'*E. coli*. Leur expression est finement régulée par les fluctuations des conditions d'osmolarité, de pH et du stress oxydatif⁹⁷. Sachant que le milieu naturel de *E. coli* est le tractus intestinal, siège de nombreuses fluctuations d'agents nocifs à la bactérie comme les antibiotiques et l'acide biliaire, la régulation de l'expression des porines serait incontournable pour protéger la bactérie contre les conditions défavorables. Bien que OmpC et OmpF restent les plus étudiées, d'autres

exemples comme celui de PhoE (porine exprimée sous condition de carence en phosphate)¹⁰⁸ et MOMP (porine surexprimée à haute température)¹⁰⁹ montrent que la régulation de l'expression des porines est un moyen de résistance pour les bactéries non seulement contre les antibiotiques, mais aussi contre les conditions environnementales défavorables.

3.3. Les porines de *P. stuartii*

P. stuartii exprime au niveau de sa membrane externe deux porines : Omp-Pst1 et Omp-Pst2 décrites en 2010¹¹⁰. Basé sur l'observation qu'Omp-Pst1 est la porine la plus abondamment exprimée dans les conditions d'expression planctonique, il a été proposé qu'Omp-Pst1 soit la porine majoritaire de *P. stuartii*.

La structure de Omp-Pst1 et Omp-Pst2 a été résolue dans notre laboratoire (El-Khatib, Nasrallah *et al.*, manuscrit en préparation). Comme la plupart des porines, celles de *P. stuartii* sont exprimées sous la forme de tonneau β formés de 16 feuilletts β connectés par des boucles extracellulaires et des tours périplasmiques avec la boucle L3 structurée en hélice α dans le tonneau β (Figure I.9A-B). Trois monomères interagissent principalement par leur boucle L2, mais aussi L1 et L4 pour former un trimère stable (Figure I.9C-D). Ces deux porines partagent également avec les autres porines toutes leurs caractéristiques communes (détaillées ci-dessus Chapitre I.3.1).

Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont exprimées sous leur état ouvert et permettent la diffusion passive des solutés <600 Da à travers la membrane. Les molécules chargées positivement traversent le pore le long des résidus chargés négativement de la boucle L3 tandis que les molécules chargées négativement traversent le pore du côté opposé à la boucle L3 riche en résidus chargés positivement (Figure I.10A). L'ouverture de ces canaux est sensible au voltage externe. Cependant, la plupart des porines se ferment à un voltage élevé, de plusieurs centaines de mV, quand le potentiel extérieur de la membrane externe est donné à tout au plus quelques dizaines de mV⁹⁷. Omp-Pst2 est une porine unique en ce qu'elle montre un gating à

un voltage aussi bas que -20 mV (externe \rightarrow interne) soit un potentiel de l'ordre de celui de la membrane externe¹¹¹.

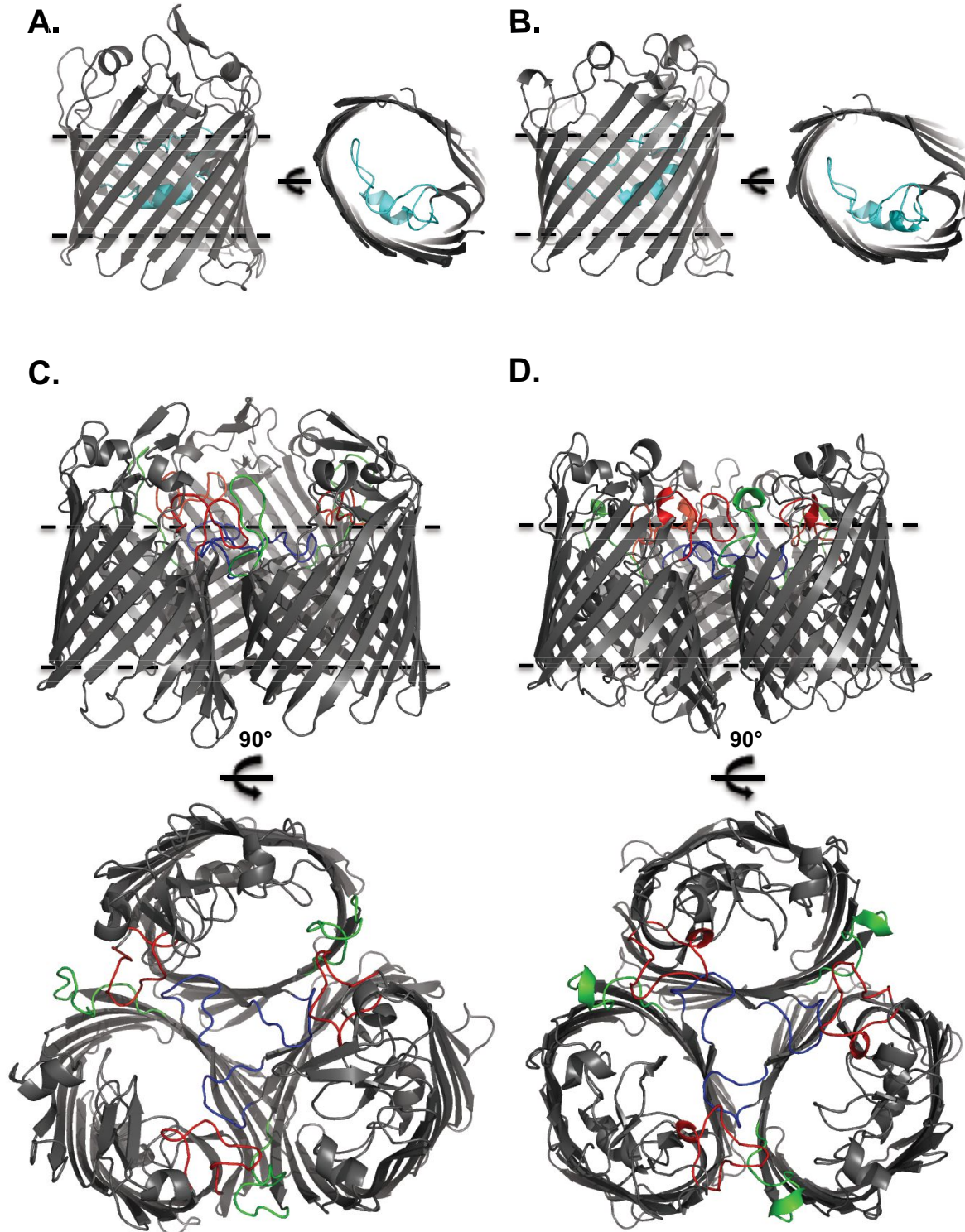


Figure I.9. Structures d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. Vues de face et du côté extracellulaire du monomère d'Omp-Pst1 (2,7 Å, référence pdb: 4d64) (A) et d'Omp-Pst2 (2,2 Å, référence pdb: 4d65) (B) formé de 16 feuillets β et caractérisé par la boucle L3 (cyan) structurée en hélice α dans le pore de la protéine. Vues de face et du côté extracellulaire du trimère d'Omp-Pst1 (C) et d'Omp-Pst2 (D) formé grâce aux boucles L1 (vert), L2 (bleu) et L4 (rouge).

En collaboration avec un laboratoire chinois, notre laboratoire a étudié ce mécanisme à l'échelle atomique¹¹¹. Leur étude de simulation sur la dynamique de ces porines a mis en évidence la rigidité du tonneau β et la flexibilité des boucles extracellulaires. Tandis que L1 interagit avec les résidus chargés positivement en face de la boucle, L3, L4, L5 et L6 changent de structure pour couvrir l'entrée du pore. En appliquant un potentiel transmembranaire, l'amplitude de ces fluctuations augmente, soulignant ainsi un fonctionnement voltage dépendant des deux porines. Contrairement à Omp-Pst1 qui est faiblement anion sélective et présente une sensibilité au voltage classique, Omp-Pst2 présente une forte sélectivité aux cations et une sensibilité élevée au voltage externe (Figure I.10.B-C). Celle ci se manifeste dans les simulations par un changement conformationnel de la boucle L3 introduisant une saillie du tryptophane 111 et exposant ainsi deux niches acides qui fixent des cations et stabilisent ainsi une conformation fermée du pore (Figure I.10C). Prenant en compte l'environnement de *P. stuartii* dans le tractus urinaire, un milieu riche en cations, cette sensibilité au voltage suggère un rôle pour Omp-Pst2 dans la régulation du flux actif des cations vers le périplasme, mais aussi dans l'efflux du trop plein cationique du périplasme vers le milieu extérieur.

Le transport des antibiotiques, notamment les β -lactames, à travers Omp-Pst1 et Omp-Pst2 a été également étudié. Tran et ses collègues¹¹⁰ ont examiné le profil d'expression des deux porines dans des lignées *P. stuartii* résistantes. Au fil des générations, la susceptibilité de ces bactéries aux antibiotiques diminuait. Cette diminution est corrélée avec une déficience d'expression d'une des deux porines. L'analyse par spectrométrie de masse révèle que la porine déficiente est Omp-Pst1. À l'inverse, la surexpression d'Omp-Pst1, mais pas Omp-Pst2, rendait les bactéries plus susceptibles aux antibiotiques. Ce résultat montre une corrélation entre Omp-Pst1 et la susceptibilité aux antibiotiques. Il suggère par ailleurs Omp-Pst2 comme une protéine peu permissive de la membrane externe. Des études récentes (résultats non publiés) ont montré une diversité de séquence d'Omp-Pst1 au niveau des boucles L5 et L7 parmi les isolats cliniques résistants de *P. stuartii* tandis que la séquence Omp-Pst2 reste identique suggérant un rôle adaptatif d'Omp-Pst1 par diminution d'expression ou par mutations face aux antibiotiques. Les travaux de Bajaj et ses collègues¹¹² sur le transport des antibiotiques à travers Omp-Pst1 confirment

le rôle de cette dernière dans la résistance de *P. stuartii* aux antibiotiques β -lactames.

Enfin, notre savoir aujourd'hui sur Omp-Pst1 et Omp-Pst2 reste modeste. La fonction des porines est primordiale et vitale pour la bactérie. Des études approfondies et diversifiées sont donc nécessaires pour mieux comprendre leur fonctionnement et leur régulation.

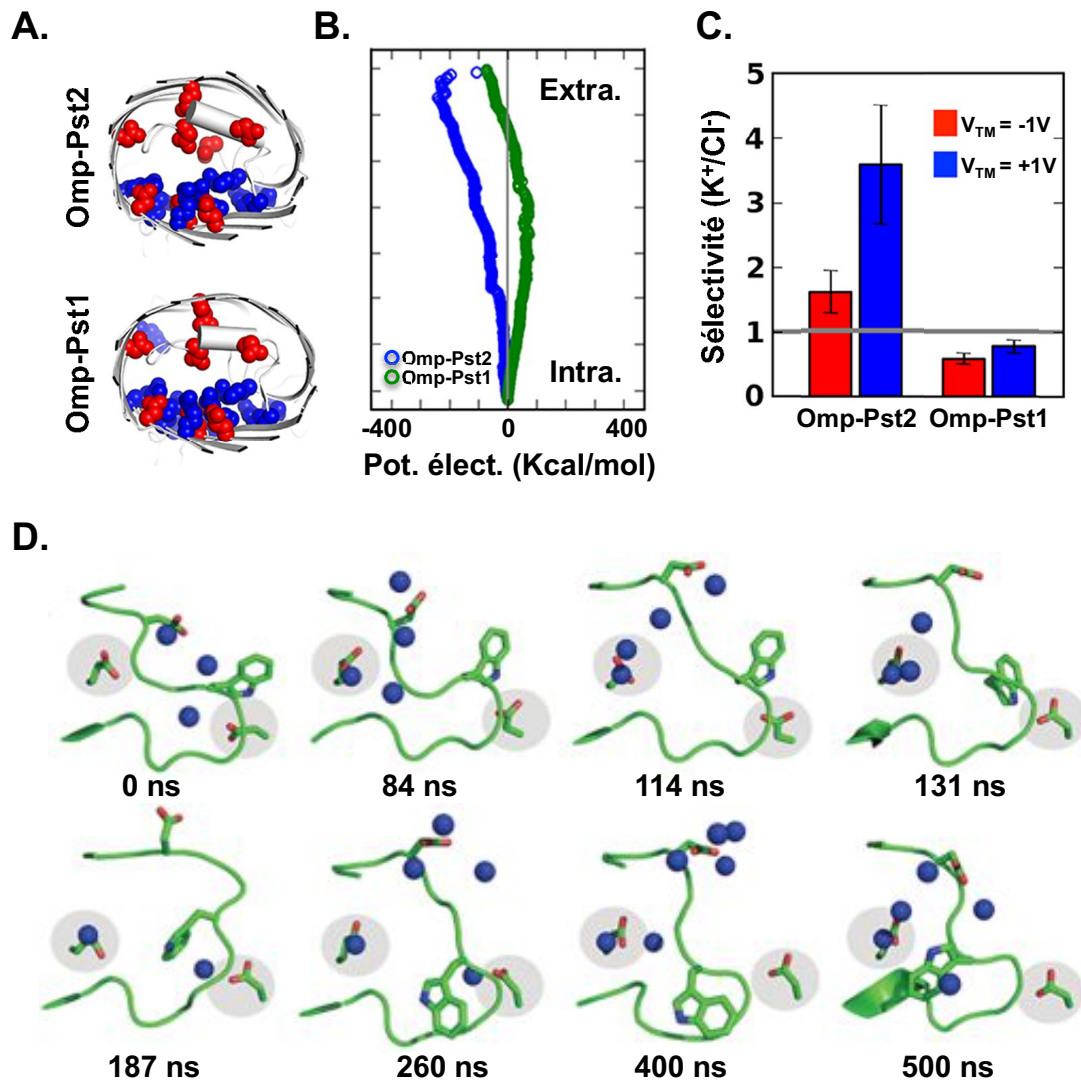


Figure I.10. Propriétés électrostatiques d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. (A) Distribution de charges négatives (sphères rouges) et positives (sphères bleues) de part et d'autre du pore d'Omp-Pst1 et d'Omp-Pst2. (B) Potentiel électrostatique mesuré le long du pore d'Omp-Pst1 (vert) et Omp-Pst2 (bleu). (C) La sélectivité ionique d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 estimée par simulation MD et exprimée en fonction du rapport entre le courant de K^+ à celui de Cl^- en présence d'un voltage transmembranaire (V_{TM}) positif et négatif. (D) Mouvement de la boucle L3 et du tryptophane en position 111 d'Omp-Pst2 en réponse à la présence des cations K^+ (sphères bleues) démasquant ainsi deux niches acides (gris). Cette figure est une reconstitution des résultats publiés des travaux de Song et ses collègues¹¹¹.

II. Problématique

1. Manque d'études sur *P. stuartii*

La gravité des infections causées par *P. stuartii* varie d'une hospitalisation prolongée au décès du patient. Ceci est principalement dû à la capacité de cette bactérie à former des biofilms très résistants aux traitements conventionnels par les antibiotiques. Malheureusement, la rareté des études sur *P. stuartii* ne permet pas de faire face à cette problématique, et ce, quoique l'augmentation de la prévalence des infections de *P. stuartii* soit alarmante^{69,82}.

Une rapide recherche quantitative sur le nombre des études sur *P. stuartii* est suffisante pour souligner le manque de savoir sur la bactérie (415 publications), les infections qu'elle est susceptible de causer (119 publications) dont les INU (21 publications) et encore moins sur les biofilms qu'elle forme (11 publications) qui restent la cause de la persistance de ces infections et de leur gravité (Figures II.1). Les 11 publications concernant les biofilms de *P. stuartii* peuvent être divisées en deux groupes :

A. Étude générale concernant les INU causées par les biofilms de différentes bactéries, dont *P. stuartii*:

1. King JB *et al.* en 1992¹¹³,
2. Stickler *et al.* en 2002⁸⁰,
3. Di martino *et al.* en 2003¹¹⁴,
4. Bret *et al.* en 2004¹¹⁵,
5. Jones *et al.* en 2006⁸⁵,
6. Macleod *et al.* en 2007¹¹⁶,
7. Broomfield *et al.* en 2009¹¹⁷,
8. Rather *et al.* en 2013¹¹⁸,

B. Étude sur les biofilms de *P. stuartii* :

1. Sturgill *et al.* en 2004¹¹⁹,
2. Kateete *et al.* en 2012¹²⁰ et
3. Ostrowska *et al.* en 2014⁶¹.

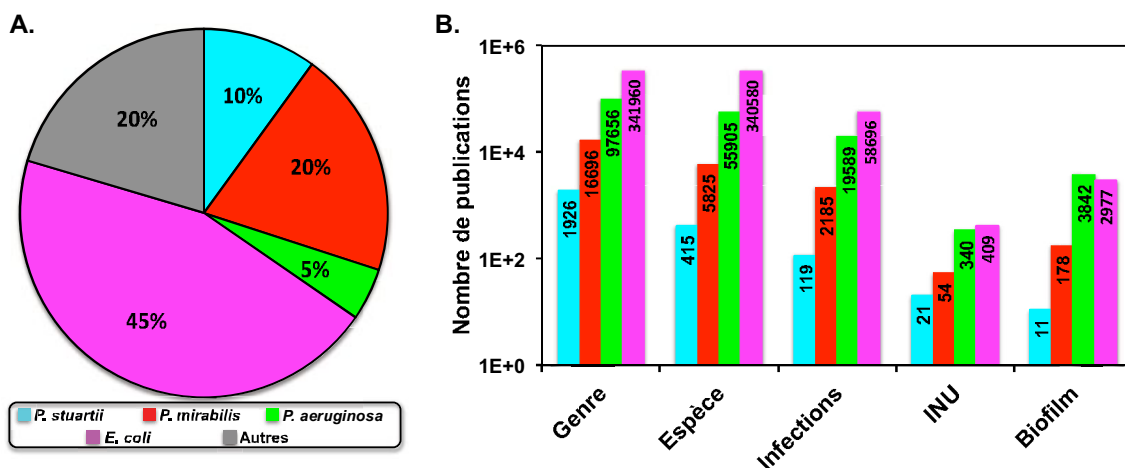


Figure II.1. Comparaison entre prévalence des INU des différentes bactéries et le nombre d'études correspondantes. (A) Diagramme circulaire représentant la prévalence des INU causées par différentes bactéries dont les principales sont *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. stuartii* et *P. aeruginosa* selon la dernière étude épidémiologique⁶⁴. (B) Nombre de publications concernant le genre *Providencia*, *Proteus*, *Pseudomonas* et *Escherichia* en général, l'espèce, les infections causées par cette espèce et le biofilm formé par cette espèce montrant le manque de recherche sur *P. stuartii* relativement aux autres bactéries.

La figure II.1 illustre le contraste saisissant entre l'attention portée par les chercheurs à certains pathogènes et l'implications de ces derniers dans des INU. De ce fait, des études sur la formation des biofilms de *P. stuartii*, leur changement phénotypique au cours de l'établissement de ces biofilms, leurs réponses aux facteurs environnementaux et leur profil d'expression génique et protéomique sont non seulement nécessaires, mais urgentes pour commencer à comprendre la résistance de *P. stuartii* au cours de l'infection et essayer par la suite de lui faire face et éventuellement, la combattre. Ceci fut le premier objectif de ma thèse.

2. Manque d'études sur les porines de *P. stuartii*

Les porines sont très importantes pour la bactérie qui les exprime. Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont les deux seules porines de *P. stuartii*. Trois études uniquement ont été portées sur le rôle d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. Elles ont montré un rôle de la première dans le transport et la résistance aux antibiotiques^{110,112} et un rôle potentiel de la deuxième dans la régulation de flux cationique¹¹¹. Malgré le fait qu'elles soient

les protéines membranaires les plus exprimées, l'implication d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 dans le cycle de vie de *P. stuartii* et surtout dans la formation de biofilms reste inconnue. L'investigation du rôle de ces porines fut le deuxième objectif de ma thèse.

L'étude sur Omp-Pst1 et Omp-Pst2 dans notre laboratoire a révélé, en plus des propriétés communes aux porines, d'autres propriétés uniques et intéressantes. La résolution des structures cristallographiques a dévoilé que chacune de ces deux porines présente une propension à s'auto-associer face-à-face en dimère de trimère « DOT » (Dimer of trimer), révélant la présence de motifs « steric zipper » dans leurs boucles extracellulaires (Figure II.2). Les résidus impliqués dans la formation de ce « steric zipper » sont 283-LGNYG-287 de la boucle extracellulaire L6 d'Omp-Pst2 et 205-AGVVT-210 de la boucle extracellulaire L6 d'Omp-Pst1 formant un motif structural en épingle à cheveux bêta (Figure II.2). De plus, Omp-Pst1 possède, au niveau de sa boucle extracellulaire L7, la séquence 291-LGNGY-295 similaire à celle d'Omp-Pst2, mais placée en aval de la séquence 205-AGVVT-210, elle ne participe pas dans la formation de DOT. Ces interfaces sont complétées par des ponts salins, dans Omp-Pst1, et par un large réseau de liaisons hydrogènes, dans Omp-Pst2.

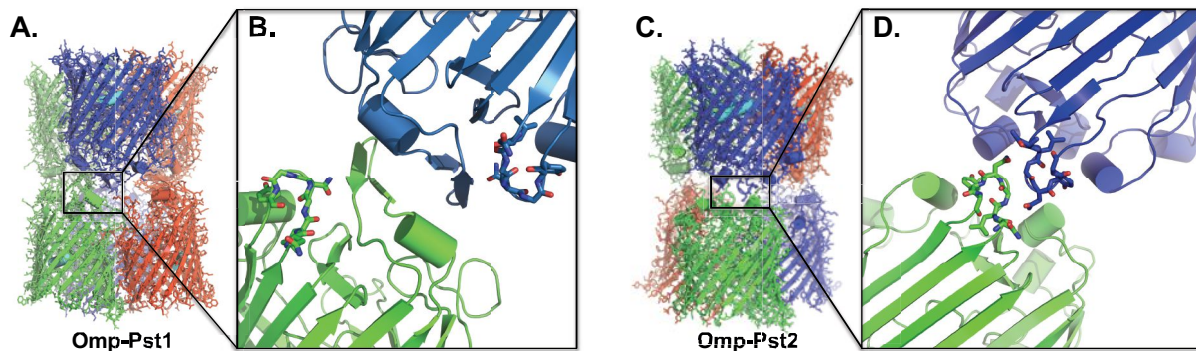


Figure II.2. Structures des DOTs d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. (A) Vue d'ensemble de la dimérisation face à face des trimères d'Omp-Pst1. (B) Vue du « steric-zipper » formé par la séquence 205-AGVVT-210 en épingle à cheveux bêta en face de la séquence 291-LGNGY-295 représentée sous forme de bâtons. (C) Vue d'ensemble de la dimérisation face à face des trimères d'Omp-Pst2. (D) Vue du « steric-zipper » formé par la séquence 283-LGNYG-287.

Cette architecture cristalline est particulièrement intéressante dans un contexte cellulaire. Son existence en interface cellulaire impliquerait la présence d'une communication directe entre les bactéries adjacentes suggérant ainsi un rôle des porines dans la communication bactérienne. De plus, dans le contexte d'un biofilm, cela aurait sans doute un effet promoteur. En effet, la communication intercellulaire est connue comme étant favorisée par le biais du QS dans les phases avancées de la formation du biofilm, mais l'établissement de cette communication dans les phases précoces d'un biofilm reste inconnu. Néanmoins, la présence de ce DOT cristallin au niveau de l'interface cellulaire bactérienne n'est pas mise en évidence et son rôle cellulaire n'est pas exploré. Ceci fut l'ultime objectif de ma thèse.

3. Plan de la thèse

Ma thèse a porté sur l'implication des porines dans la formation de biofilms chez *P. stuartii*.

Pour aboutir à cet objectif, nous avons commencé par une caractérisation des biofilms de *P. stuartii* dans des conditions expérimentales mimant les conditions de l'environnement niche de cette bactérie, à savoir le tractus urinaire. Nous avons également exploité l'effet de la délétion des porines du génome de *P. stuartii* sur la formation de biofilms et sa réponse aux facteurs environnementaux. Le résultat de ce travail fut l'objet d'un article publié¹²¹ et constituera le chapitre V.1 de ma thèse.

Nous nous sommes parallèlement intéressés à la formation des DOTs. D'une part, nous avons étudié leur formation *in vitro* par des études structurales et biophysiques. Nous avons également testé l'effet de plusieurs mutations sur cette dimérisation. D'autre part, et à l'inverse de la délétion des porines exploitée dans la première partie du chapitre V, nous avons étudié l'effet de la surexpression des porines sauvages et mutées de *P. stuartii* sur la croissance et le phénotype d'*E. coli* dépourvue de ses porines principales. Le résultat de ce travail fut l'objet d'un article en cours de revue et constituera le chapitre V.2 de ma thèse.

Les résultats de ce travail ont été malheureusement restreints par plusieurs limites notamment celles de la spécificité, la nature oxydative du périplasma et la limite de 250 nm de résolution de l'imagerie conventionnelle, ce qui est largement supérieur à la résolution optimale pour notre objectif. Pour dépasser ces limites, nous avons eu recours à l'imagerie de super-résolution (Chapitre III.4.3). En collaboration avec l'équipe PIXEL - IBS, nous avons ingénieré une nouvelle famille de protéines fluorescentes adaptées à la fois à la super résolution, à la nature oxydative du périplasma et au marquage spécifique des protéines dont la porine. Le résultat de ce développement fut l'objet d'un article publié¹²² et constituera le chapitre V.3 de ma thèse.

Pour résumer, le but de notre travail a toujours été de combler le manque de connaissance sur les porines et les biofilms de *P. stuartii*. Nous avons voulu comprendre l'effet des porines sur la bactérie en soi et sur la formation de biofilm et inversement, l'effet du biofilm sur l'expression des porines et sur la bactérie (Figure II.3). Nous avons réussi à dévoiler plusieurs facettes de ces problématiques et à développer de nouveaux outils pour leur étude. Mais ce qui ressort surtout de nos résultats est la nécessité d'approfondir et d'élargir ces recherches pour décrypter et éventuellement généraliser la relation « Porines <-> Biofilm ».

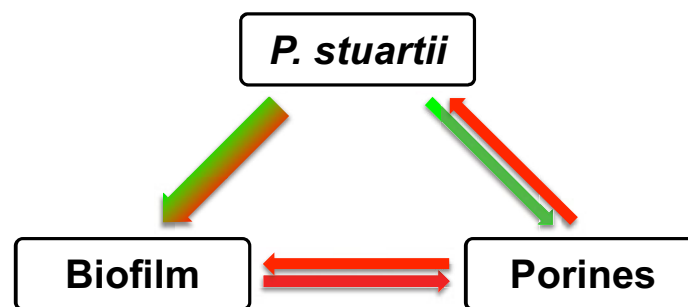


Figure II.3. La relation entre *P. stuartii*, ses porines et la formation du biofilm. Il est décrit dans la littérature la formation du biofilm par *P. stuartii* et l'expression de deux porines par cette dernière. Mais la description du biofilm, sa formation en différentes conditions environnementales et son effet sur l'expression des porines n'ont pas été étudiés. Il en est de même pour l'étude de l'effet des porines sur *P. stuartii* en soi et sur le biofilm. Le travail de ma thèse vise à combler ces déficits de connaissance.

III. Méthodologies

Mon projet de thèse est un projet multidisciplinaire. Durant mes trois années de thèse, nous avons eu recours à un nombre considérable de techniques de plusieurs domaines de la biologie couvrant différentes échelles d'études allant de l'atomique au cellulaire. Pour économiser le lecteur, ce chapitre sert à décrire les méthodologies utilisées sans inclure les détails. Nous les décrirons juste avec le niveau nécessaire à la compréhension et au suivi du déroulement de nos travaux durant la thèse.

1. Biologie moléculaire

Apparue au début du XX^{ème} siècle, la biologie moléculaire (BM) est aujourd'hui une discipline scientifique incontournable pour toute étude dans le domaine du vivant. Les techniques de la BM sont aussi nombreuses que ses applications. Parmi les nombreuses techniques de la BM que j'ai utilisées pendant ma thèse, je ne détaillerai dans la suite de cette partie que trois techniques : la PCR, le clonage moléculaire et la mutagenèse dirigée qui m'ont permis d'avancer mon projet.

1.1. La PCR

La réaction en chaîne par polymérase (PCR: Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification de l'ADN. L'utilisation de cette technique en BM est incontournable et ses applications sont variées et nombreuses, dont le clonage moléculaire et la mutagenèse dirigée détaillés ci-dessous. L'étape déterminante de la PCR est le design des amorces. Ces dernières sont des séquences d'oligonucléotides d'environ 15 paires de base (pb) complémentaires à l'un des deux brins d'ADN. Cette complémentarité de base va permettre à l'amorce de s'hybrider à l'ADN simple brin et de former un point de départ pour l'activité enzymatique de l'ADN polymérase. Le processus d'amplification se déroule par la succession de plusieurs cycles (30 – 50 cycles) de dénaturation de la double hélice d'ADN à 95°C, d'hybridation de l'amorce au brin d'ADN à une température adéquate (généralement 55°C – 65°C) et d'élongation à 72°C grâce à l'ADN polymérase synthétisant le nouveau brin d'ADN en recrutant des nucléotides (dNTP : désoxynucléotide

triphosphate) du milieu (Figure III.1). Le produit de la PCR peut ainsi être analysé sur gel d'agarose. Le fragment amplifié pourra être extrait à partir de ce gel et utilisé pour l'application souhaitée.

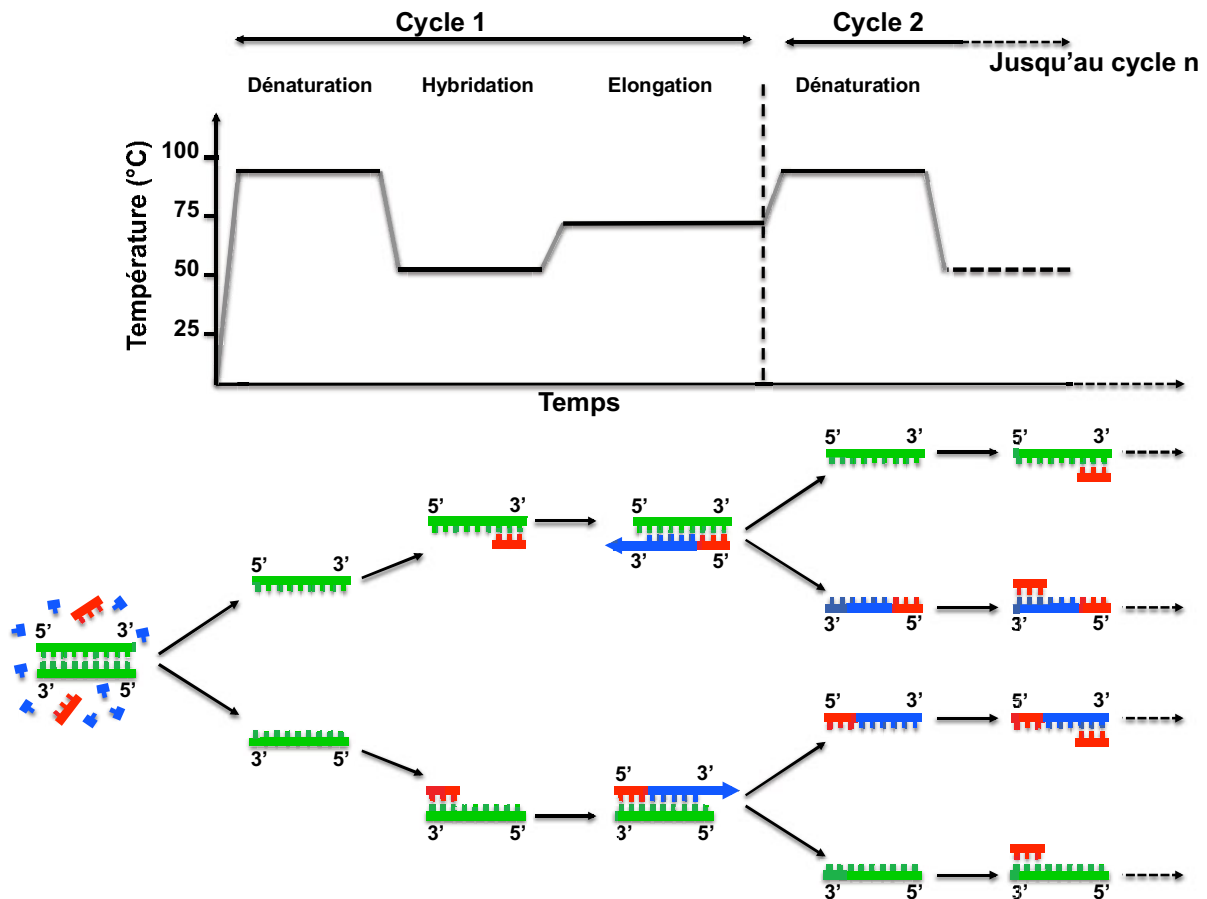


Figure III.1. Les différentes étapes d'une PCR. Les cycles de température permettant la succession de la dénaturation du double brin d'ADN (vert), l'hybridation des amorces (rouge) et l'élongation par recrutement des dNTPs (bleu) grâce à l'activité de la polymérase. Les doubles brins formés de novo sont à leur tour sujets d'un nouveau cycle permettant ainsi une amplification exponentielle.

1.2. Le clonage

Le clonage est un terme vaste en BM qui désigne la réplique à l'identique d'une molécule d'ADN. Il regroupe deux processus : le clonage génomique qui consiste en une reproduction artificielle à l'identique d'un être vivant avec la conservation exacte de son génome ou le clonage moléculaire qui consiste en une production et amplification d'un fragment d'ADN en l'insérant dans une molécule

d'ADN « porteuse » appelée vecteur permettant son amplification dans un organisme hôte. Pour notre projet nous avons utilisé le clonage moléculaire de fragments d'ADN correspondants à la séquence codante de nos protéines d'intérêt pour les sur-exprimer dans les bactéries.

Grâce à la découverte des enzymes de restriction (ER) permettant de couper spécifiquement l'ADN au niveau d'une séquence précise¹²³ que le premier clonage d'un gène a vu le jour en 1973¹²⁴. Aujourd'hui, le clonage moléculaire est la technique la plus utilisée de la BM. À travers les années, le clonage moléculaire est devenu un domaine à part entière avec un large nombre de méthodes de réalisation et une grande variété de vecteurs et d'organismes hôtes. La liste pourrait s'étendre sur plusieurs pages, aussi je me limiterai dans ce document à la méthode, le vecteur et l'organisme utilisés pour nos expériences.

Les vecteurs peuvent être des plasmides, des phagemides, des bactériophages, des phages lambda, des cosmides ou des BAC/YAC/HAC (Bacterial/Yeast/Human Artificial Chromosome : chromosome artificiel bactérien, de levure, humain) selon la taille de l'insert (Table III.1). Voulant insérer un fragment d'ADN codant pour une seule protéine dont le gène ne dépasse pas les 1kb, nous avons utilisé les plasmides comme vecteurs. Les plasmides sont des molécules d'ADN double-brin circulaires. Il en existe une très large variété ; tous ont en commun les propriétés suivantes :

- (a) Une origine de réplication (ori) pour une réplication autonome indépendante de la réplication de l'hôte,
- (b) Un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection de clones positifs,
- (c) Un site de clonage multiple (MCS: Multiple Cloning Site) formé d'une séquence de pb contenant les sites spécifiques de plusieurs ER. Ce MCS sert à l'insertion du gène d'intérêt,
- (d) Un promoteur d'expression permettant à l'expérimentateur de contrôler l'expression de son gène d'intérêt par l'ajout d'un inducteur d'expression. Il est important de noter que certains plasmides comme les pETs (que

nous avons utilisé pour exprimer toutes nos protéines) sont connus pour avoir un taux de fuite d'expression même en absence de l'inducteur,
 (e) Et le gène d'intérêt.

Type de vecteur	Taille d'ADN en kb
Plasmide	<20
Phage lambda	<25
Cosmide	<45
BAC	<300
YAC	<1000
HAC	>1000

Table III.1. Les différents vecteurs utilisés pour le clonage et la taille maximale de l'insert qui peut être cloné.

Le choix de l'organisme hôte dépend surtout de la protéine d'intérêt et de son repliement mais aussi du vecteur utilisé et de l'application désirée. Les organismes hôtes compatibles avec l'utilisation des plasmides sont généralement des bactéries (*E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens* ou *Bacillus subtilis*), mais aussi parfois des levures (*Saccharomyces cerevisiae*). Celles ci sont utilisées pour obtenir un meilleur rendement ou un meilleur repliement de la protéine d'intérêt. Les levures sont cependant bien plus difficiles à contrôler et à manipuler que les bactéries. Pour l'ensemble de nos expériences nous avons eu recours à trois souches d'*E. coli* : (1) DH5 α pour l'amplification des plasmides recombinants, (2) BL21 pour l'expression des protéines fluorescentes et (3) BL21 Δ Omp8 dépourvue de ses porines principales (OmpF, OmpC, OmpA et LamB)¹²⁵ en vue de l'expression de nos porines.

Pour cloner la séquence d'ADN d'intérêt au niveau du plasmide, plusieurs méthodes peuvent être utilisées dont la plus fréquente est l'utilisation d'ER. Les ER permettent la digestion du fragment d'ADN et du plasmide à des sites spécifiques. Ceci donnera deux fragments d'ADN linéaires à bouts complémentaires qui pourront être liés en utilisant une ligase, résultant ainsi en un plasmide recombinant circulaire (Figure III.2A). Les deux inconvénients majeurs de cette méthode sont : (1) la limitation d'insertion par la présence de sites de restriction uniques et convenables dans le plasmide et l'insert et (2) le rendement faible de la ligation nécessitant l'utilisation d'une concentration relativement élevée en plasmides ($\approx 2 \mu\text{g}$).

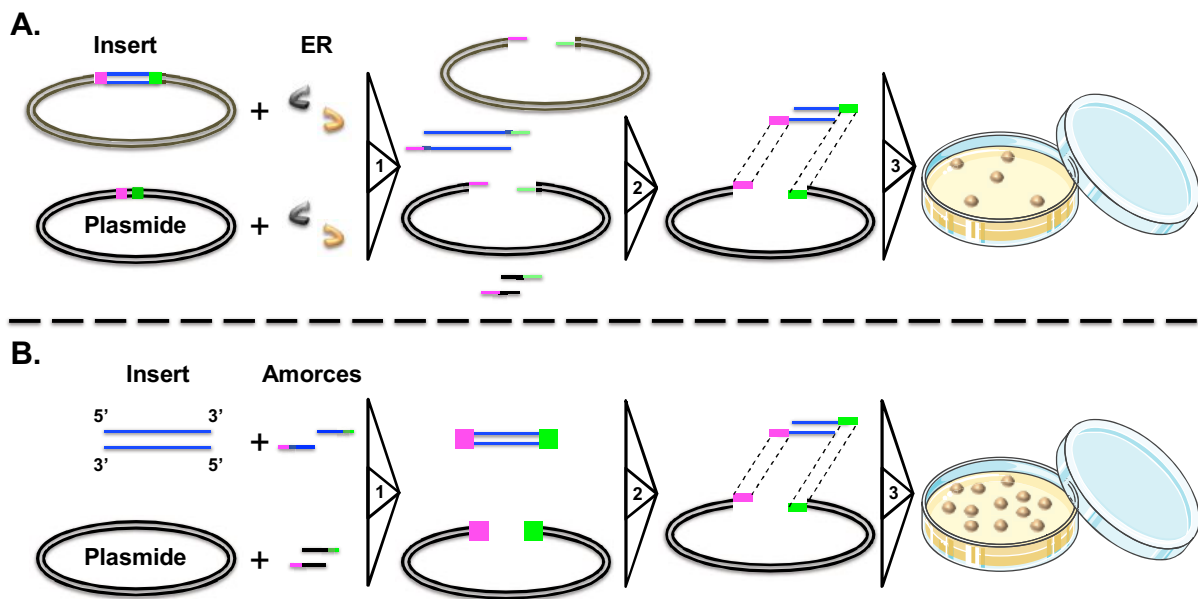


Figure III.2. Représentation schématique des différences entre le clonage par ER et par assemblage de Gibson. (A) Le clonage par ER nécessite la présence des mêmes sites de restriction (rose et vert) au niveau des deux plasmides donneur (marron) avec l'insert (bleu) et accepteur (noir) de l'insert. Dans le cas d'absence de ces sites, ils doivent être insérés auparavant par une étape supplémentaire de PCR. (1) Ces sites permettront aux ER de cliver l'ADN de façon spécifique linéarisant ainsi le plasmide accepteur et libérant l'insert de son plasmide donneur. (2) Ces deux derniers sont ensuite purifiés du mélange par migration sur gel d'agarose et seront liés par l'activité de la ligase ajoutée au mélange plasmide linéaire et insert. (3) La solution contenant le plasmide recombinant est utilisée pour transformer des bactéries DH5 α permettant de sélectionner des colonies bactériennes ayant insérées le plasmide recombinant. (B) Le clonage par Gibson ne nécessite pas la présence de sites complémentaires. (1) Ces sites sont générés par une réaction de PCR en utilisant deux couples d'amorces avec les sites complémentaires. (2) Le produit de PCR est purifié sur gel et assemblé en ajoutant un mélange d'enzymes permettant l'obtention d'extrémités simples brins et la ligation de l'insert au plasmide accepteur. (3) À la différence du clonage par ER, la transformation des bactéries DH5 α donne un meilleur rendement.

Afin de surmonter ces problèmes, nous avons utilisé une méthode alternative « l'assemblage de Gibson » (Figure III.2B). Elle est indépendante des sites de restriction et consiste à amplifier le plasmide et l'insert par PCR en utilisant des amorces permettant d'avoir des bouts complémentaires. Les deux fragments d'ADN sont liés pour former une molécule d'ADN circulaire grâce à un mix de trois enzymes : (1) l'exonucléase qui digère l'ADN à son extrémité 5' créant ainsi une extension d'ADN simple brin du côté 3' facilitant l'hybridation des deux fragments, (2) la polymérase qui remplit les lacunes dans chaque fragment et (3) la ligase qui lie les deux fragments. En plus d'être indépendante des ER, cette technique a un meilleur rendement et ne nécessite que 1 ng de plasmide.

1.3. La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est un outil de recherche puissant permettant d'identifier les sites actifs de certaines enzymes, d'étudier la fonction d'un ou de plusieurs acides aminés d'une protéine, d'optimiser ou d'abolir son activité ou même de lui accorder une nouvelle fonction. Elle permet la délétion, l'insertion ou la substitution d'une ou de plusieurs pb ce qui provoquera la délétion, l'insertion ou la substitution d'un ou de plusieurs acides aminés.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées dont la plus fréquente est la mutagenèse dirigée par PCR (Figure III.3). Elle se base sur le même principe que la PCR, mais avec deux différences au niveau de l'amorce. Celle-ci doit être longue (≈ 30 pb) et complémentaire à l'ADN sauf au niveau des pb à modifier. Ceci introduira donc la mutation voulue à une position précise. La solution résultante contient l'ADN sauvage et l'ADN muté. Contrairement à ce dernier, l'ADN sauvage est méthylé ; ceci permettra sa digestion sélective par une ER, la DpnI digérant uniquement l'ADN méthylé et gardant intact l'ADN muté qui sera utilisé pour la transformation bactérienne.

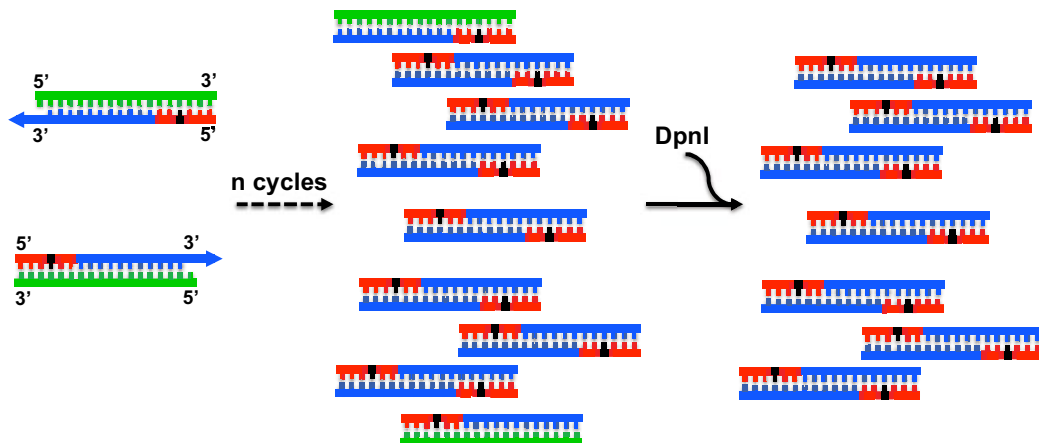


Figure III.3. Représentation schématique du principe de la mutagenèse dirigée. Les amorces utilisées pour la PCR (rouge) sont complémentaires à l'ADN sauvage (vert) sauf au niveau des pb à muter (noir). L'amplification de l'ADN se fait selon les mêmes cycles détaillés ci-dessous (Figure III.1) donnant après n cycles de l'ADN double brin ayant la mutation désirée. L'enzyme DpnI est ensuite ajoutée au mélange pour digérer spécifiquement l'ADN sauvage grâce au groupement méthyle en son extrémité. Comme dans le cas du clonage, l'ADN muté est utilisé pour la transformation bactérienne permettant la sélection des clones positifs.

2. Biochimie des protéines membranaires

Lors de la purification des protéines membranaires, il est nécessaire d'avoir recours à des détergents pour solubiliser la protéine et l'extraire de son milieu naturel hydrophobe, la membrane. Dans les complexes formés avec le détergent, la protéine membranaire pourrait présenter un comportement différent de celui qu'elle a normalement lorsqu'elle est insérée dans la bicouche lipidique. Ainsi, il sera important de reconstituer les protéines purifiées dans des structures lipidiques mimant la bicouche lipidique d'une membrane pour pouvoir étudier leur comportement (Figure III.4). Durant la thèse, nous avons reconstitué nos porines dans des liposomes et nous les avons caractérisés par la DLS.

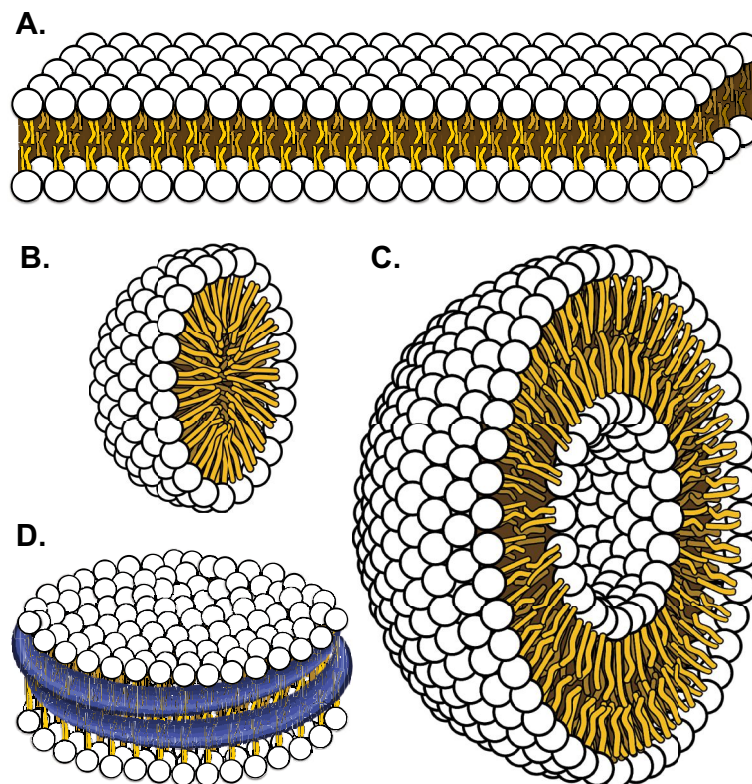


Figure III.4. Représentation schématique comparative des différentes structures lipidiques adéquates à la stabilisation des protéines membranaires. (A) Bicouche de phospholipides. (B) Micelle de détergent formée d'une monocouche de phospholipides. Elle est utilisée pour solubiliser les protéines membranaires et les purifier. (C) Liposome unilamellaire formant une sphère creuse pouvant insérer plusieurs molécules protéiques au niveau de sa bicouche de phospholipides en même temps. (D) Nanodisque formé d'une bicouche de phospholipides entourée de deux protéines amphiphiles stabilisant l'ensemble. Une seule molécule protéique peut être insérée dans chaque nanodisque.

2.1. Les liposomes

Contrairement à la micelle de détergent formée d'une monocouche lipidique (Figure III.4.B), les liposomes sont des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques délimitant des compartiments aqueux (Figure III.4.C). On parle ainsi de liposomes unilamellaires ULV (uni-lamellar vesicle) ou multilamellaires MLV (multi-lamellar vesicle). Le champ d'application des liposomes est très large grâce à leurs propriétés mimant les membranes biologiques. Leur taille varie selon la technique de préparation et définit ainsi le type de liposome. Un SUV (small unilamellar vesicle) a un diamètre <50 nm tandis qu'un LUV (large unilamellar vesicle) a un diamètre situé entre 50 et 500 nm. On parle de GUV (giant unilamellar vesicle) quand le diamètre dépasse 500 nm. Les travaux de ma thèse se sont focalisés sur la préparation et l'utilisation de LUV.

Les LUV furent préparés par la méthode classique dite « hydratation des films lipidiques » (Figure III.5). Brièvement, le chloroforme dans lequel sont solubilisés les lipides est évaporé sous un flux continu d'azote gazeux. Les lipides secs forment ainsi un film sur les parois du contenant. L'hydratation de ce film permet l'obtention d'une suspension de MLV de différentes tailles. Cette suspension de liposomes sera soumise à plusieurs cycles de congélation et de décongélation afin de fragiliser les membranes et permettre l'obtention d'ULV. Pour résoudre le problème d'hétérogénéité de taille, les ULV sont soumis à une extrusion à travers des membranes de polycarbonate permettant l'obtention de LUV de diamètre ≈ 60 nm.

Pour être incorporées dans des LUV, les protéines membranaires solubilisées par du détergent sont directement ajoutées à la suspension de liposomes. Cela entraîne la dilution du détergent en solution au-dessous de sa concentration micellaire critique (CMC) causant la dissociation des micelles en monomères. Les protéines hydrophobes trouveront alors refuge au sein de la bicouche lipidique des LUV. Malheureusement, cette technique ne permet pas le contrôle ni du ratio ni du sens des protéines insérées dans la membrane des liposomes.

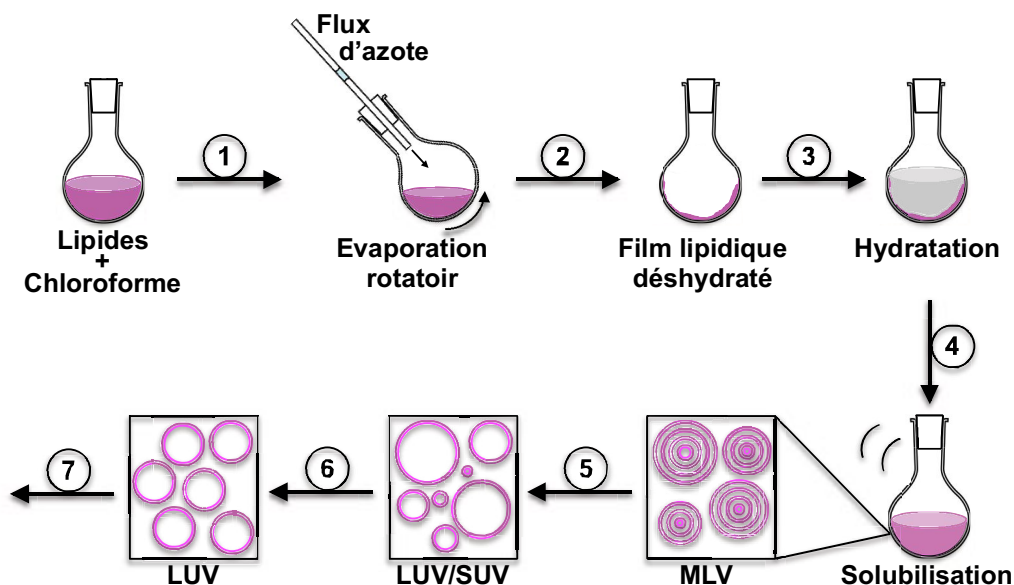


Figure III.5. Représentation schématique des différentes étapes de préparation des LUV. Les lipides solubilisés dans du chloroforme sont mélangés dans une flasque à fond rond. (1) Un flux continu d'azote gazeux est appliqué pour évaporer le chloroforme en maintenant une rotation de la flasque pour avoir (2) une couche fine de lipides couvrant les parois de cette flasque. (3) Le film est ensuite réhydraté en ajoutant un tampon convenable. (4) Les lipides sont homogénéisés après avoir mélangé le contenu de la flasque par un vortex. La solution de liposomes obtenue est formée essentiellement de MLV de tailles variables. (5) Plusieurs cycles de congélation/décongélation serviront ensuite à l'obtention de liposomes LUV et SUV de tailles variant entre 10 et 500 nm. (6) Pour homogénéiser la taille, une étape d'extrusion à travers une membrane de polycarbonate est nécessaire. (7) L'homogénéité de la solution est ensuite vérifiée par mesure de DLS.

2.2. La DLS

La diffusion dynamique de la lumière (DLS: Dynamic Light Scattering) est une technique permettant de mesurer en solution le rayon hydrodynamique (R_h) des nanoparticules variant de 1 à 500 nm. Comme son nom l'indique, la DLS se base sur la diffusion de la lumière du laser par l'échantillon placé dans son trajet. Cette diffusion est la résultante de l'interaction de cette lumière avec le champ électrique de la nanoparticule.

Brièvement, les particules en solution sont en mouvement aléatoire permanent du fait du contact entre les molécules du solvant et la surface de la particule. Ce mouvement, appelé mouvement brownien, cause la diffusion de la lumière à

différentes intensités qui obéie à la formule d'Einstein décrivant la diffusion de particules sphériques dans un milieu liquide :

$$D = \frac{\kappa_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

avec « D » la constante de diffusion, « κ_B » la constante de Boltzmann, « T » la température, « η » la viscosité de la solution et « r » le rayon de la particule.

Ainsi, la diffusion de la lumière dépendra de la taille et de la forme de la nanoparticule mais aussi de la température et de la viscosité du solvant: la vitesse de diffusion diminue avec l'augmentation de la taille et de la viscosité, mais augmente avec l'augmentation de la température. Les intensités de diffusion de lumière sont mesurées par un détecteur de photons; seront comptés et analysés par les différents composants de l'instrument de DLS (Figure III.6A) pour donner une fonction de corrélation (Figure III.6B). Cette fonction est ajustée par des algorithmes propriétaires, spécifiques à l'instrument de mesure et le logiciel d'analyse. Le résultat final est l'obtention de la taille moyenne de la particule ainsi que l'analyse de la polydispersité de l'échantillon (Figure III.6C).

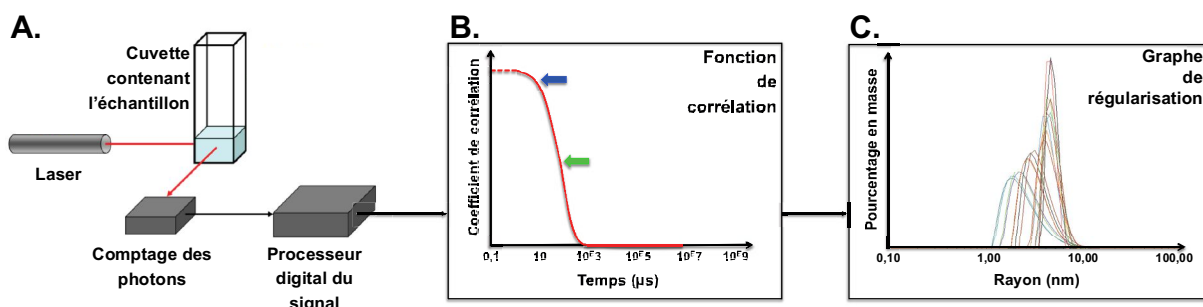


Figure III.6. Représentation schématique d'une mesure de DLS. (A) L'échantillon est placé dans une cuvette posée dans l'appareil de mesure DLS. Les rayons laser traversant la cuvette diffusent après leur interaction avec les particules. Les photons diffusés sont comptés et le signal ainsi produit est analysé pour donner les différentes valeurs de fluctuations d'intensité permettant l'obtention d'une fonction de corrélation (B). Le début de décroissance de la courbe (flèche bleu marine) déterminera la taille moyenne des nanoparticules alors que le gradient de décroissance (flèche verte) déterminera la polydispersité de l'échantillon. (C) À partir de la fonction de corrélation, un graphe de régularisation montrant la distribution de taille dans l'échantillon peut être déterminé.

3. Cristallographie aux rayons X

La résolution de la structure d'une protéine est aujourd'hui indispensable à la recherche fondamentale et appliquée. Elle autorise une meilleure compréhension de l'architecture des macromolécules (protéines, ADN, ARN ...), de leur fonction, de leur interaction avec des ligands (des inhibiteurs et des activateurs) ou d'autres macromolécules. Elle est également indispensable au design rationnel de nouvelles approches et cibles thérapeutiques. Plusieurs techniques peuvent être utilisées en vue de résoudre la structure d'une protéine: la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cryo-microscopie électronique (cryo-ME), la diffusion aux petits angles des rayons X (SAXS : small angle X-ray scattering) et des neutrons (SANS : small angle neutron scattering), la microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy) et la cristallographie. Cette dernière reste, malgré le développement des autres méthodes, la technique de référence pour l'investigation de la structure des protéines. Le nombre de structures résolues par cristallographie et présentes dans la base de données des protéines (PDB : Protein Data Base) (Figure III.7) en dit long sur la prolixité de cette méthode en comparaison des autres.

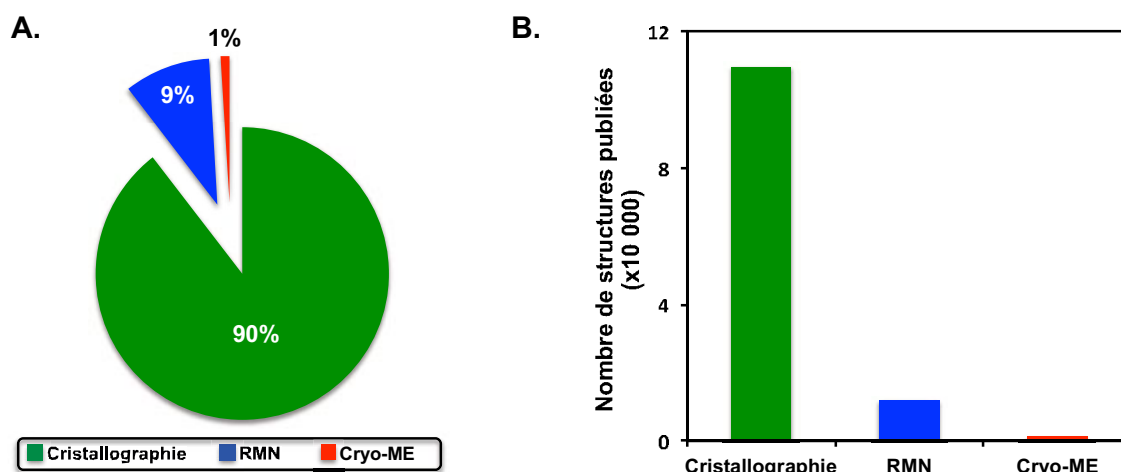


Figure III.7. Le pourcentage et le nombre des structures de protéines publiées dans la PDB en utilisant la cristallographie, la RMN ou la cryo-ME.

Pour déterminer la structure d'une protéine à une résolution atomique c'est à dire pour connaître la position relative de tous les atomes la constituant, il faudra utiliser une lumière de longueur d'onde λ adaptée, *i.e.* de la taille des distances interatomiques, soit l'angström (Å), 0,1 nm (Figure III.8). Ainsi, les rayons X sont

particulièrement adaptés à un tel dessein. L'interaction de ces derniers avec la matière étant extrêmement faible, le signal est amplifié grâce à l'utilisation d'un cristal formé d'une répétition tridimensionnelle (3D) régulière, ordonnée et périodique de la macromolécule.

L'unité de base du cristal est appelée la « maille ». Elle pourra contenir une ou plusieurs unités asymétriques selon la symétrie du cristal. Les rayons X diffusés par les composants du cristal interfèrent les uns avec les autres d'une manière constructive ou destructive. Ce phénomène, appelé diffraction, résulte de l'empilement cristallin. La mesure des angles de diffraction renseigne sur les caractéristiques du cristal (ses paramètres de maille, son réseau de Bravais et son groupe d'espace) alors que l'amplitude de diffraction renseigne sur la structure du motif cristallin (l'unité asymétrique).

Le passage de l'espace réciproque de la diffraction à l'espace réel de la molécule correspond à la transformée de Fourier inverse :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{2\pi \cdot i(hx+ky+lz)}$$

avec « ρ » la densité électronique, « V » le volume de la maille, « x, y, z » les coordonnées fractionnaires de l'espace réel, « h, k, l » les coordonnées fractionnaires de l'espace réciproque et « F_{hkl} » le facteur de structure défini par une amplitude $|F_{hkl}|$ et une phase α_{hkl} .

Cette formule qui compense mathématiquement l'absence physique de lentilles focalisant les rayons X, réclame de connaître la phase des ondes diffusées par le cristal, information perdue au cours de la collecte des données puisque nous ne pouvons pas détecter les photons plus vite que la vitesse de la lumière. Cette perte d'information de phase est la difficulté majeure lors de la détermination d'une structure par cristallographie aux rayons X. Pour résoudre ce « problème de phase »¹²⁶, deux approches sont utilisées pour la récupération de cette information: le phasage expérimental ou le remplacement moléculaire (détaillés ci-dessous III.3.3). Après phasage, la transformée de Fourier inverse permettra de calculer la densité

électronique de la maille, grâce à laquelle la structure d'intérêt pourra être construite et affinée.

En pratique, la résolution de la structure d'une protéine consiste en la cristallisation de la protéine purifiée, le montage du cristal pour son exposition au flux de rayons X et, si le cristal diffracte, le traitement et l'analyse des données de diffraction pour construire un modèle de la structure.

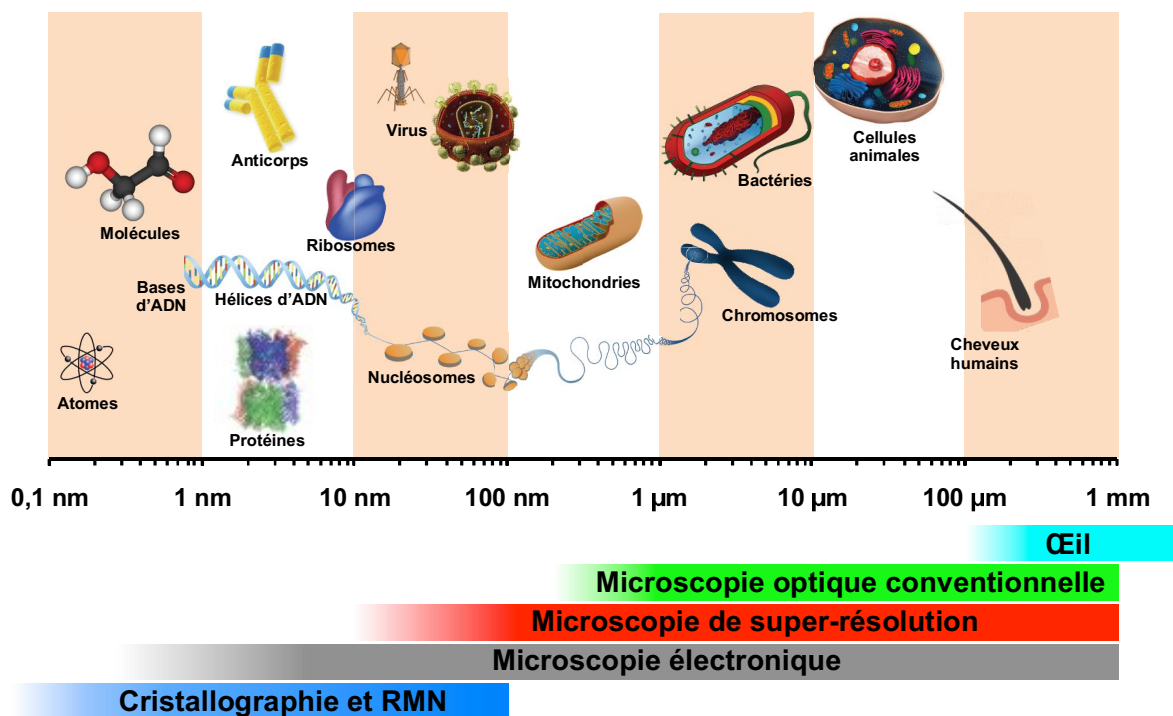


Figure III.8. L'échelle des différents objets biologiques et les techniques permettant de les observer et les étudier.

3.1. La cristallogénèse

Plusieurs méthodes existent qui permettent la cristallisation d'une protéine. La méthode la plus utilisée (et la seule utilisée durant ma thèse) est celle de la diffusion de vapeur. Cette méthode consiste à déposer, dans un milieu hermétiquement fermé, une goutte (suspendue ou assise, Figure III.9) du mélange de la solution protéique et de la solution de cristallogénèse face à un réservoir contenant la même solution de cristallogénèse. L'équilibration des concentrations est atteinte par

évaporation lente de l'eau de la goutte vers le réservoir. La diminution du volume de la goutte entraîne la concentration de la protéine et de l'agent précipitant, ce qui permet parfois de favoriser la nucléation et la croissance cristalline. Ainsi, chaque protéine cristallisera dans des conditions différentes – parfois légèrement, parfois dramatiquement. La nucléation et la croissance cristalline sont dépendantes de la « supersaturation » de la solution de cristallisation : une condition de déséquilibre où la concentration de la protéine dépasse sa limite de solubilité, l'obligeant ainsi à rétablir l'équilibre à travers l'organisation en état solide : cristal ou précipité. Ce processus est illustré par le diagramme de phase en figure III.10.

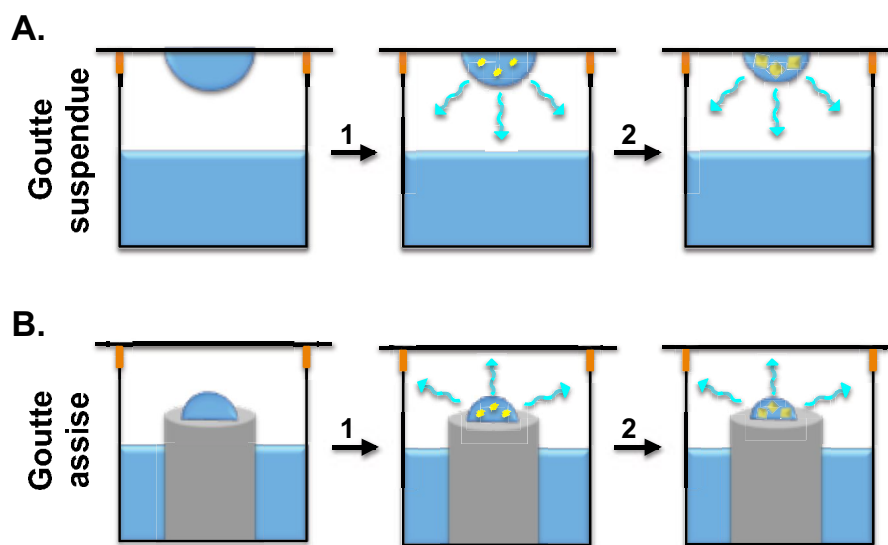


Figure III.9. Schéma illustrant la méthode de cristallisation par diffusion de vapeur. (A) Une goutte du mélange de la solution protéique et de l'agent précipitant est posée sur une lame en verre. Cette lame avec la goutte suspendue est ensuite utilisée pour fermer hermétiquement le puits avec une solution réservoir contenant le même agent précipitant. (B) La goutte est posée sur un support dans le puits avec la solution réservoir. Le puits est fermé pour assurer son étanchéité. Le processus de cristallogenèse se déroule sous l'effet de la diffusion de vapeur (cyan) en deux temps: (1) la nucléation suivie par (2) la croissance des cristaux.

La cristallisation d'une macromolécule est souvent incertaine, mais elle l'est d'autant plus que la macromolécule en question peut faire peu de contacts spécifiques avec elle-même. Les contacts spécifiques sont généralement établis entre résidus polaires, par la formation de liaisons hydrogènes et de ponts salins. Ainsi une protéine membranaire, donc hydrophobe, sera t'elle par définition difficile à

cristalliser du fait du faible nombre de contacts spécifiques pouvant s'établir entre les différentes copies de la molécules. D'autres protéines souffriront inversement de permettre trop de contacts, de fait peu spécifique, et qui limiteront également l'obtention de cristaux de taille et d'ordre suffisant pour la diffraction ; par exemple, les protéines amyloïdes.

En pratique, l'obtention de cristaux nécessite une longue routine de criblage automatique à l'aide d'un robot suivi par un criblage manuel pour optimiser les conditions de cristallisation en variant plusieurs paramètres : l'agent précipitant (le polyéthylène glycol PEG, le sulfate d'ammonium...), le sel, le pH et la température. L'ajout d'additifs à la solution de cristallisation peut aussi être déterminante dans certains cas de cristallisations difficiles. Le manque de compréhension et de base fondamentale claire pour guider les efforts de cristallisation rend la reproductibilité des résultats souvent problématique.

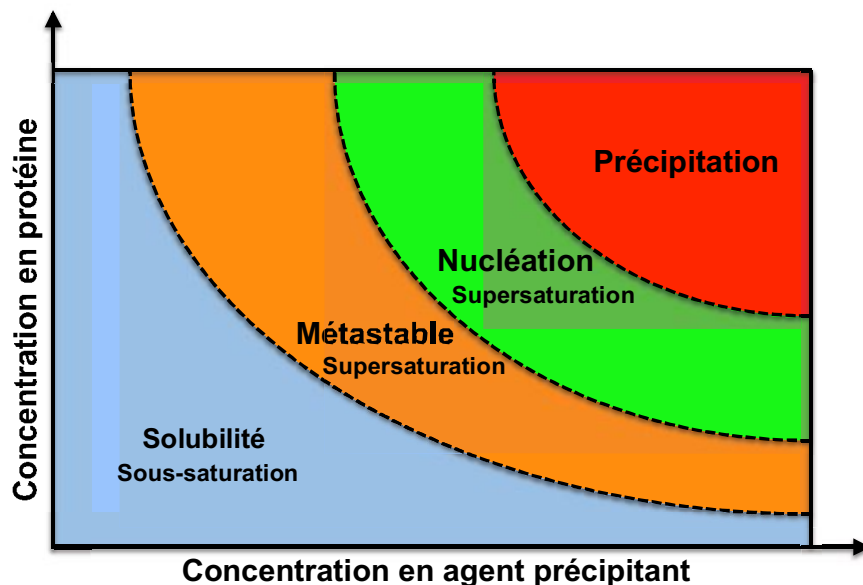


Figure III.10. Schéma du diagramme de phase. La cristallisation varie avec la concentration en protéines et en agent précipitant. Elle dépend du niveau de saturation au sein de la goutte. Dans le cas de la sous-saturation, les protéines sont dans un état d'équilibre stable et restent solubles. Par contre dans le cas de la supersaturation, les protéines sont dans un état de déséquilibre. Cela causera la précipitation ou la nucléation de la protéine permettant la formation des cristaux. Bien que la nucléation ne peut pas avoir lieu dans la phase métastable, la croissance des cristaux, elle, peut s'y produire.

3.2. La diffraction aux rayons X

Trois sources de rayons X peuvent être utilisées : (1) une source de laboratoire généralement caractérisée par une λ de 1,5 Å et une brillance de 10^{10} photons/(sec.mrad².mm².0,1%BW), (2) un synchrotron caractérisé par une λ de 0,5 – 2,5 Å et une brillance de 10^{23} photons/(sec.mrad².mm².0,1%BW) et (3) un laser à électrons libres caractérisé par une λ de 0,5 – 2,5 Å et une brillance de 10^{33} photons/(sec.mrad².mm².0,1%BW). Pour résoudre la structure de nos protéines, nous avons eu recours aux lignes de lumières de cristallographie macromoléculaire du synchrotron européen à Grenoble, l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility).

Avant leur exposition aux rayons X, les cristaux doivent être protégés des dommages d'irradiation. À dessein, ils sont trempés dans une solution cryoprotectrice puis congelés de façon ultra rapide par exposition à de l'azote liquide ou gazeux à 100 K. Durant l'exposition aux rayons X, la collecte des données est réalisée à température cryogénique sous un flux d'azote gazeux (généralement à 100 K) et les rayons diffractés sont détectés sur des détecteurs CCD (Charge Coupled Device) ou à pixel (Pilatus, Eiger...) fournissant ainsi un cliché de diffraction (Figure III.11). Durant la collecte, le cristal est oscillé et le jeu de données complet correspond à l'enregistrement de plusieurs images consécutives au cours de cette rotation, chacune correspond à une plage de rotation fixe (généralement 0,1 à 1°). Selon la symétrie interne du cristal, il faudra collecter plus ou moins de données sur une plus ou moins large plage angulaire. L'espace réciproque étant auto-symétrique, il faudra collecter au minimum sur 180° pour un cristal triclinique (pas de symétrie rotationnelle) en absence de diffusion anormale. Mais les cristaux de protéines présentent souvent des symétries rotationnelles permettant de collecter sur moins de 180°.

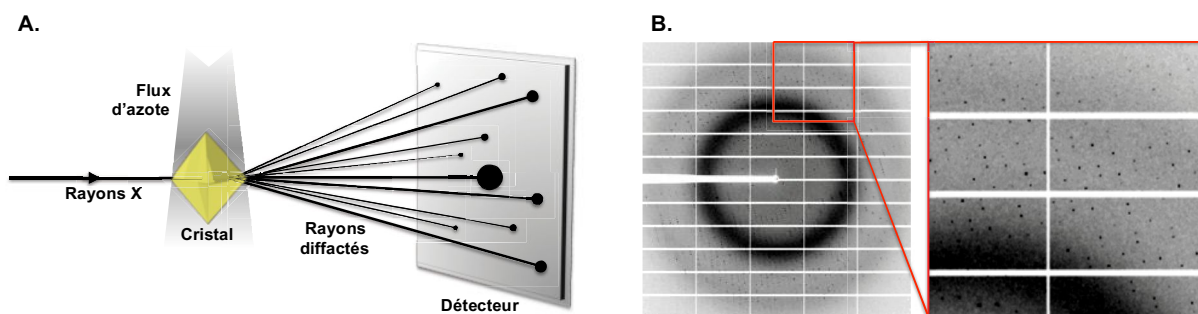


Figure III.11. La diffraction des rayons X. (A) Schéma du montage expérimental de la diffraction des rayons X à travers un cristal placé sous un flux continu d'azote gazeux. Les rayons diffractés sont détectés et permettent d'avoir un cliché de diffraction. (B) Un cliché de diffraction de la protéine rsFolder obtenue à l'ESRF sur un détecteur à photons X à pixel type Pilatus 6M.

3.3. Le traitement des données

Le traitement des données de diffraction X est essentiellement informatique de nos jours. Il se décompose en plusieurs étapes: (1) l'indexation, permettant la détermination du groupe d'espace et des paramètres de la maille, (2) l'intégration, permettant la mesure de l'intensité des tâches de diffraction, (3) la mise à l'échelle permettant d'avoir une série de réflexions uniques, (4) le phasage, (5) le calcul de la densité électronique par la transformée de Fourier inverse des facteurs de structure et (6) l'affinement de la structure permettant la construction d'un modèle final.

L'obtention d'une carte de densité électronique nécessite la connaissance de deux paramètres: l'amplitude et la phase des rayons diffractés. L'information sur l'amplitude est calculée à partir des intensités mesurées après indexation, intégration et mise à l'échelle. En revanche, l'information sur la phase n'est pas obtenue lors de la collecte des données. Il sera nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes de la diffraction pour recouvrir cette information. Plusieurs méthodes expérimentales comme le SAD (Single-wavelength anomalous dispersion), le MAD (Multi-wavelength anomalous diffraction), le SIR (Single isomorphous replacement) ou le MIR (Multi isomorphous replacement) sont utilisées surtout pour résoudre les structures de nouvelles protéines n'ayant pas d'homologue dans la PDB. Au cours de ma thèse, nous avons uniquement utilisé la méthode de remplacement moléculaire permettant

d'obtenir l'information de phase recherchée à partir d'une structure déjà connue et supposée homologue de la structure recherchée (> 20% d'homologie).

Les facteurs de structure calculés (F_{calc}) à partir de la structure modèle n'étant que partiellement en accord avec les facteurs de structures observés (F_{obs}), des pics de différence seront obtenus dans les cartes de densité électronique, à partir desquelles le cristallographe va reconstruire la structure réelle de la molécule cristallisée. En routine, deux cartes de densité électroniques sont employées : la carte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ et la carte de différence $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$. La première rend compte de la densité électronique de toute la protéine nonobstant les erreurs du modèle. La deuxième rend compte de la différence entre le modèle et les données expérimentales permettant l'obtention de pics de densités électroniques négatives autour des atomes qui ne sont pas présents, ou du moins pas à la place attendue dans la structure et de pics de densités électroniques positives aux endroits où inversement des atomes devraient être inclus dans le modèle. La hauteur des pics dépend du nombre d'électrons présent dans l'atome considéré.

La qualité de l'affinement est principalement évaluée au travers de deux critères statistiques, le R (ou R_{work}) biaisé par le modèle de départ calculé à partir de l'ensemble des réflexions obtenues, et le R_{libre} (ou R_{free}) non biaisé par le modèle de départ calculé à partir des réflexions non utilisées pour l'affinement (T).

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} \quad R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}}|}$$

Ces deux facteurs comparent les F_{obs} aux F_{calc} . Ainsi l'affinement de la structure de départ doit diminuer l'écart entre les F_{obs} et les F_{calc} , et donc nous pouvons suivre la qualité de cet affinement par le suivi de la diminution des R et des R_{libre} . Il est également important de suivre l'écart entre R et R_{libre} . Ce dernier doit être supérieur au R d'une valeur $\approx 5\%$. L'augmentation de cet écart est le signe d'un sur-affinement.

Généralement, les R et R_{libre} sont autour de $\approx 10\%$ à une résolution de 1 Å et de $\approx 20\%$ à une résolution de 2Å. D'autres critères sont également utilisés pour la

validation du modèle final comme les déviations moyennes (ou rmsd) sur la longueur des liaisons covalentes et la distribution des angles dans le diagramme de Ramachandran.

4. Imagerie cellulaire

L'imagerie cellulaire est depuis le XVI^{ème} siècle l'outil indispensable du biologiste, lui permettant de voir et de comprendre le monde du vivant. Le principe de l'imagerie se base essentiellement sur l'interaction entre les rayons de lumière incidents (photons, électrons, ions...) et les particules de l'objet à imager donnant ainsi des rayons émergents captés par un appareil de détection (film, détecteur CCD...), et au fond, la cristallographie aux rayons X n'est rien d'autre qu'une méthode d'imagerie sophistiquée. Les premiers microscopes ont été développés par Galileo Galilei, Robert Hook et Antonie van Leeuwenhoek dans les années 1600. Ils ont permis de voir à l'échelle de la cellule et de la bactérie. Le développement du microscope s'est accéléré à partir du XX^{ème} siècle avec les premiers microscopes à UV (1904), l'utilisation de fluorescence primaire (1908), la description du contraste de phase (1930), le premier microscope électronique (1931), le microscope confocal (1957), la microscopie à rayons X (1983) et le microscope AFM (1985).

Dans la suite de cette partie, nous donnerons une description brève des trois types de microscopies utilisées pendant ma thèse.

4.1. La microscopie de fluorescence conventionnelle

La microscopie de fluorescence est une technique non invasive d'imagerie dans le principe de laquelle un compartiment, un organelle ou une protéine sont spécifiquement marqués pour déterminer leur localisation dans la cellule. Malgré sa résolution spatiale limitée à ≈ 250 nm (Figure III.8), son utilisation reste incontournable. Cela se reflète dans la grande variété de molécules émettrices de

lumière ou fluorophores, et la mise sur le marché, depuis les années 1930s, d'une très large gamme de microscopes commerciaux.

La fluorescence est le phénomène photophysique au cours duquel un fluorophore porté à l'état excité par absorption d'un photon, revient à l'état fondamental selon une voie radiative. Le diagramme d'énergie de Jablonski (Figure III.12) permet de représenter les différents devenir possibles d'un fluorophore excité par l'absorption d'un photon. Brièvement, avant l'excitation, le fluorophore est dans son niveau d'énergie singulet basal (S_0). L'absorption d'un photon cause l'excitation du fluorophore qui passe dans un niveau singulet excité (S_1 ou S_2). Des transitions entre sous états excités peuvent survenir par exemple du niveau S_2 au niveau S_1 par une conversion interne appelée une relaxation vibrationnelle et qui ne sera pas accompagnée par une émission de photons (donc non-radiative). L'état excité du fluorophore est instable par définition, et pour revenir à l'état fondamental, le fluorophore se désexcite en émettant un photon: (1) par fluorescence : relaxation directe du niveau S_1 à S_0 ou (2) par phosphorescence : passage inter-système du niveau S_1 vers un niveau appelé triplet (T_1) avant de revenir au niveau S_0 . Ces deux phénomènes diffèrent par l'énergie des photons émis et par les échelles de temps concernées (ns pour la fluorescence, msec pour la phosphorescence).

Plusieurs paramètres photophysiques caractérisent les fluorophores et rendent chaque fluorophore unique. Les principales caractéristiques d'un fluorophore sont son spectre d'absorption correspondant à l'ensemble des longueurs d'onde d'absorption (λ_{ab}) permettant au fluorophore d'émettre de la fluorescence à une λ précise ainsi que son spectre d'émission correspondant à l'ensemble des longueurs d'onde des photons émis (λ_{em}) suite à l'absorption d'un photon. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est également caractéristique du fluorophore et permet la quantification de sa capacité d'absorber des photons à une λ donnée. De plus, Le rendement quantique (ϕ) définit comme étant la capacité à émettre des photons par fluorescence après l'absorption de photons reste un critère important caractérisant un fluorophore.

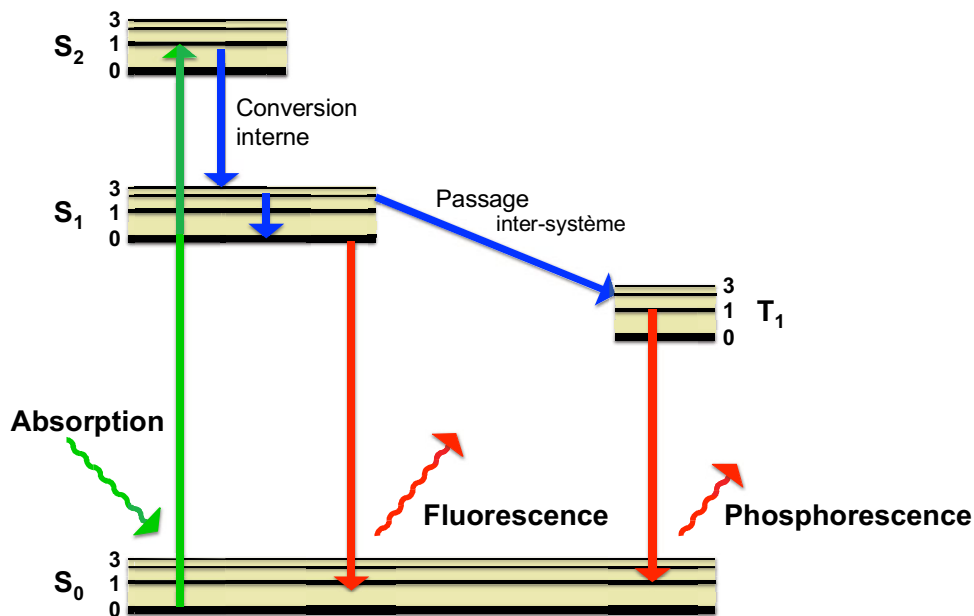


Figure III.12. Diagramme d'énergie de Jablonski simplifié. L'absorption d'un photon (vert) cause le passage du fluorophore de l'état singulet fondamental S_0 à un état excité S_1 ou S_2 . La conversion interne à l'état excité ou le passage inter-système à l'état T_1 (bleu) ne sont pas accompagnés d'émission de photons, mais d'une perte d'énergie. L'émission de photons (rouge) se produit par fluorescence ou phosphorescence lors du retour du fluorophore à son état fondamental S_0 .

Les fluorophores peuvent être (1) des molécules conjuguées à des composés organiques fluorescents comme les lipides conjugués à la rhodamine pour la production de liposomes fluorescents, (2) des colorants liés à des anticorps comme les Alexa Fluor, (3) des marqueurs spécifiques comme le Hoescht marqueur d'acides nucléiques ou l'Indo-1 marqueur de calcium ou (4) des protéines fluorescentes (FPs : Fluorescent Proteins) dont la plus connue est la GFP (Green fluorescent protein)¹²⁷. Cette dernière catégorie de fluorophore est particulièrement intéressante. Elle regroupe une large liste de FPs ayant un vaste champ d'applications et une palette de couleurs couvrant tout le visible et au delà, mais elle est surtout utilisée comme étiquette pour localiser et suivre l'expression d'une protéine cellulaire d'intérêt. Les FPs sont des protéines d'environ 27 KDa structurées en tonneau bêta au sein duquel un triplet d'acides aminés mure par isomérisation pour former ce qu'on appelle le chromophore (Figure III.13). La conformation de ce dernier et ses interactions avec les acides aminés environnants déterminent et caractérisent la fluorescence et les propriétés photophysiques de la FP considérée.

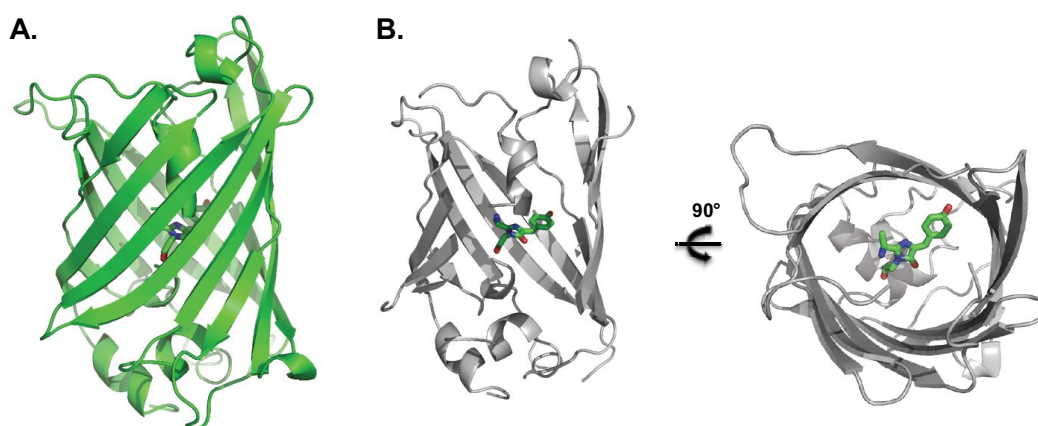


Figure III.13. Structure générale des protéines fluorescentes. (A) Vue de face de la protéine structurée en tonneau bêta. (B) Vue de face et du haut du chromophore en vert au sein du tonneau bêta en gris.

Pour faire de l'imagerie de fluorescence conventionnelle, un microscope d'épifluorescence ou un microscope confocal peuvent être utilisés. L'avantage de ces deux types de microscope est la facilité de leur prise en main et la rapidité de l'acquisition des images. C'est une technique parfaitement adaptée pour l'étude d'ensemble des cellules vivantes, de leur phénotype et de leur organisation. Grâce à une intensité d'illumination raisonnable et la courte durée nécessaire à l'acquisition, cette technique permet également de suivre les cellules vivantes au cours du temps. Le niveau d'expression d'une protéine et sa localisation dans une cellule peuvent également être étudiés, mais sans précision spatiale du fait du manque de résolution inhérent à la méthode.

La limite de résolution a été décrite par Ernst Abbe en 1873¹²⁸. Ce problème est originaire du fait que l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache de diffraction appelée disque d'Airy (Figure III.14) de taille définie par la fonction d'étalement du point (PSF: Point Spread Function). Ainsi, imager deux points séparés d'une distance inférieure à la PSF générera une image d'un seul point impossible à résoudre. La distance minimale nécessaire entre deux points définissant la résolution optimale de la microscopie conventionnelle obéit à la loi d'Abbe-Rayleigh:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin\theta}$$

avec « λ » la longueur d'onde d'excitation comprise entre 500 nm et 700 nm, « n » l'indice de réfraction et « θ » l'ouverture angulaire de l'objectif. Ainsi, l'ouverture numérique (NA) du microscope est le produit « $n \sin\theta$ » et qui est de l'ordre de 1,4 pour les microscopes les plus modernes. De ce fait, la résolution optimale serait de l'ordre de 200 nm et donc largement limitante pour l'étude des sous-compartiments cellulaires, des protéines, de leur localisation, de leur oligomérisation, de leur interactions avec d'autres partenaires cellulaires etc... En microbiologie, cette limite est d'autant plus problématique qu'elle est de l'ordre de la taille des objets imagés – une bactérie fait peu souvent plus de 500 nm d'épaisseur.

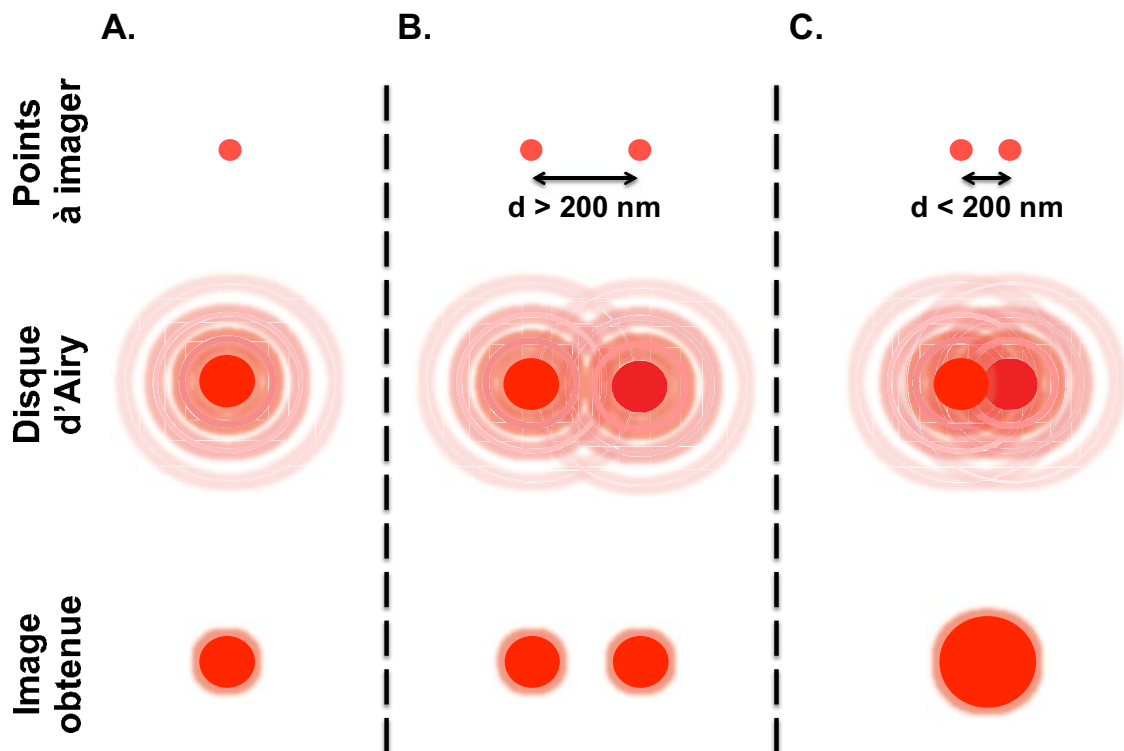


Figure III.14. Illustration de l'image de points limitée en résolution. (A) L'image d'un point est un disque d'Airy. (B) La présence de deux points à une distance > 200 nm permet, malgré l'image en disque d'Airy, de les distinguer. (C) Ceci n'est pas le cas si la distance entre les deux points est < 200 nm. Les deux points paraissent comme un seul point dans l'image finale. Figure adaptée de la thèse du Dr. Virgile Adam.

4.2. La microscopie électronique

La microscopie électronique (ME) est un domaine d'étude et de compétences à part entière. Nous l'avons surtout utilisé pour l'imagerie des biofilms, mais le spectre d'application de cette technique s'étend avec le temps. De l'apparition du premier microscope électronique en 1931 à nos jours, les applications se multiplient. Ceci est dû à la faible longueur d'onde des électrons et à leur forte interaction avec la matière, qui offre un grand pouvoir résolutif (Figure III.8) permettant d'obtenir des grossissements allant jusqu'à 5 millions de fois. Contrairement à la microscopie optique conventionnelle qui utilise des rayonnements électromagnétiques, la ME utilise un faisceau d'électrons de $\lambda \approx 2,5 \text{ pm}$ largement inférieur à celle d'un photon $\approx 400 \text{ nm}$.

Si la ME offre plusieurs applications dans plusieurs domaines du vivant, mais aussi dans l'étude des matériaux, c'est grâce aux différents types de microscopes et aux différentes méthodes de préparations d'échantillons. Les principales approches de la ME, correspondant à autant de matériels, sont la microscopie électronique en transmission (TEM : Transmission electron microscope), à balayage (SEM : Scanning electron microscope), par réflexion (REM : Reflection electron microscope) et à balayage en transmission (STEM : Scanning transmission electron microscope). Ces microscopes diffèrent par leur source d'électrons, par leur mode d'acquisition des images, par l'intensité et le temps d'exposition de l'échantillon aux électrons et par la méthode de préparation de l'échantillon. Ces facteurs influencent la qualité de l'échantillon et par conséquent la qualité de l'image. Ainsi, le choix du type de microscope ne dépend pas uniquement de l'application, mais aussi de la sensibilité de l'échantillon au faisceau d'électrons.

La préparation de l'échantillon est également importante et le choix de la technique utilisée déterminera le type d'informations que l'on pourra espérer obtenir dans la micrographie. L'échantillon peut être préparé par différentes techniques dont la coloration négative, la cryo-ME, la cryo-coloration négative ou l'ombrage. La première méthode offre l'avantage d'être rapide et donne des images à contraste élevé. Cependant, elle ne permet d'observer que l'empreinte de l'échantillon sec. Ceci n'est pas le cas de la cryo-ME qui permet de fournir la structure native de

l'échantillon, mais qui reste une méthode de préparation relativement difficile donnant une image à faible contraste. La cryo-coloration négative offre les avantages des deux méthodes précédentes, mais la préparation de l'échantillon reste difficile. L'ombrage par utilisation des métaux lourds est une technique parfaitement adaptée pour l'imagerie des structures ayant un mauvais contraste, et qui permet la reconstruction d'images 3D voir l'étude de cristaux 2D. L'inconvénient majeur de ce marquage est le risque d'agglomération des particules métalliques qui rend cette technique inadaptée à une grande variété d'échantillons, en particulier ceux de forme globulaire.

Quels que soient le type de microscope ou la méthode de préparation de l'échantillon et malgré l'avantage de sa résolution élevée, la ME demeure inadaptée pour le vivant. Ceci est dû à la préparation invasive de l'échantillon et l'intensité endommageante du faisceau d'électrons utilisé. Un autre inconvénient particulièrement limitant pour notre projet est l'absence de possibilité d'étiqueter les protéines exprimées par les bactéries d'où l'impossibilité du marquage spécifique.

4.3. La microscopie de super-résolution

4.3.1. Principe

Comme son nom l'indique, la microscopie de super-résolution (SR) permet d'aller au-dessus de la limite de résolution de la microscopie conventionnelle offrant un pouvoir d'imagerie allant jusqu'à la molécule unique. La microscopie de SR réunit l'avantage d'une part, de la microscopie conventionnelle concernant l'étiquetage spécifique des protéines et la préservation de l'échantillon et d'autre part, de la ME avec une résolution optimale de ≈ 10 nm (Figure III.10). Le principe général se base sur le fractionnement de la détection des fluorophores pendant l'acquisition de l'image ce qui nécessite l'utilisation de fluorophores adaptés. Bien que l'âge de la microscopie de SR ne dépasse pas les vingtaines d'années, le nombre de techniques, la diversité de fluorophores (dont les FPs) et par conséquent le spectre d'application s'élargit.

4.3.2. Protéines phototransformables

Les deux dernières décennies ont été marquées par le développement et la découverte d'une variété de FPs dont l'ensemble forme une boîte à outils aujourd'hui indispensable à la compréhension du vivant. Parmi ces protéines, il existe des FPs phototransformables (PTFPS : Phototransformable FPs) dont la première « Kaede » a été découverte en 2002¹²⁹. D'autres PTFPs naturelles ont été également découvertes, mais la plupart sont des protéines ingénierées et modifiées grâce à la recherche fondamentale pour optimiser leurs propriétés photophysiques et les adapter à des applications données. Aujourd'hui, les PTFPs peuvent être classées en quatre groupes (Figure III.15) selon leur mode de phototransformation.

1. Les protéines photoactivables (PAFPs : Photoactivatable FPs) sont des protéines non fluorescentes à l'état basal (appelé état OFF). Après une activation irréversible à une λ bien définie et spécifique à chaque protéine, les PAFP passent à un état excité (appelé état ON) leur permettant d'émettre de la fluorescence. C'est le cas de PAmcherry¹³⁰ activable et fluorescente en rouge.

2. Les protéines photoconvertibles (PCFPs : Photoconvertible FPs) sont des protéines fluorescentes capables de changer leur couleur de fluorescence après excitation à une λ définie. Comme pour l'activation des PAFP, la conversion de PCFPs est irréversible. La protéine Kaede¹²⁹ photoconvertible du vert au rouge en est un exemple.

3. Les protéines photocommutables (RSFPs : Reversibly switchable FPs) sont des protéines dont la phototransformation est réversible. Elles peuvent être divisées en deux catégories : RSFPs négatives fluorescentes (ON) comme rsEGFP¹³¹ et les RSFPs positives non fluorescentes (OFF) à l'état basal comme rsCherry¹³². Ces protéines commutent d'un état à un autre sous l'effet de deux λ spécifiques. Le contraste entre ces deux états, la durée de vie de l'état excité et le nombre de cycles que peut effectuer la protéine avant son blanchiment caractérisent, différencient et déterminent les applications adaptées à chaque RSFP.

4. Les protéines biphotochromiques sont des protéines à la fois PCFPs et RSFPs. Ces protéines peuvent être converties irréversiblement d'une couleur à une autre et peuvent également commutées réversiblement de ces deux couleurs à un état OFF selon les λ d'excitation. Parmi ces protéines, la première décrite est IrisFP¹³³.

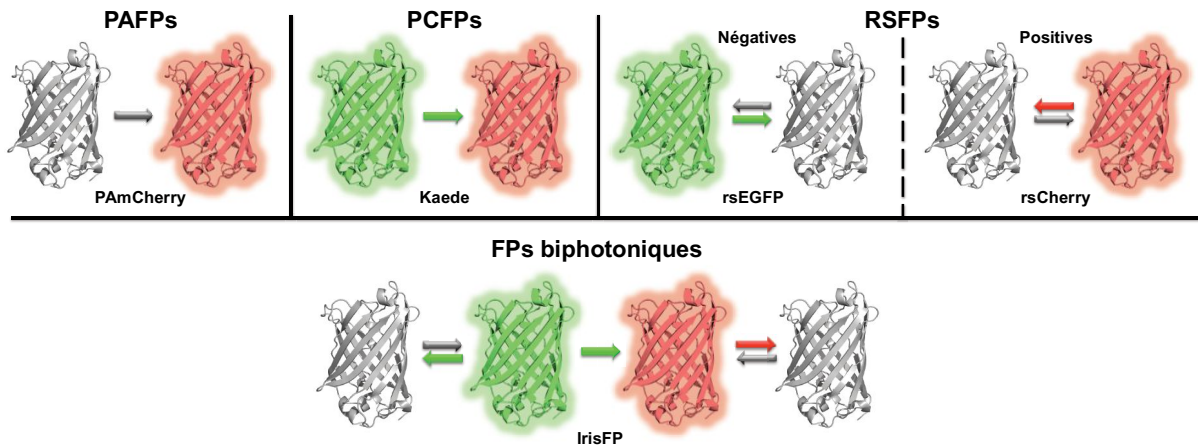


Figure III.15. Illustration des différentes classes de PTFPs. Chaque classe est représentée par un exemple de FPs. Les flèches représentent le sens de la phototransformation.

4.3.3. Types

L'imagerie de SR réunit aujourd'hui plusieurs techniques dont les principales peuvent être divisées en deux catégories qui diffèrent surtout par leur mode d'acquisition :

1. La microscopie de SR par illumination structurée : elle est basée sur la déplétion de la fluorescence des molécules périphériques. Le microscope utilisé est un microscope confocal à balayage ayant un faisceau d'excitation focalisé auquel est ajouté un deuxième faisceau annulaire qui servira à éteindre les molécules adjacentes aux molécules centrales excitées par le faisceau focalisé (Figure III.16). Cette catégorie comprend la microscopie SSIM¹³⁴ (Saturated structured-illumination microscopy), la microscopie STED¹³⁵ (Stimulated emission depletion) pour laquelle

Stefan W. Hell a été récompensé par le prix nobel de Chimie en 2014 et la microscopie RESOLFT¹³⁶ (Reversible saturable optically linear fluorescence transitions) utilisée durant ma thèse en collaboration avec l'équipe du Dr. Stefan Jacobs.

Parmi les PTFPs, les RSFPs sont les plus adaptées à cette méthode grâce à la réversibilité de leur commutation qui leur permet de passer d'un état OFF de fluorescence lors de l'excitation du laser de déplétion à un l'état ON lors de l'exposition au laser d'excitation et ceci, un très grand nombre de fois. L'inconvénient majeur de ces techniques réside dans le coût élevé du dispositif expérimental, la complexité du montage optique, mais surtout la forte phototoxicité résultant de l'exposition répétée de l'échantillon biologique à de fortes puissances de lumière, du fait de la faible probabilité de la commutation ON→OFF et donc de la correspondamment forte intensité requise pour le laser de déplétion.

2. La microscopie de SR par localisation de molécules uniques : elle est basée sur une activation fractionnée au cours du temps d'acquisition d'une sous population de l'ensemble des molécules fluorescentes grâce à l'utilisation d'une faible intensité de laser (Figure III.17). Contrairement aux techniques précédentes, le dispositif expérimental est classique avec un microscope d'épifluorescence conventionnel. La différence réside dans le type de fluorophore utilisé, la méthode d'acquisition (plutôt cumulative que par balayage) et le traitement de données. La résolution pouvant être atteinte en utilisant ce type de méthode est d'environ 10 nm, comparée à 40 nm pour le STED et le RESOLFT. De plus, la faible intensité que nécessite cette catégorie d'imagerie la rend parfaitement adaptée aux échantillons biologiques vivants. Cette catégorie comprend la microscopie STORM¹³⁷ (Stochastic optical reconstruction microscopy) utilisant des fluorophores organiques, la microscopie FPALM¹³⁸ (Fluorescent photoactivated localisation microscopy) et la microscopie PALM¹³⁹ (Photoactivated localisation microscopy) pour laquelle Eric Betzig a été récompensé, avec S. W. Hell, par le prix nobel de Chimie en 2014. Cette dernière méthode, également utilisée durant ma thèse, nécessite l'utilisation des PAFPs ou des PCFPs.

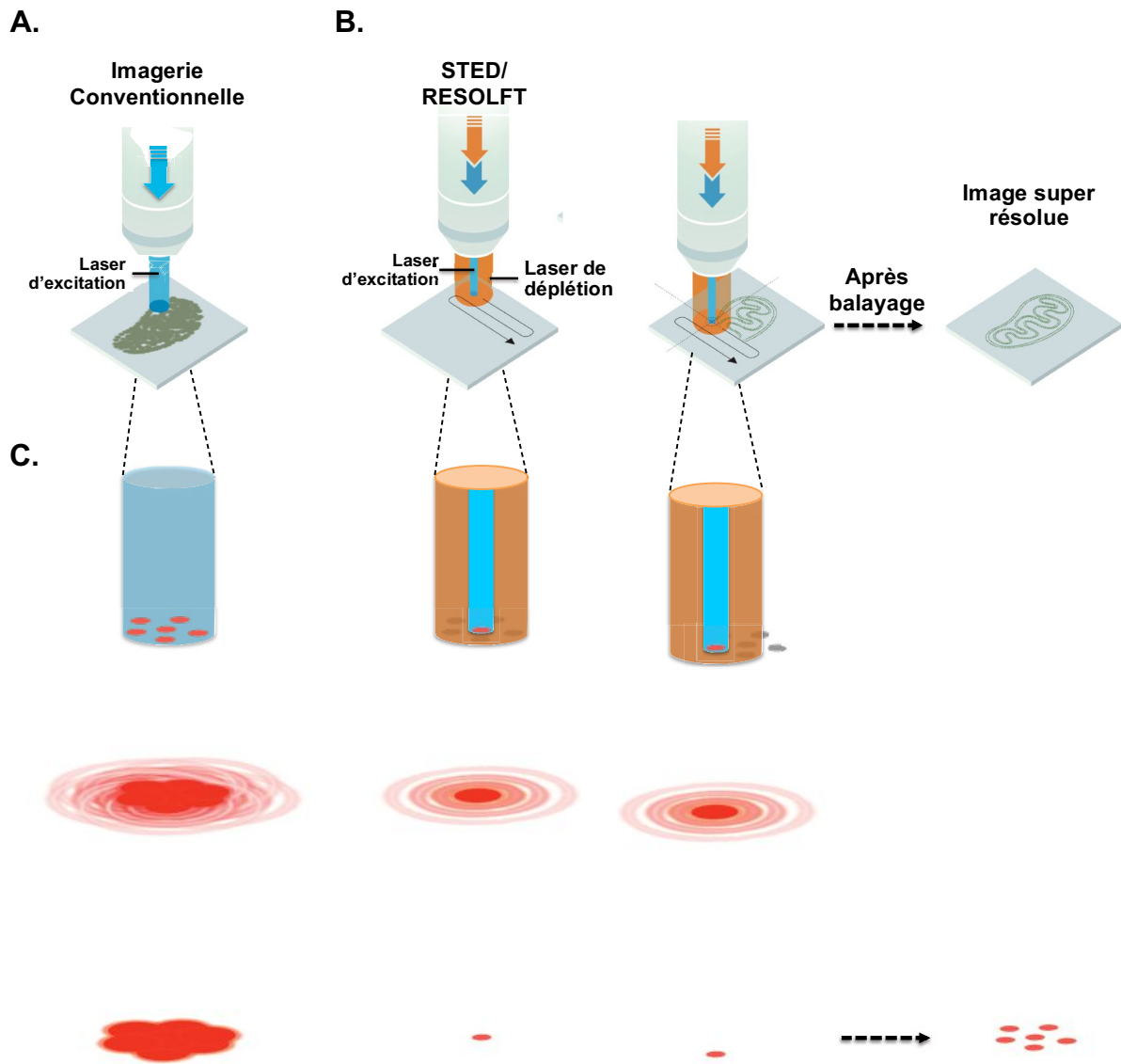


Figure III.16. Représentation schématique du principe d'imagerie par la microscopie STED ou RESOLFT. (A) Image obtenue de la mitochondrie par imagerie conventionnelle avec un microscope confocal à balayage. (B) En imagerie STED ou RESOLFT, la présence d'un deuxième faisceau annulaire au cours du balayage permet d'avoir une image de super-résolution¹⁴⁰. (C) Illustration des différents modes d'acquisitions simplifiés sur 5 points. En microscopie conventionnelle, la limite de résolution ne permet pas de distinguer les points. Alors qu'en microscopie STED ou RESOLFT, le balayage accompagné de déplétions des molécules adjacentes permettra cette distinction.

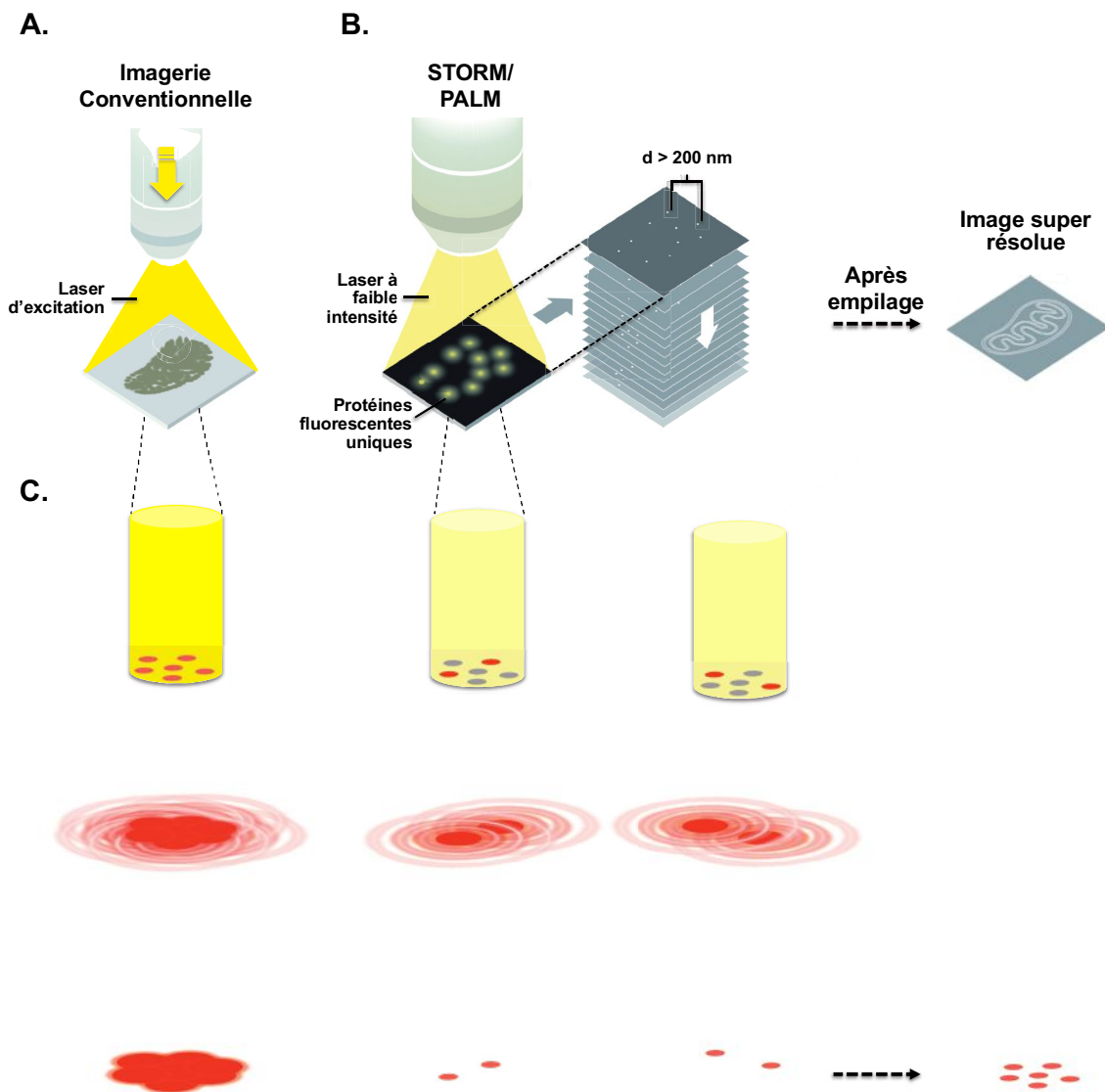


Figure III.17. Représentation schématique du principe d'imagerie par la microscopie PALM. (A) Image obtenue de la mitochondrie par imagerie conventionnelle avec un microscope d'épifluorescence. (B) En imagerie PALM, l'acquisition fractionnée permet la détection des molécules uniques et ainsi l'obtention d'une image super-résolue après empilage des différentes acquisitions¹⁴⁰. (C) Illustration des différents modes d'acquisitions simplifiés sur 5 points. En microscopie conventionnelle, la limite de résolution ne permet pas de distinguer les points. Tandis qu'en microscopie PALM, la faible illumination provoquera l'excitation stochastique des molécules uniques permettant ainsi après traitement des données la distinction des 5 points.

IV. Matériels et méthodes

1. Souches bactériennes

Selon l'expérience envisagée, cinq souches de bactéries sont systématiquement utilisées :

1. La souche DH5 α d'*E. coli* pour la sélection des clones positifs après clonage ou mutagénèse dirigée et pour l'amplification des plasmides recombinants.

2. La souche BL21 (DE3) d'*E. coli* pour l'expression et la production des protéines solubles (cytoplasmiques et périplasmiques) et comme bactérie contrôle négatif pour la formation de biofilms¹⁴¹.

3. La souche BL21 Δ Omp8 d'*E. coli* dépourvue de ses porines principales¹²⁵ pour l'expression de nos porines d'intérêt et l'étude de leur rôle potentiel dans la formation des biofilms.

4. La souche ATCC 29914 de *P. stuartii* (fournie par l'Institut Pasteur, Paris, France) pour l'étude des biofilms bactériens et de leur réponse aux stress extérieurs.

5. La souche ATCC 29914 de *P. stuartii* Δ Omp-Pst2 (Δ P2) (fournie par le professeur Jean-Marie Pagès de l'université de Marseille, France) pour l'étude de l'effet de la délétion du Omp-Pst2 sur la croissance bactérienne et la formation de biofilms.

2. Biologie moléculaire

2.1. Les plasmides

Mis à part le plasmide pEF.myc.ER utilisé pour exprimer rsEGFP2 et rsFolder2 dans le réticulum endoplasmique, tous les plasmides utilisés sont des plasmides d'expression pET. Ces plasmides possèdent un promoteur T7 permettant l'induction de l'expression de la protéine d'intérêt en cas de carence en glucose mais aussi grâce à l'ajout d'une molécule inductrice l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). En plus de la sur-expression après induction, les pETs possèdent un niveau d'expression basal considérable même en absence d'induction. Pour l'expression cytoplasmique des protéines fluorescentes rsEGFP2,

rsFolder et rsFolder2, pET15b est utilisé. Pour les exprimer au niveau du périplasme, pET26b contenant une séquence signal permettant l'adressage au périplasme est utilisé. Tandis que pour l'expression des protéines membranaires, deux variants du pET3a, pGOmp-Pst1 et pGOmp-Pst2, sont utilisés. Ils permettent l'expression d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 respectivement. Ils ont été fournis par le professeur Mathias Wintherhalter de l'université Jacobs de Brèmes.

2.2. La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est utilisée pour la production du mutant (1) rsFolder2 : rsFolder F146Y et les différents mutants de porines Omp-Pst1 et Omp-Pst2, viz. (2) Omp-Pst1-N293G, (3) Omp-Pst1-D213R, (4) Omp-Pst1-D213R/N293R, (5) Omp-Pst1-K221C, (6) Omp-Pst2-N283G, (7) Omp-Pst2-G282R/N283G, (8) Omp-Pst2-G282R/N283K et (9) Omp-Pst2-K211C.

Pour tous ces mutants, le protocole utilisé est le même. Nous avons conçu un couple d'amorce d'environ une trentaine de pb contenant la mutation désirée. Les amorces ont été commandées chez Eurofins Genomics[®]. Nous avons mélangé :

- 100 nM d'amorces,
- 1 ng de notre plasmide « template »,
- 100 μ M de dNTPs,
- 1X du tampon GC enhancer (New England Biolabs[®] : NEB[®]) pour améliorer le rendement et la spécificité de l'hybridation de l'amorce au brin d'ADN,
- 1X du tampon Q5 (NEB[®]) adéquat pour l'activité de l'enzyme.
- 0,02 U/ μ L de l'enzyme ADN polymérase Q5 Hot start (NEB[®]).

Ce mélange nous a permis d'avoir l'amplification du plasmide muté par PCR de 50 cycles. Les plasmides template et muté sont purifiés à partir du produit de la PCR selon les instructions du kit de purification QIAquick PCR purification (Qiagen[®]). Pour digérer l'ADN template, nous avons ajouté au produit purifié 1 μ L de Dnpl (NEB[®]) et 1X du tampon cutsmart (NEB[®]) adéquat à l'enzyme. Le mélange a été incubé 30 minutes à 37°C suivi d'une désactivation de l'enzyme pendant 20 minutes à 80°C. 5 μ L sont ensuite utilisés pour transformer les bactéries DH5 α par choc thermique

(détaillé ci-dessous IV.3.1). Les bactéries étalées sur la boîte de LB-agar (Luria-Bertani) sont incubées sur la nuit à 37°C. Chaque clone est mis en culture sur la nuit à 37°C sous 150 rpm d'agitation dans 5 mL de LB supplémenté avec l'antibiotique adéquat. Le lendemain, chaque culture est utilisée pour purifier le plasmide exprimé par chaque clone par Miniprep selon les instructions du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen®). 2 µg du plasmide purifié sont envoyés au séquençage chez Beckman Coulter Genomics (Genewiz®). Le résultat du séquençage nous permet ainsi de sélectionner les plasmides mutés positifs.

2.3. L'assemblage par Gibson

L'assemblage de Gibson est utilisé pour le clonage des gènes (1) *rsEGFP2*, *rsFolder* et *rsFolder2* dans le plasmide pET15b et pET26b, (2) *rsEGFP2* et *rsFolder2* dans le plasmide pEF.myc.ER, (3) *DsbA* en amont de *rsFolder2* dans le plasmide pET15b, (4) *rsFolder2* en amont ou en aval d'*Omp-Pst1* et *Omp-Pst2* dans les plasmides pGOmp-Pst1 et pGOmp-Pst2 et (5) *PAmCherry* en aval d' *Omp-Pst1* et *Omp-Pst2* dans les plasmides pGOmp-Pst1 et pGOmp-Pst2. L'assemblage de Gibson nous a permis également de produire le mutant (6) *Omp-Pst1-Δ207-216/N293G*.

La première étape consistant à ajouter des sites complémentaires de part et d'autre de l'insert et du plasmide accepteur, nous avons conçu des amorces complémentaires à notre ADN template avec les sites complémentaires désirés. Les amorces commandées chez Eurofins Genomics® ont servi pour faire le mélange pour l'amplification par PCR (de façon identique à la mutagenèse). Nous avons vérifié l'amplification de l'insert et du plasmide accepteur en migrant le produit de PCR sur un gel à 1,5% d'agarose dans 0,5X du tampon TAE (Tris base, acide acétique et EDTA : Acide d'éthylène diamine tétraacétique). Les bandes positives correspondantes à notre insert et notre plasmide amplifiés sont par la suite coupées et l'ADN est purifié selon les instructions du kit QIAquick Gel extraction (Qiagen®) et dosé en utilisant le NanoDrop™ (ThermoFisher scientific). Pour l'assemblage de Gibson, ≈ 100 ng du plasmide sont mélangés à l'insert pour avoir un ratio molaire de 1:3 de plasmide : insert. La ligation se fait après ajout à 1X du mix Gibson assembly®

(NEB[®]) et l'incubation 20 – 30 minutes à 50°C. Le produit de l'assemblage est refroidi sur la glace pour servir à la transformation des bactéries DH5 α . La culture des clones, la miniprep et le séquençage sont identiques à ceux décrits pour la mutagénèse dirigée.

3. Etude de la croissance bactérienne et des biofilms

3.1. La transformation bactérienne

La transformation des bactéries DH5 α , BL21 et BL21 Δ Omp8 est faite par choc thermique. Ceci nécessite une étape préparatoire pour rendre les bactéries compétentes. A dessein, les bactéries non-compétentes sont étalées sur des boîtes de LB-agar et incubées sur la nuit à 37°C. Une colonie est ensuite mise en préculture dans 5 mL de LB sur la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 1 mL de la préculture est utilisé pour ensemençer une culture de 100 mL de LB. La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une densité optique (D.O.) à 600 nm d'environ 0,4. Les cellules sont centrifugées à 4°C pendant 15 minutes à 2000 rpm, le culot est resuspendu dans 30 mL d'un tampon RF1 glacé (30 g CH₃COOK à pH 5,8 ; 12 g RbCl ; 9,9 g MnCl₂.4H₂O ; 1,5 g CaCl₂.2H₂O ; 150 g de glycérol pour un volume final de 1L) puis le tout est incubé 15 minutes sur glace. Les bactéries sont centrifugées à nouveau et le culot est resuspendu dans 8 mL d'un tampon RF2 glacé (10 mM MOPS à pH 6,8 ; 1,2 g RbCl ; 11 g CaCl₂.2H₂O ; 150 g de glycérol pour un volume final de 1 L) et remis à incuber 15 minutes sur glace avant d'être aliquoté en 50 μ L. Les aliquots sont congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

Pour la transformation par choc thermique, 2 μ L ou 5 μ L du plasmide sont ajoutés à un aliquot de 50 μ L de bactéries compétentes. Le mélange est incubé 30 minutes sur la glace afin que l'ADN plasmidique s'accroche aux bactéries, puis 45 secondes à 42°C pour fragiliser la membrane bactérienne et 2 minutes sur la glace permettant l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la bactérie. 500 μ L d'un milieu de culture riche stérile SOC (Super Optimal Broth ; 20 g de tryptone ; 5g d'extrait de levure ; 5 g NaCl ; 1,86 g KCl ; 50 mL de glucose à 1M pour un volume final de 1 L) est ajouté

aux bactéries qui seront incubées sous agitation à 37°C pendant une heure pour leur permettre de commencer leur croissance. Les bactéries sont étalées sur une boîte de LB-agar supplémentée de l'antibiotique de sélection et incubées sur la nuit à 37°C pour avoir des colonies exprimant la protéine d'intérêt.

3.2. Le suivi de la courbe de croissance

Toutes les cultures bactériennes réalisées durant cette thèse ont été faites à partir de colonies fraîchement étalées. La veille de l'expérience, *E. coli*, *P. stuartii*, $\Delta P2$ ainsi que tous les bactéries BL21 Δ Omp8 transformées sont étalées sur des boîtes de LB agar supplémentées avec l' (es) antibiotique(s) convenable(s) à 37°C sur la nuit. Une colonie de chaque lignée est mise en culture dans 5 mL du milieu LB standard ou à un pH précis pendant 1 – 2h à 37°C permettant ainsi de resuspendre les bactéries en les gardant dans la phase de latence de leur croissance. La culture bactérienne est ensuite distribuée sur des plaques de 96 puits (135 μ L/puits) supplémentés avec 15 μ L des solutions à 10X d'urée (0 M – 10 M), de CaCl₂ (0 M – 0,5 M), de MgCl₂ (0 M – 0,5 M). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous 100 rpm d'agitation dans un lecteur de plaque (Biotek Synergy H4) et la D.O. est suivi à 600 nm toutes les 10 minutes pendant 24h.

3.3. L'effet des facteurs environnementaux sur les biofilms

La courbe de croissance des bactéries peut être divisée classiquement en trois phases : (1) la phase de latence, (2) la phase exponentielle et (3) la phase stationnaire. Pendant cette dernière, les bactéries capables de former des biofilms adhèrent à la surface pour (4) former des communautés bactériennes adhérentes qui peut être envisagée comme phase de croissance supplémentaire aux trois dernières (Figure IV.1). L'effet des facteurs environnementaux a été étudié sur la croissance (comme décrit ci-dessus IV.3.2) mais aussi sur la genèse de biofilm (à partir des bactéries en phases de latence), l'adhésion des bactéries à la surface (après la phase stationnaire) et la perturbation des biofilms déjà développés (24h après l'adhésion à la surface) en les ajoutant aux différentes phases de croissance.

Pour étudier l'effet de l'urée, du calcium ou du magnésium, une colonie bactérienne est mise en culture dans du milieu LB standard à 37°C sous agitation pendant : 2h pour que les bactéries restent en phase de latence ou sur la nuit pour qu'elles arrivent à la phase stationnaire de leur croissance sans former des biofilms du fait de l'absence d'un support stable. La culture est ensuite distribuée sur des plaques 96 puits supplémentés avec du facteur stressant comme décrit ci-dessus.

Pour étudier l'effet du pH, une colonie bactérienne est mise en culture dans du milieu LB standard à 37°C, mis sous agitation pendant 2h pour resuspendre les bactéries puis diluée 10 fois dans un milieu LB à un pH spécifique tamponné avec du CH₃COONa (pH 4 et 5), du MES (pH 6), du Tris HCl (pH 7 et 8) ou du CHES (pH 9). Les bactéries sont incubées pour 2h ou sur la nuit puis distribuées sur des plaques de 96 puits et incubées à 37°C sous 100 rpm agitation sur la nuit.

Pour étudier l'effet de ces facteurs sur les biofilms établis, une colonie bactérienne est mise en culture dans du milieu LB standard à 37°C sous agitation pendant 2h. La culture est distribuée sur des plaques 96 puits et incubée à 37°C sous agitation sur la nuit. Le lendemain, les bactéries planctoniques sont éliminées et un milieu LB frais supplémenté d'urée, de calcium, de magnésium ou tamponné à un pH précis est ajouté aux bactéries adhérentes (et donc formant déjà un biofilm). La plaque est incubée à 37°C sous agitation sur une nuit supplémentaire (Figure IV.1).

Les biofilms formés sur les différentes plaques sont quantifiés en utilisant le PrestoBlue[®] (ThermoFisher scientific), un marqueur de viabilité cellulaire. Les plaques sont donc extensivement lavées avec un tampon phosphaste salin (PBS : Phosphate buffered saline) pour écarter toutes les bactéries planctoniques. Seules les bactéries adhérentes formant les biofilms restent dans les puits. 100 µL d'une solution de PrestoBlue[®] sont ajoutés à chaque puits et laissés à incuber pendant 20 minutes à température ambiante. La fluorescence est ensuite mesurée à $\lambda_{ex} = 560$ nm et $\lambda_{em} = 590$ nm et la formation de biofilms quantifiée en comparant ces mesures à celles des puits contrôles.

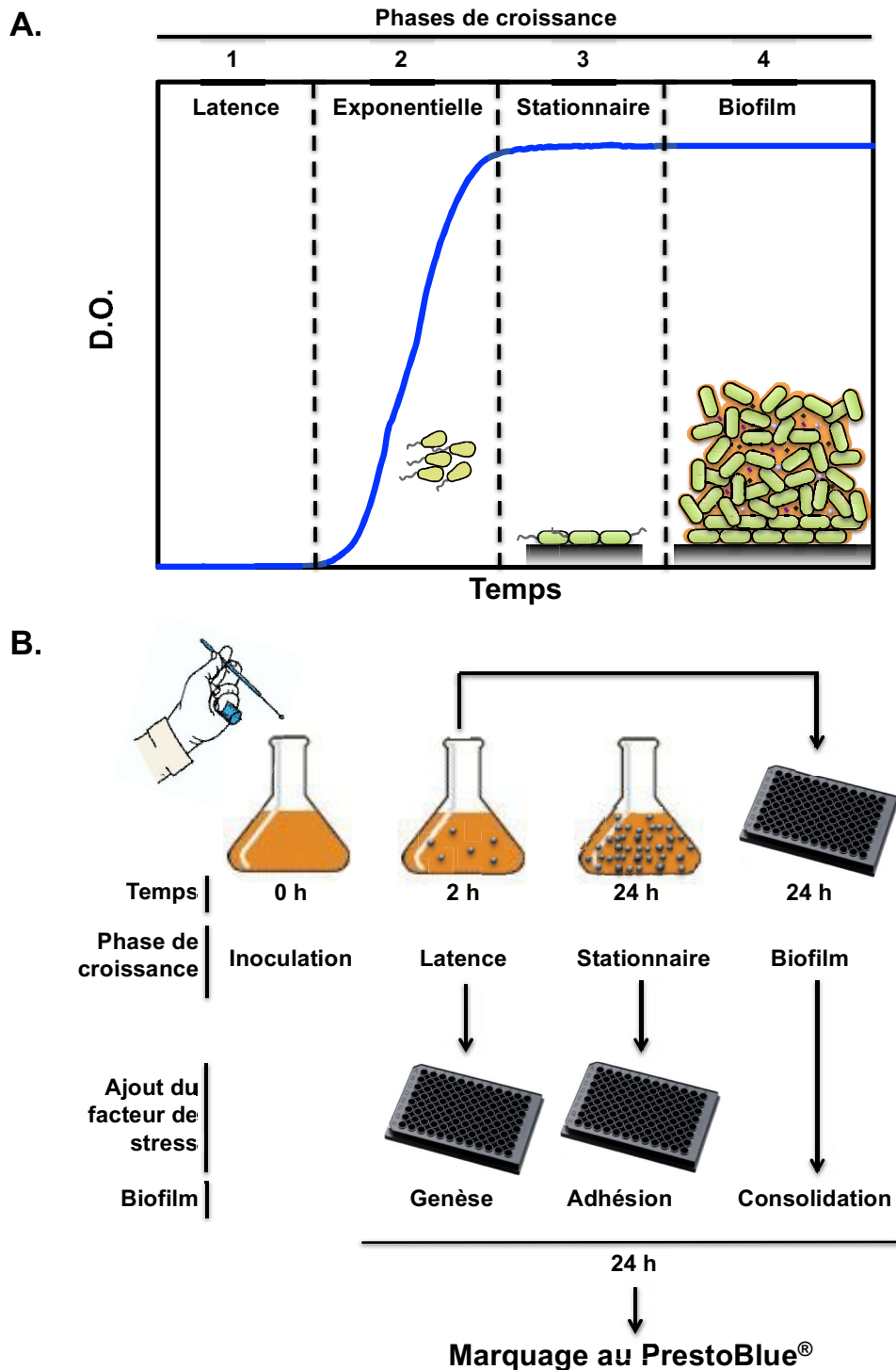


Figure IV.1. Protocole d'étude des biofilms. (A) Courbe de croissance normale des bactéries avec les quatre phases : (1) la phase de latence, (2) la phase exponentielle pendant laquelle les bactéries se divisent en restant planctoniques, (3) la phase stationnaire à partir de laquelle les bactéries peuvent s'adhérer aux surfaces et (4) la phase de formation de biofilm mature. (B) Illustration du protocole expérimental permettant la quantification des biofilms. Les bactéries sont mises en culture pour arriver aux différentes phases de croissance avant que le facteur de stress soit ajouté. Après une incubation 24 h, les plaques sont lavées et les bactéries adhérentes et vivantes sont marquées avec du PrestoBlue®.

3.4. L'imagerie des bactéries

Les bactéries, dans différentes conditions, ont été mises en culture dans des plaques 96 puits comme décrits ci-dessus. Les bactéries adhérentes ainsi que les bactéries planctoniques ont été imagées par la microscopie d'épifluorescence en utilisant le microscope IX81 inversé d'Olympus (Plateforme M4D – IBS) après marquage des bactéries vivantes avec 5 μM du Syto[®] 9 Green (Thermo Fisher scientific) et des bactéries mortes avec 20 μM d'iodure de propidium pendant 20 minutes.

Les bactéries planctoniques sont étalées sur des lames avec du LB-Gelzan[™] et préparées selon le protocole décrit par De Jong et al. en 2011¹⁴². Brièvement, 8 g/L de Gelzan[®] sont dissous dans du milieu LB. 300 μL de LB-Gelzan[™] sont transférés au milieu d'un cadre (gene frame) placé sur la lame en verre qui sera fermée par une lamelle. Le sandwich ainsi formé est placé à 4°C pendant une heure pour polymériser, puis à 37°C pendant une heure supplémentaire pour éviter de stresser les bactéries lors de leur ajout. La lamelle est retirée, 10 μL de bactéries sont étalées et le système est refermé avec une nouvelle lamelle pour l'imagerie (Figure IV.2). Le reste des bactéries planctoniques dans les puits sont écartées par lavage avec du PBS et les bactéries adhérentes sont directement observées au fond des puits.

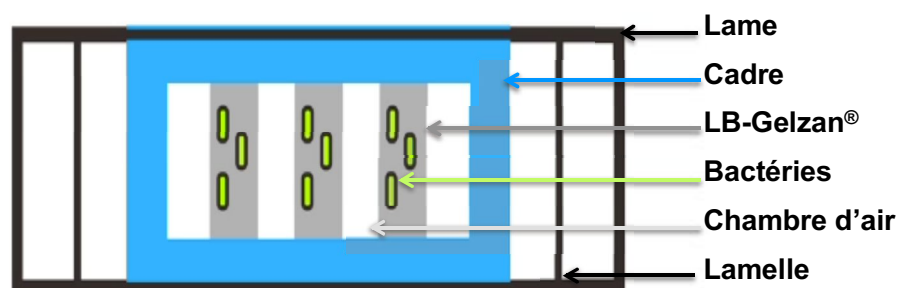


Figure IV.2. Schéma de la lame de LB-Gelzan[®]. Sur une lame en verre, un cadre adhésif est collé dans lequel 300 μL de LB-Gelzan[®] sont distribués. Le système est fermé par une lamelle et stocké à 4°C pour permettre la polymérisation du LB-Gelzan[®]. La lamelle est ensuite enlevée et des stries dans le LB-Gelzan[®] sont faites permettant d'avoir des chambres d'air pour la respiration bactérienne. Les bactéries sont finalement étalées sur les stries de LB-Gelzan[®]. Le système est fermé par une nouvelle lamelle pour l'imagerie.

4. Biochimie des protéines membranaires

4.1. L'expression et la purification des porines

La purification des porines peut être divisée en 4 étapes principales: l'expression des protéines dans les bactéries, l'extraction, la purification sur une colonne échangeuse d'anions et la purification sur une chromatographie d'exclusion stérique (SEC : Size exclusion chromatography).

Une colonie de BL21ΔOmp8 issue de la transformation par le plasmide d'intérêt est mise en préculture à 37°C sur la nuit et sous agitation dans 25 mL du milieu LB supplémenté de 50 µg/mL de kanamycine (gène de résistance pour la sélection des BL21ΔOmp8) et 100 µg/mL d'ampicilline (gène de résistance du plasmide pET3a). Le lendemain, les 25 mL de préculture sont mis en culture dans 1 L de LB supplémenté d'antibiotiques à 37°C sur la journée et sous agitation jusqu'à une D.O. (600 nm) > 1,5 sans induction. Le niveau d'expression basal du plasmide est suffisant pour la purification. En cas d'induction, la surexpression des porines cause leur mauvais repliement et leur adressage aux corps d'inclusions avec leur séquence signal non clivée. Ainsi, l'induction ne peut pas avoir d'intérêt pour la production de ces protéines.

Les bactéries sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 30 minutes à 4500 rpm et le culot est resuspendu dans 20 mL d'un tampon phosphate (20 mM à pH 7,4) supplémenté d'une pastille d'anti-protéase cOmplete™ (Roche) et de DNase. Les cellules sont lysées par plusieurs passages au microfluidizer à 14000 psi et centrifugées à 4°C pendant 45 minutes à 18000 rpm. Le surnageant contient les protéines solubles et le culot constitue la partie non soluble contenant les membranes internes et externes avec leurs protéines. Pour les séparer et extraire nos porines d'intérêt, le culot est resuspendu dans 20 mL de tampon phosphate supplémenté avec 0,3% du détergent n-Octyl-poly-oxyéthylène (OPOE) et incubé 1h pour solubiliser les protéines de la membrane interne. Une centrifugation à 4°C pendant 45 minutes à 35000 rpm permettra la récupération des protéines de membrane interne ainsi solubilisées dans le surnageant, tandis que les protéines de

la membrane externe resteront dans le culot. Pour les solubiliser, 3 à 4 cycles de solubilisation dans 20 mL de tampon phosphate supplémenté avec 3% d'OPOE suivis d'une centrifugation à 4°C pendant 45 minutes à 35000 rpm, sont nécessaires et permettant *in fine* l'extraction de la totalité des porines. La qualité de l'extraction est évaluée par gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Figure IV.3A). Brièvement, 10 µL de chaque fraction protéique sont marqués, réduits et chargés négativement par l'ajout d'un mélange bromophénol bleu – β-mercaptoéthanol – SDS – glycérol. Les fractions sont incubées 5 minutes à 90°C pour dénaturer les protéines. Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits du gel SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide submergés dans un tampon d'électrophorèse (50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 200 mM glycine ; 0,1% SDS). Après la migration des fractions sous l'application d'un courant de 200 V pendant 45 minutes, les bandes sur le gel sont révélées par coloration du gel avec le bleu de Coomassie.

Les fractions d'intérêt de la membrane externe sont chargées sur une colonne échangeuse d'anions HiTrap Q HP 5 mL (GE healthcare). Une étape de changement de détergent est nécessaire pour échanger les 3% d'OPOE contre 0,12% de LDAO (N,N-dimethyldodecylamine N-oxide) par lavage de la colonne avec 25 mL de tampon A (0,1 M MES pH 6,5 ; 25mM NaCl ; 0,12% LDAO). Cet échange est important pour permettre l'étape suivante de délipidation indispensable à la cristallisation. Cette étape de délipidation consiste en le passage de plusieurs volumes de colonne d'un tampon riche en détergent (0,1 M MES pH 6,5 ; 25 mM NaCl ; 2% LDAO) pendant 4 heures à faible débit 0,2 mL/min (comparé à 3 mL/min pour le lavage). Elle permet l'élimination des lipides entourant les porines et améliore ainsi l'homogénéité de la solution protéique purifiée. La colonne est ensuite lavée avec le tampon A et un gradient de sel est appliqué avec un tampon B (0,1 M MES pH 6,5 ; 1 M NaCl ; 0,12% LDAO). L'élution est suivie grâce au chromatogramme (notre protéine est éluée à \approx 350 mM) et vérifiée par gel SDS-PAGE (Figure IV.3B). Nos fractions d'intérêts sont concentrées à l'aide des concentrateurs Amicon Ultra 50 KDa (Merk Millipore), diluées avec un tampon C (0,1 M MES pH 6,5 ; 150 mM NaCl ; 0,12% LDAO) pour diminuer la concentration en sel puis concentrées à 7 mg/mL.

Pour la SEC, la protéine concentrée est injectée sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare) et éluée par le passage du tampon C. L'élution est

suivie grâce au chromatogramme et la pureté des fractions éluées est évaluée par gel SDS-PAGE (Figure IV.3C). La protéine purifiée est finalement concentrée à l'aide des concentrateurs à une concentration finale de 7 mg/mL et stockée à 4°C.

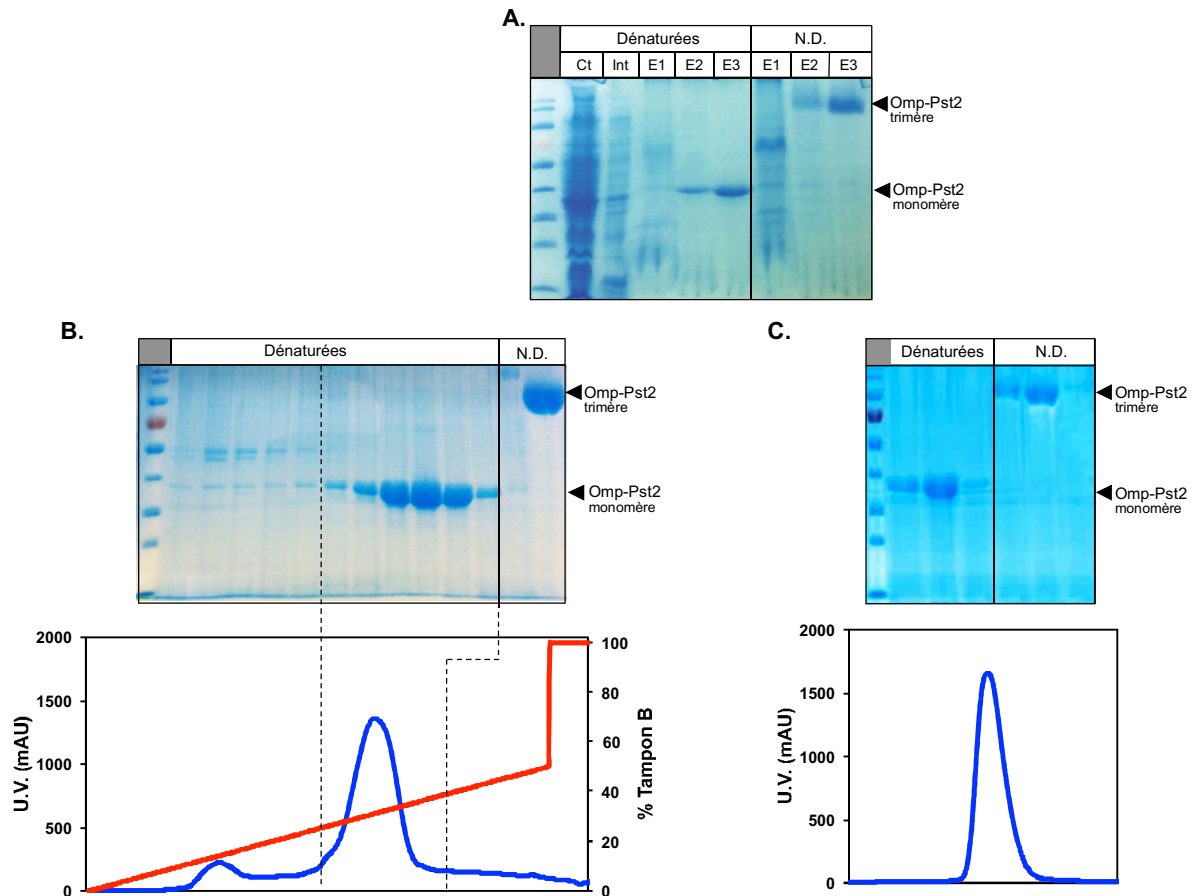


Figure IV.3. Extraction et purification de Omp-Pst2. (A) Résultat des différentes étapes d'extraction d'Omp-Pst2. Le gel montre les fractions de protéines cytoplasmiques (Ct), de la membrane interne (Int), et de la membrane externe (Ext1/2/3) dénaturées ou pas (N.D.: non dénaturées). (B) Le chromatogramme et le gel correspondant à la purification d'Omp-Pst2 sur la colonne échangeuse d'anions. (C) Le chromatogramme et le gel correspondant à la purification d'Omp-Pst2 sur la colonne SEC. Les gels nous permettent de vérifier la trimérisation de notre protéine et de sélectionner les fractions d'intérêts.

4.2. Le marquage des porines

Faute d'absence d'anticorps spécifiques à nos porines, nous avons effectué deux mutagénèses dirigées Omp-Pst1 K221C et Omp-Pst2 K211C (IV.2.2) pour substituer par une cystéine, une lysine de la boucle extracellulaire L5 structurellement

non impliquée dans la dimérisation. Cette mutation nous a permis de marquer les porines en utilisant des fluorophores Alexa Fluor[®] 488. Le marquage spécifique des cystéines a été permis par conjugaison grâce à un lien maleimide.

Le marquage a été fait en collaboration avec le Dr. Sigrid Milles (IBS – Grenoble). Brièvement, nous avons changé le tampon MES avec lequel les porines ont été purifiées contre un tampon HEPES (20 mM HEPES pH 7 ; 150 mM NaCl ; 0,12% LDAO ; 10 mM DTT). Le DTT est ensuite éliminé par dialyse. Le fluorophore est incubé avec la porine pendant 2h à température ambiante (ou sur la nuit à 4°C). La réaction est arrêtée par l'ajout de 10 mM de DTT. Une SEC avec le tampon HEPES sans DTT sert en dernière étape à la purification de la protéine marquée.

4.3. La formation des liposomes

Les LUV sont préparés selon le protocole décrit ci-dessous (III.2.1). Le mélange des lipides est formé de 10 mg de L- α -phosphatidylcholine (EggPC) et 0,1 mg de 1,2-dioléoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rhod PE) (Avanti polars lipids). Suite à l'évaporation du chloroforme sous un flux d'azote gazeux pendant 2h, la flasque est gardée sous vide pendant la nuit et le lendemain le film lipidique est ré-hydraté dans 2 mL de tampon phosphate à pH 4 – 8 (selon l'expérience envisagée) supplémenté de 150 mM NaCl. Pour obtenir des ULV, 10 cycles de congélation dans l'azote liquide et décongélation dans un bain-marie à 40°C sont effectués. Les liposomes sont ensuite dilués à une concentration finale de 1,25 mg/mL dans le tampon phosphate. Ce mélange peut être conservé à -80°C. Pour obtenir des LUV, 1 mL de la solution stock de liposomes est extrudé 30 fois à travers une membrane de polycarbonate dans un mini-extruder (Avanti polars lipids) (Figure IV.4). Les LUV sont stables pour une semaine à 4°C. Les porines sont ajoutées aux LUV au moment de l'expérience de DLS.

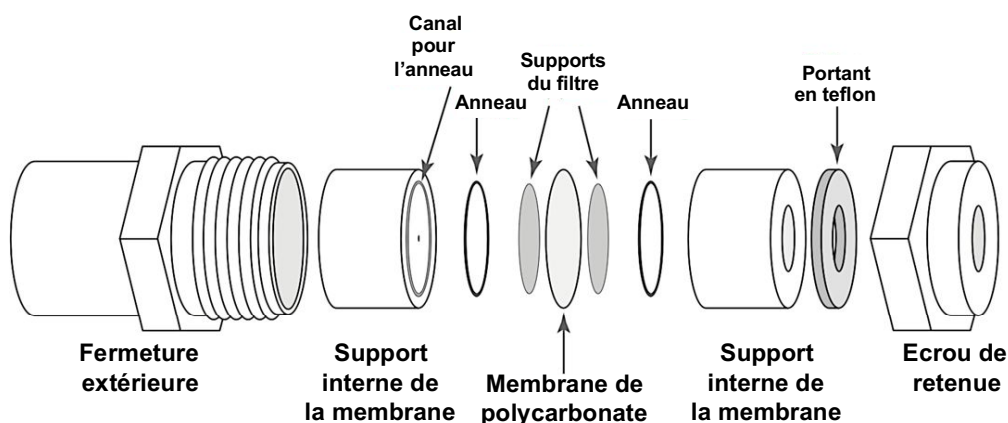


Figure IV.4. Les différents composants du mini-extruder. La figure est adaptée du site d' « Avantis polars lipids ».

4.4. La DLS

La DLS (Platform PAOL – IBS) a été utilisée essentiellement pour deux objectifs : (1) vérifier la qualité des porines purifiées et l'absence d'agrégaions et (2) étudier l'effet de l'ajout des porines aux LUV.

Pour les porines seules, 50 μL de la solution de protéines purifiées sont placés dans une cuvette et le R_h est mesuré. Si ce rayon est supérieur à 10 nm, nous considérons que les porines agrègent et que donc, le batch n'est pas d'une qualité suffisante pour la suite des expériences. En absence d'agrégaions, le R_h varie entre 3 nm et 6 nm. Dans ce cas, l'effet de ces porines sur les LUV peut être étudié. Pour cela, le R_h des LUV est mesuré avant et après l'ajout des porines à différentes concentrations. En pratique, 50 μL de LUV sont placés dans la cuvette et le R_h est mesuré : il varie entre 50 et 70 nm. 10 μL de porines à différentes concentrations variant de 0,16 à 6,4 μM sont ajoutés aux LUV pour des concentrations finales de 0,02 μM – 1,28 μM de porines, puis le R_h est mesuré. Nous considérons que les LUV agrègent si le R_h est supérieur à 200 nm (au moins 4 liposomes).

5. Études des protéines fluorescentes

5.1. L'expression et la purification des FPs

La purification des protéines rsFolder, rsFolder2, rsEGFP2 et Super-Folder-GFP peut être divisée en 4 étapes principales : l'expression des protéines dans les bactéries, l'extraction, la purification sur une colonne d'affinité et la purification sur une SEC.

Une colonie de BL21 issue de la transformation par le plasmide d'intérêt (Figure IV.6A) est mise en culture à 37°C sur deux nuits et sous agitation dans 1 L d'un milieu de culture autoinductible AI (930 mL d'une solution ZY stérile: 10 g de tryptone et 5 g d'extrait de levure + 50 mL d'une solution NPS stérile: 66 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 136 g KH_2PO_4 et 142 g K_2HPO_4 dans un volume de 1L + 20 mL d'une solution 50-52 stérilisée par filtration: 25 g glycérol ; 25 g glucose et 100 g de lactose dans un volume de 1 L + 1 mL MgSO_4 stérile à 1M) supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline ou de 50 µg/mL kanamycine.

Les bactéries sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 30 minutes à 4500 rpm et le culot (Figure IV.5B) est resuspendu dans 50 mL d'un tampon HEPES (50 mM HEPES pH7 ; 300 mM NaCl) supplémenté d'une pastille d'anti-protéase cOmplete™ (Roche) et de la DNase. Les cellules sont ensuite lysées par plusieurs passages au microfluidizer à 14000 psi et centrifugées à 4°C pendant 45 minutes à 18000 rpm. Le surnageant contenant les protéines solubles dont nos protéines, est récupéré et chargé sur une colonne de résine couplée au nickel. Contrairement aux protéines cytoplasmiques de la bactérie, nos FPs possèdent une étiquette de six histidines au niveau de leur N-terminal leur permettant de s'accrocher au nickel par affinité réversible par l'ajout d'imidazole. Plusieurs lavages sont effectués avec le tampon HEPES supplémenté de concentrations croissantes d'imidazole (0 mM, 25 mM puis 50 mM) pour éliminer les protéines non accrochées ou accrochées de manière non spécifique à la résine. Notre protéine est ensuite éluée par l'ajout du tampon HEPES supplémenté de 150 mM d'imidazole. La qualité de l'extraction et de la purification d'affinité est évaluée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure IV.5C). Une étape

de dialyse sur la nuit dans 5L de tampon HEPES est nécessaire pour éliminer l'imidazole des fractions d'intérêt. Notre protéine de 27 KDa est ensuite concentrée à l'aide des concentrateurs Amicon Ultra 10KDa (Merk Millipore).

Pour la SEC, la protéine concentrée est injectée sur une colonne HiLoad 16/600 Superdex 75 (GE healthcare) et éluée par le passage d'un tampon HEPES sans sel (condition optimale pour la cristallisation). L'élution est suivie grâce au chromatogramme et la qualité et la pureté des fractions éluées sont évaluées par gel SDS-PAGE (Figure IV.5D). La protéine purifiée est finalement concentrée à l'aide des concentrateurs Amicon à une concentration finale de 20 mg/mL et stockée à 4°C.

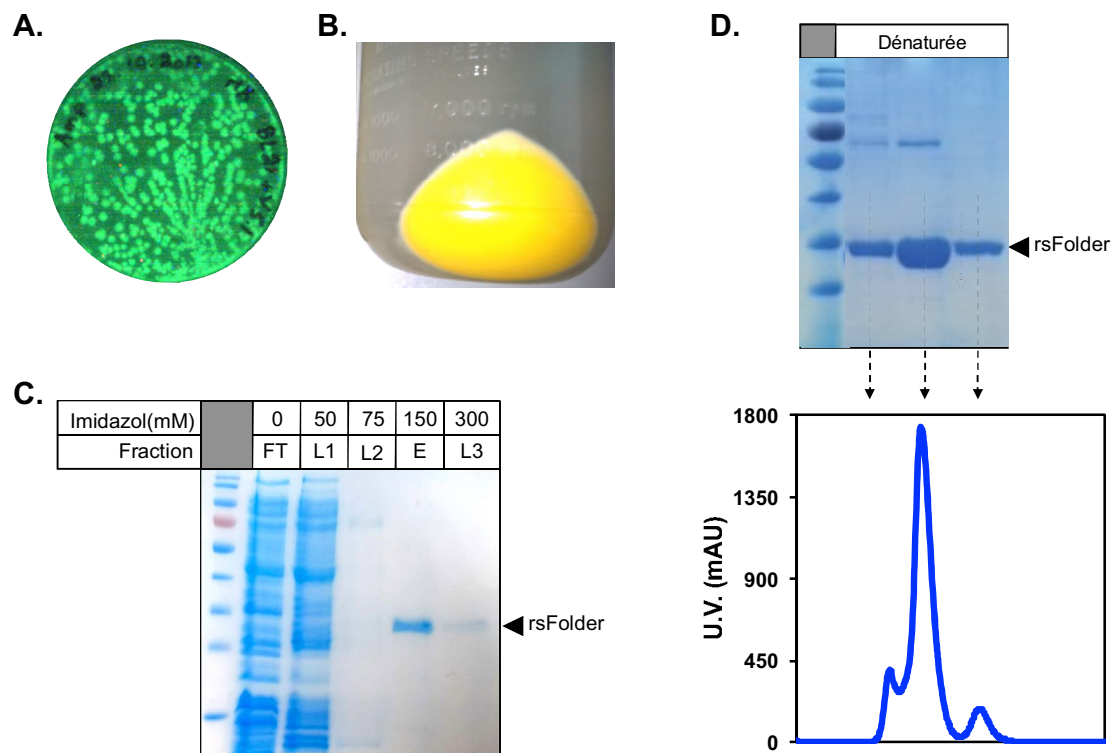


Figure IV.5. Extraction et purification de rsFolder. (A) Les colonies de BL21 exprimant rsFolder observées après excitation avec une lumière bleue. (B) Culot des BL21 exprimant rsFolder issu d'une culture de 1L. (C) Le gel montre les fractions de protéines issues de la purification sur la colonne de Nickel : le filtrat (FT), les lavages à l'imidazole avant (L1 et L2) et après (L3) l'élution (E). (C) Le chromatogramme et le gel correspondant à la purification de rsFolder sur la colonne SEC. Le chromatogramme montre trois pics. Le premier correspond à la protéine rsFolder avec quelques impuretés, le deuxième et le troisième correspondent à la protéine rsFolder monomérique et dimérique. Cette dimérisation est un artefact de la concentration locale élevée.

5.2. La caractérisation photophysique

Le spectre d'absorbance des différentes FPs est mesuré en utilisant un spectrophotomètre (Jasco V-630 UV/VIS). Les spectres d'excitation (450 – 520 nm) à $\lambda_{em}= 540$ nm et d'émission (500 – 650 nm) à $\lambda_{ex}= 480$ nm (Figure IV.6A) de la protéine diluée à une D.O. < 0,1 sont mesurés en utilisant un lecteur de plaque (Biotek Synergy H4).

Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) a été déterminé en utilisant la méthode de Ward¹⁴³. Brièvement, différents spectres d'absorbance de chaque FP sont mesurés en ajoutant progressivement 250 mM de NaOH par des pas de 2 μ L jusqu'à la dénaturation de la protéine, identifiable par un pic d'absorption à 440 nm (Figure IV.6B) dont le coefficient d'extinction molaire est égal à 44 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Les coefficients d'extinction molaires anioniques et à pH 7 sont calculés à partir du pic des spectres d'absorbance correspondants normalisés par rapport à 44 000 $M^{-1}.cm^{-1}$.

Le rendement quantique (ϕ) a été déterminé selon le protocole décrit par Williams *et al.*¹⁴⁴. Plusieurs dilutions de solution de FPs et de fluorescéine (fluorophore référence) sont préparées. La mesure des spectres d'absorbance et d'émission à $\lambda_{ex}= 460$ nm pour chacune de ces dilutions nous permet de tracer la variation de la fluorescence en fonction de l'absorbance (Figure IV.6C). La comparaison des pentes des droites par rapport à la fluorescéine permet de calculer le rendement quantique de nos FPs.

Le pKa a été déterminé par la mesure des spectres d'absorbance des FPs diluées à différents pH dans différents tampons : Acide citrique (pH 3,5), Acétate de sodium (pH 4,0 – 5,0), MES (pH 5,5 – 6,5), HEPES (pH 7,0 – 8,5) et CHES (pH 9,0 – 9,5). La variation de l'absorbance intégrée en fonction du pH est ajustée par une fonction de Henderson-Hasselbalch (courbe sigmoïdale) (Figure IV.6D) ce qui permet de déterminer le pKa.

La stabilité thermique de l'état OFF est mesurée après commutation des RSFPs de l'état ON à l'état OFF. Le retour thermique a été suivi par mesure des spectres d'absorbance toutes les 10 minutes pendant 5 jours.

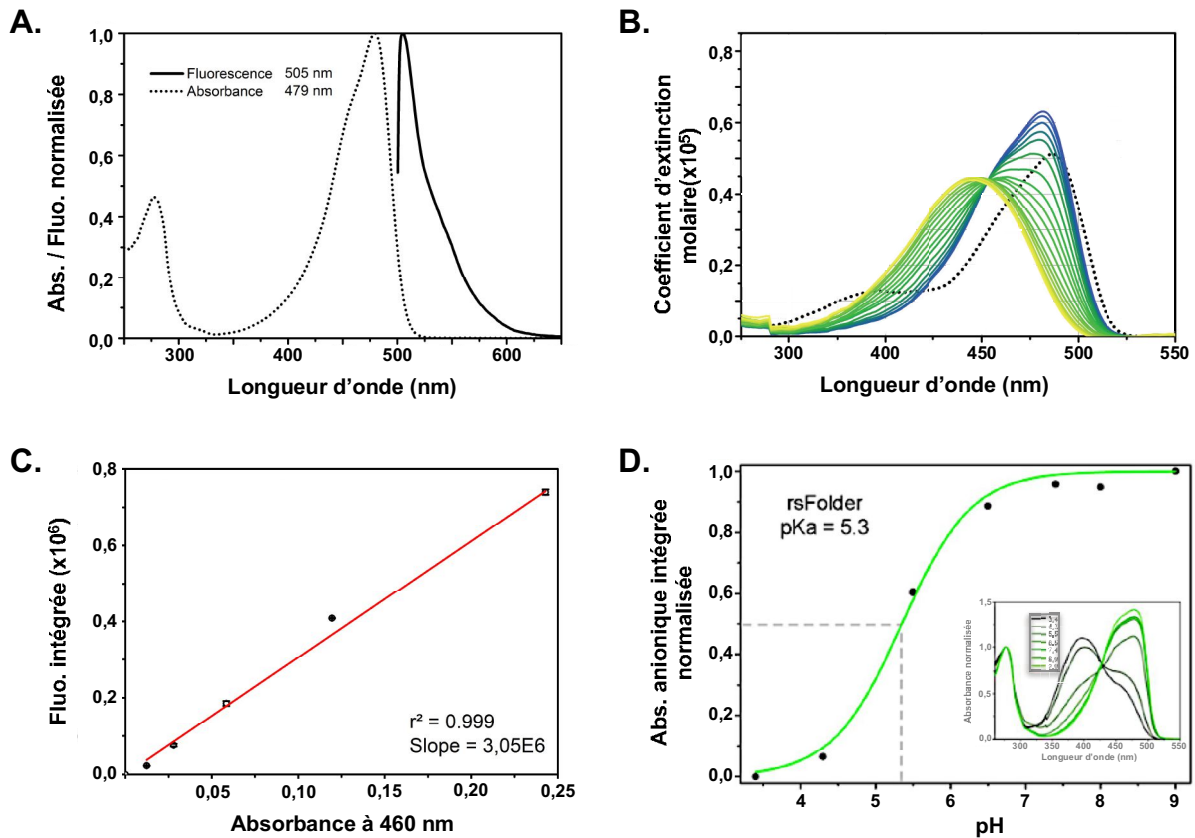


Figure IV.6. Caractérisation photophysique de rsFolder. (A) Spectre d'absorbance et d'émission de rsFolder. (B) Spectres d'absorbance de rsFolder après ajouts successifs de 250 mM NaOH normalisés par rapport à $44\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ le coefficient d'extinction molaire à 440 nm de la protéine dénaturée. (C) La variation de fluorescence de rsFolder en fonction de l'absorbance à 460 nm en effectuant plusieurs dilutions. En comparant la pente de cette courbe à celle de la protéine référence fluorescéine, nous pouvons calculer le rendement quantique de notre protéine. (D) Les spectres d'absorbance de rsFolder à différents pH (vignette) permettant de tracer la variation de l'intégral de l'absorbance anionique en fonction du pH pour le calcul du pKa. Abs : absorbance, Fluo : Fluorescence.

5.3. La caractérisation biochimique

La cinétique de renaturation a été étudiée après dénaturation des FPs au chlorure de guanidinium (GuHCl). Brièvement, 6 M de GuCl sont ajoutés à 10 µg de FPs en présence d'1 mM de DTT. Le mélange est incubé 10 minutes à 65°C pour dénaturer les FPs. La réaction est arrêtée par une dilution du mélange 10 fois avec le tampon de renaturation (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 35 mM KCl ; 2 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT ; 30% glycerol). La renaturation est suivie par mesure du retour de fluorescence toutes les minutes pendant 20 minutes.

La cinétique de maturation du chromophore a été mesurée selon un protocole adapté de Moore *et al.*¹⁴⁵. Les bactéries exprimant les différentes FPs sont mises en culture dans 50 mL de LB jusqu'à une D.O. de 0,6. 1 mM d'IPTG est ainsi ajouté et les 50 mL sont transvasés dans un falcon de 50 mL et incubés sur la nuit sous agitation à température ambiante ce qui induira l'expression des FPs mais empêchera la maturation du chromophore à cause de l'absence d'oxygène. Le lendemain, à 4°C, la culture est centrifugée, le culot est resuspendu dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1 pastille d'anti-protéase et de la DNaseI) et les bactéries sont lysées par sonication. Après centrifugation pendant 30 minutes à 18000 rpm, 200 µL du tampon de ré-oxygénation (50 mM Tris-HCl pH7,5 ; 35 mM KCl ; 2 mM MgCl₂,) sont ajoutés à 50 µL du surnageant contenant les FPs non-matures. La maturation est suivie par mesure de la fluorescence toutes les 10 minutes pendant 8h.

La cytotoxicité cellulaire a été évaluée par le suivi de l'effet de l'expression des FPs sur la croissance bactérienne. Brièvement, une colonie de bactéries exprimant les RSFPs dans le cytoplasme ou le périplasme bactérien est resuspendue dans 5 mL de milieu AI et distribuée dans une plaque stérile de 96 puits mise sous agitation à 25°C sur la nuit dans un lecteur de plaque. La croissance des bactéries et l'expression des protéines sont suivies par mesure de la D.O. à 600 nm et de la fluorescence (λ_{ex} = 480 nm et λ_{em} = 505 nm) respectivement toutes les 10 minutes pendant 24h.

6. Cristallographie aux rayons X

6.1. La cristallisation

Pour la cristallisation de rsFolder, la méthode de la diffusion de vapeur en goutte suspendue a été utilisée. Un criblage manuel est réalisé en faisant varier le pH de la solution de cristallisation ainsi que la concentration de protéine, du sel et des différents agents de précipitation testés. 1 mL de la solution de cristallisation est déposé dans le réservoir de chacun des 24 puits de notre plaque de cristallisation. Sur une lame en verre, 1 μ L de notre protéine purifiée est mélangé avec 1 μ L de la solution de cristallisation du puits correspondant. Cette lame est ensuite retournée et servira pour assurer une fermeture hermétique du puits. Les cristaux de rsFolder commencent à pousser après 48h à 20°C et atteignent leur taille maximale après une semaine. Les meilleurs cristaux sont obtenus à une concentration de 10 mg/mL de rsFolder avec la solution de précipitation contenant: 0,1 M Tris pH 8,5 et 20% PEG 3350. Les cristaux sont par la suite pêchés, submergés dans une solution de cryoprotection (85% de la solution de précipitation et 15% de glycérol), repêchés, et congelés dans l'azote liquide jusqu'à être testés au synchrotron. Pour obtenir la structure de la protéine dans son état OFF, les cristaux dans la solution de cryoprotection sont soumis à un laser 488 nm (illumination pendant quelques secondes via une fibre optique) pour commuter les protéines avant d'être repêchés, congelés dans l'azote liquide et testés au synchrotron.

Pour la cristallisation des différents mutants de porines, la méthode de la diffusion de vapeur en goutte assise a été utilisée. Un criblage au robot (Platform de cristallisation à haut débit, HTX laboratory – ESRF) ainsi qu'un criblage manuel sont réalisés. Pour le criblage au robot, 6 trousse de criblage sont testées : (1) Classic Suite and (2) PEGs-I from Qiagen/Nextal, (3) JCSG+ and (4) PACT premier from Molecular dimensions, (5) Salt Grid from Hampton research and (6) Wizard I&II from Rigaku reagents. Plusieurs cristaux sont obtenus après 35 jours à 4°C pour les différentes porines. En parallèle, nous avons effectué un criblage manuel en optimisant les conditions du criblage au robot ayant donnés des cristaux ainsi que les conditions de cristallisation de Omp-Pst1 (13% PEG 6000, 0,1 M MgCl₂, 0,1 M MES

pH6,5) et Omp-Pst2 (11% PEG 6000, 1 M LiCl, 0,1 M Tris pH8) ayant servis pour la résolution de leurs structures respectives. Cette optimisation consistait surtout sur la variation de la concentration en sel et en agent précipitant. Les cristaux obtenus sont pêchés, cryoprotégés, repêchés puis congelés dans l'azote liquide pour être testés au synchrotron.

6.2. La collecte et le traitement des données

Les cristaux de rsFolder dans leur état ON et OFF ainsi que ceux des porines ont été testés à la ligne ID29¹⁴⁶ de l'ESRF équipée d'un détecteur PILATUS 6M. Les cristaux de rsFolder ont diffractés à une résolution 1,5 – 3,5 Å. Des données de diffraction ont été collectées à partir des meilleurs cristaux avec une oscillation de 1° par image. Malheureusement, ce n'était pas le cas des cristaux de porines. Les meilleurs cristaux issus du criblage au robot ont diffractés à 10 Å. Parmi les cristaux issus du criblage manuel, un seul cristal correspondant à la porine mutée Omp-Pst1.2 (25% PEG 600, 0,2 M NaCl, 0,1 M MES pH 6,5) a diffracté à 3,2 Å et les données sont collectées comme pour les cristaux de rsFolder.

Les données collectées ont été indexées et intégrées en utilisant XDS puis mises à l'échelle en utilisant XSCALE. XDSCONV¹⁴⁷ nous a permis de générer les facteurs de structures et d'obtenir des données sous un format .mtz permettant le phasage par remplacement moléculaire à l'aide du programme PHASER¹⁴⁸. Les structures de rsFolder et Omp-Pst1.2 ont été phasées en utilisant la structure de la protéine Superfolder-GFP et Omp-Pst1 comme modèle de départ, respectivement. La re-construction des protéines dans l'espace réel est réalisée en utilisant Coot¹⁴⁹ et l'affinement dans l'espace réciproque est réalisée grâce à REFMAC¹⁵⁰ et PHENIX¹⁵¹.

7. Imagerie

7.1. La microscopie d'épifluorescence

La microscopie d'épifluorescence a été utilisée pour faire l'imagerie d'ensemble en utilisant le microscope IX81 inversé d'Olympus (Plateforme M4D – IBS). Nous avons imagé les liposomes avec ou sans l'ajout des différentes porines (marquées à la maleimide ou pas). Nous l'avons également utilisé pour l'imagerie des bactéries planctoniques et les bactéries adhérentes lors de la formation de biofilms (détaillée ci-dessus IV.3.4) ainsi que pour l'imagerie des membranes et du périplasme bactérien.

Pour l'imagerie des liposomes, 2 μL des différentes solutions de liposomes qui ont servi pour les mesures de DLS (détaillée ci-dessus IV.4.4) sont déposés sur des lames fonctionnalisées avec 2% d'agarose. Une lamelle est déposée au-dessus pour les imager au microscope.

Pour l'imagerie des membranes, les différentes souches de bactéries sont mises en culture dans 5 mL de LB pendant 2h à 37°C. Les membranes sont marquées avec 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FM1-43X (Thermo Fisher scientific) et le cytoplasme occupé par l'ADN bactérien avec 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ du Hoescht. Pour le suivi de la formation d'un biofilm bidimensionnel (2D), 2 μL de la culture sont étalés sur les lames LB – Gelzan[®] qui sont incubées à 37°C pendant 1 semaine et imagées après 2h, 6h, 24h, 48h et une semaine. Pour le suivi de la formation d'un biofilm 3D, 100 μL de la culture ont été placés dans des plaques de 96 puits sous agitation à 37°C. Les plaques sont imagées après 2h, 6h et 24h. A ce stade, le biofilm 3D était tellement développé qu'on ne pouvait plus distinguer les membranes. Plusieurs lavages extensifs des puits avec du PBS ont permis d'éliminer les multiples couches de bactéries et d'imager dans certains d'entre eux, la monocouche de cellules la plus adhérente et ayant présumablement servi à l'attachement initial du biofilm.

Pour l'imagerie du périplasme, les bactéries exprimant rsEGFP2, rsFolder et rsFolder2 adressées au périplasme par addition d'une séquence signal ou par

étiquetage avec la protéine périplasmique DsbA sont mises en culture pendant une nuit à 20°C dans 5 mL du milieu TB (Terrific broth : 900 mL d'une solution A stérile: 12 g de tryptone ; 24 g d'extrait de levure ; 4 mL glycérol + 100 mL d'une solution B stérilisée par filtration: 0,17 M KH_2PO_4 ; 0,72 M K_2HPO_4 + 1 mL d'une solution de MgSO_4 stérile à 1M). Ce milieu permet d'avoir des bactéries de plus grande taille pour mieux voir et distinguer le périplasme. Le lendemain, la culture bactérienne est centrifugée et le culot est lavé deux fois avec du PBS. Les bactéries sont ensuite fixées en les incubant 1h à température ambiante avec 4% de paraformaldéhyde (PFA). Après lavage avec du PBS, les bactéries sont déposées sur une lame fonctionnalisée pendant 1h avec une solution de chitosane 1X (50X : 15mg de chitosane dans une solution de 5% d'acide acétique). Après 1h de dépôt des bactéries, la lame est lavée avec du PBS pour éliminer toutes les bactéries non fixées, montée avec une lamelle, soudée avec du Valap (1V de lanoline ; 1V de paraffine ; 1V de vaseline) et observée au microscope.

7.2. La microscopie confocale

L'imagerie confocale a été réalisée avec un microscope IX81 inversé d'Olympus équipé d'un disque de Nipkow (Spinning disk) permettant le balayage du champ observé (Plateforme M4D – IBS). Cette microscopie a été utilisée pour faire l'imagerie des cellules mammifères HELA dont le réticulum endoplasmique est marqué avec rsFolder2 ou rsEGFP2 et des bactéries exprimant la protéine chimère DsbA – rsFolder2 dans le périplasme. Pour ces dernières, les lames permettant leur imagerie, sont préparées comme décrit ci-dessus.

Pour imager les cellules HELA, elles sont mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 90%. Elles sont ensuite comptées, diluées dans un milieu DMEM enrichi et déposées dans les puits NuncTM Lab-TekTM (Thermo Fisher Scientific) en quantité suffisante pour avoir, *in fine*, environ 40000 cellules par puits. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pour atteindre 70% de confluence (\approx 48h). Un mélange de transfection formé du plasmide pEF.myc.ER + rsFolder2 ou pEF.myc.ER + rsEGFP2 (1 mg dans 50 μL d'Opti-MEMTM) et de lipofectamineTM (3 μL dans 50 μL

d'Opti-MEM™) est préparé et incubé pendant 30 minutes. Les puits avec les cellules à confluence sont lavés avec du PBS, ré-incubés 24h avec 250 μL d'Opti-MEM™ supplémentés de 25 μL du mélange de transfection et observés au microscope.

7.3. La microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission a été réalisée avec un microscope FEI Tecnai12 120kV LaB6 avec caméra GATAN Orius 1000 (Plateforme EM – IBS) en collaboration avec Daphna Fenel et Guy Schohen. Cette technique a été utilisée pendant ma thèse pour l'imagerie des biofilms 2D.

Les bactéries sont mises en pré-culture sur la nuit et diluées le lendemain à une D.O. de 0,2. 20 μL de cette culture sont ensuite déposés sur une boîte de LB-agar pendant 1h à 37°C. Une grille de microscopie électronique couverte d'un côté avec une couche de carbone et de l'autre avec une couche de formvar est déposée au dessus de la goutte de culture (Figure IV.7). La boîte est incubée pendant 4h supplémentaire à 37°C pour permettre le développement du biofilm. La grille est ensuite lavée avec du PBS, incubée 30 secondes avec 30% de Silicotungastate de sodium (SST) pour la coloration négative et observée au microscope.

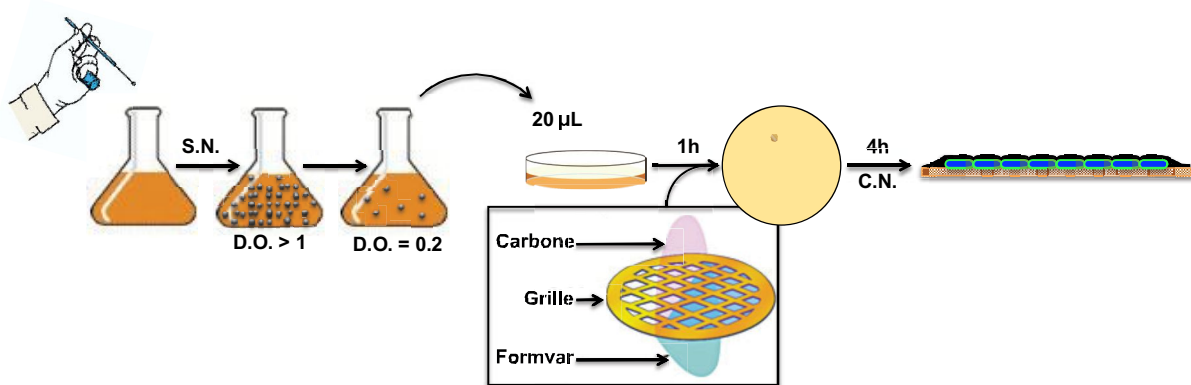


Figure IV.7. Représentation schématique de la préparation de la grille pour la TEM. Une colonie bactérienne est mise en pré-culture en milieu LB sur la nuit à 37°C. Le lendemain, cette pré-culture est diluée à une D.O.=0,2. 20 μL de la culture sont déposés sur une boîte de LB-agar incubée une heure à 37°C pour que la goutte de culture sèche. Une grille de ME, recouverte de part et d'autre d'une couche de carbone et de formvar, est déposée sur le LB-agar et incubée 4h supplémentaire permettant le développement des bactéries sur la grille. La grille est ensuite marquée par la coloration négative avec du 30% SST.

7.4. La microscopie de super-résolution

La microscopie de super-résolution a été utilisée pour imager le périplasma bactérien (par RESOLFT) et les porines à l'échelle de la bactérie unique (par PALM).

L'imagerie par RESOLFT a été réalisée en collaboration avec Tim Grotjohann et Stefan Jakobs de l'institut Max Plank de Göttingen (Allemagne) en utilisant un microscope Quad P (Instrument Abberior). Les bactéries exprimant rsFolder2 adressée au périplasma par une séquence signal ont été mises en pré-culture pendant une nuit à 20°C dans 5 mL du milieu TB. Le lendemain, la pré-culture bactérienne est diluée, remise en culture jusqu'à D.O. 0,6 et induite avec de l'IPTG pendant 6h à 20°C. Les bactéries sont ensuite déposées sur une lame préalablement fonctionnalisée avec une couche de 2% d'agarose déshydraté sur la nuit. L'acquisition d'images a été réalisée par la superposition d'un faisceau d'excitation focalisé à $\lambda = 405$ nm (permettant de commuter les protéines rsFolder2 à leur état ON) et d'un deuxième faisceau annulaire à $\lambda = 488$ nm (permettant de commuter des molécules rsFolder2 à la périphérie à leur état OFF).

L'imagerie par PALM a été réalisée en utilisant un microscope PALM construit par Virgile Adam et Dominique Bourgeois de l'équipe PIXEL à IBS. Ce dispositif PALM se compose d'un microscope IX81 Olympus inversé équipé de plusieurs lasers (405 nm, 488 nm et 561 nm) et d'un objectif 100X ayant une NA de 1,49 dans l'huile à immersion. L'intensité et le temps d'acquisition sont ajustés grâce à un filtre acousto-optique accordable AOTF (acousto-optical tunable filter, Quantum Tech). L'acquisition des images est faite avec une caméra CCD (Photometrics) et sous le contrôle du programme MetaMorph (Molecular Devices). Pour la préparation des échantillons, les bactéries exprimant la protéine chimère Omp-Pst1 + PAmCherry ou Omp-Pst1 + rsFolder2 sont mises en culture pendant 2h à 20°C dans 5 mL du milieu TB. Elles sont ensuite déposées sur une lame de LB-Gelzan[®] à 20°C sur la nuit. Le lendemain, les bactéries sont directement imagées. L'acquisition des images est faite en alternant le laser 405 nm pour activer PAmCherry ou commuter rsFolder2 et le laser 561 nm ou 488 nm pour les exciter respectivement. Les images (>5000) sont analysées en utilisant l'option « thunderstorm » d'ImageJ qui permet de cumuler l'information pour obtenir l'image super-résolue.

V. Résultats

1. Caractérisation des biofilms de *P. stuartii*

Cette première partie des résultats présente une description de la formation des biofilms de *P. stuartii*. Notre découverte principale est que cette bactérie forme des communautés flottantes de cellules. Nous avons exploré cette architecture par imagerie et nous l'avons soumise à plusieurs stress environnementaux mimant le plus possible les conditions rencontrées dans le tractus urinaire, son habitat le plus fréquent dans l'être humain. Nous avons également inspecté le rôle d'Omp-Pst2 dans la mise en place des biofilms et leur résistance en comparant *P. stuartii* à $\Delta P2$, la souche de *P. stuartii* délétée pour cette porine.

1.1. Résumé

Les biofilms sont des communautés bactériennes multicellulaires impliquées dans la majorité des infections chroniques humaines. Dans les biofilms, les cellules individuelles communiquent par le biais d'un processus de signalisation chimique mal compris, le quorum sensing (QS). *P. stuartii* est une bactérie Gram-négatif formant des biofilms et responsable de fréquentes INU chroniques. Pourtant, ni la structuration, ni la résistance des biofilms de *P. stuartii* n'ont été étudiées en détails. Dans l'article ci-dessous, nous rapportons nos observations selon lesquelles *P. stuartii* forme non seulement des biofilms adhérents à la surface, mais aussi des communautés bactériennes flottantes. Nous avons observé une formidable résistance de *P. stuartii* à des concentrations élevées de calcium, de magnésium et d'urée et sur une large gamme de pH. Cette résistance est visible à l'échelle des biofilms mais aussi à celle des cellules planctoniques. Nous avons étudié l'implication d'une des deux porines de *P. stuartii*, Omp-Pst2, dans cette résistance. Les porines sont en effet la porte d'entrée principale des petits solutés dans la cellule. Nos résultats suggèrent un rôle significatif et important d'Omp-Pst2 dans les premières phases de la croissance de *P. stuartii* et son implication dans la résistance aux hautes concentrations d'urée et de calcium.

1.2. Le comportement social de *P. stuartii* et l'implication d'Omp-Pst2 dans la résistance du biofilm aux agressions environnementales.

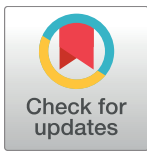
RESEARCH ARTICLE

Providencia stuartii form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults

Mariam El Khatib¹, Que-Tien Tran², Chady Nasrallah^{1*}, Julie Lopes¹, Jean-Michel Bolla³, Michel Vivaudou¹, Jean-Marie Pagès³, Jacques-Philippe Colletier^{1*}

1 Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes – Commissariat à l'Énergie Atomique – Centre National de la Recherche Scientifique, Grenoble, France, **2** School of Biophysics, Jacobs University of Bremen, Bremen, Germany, **3** Équipe Transporteurs Membranaires, Chimiorésistance et Drug-Design, Université Aix-Marseille – Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France

* Current address: Department of Neuroscience, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France
* colletier@ibs.fr



OPEN ACCESS

Citation: El Khatib M, Tran Q-T, Nasrallah C, Lopes J, Bolla J-M, Vivaudou M, et al. (2017) *Providencia stuartii* form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults. PLoS ONE 12(3): e0174213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213>

Editor: Surajit Das, National Institute of Technology Rourkela, INDIA

Received: November 22, 2016

Accepted: March 6, 2017

Published: March 23, 2017

Copyright: © 2017 El Khatib et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work used the platforms of the Grenoble Instruct Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL; <http://www.isbg.fr>) with support from GRAL (ANR-10-LABX-49-01; <http://www.labex-gral.fr>) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Financial support by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE18-0005-02;

Abstract

Biofilms are organized communities of bacterial cells that are responsible for the majority of human chronic bacterial infections. *Providencia stuartii* is a Gram-negative biofilm-forming bacterium involved in high incidence of urinary tract infections in catheterized patients. Yet, the structuration of these biofilms, and their resistance to environmental insults remain poorly understood. Here, we report on planktonic cell growth and biofilm formation by *P. stuartii*, in conditions that mimic its most common pathophysiological habitat in humans, *i.e.* the urinary tract. We observed that, in the planktonic state, *P. stuartii* forms floating communities of cells, prior to attachment to a surface and subsequent adoption of the biofilm phenotype. *P. stuartii* planktonic and biofilm cells are remarkably resistant to calcium, magnesium and to high concentrations of urea, and show the ability to grow over a wide range of pHs. Experiments conducted on a *P. stuartii* strain knocked-out for the Omp-Pst2 porin sheds light on the role it plays in the early stages of growth, as well as in the adaptation to high concentration of urea and to varying pH.

Introduction

Bacteria are known to live as organized community of cells termed biofilms. In humans, these supra-cellular structures are responsible for the majority of chronic bacterial infections [1,2]. Prominent examples of biofilm-related infections include catheter-associated infections, the leading cause of secondary nosocomial bacteremia (20%) [3], and cystic fibrosis [4], a genetic disorder that favours the colonisation of aerial tissues by *P. aeruginosa*. The chronic nature of biofilm-related infections originates from their increased resistance to the immune system and antibiotherapy. The current model for biofilm formation includes five different stages [5], *viz.* i/ the initial attachment of cells on a biotic or abiotic surface; ii/ the formation of a monolayer of cells; iii/ the migration of cells into a multi-layered colony; iv/ the synthesis of an

<http://www.agence-nationale-recherche.fr>) is acknowledged, as well as from the CEA (www.cea.fr), the CNRS (www.cnrs.fr) and the University Grenoble Alpes (<http://www.univ-grenoble-alpes.fr>). M.E.K. is supported by a joint CEA-GRAL (<http://www.labex-gral.fr>) doctoral fellowship. 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.

extracellular matrix around the cells; and v/ the maturation of the biofilm into a characteristic 3D ensemble, composed of cells flapping in a self-produced polymeric matrix [5]. A sixth stage would be the release and dispersion of biofilm cells to colonize other niches. Depending on species, the biofilm polymeric matrix may be composed of extra-cellular polysaccharides [1], amyloid fibers [6] and DNA [7]. The versatile and adaptable nature of the matrix allows bacteria to attach on, and thus colonize, a range of disparate (biotic or abiotic) surfaces. It also affects antibiotic efficiency through a variety of mechanisms, including reduced diffusion of drugs within the biofilm, masking or alteration of drug targets by the biofilm environment, or the adoption by some cells of a dormant—and therefore less drug-susceptible—phenotype [8,9].

Providencia stuartii is an opportunistic biofilm-forming pathogen from the *Enterobacteriaceae* family [10] that is ubiquitous in the environment [11]. A recent study reported an incidence rate of 4 per 100,000 hospital admissions, suggesting a low rate of prevalence in the general population [11]. *P. stuartii* is yet responsible for ≈ 9% of urinary tract infections, in patients undergoing long-term catheterization [11–15]. These patients are often nursing home (NH) or intensive care unit (ICU) residents; hence this contingent is bound to increase with aging of the population. The in-hospital mortality rate of *P. stuartii* infections is around 30% [11], in part due to its high intrinsic multidrug resistance (MDR) phenotype conferred by the presence of an inducible chromosomal AmpC [16]. This MDR phenotype can be further exaggerated in clinical isolates, a majority of which were shown to feature plasmid-encoded extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) [17]. More recently, clinical isolates presenting carbapenemase activities were isolated in Afghanistan [18] and Portugal [19]. *P. stuartii* is adept at biofilm dispersion, explaining that infections sometimes migrate from the urinary tract to other organs, causing endocarditis [20], pericarditis [21], peritonitis [22] or meningitis [23]. These facts, together with the now established ability of *P. stuartii* to disseminate amidst patients in hospital settings [24,25], explain the growing concern among health professionals [11]. As yet, however, studies remain scarce on *P. stuartii* and on the nature and resistance of its biofilms to environmental cues [26–28]. More investigations are needed to characterize how *P. stuartii* biofilms form, and what their specifics are in terms of extracellular matrix composition, cell sub-types and behaviour, and mechanisms of adherence-to and detachment-from surfaces or other cells. Such information is crucial to eventually prevent or manage chronic infections by *P. stuartii*, and the high toll they take on NH and ICU residents [11,29].

In urine, the metabolite urea is found at a concentration of 150 mM, at which it displays a strong anti-microbial effect. Thus, bacteria that colonize the urinary tract must find means to evade this stress. One of these is to feature (or acquire) a urease activity, that will hydrolyze urea into two ammoniums and an carbonate [30]. Calcium and magnesium are generally found at normal serum concentration (2 and 2.5 mM) but may reach higher concentrations in pathological conditions, e.g. in patients presenting bladder stones whose formation correlates with a 2-fold increase in the calcium-concentration/osmolarity ratio of urine [31,32]. The pH of urine is usually acidic but may vary from 6 to 8 depending on diet or pre-conditions. For example, infection by *P. mirabilis* is known to raise urine pH above 8, due to its strong urease activity that degrades urea into carbon monoxide and ammonia [29]. Some clinical isolates of *P. stuartii* feature a plasmid-encoded urease activity, but this activity is generally too weak to induce alkalinisation of urine [33]. Therefore alternative mechanisms, which allow *P. stuartii* cells to evade detrimental effects of urea, must exist. One of these is co-infection with species that have a strong urease activity such as *P. mirabilis*, whose presence was shown to increase *P. stuartii* colonization and bacteremia incidence [34]. Another efficient mechanism could be the limited diffusion of urea across the extracellular matrix of *P. stuartii* biofilms, which would result in reducing the effective concentration of urea in cells, thence preserving these. Access

to the periplasm is mainly controlled by general-diffusion porins, which are water-filled channels sprinkling the outer-membrane thence allowing passive diffusion of nutrients and ions into the periplasm. Porins are the most abundantly expressed outer-membrane (OM) proteins (up to 100,000 copies/cell), with a single porin often accounting for up to 70% of the OM proteinaceous content [35]. Current interest in porins mostly stems from their involvement in antibiotic uptake [36] and in the emergence of antibiotic resistance [37]. But as the first door opened toward the exterior, they also play a number of additional roles in bacterial survival, homeostasis and pathogenesis, adhesion to surfaces and host cells [38], and sometimes penetration into these [39]. Porins are therefore good candidates for playing a role in limiting excessive urea accumulation in the periplasm.

The genome of *P. stuartii* features two porins, Omp-Pst1 and Omp-Pst2 [40]. When grown in rich medium (*per se*, Luria-Bertani or LB), *P. stuartii* predominantly expresses Omp-Pst1, and it was proposed that Omp-Pst1 is the major porin of the bacterium [40]. Electrophysiology measurements revealed that Omp-Pst2 is highly cation-selective and prone to voltage-gating (critical voltage $V_c = 20\text{--}90$ mV), whereas Omp-Pst1 channel gates normally ($V_c > 199$ mV), is mildly anion selective and comparatively more permissive to β -lactam antibiotics [40,41]. MD simulations suggested that Omp-Pst2 atypical voltage-gating behaviour is asymmetric and triggered by the influx of cations from the extracellular to the periplasmic side of the porin. Efflux of cations, on the other hand, would be facilitated, suggesting a potential role for this porin in the regulation of charge distribution across the OM [42].

Here, we report on *P. stuartii* growth and biofilm formation under environmental conditions that mimic its most common habitat in humans, *i.e.* the urinary tract. We used the methodology of Mishra *et al.* [43] to characterize the effect of pH, urea, calcium and magnesium on biofilm genesis, attachment and consolidation. We found that *P. stuartii* growth is independent on pH in the viability range (pH 6 to 9), yet biofilm genesis and attachment onto the surface are favoured at $\text{pH} \geq 8$. We observed that *P. stuartii* biofilms survive in high concentrations of urea (up to 500 mM), calcium and magnesium (up to 50 mM), and that these environmental stresses trigger the consolidation of *P. stuartii* biofilms. Magnesium and calcium both inhibit the attachment of new cells onto surfaces in a dose-dependent manner, but magnesium activates biofilm genesis. Epifluorescence micrographs were taken at various stages of growth, of cells both in the planktonic (floating cells) and in the biofilm state (adherent cells). Most unexpectedly, we observed that planktonic *P. stuartii* cells exhibit a highly social behaviour, whereby cell-to-cell contact occurs prior to attachment of cells onto the surface, resulting in floating communities of cells that precede—and later coexist—with surface-attached biofilms. This observation suggested cell-to-cell contact as the primary mechanism by which *P. stuartii* cells form a community, and prompted us to examine whether or not porins—as the main proteinaceous component of the outer membrane—are involved. A knock-out strain for Omp-Pst2, *P. stuartii* $\Delta P2$, was obtained (*P. stuartii* ATCC 29914 $\Delta\text{ompPst2}::\text{Cm}$) that formed more biofilms (+70%) but displayed retarded growth, higher sensitivity to urea and cations, and a clear dependence of the lag-time on pH. Results suggest that Omp-Pst2 is an important actor in the early stages of *P. stuartii* growth and in adaptation to alkalinity.

Materials and methods

Strains and materials

Escherichia coli BL21 DE3 strain was used as a negative control strain and the wild type *Providencia stuartii* ATCC 29914 strain was obtained from the Pasteur Institute (Paris, France). All fluorescent dyes were from Thermo Fischer Scientific. Unless specified otherwise, chemicals were from Sigma-Aldrich. Polystyrene-bottom 96-well plates were from Greiner.

Generation of the *omp-pst2* knock out strain, *P. stuartii* $\Delta P2$

The disruption of the *omp-Pst2* gene in *P. stuartii* ATCC 29914 was carried out by adapting the protocol described by Datsenko and Wanner [44], based on the use of phage lambda Red recombinase [44]. The PCR primers were *OmpPst2_XbaI* 5' – GTG TCT AGA CAC TTA GTT AGT AAA TGG C –3' (forward) and *OmpPst2_BamHI* 5' – GTT GGA TCC GGA TAA TTG CGT ATG ATG G –3' (reverse). The *ompPst2* PCR amplicon was cloned into pGem-T-Easy vector and the construct was transferred by electroporation into *E. coli* DH5 α for plasmid maintenance and amplification. The plasmid was digested with HindIII enzyme and the subsequent protruding ends were filled in by Klenow enzyme. The construct was then ligated to chloramphenicol-resistance (Cm) cassette making *omp-Pst2::Cm* knockout construct. pCAM-MSU suicide vector for *Enterobacteriaceae* was then used to bring the *omp-Pst2::Cm* into *E. coli* S17-1 λ pir. Biparental mating with *P. stuartii* was then carried out by homology conjugation. Selection of *P. stuartii* ATCC 29914 *omp-Pst2::Cm* mutants was performed in the presence of chloramphenicol at 33 μ g/mL concentration. The resulting genetic modification of *P. stuartii* ATCC 29914 *omp-Pst2::Cm* was finally confirmed by both colony PCR and sequencing, using primers flanking the *omp-Pst2* gene in the *P. stuartii* genome.

Bacterial growth studies

E. coli and *P. stuartii* bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) growth medium without antibiotics. LB medium was supplemented with 33 μ g/ml chloramphenicol for the growth of the *P. stuartii* $\Delta P2$ bacteria. Control experiments showed that chloramphenicol at this concentration has no effect on cell-growth and biofilm formation by *P. stuartii*- $\Delta P2$ (data not shown). For each experiment, a single bacterial colony was inoculated in standard LB or pH-specific LB medium for 2 h, yielding cells in their lag phase. These were then distributed into a 96-wells plates supplemented with 0–1 M urea, 0–50 mM Ca²⁺ or 0–50 mM Mg²⁺, and incubated at 37°C and under 100 rpm agitation overnight, to form biofilms. Bacterial growth was monitored in terms of absorbance at 600 nm for 24 h (10 minutes interval between time points) using a Biotek Synergy H4 microplate reader (Winooski, VT, USA)

Environmental stresses impact on biofilm genesis and attachment onto surface

For each experiment, a single bacterial colony was used to inoculate 25 mL of standard LB medium (37°C). A large flask was used, that was maintained under constant shaking at 200 rpm on the rotatory platform, thence preventing bacterial attachment onto the surface and subsequent formation of adherent biofilms. After 2 hours, aliquots of this culture (cells in the lag phase) were transferred in a 96-well plate (see below), serving to study the effect of environmental stresses on biofilm genesis. After 24 h, another set of aliquots was transferred in the 96-well plate, with view to study the effect of environmental stresses on the attachment of cells onto the well surfaces (see below). Cells were confronted with environmental insults after transfer into the 96-well plate. Briefly, above-mentioned aliquots were distributed into wells containing 150 μ L LB medium buffered at increasing pH (4 to 9) or supplemented with increasing concentrations of urea (0–1 M), Ca²⁺ or Mg²⁺ (0–0.05 M). Cells were then incubated at 37°C under constant shaking at 100 rpm. Biofilms were revealed after 24-hours incubation in the 96-well plate.

Environmental stresses impact on established biofilms

For each experiment, a single bacterial colony was used to inoculate 25 mL of standard LB medium (37°C). A large flask was used, that was maintained under constant shaking at 200 rpm on the rotatory platform, thence preventing bacterial attachment onto the surface and subsequent formation of adherent biofilms. After 2 hours, aliquots of this culture (cells in the lag phase) were transferred in a 96-well plate and incubated for 24 hours at 37°C under constant shaking at 100 rpm, resulting in the formation of biofilms at the bottom of the wells. The medium was then removed to discard planktonic bacteria and replaced by fresh LB medium buffered at increasing pH (4 to 9) or supplemented with urea (0–1 M), Ca²⁺ or Mg²⁺ (0–0.05 M). The plate was then incubated at 37°C and 100 rpm overnight. Biofilms were revealed after an additional 24-hours incubation in this plate.

Imaging

Epifluorescence micrographs were taken on an IX81 Olympus inverted microscope; samples were magnified through 20 or 60X objectives (Plan APON60XO, Olympus). SYTO[®] 9 Green fluorescent nucleic acid stain and propidium iodide solution were used at 5 and 20 µM concentration to stain live and dead cells respectively. Bacterial membranes were stained by the fluorescent dye FM1-43FX at 5 µg/mL. Bacterial biofilms were grown in a 96-wells plates as described above. For the imaging of planktonic bacteria, 10 µL of the culture were spread on LB-Gelzan™ cover slides prepared as previously described [45] and imaged directly afterwards. For biofilm imaging, wells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove all planktonic bacteria; the remaining adherent bacteria forming the biofilm were then imaged.

Biofilm quantification

Well plates incubated overnight were washed extensively with PBS to remove all planktonic bacteria. Adherent biofilms were then stained with PrestoBlue[®] cell viability reagent. For each plate, fluorescence emission was measured at 590 nm, upon excitation at 560 nm. All experiments were performed at least in triplicate and biofilm formation was quantified with respect to *P. stuartii* cells grown in the absence of environmental stresses.

Results

P. stuartii form floating communities of cells prior to adherent biofilm

In order to characterize *P. stuartii* growth and its ability to form biofilms, we compared it to one of the most common *E. coli* strains used in laboratories, BL21 DE3. This *E. coli* strain is known not to form biofilms [46] and was therefore used as a negative control. When cultivated in LB medium, both *P. stuartii* and *E. coli* show a typical growth curve that can be divided into three phases: (1) a lag phase, (2) an exponential phase, and (3) a stationary phase (Fig 1A). *E. coli* and *P. stuartii* have similar lag phase duration and the same growth rate in the beginning of the exponential phase (Fig 1B). After five hours, however, *E. coli* cells decline whereas *P. stuartii* cells continue to exhibit a positive rate of growth.

Micrographic examination of attached *P. stuartii* cells reveals that no biofilm forms before the stationary phase (Fig 2A–2C), in agreement with the idea that bacteria form biofilms when faced with an environmental stress. After five hours of growth, the well is covered with a large biofilm, presumably as a result of starvation (Fig 2D). Examination of planktonic cells at the exponential and stationary phases reveals that floating communities of cells form by cell-to-cell contact in solution (Fig 2E–2G and S1 Movie), prior to the attachment of cells on the

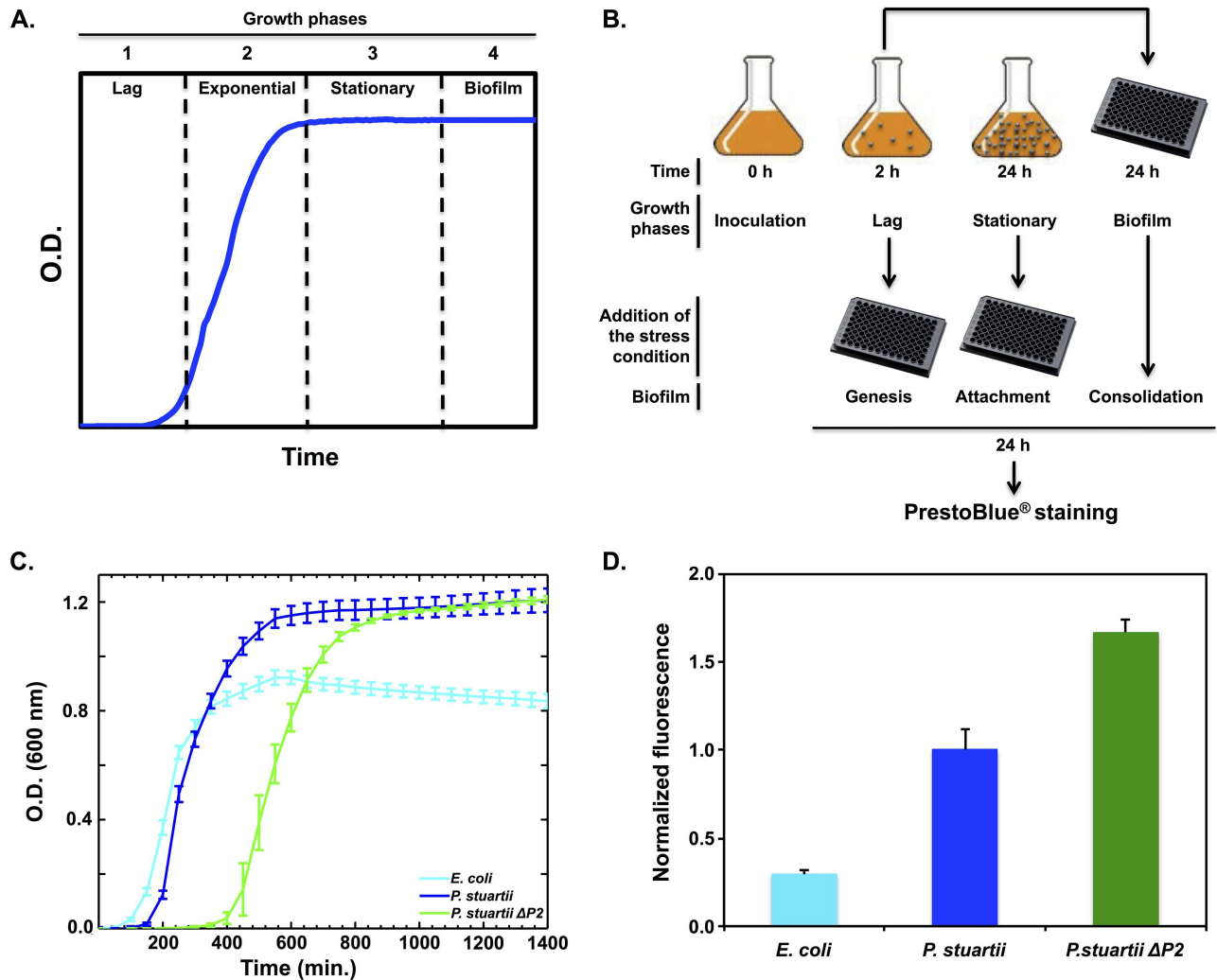


Fig 1. Planktonic bacterial growth and biofilm formation. (A) Bacterial growth can be divided into 4 main phases: (1) the lag phase, (2) the exponential phase, (3) the stationary phase and (4) the biofilm establishment phase. (B) Growth curves of *E. coli* BL21, *P. stuartii* and *P. stuartii*-ΔP2. (C) Experimental protocol designed to challenge the effect of various environmental stresses on the different stages of biofilm formation (genesis, attachment, consolidation) by *P. stuartii*. (D) Biofilm quantification after 24h of growth in 96-wells plates, as revealed by adherent cells using PrestoBlue. Data are normalized with respect to measurements performed on *P. stuartii*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213.g001>

surface (Fig 2A–2C)—that is, prior to the formation of canonical biofilms. After five hours of growth, these floating communities of cells are multi-layered and coexist with surface-attached biofilms (Fig 2D–2H).

The viable adherent biomass formed by *P. stuartii* was 3-fold greater than that formed by *E. coli* (Fig 1C), with virtually all cells being alive in *P. stuartii* biofilms (Fig 3A). In contrast, *E. coli* adherent biomass amounted to only few dispersed cells, roughly the half of which were dead (Fig 3A). Phenotypic differences between *P. stuartii* and *E. coli* cells were also clear at the planktonic level, where the dispersion of *E. coli* cells contrasted with the highly gregarious behaviour of *P. stuartii* floating communities (Fig 3B).

We examined whether *Omp-Pst2* could play a role in biofilm formation by repeating these experiments on the *P. stuartii* ATCC 29914 $\Delta ompPst2::Cm$ strain (*P. stuartii* ΔP2). The growth rate of *P. stuartii* ΔP2 in the exponential and stationary phases was identical to that of the wild-

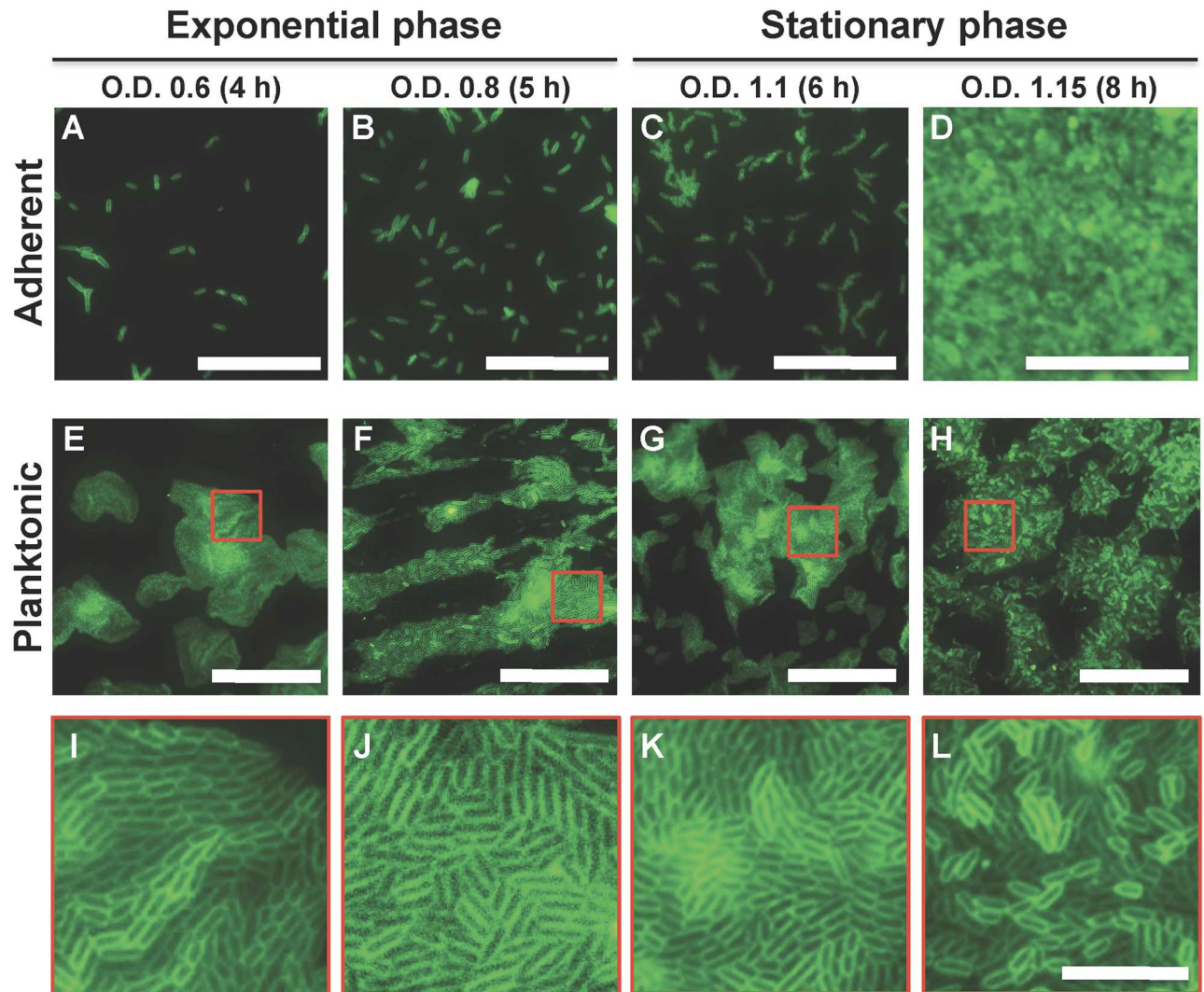


Fig 2. *P. stuartii* form floating-communities of planktonic-cells prior to adherent biofilms. (A-D) Micrographs of bacteria that remain bound to the well surface, after discard of planktonic cells by PBS washes. (E-H) Micrographs of planktonic bacteria. Cells were pipetted from the LB medium, spreaded on LB-Gelzan and imaged immediatly. (I-L) Close-up views of the red-delineated regions in panels E-H showing close contact between the membrane of adjacent cells. Bacterial membranes were stained using FM1-43FX. Scale bars: 50 μ m (A-H) and 10 μ m (I-L).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213.g002>

type strain, showing a rapid adaptation to Omp-Pst2 depletion (Fig 1B). However, cells devoid of Omp-Pst2 displayed retarded growth (+ 60% increase in lag time; Fig 1B) and a 70% increase in biofilm formation (Fig 1C). *P. stuartii* Δ P2 biofilms were comparatively denser, but the lack of Omp-Pst2 did not perturb the microscopic appearance of *P. stuartii* cells—in either planktonic (Fig 3A) or biofilm (Fig 3B) states. Increased biofilm formation by *P. stuartii* Δ P2 could underlie a pathway undertaken by this K.O. strain to overcome the stress induced by the lack of Omp-Pst2 in the early stages of growth.

***P. stuartii* is resistant to urea and forms biofilm over a large range of pH**

Inasmuch as urea is the principal component of urine, we set to determine the effect of this metabolite on *P. stuartii* planktonic cell growth as well as on biofilm genesis, attachment and

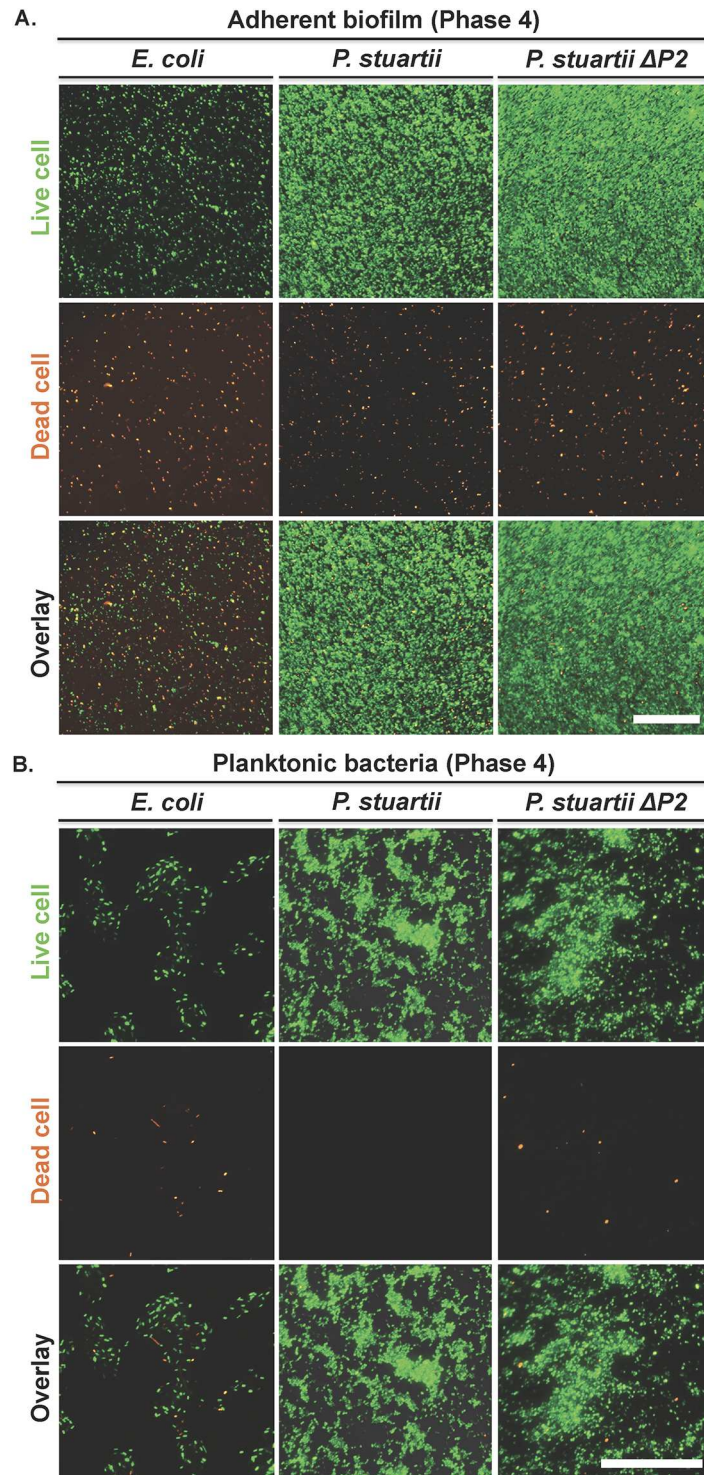


Fig 3. *P. stuartii* is adept at forming large biofilms mainly composed of living cells. (A) Micrographs of bacteria adherent to the wells surface after discard of planktonic cells by PBS washes. (B) Micrographs of planktonic bacteria. Cells were pipetted from the LB medium, spreaded on LB-Gelzan® and imaged immediatly. Live and dead cells were stained with SYTO9 Green and propidium iodide, respectively. Scale bars are 100 and 50 μ m in panels (A) and (B), respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213.g003>

consolidation. We used to this end the methodology recently introduced by Mishra *et al.* [43]. Briefly, cells were submitted to increasing urea concentration at various phases of their growth (lag, stationary and biofilm phases), grown overnight (ON) under this environmental pressure, and the viable biofilm mass was then quantified using Presto Blue (Fig 1D). We found that *P. stuartii* planktonic cells sustain normal growth up to 500 mM urea but display an 85% decrease in growth at 1 M urea (Fig 4A). Exposure of cells to urea in the lag and stationary phases reveals that biofilm genesis and attachment to surfaces are unaffected by concentrations of urea up to 200 and 500 mM, respectively (Fig 4B and S1 Fig). Exposure to urea furthermore consolidates pre-formed *P. stuartii* biofilms, in the viability range (0–500 mM) (Fig 4B and S2 Fig). Clearly, ATCC 29914 is a urease-positive *P. stuartii* strain, sustaining urea concentrations ≥ 4 -fold higher than that encountered in its human habitat (150 mM). The urease activity of *P. stuartii* is cytoplasmic and produces 2 ammoniums and 1 carbonate per hydrolysed molecule of urea [30].

We then investigated how *P. stuartii* responds to changes in pH. Using the approach summarized above—and further detailed in the Methods section—we found that *P. stuartii* is unable to grow at pH 4 and 5, but viable between pH 6 and 9 (Fig 4C). Within this range, neither planktonic cells (Fig 4C) nor cells from preformed biofilms are affected by pH variations, although alkalinity favours biofilm genesis and attachment of cells onto the surface (Fig 4D and S1 Fig). While partially destroyed at pH 4, preformed *P. stuartii* biofilms consolidate at pH 5 (Fig 4D and S2 Fig) underlining their resistance to extreme environmental conditions.

Omp-Pst2 is involved in urea uptake and in the regulation of pH in the periplasm

We examined the impact of urea on planktonic growth and biofilm formation by the Δ Omp-Pst2 strain of *P. stuartii*. *P. stuartii* Δ P2 showed normal growth in urea up to 200 mM, but an increased lag time at 500 mM. At 1M, the strain could not grow, suggesting that Omp-Pst2 participates in alleviating urea toxicity in parental cells (Fig 4E). The fitness loss induced by lack of Omp-Pst2 was also visible at the biofilm level, with biofilm genesis, attachment and consolidation all being negatively impacted by urea in a dose-dependent manner (Fig 4F and S1 and S2 Figs).

We also investigated the sensitivity of *P. stuartii* Δ P2 to variations in pH. At the planktonic level, we observed a clear dependency on pH of the lag time of *P. stuartii* Δ P2 growth. The K. O. strain remains unable to grow at pH 4 and 5, but displays a faster and more productive planktonic growth at pH 6 than at pH 9 (Fig 4G). In strong contrast, the growth of the parental strain is equally favoured from pH 6 to 9 (Fig 4C). At the biofilm level, *P. stuartii* Δ P2 cells show reduced biofilm genesis and attachment to the surface at pH 9, resulting in a shift of the optimal pH for biofilm formation from pH 9 to 8 (Fig 4H and S1 Fig). Absence of Omp-Pst2 also lowers biofilm consolidation at pH5, as compared to the parental strain (Fig 4D and 4H and S2 Fig). Altogether, these results indicate a role for Omp-Pst2 in the regulation of periplasmic pH.

P. stuartii biofilms benefit from the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+}

Calcium and magnesium are the most abundant divalent-cations in the urine. Therefore, their effect on the growth and fitness of *P. stuartii* cells was investigated, at the planktonic and biofilm levels. Upon addition of 50 mM of calcium and magnesium into the growth medium, *P. stuartii* growth level increased by 17 and 25% respectively (Fig 5A and 5C). Addition of calcium had an inhibitory effect on biofilm genesis as well and on cell attachment onto the surface, but triggered the consolidation of preformed-biofilms (Fig 5B) and a drastic

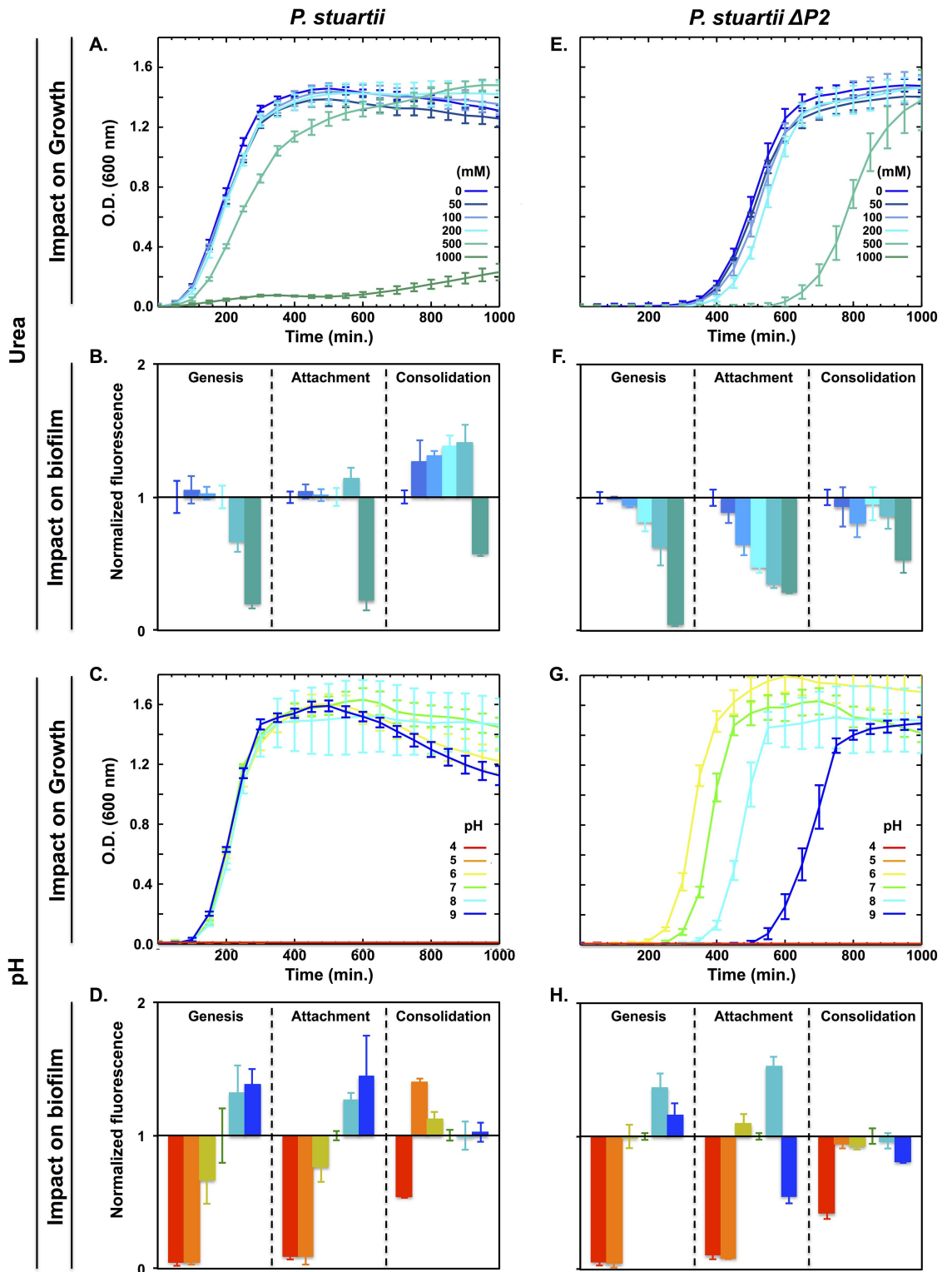


Fig 4. Resistance of *P. stuartii* and *P. stuartii* $\Delta P2$ cells to high concentrations of urea and to pH variations. Effect of urea (A and E) and pH (C and G) on bacterial growth, as judged from the O.D. of cultures at 600 nm. The impact on biofilm genesis, attachment and consolidation was evaluated by adding urea (B and F) or changing the pH (D and H) during the lag, stationary and preformed biofilm phases, respectively. Biofilm formation was quantified 24 h later, by PrestoBlue staining. Fluorescence values were normalized with respect to the control wells containing no urea and buffered at pH7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213.g004>

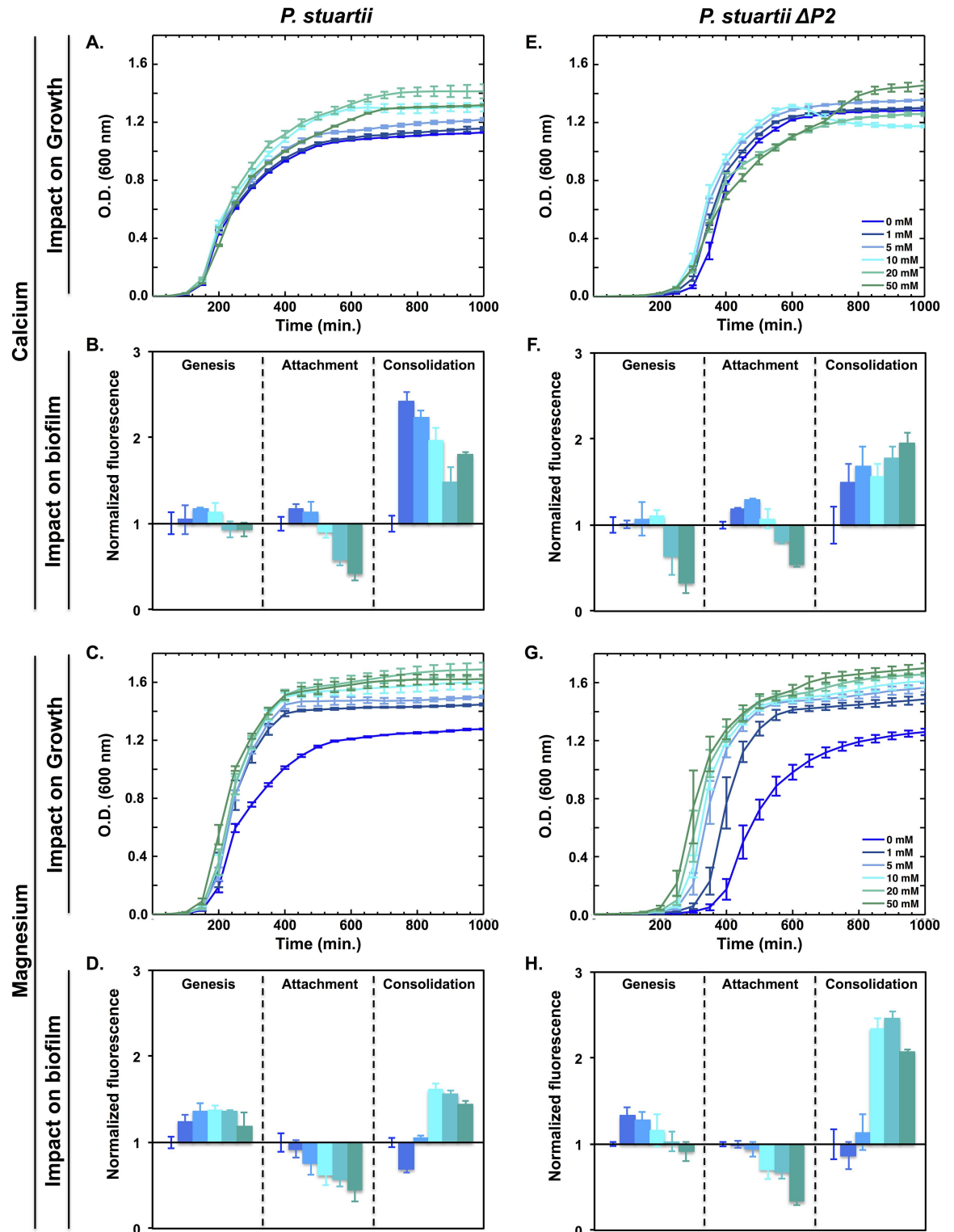


Fig 5. Resistance of *P. stuartii* and *P. stuartii*- Δ P2 cells to high concentrations of calcium and magnesium. Effect of calcium (A and E) and magnesium (C and G) on bacterial growth, as judged from the O.D. of cultures at 600 nm. The impact on biofilm genesis, attachment and consolidation was evaluated by adding calcium (B and F) or magnesium (D and H) during the lag, stationary and preformed biofilm phases, respectively. Biofilm formation was quantified 24 h later, by PrestoBlue staining. Fluorescence values were normalized with respect to the control wells buffered at pH7 and devoid of urea.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213.g005>

reorganisation of their supracellular structure. Micrographs indeed reveal that *P. stuartii* biofilms change shape, forming compact assemblies of tightly aggregated cells (S2 Fig), upon exposure to high calcium concentration. Magnesium also inhibited cell attachment to surfaces, but was beneficial to biofilm genesis and consolidation (Fig 5D) and did not affect the shape of pre-formed biofilms, even at the highest concentrations tested.

Deletion of Omp-Pst2 reproduced or enhanced the impact of the two divalent cations on *P. stuartii* $\Delta P2$ cells, planktonic and biofilm alike. The beneficial effect of calcium on planktonic growth was preserved, and likewise for its inhibitory effect on biofilm genesis and cell attachment onto the surface (Fig 5B and 5F). Pre-formed biofilms of *P. stuartii* $\Delta P2$ also displayed more sensitivity to high calcium concentrations, as exposed by the observation of more compact cell-assemblies characterized by a higher mortality level (S2 Fig), in epifluorescence micrographs. The beneficial effect of magnesium on planktonic growth was also preserved in *P. stuartii* $\Delta P2$ cells, while that on biofilm consolidation was further potentiated (Fig 5H).

Discussion

P. stuartii is a biofilm-forming pathogen (Fig 1B), mainly involved in urinary tract infections in elderly patients [11,15]. It is occasionally implicated in others types of infections [47], including endocarditis [20], pericarditis [21], peritonitis [22] and meningitis [23]. Notwithstanding that the prevalence of infections is increasing alarmingly, knowledge regarding the species and its biofilms remains scarce.

Here, we aimed at studying *P. stuartii* growth and biofilm formation in conditions that mimic its most common habitat in humans, *i.e.* the urinary tract. Our study demonstrated the ability of the microbe to form biofilms in a variety of insulting conditions. Furthermore, it shed light on the highly gregarious behaviour of *P. stuartii* planktonic cells, which associate from the early stages of growth through cell-to-cell contact, forming floating community of cells prior to formation of canonical—per say, adherent—biofilms (Fig 2 and S1 Movie). Cell-to-cell contact in the planktonic state could provide a means to maximize cell density, inter-communication and resistance to environmental cues, before formation of the mature biofilm. We observed that the floating communities of cells could attach altogether to surfaces, allowing biofilms to start from a critical mass.

Planktonic and biofilm cells of *P. stuartii* adapt well to changes in pH, in the pH 6 to 9 range. Alkaline pH furthermore activates *P. stuartii* biofilm genesis and attachment to surfaces (Fig 4A–4D). This fitness suggests the existence of periplasmic pH regulators, which would support the swift adaptation of *P. stuartii* to pH variation. *P. stuartii* $\Delta P2$, plagued by delayed growth, displays a clear dependence of the lag time on pH, suggesting that Omp-Pst2 contributes to the ability of the parental strain to immediately grow regardless of pH (Fig 4C and 4G). Thus Omp-Pst2 could play a role in regulating/buffering periplasmic pH, thereby supporting the adaptation of wild-type *P. stuartii* to changes in environmental pH. In the absence of this presumed regulator, *P. stuartii* $\Delta P2$ cells would take longer to adapt to increasing pH, hence explaining their retarded growth (+300 min at pH 9, compared to pH 7, Fig 4G).

The urease activity of *P. stuartii* ATCC 29914 was uncovered by its ability to grow normally in mediums containing up to 500 mM urea. The species furthermore survives (15%) in 1 M urea (Fig 4A) demonstrating that it would be able to grow in the urinary tract. *P. stuartii* $\Delta P2$ is nevertheless more sensitive to urea, displaying an increased lag time at 500 mM urea (+ 250 min) and showing no growth at 1M urea (Fig 4E). Accordingly, biofilm genesis, attachment and consolidation by this strain are affected by urea in a dose-dependent manner (Fig 4F). This mechanism of toxicity is not detectable in the parental strain. It appears unlikely that Omp-Pst2 absence would effect in increasing urea concentration in the periplasm. Rather,

Omp-Pst2 is involved in a process downstream of the penetration of urea into cells, such as efflux of urea or of its hydrolytic products. We see at least three possible explanations for the reduced resistance to urea of the *P. stuartii* $\Delta P2$ strain. (i) Omp-Pst2 could contribute to the efflux of urea from the periplasm, hence reducing the actual periplasmic (and thus cytoplasmic) concentration of urea. Given the large excess present in the surrounding growth medium, it nevertheless appears unlikely that this efflux activity would significantly affect the periplasmic concentration in urea. (ii) Omp-Pst2 could facilitate the influx of anions neutralizing the periplasmic ammonium generated by urea degradation—but again, given the strong cation-selectivity of Omp-Pst2, however, this hypothesis also appears unlikely. (iii) Omp-Pst2 could be involved in the direct efflux of periplasmic ammonium and in limiting its re-penetration into the periplasm; this is the only hypothesis that fits the prior knowledge on Omp-Pst2. Indeed, MD simulations have suggested that Omp-Pst2 could be involved in the facilitated transport of cations from the periplasm to the extracellular side of the OM [42]. They furthermore highlighted that Omp-Pst2 channel would respond by gating to a massive transit of cations from the external medium to the periplasm [42]. Thus, we favour the hypothesis that Omp-Pst2 alleviates the toxic effects of urea on *P. stuartii* cells by mitigating the toxic accumulation of ammonium in their periplasm. Of note, rough calculations indicate that accumulation of 10 μM ammonium would raise the periplasmic pH from 7 to 9. Thus, the delayed growth displayed by *P. stuartii* $\Delta P2$ cells in the presence of 500 mM urea could result from increased periplasmic pH, due to reduced efflux of ammonium. More generally, Omp-Pst2 could act on periplasmic pH by regulating the cationic content of the periplasm; this hypothesis will have to be confirmed by electrophysiology.

Elevated calcium and magnesium consolidate preformed *P. stuartii* biofilms, activate planktonic cell growth (Fig 5A and 5C), and reduce cell attachment onto surfaces (Fig 5B and 5D). Calcium at 50 mM induces changes in the macroscopic appearance of biofilms, leading to their compaction (S2 Fig), whereas magnesium slightly activates their genesis. These effects are further exaggerated in *P. stuartii* $\Delta P2$ (Fig 5F and 5H), again supporting that the absence of Omp-Pst2 could lead to accumulation of cations in the periplasm, aggravating the effect of these on cellular metabolism.

Altogether, our results suggest that *P. stuartii* exploits sociability as a means to foster cellular growth and resist to environmental stress, before formation of a canonical—per say, surface-attached—biofilm. Our work also points out that Omp-Pst2 plays a crucial role in the early stages of *P. stuartii* growth (Fig 1A). Data show that Omp-Pst2 is involved in pH regulation (Fig 4G) and could be in charge of ammonium clearance/neutralization from/in the periplasm, a hypothesis supported by electrophysiology data [40] and more recently molecular dynamics simulations on the porin [42]. Our data add to the growing body of evidence that suggests an implication of OM components in biofilm formation and regulation [48,49]. Further studies are needed to understand how *P. stuartii* cells are riveted to one another in floating communities of planktonic cells, and how this phenotype influences the ability of the species to form biofilms.

Supporting information

S1 Movie. *P. stuartii* forms floating communities of cells. Bacteria were grown to an O.D. of 0.5 at 600 nm and imaged by conventional microscopy without washing. The movie shows a Z-scan acquisition of the whole well (bottom-to-top). Planktonic cells assemble into a floating community, wherein cells appear to be attached to one another and are presumably in close contact.
(M4V)

S1 Fig. Impact of urea and pH impact on biofilm genesis. Effect of urea (B-C and H-I) and pH (D-F and J-L) on the genesis of *P. stuartii* (A-F) and *P. stuartii* $\Delta P2$ (G-L) biofilms. Cells were subjected to environmental stresses for 24 h and bacteria adherent to the well surface were imaged after discard of planktonic cells by PBS washes. Live and dead cells were stained with SYTO9 Green and propidium iodide, respectively. Scale bar: 100 μm . (TIF)

S2 Fig. Impact of urea, pH and divalent cations on consolidation of pre-formed biofilms. Effect of urea (B, H), calcium (E, K), magnesium (F, L) and pH (C- D, I-J) on the consolidation of *P. stuartii* (A-F) and *P. stuartii* $\Delta P2$ (G-L) biofilms. Cells were subjected to environmental stresses for 24 h and bacteria adherent to the well surface were imaged after discard of planktonic cells by PBS washes. Live and dead cells were stained with SYTO9 Green and propidium iodide, respectively. Scale bar: 100 μm . (TIF)

Acknowledgments

We are indebted to Martin Weik for continuous support and fruitful discussions. We are grateful to Jean-Philippe Kleman and Françoise Lacroix for their technical support and advices during epifluorescence microscopy experiments. We thank Alexandre Dos Santos Martins and Coline Burnet-Merlin for technical support. This work used the platforms of the Grenoble Instruct Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

Author Contributions

Conceptualization: MEK JPC.

Formal analysis: MEK.

Funding acquisition: JPC.

Investigation: MEK CN JL.

Methodology: MEK JPC.

Project administration: JPC.

Resources: MEK QTT JMB MV JMP JPC.

Software: n/a.

Supervision: JPC.

Validation: MEK, JPC.

Visualization: MEK.

Writing – original draft: MEK, JPC.

Writing – review & editing: MEK, MV, JPC.

References

1. Costerton J. W., Stewart P. S. & Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322 (1999). PMID: [10334980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10334980/)

2. Hall-Stoodley L. & Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1034–1043 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x> PMID: 19374653
3. Gould C. V. et al. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 31, 319–326 (2010). <https://doi.org/10.1086/651091> PMID: 20156062
4. Chapman C. M. C., Gibson G. R. & Rowland I. Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. *Anaerobe* 27, 71–76 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.02.001> PMID: 24583095
5. Branda S. S., Vik S., Friedman L. & Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20–26 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006> PMID: 15639628
6. Chapman M. R. et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851–855 (2002). <https://doi.org/10.1126/science.1067484> PMID: 11823641
7. Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C. & Mattick J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487–1487 (2002). <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487> PMID: 11859186
8. Stewart P. S. & William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135–138 (2001).
9. Lebeaux D., Ghigo J.-M. & Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 78, 510–543 (2014). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14> PMID: 25184564
10. Manos J. & Belas R. in *The Prokaryotes* (eds Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. & Stackebrandt E.) 245–269 (Springer New York, 2006).
11. Wie S.-H. Clinical significance of *Providencia* bacteremia or bacteriuria. *Korean J. Intern. Med.* 30, 167–169 (2015).
12. McHale P. J., Walker F., Scully B., English L. & Keane C. T. *Providencia stuartii* infections: a review of 117 cases over an eight year period. *J. Hosp. Infect.* 2, 155–165 (1981). PMID: 6174578
13. Warren J. W. *Providencia stuartii*: A Common Cause of Antibiotic-Resistant Bacteriuria in Patients with Long-Term Indwelling Catheters. *Rev. Infect. Dis.* 8, 61–67 (1986). PMID: 3081988
14. Stickler D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 5, 598–608 (2008). <https://doi.org/10.1038/ncpuro1231> PMID: 18852707
15. De Vecchi E. et al. Aetiology and antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in the elderly: a 6-month study. *J. Med. Microbiol.* 62, 859–863 (2013). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056945-0> PMID: 23475904
16. Aubert D., Naas T., Lartigue M.-F. & Nordmann P. Novel Genetic Structure Associated with an Extended-Spectrum β -Lactamase bla_{VEB} Gene in a *Providencia stuartii* Clinical Isolate from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3590–3592 (2005). <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3590-3592.2005> PMID: 16048993
17. Tumbarello M. et al. ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 277–282 (2004). <https://doi.org/10.1093/jac/dkh047> PMID: 14688041
18. Mc Gann P. et al. Complete Sequence of a Novel 178-Kilobase Plasmid Carrying bla_{NDM-1} in a *Providencia stuartii* Strain Isolated in Afghanistan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1673–1679 (2012). <https://doi.org/10.1128/AAC.05604-11> PMID: 22290972
19. Manageiro V. et al. Draft Genome Sequence of the First NDM-1-Producing *Providencia stuartii* Strain Isolated in Portugal. *Genome Announc.* 3, (2015).
20. Krake P. R. & Tandon N. Infective endocarditis due to *Providencia stuartii*. *South. Med. J.* 97, 1022–1023 (2004).
21. Simon C. et al. Images in cardiovascular medicine. Bacterial pericarditis due to *Providencia stuartii*: an atypical case of relapsing pericarditis. *Circulation* 122, e401–403 (2010). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943118> PMID: 20660810
22. Unverdi S. et al. Peritonitis due to *Providencia stuartii*. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* 31, 216–217 (2011).
23. Sipahi O. R. et al. Meningitis due to *Providencia stuartii*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4667–4668 (2010). <https://doi.org/10.1128/JCM.01349-10> PMID: 20980575
24. Bret L. & Di Martino P. Effect of Ceftazidime, Amikacin and Ciprofloxacin on Biofilm Formation by Some Enterobacterial Clinical Isolates. *Chemotherapy* 50, 255–259 (2004). <https://doi.org/10.1159/000081947> PMID: 15528892

25. Lahlaoui H. et al. Nosocomial dissemination of extended-spectrum β -lactamase VEB-1a-producing *Providencia stuartii* isolates in a Tunisian hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 1267–1270 (2011).
26. Sturgill G., Toutain C. M., Komperda J., O'Toole G. A. & Rather P. N. Role of CysE in Production of an Extracellular Signaling Molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: Loss of *cysE* Enhances Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 7610–7617 (2004). <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7610-7617.2004> PMID: 15516574
27. Kateete D. P. et al. Rhomboids of Mycobacteria: Characterization Using an *aarA* Mutant of *Providencia stuartii* and Gene Deletion in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS ONE* 7, e45741 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045741> PMID: 23029216
28. Ostrowska K., Kamysz W., Dawgul M. & Różalski A. Synthetic amphibian peptides and short amino-acids derivatives against planktonic cells and mature biofilm of *Providencia stuartii* clinical strains. *Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* 63, 423–431 (2014).
29. Stickler D. J. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J. Intern. Med.* 276, 120–129 (2014). <https://doi.org/10.1111/joim.12220> PMID: 24635559
30. Isaacson L. C. Urinary composition in calcific nephrolithiasis. *Invest. Urol.* 6, 356–363 (1969). PMID: 5773520
31. Raman A. & Sreenevasan G. A. Urinary Osmolarity and Excretion of Sodium, Calcium and Magnesium in Patients with Renal Calculi. *Br. J. Urol.* 44, 537–540 (1972). PMID: 4628536
32. Broomfield R. J., Morgan S. D., Khan A. & Stickler D. J. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *J. Med. Microbiol.* 58, 1367–1375 (2009). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.012419-0> PMID: 19556373
33. Armbruster C. E., Smith S. N., Yep A. & Mobley H. L. T. Increased Incidence of Urolithiasis and Bacteremia During *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* Coinfection Due to Synergistic Induction of Urease Activity. *J. Infect. Dis.* 209, 1524–1532 (2014). <https://doi.org/10.1093/infdis/jit663> PMID: 24280366
34. Zeth K. & Thein M. Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochem. J.* 431, 13–22 (2010). <https://doi.org/10.1042/BJ20100371> PMID: 20836765
35. Pagès J.-M., James C. E. & Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 893–903 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994> PMID: 18997824
36. Delcour A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Proteins Proteomics* 1794, 808–816 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005> PMID: 19100346
37. Hemery G., Chevalier S., Bellon-Fontaine M.-N., Haras D. & Orange N. Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 49–54 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0160-x> PMID: 16932888
38. Galdiero S. et al. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 843–854 (2012). <https://doi.org/10.2174/138920312804871120> PMID: 23305369
39. Tran Q.-T. et al. Implication of Porins in β -Lactam Resistance of *Providencia stuartii*. *J. Biol. Chem.* 285, 32273–32281 (2010). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143305> PMID: 20667831
40. Bajaj H. et al. Antibiotic Uptake through Membrane Channels: Role of *Providencia stuartii* *OmpPst1* Porin in Carbapenem Resistance. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 10244–10249 (2012).
41. Song W. et al. Understanding Voltage Gating of *Providencia stuartii* Porins at Atomic Level. *PLoS Comput Biol* 11, e1004255 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004255> PMID: 25955156
42. Mishra B., Golla R. M., Lau K., Lushnikova T. & Wang G. Anti-Staphylococcal Biofilm Effects of Human Cathelicidin Peptides. *ACS Med. Chem. Lett.* (2015).
43. Datsenko K. A. & Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6640–6645 (2000). <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297> PMID: 10829079
44. de Jong I. G., Beilharz K., Kuipers O. P. & Veening J.-W. Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae*; using Automated Time-lapse Microscopy. *J. Vis. Exp.* (2011).
45. Zalewska-Piatek B. M., Wilkanowicz S. I., Piatek R. J. & Kur J. W. Biofilm formation as a virulence determinant of uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains. *Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* 58, 223–229 (2009).

46. MOBLEY H. L., CHIPPENDALE G. R., TENNEY J. H. & WARREN J. W. Adherence to uroepithelial cells of *Providencia stuartii* isolated from the catheterized urinary tract. *Microbiology* 132, 2863–2872 (1986).
47. Frey K. G. et al. Full-Genome Assembly of Reference Strain *Providencia stuartii* ATCC 33672. *Genome Announc.* 2, e01082–14 (2014). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01082-14> PMID: 25342690
48. Gaddy J. A., Tomaras A. P. & Actis L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* 77, 3150–3160 (2009). <https://doi.org/10.1128/IAI.00096-09> PMID: 19470746
49. Phillips N. J. et al. Proteomic Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* Biofilms Shows Shift to Anaerobic Respiration and Changes in Nutrient Transport and Outer membrane Proteins. *PLOS ONE* 7, e38303 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038303> PMID: 22701624

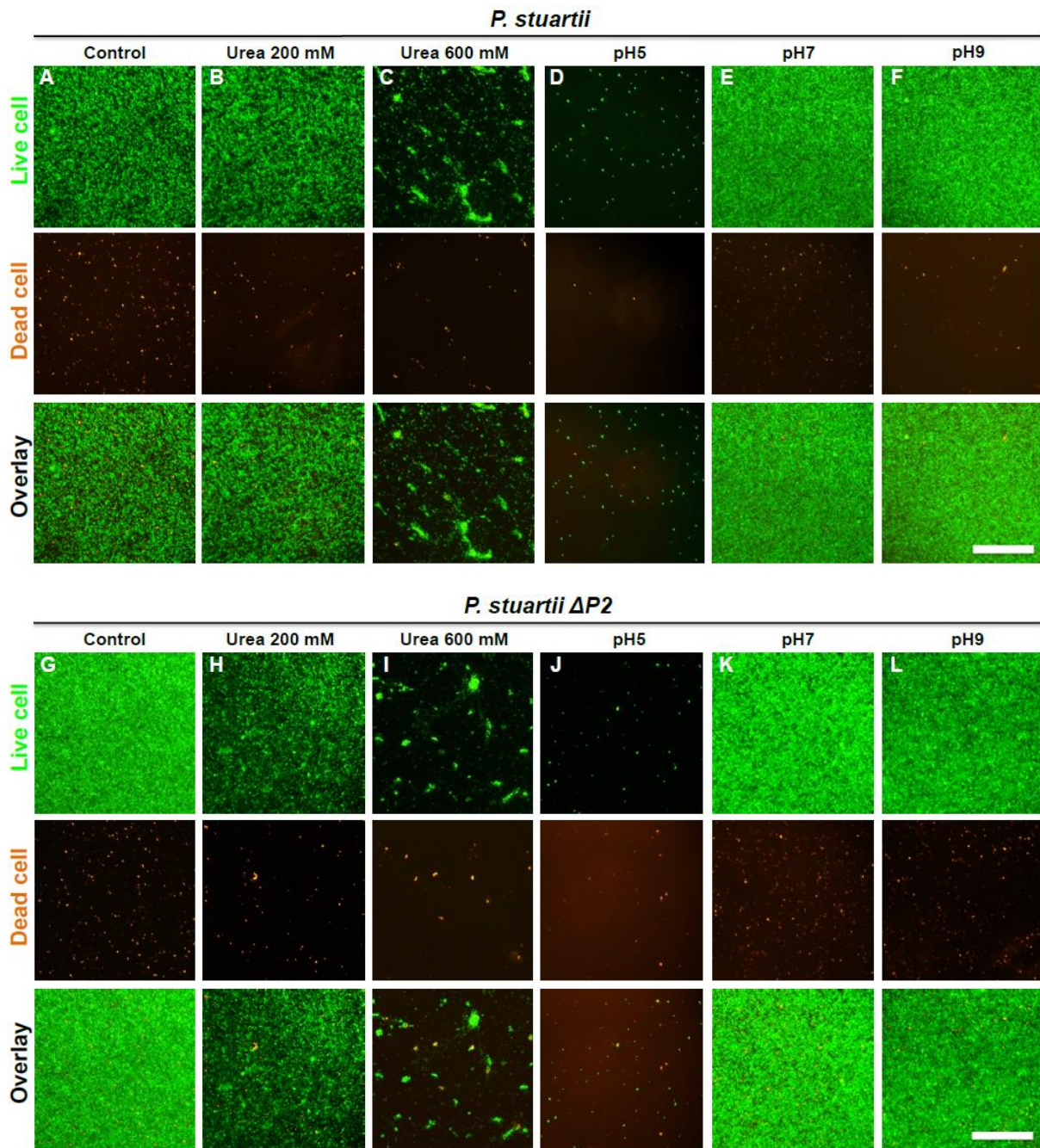


Figure S.1.

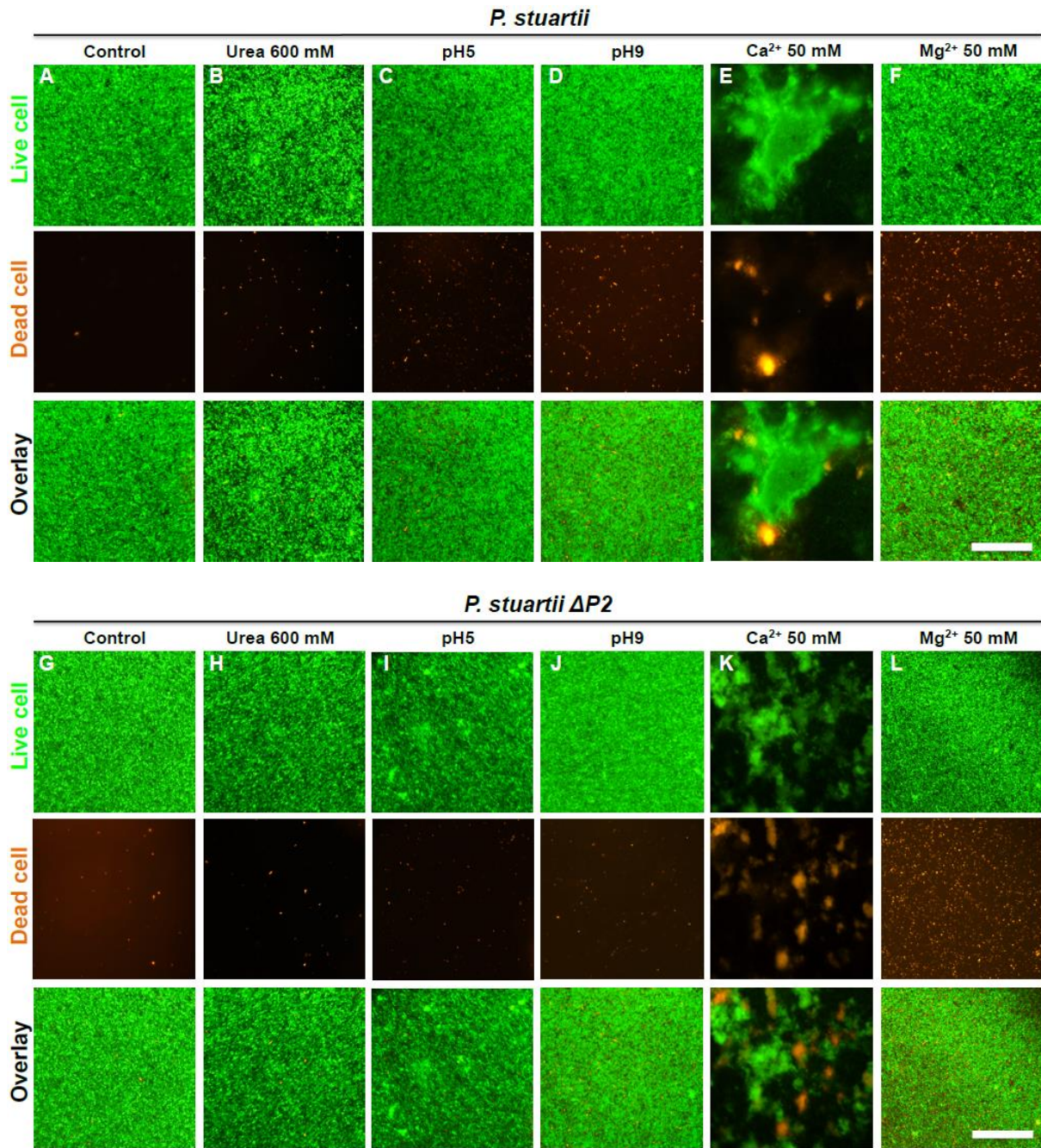


Figure S.2.

1.3. Conclusions et perspectives

Dans l'ensemble, nos résultats offrent de nouvelles perspectives sur *P. stuartii* et les biofilms formés par celle-ci. Le caractère social de *P. stuartii* à l'état planctonique implique une communication cellulaire avant même que les cellules n'adhèrent à une surface pour former un biofilm canonique. En appliquant plusieurs conditions de stress, nous avons pu mettre en évidence la viabilité élevée de *P. stuartii* et son niveau de résistance importantes lesquelles pourraient être potentialisées, du moins en partie, par la sociabilité de *P. stuartii*, mais souligne avant tout la forte capacité de cette espèce à s'adapter à des environnements divers. Cette résistance bactérienne suggère un ou plusieurs mécanismes d'adaptation à *P. stuartii* de surmonter les contraintes environnementales dès le début de son cycle de vie. L'étude de l'impact de l'absence d'Omp-Pst2 révèle son rôle crucial dans la croissance de *P. stuartii* notamment dans les phases précoces de croissance et son implication dans la résistance aux agressions environnementales. Il serait donc nécessaire de confirmer ou d'infirmer la présence d'un contact cellulaire entre les bactéries adjacentes pour avoir une compréhension approfondie de l'implication des porines dans cette sociabilité bactérienne.

Afin de faire la lumière sur les bases moléculaires de cette résistance, nous avons entrepris de résoudre les structures des deux porines de *P. stuartii*, Omp-Pst1 et Omp-Pst2.

2. Caractérisation des porines de *P. stuartii*

Les résultats de notre première partie et ceux de la littérature liant les fonctions diffusives des porines à la résistance des bactéries aux antibiotiques soulèvent des questions sur le rôle exact joué par celles-ci dans la physiologie de *P. stuartii*. Les bases moléculaires des propriétés diffusives des porines de *P. stuartii* ne peuvent être illuminées que par la résolution de leurs structures à résolution atomique. A dessein, cette deuxième partie décrit les caractérisations cristallographiques, biochimiques et biophysiques de ces deux porines, et leurs possibles rôles physiologiques. Les structures cristallographiques d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 ont été résolues, révélant une structuration en dimère de trimères (DOT) associés face à face par leurs boucles extracellulaires. Ces structures nous ont permis de formuler l'hypothèse selon laquelle Omp-Pst1 et Omp-Pst2 pourraient participer dans la médiation du contact intercellulaire dans les communautés flottantes de cellules formées par *P. stuartii*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les propriétés d'auto-association de ces porines après reconstitution dans des bicouches lipidiques, ainsi que l'effet de leur expression ectopique dans des bactéries dépourvues de porines sur le phénotype planctonique. Nous avons également investigué la nature des interactions conduisant à la formation de DOTs d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 par mutagenèse dirigée

2.1. Résumé

Chez les eucaryotes, le contact et la communication inter-cellulaire peuvent être favorisés par une variété de jonctions, mais de tels complexes inter-cellulaires n'ont pas été décrits dans les bactéries. Ici, nous montrons que les porines de *P. stuartii* peuvent s'auto-associer en DOT grâce à leurs boucles extracellulaires, formant des complexes qui pourraient servir de jonctions primitives au sein des communautés flottantes de cellules formées par cette bactérie. Ceux-ci se formeraient entre bactéries adjacentes, autorisant un contact étroit et une communication entre celles-ci. Nos données cristallographiques montrent que l'auto-association des porines est médiée par des interactions de type « steric-zipper » hautement spécifiques, suggérant un mécanisme qui restreint le contact

intercellulaire aux cellules d'une même souche, et une possible signature pour identifier d'autres porines formant des jonctions par des moyens computationnels.

2.2. L'auto-association des porines en DOTs permet le contact cellulaire au sein des communautés bactériennes de *P. stuartii*.

Title: Porin self-association enables cell-to-cell contact in *Providencia stuartii* floating communities of cells.

Authors: Mariam El-Khatib^{a,*}, Chady Nasrallah^{a,*‡}, Hind Basbous^a, Que-Tien Tran^b, Daphna Fenel^a, Benoit Gallet^a, Mathilde Lethier^a, Jean-Michel Bolla^c, Michel Vivaudou^a, Jean-Marie Pagès^c, Martin Weik^a, Mathias Winterhalter^b and Jacques-Philippe Colletier^{a*}.

Affiliations:

^a *Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes – CEA – CNRS UMR 5075, F-38044 Grenoble, France*

^b *Jacobs University, Bremen, Germany*

^c *UMR_MDI, Aix-Marseille Université, IRBA, Marseille, France*

[‡] Present address: *Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France*

* These authors contributed equally.

* To whom correspondence should be addressed: colletier@ibs.fr.

Abstract (155 words, should be 150):

Providencia stuartii is a Gram-negative biofilm forming pathogen. It was shown that prior to depositing as a canonical biofilm, *P. stuartii* forms floating communities of plankton, within which adjacent cells are in apparent contact. In eukaryotes, cell-to-cell contact and communication can be promoted by a variety of junctions but no such proteinaceous intercellular complexes have been described in prokaryotes. Here, we report the crystallographic structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2, the two porins of *P. stuartii*. These structures reveal that porins can self-associate through their extracellular loops, forming dimer or trimers (DOTs) that could serve as primitive junctions between planktonic cells. We explored this hypothesis by crystallography, dynamic-light scattering, site-directed mutagenesis, and epifluorescence and electron microscopy. Our results suggest that DOTs support cell-to-cell contact in *P. stuartii*, thereby governing the formation of floating communities of cells. The observation that facing-channels are open in the structures of our DOTs suggest that these could partake in inter-cellular communication.

Introduction:

P. stuartii is an opportunistic pathogen from the *Enterobacteriaceae* family¹ that is involved in increasingly frequent infections in burn victims and patients undergoing long-term catheterization²⁻⁵. Treatment of infections by *P. stuartii* is complicated by its intrinsically strong resistance to a wide range of antibiotics, including most penicillins, aminoglycosides, tetracyclines, cephalosporins of older generations, sulfamethoxazole and fosfomycin^{4,6-8}. This multi-drug resistance phenotype can be partly explained by the presence of an inducible chromosomal AmpC⁸. However, plasmid-encoded extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) including the New Delhi metallo- β -lactamase 1 have also been found in clinical isolates⁹⁻¹⁴. The endemic nature of *P. stuartii* infections is furthermore reinforced by its ability to form biofilms, which can attach and grow on indwelling catheters^{3,15,16} and uroepithelial cells¹⁷. Only few studies have focused on biofilm formation by *P. stuartii* but it has been established that this species expresses three forms of fimbriae associated with erythrocytes adherence^{17,18}. Recently, we reported the microscopic characterization of *P. stuartii*'s biofilms and the unexpected finding that the bacterium remains highly social even in the planktonic state, forming floating communities within which cells presumably stick to one another *via* protein-protein interactions¹⁹. By reinforcing the local concentration of cells and of secreted effectors, the sociability of cells could serve inter-cellular communication in the planktonic state, alike quorum-sensing (QS) in the biofilm state.

Porins are water-filled channels sprinkling the outer-membrane (OM) of Gram-negative bacteria²⁰ and constitute the principal entry route for hydrophilic nutrients and ions into the periplasm. They are generally assembled as trimers, within which each monomer displays a conserved β -stranded architecture that delineates a hydrophilic channel. In most Gram-negative species, a 'major' general-diffusion porin is abundantly expressed, with up to 10⁵ copies per cell (*i.e.* up to 70% of the OM protein content)²¹, suggesting a passive role in inter-communication and sensing. Substrate-specific porins are 18 β -stranded, while porins governed by general diffusion feature 16 β -strands. The sifting properties of general-diffusion porins (referred to as 'porins' throughout the manuscript) are determined by the amino-acid distribution at their constriction zone, contributed by the folding of extracellular loop L3 into the channel lumen.

Current interest in porins stems from their involvement in antibiotic translocation. Porins are hijacked by hydrophilic antibiotics to reach their target and kill the cells. As such, down-

regulation of porin expression, or changes in their coding sequences, have been observed in numerous cases of hospital-acquired antibiotic resistance^{22,23}. Porins have also been shown to participate in a variety of non-diffusive functions, including phage-anchoring and genetic material transfer^{24,25} or small-protein export²⁵. Furthermore, recent reports have hinted at the participation of porins in biofilm formation^{26,27}. The *P. stuartii* genome features two porins, Omp-Pst1 and Omp-Pst2. It was reported that uptake of β -lactams (e.g. cephalosporins and carbapenems, in particular), chloramphenicol, quinolones (e.g. nalixidic acid) and fluoroquinolones (e.g. sparfloxacin) is mainly due to their passive diffusion through Omp-Pst1^{6,7}. Recently, we showed the central role of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 in the rapid adaptation of *P. stuartii* to pH variations and to the high urea concentrations encountered in the urinary tract – its primary habitat in humans. Our study indicated that Omp-Pst1 is essential to *P. stuartii* survival while Omp-Pst2 promotes rapid growth, by regulation of the cationic content of the periplasm¹⁹. Further insights into how Omp-Pst1 and Omp-Pst2 support the pathogenicity of *P. stuartii* require determination of their three-dimensional structures.

Here, we report the crystallographic structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 from *P. stuartii* strain ATCC 29914, of a complex of Omp-Pst1 with maltose, and of a deletion mutant of Omp-Pst1 representative of that expressed by *P. stuartii* strain ATCC 25827, *i.e.* Omp-Pst1- Δ 206-211/N293G. The structures reveal the molecular basis for the distinct ion selectivities of Omp-Pst1 and Omp-Pst2. Analysis of crystal packing interactions unveils that, in crystals, the two porins self-associate face-to-face through their extracellular loops, thereby forming dimers of trimers (DOTs). Reconstitution of either porin into liposomes results in proteoliposome aggregation, while their ectopic expression in a porin-devoid *E. coli* strain induces a shift from the state of isolated plankton to floating communities of cells, reminiscent of those formed by *P. stuartii*. Introduction of charged residues at the DOT interface reduces the ability of both porins to promote proteoliposome aggregation and cell-to-cell contact suggesting an electrostatic driving force for their self-association into DOTs. Crystallographic data furthermore suggest that DOT formation is restricted to cells of the same strain by highly self-selective steric-zippers. Altogether, our results suggest that DOTs of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 support cell-to-cell adhesion and communication, by riveting cells one to another in *P. stuartii* floating communities of cells¹⁹.

Results:***Structures of Omp-Pst1 and of its complex with maltose***

The structure of native Omp-Pst1 was solved in two space groups, C2 (type-I; 3.2 Å resolution) and P2₁2₁2₁ (type-II; 2.7 Å resolution). In both types of crystals, we found a single trimer in the asymmetric unit, although at the unit-cell level, type-I Omp-Pst1 crystals feature a DOT associated through self-matching interactions between extracellular loops of facing trimers (Fig. 1a). In type-II crystals, contact is also observed between extracellular loops, but does not involve self-matching interactions. In both type of crystals, no contact is observed between intracellular turns. The trimeric structures of Omp-Pst1 in type I and type II crystals are similar, superimposing with an rmsd of 0.356 Å, over 1056 residues in the trimeric assembly. Extracellular loops of Omp-Pst1 are mostly folded as α -helices, yet in each monomer, extracellular loop L5 contributes a β -hairpin that erects over the channel entrance and effect in thwarting access to these, in the trimeric assembly (Fig. 2a). In type-I crystals, this hairpin is involved in the crystal-packing interactions that result in build-up of a DOT, within the unit cell (Fig. 1a, b).

As compared to the canonical porins OmpF, OmpC and PhoE from *E. coli*, Omp-Pst1 displays a similar pattern of charge distribution, *i.e.*, Omp-Pst1 channel is overall positively charged (+5e vs. +3e, +3e and +6e in OmpF, OmpC and PhoE, respectively) (Fig. 1i and Supplementary Fig. 1a), with a net charge of +1e at the constriction zone (0e, -2e and 0e in OmpF, OmpC and PhoE) (Fig. 1k, l and Supplementary Fig. 1b). The electrostatic potential profile calculated along the channel of Omp-Pst1 indicates mild anion selectivity (Fig. 1l), in line with electrophysiology measurements and with MD simulations based on this structure²⁸. Nevertheless, the Omp-Pst1 channel features more charged residues than *E. coli* porins (+48, +35 and +20%, respectively), suggesting higher translocation selectivity, and its extracellular vestibule is negatively charged (Fig. 1i, l).

In an attempt to determine whether or not Omp-Pst1 could be involved in the translocation of uncharged nutrients into the periplasm, we soaked type-II crystals of Omp-Pst1 with a mother solution containing 100 mM maltose. In the complex structure, three maltose molecules are found, each bound to a similar binding site in the three monomers. Residues from extracellular loops L1 (K31, E33), L3 (Q121), L6 (R251 and G253), L7 (L300) and L8 (G337, N339) form a groove above the constriction zone within which each maltose establishes 6-8 H-bonds (depending on the monomer), burying ~70% of its accessible surface (Fig. 2b). The fitness of this binding-site and its ideal positioning at the channel entrance

could underlie a role for Omp-Pst1 in harvesting and facilitating the translocation of carbohydrates.

We also note that in all Omp-Pst1 structures, an ion is observed at the interface between the three monomers in a trimer, which is best modelled as a Ca^{2+} ion, stabilized by cation- π interaction with the side chain of Trp62 in each monomer. This ion is at the top of a fourth “channel”, central to the trimer, opened on the intracellular side but insulated from the extracellular bulk by symmetrical interactions between Asn75 side chains from the three monomers.

Structure of Omp-Pst2

The structure of Omp-Pst2 was solved in the $P2_1$ space group, at 2.2 Å resolution. A DOT is observed in the asymmetric unit, formed by the face-to-face, self-matching interaction of two trimers through their extracellular loops (Fig. 1e, f). Within the DOT, the two trimers are related by quasi-perfect non-crystallographic C2 symmetry, *i.e.* Omp-Pst2 and type-I Omp-Pst1 DOTs reveal a similar oligomeric assembly (Fig. 1a, b, e, f). The extracellular loops of Omp-Pst2 are mostly folded as α -helices (Fig. 2c), and contribute an additional constriction zone at the entrance of the channel that could affect the diffusion of large solutes across Omp-Pst2 (Fig. 1j, k). As compared to *E. coli* OmpF, OmpC and PhoE, the Omp-Pst2 channel features a similar amount of charged residues (+20, -8 and -4%, respectively), but is characterized by its acidic nature (Supplementary Fig. 1c). The net charge of Omp-Pst2 channel is indeed -4e at the constriction zone (5 Å radius) suggesting strong cation selectivity (Supplementary Fig. 1d). This hypothesis is supported by electrophysiology measurements²⁸. Calculations of the electrostatic potential along the Omp-Pst2 channel furthermore suggest a facilitated transport of cations from the intracellular to the extracellular side of the porin (Fig. 1j, l), in line with recent MD simulations based on the Omp-Pst2 crystal structure. We note that as in Omp-Pst1 crystals, no contact is observed between intracellular turns, and a fourth “channel” is apparent at the center of the trimeric complex. This channel is also open on its intracellular end, but closed at its extracellular end by symmetrical interactions between Asn72 side chains from the three monomers (equivalent to Omp-Pst1 Asn75). An ion is again observed bound at the top of this channel, which was best modelled as a SO_4^{2-} , stabilized by anion- π interaction with the side chain of Trp59 from each monomer.

Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs are locked-in by three single-layered steric-zippers

In Omp-Pst2 and in type-I Omp-Pst1 crystals, packing is supported by the face-to-face interaction of two trimers *via* their extracellular loops (Fig. 1a, b, e, f). In both DOTs, the dimerization interface delineates a large negatively-charged cavity (volumes of 30,610 and 37,959 Å³ for Omp-Pst1 and Omp-Pst2, respectively) (Fig. 1i, j). The cavity of Omp-Pst2 is accessible from the bulk *via* three ellipsoidal fenestrations of 17 × 29 Å (Fig. 1e, f, j), while that of Omp-Pst1 is insulated from the bulk and presumably permeable to waters only (Fig. 1a, b, i). The buried surface areas per facing trimers are 921 Å² for Omp-Pst1 and 1215 Å² for Omp-Pst2 DOTs, *i.e.* values above the threshold of 856 Å² that has been proposed to discriminate between artificial and biological dimers in crystal structures²⁹. For a comparison, the buried surface area per facing trimers is 350 Å² in type-I Omp-Pst1 crystals. The surface complementary between facing trimers of the DOT is 0.39 for Omp-Pst1 and 0.64 for Omp-Pst2. The latter value is close to that displayed by antibody-antigen complexes, *viz.* 0.65³⁰.

The DOTs formed by Omp-Pst1 and Omp-Pst2 are singular in that they appear to be supported by steric-zipper interactions – a structural motif that has to date been observed only in prions and amyloid fibers. Steric-zippers form from the tight interdigitation of side chains emanating from equivalent residues in short self-matching sequences (4-11 residues) and they are by nature highly self-selective. In amyloid and prion assemblies, steric-zippers associate β-sheets into highly-ordered fibers⁴⁰⁻⁴². In contrast, the steric-zipper interfaces that form between facing monomers of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 are single-layered and differ in the two porins. In Omp-Pst1, the three single-layered steric-zipper interfaces are contributed by residues 205-AGVVTSE-211 from extracellular loop L5, and would belong to the symmetry class III of steric zippers (face-to-face; up-down)³¹ (Fig. 1c, d and Fig. 3a), with a 15° tilt between the two facing β-strands. This interface is solely reinforced by weak electrostatic interaction (distance ≥ 3.5Å) between K28 and D213 from facing extracellular loops L1 and L5, respectively. The formation of Omp-Pst1-29914 DOTs thus appears fully governed by extracellular loop L5. In Omp-Pst2, residues 282-NLGNYG-287 from extracellular loop L7 contribute a short, non-tilted, self-matching interface that would correspond to the symmetry class I of steric-zippers³¹ (face-to-face, up-up) (Fig. 1g, h and Fig. 3b). The three single-layered steric-zipper interfaces are further complemented by a network of H-bonds, which fastens extracellular loops L5, L7 and L8 from facing monomers (Fig. 1g). Of note, Omp-Pst1 features a 290-NLGNGY-295 sequence in its extracellular loop L7, similar to the 282-NLGNYG-287 sequence of Omp-Pst2. However, the L5 β-hairpin protrusion that contributes

the 205-AGVVTSE-211 steric-zipper interface renders L7 inaccessible in Omp-Pst1 (Supplementary Fig. 2). We note that the 208-VTSEGDSYY-216 insertion in L5 which contributes this hairpin is a unique feature of Omp-Pst1 from *P. stuartii* strain ATCC 29914. To challenge the steric-zipper propensity of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 segments involved in their respective dimerization into DOTs, we crystallized the corresponding peptides in isolation of their respective parent proteins. For each, we chose the smallest fragment hypothetically involved in the interaction, *viz.* 206-GVVTSE-211 from Omp-Pst1 and 283-LGNY-286 from Omp-Pst2. Both peptides produced urchin-like micro-crystals, from which their structures were solved by X-ray crystallography at 1.7 and 1.0 Å resolution, respectively (Fig. 3a, b). The two peptides display canonical cross- β structures, characterized by the in-register stacking of strands into sheets, and by the mating of these *via* a steric-zipper, perpendicular to the fiber axis. Thus, both GVVTSE and LGNY are prone to form steric-zippers in isolation of their respective parent proteins. Of interesting note, 283-LGNY-286 offers the first class-III steric zipper structure ever to be determined, providing final validation for the proposed eight symmetry-classes of steric zippers³¹.

The proneness of GVVTSE and LGNY to form steric-zippers in isolation as well as in porin DOTs questions whether or not methods successful at predicting steric-zipper occurrence would have singled these motifs based on Omp-Pst1 and Omp-Pst2 sequences. We used the ZipperDB server (<http://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/>) to calculate the propensity of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 segments to form a steric zipper. Briefly, the server uses the 3D profile method³² to score hexa-peptidic segments along a protein sequence; scores below -19 and -23 kcal/mol designate sequences that likely or inevitably form a steric-zipper, respectively³³. This method identified 206-GVVTSE-211 (from Omp-Pst1 L5) and 282-NLGNYG-287 (from Omp-Pst2 L7) as highly prone to form steric zippers, with scores of -26.2 and -22.1 kcal/mol, respectively (Supplementary Fig. 2). Other segments prone to form a steric-zipper in Omp-Pst1 and Omp-Pst2 are all either unexposed as a part of the membrane-embedded β -barrel, or part of extracellular loops involved in the forming of α -helices (Supplementary Fig. 2), in line with previous findings³³. Nonetheless, it was recently shown that amphipathic α -helices can also self-associate into amyloid-like fibers³⁴. Hence, extracellular loops folded as α -helices could hypothetically support the formation of DOTs as well.

Omp-Pst1 and Omp-Pst2 display self-interaction properties *in vitro*

The observation that Omp-Pst1 and Omp-Pst2 crystallize as DOTs challenged us to investigate whether or not they display adhesion properties *in vitro*. If so, reconstitution of either porin into liposomes should lead to proteoliposome aggregation – a process that can be monitored by means of dynamic light scattering (DLS). Real-time monitoring of proteoliposome aggregation required the use of the direct-dilution method to reconstitute porins into liposomes. We thus first investigated the optimal pH to insert Omp-Pst1 and Omp-Pst2 into preformed ~60-nm radius liposomes by direct dilution of the porin into liposome solutions buffered at pH 4-8. Using sucrose gradient to separate liposomes, proteoliposomes and porins³⁵, we found that an acidic pH favours the insertion of *P. stuartii* Omp-Pst1 and Omp-Pst2 and *E. coli* OmpF into liposomes (Supplementary Fig. 3). We then used DLS to monitor the average hydrodynamic radius of the proteoliposome aggregates which form, at pH 4, upon mixing of preformed liposomes with increasing concentrations of Omp-Pst1 or Omp-Pst2. We found that insertion of either porin into liposomes results in a fast (~30-45 s) and porin-concentration dependent aggregation of proteoliposomes (Fig. 4a). In electron micrographs, proteoliposomes formed at 10 μ M porin concentration display periodic order, forming stacks of bilayers (Supplementary Fig. 4). Those formed by Omp-Pst2 are quasi-crystalline, further exemplifying the strong tendency of this porin to self-associate, laterally and axially. To further ascertain the presence of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 in proteoliposome aggregates, we labelled lipids and porins specifically, and examined porin-induced proteoliposome aggregation by epifluorescence microscopy (Fig. 4b). To specifically label Omp-Pst1 and Omp-Pst2, we engineered a cysteine at the C-terminal extremity of their L5 loop (Omp-Pst1-K221C and Omp-Pst2-K211C), and derivatised the resulting mutants using a maleimide-coupled green fluorophore (Alexa488). Fluorescent liposomes were prepared by introduction of a red fluorescent lipid (rhodamine derivative) in the bilayer composition. Both Omp-Pst1-K221C and Omp-Pst2-K211C retained the property of their parent porins to induce proteoliposome aggregation in DLS experiments. In epifluorescence micrographs, we furthermore could observe a colocalization of the fluorescence signals arising from the lipids and the porins. Importantly, the observation that Omp-Pst1-K221C mutant maintains the ability to self-associate eliminates the possibility that the interface revealed by type-II crystals would be relevant for proteoliposome aggregation, since the H-bond between K221(NZ) and N293(O) is central to this interface.

Self-association of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 is driven by electrostatic interactions:

We challenged the self-association of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 into DOTs by site-directed mutagenesis. Specifically, we aimed at disrupting steric-zipper interactions by suppression of H-bonds, of a full interface or by electrostatic repulsion. First, we challenged the steric-zipper interface observed in Omp-Pst1 DOTs, either by introduction of point mutations in L5 and L7 (Omp-Pst1-D213R, Omp-Pst1-N293G, and Omp-Pst1-D213R/N293R), or by deletion of the full L5 β -hairpin that support this interface (Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G). The charge-altering mutations D213R and D213R/N293R, engineered at select contacts based on the DOT structure, respectively reduced and suppressed the ability of Omp-Pst1 to induce proteoliposome aggregation (Fig. 5a, b). The L7 mutant Omp-Pst1-N293G, designed to destabilize extracellular loop L5 by suppression of the strong H-bond (2.4 Å) between N293(OD1) and Tyr216(N), was unable to promote proteoliposome aggregation, supporting the hypothesis that extracellular loop L5 is central to Omp-Pst1 self-association (Fig. 5a, b). The inability of Omp-Pst1-N293G to induce proteoliposome aggregation is yet fully reversed by deletion of the full L5 β -hairpin, *viz.* Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G (Fig. 5a, b). Hence, the self-association properties of Omp-Pst1 are impacted by electrostatic repulsion or destabilization of the L5 β -hairpin, but not by the bold suppression of the steric-zipper interface. Likewise, two Omp-Pst2 mutants aimed at disrupting the 282-NLGNYG-287 steric-zipper interface, *viz.* Omp-Pst2 N283G and Omp-Pst2-G282R/N283G, showed increased ability to induce proteoliposome aggregation (Fig. 5c, d). Again, only the Omp-Pst2-G282R/N283K mutant, with two positive charges added side-by-side, displayed a reduced ability to induce proteoliposome aggregation – reminiscent of Omp-Pst1-D213R/N293R. Hence, the main driving force behind Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOT formation is likely electrostatic attraction, with single-layered steric-zipper interaction between facing monomers possibly underlying a slotting mechanism that regulates DOT formation.

To verify this hypothesis, we crystallized Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G and solved its structure at 3.2 Å resolution (Supplementary Fig. 5). Reminiscent of type-I Omp-Pst1 crystals, those of Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G belonged to the C2 space group, and revealed the presence of a DOT at the unit cell level. The buried surface area per facing trimer is 1,126 Å² and the dimerization interface delineates a large negatively-charged cavity characterized by a volume of 24,540 Å³. Electrostatic interactions between extracellular loops are at the basis of this DOT, which is not supported by steric-zipper interactions and wherein facing channels do not join at their extracellular ends – in contrast with DOTs formed by both Omp-Pst1 and Omp-Pst2. Rather, one monomer from each trimer plugs into the center of the facing

trimer. Each of the two central monomers of the DOT establishes contact with the three facing monomers through extracellular loops L7 (to L4 in a first monomer), L8 (to L6 and L8 in a second monomer) and L5 (to L5 in the third monomer). The two first interaction zones are polar, respectively featuring a H-bond between Asp296(OD2) and Met168(N), and H-bonds between NZ atoms of K328 and K334 and the main chain carbonyl oxygen of Glu335 and Asp254. The Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G DOT is nevertheless leaky, showing reduced surface complementarity between facing trimers (0.37) and featuring six large ellipsoidal fenestrations (up to 7 x 20 Å). As mentioned already, ATCC 29914 is the only *P. stuartii* strain across all sequenced so far that features a 208-VTSEGDSYY-216 insertion in L5. Hence, the DOT revealed by Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G could be representative of those formed by Omp-Pst1 from *P. stuartii* strain ATCC 25187, which lacks the L5 insertion but is otherwise 92.4 % similar to Omp-Pst1 from strain 29914.

Self-interaction of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 enables cell-to-cell contact in P. stuartii

Our structural data revealed the formation of DOTs, whose adhesion properties were challenged *in vitro* by a combination of DLS, electron microscopy, epifluorescence microscopy, and site-directed mutagenesis. We then asked whether such intercellular structures could form *in vivo*, *i.e.* between porins harbored in the outer-membrane of adjacent cells. *P. stuartii* is indeed highly-social, forming floating communities of cells even in the planktonic state¹⁹. As porins are the most abundant proteins in the outer membrane of Gram-negative bacteria, their DOTs could contribute to this phenotype.

In earlier work, we faced difficulties producing a *P. stuartii* strain deleted for the Omp-Pst1 porin, suggesting that this porin is essential to the bacterium survival and that a deletion strategy would be inadequate to address the role of porins in cell-to-cell contact; indeed, all our viable *P. stuartii* strains express at least one porin. Hence, we here opted for an ectopic expression strategy, using as a surrogate for *P. stuartii* a strain of *E. coli* BL21 deleted of its major porins OmpF, OmpC, OmpA and LamB, *viz.* *E. coli* Δ Omp8³⁶. Note that the Δ Omp8 strain is also that which we used to overexpress porins (see Methods). As compared to BL21, this strain displays reduced growth and fitness, and is characterized by a longer lag-phase (Supplementary Fig. 6a). Like *E. coli* BL21, however, it does not form detectable floating communities of cells or biofilms (Fig. 6). Ectopic expression of either Omp-Pst1 or Omp-Pst2 restores normal growth and reduces the lag phase displayed by Δ Omp8 (Supplementary Fig. 6a-c). Furthermore, it confers to *E. coli* Δ Omp8 cells the ability to form floating communities of cells. Note that formation of these communities is independent of that

of canonical (per se, adherent) biofilms, which the Δ Omp8 strain remains unable to form (Fig. 6). Δ Omp8 cells expressing mutated versions of Omp-Pst1 (D213R, N293G, D213R/N293R, Δ 207-216/N293G) or Omp-Pst2 (N283G, G282R/N283G, G282R/N283K) display similar growth and lag phases as cells expressing wild-type Omp-Pst1 and Omp-Pst2, and they as well remain unable to form biofilms (Supplementary Fig. 7). Strikingly, however, Δ Omp8 cells expressing Omp-Pst1 and Omp-Pst2 mutants that are able to induce aggregation of proteoliposomes *in vitro* (Fig. 5) form floating communities of cells, whereas those expressing mutants inept at self-associating *in vitro*, do not (Fig. 7). Taken together, these results establish that porins enable cell-to-cell contact in *P. stuartii* floating communities of cells, and suggest that porin DOTs are driving force for intercellular assembly (Fig. 7 and Supplementary Fig. 7). As the formation of floating communities of cells precedes that of canonical biofilms, DOTs could also be at the origin of cell-to-cell contacts within the core of biofilms (Supplementary Fig. 8).

Discussion:

Earlier, we reported on the sociability of *P. stuartii* cells and on their resistance to a variety of environmental insults encountered in their principal habitat in humans – that is, the urinary tract¹⁹. We notably showed that in the planktonic state, *i.e.*, prior to attachment on a surface and subsequent formation of a canonical biofilm, *P. stuartii* cells form floating communities seemingly associated through their OM. Our work suggested essentiality of Omp-Pst1 for *P. stuartii* survival, and revealed that Omp-Pst2 plays a role in the adaptation to varying pH and high urea concentration of *P. stuartii* – as encountered in the urinary tract.

In the present study, we sought to solve the crystallographic structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2, and unexpectedly found that both form DOTs self-associated through their extracellular loops. Using liposome-based assays, we showed that Omp-Pst1 and Omp-Pst2 display self-association properties *in vitro*. By means of ectopic expression in a porin-devoid strain of *E. coli* Δ Omp8, we showed that expression of Omp-Pst1 or Omp-Pst2 endows these cells with the capability to form floating communities of cells. Altogether, these results show that the self-association of porins from adjacent cells can sustain cell-to-cell contact between these. Our crystal structures reveal two modes of self-association between extracellular loops; either ‘side-by-side’, as observed in type-II crystals of Omp-Pst1, or ‘face-to-face’, as observed in crystals of Omp-Pst2 and type-I crystals of Omp-Pst1. Only the latter mode of interaction, which yields DOTs, should be of physiological relevance, based on buried surface area statistics. Nonetheless, we cannot exclude that porin oligomers other than DOTs could participate in cell-to-cell contact.

Within DOTs, facing channels are opened, suggesting that would these form between two cells, they could provide an effective conduit for exchange of signalling solutes or nutrients by passive diffusion. It is known that cells exchange chemical information within biofilms through a quorum sensing (QS) mechanism that orchestrates the phenotypic adaptation undergone by bacteria as they morph from their planktonic state to the multicellular biofilm state³⁷. QS is also involved in cell adaptation to local environmental changes²⁰ and in the release of cells from the biofilm. Because QS relies on the diffusion of chemical effectors, critical cell density and/or limited diffusion volume is required for this signalling to be effective. It had as yet remained unclear how soluble QS effectors can mediate intercellular communication in the first stages of biofilm formation, *i.e.*, when the cell density is low and no surrounding matrix is present. Our data suggest that porin DOTs could allow the formation of primitive junctions between *P. stuartii* cells, thereby enabling QS prior to biofilm

formation. The crystallographic structures show that Omp-Pst1 forms more hermetic DOTs (virtually no fenestrations) than Omp-Pst2, suggesting that intercellular solute translocation would be more efficient in Omp-Pst1 DOTs (Fig. 1b, f). Also, the presence of an additional constriction zone in Omp-Pst2 channel could limit large solute exchange across Omp-Pst2 DOTs (Fig. 1j, k).

The channel of Omp-Pst1 is mildly anion-selective whereas that of Omp-Pst2 is strongly cation-selective, suggesting that the two porins are involved in the transport of different solutes (Fig. 1i-l). For example, our structure of maltose-bound Omp-Pst1 suggests that this porin could be involved in the harvesting and the concentration of maltose and other di-glycosides at the surface of the OM (Fig 2b). The binding site for maltose is not affected by the formation of Omp-Pst1 DOTs – not even those formed by the Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G mutant presumably representative of the Omp-Pst1 variant from ATCC 25187. Hence, Omp-Pst1 DOTs could contribute to the equilibration of di-glycoside concentrations between adjacent cells. In Omp-Pst2, to the contrary, the protrusion contributed by the longer L6 loop prevents the binding of such solutes. Furthermore, Omp-Pst2 is cation-selective, and the electrostatic potential developed along its channel suggests a facilitated transport of cations from the periplasm to the bulk (Fig. 1l). In pathophysiological conditions where *P. stuartii* cells bath in high urea concentrations²⁻⁵, Omp-Pst2 could facilitate the export of the ammonium that accumulates in the periplasm, due to the cytoplasmic urease activity¹⁹. MD simulations have revealed that the propensity to gate of Omp-Pst2 increases when cations (potassium ions in MD simulations) translocate from the extracellular to the periplasmic side of the porin. Hence, Omp-Pst2 DOTs could function there as double-valves, allowing adjacent cells to expel cationic waste through fenestrations at the dimerization interface, while not re-absorbing it. Our recent work on *P. stuartii* strain ATCC 29914 supports the hypothesis of an essential role of Omp-Pst2 in the regulation of the cationic content of the periplasm¹⁹.

Structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 evidence that steric-zipper interactions like those that contribute the spine of prion and amyloid fibers³¹ can promote a face-to-face association of porins into DOT. Indeed, both Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs are supported by three single-layered steric-zippers forming between equivalent residues from facing extracellular loops (Fig. 1). The steric-zipper motifs differ in Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs, being contributed by segments 206-GVVTSE-211 from extracellular loop L5, in Omp-Pst1, and 283-LGNY-286 from extracellular loop L7, in Omp-Pst2 (Fig. 1d, h). The propensity of these segments to

form steric-zippers was challenged experimentally, by crystallizing the corresponding peptides (Fig. 3), and computationally, using the 3D-profile method^{32,33} (Supplementary Fig. 2). The two approaches showed that segments 206-GVVTSE-211 and 283-LGNY-286 are highly prone to form steric zippers. Using side-directed mutagenesis, we nevertheless could exclude that steric-zippers drive the formation of OmpPst1 and Omp-Pst2 DOTs (Fig. 5, 7). Rather, these self-associate under the impulse of electrostatic interactions, with steric zippers likely only serving the slotting of the two trimers on one another. Accordingly, destabilization of the steric zipper interface by unfastening of the L5 β -hairpin in Omp-Pst1-N293G abolishes self-association *in vitro* and *in vivo*, but further deletion of the complete β -hairpin restores it (Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G). Steric-zippers are highly self-specific, supporting the selection of strains based on self-templating prions, in yeast, and the enrichment of select polymorphs of fibers that differs in toxicity and shape, in amyloid diseases³⁹. We hypothesize that in *P. stuartii* porins, they could serve the regulation of DOT formation, restricting contact and cross-talk to cells of the same strain only.

Our results highlight a previously uncharacterized role for porins, *i.e.* to form primitive junctions between *P. stuartii* cells, thereby favoring the formation of floating communities, in the planktonic state (Fig. 6-8). We observed that the cells in the first layers of *P. stuartii* biofilms display the same phenotype as those in floating communities of cells (Supplementary Fig. 8a, b) – that is close contact between their outer-membranes. Floating communities of cells associated through DOTs could provide a scaffold for biofilm genesis, allowing attachment of critical mass and efficient communication in the initial stage of biofilm formation. Hence, Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs could be targeted to challenge the sociability of *P. stuartii* cells. It remains unclear, however, if porin DOTs also form between cells of other species. Examination of porin structures deposited in the wwPDB, and of their crystal packing interactions, reveals that many crystallize as DOTs associated through their extracellular loops. Trimeric PorB from *Neisseria meningitidis* (PDB accession codes: 3wi4, 3wi5) and *Neisseria gonorrhoeae* (4aui), OprB from *Pseudomonas putida* (4gey, 4gf4), Occk4, OpdD/Occk7, OpdN/Occk10, OpdQ and OpdL from *Pseudomonas aeruginosa* (3t0s, 4ftr, 4fso, 3t24 and 2y0h, respectively) all self-associate through identical segments in their extracellular loops. The list extends to *E. coli* OmpC variants from clinical isolates (2xe1, 2xe2, 2xe5) or crystallized in the presence of antimicrobial lactoferrin (2j4u), to NanC crystallized without resorting to expression in inclusion bodies, and to OmpF crystallized in a

lipidic cubic phase (3poq, 3pou, 3pox). Yet, none of these DOT structures feature the tight interdigitation of side chains characteristic of a steric zipper. Accordingly, DLS measurements on liposomes harbouring *E. coli* OmpF did not indicate a propensity to self-associate in the range of concentrations we tested (Fig. 4), nor did the 3D-profile method uncovered segments of its extracellular loops highly prone to form steric-zippers. In contrast, segments involved in Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs were clearly identified by the 3D-profile method (Supplementary Fig 2). Hence, while formation of porin DOTs may not be an apanage of *P. stuartii*, it could be regulated by steric-zippers in a subset of species only. From a more general standpoint, self-matching interactions between porins engineered to harbour steric-zipper prone segments in their extracellular loops could be exploited for the design of artificial proteolipidic tissues and to engineer sieving properties into these.

Acknowledgments: We warmly thank D. Cascio, M.R. Sawaya, D.S. Eisenberg and J. Zaccari for critically reading the manuscript. We thank C. Breyton and D. Levy for suggesting on-column delipidation of porins and sucrose gradient experiments, respectively. We thank A. Martel, A. Flayhan, A. Laganowsky, A. Davin-Regli, E. Moiseeva, M. Zhao and T. Vernet for stimulating discussions. We are indebted to I. Snigireva for scanning electron micrographs and to J.-P. Kleman and F. Lacroix for their technical support and advices during epifluorescence microscopy experiments. This work used the platforms of the Grenoble Instruct Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscopy facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), the CNRS, the CEA, the University of Grenoble, EMBL, and the GIS-Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie (IBISA). We are grateful to the ESRF for beam-time under long-term projects MX722, MX1464 and MX1583 (IBS BAG). We acknowledge financial support by CEA, CNRS, Université Grenoble Alpes, ANR (Grant Nr. ANR-15-CE18-0005-02 to J.-P.C), GRAL (Grants Nr. C7H-LXG11A20-DYNAMOP and C7H-LXG11A20-COLLETIER to J.-P.C), NIH (Grant Nr. 5R01EB007047-06 to M.V.), the Aix-Marseille University and the Service de Santé des Armées (to J.-M.P.). M.E.K. is supported by a joint CEA-GRAL doctoral fellowship.

Author contributions: M.E.K., C.N. and J.P.C. designed research. M.E.K., C.N., H.B. and M.L. prepared samples and performed biophysical experiments; M.E.K., C.N. and J-P.C. analysed the data; M.E.K., B.G., D.F., and G.S. performed microscopy; Q-T.T., J.-M.B. J.-M.P., M.W., M.W. and M.V. contributed new materials; J-P.C wrote the manuscript with inputs from all authors.

Author information: Authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to colletier@ibs.fr.

File deposition: Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank under the following accession codes: Omp-Pst1 type-I (4d64), Omp-Pst1 type-II

(5nxr), maltose complex with Omp-Pst1 type-II (5nxu), Omp-Pst2 (4d65), 283-LGNY-286 (5n9i) and 206-GVVTSE-211 (5n9h), and Omp-Pst1- Δ 207-216-N293G (5nxn).

References:

1. Manos, J. & Belas, R. in *Prokaryotes* **3.3.12**, 245–269 (2006).
2. McHale, P. J., Walker, F., Scully, B., English, L. & Keane, C. T. *Providencia stuartii* infections: a review of 117 cases over an eight year period. *J. Hosp. Infect.* **2**, 155–165 (1981).
3. Stickler, D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **5**, 598–608 (2008).
4. Warren, J. W. *Providencia stuartii*: a common cause of antibiotic-resistant bacteriuria in patients with long-term indwelling catheters. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 61–67 (1986).
5. Warren, J. W. The catheter and urinary tract infection. *Med. Clin. North Am.* **75**, 481–493 (1991).
6. Tran, Q.-T. *et al.* Implication of Porins in β -Lactam Resistance of *Providencia stuartii*. *J. Biol. Chem.* **285**, 32273–32281 (2010).
7. Bajaj, H. *et al.* Antibiotic Uptake through Membrane Channels: Role of *Providencia stuartii* OmpPst1 Porin in Carbapenem Resistance. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 10244–10249 (2012).
8. STOCK, I. & WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* strains. *J. Med. Microbiol.* **47**, 629–642 (1998).
9. McGann, P. *et al.* Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying bla(NDM-1) in a *Providencia stuartii* strain isolated in Afghanistan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1673–1679 (2012).
10. Tumbarello, M. *et al.* ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 277–282 (2004).
11. Lahlaoui, H. *et al.* Nosocomial dissemination of extended-spectrum β -lactamase VEB-1a-producing *Providencia stuartii* isolates in a Tunisian hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **30**, 1267–1270 (2011).
12. Mnif, B. *et al.* Nosocomial dissemination of *Providencia stuartii* isolates carrying bla OXA-48, bla PER-1, bla CMY-4 and qnrA6 in a Tunisian hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 329–332 (2013).
13. Giakkoupi, P. *et al.* Circulation of a multiresistant, conjugative, IncA/C plasmid within the nosocomial *Providencia stuartii* population in the Athens area. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **82**, 62–64 (2015).
14. Zavascki, A. P. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Providencia stuartii* in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **33**, 627–630 (2012).
15. Broomfield, R. J., Morgan, S. D., Khan, A. & Stickler, D. J. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1367–1375 (2009).
16. Hollick, G. E. *et al.* Characterization of endemic *Providencia stuartii* isolates from

patients with urinary devices. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **3**, 521–525 (1984).

17. Mobley, H. L., Chippendale, G. R., Tenney, J. H. & Warren, J. W. Adherence to uroepithelial cells of *Providencia stuartii* isolated from the catheterized urinary tract. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2863–2872 (1986).
18. Mobley, H. L. *et al.* MR/K hemagglutination of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria. *J. Infect. Dis.* **157**, 264–271 (1988).
19. Khatib, M. E. *et al.* *Providencia stuartii* form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults. *PLOS ONE* **12**, e0174213 (2017).
20. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **67**, 593–656 (2003).
21. Zeth, K. & Thein, M. Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochem. J.* **431**, 13–22 (2010).
22. Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382–388 (1994).
23. Pagès, J.-M., James, C. E. & Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 893–903 (2008).
24. Chatterjee, S. & Rothenberg, E. Interaction of Bacteriophage I with Its E. coli Receptor, LamB. *Viruses* **4**, 3162–3178 (2012).
25. Zhao, H., Sequeira, R. D., Galeva, N. A. & Tang, L. The host outer membrane proteins OmpA and OmpC are associated with the Shigella phage Sf6 virion. *Virology* **409**, 319–327 (2011).
26. Ficarra, F. A. *et al.* *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. *Mol. Plant Pathol.* (2016). doi:10.1111/mpp.12433
27. Cattelan, N. *et al.* Outer membrane protein OmpQ of *Bordetella bronchiseptica* is required for mature biofilm formation. *Microbiol. Read. Engl.* **162**, 351–363 (2016).
28. Song, W. *et al.* Understanding Voltage Gating of *Providencia stuartii* Porins at Atomic Level. *PLoS Comput Biol* **11**, e1004255 (2015).
29. Ponstingl, H., Henrick, K. & Thornton, J. M. Discriminating between homodimeric and monomeric proteins in the crystalline state. *Proteins* **41**, 47–57 (2000).
30. Lawrence, M. C. & Colman, P. M. Shape complementarity at protein/protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **234**, 946–950 (1993).
31. Sawaya, M. R. *et al.* Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453–457 (2007).
32. Eisenberg, D., Bowie, J. U., Lüthy, R. & Choe, S. Three-dimensional profiles for analysing protein sequence-structure relationships. *Faraday Discuss.* 25–34 (1992).

-
33. Goldschmidt, L., Teng, P. K., Riek, R. & Eisenberg, D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3487–3492 (2010).
34. Tayeb-Fligelman, E. *et al.* The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM α 3 reveals a cross- α amyloid-like fibril. *Science* **355**, 831–833 (2017).
35. Lévy, D., Gulik, A., Bluzat, A. & Rigaud, J. L. Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1107**, 283–298 (1992).
36. Prilipov, A., Phale, P. S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J. P. & Koebnik, R. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 65–72 (1998).
37. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 114–122 (2003).
38. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond. Engl.* **358**, 135–138 (2001).
39. Eisenberg, D. & Jucker, M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **148**, 1188–1203 (2012).
40. Garavito, R. M. & Rosenbusch, J. P. Isolation and crystallization of bacterial porin. *Methods Enzymol.* **125**, 309–328 (1986).
41. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800 (1993).
42. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
43. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins* **23**, 318–326 (1995).
44. Sheldrick, G. M. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 479–485 (2010).
45. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
46. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
47. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
48. Unni, S. *et al.* Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *J. Comput. Chem.* **32**, 1488–1491 (2011).
49. Smart, O. S., Neduelil, J. G., Wang, X., Wallace, B. A. & Sansom, M. S. HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. Mol.*

Graph. **14**, 354–360, 376 (1996).

50. Thompson, M. J. *et al.* The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4074–4078 (2006).

51. Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7190–7195 (1999).

52. de Jong, I. G., Beilharz, K., Kuipers, O. P. & Veening, J.-W. Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using Automated Time-lapse Microscopy. *J. Vis. Exp. JoVE* (2011). doi:10.3791/3145

Figures:

Fig. 1 | Omp-Pst1 and Omp-Pst2 form dimers of trimers (DOTs). (a) Lateral view of the Omp-Pst1 DOT. The presumed positions of outer-membranes (OMs) are shown in grey. (b) Same view after 60° vertical rotation. (c) Interaction region (circled in panel b) between facing monomers. (d) Enlarged view of center of panel c showing a symmetry-class III steric zipper that is buried in the core of the DOT structure. (e, f, g, h) Equivalent views of the Omp-Pst2 DOT. Main differences are the ellipsoidal fenestrations evident in panel e, and the presence of a symmetry-class I steric zipper in panel f. (i) The dimerization interface of the Omp-Pst1 DOT, viewed as in panel b, delineates a large negatively charged cavity. The electrostatic potential is mapped on the solvent-accessible surface. (j) Equivalent representation of Omp-Pst2. In panels (i) and (j), white arrows indicate constrictions along the porin channels, whereas yellow arrows indicate possible translocation pathways across porin DOTs – viz. between the periplasm of two adjacent cells, along porin channels, or between the periplasmic space of each cell and the external medium, through fenestrations of the DOTs. (k) Effective radii measured along Omp-Pst1 (green), Omp-Pst2 (blue) and *E. coli* porins channels using a 1-Å positively-charged rolling probe (equivalent to a proton). The y-axis indicates vertical position along the channels from periplasmic to extracellular ends, with reference to the central constriction zone ($z=0$) contributed by L3. Channels of Omp-Pst1, Omp-Pst2 and *E. coli* porins all display similar radii at their central constriction zone, but Omp-Pst2 channel features an additional constriction zone in its extracellular vestibule. (l) Equivalent plots of electrostatic potentials associated with the translocation of a proton, indicating that Omp-Pst1 is mildly anion-selective, while Omp-Pst2 is strongly cation-selective. The energy profile of Omp-Pst2 further suggests a facilitated transport of cations from the periplasm to the external medium.

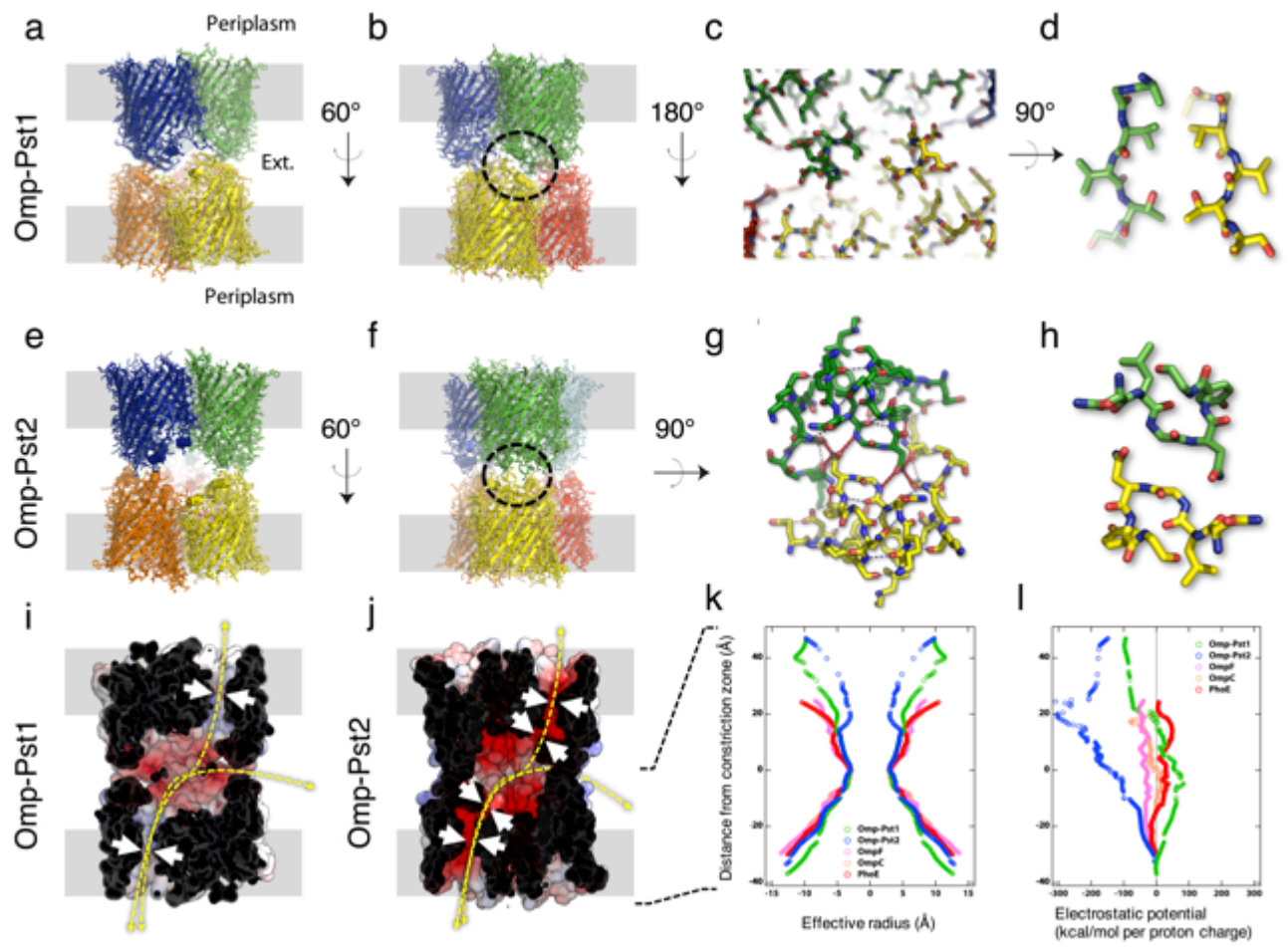


Fig. 2 | The segments involved in the formation of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs also form steric zippers in isolation of their parent protein. (a, b) Both 206-GVVTSE-211 from Omp-Pst1 (a) and 283-LGNY-286 from Omp-Pst2 (b) form single-layered steric zippers in the DOT structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2, respectively (left panels). The 206-GVVTSE-211 and 283-LGNY-286 steric-zippers respectively would belong to symmetry classes III and I, respectively. In isolation, the GVVTSE and LGNY peptides also form steric zippers (middle and right panels), as revealed by their crystal structures solved at 1.7 and 1.0 Å resolution, respectively. The middle panels show the steric-zipper interfaces. The right panels show a view of 90° apart which reveal that both GVVTSE and LGNY adopt a canonical cross- β structure, whereby the steric zipper repeats itself every 4.8 Å through hydrogen bonding along a fiber axis. In the peptide structures, GVVTSE and LGNY form steric zippers that belong to symmetry classes I and III, respectively. In all panels, the corresponding refined 2mFo-DFc electron density map is contoured at 1 σ .

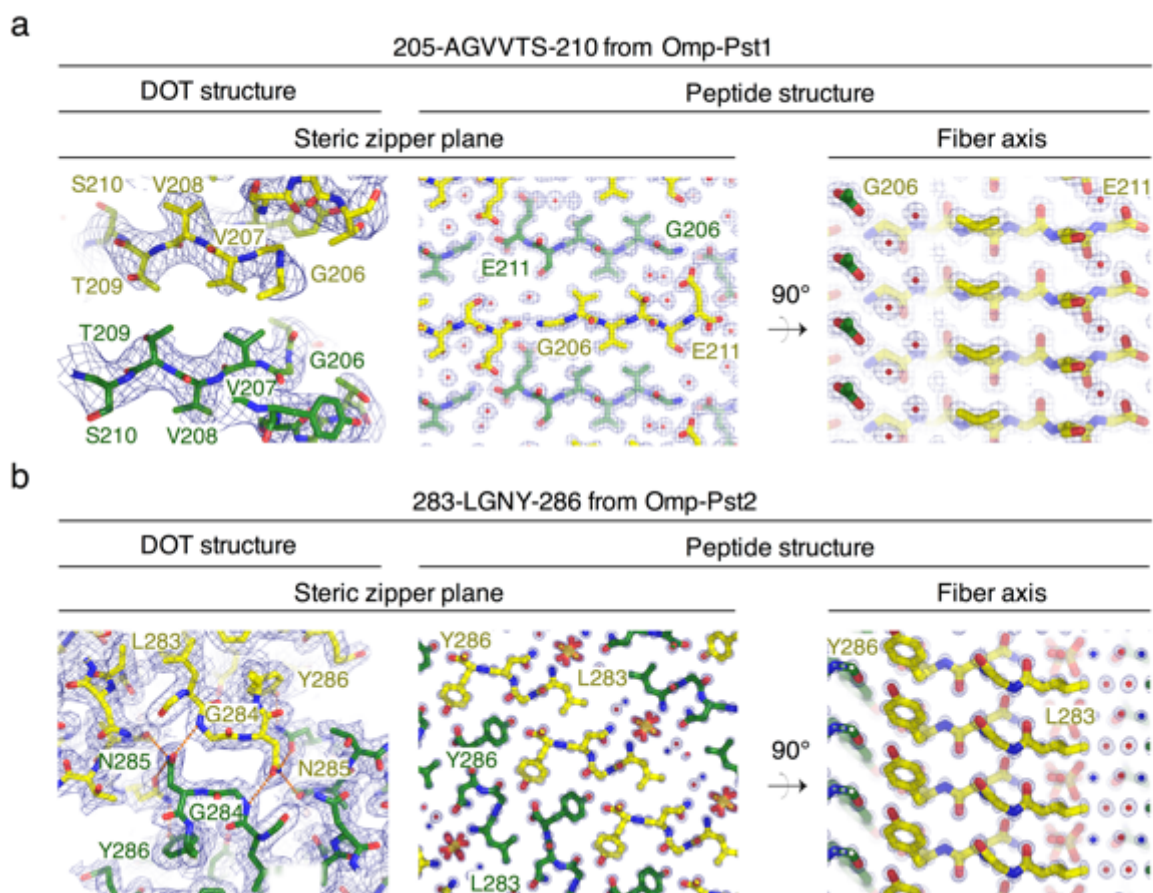


Fig. 3 | Omp-Pst1 and Omp-Pst2 porins display self-adhesion properties *in vitro*. (a) Dynamic light scattering was used to measure the hydrodynamic radii of proteoliposomes formed 24 h following addition of OmpF (grey), Omp-Pst1 (plain green), Omp-Pst1-K221C (hatched green), Omp-Pst2 (blue) or Omp-Pst2-K11C (hatched blue) to a monodispersed solution of 60-nm liposomes. (b) Epifluorescence microscopy reveals that porins are concentrated in the proteoliposome aggregates. LUVs were labelled using rhodamine-coupled lipids. Omp-Pst1-K221C and Omp-Pst2-K211C were labelled by Alexa 488 using a maleimide conjugate. Proteoliposomes (5 μ l) were spread on an agarose-coated coverslide, and imaged immediately. Scale bars are 40 μ m (60X magnification).

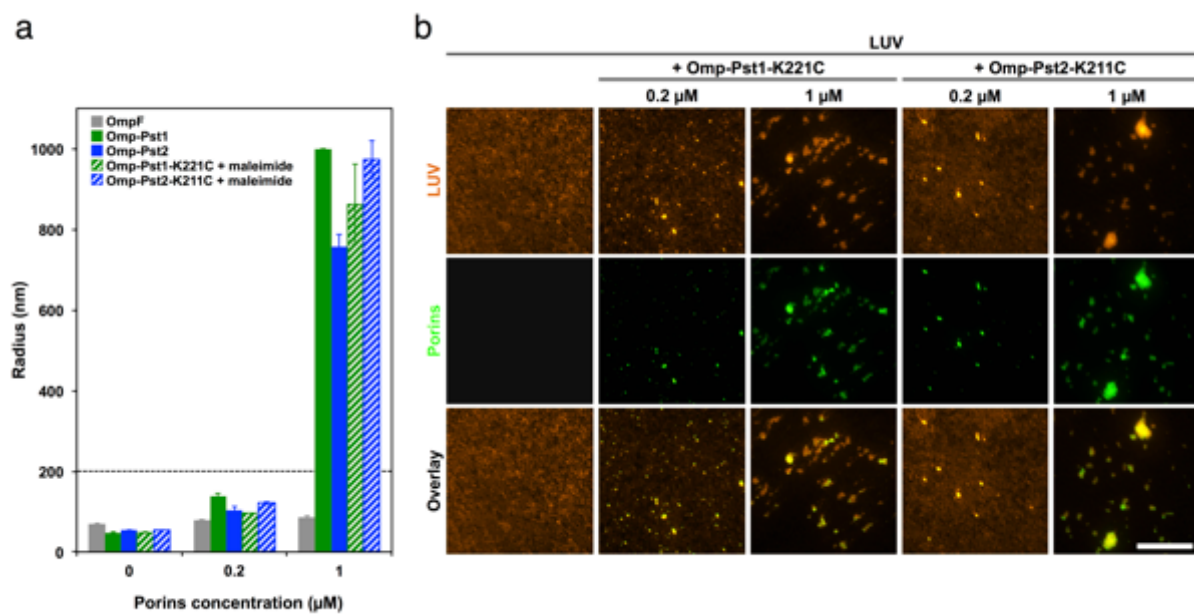


Fig. 4 | Altering charge distribution at the DOT interface reduces aggregation properties of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 *in vitro*. (a) Dynamic light scattering was used to measure the hydrodynamic radii of proteo-LUVs formed 24 h after the addition to a monodispersed 60 nm LUV solution of increasing concentrations of Omp-Pst1 and its specified mutants (a; colored in shades of green). (b) Five microliters of proteo-LUVs formed with 1 μ M porin were spread onto an agarose-coated cover slide for epifluorescence imaging. LUVs were labelled using rhodamine-derivatized lipids. Scale bars are 20 μ m (60X magnification). (c, d) Same as panels a and b for Omp-Pst2.

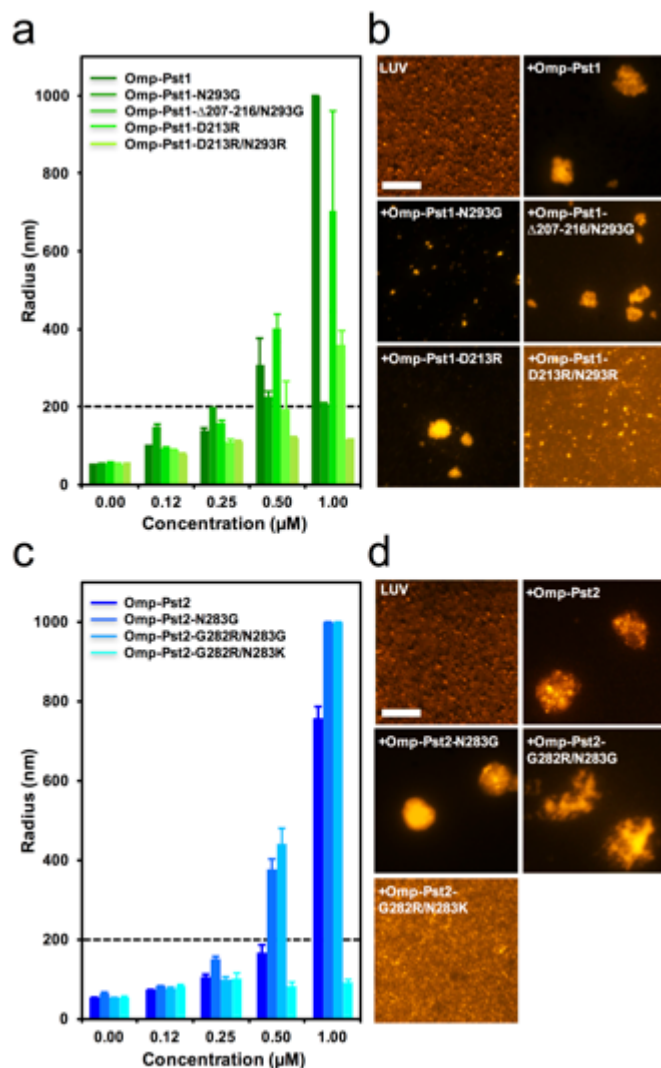


Fig. 5 | Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G also forms a crystallographic dimer of trimers (DOTs). (a, b) Lateral views of the Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G DOT in the same orientations as in panels (a) and (b) of Fig. 1, respectively. The presumed positions of outer-membranes (OMs) are shown in grey. (c, d) The interacting region between facing monomers in the Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G DOT does not involve a steric zipper. (c) The dimerization interface delineates a large cavity, which is less negatively charged than that of Omp-Pst1 due to suppression of the highly acidic β -hairpin contributed by L5. The Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G DOT is also characterized by a reduced surface complementarity, that results in a more leaky DOT. The electrostatic potential of Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G is mapped on its solvent accessible surface. The orientation is the same as in (b).

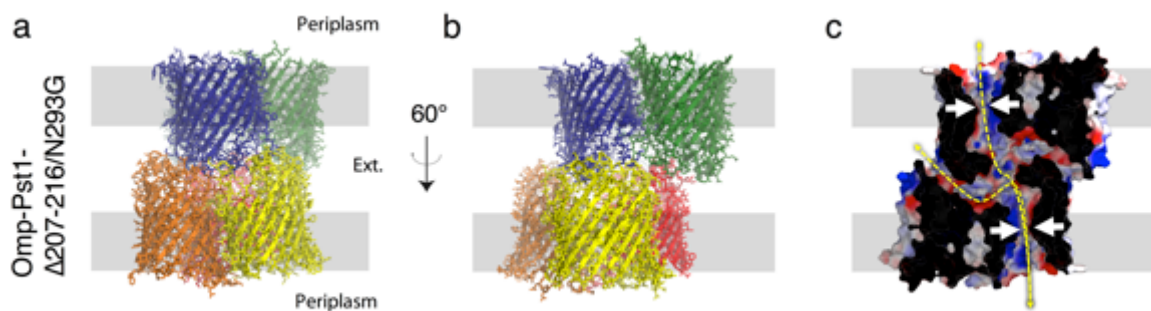


Fig. 6 | Ectopic expression of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 enables cell-to-cell contact in *E. coli* Δ Omp8. Bacterial strains were grown for 24h in 96-well plates. Subsequently, live and dead cells were stained with SYTO9 Green and propidium iodide, respectively. Planktonic cells were harvested by direct pipetting from the LB medium, spread on LB-Gelzan® and imaged immediately afterwards. Biofilm cells attached to the well surface were imaged after intensive PBS washes. Scale bars are 100 μ m for biofilm cells (20X magnification) and 50 μ m for planktonic cells (60X magnification).

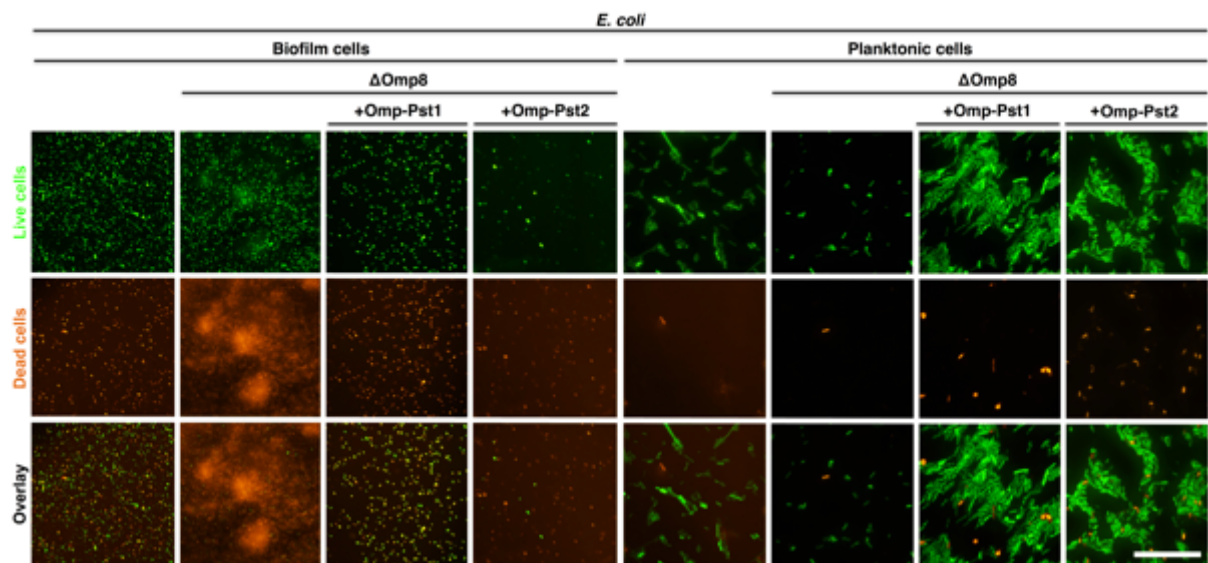


Fig. 7 | Omp-Pst1 and Omp-Pst2 mutations affect the formation of floating communities in *E. coli*. Bacterial strains were grown for 24h in 96-well plates. Subsequently, live and dead cells were stained with SYTO9 Green and propidium iodide, respectively. Planktonic cells were harvested by direct pipetting from the LB medium, spread on LB-Gelzan® and imaged immediately afterwards. For comparison, the floating communities of cells natively formed by *P. stuartii* are also shown. The scale bar is 50 μ m for all panels (60X magnification).

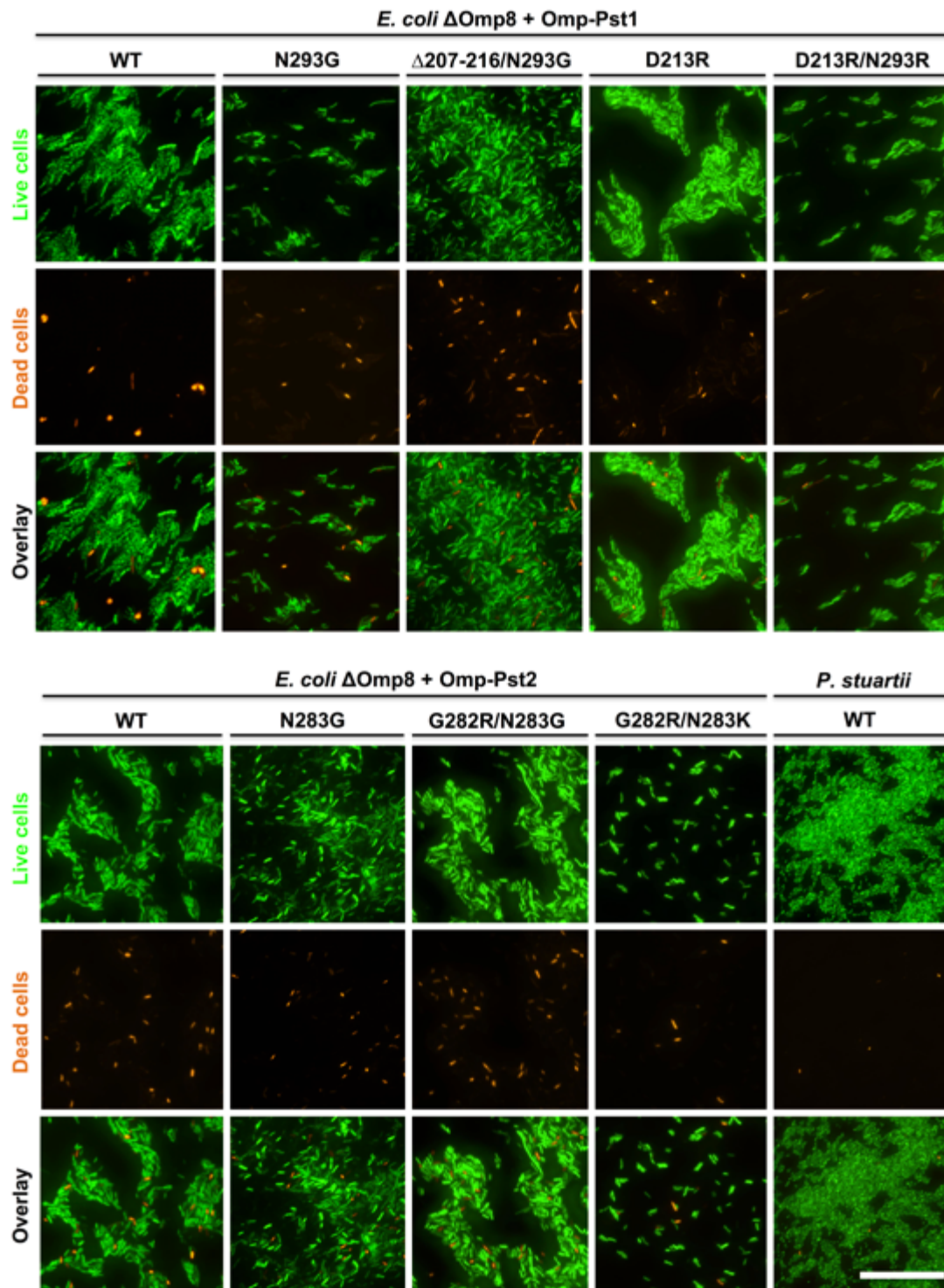


Table 1 | Data collection and refinement statistics

	Omp-Pst1 (type I) ^a	Omp-Pst1 (type II) ^a	Omp-Pst1-Maltose (type II) ^a	Omp-Pst2 (type I) ^a	²⁰⁶ GVVTSF211 from Omp-Pst1 ^a	²⁸³ LGNV ²⁸⁶ from Omp-Pst2 ^a	Omp-Pst1-Δ207- 216/N293G ^a
Data collection							
Space group	C 2	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁	P1	P1	C 2
Cell dimensions <i>a, b, c</i> (Å)	151.52, 142.02, 113.32	108.11, 129.14, 160.05	104.20, 127.12, 150.72	143.26, 135.51, 151.71	4.81, 16.95, 45.50	4.78, 11.55, 47.04	126.32, 158.98, 101.33
α, β, γ (°)	90.0, 131.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 114.6, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 124.6, 90.0
Resolution (Å)	50.0-3.2 (3.28- 3.20) [*]	50 - 2.7 Å (2.75 - 2.80)	50.0-3.0 (3.05- 3.00)	45.7-2.2 (2.26- 2.2) [*]	50-1.91 (1.98- 1.91) [*]	47.04-1.00 (1.03- 1.00) [*]	48.76-3.11 (3.21- 3.11)
R_{Sym} or R_{merge} (%)	11.2 (57.7)	8.1 (74.8)	11.4 (134.0)	5.2 (54.0)	12.0 (18.8)	4.3 (17.3)	20.2 (168.1)
$CC^{1/2}$	99.0 (66.3)	99.9 (82.4)	99.7 (54.5)	99.9 (73.7)	99.1 (97.3)	99.8 (94.3)	99.8 (60.5)
$I / \sigma I$	10.98 (1.97)	23.48 (2.02)	10.20 (0.98)	19.43 (2.0)	4.90 (3.24)	15.21 (4.93)	8.56 (1.51)
Completeness (%)	90.5 (93.2)	80.6 (73.1)	99.2 (100.0)	93.9 (73.7)	96.7 (100.0)	89.6 (89.0)	96.7 (79.2)
Redundancy	2.68 (2.66)	4.35 - 4.14	5.00 (5.34)	3.01 (2.57)	2.20 (2.20)	2.17 (2.15)	6.78 (6.10)
Refinement							
PDB accession code	4D64	5NXR	5NXU	4D65	5N9I	5N9H	5NXN
Resolution (Å)	36.25-3.2	38.80 - 2.70	39.15 - 3.00	45.7-2.2	22.72-1.91	47.04-1.00	86.99-3.11
No. reflections	27279	59296	38580	249377	1076	4934	25757
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	20.75/26.11	24.10/28.48	21.15/25.38	16.83/19.68	14.74/20.59	8.11/9.59	24.62/26.80
No. atoms							
Protein	8298	8375	8312	16377	164	244	8133
Ligand/ion	1	1122	344	2487	n/a	20	1
Water	160	833	535	3115	18	8	520
B -factors ^Δ							
Protein	76.40	69.70	61.49	35.53	12.70	2.66	98.63
Ligand/ion	83.79	110.47	112.52	84.79	n/a	3.29	79.05
Water	57.24	66.31	83.20	57.63	12.41	16.58	86.69
R.m.s. deviations							
Bond lengths (Å)	0.006	0.012	0.008	0.007	0.019	0.013	0.018
Bond angles (°)	1.007	2.048	1.738	1.432	2.122	1.929	1.869

^a Structure was solved from single crystal.

^{*} Values in parentheses are for highest-resolution shell.

^Δ These values include TLS contributions when applicable.

Methods:

Chemicals

The *Providencia stuartii* ATCC 29914 strain was obtained from the Pasteur Institute in Paris (France). *Escherichia coli* DH5 α was used for cloning and *E. coli* BL21 (DE3) Δ omp8 (Δ lamB ompF::*Tn5* Δ ompA Δ ompC) was used for expression of porins ³⁶. Lipids were from Avanti Polar Lipids Co. (Albaster, AL, USA) and detergents were from Affymetrix (UK). Synthetic peptides (LGNY; GVVVTSE) were from CSBio Co (CA, USA), and Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide, FM1-43X, Syto9 Green® and Hoechst 33342 were from Thermo Scientific, USA. Other chemicals were from Sigma-Aldrich. Polystyrene bottom plates used for epifluorescence imaging (96 well plates) were from Greiner.

Cloning of Omp-Pst1, Omp-Pst2 and mutants thereof.

Genomic DNA purification kit (QIAGEN, Valencia, CA) was used to isolate chromosomal DNA of *P. stuartii* ATCC 29914. *Omp-Pst1* (1125 bp) and *Omp-Pst2* (1098 bp) genes were amplified by PCR with the following primers: Forward Pst1-XbaI (5'-GTGTCTAGATGTCCGAATAACACCAATG-3'); Reverse Pst1-BamHI (5'-GTTGGATCCCAGATTTCACTGTTGTCTG-3'); Forward Pst2-XbaI (5'-GTGTCTGACACTTAGTTAGTAAATGGC-3'); Reverse Pst2-BamHI (5'-GTTGGATCCGGATAATTGCGTATGATGG-3'). Restriction sites are underlined. 30 cycles of PCR (45 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, and 1 min at 72 °C) were performed. PCR products were treated with XbaI and BamHI restriction enzymes overnight and ligated into XbaI-BamHI-digested pGompF ³⁶ to yield the expression plasmids pGompPst1 and pGompPst2 ⁶.

Genesis of porins mutants

Single and double mutants of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 (Omp-Pst1-N293G, Omp-Pst1-D213R, Omp-Pst1-D213R/N293R, Omp-Pst1-K221C, Omp-Pst2-N283G, Omp-Pst2-G282R/N283G, Omp-Pst2-G282R/N283K and Omp-Pst2-K211C) were obtained by site-directed mutagenesis using pGomp-Pst1 and pGomp-Pst2 as templates. Briefly, overlapping primers of 30 base pairs containing the desired mutation were designed and used to generate the mutated DNA by PCR. Plasmids were then purified using QIAquick PCR purification kit and the template plasmids were digested using DpnI enzyme. The Gibson assembly technique (Gibson et al. 2009) was used to generate the L5-loop deletion mutant (Omp-Pst1- Δ 207-

216/N293G) using pGomp-Pst1 N293G as a template. Overlapping primers were designed to amplify the DNA from either sides of the desired deletion sequence. The resulting DNA was then purified after migration on agarose gel using QIAquick Gel extraction kit and ligated using the Gibson assembly mix[®]. The different generated plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α cells by heat shock and positive clones were identified by ampicillin selection. Sequences of all mutants were verified by DNA sequencing.

Expression of Omp-Pst1, Omp-Pst2, and mutants thereof

We used heat-shock to transform 1 μ L of plasmids pGomp-Pst1 or pGomp-Pst2 (ampicillin-resistant) into 40 μ L of *E. coli* Δ omp8 competent cells (kanamycin-resistant)^{6,36}. Cells were then recovered in 500 μ L of SOC medium and incubated for 1 hour at 37°C. 20 μ L of cell suspension was then transferred onto agar plates and incubated overnight at 37°C. A colony was introduced in 25 ml of LB media and incubated overnight, yielding a pre-culture that was further diluted into 1 L of LB media culture. During both pre-culture and culture, selection of transformed strains was achieved through the addition of ampicillin and kanamycin at final concentrations of 100 μ g/ml and 25 μ g/ml, respectively. After the optical density of cultures at 600 nm (OD^{600nm}) reached a value of 1, cells were harvested by centrifugation at 4,000 rpm for 20 min. It is noteworthy that the presence of a strong T7-phage promoter on the pGomp-Pst1 and PGomp-Pst2 plasmids allows sufficient porin expression without induction by IPTG. The addition of IPTG in fact results in the over-expression of porins as inclusion body, thus complicating purification.

Extraction and solubilization of Omp-Pst1, Omp-Pst2 and mutants thereof.

Extraction and solubilization of porins was performed as described⁴⁰ with minor modifications. In brief, 5 g of cells were suspended in 20 mM phosphate buffer at pH 7.4, supplemented with DNase (final concentration: 0.15 mU/L) in the presence of 1 mM MgSO₄, as well as with an anti-proteases cocktail (Roche[®]). Cells were disrupted using a microfluidizer at 1,400 Psi (4-5 passes). Non-disrupted cell debris were pelleted and discarded by centrifugation at 6,000 rpm for 15 min. Membranes were collected by subjecting the supernatant to centrifugation at 35,000 rpm for 20 min. Inner-membrane constituents were solubilized by an 1-hour incubation at 20 °C under mild shaking (225 rpm) in buffer complemented with 0.3% octyl-polyoxyethylene (Octyl-POE). A 20-min centrifugation at

35,000 rpm was then performed and the resulting pellet was resuspended and incubated for 1 hour at 20 °C under mild shaking (225 rpm) in buffer complemented with 3% octyl-POE. Outer-membrane proteins were isolated from membrane debris by centrifugation at 35,000 rpm for 20 min. The last solubilization step was performed three times to maximize outer membrane protein recovery. Supernatants containing the solubilized porins were stored at 4°C.

Purification of Omp-Pst1, Omp-Pst2 and mutants thereof.

The purification procedures for Omp-Pst1, Omp-Pst2 and mutants thereof were identical. Briefly, solubilized porins were loaded onto an anionic-exchange column (Hitrap HQ, 5ml) and subjected to detergent exchange by flushing the column with 0.1 M MES buffer at pH 6.5 complemented with lauryldimethylamine-oxide (LDAO) at 0.12% (*i.e.*, 5.2 times the critical micellar concentration (CMC) in water; 0.9 times the CMC in 0.1 M NaCl) and 25 mM NaCl. Elimination of lipopolysaccharides (LPS) was achieved by washing the column with 0.1 M MES pH 6.5 buffer complemented with LDAO at 2 % (*i.e.*, 43.5 times the CMC in water; 7.15 times the CMC in 0.1 M NaCl). After 4 hours of slow washing (0.2 ml/min), the column was re-equilibrated with 0.1 M MES buffer at pH 6.5 complemented with LDAO at 0.12% and 25mM NaCl. The protein was then eluted by the application of a NaCl gradient. Fractions containing the pure protein were pooled together and concentrated to 7 mg/ml on a 50 kDa cutoff AMICON ultra-filtration unit. NaCl concentration was then adjusted to 150 mM. Protein solutions were stored at 4°C. Protein purity was estimated to be c.a. 95%, based on Coomassie blue and silver-staining SDS-PAGE gels. For both Omp-Pst1 and Omp-Pst2, 5-6 mgs of purified protein were obtained per litre of culture. On-column delipidation was crucial to obtain LPS-free porins.

Crystallization

Screening of crystallization conditions was performed at the HTX-Lab of the PSB (IBS, ESRF, ILL, EMBL) using a Cartesian PixSys 4200 crystallization robot (Genomic Solutions, U.K.) and commercial screens from Hampton and Qiagen. Screening was carried out at the nano-litre scale using the hanging-drop vapour-diffusion method. Several conditions yielded poorly or non-diffracting crystals. Manual screening around these conditions was thus performed using the sitting-drop vapour-diffusion method, yielding diffraction-grade crystals after a few days to a few weeks. The protein (or peptide) to mother liquor ratio was 1:1.

Mother liquor solutions were: i/ 14% PEG6000 MME, 0.1 M MES pH 6.5, 0.1 M MgCl₂ for Omp-Pst1 (both types); ii/ 8% PEG 6000, 0.1 M TRIS pH 8, 1 M lithium chloride for Omp-Pst2; iii/ 25% PEG 600, 0.2 M NaCl, 0.1 M MES pH 6.5 for Omp-Pst1-Δ207-216/N293G; iv/ 3.2 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium citrate pH 4 for 283-LGNY-286; v/ 2.5 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium citrate pH 4 for 206-GVVTSE-211. Omp-Pst1, Omp-Pst2 and Omp-Pst1-Δ207-216/N293G were crystallized at 4°C at a concentration of 7 mg/ml, while 283-LGNY-286 and 206-GVVTSE-211 crystallized at 20°C at a concentration of 8 mg/ml. The micro-needle crystals formed by 283-LGNY-286 diffracted reproducibly between 0.8 and 1.5 Å, while those of 206-GVVTSE-211 diffracted between 1.5 and 2 Å. Crystals of porins were however very soft in nature and only 2-5 % of crystals diffracted to a resolution better than 3.5 Å. The complex with maltose was obtained by soaking crystals for 24 hours in a mother liquor solution complemented with maltose at 100 mM.

X-ray data collection and processing

Crystals of Omp-Pst1, Omp-Pst1-Δ207-216/N293G and Omp-Pst2 were soaked in mother liquor solutions containing 18% of glycerol for 30 s, before being mounted in a cryo-loop and flash-cooled in a nitrogen stream at 100 K. X-ray Data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) on beamlines ID14-EH4 (Omp-Pst1 type-I and Omp-Pst2), ID23-EH1 (Omp-Pst1 native type-II crystal), ID29 (Omp-Pst1 type-II crystal soaked with maltose) and ID30-B (Omp-Pst1-Δ207-216/N293G). Micro-crystalline needles of 283-LGNY-286 and 206-GVVTSE-211 were mounted on pulled glass-capillaries and directly flashcooled in the nitrogen gas stream at 100 K, without cryo-protection. Data were collected on ESRF beamline ID23-EH2 using a transmission of 100% at a beamsize of 5*7 μm² (λ=0.87 Å). All data were processed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors were generated using XDSCONV⁴¹.

Structure determination and refinement

Omp-Pst1, Omp-Pst1-Δ207-216/N293G and Omp-Pst2 X-ray data were phased by molecular replacement using PHASER⁴². For Omp-Pst1 type I, a homology model based on the X-ray structure of OmpF (PDB access code: 1OPF) was used as the search model. For Omp-Pst2, a homology model based on the X-ray structure of Omp-Pst1 was used as the search model. Homology modelling was performed using MODELLER⁴³. After reconstruction of Omp-Pst1 structure from type I crystals, we used this structure to phase data from Omp-Pst1 type-II and

Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G crystals. For Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G, we used the structure of Omp-Pst1 devoid of the L5 β -hairpin as a search model. The asymmetric unit of Omp-Pst2 features a full hexamer, in which trimers are related by non-crystallographic symmetry and which are further referred to as dimers of trimers (DOTs). The asymmetric units of type-I Omp-Pst1 and Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G feature a trimer, and the hexamer is formed by crystallographic symmetry. The asymmetric unit of type-II Omp-Pst1 crystals features a trimer, which establishes side-by-side contact with symmetry related trimers. In all three structures, all residues were visible in the electron density maps.

The structure of 206-GVVTSE-211 was also solved by molecular replacement with PHASER, using the corresponding segment from the Omp-Pst1 structure as a starting model. The structure of 283-LGNY-286 could not be solved by molecular replacement owing to the low contrast originating from the low solvent content (<15%) and the failure to find an appropriate model; 283-LGNY-286 is indeed the first symmetry class-III steric zipper to be characterized in the amyloid state. The sub-atomic resolution of the 283-LGNY-286 data nevertheless allowed phasing by direct methods, using SHELXD and SHELXL⁴⁴.

For all structures, diffraction data from 20 Å to the highest resolution limits were used for refinement, and maps were calculated using all data between 15 Å and the highest resolution limits. Graphic operations, modelling and model building were performed with COOT⁴⁵. Energy minimization and individual B-factor refinement followed each stage of manual rebuilding. Refinement and map calculations were performed using PHENIX⁴⁶ except for the structure of 206-GVVTSE-211, which was refined with REFMAC⁴⁷ to allow refinement in the presence of multiple twin operators. Figures were generated using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). For electrostatic surface potential calculation, PDB2PQR and PROPKA were used to assign hydrogens at pH 7.4 (AMBER force field)⁴⁸, APBS was used to solve the non-linear Poisson-Boltzmann equation, and surface representations were produced in PyMOL using the APBS plug-in written by Michael Lerner (<http://pymolwiki.org/index.php/User:Mglerner>). Channel topographies, effective radii and electrostatic potentials associated to the translocation of a proton were calculated using HOLE⁴⁹ and the protonated structures produced by PDB2PQR. For calculations on OmpF, OmpC and PhoE, we used structures deposited in the wwPDB under accession codes 1opf, 2j1n and 2por, respectively. The propensity to form steric zippers of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 hexapeptide segments were predicted using the ZipperDB (<http://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/>)^{33,50} and mapped onto the ribbon diagrams of Omp-

Pst1 and Omp-Pst2 using a python script kindly provided by Dr. Arthur Laganowsky. Details on data collection and refinement statistics are given in Table 1.

Porin labelling

Mutation of loop L5 conserved K221/K211 into a cysteine enabled Omp-Pst1/Omp-Pst2 labelling with the fluorescent dye maleimide. In neither porins is this lysine involved in the structuration of DOTs. Briefly, the MES buffer of purified Omp-Pst1-K221C and Omp-Pst2-K211C was exchanged for a HEPES buffer containing DTT as a reducing agent (20 mM HEPES pH 7; 150 mM NaCl; 0.12% LDAO; 10 mM DTT) in three steps of dialysis. The DTT was then removed by dialysis and the porins were incubated with 20-fold molar excess of Alexa Fluor® 488 C5 maleimide (Thermo Fisher Scientific) for 2 h at room temperature. The reaction was then stopped by the addition of 10 mM DTT. Free dye and unreacted DTT were removed by gel filtration. Labeled porins were concentrated to 1 μ M and reconstituted into large unilamellar liposomes (LUV) (see details in the next section).

Liposome preparation

Large unilamellar liposomes (LUV) were produced by the standard film-hydration method. In brief, fluorescent liposome mixtures were generated by the addition of 0.02% lissamine-rhodamine-sn-glycero-3-phosphoethanolamine to 4% L- α -phosphatidylcholine (EggPC). The lipid were dried under N₂ flow to obtain a thin lipid film, which was then rehydrated with buffer and vortexed, yielding multilamellar vesicles. The vesicles were freeze-thawed (100K – 310K) 20 times to obtain LUV. Extrusion was then performed to calibrate LUV with a narrow size distribution (mini-extruder with polycarbonate filters; Avanti Polar Lipids). For the DLS experiments, we used a 100-nm filter, generating liposomes of ~60 nm radius (see details in the next section).

Dynamic Light Scattering

We used dynamic light scattering (DLS; DynaPro Nanostar from Wyatt Technology) to verify that proteins solution did not contain any aggregates. Hydrodynamic radiuses measured in the 2 – 8000 nM concentration range spanned ~3.6 to 5.8 nm for both Omp-Pst1 and Omp-Pst2, in reasonable agreement with predicted radii of gyration of 3.0 and 4.3 for nude (no LDAO molecules) trimers and DOTs, respectively. These DLS data were yet too noisy to allow

determination of dissociation constants for Omp-Pst1 and Omp-Pst2 DOTs. Of note, we did not detect signal in control experiments performed on LDAO solutions of increasing concentrations. This observation suggests that the radius of LDAO micelles is too small to be detected by DLS.

DLS was also used to monitor the hydrodynamic radii of liposomes before and after the reconstitution of porins (Omp-Pst1, Omp-Pst2, mutants thereof, and *E. coli* OmpF as a control) into their bilayer, at final concentrations of 0.125, 0.25, 0.5 and 1 μ M. For DLS experiments, we used LUVs (prepared as described above) that had been extruded through a 100-nm polycarbonate filter, yielding an effective starting hydrodynamic radius of \sim 60 nm. Experiments were performed in phosphate buffer (125 mM), allowing testing the effect of pH in the range of 4 to 8. Porin insertion into LUVs was achieved by a direct approach, where dilution of detergent-solubilized porins at a final concentration below the critical micellar concentration (CMC) of the detergent results in either their insertion into LUV bilayers, or their precipitation. In this approach, the orientation of the reconstituted protein in the bilayer depends on the relative size of hydrophilic segments harboured on both sides of this protein. In the case of porins, extracellular loops are large and well folded, whereas intracellular turns are short (4-6 amino-acids). Thus, porins are most likely oriented in LUVs in the natural way, *i.e.* with their intracellular turns facing the lumen of the LUV, and the extracellular loops facing the outside⁵¹. In DLS experiments, measured hydrodynamic radii started increasing immediately after the incorporation of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 into LUVs, but continued to evolve overnight; results reported herein are following 24 hours of incubation at 4°C. In contrast to *P. stuartii* porins, insertion of *E. coli* OmpF into LUVs has virtually no effect on their average size distribution (Fig. 3). Here, the final LDAO concentrations were 0.004 % and 0.0026 % for Omp-Pst1 and Omp-Pst2, corresponding to concentrations 17 and 11 fold lower than the detergent CMC (0.023 %). Controls established that in absence of porins, LUVs remain unaffected in size up to a concentration of 0.0805 % LDAO (*i.e.* 3.5 times the CMC), after what they degrade leading to a decrease in measured hydrodynamic radii (not shown).

Determination of optimal pH to insert porins into LUVs.

We used centrifugation on sucrose gradient to examine the proteoliposome aggregates formed by reconstitution of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 into preformed \sim 60 nm radius liposomes (lipid concentration: 0.125 mg/ml) at pH 4 and 8. After reconstitution of porins, Triton X-100

detergent was added at 0.02% to permeabilize liposomes and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS ; λ_{ex} 388 nm; λ_{em} 470 nm) was added at 4 μM to reveal porins. The mixture was deposited on a 5-30% sucrose gradient (deposited in decreasing steps of 5%) and centrifuged overnight at 25,000 rpm (TLS 55, Beckman) and at 4 °C., allowing the separation of liposomes, proteoliposomes and porins (Supplementary Fig. 3a-f). To estimate the relative distributions of porins that incorporate in liposomes or precipitate, corresponding layers of the sucrose gradient were isolated, heated 5 min at 90 °C and then subjected to SDS PAGE (12%). These experiments show that the insertion of *P. stuartii* porins into liposomes is favoured at acidic pH (Supplementary Fig. 3g), where it dominates over precipitation. In sucrose gradient and DLS experiments on liposomes and porins, we used a concentration of 0.125 mg/ml lipid, corresponding to ~2 nM of 60-nm radius liposomes. Considering that only 50-75 % and 25-50 % of porins factually insert into liposome bilayers at pH 4 and 8, respectively, the number of porins per liposome can be tentatively estimated to be 3, 15, 30 and 3000 at pH 4 – and 1.5, 7.5, 15 and 1500 at pH 8 – for porin concentrations of 0.01, 0.05, 0.1 and 1 μM , respectively.

Bacterial growth studies.

P. stuartii and *E. coli* Δ Omp8 transformants were grown in LB growth medium. For each experiment, a single bacterial colony was inoculated in standard LB medium for 2h, allowing us to characterize the cells in their lag phase. Bacteria were then distributed into a 96 well plates and incubated at 37°C under 100 rpm shaking overnight to grow and potentially form biofilm on the well-surface. Bacterial growth was monitored in terms of absorbance at 600 nm for 24h (10 minutes interval between time points) using a Biotek Synergy H4 microplate reader (Winooski, VT, USA).

Epifluorescence microscopy

Epifluorescence microscopy experiments were performed on an IX81 Olympus inverted microscope; samples were magnified through a 60X objective (Plan APON60XO, Olympus). LUVs containing the fluorescent lipid lissamine-rhodamine-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (excitation: 557 nm; emission: 571 nm) were prepared as described above. Experiments were conducted following the introduction of 5 μL LUV solutions onto microscopic cover-slides coated with 2% agarose dehydrated film. Porin-mediated proteo-

LUV aggregation was imaged after the incubation of LUV with the different porins at 1 μ M for 24 h.

Experiments on bacteria were performed using the same microscope. In all our imaging experiments, DNA was labelled using the cell-permeant dye Hoechst 33342 (361 nm excitation; 486 nm emission) at 5 μ g/ml, membranes were labelled using FM 1-43X dye at 4 μ g/ml (479 nm excitation; emission: 598 nm emission), living bacteria were labelled using Syto® 9 Green (485 nm excitation; 498 nm emission) at 5 μ M and dead bacteria were labelled with propidium iodide at 20 μ M (533 nm excitation; 617 nm emission). Fluorescence images sequentially recorded on the blue and green channels, or on the green and red channels, were used for overlays. For biofilm imaging, a single fresh bacterial colony was inoculated in 5 mL of LB media and incubated 2 h at 37°C, before distribution of cells into 96 well plates for a further overnight growth at 37°C. 10 μ L of the floating bacteria were collected and spread in the interstice between LB-Gelzan solid media (LB-Lennox solidified with 8 g/L Gelzan™) and a glass cover-slide, as previously described⁵² then imaged immediately. The wells were then extensively washed by PBS, allowing the removal of all floating bacteria and to image cells tightly attached to the well surface – *i.e.* biofilm cells (El-Khatib et al, in review).

Electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed to visualize the ultrastructure of proteoliposome aggregates. Large unilamellar 200 nm radius liposomes were prepared as described above. In electron microscopy experiments, we used 200 nm radius liposomes formed at 0.125 mg/ml lipid concentration, corresponding to ~0.12 nM of 60-nm radius liposomes, and porins were added at 10 μ M. Experiments were performed at pH 8. Samples were negatively stained using the mica floatation technique. Briefly, 4 μ L of the proteoliposome mixture were adsorbed on the clean side of a carbon film on a mica sheet (carbon/mica interface). After 30 seconds, negative-staining was performed with 2% (w/v) uranyl acetate (pH 4.5).

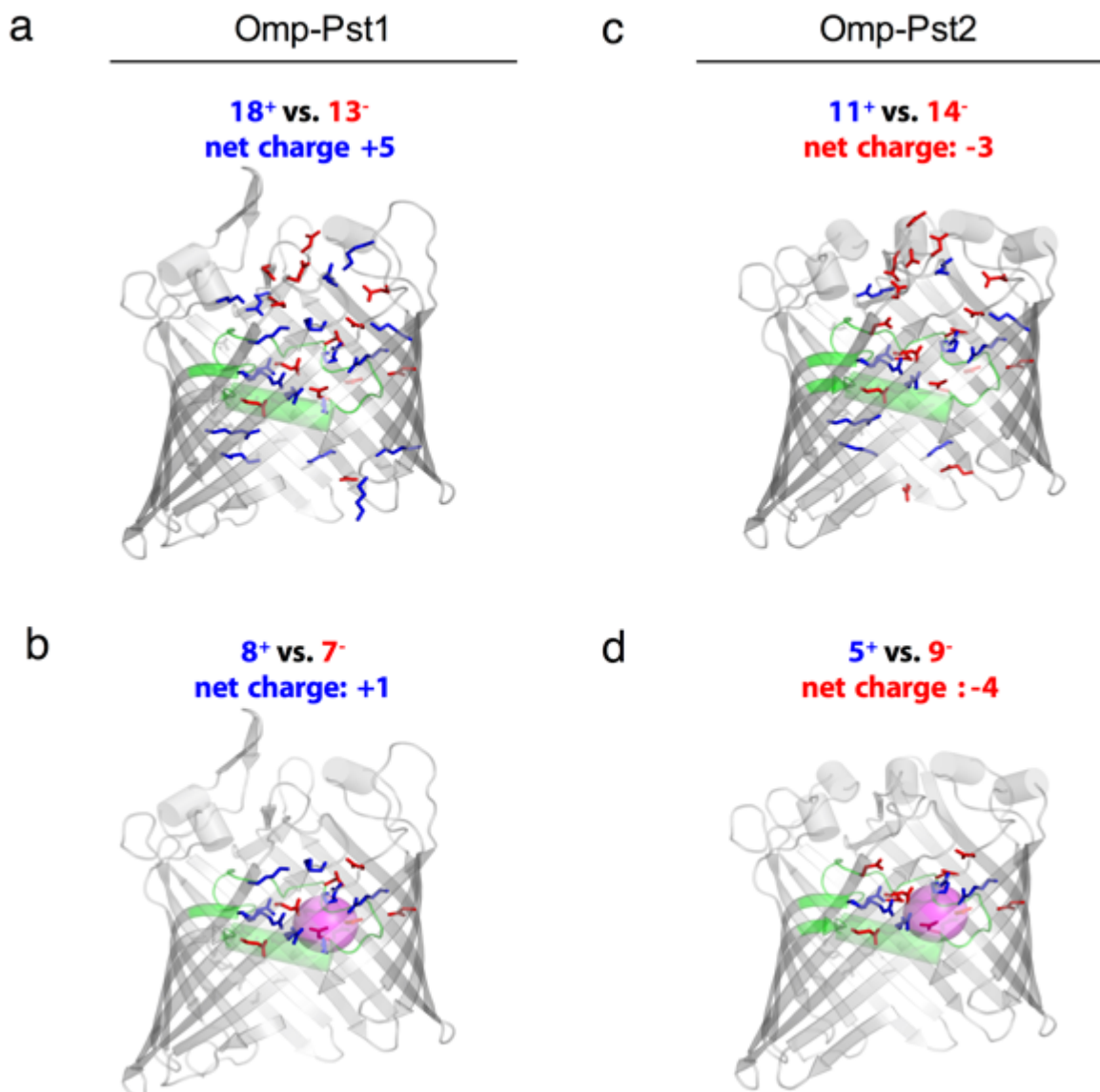
TEM was also used to visualize *P. stuartii* floating communities of cells, grown in the interstice between LB-agar solid media and an electron microscopy grid. Briefly, *P. stuartii* cells were grown overnight to an optical density of > 1 at 600 nm (OD^{600nm}), diluted to an OD^{600nm} of 0.1. Twenty microliters of diluted cells were deposited on LB-agar media, incubated for 1 h at 37°C, before adding an electron microscopy grid atop of them, in contact

with the liquid medium. Plates were incubated for 3 additional hours at 37 °C. EM grids were then removed gently, washed 6 times with drop of sterile water and subjected to negative-staining with 2% (w/v) sodium silicotungstate.

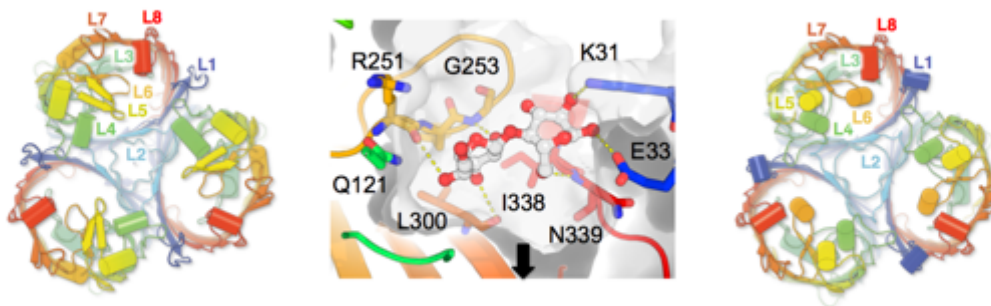
Images were taken under low-dose conditions with a CM12 and Tecnai 12 LaB6 electron microscope working at 120 kV and with nominal magnifications of 22000 X (not shown) and 45000X using an Orius TM SC1000 CCD camera from Gatan. Calibrated Fourier transforms of the images were performed with the software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

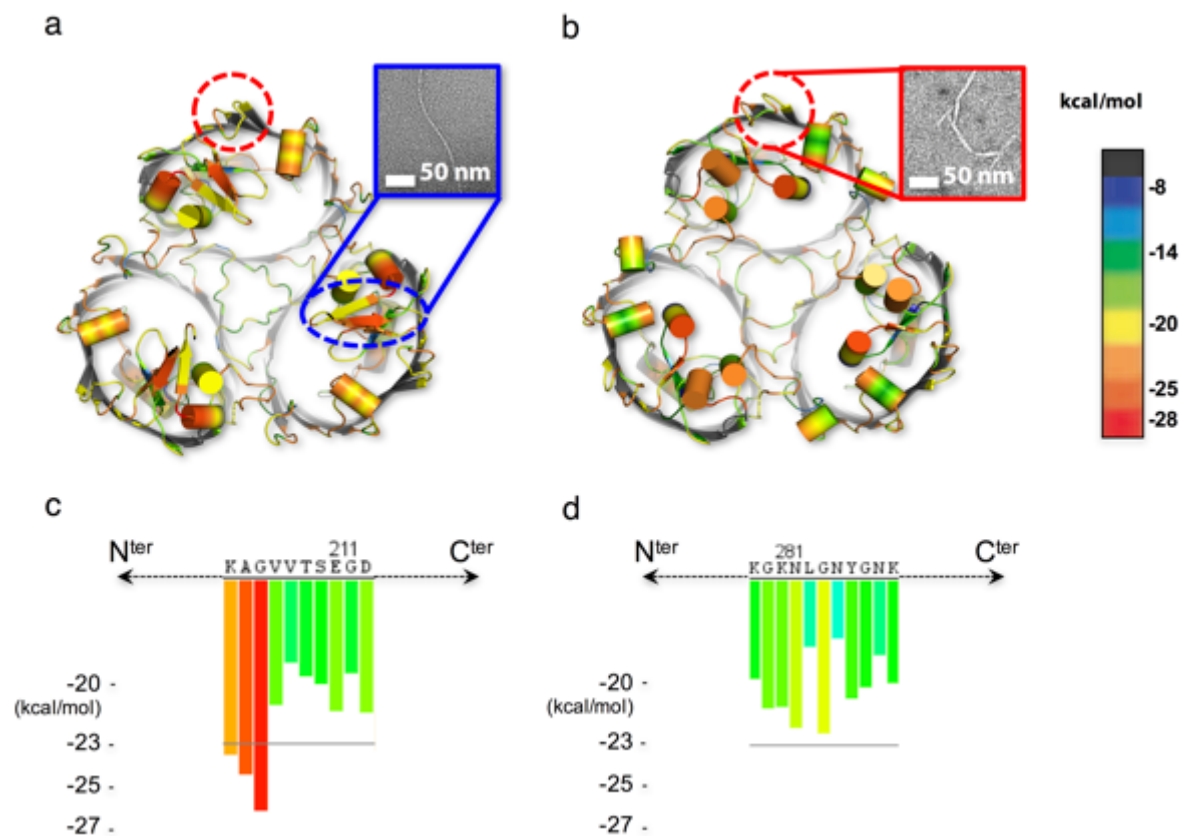
Supplementary Fig. 1 | Distribution of charged residues along Omp-Pst1 and Omp-Pst2 channels. (a, c) Distribution of charged amino-acids along the channel of Omp-Pst1 (a) and Omp-Pst2 (c). (b, d) Distribution of charged amino-acids within a 5-Å radius of the constriction zone of Omp-Pst1 (b) and Omp-Pst2 (d). The magenta sphere is centred at, and has the radius of, the constriction zone in Omp-Pst1 (b) and Omp-Pst2 (d).



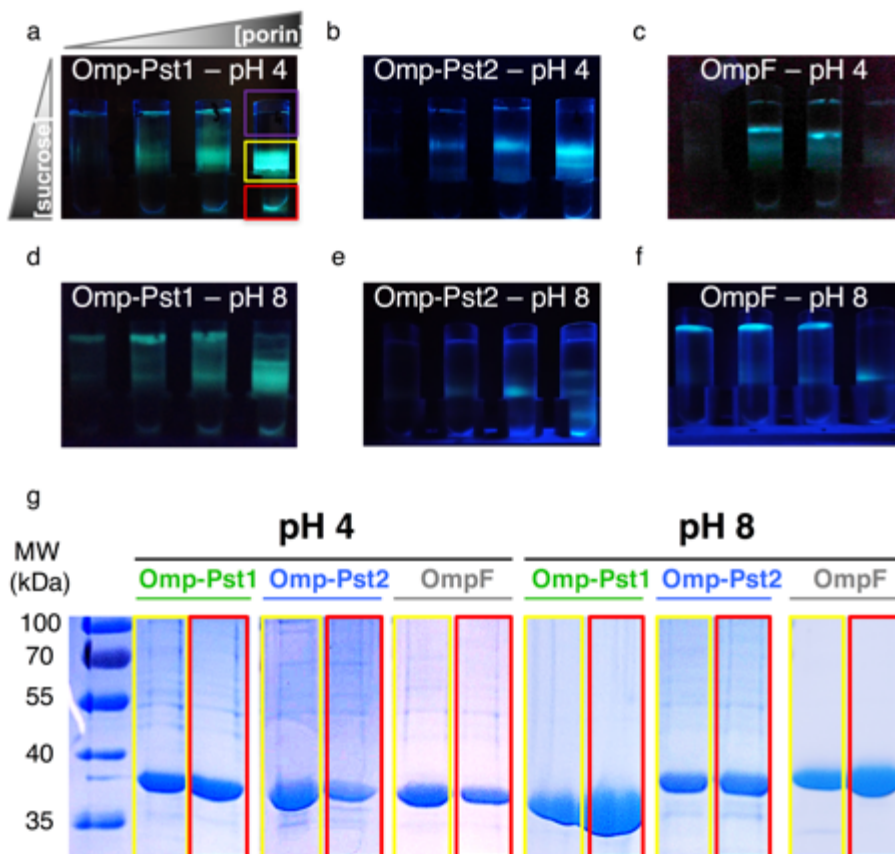
Supplementary Fig. 2 | Location of the maltose binding site of Omp-Pst1 and extracellular topology of the Omp-Pst1 and Omp-Pst2 trimers. (a) Ribbon diagram of Omp-Pst1 coloured sequence-wise, from cold (N-ter) to hot (C-ter) colours. Extracellular loops L1 to L8 are labelled. As in all general-diffusion porins, L2 cements subunits into a trimer, whereas L3 folds into the channel lumen contributing a constriction zone at mid-height. In Omp-Pst1, extracellular loops are mostly folded as α -helices. Nevertheless, L5 folds as a β -hairpin, which is involved in DOT formation. (b) Extracellular loops L1 and L6-L8 contribute a binding site for maltose, in the extracellular vestibule of Omp-Pst1. The arrow indicates the way down the channel, towards the constriction zone and the periplasmic side. (c) Equivalent to panel a for Omp-Pst2. Apart from L2, involved in trimer formation, and L7, involved in DOT formation, all extracellular loops are folded as α -helices



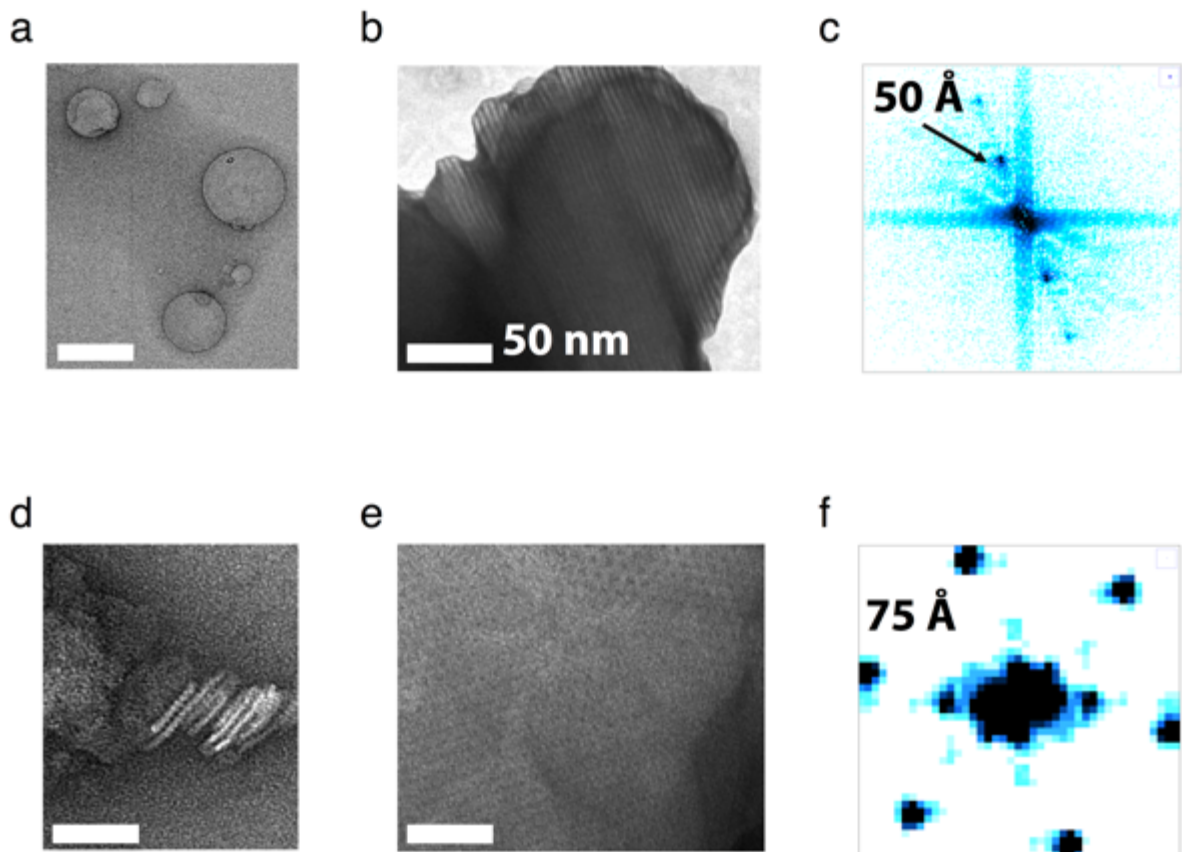
Supplementary Fig. 3 | Extracellular loops L5 from Omp-Pst1 and L7 from Omp-Pst2 display high propensity to form steric zippers. (a, b) Ribbon diagrams of Omp-Pst1 (a) and Omp-Pst2 (b) coloured by propensity of hexapeptidic segments to form steric zippers, with red being the highest and blue the lowest propensity. Most high-propensity segments are found in the membrane-embedded β -barrel and in α helices contributed by extracellular loops. Both the extracellular loop L5 (blue oval in (a)) and the extracellular loops L7 of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 (red circle in (a, b)) are exposed in a β -sheet compatible geometry. Inserts show that both fragments 206-GVVTSE-211 isolated from Omp-Pst1 L5 (a) and 282-NLGNYG-287 from Omp-Pst2 L7 (b) form thin amyloid fibres at pH 7. (c, d) 3D-profile scores for Omp-Pst1 L5 and Omp-Pst2 L7.



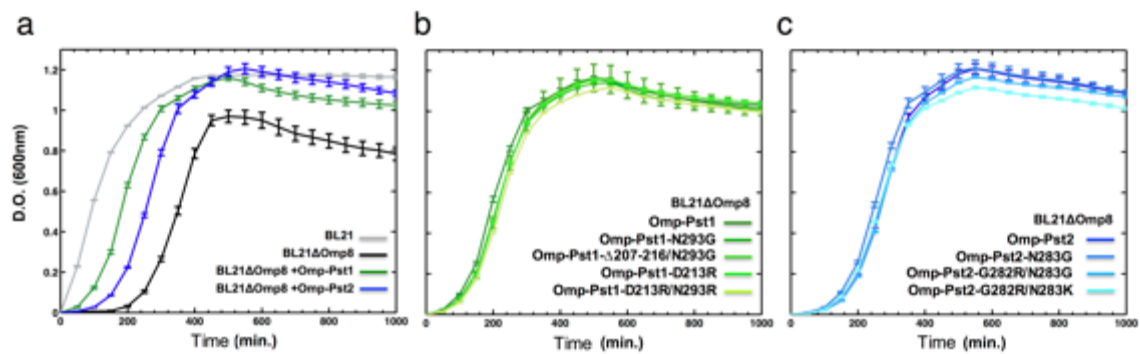
Supplementary Fig. 4 | Porin incorporation into liposomes is slightly favoured at acidic pH. Pre-formed 60-nm liposomes were incubated 30 min at pH 4 (**a-c**) or pH 8 (**d-f**) with increasing concentrations (0, 0.01, 0.1 and 1 μ M; from left to right) of Omp-Pst1 (**a, d**), Omp-Pst2 (**b, e**), or *E. coli* OmpF (**c, f** control). The protein-specific fluorescent probe ANS was then added to the mixtures, which were centrifuged on a sucrose gradient to separate liposomes (upper fraction; purple square in (**a**)), proteoliposomes (middle fraction; yellow square in (**a**)) and precipitated porins (lower fraction; red square in (**a**)). (**g**) Proteoliposomes aggregates (yellow rectangles) and precipitated porins (red rectangles) were further isolated, brought to 95°C for 5 min and migrated on an SDS-page gel for quantification. Molecular weight markers are shown on the left. The ~39 kDa band corresponds to porin monomers. Gels corresponding to Omp-Pst1, Omp-Pst2 and OmpF are lined in green, purple and blue, respectively, and reveal that a large fraction of porins precipitate (red squares) upon reconstitution in pre-formed liposomes by direct dilution. Nevertheless, at acidic pH, insertion (yellow squares) is favoured over precipitation.



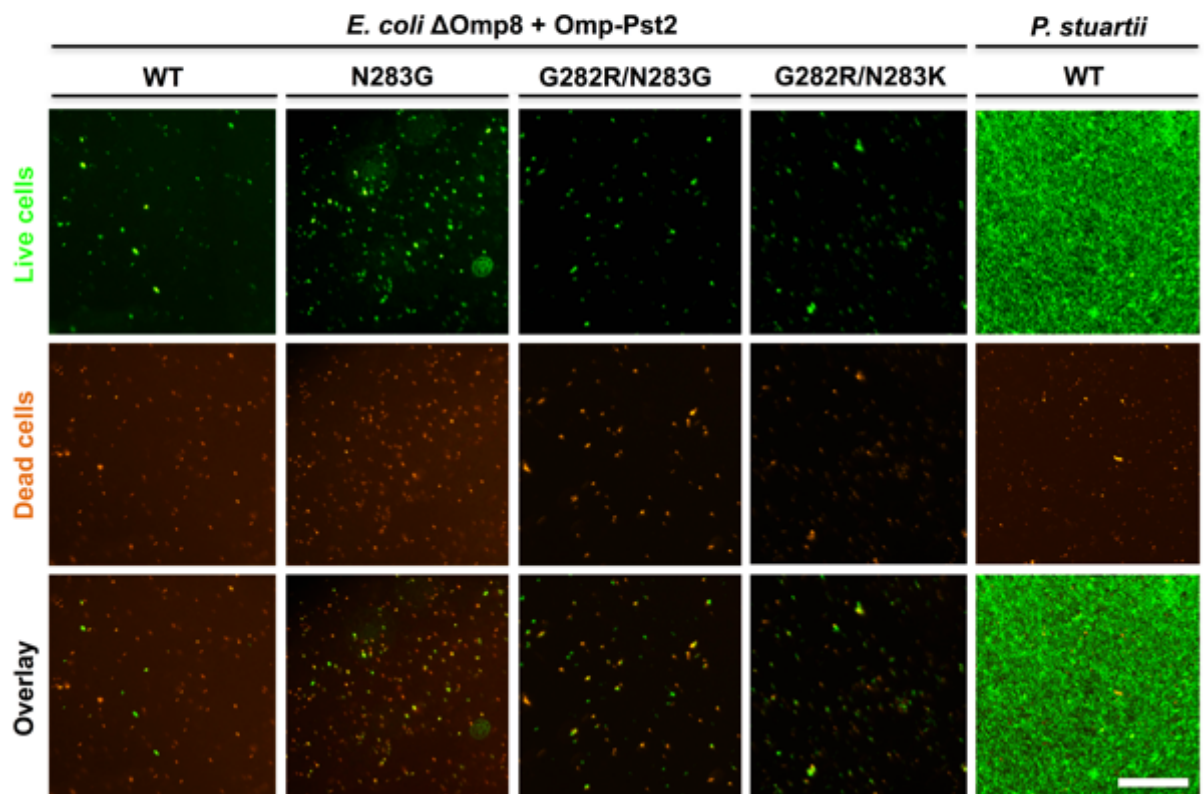
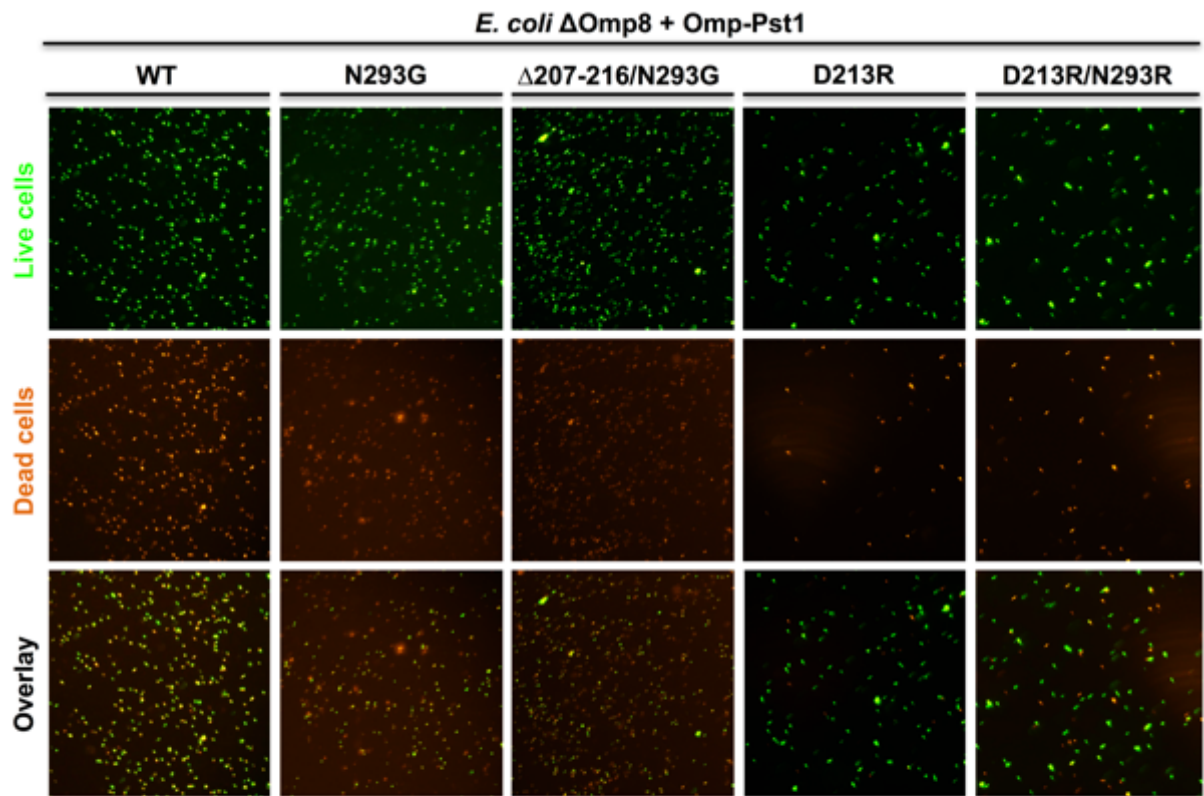
Supplementary Fig. 5 | Omp-Pst1 and Omp-Pst2 proteoliposome aggregates. (a) Pre-formed 60-nm liposomes. (b) Proteoliposome aggregates obtained following the reconstitution of 10 μ M of Omp-Pst1 into pre-formed 60-nm liposomes appear as stacked lipid bilayers. (c) A Fourier transform of the image shown in (b) yields peaks at ~ 50 Å, corresponding to the thickness of lipid bilayers. (d, e) Proteoliposome aggregates obtained following the reconstitution of 10 μ M of Omp-Pst2 into pre-formed 60-nm liposomes are quasi-crystalline, forming stacks of bilayers (d) within which the lateral packing of Omp-Pst2 trimers is visible. (f) A Fourier transform of the image shown in (e) yields peaks related by hexagonal symmetry at ~ 75 Å, corresponding to the packing and extent of porin trimers in the aggregates.



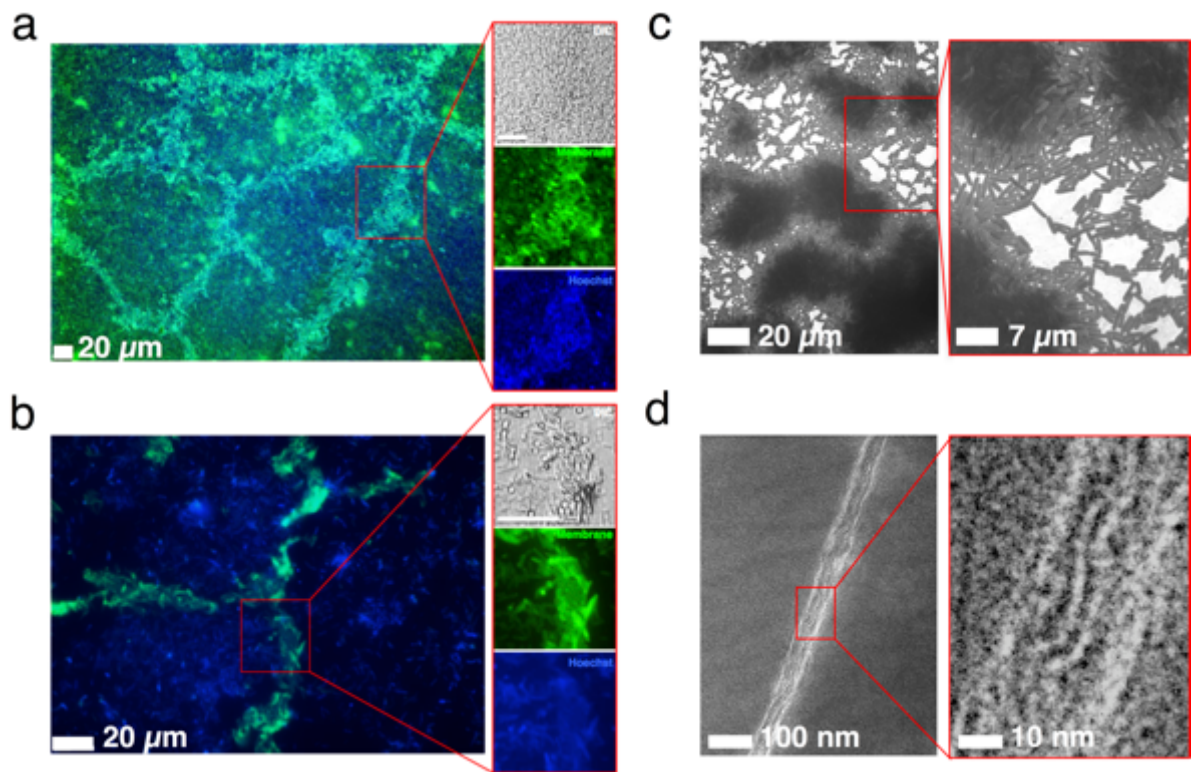
Supplementary Fig. 6 | Expressions of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 restore normal growth of *E. coli* Δ Omp8 cells. (a) The *E. coli* strain Δ Omp8 (black) is a K12 strain (grey) deleted of its major porins (OmpF, OmpC, OmpA and LamB) and it comparatively displays both a reduced growth, and a longer lag-phase. Ectopic expression of Omp-Pst1 or Omp-Pst2 in *E. coli* Δ Omp8 restores normal growth and reduces the lag phase. Expression of Omp-Pst1 appears more profitable to Δ Omp8 cells than that of Omp-Pst2, in terms of rapidity of growth. (b, c) *E. coli* Δ Omp8 cells expressing mutants of Omp-Pst1 (b) and Omp-Pst2 (c) appear as fit at those expressing wild-type Omp-Pst1 and Omp-Pst2, respectively.



Supplementary Fig. 7 | *E. coli* expressing Omp-Pst1 and Omp-Pst2 mutants do not form adherent biofilms. Bacterial strains were grown for 24 h in 96-well plates. Subsequently, live and dead cells were stained with SYTO9 Green and propidium iodide, respectively. Biofilm cells attached to the well surface were imaged after intensive PBS washes. For comparison purposes, the biofilms formed by *P. stuartii* are shown. The scale bar is 100 47 μ m (20X magnification).



Supplementary Fig. 8 | *P. stuartii* cells are close contact in biofilms and microcolonies. a-b, *P. stuartii* cells were grown for 24 h in LB medium in 96 wells plate. Well surfaces were imaged before (a) and after (b) extensive PBS washing, allowing observation of the first layers of *P. stuartii* cells attached to the well bottoms (b). FM1-43X and Hoechst 33342 were used to stain the bacterial membrane and cytosol (DNA) respectively. **c-d**, *P. stuartii* biofilms were grown in the interstice between LB agar and an electron microscopy (EM) grid for 6 h. Micrographs show the close outer membrane contact between adjacent bacteria at different magnifications. Panels in (c) show an overview of the biofilms formed on the EM grid. Panels in (d) reveal a close contact between the outer membranes of adjacent cells. In the close-up view, outer-membranes are ~10 nm apart, a distance that would allow a DOT to form between two outer-membranes.



2.3. Conclusions

La résolution de la structure des porines a mis en évidence l'association de ces derniers en DOTs. Les travaux décrits dans cette partie, et qui vont de l'échelle atomique à l'échelle supra-cellulaire, nous ont permis de révéler un nouveau rôle physiologique pour les porines et de suggérer un nouveau mécanisme de formation de communautés cellulaires bactériennes. Notre observation d'un étroit contact entre les membranes externes des cellules dans les communautés flottantes, les microcolonies et les couches les plus profondes des biofilms canoniques (i.e. attachés sur une surface) suggère que des DOTs pourraient se former dans de multiples états phénotypiques. Les porines sont en effet abondamment exprimées et donc représentées dans les membranes externes des bactéries Gram-négatives.

Nos résultats ont montré que l'expression des porines améliore la croissance bactérienne en réduisant la phase de latence et la mortalité dès l'entrée en phase stationnaire. Cette amélioration serait due au rôle des porines dans la diffusion passive des solutés du milieu extérieur vers le périplasme des bactéries, lequel soutiendrait la croissance et la multiplication cellulaire. C'est le rôle canonique et vital des porines, extensivement décrit dans la littérature; nos résultats le confirment pour les deux porines de *P. stuartii*, Omp-Pst1 et Omp-Pst2.

Nos résultats d'imagerie cellulaire (*in vivo*) et de DLS (*in vitro*) permettent cependant d'affirmer qu'en sus de leurs fonctions diffusives, les porines de *P. stuartii* jouent un rôle dans la formation de communautés bactériennes flottantes. L'expression ectopique d'Omp-Pst1 ou Omp-Pst2 dans les bactéries BL21ΔOmp8, des bactéries asociales qui ne forment ni biofilms ni communautés cellulaires flottantes, a permis de démontrer la capacité de ces porines à promouvoir l'association de cellules bactériennes planctoniques en communautés flottantes. Nous avons exploité notre connaissance de la structure d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 pour générer des mutants, n'affectant ni la viabilité ni la croissance des cellules, mais présentant des propensions plus ou moins fortes à promouvoir la sociabilité bactérienne. Un mutant en particulier, Omp-Pst2-G282R/N283K, a montré une totale incapacité à déclencher l'agrégation *in vitro* des protéoliposomes et l'association cellulaire en communautés flottantes. Les structures cristallographiques des porines

Omp-Pst1 et Omp-Pst2 suggèrent que ces derniers promeuvent cette association par la formation des DOTs. La formation des telles structures intercellulaires impliquerait la possibilité d'une communication inter-bactérienne, dès la phase planctonique de la croissance de *P. stuartii*. Ce rôle inédit des porines pourrait servir la genèse des biofilms bactériens, tel que supposé par l'observation du contact intercellulaires étroits dans les plus profondes – et possiblement germinales – des biofilms 3D attachées aux surfaces.

Cependant, malgré la bonne résolution de la microscopie électronique, nous avons été incapable de visualiser la formation de DOTs entre deux bactéries adjacentes, faute d'anticorps spécifiques contre Omp-Pst1 et Omp-Pst2. Une telle visualisation est cependant requise pour prouver notre hypothèse du rôle des porines dans la sociabilité bactérienne et la genèse des biofilms via la formation de DOTs.

3. Imagerie des porines au sein des biofilms

Les résultats des parties précédentes étaient très encourageants. Nos données favorisent l'hypothèse suggèrent en effet l'implication directe de la dimérisation des porines dans l'établissement du contact cellulaire et la communication bactérienne.

Pour valider cette hypothèse, il nous fallait cependant pouvoir visualiser nos porines *in vivo*, à l'échelle moléculaire, et non seulement les localiser mais aussi les quantifier. A dessein, nous nous sommes tournés vers la microscopie de super-résolution (SR), grâce à l'étiquetage spécifique de nos porines par des protéines phototransformables. Nous avons du faire face à deux défis : Obtenir une FP (1) adaptée à l'imagerie de SR et (2) suffisamment stable pour se replier, mûrir et rester fluorescente et phototransformable durant et après son passage dans le périplasme. En effet, durant leur cheminement vers la membrane externe, les porines doivent passer par le périplasme qui, comme l'espace inter-membranaire mitochondrial, le peroxysoxe, le réticulum endoplasmique ou l'appareil de golgi des cellules eucaryotes, est un milieu oxydatif défavorable pour le repliement des FP. Dans la littérature, deux FPs uniquement sont décrites comme étant stable dans ces milieux oxydatifs¹⁵²: (1) Superfolder-GFP¹⁵³ et (2) mCherry¹⁵⁴. Malheureusement, ces deux FPs sont inadaptées à l'imagerie de SR et donc inadaptées à notre objectif.


Faute de FPs adéquates pour l'imagerie de SR du périplasme, nous avons collaboré avec les Drs. Dominique Bourgeois et Virgile Adam de l'équipe PIXEL à l'IBS pour concevoir par un design rationnel une nouvelle FP adaptée à nos besoins. Cette étroite collaboration nous a permis de développer deux nouvelles FPs, rsFolder et rsFolder2, pour l'imagerie RESOLFT. Cette dernière partie des résultats a fait l'objet d'un article publié en janvier 2016¹²².

3.1. Résumé

Les FPs phototransformables sont au centre de plusieurs approches de nanoscopies. Cependant, jusqu'à présent, il n'y a aucune variante de ces FPs permettant l'imagerie de SR dans les compartiments cellulaires qui maintiennent des conditions oxydatives. Dans l'article ci-dessous, nous rapportons le design rationnel de deux RSFPs capables de se replier et de photocommuter dans le périplasma bactérien, rsFolder et rsFolder2. rsFolder a été « designée » par l'hybridation de Superfolder-GFP avec rsEGFP2. Elle a hérité les propriétés de repliement rapide de la première ainsi que la vitesse de commutation de la deuxième, mais au prix d'un contraste de commutation réduit. La caractérisation structurale des mécanismes de commutation de rsFolder et rsEGFP2 a révélé deux scénarios différents de l'isomérisation du chromophore cis-trans. Ceci a permis la conception de rsFolder2, une variante de rsFolder qui présente un contraste amélioré de commutation, adapté à l'imagerie par RESOLFT. Les rsFolders peuvent être efficacement exprimées dans le périplasma d'*E. coli*, ouvrant la porte des investigations à l'échelle nanométrique de protéines localisées dans des compartiments cellulaires jusqu'ici non observables.

3.2. rsFolders : Nouvelles RSFPs ultrastable pour l'imagerie de SR du périplasma bactérien

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm

Mariam El Khatib^{1,2,3}, Alexandre Martins^{1,2,3}, Dominique Bourgeois^{1,2,3}, Jacques-Philippe Colletier^{1,2,3} & Virgile Adam^{1,2,3}

Received: 28 October 2015
Accepted: 11 November 2015
Published: 06 January 2016

Phototransformable fluorescent proteins are central to several nanoscopy approaches. As yet however, there is no available variant allowing super-resolution imaging in cell compartments that maintain oxidative conditions. Here, we report the rational design of two reversibly switchable fluorescent proteins able to fold and photoswitch in the bacterial periplasm, rsFolder and rsFolder2. rsFolder was designed by hybridisation of Superfolder-GFP with rsEGFP2, and inherited the fast folding properties of the former together with the rapid switching of the latter, but at the cost of a reduced switching contrast. Structural characterisation of the switching mechanisms of rsFolder and rsEGFP2 revealed different scenarios for chromophore *cis-trans* isomerisation and allowed designing rsFolder2, a variant of rsFolder that exhibits improved switching contrast and is amenable to RESOLFT nanoscopy. The rsFolders can be efficiently expressed in the *E. coli* periplasm, opening the door to the nanoscale investigation of proteins localised in hitherto non-observable cellular compartments.

The nanoscale visualisation of intracellular details in live cells by super-resolution microscopy often relies on employing “phototransformable” fluorescent proteins (PTFPs) as genetically encoded markers¹. Accordingly, the engineering of PTFPs with improved biochemical or photophysical properties has fostered the development of a large variety of nanoscopy approaches^{2,3}. Notably, methods such as RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions)⁴, nonlinear SIM (Structured Illumination Microscopy)⁵ or pcSOFI (photochromic Stochastic Optical Fluctuation Imaging)⁶ exploit reversibly switchable fluorescent proteins (RSFPs) that are able to repeatedly toggle between a fluorescent (*on*) and a non-fluorescent (*off*) state. In so-called “negative switching” green RSFPs, the *on-to-off* transition competes with fluorescence emission upon illumination by cyan light (~490 nm), while the *off-to-on* transition promptly responds to illumination by violet light (~405 nm). The negative RSFP’s subfamily first consisted of Dronpa⁷ and its variants^{8,9}, and was progressively enriched with other proteins of anthozoan origin (corals and anemones) such as rsCherryRev¹⁰, rsTagRFP¹¹, the mGeos¹² and the biphotochromic IrisFP¹³ and NijiFP¹⁴. However, the development of RESOLFT nanoscopy in live cells necessitates RSFPs that switch efficiently even at low illumination power (to minimise photo-damage), display minimal residual fluorescence in the *off* state (to maximise contrast), and are highly resistant against switching fatigue (to sustain a large number of successive *on-off* switching cycles). It was found that variants engineered from fluorescent proteins of hydrozoan origin (jellyfishes), and notably from the well-known EGFP, could fulfil these requirements, giving rise to rsEGFP¹⁵ and rsEGFP2¹⁶. Very recently, variants of rsEGFP obtained by directed evolution were reported that mature and express more efficiently in the cytosol of mammalian cells¹⁷. RSFPs of anthozoan origin with enhanced photoswitching properties were also introduced, including the positive switcher Kohinoor¹⁸ evolved from Padron⁸, and the negative switcher SkyJan-S, evolved from mEos3.1¹⁹.

¹Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France. ²CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France. ³CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.C. (email: colletier@ibs.fr) or V.A. (email: virgile.adam@ibs.fr)

Despite the intensive development of PTFPs, some cellular substructures remain poorly explored at the nano-scale, in particular compartments where oxidative folding takes place, such as the peroxisome, the endoplasmic reticulum, the mitochondrial intermembrane space or the bacterial periplasm. These compartments yet harbour a large number of key macromolecules, involved in e.g. drug uptake, energy production, or oxidative metabolism. The major reason for this gap in the super-resolution field is that fluorescent proteins are generally unable to properly fold and emit light in highly oxidative environments²⁰. The development of a PTFP capable of oxidative folding is thus required to facilitate super-resolution imaging of such compartments in living cells.

The periplasm of Gram-negative bacteria, sometimes referred to as the entrance hall of the cell and accounting for 20–40% of its total volume²¹, is involved in important processes such as cell division, environmental signalling and cellular transport²². Accordingly, it hosts a variety of proteins involved in antibiotic action (e.g. penicillin binding proteins) and resistance (e.g. beta-lactamases, porins and efflux pumps components)^{23,24}. Understanding the molecular processes that take place in the periplasm is thus of both fundamental and biomedical interest. Four types of proteins face oxidative folding in the periplasm: secreted proteins, periplasmic proteins, inner membrane proteins and outer membrane proteins. Most outer-membrane, secreted and periplasmic proteins are exported in a post-translational manner, generally in the unfolded state via the Sec secretion pathway, and more rarely in the folded state through the twin arginine translocon (Tat) secretion pathway^{25,26}. Inner membrane proteins are inserted in a co-translational manner, following recognition of the nascent polypeptide chain emerging from the ribosome by the bacterial signal recognition particle (SRP) and binding of the tripartite complex to the membrane embedded SRP receptor²⁷. It was shown that the SRP and Sec system can act cooperatively, to ensure correct insertion of membrane proteins that harbour substantial hydrophilic periplasmic domains²⁸. Also, some periplasmic proteins are translocated through the SRP pathway. Although periplasmic GFP fluorescence could be observed after post-folding translocation through Tat²², GFP refolding after translocation through Sec has been shown to be problematic inside the periplasm due to undesirable intermolecular disulphide-bridge formation in the oxidative environment²⁰. While non-fluorescent, these GFP aggregates showed strong cytotoxicity²⁹. In contrast, Superfolder-GFP^{20,22,30,31}, a GFP variant engineered for fast maturation and folding kinetics, was shown to enable periplasmic protein localisation studies after Sec-mediated transport, notably when the SRP pathway was employed³⁰. Yet Superfolder-GFP is not phototransformable, and is thus unsuited for super-resolution imaging.

Here, we report the rational, structure-based design of two novel superfolding RSFPs, rsFolder and rsFolder2. Both RSFPs are able to fold and efficiently photoswitch in the bacterial periplasm, opening the door to nanoscopic live imaging of macromolecules in such ‘hostile’ compartments. Specifically, we show here that rsFolder2 is suited for RESOLFT imaging of the bacterial periplasm.

Results and Discussion

Design and photophysical characterisation of rsFolder. We reasoned that Superfolder-GFP and rsEGFP2, sharing GFP as a common “ancestor”, could be hybridised by pure rational design to provide a reversibly switchable variant capable of efficient folding in the oxidative environment of the *E. coli* periplasm. The four point mutations that allowed evolving EGFP into rsEGFP2 (T65A, Q69L, V163S, A206K)¹⁶ were thus engineered in Superfolder-GFP, yielding a new PTFP that we named rsFolder. The T65A mutation, known to confer photoswitching capabilities to rsEGFP2¹⁶, targets the Superfolder-GFP chromophore itself. Two out of the three other mutations target amino-acid positions (163 and 206) that were already modified in Superfolder-GFP relative to the GFP ancestor (see sequence alignment in Supplemental Fig. S1). We chose to retain these rsEGFP2 mutations in rsFolder as it was found that a serine at position 163 is critical to enhance the switching contrast in rsEGFP2¹⁶, while a lysine at position 206, facing the solvent, confers a strong monomeric character to GFP variants³². Thus, when compared to rsEGFP2, rsFolder exhibits six point mutations (S31R, N40Y, S100F, T106N, Y146F and M154T), only one of which occurs in the vicinity of the chromophore (Y146F) (Fig. S1, Fig. S2b).

The photophysical properties of rsFolder and rsEGFP2 are highly similar (Table 1, Fig. 1 and Fig. S3). As rsEGFP2, rsFolder is an efficient negative photoswitcher, both in purified form (Fig. 1a) and in live cells (Fig. S4). The two proteins display almost identical absorbance and fluorescence spectral properties (Fig. 1b,c). The pKa of the rsFolder chromophore (pKa = 5.5) is slightly lower than that of rsEGFP2 (pKa = 5.9) (Fig. S5, Table 1). Both RSFPs mature slower than Superfolder-GFP (~40 min), with respective half-times of ~2.5 h (rsFolder) and ~3 h (rsEGFP2), (Fig. 1d, Table 1). rsFolder is also monomeric (Fig. S6, Table S1) and refolds as swiftly as Superfolder-GFP (Fig. 1e). Thus, photophysical and biochemical data suggest that rsFolder has inherited both the fast folding properties of Superfolder-GFP and the fast switching properties of rsEGFP2. Its fluorescence emission is in addition maintained over a wide pH range (Fig. S7).

rsFolder yet displays its own peculiarities. First, the thermal stability of its *off* state (~64 hours) is 15 times higher than that of rsEGFP2 (Fig. 1f and Table 1) and, to our knowledge, unprecedented amidst RSFPs. Also, rsFolder exhibits a higher level of residual fluorescence after *off*-switching than rsEGFP2, leading to a reduced switching contrast (Fig. 1a, Fig. S4 and Table 1). This feature arises from the increased *off*-to-*on* quantum yield and the higher extinction coefficient of the *off*-state at 488 nm (Table 1, Fig. S3), is expected to compromise RESOLFT imaging. A possible explanation for these differences is that the two RSFPs photoswitch by different mechanisms. Molecular level insights are required to further substantiate this hypothesis.

Structural elucidation of rsEGFP2 and rsFolder photoswitching mechanisms. With the exception of Dreiklang³³, all RSFPs of hydrozoan origin have been proposed to undergo *cis-trans* isomerisation of their chromophore upon *off*-switching, by analogy with RSFPs of anthozoan origin³⁴. This hypothesis was confirmed recently by structural studies on the rsGreen0.7 variant of rsEGFP¹⁷. It remains unclear, however, whether rsEGFP2 and rsFolder photoswitch by the same mechanism or not. Inspection of the absorption spectra of rsEGFP2¹⁶ and rsFolder in their *off* state reveals a broad band centred at ~400 nm. This strongly suggests that in both proteins, the classical rule applies – that is, chromophore protonation couples with isomerisation. To shed

	Superfolder-GFP	rsEGFP2	rsFolder	rsFolder2
Excitation maximum <i>on</i> [nm]	487 (488)	479 (478)	477	478
Extinction coefficient (ϵ) <i>on</i> , pH 7.5 [$M^{-1}.cm^{-1}$]	54000 (83300)	57150 (61300)	51600	44000
Extinction coefficient (ϵ) <i>on</i> , fully anionic [$M^{-1}.cm^{-1}$]	63100	61900	58100	54800
Emission maximum <i>on</i> [nm]	510 (510)	503 (503)	503	503
Fluorescence quantum yield <i>on</i> (Φ_{flu})	0.65 (0.65)	0.35 (0.3)	0.25	0.23
Brightness at pH 7.5 <i>on</i> (relative to EGFP)	1.06 (1.64)	0.61 (0.56)	0.39	0.23
<i>On-to-off</i> switching quantum yield (Φ_{off})	NA	1.65×10^{-2}	2.1×10^{-2}	1.98×10^{-2}
Absorption maximum neutral form [nm]	393	403	403	400
Extinction coefficient (ϵ) <i>on</i> fully neutral [$M^{-1}.cm^{-1}$]	36800	27800	29200	25200
Absorption maximum acid/base denatured [nm]	385/450	399/446	399/444	393/444
Chromophore pK_a , <i>on</i>	5.4	5.9 (5.8)	5.5	5.5
Chromophore maturation rate [$10^{-4} s^{-1}$]	4.2	0.9	1.1	1.1
Refolding rate [$10^{-2} s^{-1}$]	1.5	0.7	1.2	1.6
Absorption maximum <i>off</i> [nm]	NA	406 (408)	413	410
Extinction coefficient (ϵ) <i>off</i> [$M^{-1}.cm^{-1}$]	NA	22000	27000	23500
Extinction coefficient (ϵ) <i>off</i> at 488 nm [$M^{-1}.cm^{-1}$]	NA	60	130	90
<i>Off-to-on</i> switching quantum yield (Φ_{on})	NA	0.33	0.44	0.28
Switching contrast	NA	~57	~26	~40
<i>Off-to-on</i> thermal recovery rate [$10^{-5} s^{-1}$]	NA	6.0	0.4	1.1

Table 1. *In-vitro* photophysical and biochemical properties of all proteins presented in this study. Values previously reported in different literature sources are shown between parentheses and are extracted from Pédelacq *et al.*, 2006 (Superfolder GFP) and Grotjohann *et al.*, 2012 (rsEGFP2). NA: Not Applicable

light on the switching mechanisms of rsFolder and rsEGFP2, we solved their crystallographic structures in both the *on* and *off* states (Fig. 2 and Table 2). The *on-to-off* switching was triggered by illumination of crystals with a fibre-coupled 488-nm laser. Models were refined at 1.45 Å (*on* state) and 1.50 Å (*off* state) resolution for rsEGFP2, and at 1.50 Å (*on* state) and 2.35 Å (*off* state) resolution for rsFolder, respectively. The experimental Fourier difference maps provide evidence that in both RSFPs, *off*-switching indeed results from *cis-trans* isomerisation of the chromophore (Fig. S8). Yet, our structures reveal major differences between the photoswitching mechanisms of rsEGFP2, rsFolder and Dronpa, the anthozoan RSFP archetype³⁵. In Dronpa and other negative RSFPs such as mTFP0.7³⁶ or IrisFP¹³, a drastic structural reorganisation of the chromophore environment is observed upon switching. The tightly H-bonded Glu144-His193-Glu211 triad in the *cis* conformation is replaced by the Glu144-Arg66-Glu211 triad in the *trans* conformation, with either His193 or Arg66 stabilizing the chromophore by π -stacking and cation- π interactions with the *p*-hydroxybenzylidene moiety, respectively³⁴. In rsEGFP2 and rsFolder, on the contrary, no such reorganisation of H-bonding networks is observed and the structural changes are restricted to the near environment of the chromophore phenolate (Fig. 2 and Fig. S8).

In the anthozoan negative RSFPs, it was also noticed that the free energy of the *trans* state is lowered by the ability of Ser142, which maintains a strong H-bond with the hydroxybenzylidene moiety in the *cis* state, to find another H-bonding partner upon chromophore isomerisation^{35,37}. A similar situation is observed in rsEGFP2, where His149, playing the same role as Ser142 in Dronpa (distance to the chromophore phenolate: 2.7 Å), finds Tyr146 as a surrogate H-bonding partner in the *trans* state of the chromophore. This photoswitching mechanism is identical to that recently reported for rsGreen0.7¹⁷. Of note, in these three RSFPs, the phenolate of the *off*-state chromophore loses all H-bonds to the barrel scaffold, being only H-bonded to a structural water molecule, hitherto absent in the *on*-state structure (Fig. 2a). However, a drastically different scenario is seen in rsFolder, where Tyr146 is replaced by a hydrophobic phenylalanine, one of the mutations inherited from Superfolder-GFP. Consequently, the switching pattern exhibited by rsFolder is unique. In the *on* state, the phenolate oxygen of the *cis* chromophore is H-bonded to Thr204, a water molecule and His149. Upon isomerisation the interactions with the two first partners are lost, while His149 and the phenolate oxygen remain H-bonded, resulting in a *trans* conformation of the chromophore that is a mirror image of the *cis* conformation (Fig. 2b). This highly unusual mechanism results in the *off*-state chromophore of rsFolder remaining tightly attached to the barrel scaffold and likely explains its exceptional thermal stability. The limited number of residues involved in rsFolder *on-to-off* switching, and the reduced cascade of H-bond formation and disruption that accompanies it, could result in a higher energy barrier for the *off-to-on* transition in rsFolder than in rsEGFP2.

Design and photophysical characterisation of rsFolder2. The crystallographic structures of rsEGFP2 and rsFolder in their *on* and *off* states provide a clear molecular basis for the observed higher thermal stability of rsFolder's *off* state. The reduced switching contrast of rsFolder is more difficult to explain in structural terms. The unique symmetry observed between the *on* and *off* states of rsFolder could possibly play a role. Structural data also reveal the central role of the amino-acid at position 146 in differentiating the switching mechanisms of the two RSFPs, and suggest a straightforward strategy to rationally evolve the mechanism of rsFolder into that of rsEGFP2 – that is, replacing its Phe146 by a tyrosine. The F146Y mutant of rsFolder, referred to as rsFolder2, was

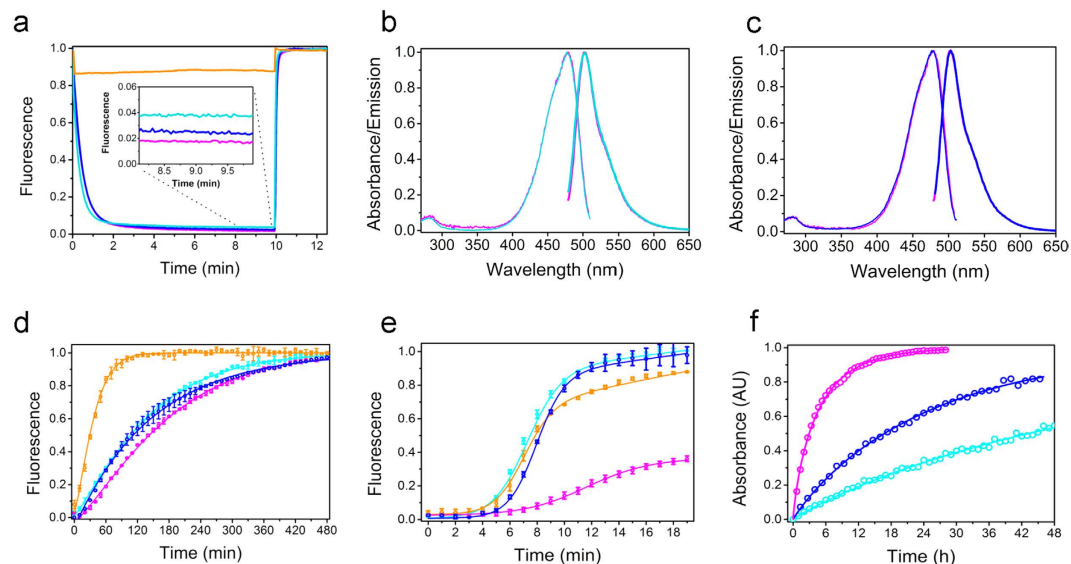


Figure 1. Spectroscopic and biochemical characteristics. Superfolder-GFP (orange), rsEGFP2 (purple), rsFolder (cyan) and rsFolder2 (navy). **(a)** Switching cycle at low illumination intensity (488 nm: 1.9 mW/cm², 405 nm: 2.2 mW/cm²). rsFolder switches *off* faster than rsEGFP2 but reaches a higher residual fluorescence in the *off* state (inset). rsFolder2 behaves similarly to rsEGFP2 in terms of switching speed and contrast. Apparent residual switching is solely due its direct fluorescence excitation by the 405-nm laser. **(b,c)** Excitation and emission spectra of rsFolder (b, cyan) and rsFolder2 (c, navy), as compared to those of rsEGFP2 (purple). **(d)** Chromophore maturation kinetics show that the chromophores of rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2 (Ala-Tyr-Gly) mature at similar rates while that of Superfolder-GFP (Thr-Tyr-Gly) matures faster. Error bars represent the standard deviation over triplicate measurements. **(e)** Fluorescence recovery kinetics during refolding after chaotropic denaturation by guanidine hydrochloride. The fluorescence signal was monitored continuously at 25 °C. Error bars represent the standard deviation over triplicate measurements. **(f)** Thermal relaxation of the photoswitched *off* states followed at the on-state maximum absorbance for rsEGFP2 (purple), rsFolder (cyan) and rsFolder2 (navy). See Table 1 for values.

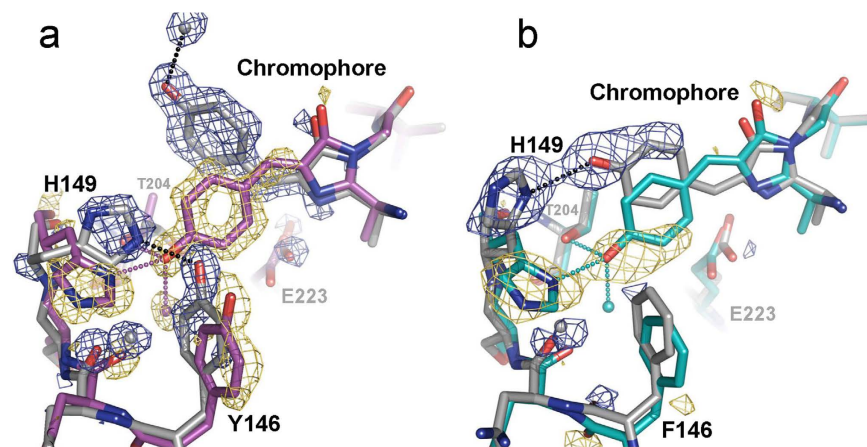


Figure 2. Crystal structures of rsEGFP2 and rsFolder in their *on* and *off* states. Refined models of the chromophores and surrounding residues are shown for rsEGFP2 **(a)** and rsFolder **(b)**. Initial *on* states are shown with coloured carbon atoms (purples and cyan for rsEGFP2 and rsFolder, respectively). *Off* states are shown with grey carbons. The $F_{\text{obs}}(\text{off}) - F_{\text{obs}}(\text{on})$ difference electron density maps contoured at $\pm 4.5 \sigma$ (yellow: negative; blue: positive) highlight atoms exhibiting a notable motion from the fluorescent state (*cis* conformation) to the photoswitched state (*trans* conformation). H-bonds (2.7–2.9 Å) are shown with dashed lines.

	rsEGFP2 <i>on</i> -state	rsEGFP2 <i>off</i> -state	rsFolder <i>on</i> -state	rsFolder <i>off</i> -state
PDB entry	5DTX	5DTY	5DTZ	5DU0
Beamline	ESRF/ID23-2	ESRF/ID23-2	ESRF/ID29	ESRF/ID29
Wavelength, Å	0.873	0.873	0.976	0.992
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C2	C2
<i>a</i> , Å	50.99	51.20	142.47	141.29
<i>b</i> , Å	62.91	62.81	134.56	134.80
<i>c</i> , Å	70.84	70.55	51.72	51.05
α, γ, \circ	90.0	90.0	90.0	90.0
β, \circ	90.0	90.0	106.05	105.58
Resolution, Å	47.04-1.45 (1.50-1.45)	46.91-1.5 (1.55-1.5)	95.97-1.50 (1.55-1.50)	95.77-2.35 (2.43-2.35)
*R _{sym} , %	5.2 (64.3)	7.5 (60.1)	7.8 (63.7)	10.4 (53.0)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	16.1 (2.3)	11.9 (1.2)	9.0 (1.1)	10.1 (2.2)
Completeness, %	99.35 (99.70)	98.13 (91.59)	97.12 (81.62)	98.07 (88.56)
Redundancy	4.3 (4.4)	4.6 (4.1)	4.0 (2.8)	4.0 (4.0)
Unique reflections	40827 (3787)	36769 (3364)	144849 (12182)	37525 (3391)
Wilson B factor, Å ²	13.76	14.85	20.82	39.94
#R _{work} /R _{free}	0.17/0.21	0.18/0.22	0.18/0.20	0.21/0.26
Average B factor, Å ²	18.9	21.9	25.0	41.3
Rmsd				
<i>Bond length</i> , Å	0.014	0.018	0.010	0.007
<i>Bond angles</i> , °	1.65	1.76	1.33	1.07
<i>Favored</i>	98.0	97.0	99.0	98.0
<i>Allowed</i>	2.0	1.8	0.78	1.78
<i>Outliers</i>	0.0	1.2	0.22	0.22

Table 2. Crystallographic data collection and refinement statistics. Values in parentheses refer to the highest resolution shell. $R_{sym} = \sum_j \sum_h |I_{h,j} - \langle I_h \rangle| / \sum_j \sum_h I_{h,j}$, $R_{work} = \sum_h |F_{obs} - F_{cal}| / \sum_h F_{obs}$, R_{free} is calculated with a small fraction (5%) of reflections chosen to be part of a test group.

therefore produced and characterised. As expected, rsFolder2 displays a higher switching contrast (Fig. 1a, Fig. S4) and a reduced thermal stability for its *off* state as compared to rsFolder (Fig. 1f), bringing its photophysical behaviour very close to that of rsEGFP2. Concomitantly, the maturation (Fig. 1d) and refolding kinetics inherited from Superfolder-GFP are essentially preserved in rsFolder2 (Fig. 1d,e). Altogether, these properties (switching contrast, photoresistance, maturation and folding) suggest that rsFolder2 could be a suitable candidate for nano-scale imaging of the bacterial periplasm, using RESOLFT microscopy.

Expression and RESOLFT imaging in the periplasm. Having established that rsFolder and rsFolder2 are both fast-switching and photofatigue-resistant RSFPs and that they refold, *in vitro*, just as well as Superfolder-GFP, we asked whether they could fold and photoswitch in the cellular context, *i.e.* when expressed in the cytosol (pET15-b vector) or the periplasm (pET26-b(+) vector, Sec pathway) of *E. coli* cells. Bacterial cell brightness, here expressed as the ratio between the fluorescence signal (at 505 nm) and the optical density (at 600 nm), informs on the total amount of folded FPs present in living cells. When compared to cytosolic expression, all clones displayed lower bacterial cell brightness in periplasmic expression tests, with the most dramatic effect being observed on cells expressing rsEGFP2 (Fig. S9a). Figure 3 shows that cultures expressing rsEGFP2 into the periplasm die prematurely, presumably owing to the accumulation and deposition of unfolded proteins into toxic aggregates. In contrast, periplasmic expression of rsFolder and rsFolder2 does not affect cell viability (Fig. 3a). The reduced brightness of cells expressing periplasmic rsFolder and rsFolder2 likely originates from the inherently smaller volume of the periplasm, and its regulated overall protein-load. To verify this hypothesis, we separated the periplasmic and cytosolic contents of the cells and evaluated the amount of RSFP present in each compartment by fluorimetry and gel electrophoresis (Fig. S9b). The results support the hypothesis that the amount of protein that can be addressed to the periplasm is indeed limited. Incidentally, they also confirm that the observed fluorescence mostly (~70%) originates from periplasmic RSFPs. Importantly, switching experiments performed on cells grown on solid medium confirm that the switching efficiencies of rsFolder and rsFolder2 are preserved in the cellular context (Fig. 3b and Fig. S4). Data also show that the photofatigue resistance is similar when the RSFPs are addressed to the periplasm.

We set to determine whether rsFolder and rsFolder2 could be used for imaging. First, we imaged cells expressing rsEGFP2, rsFolder or rsFolder2 in either the cytosol or the periplasm by wide field imaging (Fig. 4a). Cells expressing the RSFPs in the cytosol show a homogeneous fluorescence distribution, whereas clearly delineated periplasms are visible on images of cells expressing periplasmic rsFolder or rsFolder2. Unsurprisingly, cells expressing periplasmic rsEGFP2 show a hardly detectable signal and no delineation of the periplasm.

We then performed RESOLFT microscopy on *E. coli* cells expressing periplasmic rsFolder2. From measures of the narrowest regions, we derived a resolution of ~70 nm for the periplasm (Fig. 4b, line plot 1). Some bacteria

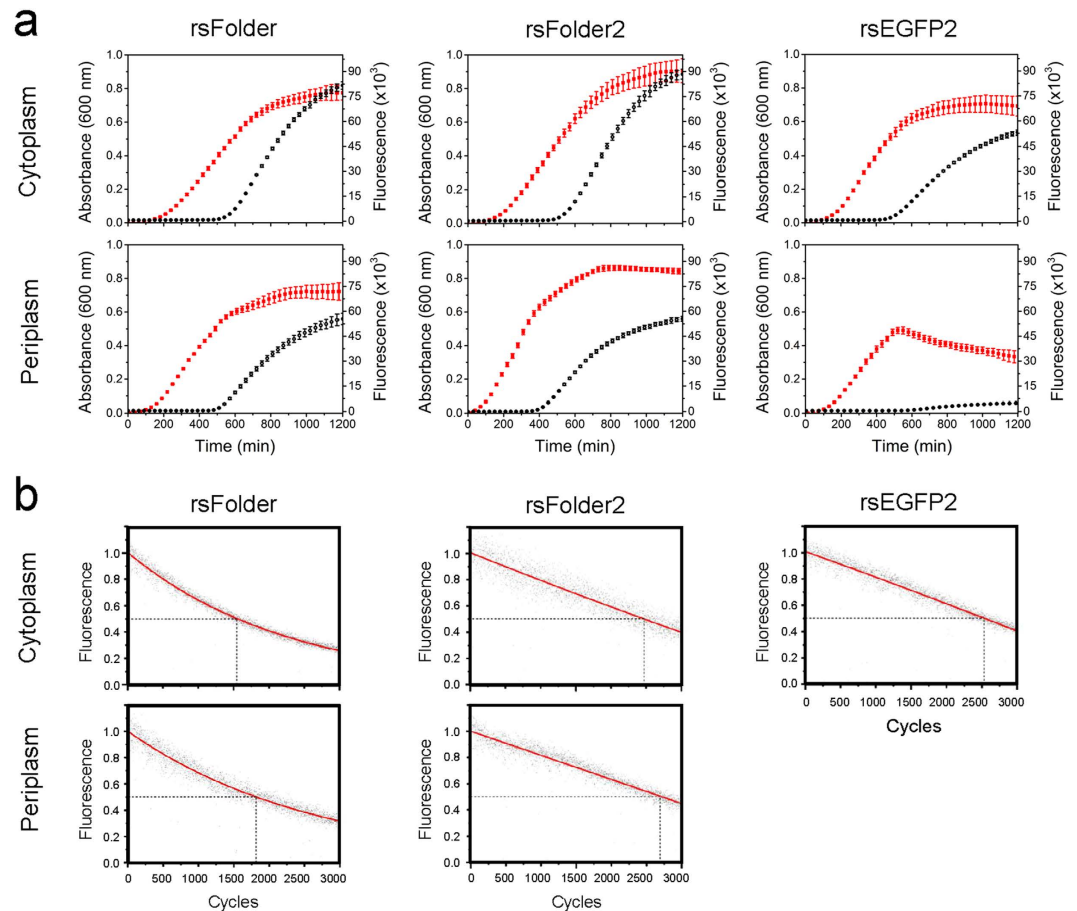


Figure 3. Cytoplasmic and periplasmic expressions and switching fatigue. (a) Bacterial growth from a single colony in autoinduction medium and further cytoplasmic and periplasmic expressions of rsFolder, rsFolder2 and rsEGFP2 were monitored in absorbance (red) and in fluorescence (black), respectively, during 20 hours. Error bars represent standard deviations over triplicate measurements. The production of rsEGFP2 targeted to the periplasm corresponds to a brutal stop of bacterial growth that can be explained by cell toxicity induced by periplasmic clogging. (b) Switching fatigue measurements of rsFolder and rsFolder2 in comparison to rsEGFP2, expressed in the cytoplasm as well as in the periplasm of living *E. coli* cells. The black dots indicate the maximum *on*-state fluorescence of each switching cycle. The corresponding fitted exponential decay curves are shown in red. The dashed lines illustrate the numbers of cycles the different RSFP samples can achieve before being bleached to half of their initial fluorescence.

showed heterogeneous structures possibly due to the presence of peptidoglycan and associated proteins occupying the periplasmic space (Fig. 4b, line plots II–III). We were also able to distinguish the periplasm of two adjacent bacteria separated by a distance as short as 110 nm (Fig. 4b, line plot IV), demonstrating a significant resolution enhancement compared to diffraction limited imaging. A similar resolution (80 nm) was obtained in controls where a fusion of rsFolder2 with keratin18 was expressed in the cytosol of HeLa cells to benchmark its RESOLFT performance (Fig. S10)^{15,16}. The RESOLFT micrographs show that the thickness of the periplasm widely varies among cells (Fig. 4b). We correlate this observation with electron micrographs, which reveal that the periplasm is generally larger in isolated cells (up to hundreds of nm) than in colony cells (few tens of nm) (Fig. S11a). The heterogeneous nature of the periplasm, and the improvement in resolution allowed by rsFolder2, are further evidenced by the visualisation of what could be outer-membrane budding events and vesicle formation in the RESOLFT images (indicated by arrows in Fig. S11b,c)³⁸. Transmission electron micrographs reveal the same features (Fig. S11b). Thus, our results altogether open the door to the live fluorescence super-resolution imaging of complex periplasmic and outer-membrane processes hitherto traceable only by electron microscopy.

The rsFolders are the two first RSFPs endowed with oxidative folding capabilities. We have shown that both are able to fold and photoswitch in the bacterial periplasm, and that rsFolder2 can be used to obtain RESOLFT sub-diffraction images. It remains to be determined whether the rsFolders can be used in other prokaryotic or eukaryotic cellular compartments where oxidative-folding takes place, including the endoplasmic reticulum, thylakoid membranes, the mitochondrial intermembrane space and the external medium³⁹. Despite its lower brightness, the second-generation mutant rsFolder2 displays improved switching contrast when compared to rsFolder, making it a well-suited candidate for RESOLFT. We anticipate that this variant could also be useful for other techniques such as patterned activation nonlinear SIM⁴⁰ or pcSOFI⁶ for the imaging of periplasmic proteins

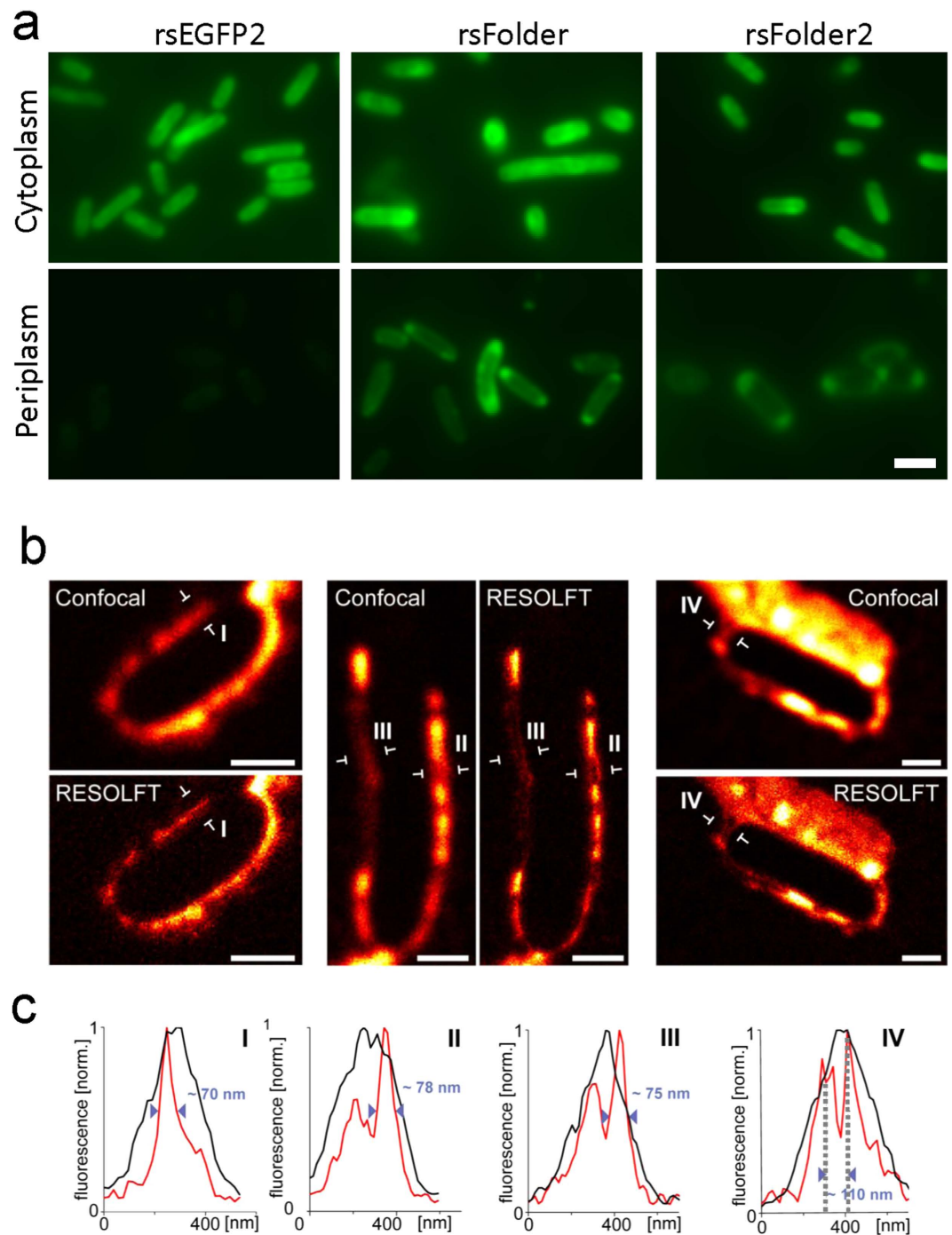


Figure 4. Wide field and RESOLFT Imaging. (a) Representative wide field images of fixed *E. coli* bacteria expressing rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2 either in the cytoplasm or in the periplasm. All images were obtained using the same illumination conditions and scaled on the same dynamical range. Scalebar: 2 μ m. (b) RESOLFT imaging of live *E. coli* bacteria expressing rsFolder2 in the periplasm and corresponding diffraction limited confocal images. (c) Graphs I-IV illustrate line profiles across the periplasm at the locations indicated by arrows in (b). Each profile is an average of five adjacent lines distant by 30 nm. Scalebar: 1 μ m

in living cells. rsFolder is not adapted for RESOLFT imaging but may prove useful for other super-resolution approaches, such as pcSOFI or potential methods taking advantage of its extreme stability in the *off* state. Further fine-tuning of the photophysical properties of the rsFolders' scaffold can be envisaged, to better adapt it to other super-resolution techniques. For instance, slow-switching and/or red-shifted rsFolder variants could be developed for single-molecule localisation microscopy and/or multicolour imaging. Specific to RESOLFT imaging, rsFolder2 could be evolved to increase the attainable resolution, either rationally or by directed evolution. Whether or not such improvements are at hand will be determined by future research.

Methods

Materials and plasmids. *E. coli* DH5 α cells were used for cloning and DNA amplification while *E. coli* BL21 (DE3) were used for expression. Unless otherwise stated, all bacterial cultures were grown in LB medium supplemented with 100 μ g/ml ampicillin (cytoplasmic rsFolder, rsFolder2 and rsEGFP2) or 30 μ g/ml kanamycin (cytoplasmic Superfolder-GFP and periplasmic rsFolder, rsFolder2 and rsEGFP2). Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

The Superfolder-GFP/pET-30 and rsEGFP2/pQE31 plasmids were kindly provided by Dr. Cécile Morlot and Prof. Stefan Jakobs, respectively. rsFolder was designed based on the structure of Superfolder-GFP, by introducing into the sequence the four key mutations of rsEGFP2 when compared to EGFP (T65A, Q69L, A163S et V206K). The sequence, synthesised by Eurofins MWG Operon, was recursively codon-optimised both for human and *E. coli* expressions and a Kozak sequence was inserted for potential expression in mammalian cells. Most common restriction sites were removed from the resulting coding sequence to facilitate further cloning uses. rsFolder2 was obtained by directed mutagenesis, using the rsFolder template, and is a single-point mutant of rsFolder (F146Y). For cytosolic expression tests, rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2 were subcloned in pET-15b (between *Nde*I and *Bam*HI restriction sites). For periplasmic expression tests, the proteins were subcloned in pET-26b(+) using the Gibson assembly method⁴¹. Plasmid DNA and PCR fragments were purified with a QiaPrep spin miniprep kit (Qiagen) and a Qiaquick PCR purification kit (Qiagen), respectively. The plasmid encoding the keratin18-rsFolder2 fusion protein was generated by replacing the coding sequence of TagRFP by that of rsFolder2 (restriction sites: *Kpn*I and *Not*I) in the commercial pTagRFP-keratin vector (Evrogen, Moscow, Russia).

Expression, purification and crystallogenesis. Fluorescent proteins fused to an N-terminal polyhistidine tag were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. After cell lysis, the fluorescent proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography followed by size exclusion chromatography using a HiLoad 16/600 Superdex 75 column (GE healthcare, Freiburg, Germany). Purified proteins were concentrated by ultrafiltration and equilibrated in buffer solutions (50 mM HEPES pH 7.5). Crystals of rsEGFP2 and rsFolder were obtained by the hanging-drop vapour diffusion method at 20 °C. Briefly, the protein (12 mg/ml for rsEGFP2 and 10 mg/ml for rsFolder) and precipitant solution (0.1 M HEPES pH 8.1, 1.7 M ammonium sulphate for rsEGFP2 and 0.1 M Tris pH 8.5, 20% PEG 3,350 for rsFolder) were mixed 1:1, yielding 2- μ l drops that were placed over a 1 ml well containing the precipitant solution. Crystals appeared within 1–7 days.

Crystallographic characterisation. Prior to data collection, crystals of rsEGFP2 and rsFolder in their *on* states were cryoprotected by a short soak in the mother liquor supplemented with 15% glycerol, followed by flash-cooling in liquid nitrogen. In order to generate the *off* states, crystals were illuminated for ~1 min with a fibre-coupled 488-nm laser after cryoprotection and before flash-cooling in liquid nitrogen. X-ray diffraction data sets were collected at 100K at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) on beamlines ID23-2⁴² (rsEGFP2) and ID29⁴³ (rsFolder), equipped with a PILATUS 2M and a PILATUS 6M detector, respectively. Data were processed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors were generated using XDSCONV⁴⁴. Structures were phased by the molecular replacement method using as a starting model the X-ray structure of Superfolder-GFP (PDB ID: 2B3P) and the program PHASER⁴⁵. Model building was performed with *Coot*⁴⁶. Energy minimisation and individual B-factor refinement followed each stage of manual rebuilding. Refinement and map calculations were performed using REFMAC⁴⁷ and PHENIX⁴⁸. Data collection and refinement statistics are given in Table 2. Figures were produced using PyMOL⁴⁹.

Analytical ultracentrifugation. Sedimentation velocity experiments were performed in a XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA), with a rotor speed of 42,000 rpm, at 20 °C, using an AnTi-50 rotor. Depending on their concentrations, samples of 55, 110 or 420 μ l were respectively loaded in 1.5-, 3-, or 12-mm, path length Ti double-sector centrepieces equipped with sapphire windows (Nanolytics GmbH, Germany). The solvent and reference buffers were 50 mM HEPES pH 7.5; 150 mM NaCl. Radial scans at 280, 488 or 395 nm and from interference optics were monitored. Data were processed using standard methods as implemented in the Sedfit software, v14.6e (www.analyticalultracentrifugation.com) for data analysis. Buffer parameters (in particular, the sedimentation coefficient at 20 °C, s_{20w}) were calculated using the program Sednterp (sednterp.unh.edu), and assuming a density (ρ) and a viscosity (η) of 1.008 g.ml⁻¹ and 1.05 mPa.s, respectively. Sedimentation velocity profiles were analysed both in terms of continuous distribution $c(s)$ of sedimentation coefficients (s)⁵⁰ and in the framework of the non-interacting species model, providing experimental values for s and concentration, on the one hand, and the molar mass M , on the other. Predicted partial specific volume \bar{v} and refractive index increment ($\partial n/\partial c$) were 0.733 ml.g⁻¹ and 0.189 for rsFolder, and 0.735 ml.g⁻¹ and 0.190 for rsEGFP2, indicating that the two proteins sediment as monomers. Figures were produced using Gussi v1.0.9e (biophysics.swmed.edu/MBR/software.html).

Spectroscopic characterisation. Absorption spectra were recorded using a Jasco V-630 UV/VIS photometer (Easton, USA). Excitation ($\lambda_{em} = 540$ nm) and emission ($\lambda_{ex} = 480$ nm) spectra as well as refolding, maturation and expression kinetics were recorded using a Biotek Synergy H4 microplate reader (Winooski, VT, USA). Emission spectra were obtained using excitation at 480 nm while excitation spectra were obtained measuring fluorescence at 540 nm. Molar extinction coefficients were determined using the Ward method⁵¹. Fluorescence quantum yields were calculated relative to fluorescein ($\Phi_{FL} = 0.95$) and cross-validated between proteins using the method described by Williams *et al.*⁵² pKa values were determined by measuring the anionic absorbance peak of the various FPs as a function of pH, using different buffers [citric acid (pH 3.5), sodium acetate (4.0–5.0), MES (5.5–6.5), HEPES (7.0–8.5), CHES (9.0–9.5)]. Thermal stabilities of the switched-off

RSFPs were measured by monitoring the absorption as a function of time, every 10 minutes for 1 to 5 days. Photoinduced fluorescence recoveries of switched-off FP s were measured at 20 °C with a CCD-based spectrometer (AvaSpec-ULS2048, Avantes, Eerbeek, The Netherlands) coupled with optic fibres to a cuvette holder. Diluted proteins (50 µl) were placed in a 50-µl 3-window cuvette and a square diffuser (Thorlabs, ED1-S50) was put in front of the cuvette to ensure homogeneous laser excitations at 488 nm (1.9 mW/cm²) and 405 nm (2.2 mW/cm²). Fluorescence emission was measured every 2 s ($\lambda_{em} = 506 \pm 4$ nm for rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2; $\lambda_{em} = 512 \pm 4$ nm for Superfolder-GFP).

Constant illumination at 488 nm served both to switch off the proteins and excite their fluorescence while alternating illumination at 405 nm was used during 150 seconds every 600 seconds to promote off-to-on recoveries. Evolutions of the fluorescence signal were then analysed with MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA) in the framework of the method described in Duan *et al.*⁵³, allowing accurate calculation of switching quantum yields.

Refolding kinetics. All proteins were diluted to 0.1 mg/ml in a denaturation buffer (8 M guanidine hydrochloride, 1 mM DTT, 50 mM HEPES pH 7.5) and heated for 10 minutes at 65 °C. Surprisingly, a treatment by concentrated urea without heating was not sufficient to properly unfold these fluorescent proteins. Denatured proteins were then diluted 10 times in a renaturation buffer (35 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM Tris pH 7.5, 30% glycerol). For each protein, refolding kinetics were measured by following the fluorescence recovery at 25 °C ($\lambda_{em} = 485 \pm 9$ nm for all proteins; $\lambda_{em} = 505 \pm 9$ nm for rsFolder, rsFolder2 and rsEGFP2 and at $\lambda_{em} = 510 \pm 9$ nm for Superfolder-GFP) every minute during 20 minutes. Data points were fitted along time t with the function $F = F_0 + [A + c \cdot t / (1 + \exp[k(t_m - t)])]$ with k , the refolding rate; t_m , the median refolding time; and the derived lag parameter obtained by $t_m - (2/k)$. All experiments were performed in triplicate.

Maturation kinetics. Maturation kinetics were measured using a protocol adapted from Moore *et al.*⁵⁴ Briefly, 50 ml of bacterial cultures were grown in LB medium in 250-ml flasks to an optical density of 0.6 and then transferred into sealed 50-ml tubes. This allowed to create an anaerobic environment that permits protein expression but stops the cell division and chromophores maturation. Proteins were expressed overnight at room temperature after IPTG induction (1 mM). At 4 °C, cells were then harvested by centrifugation, resuspended in 5 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 mM, 1 tablet of anti-protease cocktail supplemented with DNaseI) and lysed by sonication. After centrifugation, 50 µL of supernatant were added to 200 µL of re-oxygenation buffer (35 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5). Fluorescence intensities were recorded at 37 °C every 10 minutes during ~8 hours. All experiments were performed in triplicate.

Cytoplasmic and periplasmic expressions. To ensure a synchronised start of protein expression and to warrant that no detectable absorbance or fluorescence was present at the beginning of the experiment, bacteria were grown in an auto-inducible medium for these expression tests. Briefly, for each clone, a single bacterial colony was used to inoculate 5 ml of auto induction growth medium⁵⁵ at 25 °C, further distributed into 96-well plates with 100 µl per well. Bacteria were grown using glucose as carbon source until an OD of 0.6 was reached (~8 hours), after what protein expression was initiated by switching to lactose as carbon source, and both OD (600 nm) and fluorescence (505 nm) were monitored as a function of time. Bacterial cell brightness was expressed as the ratio between the fluorescence value and O.D. after 20 h of growth. Cytoplasmic and periplasmic expression levels were further quantified by bacterial fractionation, as previously described⁵⁶. Briefly, induced bacterial cultures were pelleted at 3,000 g for 10 min at 4 °C, resuspended in 0.5 ml TSE buffer (200 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM sucrose and 1 mM EDTA) and incubated on ice for 30 minutes. 0.5 ml of ice cold water was added and incubated for 30 min. Cells were pelleted and the supernatant was collected as the periplasmic fraction. The pellet was resuspended in 5 ml BugBuster protein extraction reagent (Novagen 70921-3) and further incubated for 30 min at room temperature. The lysates were then centrifuged at 16,000 g for 45 min at 4 °C, and the supernatant was collected as the cytoplasmic fraction. Bacterial fractions were loaded on SDS-PAGE 12% acrylamide gels and visualised using Coomassie blue. To quantify folded proteins in each compartment, periplasmic and cytoplasmic fractions were diluted 10 times in HEPES (pH 7.5) and fluorescence intensities were recorded.

Bacterial photofatigue measurement. Switching fatigue measurements on living *E.coli* colonies were performed by alternate irradiation with laser light of 405 nm (to switch RSFPs on) and 488 nm (to switch RSFPs off). The light was focus by a 20-fold objective (NA = 0.4) onto a colony, providing power densities of ~0.5 kW/cm² (488 nm) and ~0.1 kW/cm² (405 nm). For each RSFP, illumination was kept as short as needed to attain 100% photoswitching. Fluorescence was recorded with a PMT (photomultiplier tube).

Wide field and RESOLFT microscopy. Bacterial cultures were grown in TB medium supplemented with 1% glycerol to an O.D. of 0.6 and then induced with IPTG overnight at 20 °C. After induction, cells were pelleted, fixed (for wide field imaging) or not (for RESOLFT imaging) with 4% paraformaldehyde, and then washed twice with PBS. A drop of the cell slurry was deposited on glass coverslips previously coated with chitosan (for wide field imaging) or LB agar (for RESOLFT imaging) and mounted onto glass slides.

For mammalian cells experiments, HeLa cells were seeded on cover slides overnight. Transfection was performed using Turbofect (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's manual. After 1 day of incubation cells were glued on object slides with picodent twinsil silicone (Picodent, Wipperfurth, Germany), preventing dying, and subsequently imaged.

Wide field imaging experiments were performed on an IX81 Olympus inverted microscope equipped with a 100X oil-immersion objective of 1.49 numerical aperture and an anti-drift NPS nosepiece (Olympus). Samples

were illuminated by circularly polarised 488-nm (Spectra-Physics, Santa Clara, USA) 300 μ W, 23.5 μ m FWHM Gaussian-shaped laser beam.

RESOLFT microscopy was performed using a Quad P microscope (Abberior Instruments, Goettingen, Germany), equipped with a 100X oil immersion objective of 1.4 numerical aperture. RESOLFT images were recorded by applying the following illumination sequence at each scanning position: first rsFolder2 was switched to the *on*-state by illuminating with 405-nm light (30 μ s at 2.2 to 2.5 μ W). Second a doughnut-shaped beam of 488-nm light (640 to 670 μ s at 14 μ W) was used to switch the proteins in the periphery of the focal spot into the *off*-state. Third, the fluorescent signal of residual *on*-state proteins at the centre of the spot was recorded at 510 nm following excitation by a 488-nm light (10 to 30 μ s at 5 to 7 μ W). Before and after *off*-switching with the doughnut-shaped beam, short illumination breaks (up to 60 μ s) were introduced into the switching sequence. The scanning step size was set to 30 nm. Detailed information concerning the imaging parameter is provided in table S2.

Electron microscopy. Transmission electron microscopy was used to visualise *E. coli* BL21 DE3 cells grown in the interstice between LB-agar solid media and an electron microscopy grid^{57,58}. Briefly, cells were grown overnight to an optical density of \sim 1 at 600 nm. 20 μ L of ten-times diluted cells were deposited on LB-agar media, incubated for 1 h at 37 °C, before adding an electron microscopy grid atop of them. Plates were incubated for 3 additional hours at 37 °C. EM grids were then removed gently, washed 6 times with drop of sterile water and then either imaged directly or after being subjected to negative-staining with 2% (w/v) sodium silicotungstate. Images were taken under low-dose conditions with a CM12 and Tecnai 12 LaB6 electron microscope working at 120 kV and with nominal magnifications of 22,000X and 45,000X using an Orius TM SC1000 CCD camera from Gatan.

References

- Adam V., Berardozi R., Byrdin M. & Bourgeois D. Phototransformable fluorescent proteins: Future challenges. *Curr Opin Chem Biol* **20**, 92–102 (2014).
- Fernandez-Suarez M. & Ting A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 929–943 (2008).
- Han R., Li Z., Fan Y. & Jiang Y. Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J Genet Genomics* **40**, 583–595 (2013).
- Hofmann M., Eggeling C., Jakobs S. & Hell S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17565–17569 (2005).
- Rego E. H. *et al.* Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E135–143 (2012).
- Dedecker P., Mo G. C., Dertinger T. & Zhang J. Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 10909–10914 (2012).
- Ando R., Mizuno H. & Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science* **306**, 1370–1373 (2004).
- Andresen M. *et al.* Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* **26**, 1035–1040 (2008).
- Lummer M., Humpert F., Wiedenlubbert M., Sauer M., Schuttelpelz M. & Staiger D. A new set of reversibly photoswitchable fluorescent proteins for use in transgenic plants. *Mol Plant* **6**, 1518–1530 (2013).
- Stiel A. C. *et al.* Generation of monomeric reversibly switchable red fluorescent proteins for far-field fluorescence nanoscopy. *Biophys J* **95**, 2989–2997 (2008).
- Subach F. V., Zhang L., Gadella T. W., Gurskaya N. G., Lukyanov K. A. & Verkhusha V. V. Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET. *Chem Biol* **17**, 745–755 (2010).
- Chang H. *et al.* A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 4455–4460 (2012).
- Adam V. *et al.* Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 18343–18348 (2008).
- Adam V. *et al.* Rational design of photoconvertible and biphotocromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications. *Chem Biol* **18**, 1241–1251 (2011).
- Grotjohann T. *et al.* Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature* **478**, 204–208 (2011).
- Grotjohann T. *et al.* rEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells. *Elife* **1**, e00248 (2012).
- Duwe S. *et al.* Expression-Enhanced Fluorescent Proteins Based on Enhanced Green Fluorescent Protein for Super-resolution Microscopy. *ACS Nano*, (2015).
- Tiwari D. K. *et al.* A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy. *Nat Methods* **12**, 515–518 (2015).
- Zhang X. *et al.* Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *ACS Nano* **9**, 2659–2667 (2015).
- Aronson D. E., Costantini L. M., Snapp E. L. & Superfolder G. F. P. is fluorescent in oxidizing environments when targeted via the Sec translocon. *Traffic* **12**, 543–548 (2011).
- Stock J. B., Rauch B. & Roseman S. Periplasmic space in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. *J Biol Chem* **252**, 7850–7861 (1977).
- Dammeyer T. & Tinnfeld P. Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Comput Struct Biotechnol J* **3**, e201210013 (2012).
- Alekshun M. N. & Levy S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037–1050 (2007).
- Pages J. M., James C. E. & Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 893–903 (2008).
- Desvaux M., Hebraud M., Talon R. & Henderson I. R. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* **17**, 139–145 (2009).
- Economou A. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions (Review). *Mol Membr Biol* **19**, 159–169 (2002).
- Luirink J. & Sinning I. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 17–35 (2004).
- Neumann-Haefelin C., Schafer U., Muller M. & Koch H. G. SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J* **19**, 6419–6426 (2000).
- Feilmeier B. J., Iseminger G., Schroeder D., Webber H. & Phillips G. J. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in Escherichia coli. *J Bacteriol* **182**, 4068–4076 (2000).

30. Dinh T. & Bernhardt T. G. Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *J Bacteriol* **193**, 4984–4987 (2011).
31. Pedelacq J. D., Cabantous S., Tran T., Terwilliger T. C. & Waldo G. S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**, 79–88 (2006).
32. Zacharias D. A., Violin J. D., Newton A. C. & Tsien R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913–916 (2002).
33. Brakemann T. *et al.* A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. *Nat Biotechnol* **29**, 942–947 (2011).
34. Bourgeois D. & Adam V. Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view. *IUBMB Life* **64**, 482–491 (2012).
35. Wilmann P. G. *et al.* The 1.7 Å crystal structure of Dronpa: a photoswitchable green fluorescent protein. *J Mol Biol* **364**, 213–224 (2006).
36. Henderson J. N., Ai H. W., Campbell R. E. & Remington S. J. Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 6672–6677 (2007).
37. Stiel A. C. *et al.* 1.8 Å bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein Dronpa guides the generation of fast switching variants. *Biochem J* **402**, 35–42 (2007).
38. Beveridge T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**, 4725–4733 (1999).
39. Kojer K. & Riemer J. Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 1383–1390 (2014).
40. Li D. *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* **349**, aab3500 (2015).
41. Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., Venter J. C., Hutchison C. A., 3rd & Smith H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343–345 (2009).
42. Flot D. *et al.* The ID23-2 structural biology microfocus beamline at the ESRF. *J Synchrotron Radiat* **17**, 107–118 (2010).
43. de Sanctis D. *et al.* ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering. *J Synchrotron Radiat* **19**, 455–461 (2012).
44. Kabsch W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* **26**, 795–800 (1993).
45. McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L. C. & Read R. J. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658–674 (2007).
46. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G. & Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486–501 (2010).
47. Murshudov G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355–367 (2011).
48. Adams P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213–221 (2010).
49. DeLano W. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC., (2002).
50. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**, 1606–1619 (2000).
51. Ward W. W. Properties of the coelenterate green-fluorescent proteins. In: *Bioluminescence and chemiluminescence: basic chemistry and analytical applications* (ed[^](eds DeLuca M. A., McElroy W. D.)). Academic Press (1981).
52. Williams A. T. R., Winfield S. A. & Miller J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *The Analyst* **108**, 1067 (1983).
53. Duan C., Byrdin M., El Khatib M., Adam V. & Bourgeois D. Rational design of enhanced photoresistance in a photoswitchable fluorescent protein. *Methods Appl Fluoresc* **3**, (2015).
54. Moore M. M., Oteng-Pabi S. K., Pandelieva A. T., Mayo S. L. & Chica R. A. Recovery of red fluorescent protein chromophore maturation deficiency through rational design. *PLoS One* **7**, e52463 (2012).
55. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207–234 (2005).
56. Quan S., Hiniker A., Collet J. F. & Bardwell J. C. Isolation of bacteria envelope proteins. *Methods Mol Biol* **966**, 359–366 (2013).
57. de Jong I. G., Beilharz K., Kuipers O. P. & Veening J. W. Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using Automated Time-lapse Microscopy. *J Vis Exp*, (2011).
58. Dubey G. P. & Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* **144**, 590–600 (2011).

Acknowledgements

This work used the platforms of the Grenoble Instruct Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Support for this work comes from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-BSV5-012-01 NOBLEACH to D.B. and ANR-12-BS07-0008-03 Multiclick to J.P.C.) and from the Université Grenoble Alpes (AGIR NanOxyd to V.A.). Tim Grotjohann and Stefan Jakobs from the Max Plank Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen are warmly acknowledged for the acquisition and data processing of the RESOLFT images as well as for insightful discussions. We are indebted to Aline Le Roy and Christine Ebel from the ISBG PAOL platform for performing analytical ultracentrifugation experiments and processing the data, respectively, and to Daphna Fenel for collecting electron micrographs. The electron microscopy facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Médicale (FRM), the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), the CNRS, the CEA, the University of Grenoble, EMBL, and the GIS-Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie (IBISA). We sincerely thank Martin Byrdin and Duan Chenxi for their help in measuring photoswitching cycles in solution for the proteins studied in this work. We thank Martin Weik for proof-reading the manuscript and continuous support. We are grateful to the ESRF for beam-time under long-term projects MX1464, MX1583 and MX1676 (IBS BAG). Financial support by CEA, CNRS and Univ. Grenoble Alpes. M.E.K. is supported by a Ph.D. fellowship from the Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology (GRAL) and the French Atomic Energy Commission (CEA).

Author Contributions

M.E.K., J.P.C. and V.A. designed research. M.E.K., A.D.M. and V.A. prepared samples; M.E.K. and V.A. performed biochemical and photophysical experiments and processed the data; M.E.K. and V.A. performed imaging experiments; M.E.K., J.P.C. and V.A. processed crystallographic data; M.E.K. and V.A. refined the structures; M.E.K., D.B., J.P.C. and V.A. analysed the data; D.B. and J.P.C. wrote the manuscript with inputs from all authors.

Additional Information

Accession Codes: Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank under the following accession codes: 5DTX (rsEGFP2 – *on*-state), 5DTY (rsEGFP2 – *off*-state), 5DTZ (rsFolder – *on*-state), 5DU0 (rsFolder – *off*-state).

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: El Khatib, M. *et al.* Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm. *Sci. Rep.* **6**, 18459; doi: 10.1038/srep18459 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm.

Supplementary material

Mariam El Khatib^{1,2,3}, Alexandre Martins^{1,2,3}, Dominique Bourgeois^{1,2,3}, Jacques-Philippe Colletier^{*1,2,3} and Virgile Adam^{*1,2,3}

¹Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, ²CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, ³CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

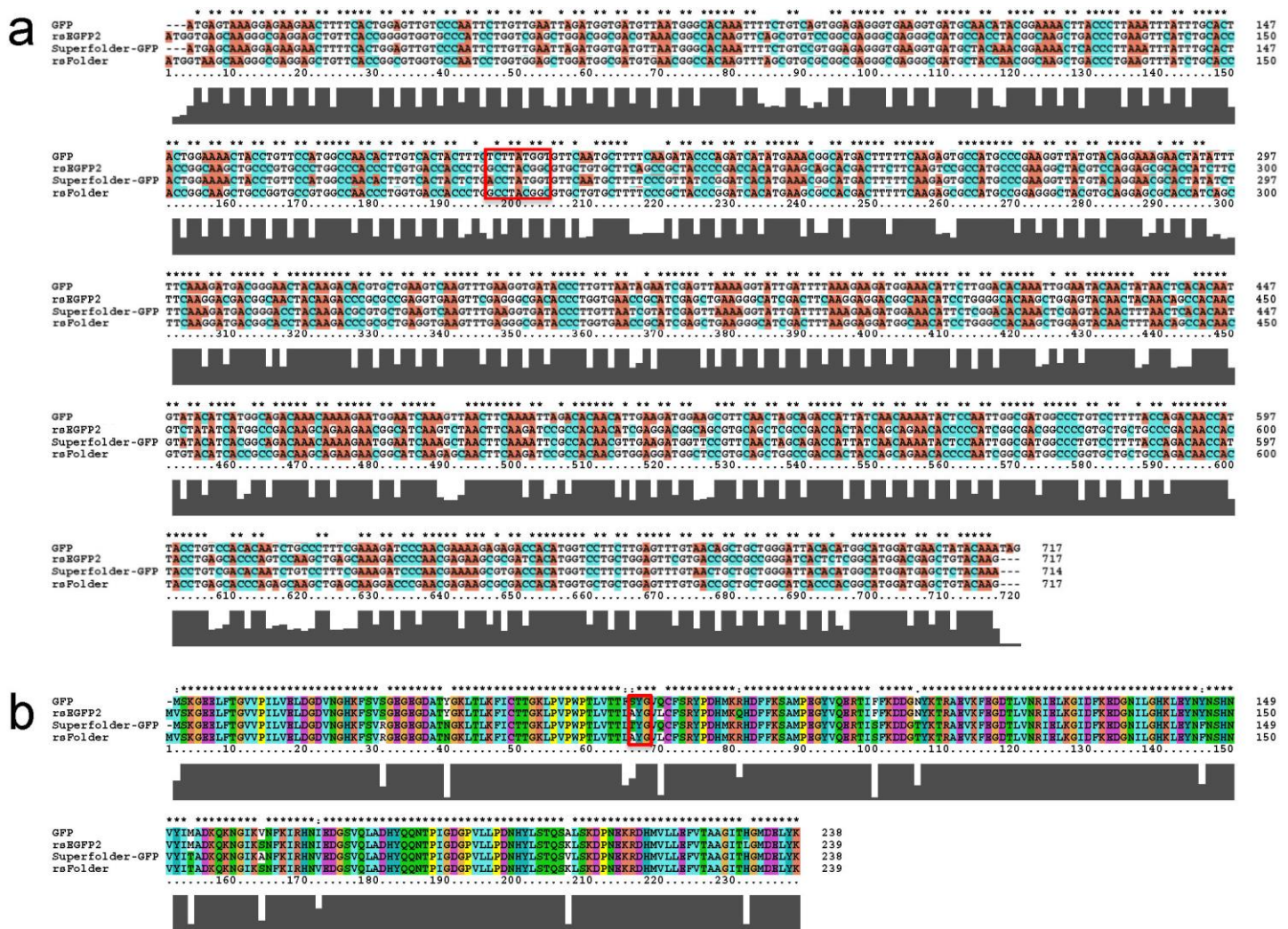


Figure S1. Sequence alignments. Nucleic acid (a) and amino-acid (b) alignments are shown for rsEGFP2, Superfolder-GFP and rsFolder, relatively to GFP. Sequences corresponding to the chromophores are red-squared. Colour-coded by default by the ClustalX alignment software.

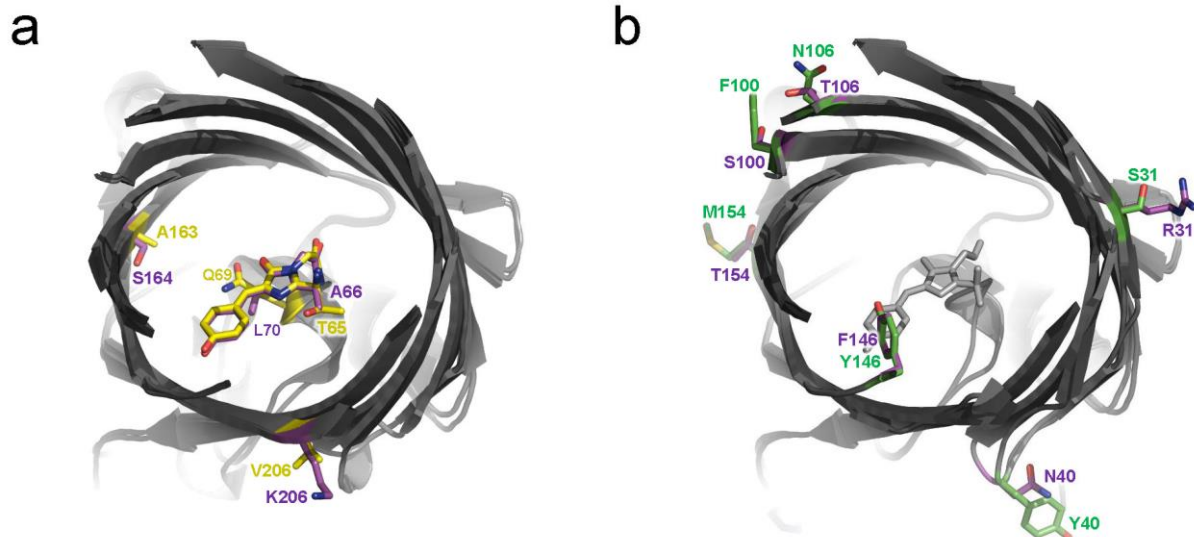


Figure S2. Representation of mutations of rsFolder as compared to rsEGFP2 and Superfolder-GFP. rsFolder was engineered from the architecture of Superfolder-GFP. (a) Four key residues in Superfolder-GFP (yellow) were mutated (purple). (b) The resulting rsFolder contains six aminoacid substitutions as compared to rsEGFP2 (green).

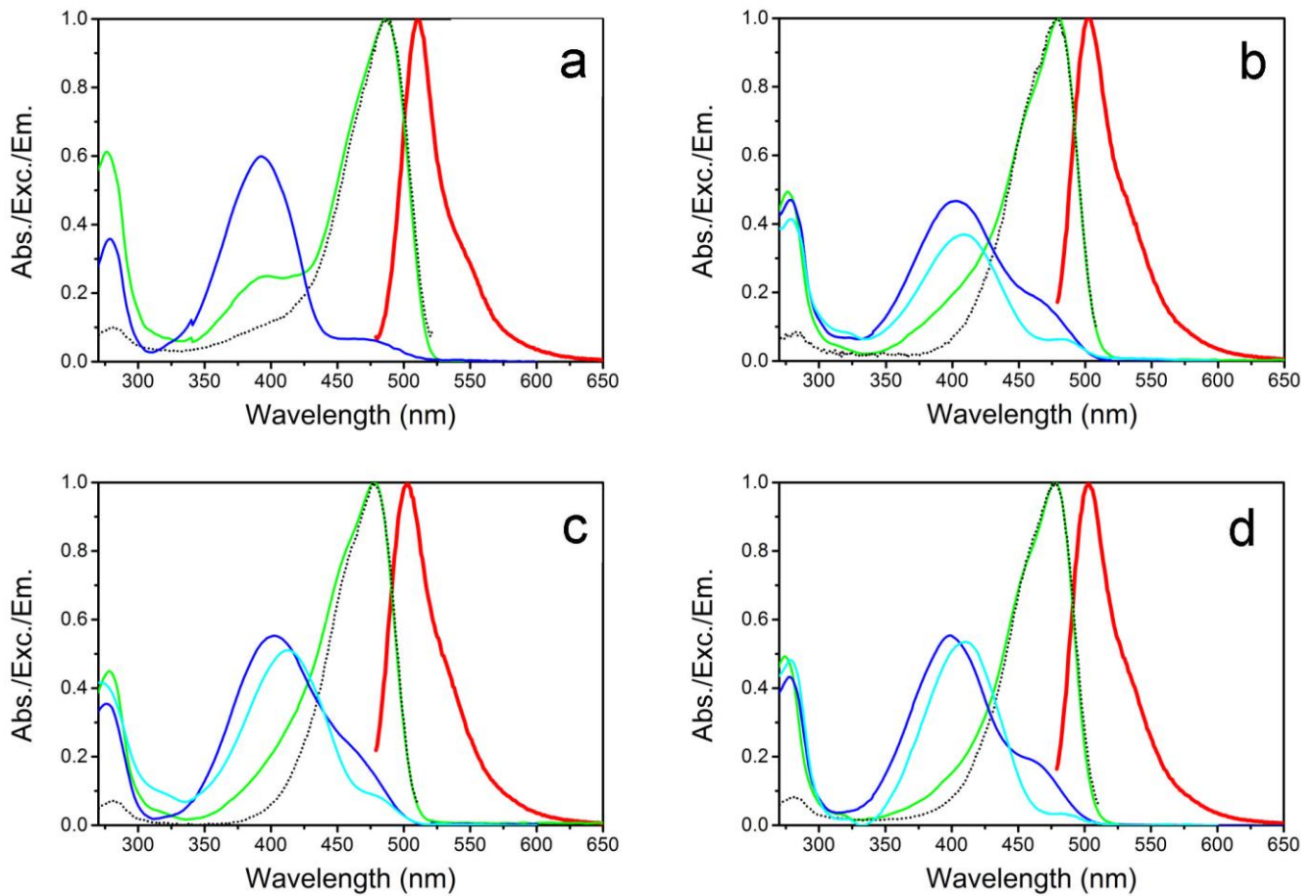


Figure S3. Spectroscopic characterization. Superfolder-GFP (a), rsEGFP2 (b), rsFolder (c) and rsFolder2 (d). Absorption spectra at pH 7.5 are shown for the *on* state (green) and photoswitched *off* state (cyan). Excitation spectra of the *on* state are shown as dotted black lines and corresponding emission spectra as plain red lines. Absorption spectra of the neutral state for Superfolder-GFP (pH 3.4) rsEGFP2 (pH 5.0), rsFolder (pH 4.5) and rsFolder2 (pH 4.0) are shown in blue.

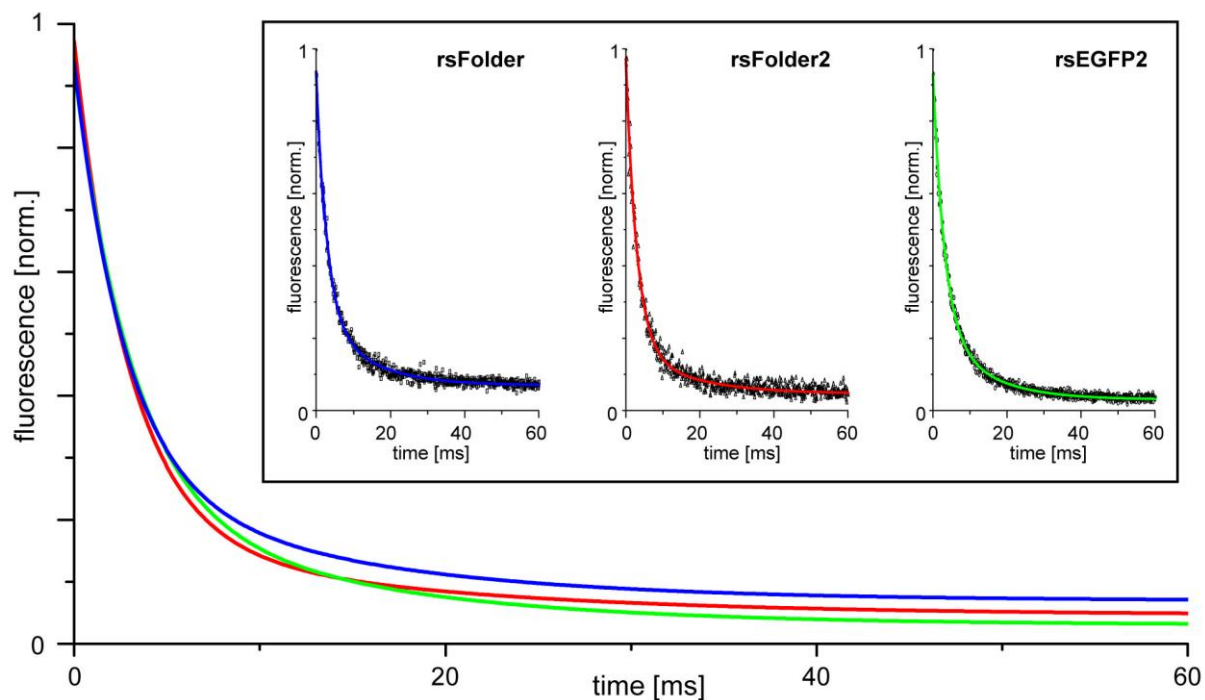


Figure S4. Off-switching kinetics of rsFolder, rsFolder2 and rsEGFP2 recorded on living *E. coli* samples. Comparison of fitted exponential decay curves representing the *off*-switching kinetics of rsFolder (blue), rsFolder2 (red) and rsEGFP2 (green). The inset shows raw data for each protein and the corresponding fitted curves. *Off*-switching was performed using a 488-nm laser light on *E. coli* colonies grown on agar plates. The light was focused with a 20X objective lens (NA = 0.4) to an intensity of ~ 0.5 kW/cm² and fluorescence light was recorded by a PMT (photomultiplier tube).

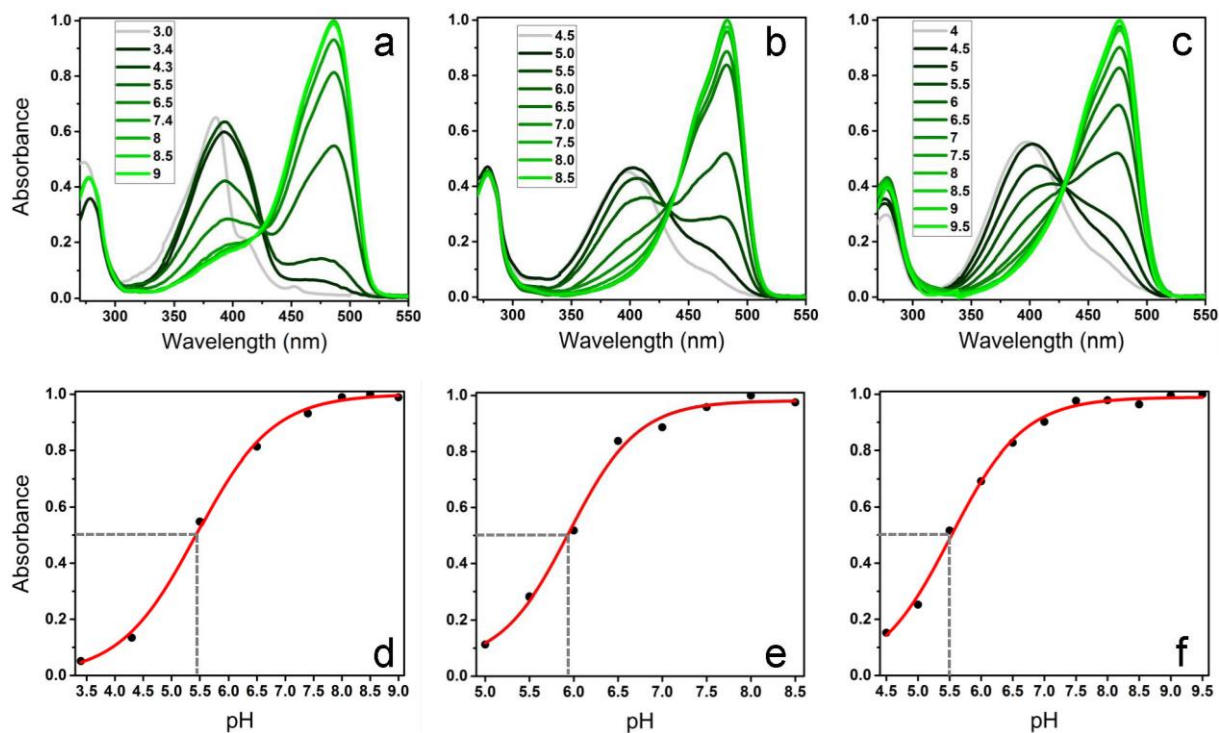


Figure S5. pH dependency of Superfolder-GFP (a,d), rsEGFP2 (b,e) and rsFolder (c,f) absorbance. (a-c) absorbance spectra colour-coded from black to green as a function of increasing pH. The gray spectrum represents the pH value at which denaturation starts to be spectroscopically detected. (d-f) Data points (black dots) corresponding to the absorbance of the anionic peak, fitted by a Henderson-Hasselbalch equation. Gray dotted lines represent the apparent pKa.

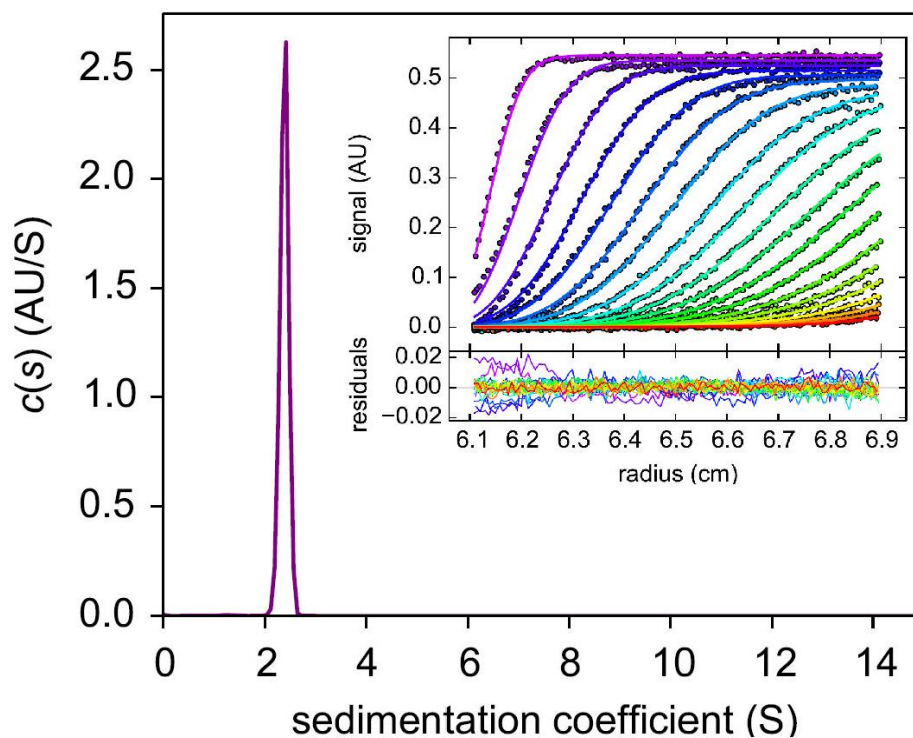


Figure S6. Sedimentation velocity of rsFolder and rsEGFP2. Analytical ultracentrifugation data show that both rsEGFP2 and rsFolder are monomeric. Sedimentation velocity experiments were performed on rsFolder at 0.8, 3.3, 19 and 41 mg mL⁻¹, to probe its association state in solution. rsEGFP2 was investigated at 2 and 22 mg mL⁻¹ for comparison. The two proteins sediment with a contribution at ≈ 2.5 S as demonstrated by $c(s)$ analysis. (Inset) Superposition of experimental (colour-scattered as a function of centrifugation times from purple to dark red) and fitted sedimentation velocity profiles measured at 395 nm for rsFolder at 19.4 mg mL⁻¹ (top), and residuals (bottom).

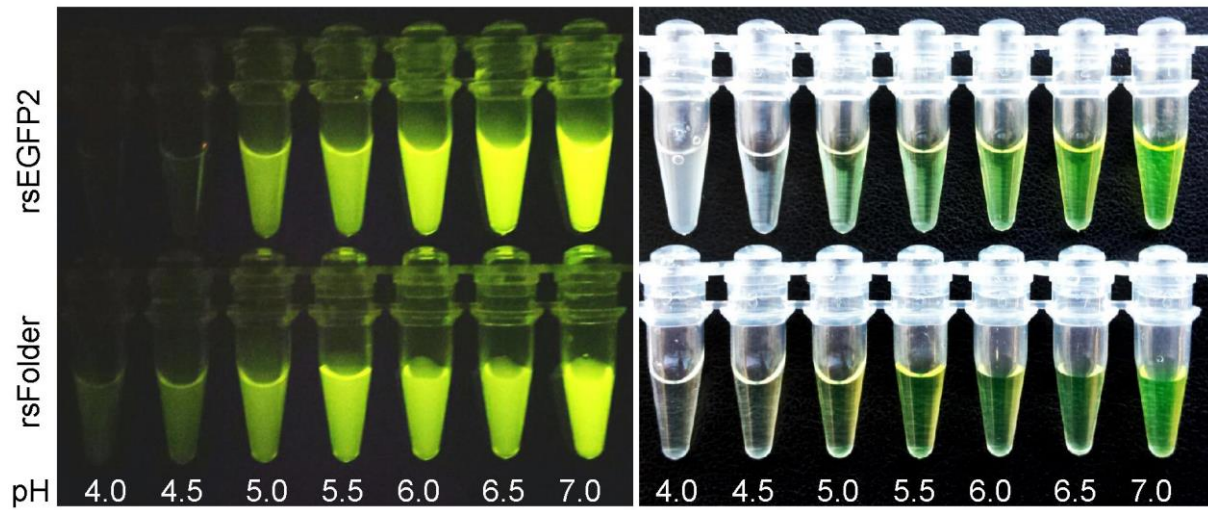


Figure S7. pH-dependency of the fluorescence of rsEGFP2 and rsFolder. For pH values superior to 5.0, rsEGFP2 and rsFolder show a similar fluorescence gradient with varying pH. At pH lower than 5.0, however, rsEGFP2 starts to precipitate as assessed by the cloudy aspect of the protein solution observed under white light (right panel). This precipitation results in no fluorescence at low pH when rsFolder is still properly folded and fluorescent.

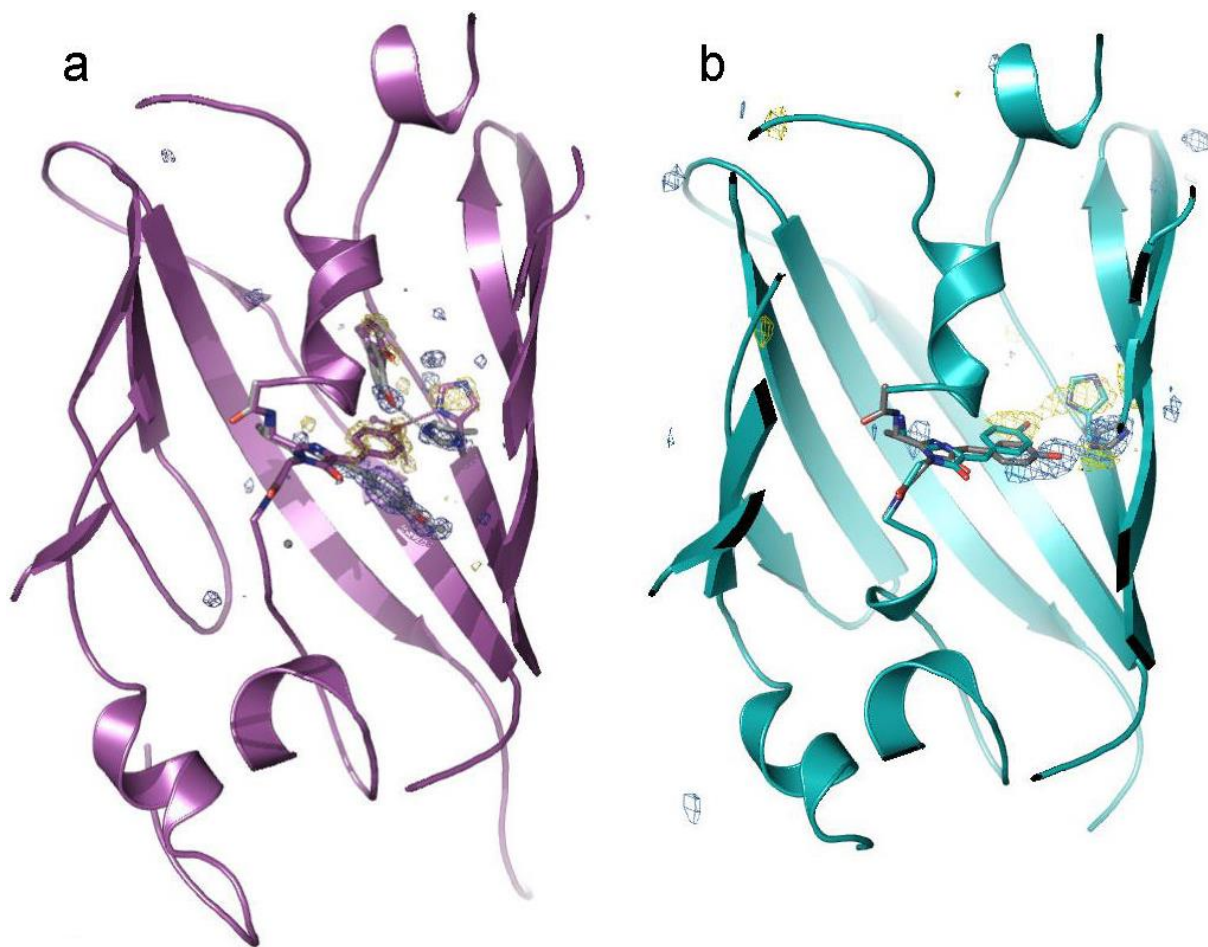


Figure S8. Overall view of structural changes upon *cis/trans* isomerization. Both in rsEGFP2 (a) and rsFolder (b) all the structural modifications are limited to the chromophore and its direct environment as depicted by electron density difference maps ($\pm 5 \sigma$) extended to the whole β -barrel.

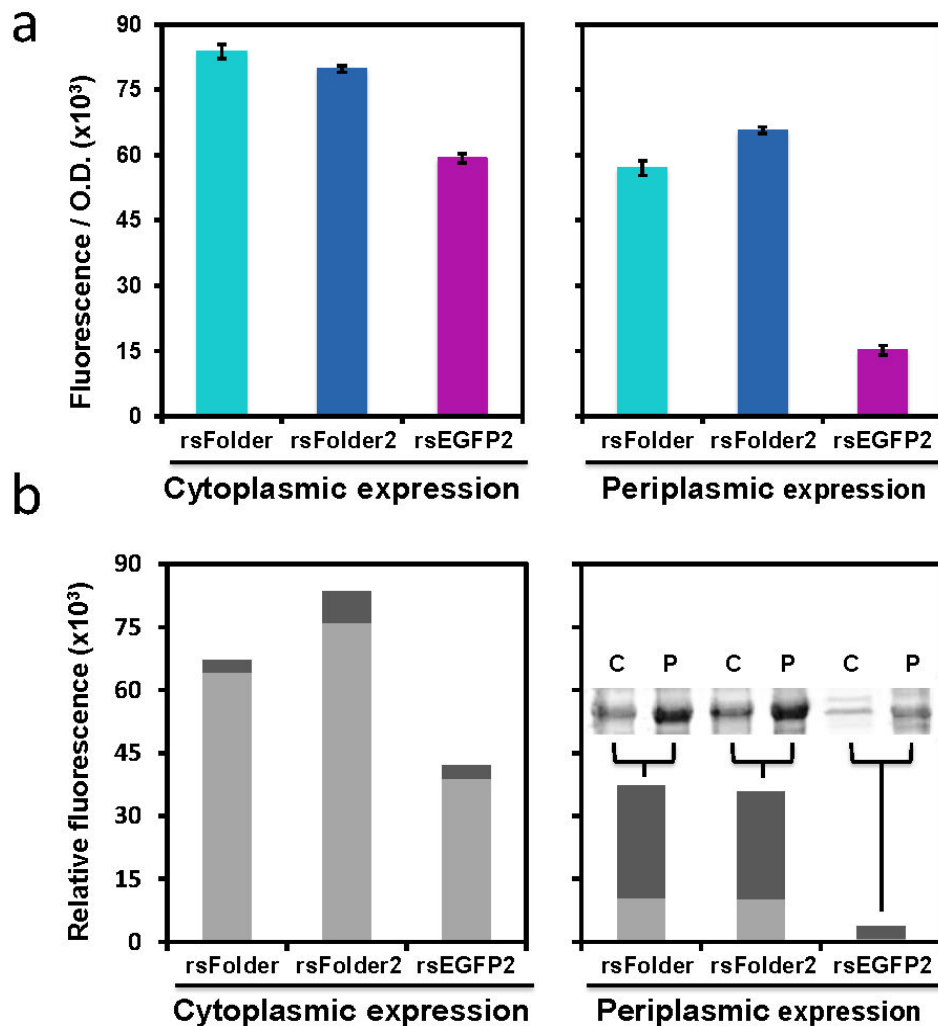


Figure S9. Quantification of cytoplasmic and periplasmic expression of rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2. (a) Bacterial cell brightness expressed as the ratio between the fluorescence signal at 510 nm and the optical density at 600 nm at the beginning of the stationary phase of the bacterial growth that was monitored as a function of time on *E. coli* cells grown at 37°C in liquid media and expressing rsEGFP2, rsFolder or rsFolder2. (b) Cytoplasmic and periplasmic contents of *E. coli* cells expressing rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2 were isolated. In spite of different intensities, fluorescence measurements demonstrate similar signal ratios between cytoplasmic (light gray) and periplasmic (dark gray) for all three FPs either targeted to the cytoplasm (pET15-b vector) or to the periplasm (pET26-b(+)) vector). As expected, the fluorescence signal originates mostly from periplasmic fractions when pET26-b(+) is used. Unlike the rsFolders, rsEGFP2 is almost non-fluorescent when secreted to this compartment although it is efficiently translocated as assessed by SDS-PAGE. In the case of periplasmic secretion, the fluorescence detected in cytoplasmic fractions could originate from fast folding in the cytoplasm of a fraction of the rsFolder and rsFolder2 proteins, which would prevent their secretion. However, the detection of residual periplasmic fluorescence when the RSFPs are targeted to the cytosol points at some cross contaminations between the cytoplasmic and periplasmic contents during cell fractionation.

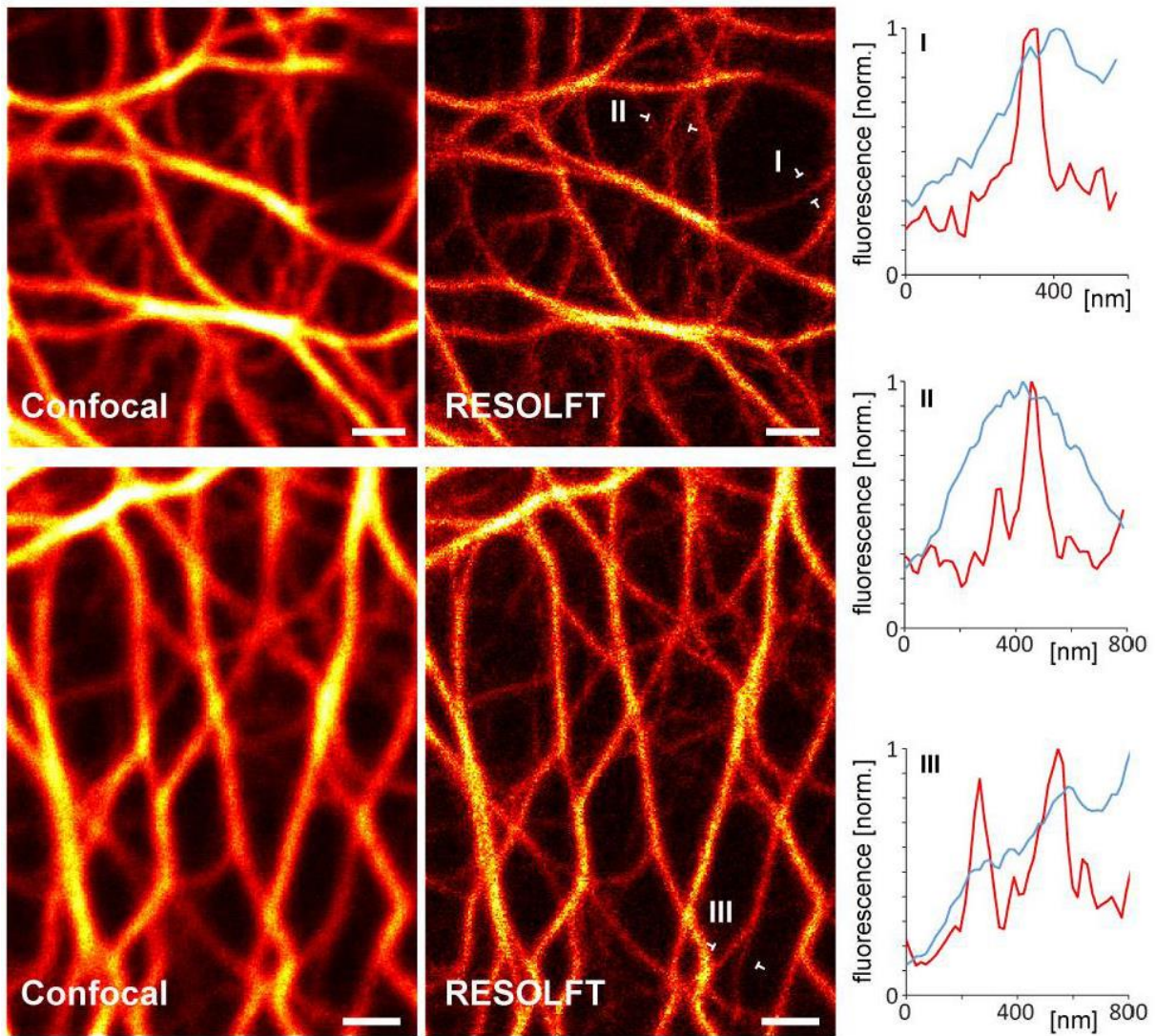


Figure S10. RESOLFT microscopy of living HeLa cells expressing a keratin18-rsFolder2 fusion protein. Two RESOLFT images of keratin18 structures in HeLa cells labeled by rsFolder2, and their corresponding confocal images are shown. Graphs I – III illustrate line profiles across single keratin18 filaments at the locations indicated by arrows. Each of these profiles are a sum of 5 adjacent line profiles distant by 30 nm. RESOLFT images show filaments with diameters < 80 nm. Scale bar 1 μ m.

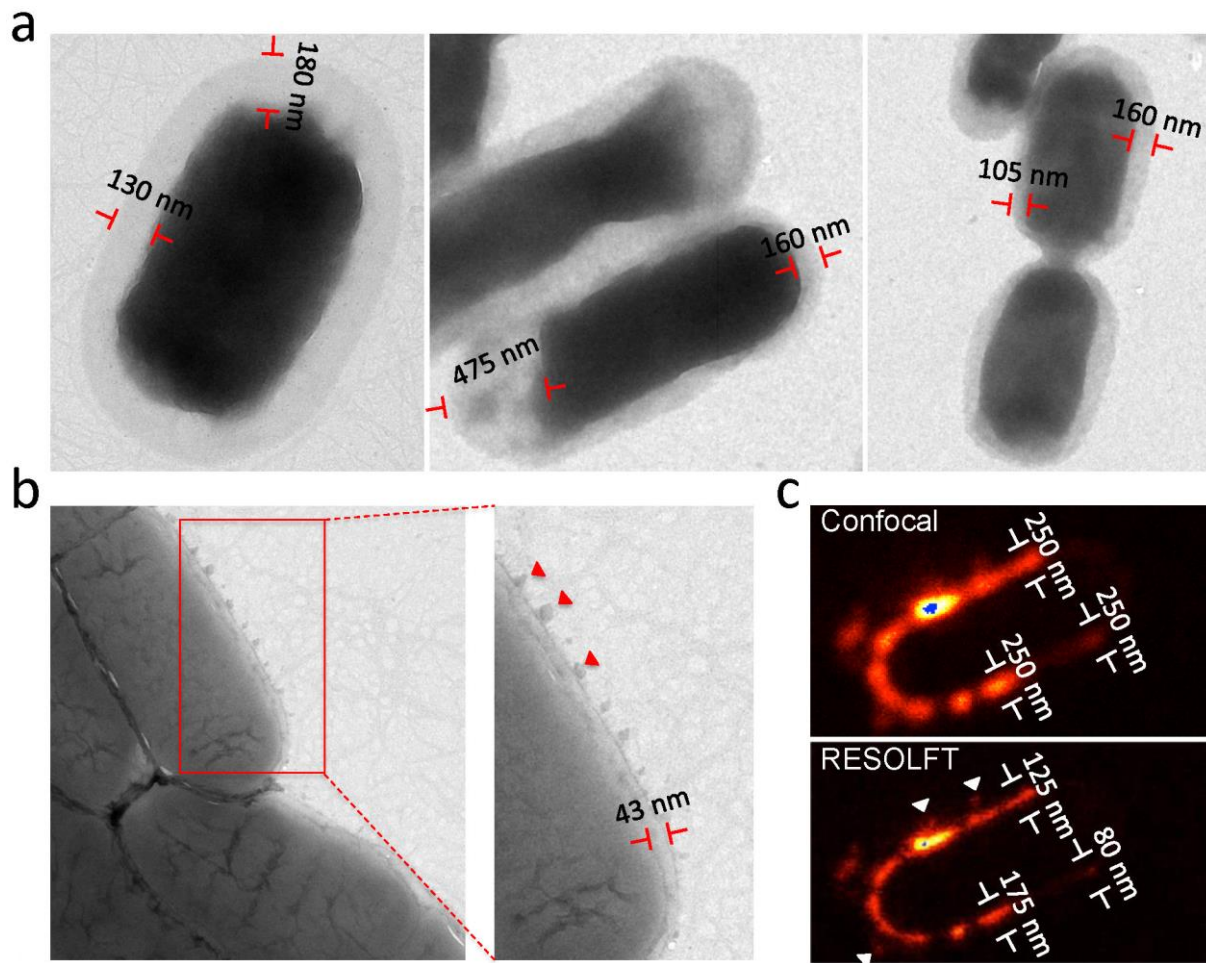


Figure S11. Transmission electron micrographs of *E.coli* compared to confocal and RESOLFT microscopy. (a-b) Bacteria were grown in the interstice between an electron microscopy grid and LB-agar medium for 4h at 37°C. (a) The grid was imaged without negative staining and showing variable periplasmic width (100 nm – 475 nm) of isolated cells. (b) The grid was imaged with negative staining and showing outer membrane budding event (red arrows) and a smaller periplasmic space between colony cells. (c) Diffraction limited confocal imaging and the corresponding RESOLFT imaging of bacteria expressing rsFolder2 in the periplasm showing similarly an uneven periplasmic width and some budding outer membrane vesicles (white arrows).

Table S1. Results obtained in analytical ultracentrifugation

	C (mg/ml)	S_{20W} (S)	M (kDa)
rsFolder	40.8	2.27	
	19.4	2.57	
	3.3	2.67	26.8
	0.8	2.68	26.8
	0.0	2.69	
rsEGFP2	21.8	2.55	
	1.7	2.77	
	0.0	2.80	

Table S2. Imaging parameters applied for RESOLFT microscopy

RESOLFT figure	On-switching beam (405 nm)		Pause	Depletion beam (488 nm)		Pause	Readout beam (488 nm)	
	Power (μ W)	Illumin. time (μ s)	μ s	Power (μ W)	Illumin. time (μ s)	μ s	Power (μ W)	Illumin. time (μ s)
Fig. 4b left & S11c	2.5	30	60	14	650	20	5	10
Fig. 4b mid. & right	2.5	30	60	14	640	20	5	10
Fig. S10 top	2.2	30	10	14	670	0	5	30
Fig. S10 bottom	2.5	30	60	14	650	20	7	30

All light powers were measured at the back focal plane of the objective lens

3.3. Conclusions

Les rsFolders sont les deux premières RSFPs dotées de capacités de repliement dans les milieux oxydants. Nous avons montré que ces deux RSFPs sont capables de se replier et de photocommuter dans le périplasma bactérien, et que rsFolder2 peut être utilisée pour l'imagerie RESOLFT. Bien que rsFolder ne soit pas adaptée pour l'imagerie RESOLFT, elle peut se révéler utile pour d'autres approches de SR, telles que le pcSOFI (photochromic stochastic optical fluctuation imaging) ou des méthodes potentielles pouvant profiter de son extrême stabilité à l'état OFF. Il reste à déterminer si les rsFolders peuvent être utilisées dans d'autres compartiments cellulaires oxydatifs tels que le réticulum endoplasmique, les membranes des thylacoïdes, l'espace inter-membranaire mitochondrial et le peroxysome. Nous prévoyons également que rsFolder2 puisse être utilisée pour d'autres techniques de microscopie de SR par illumination structurée (Chapitre III.4.3.3.1) comme le SSIM ou le pcSOFI. Ces techniques permettent d'atteindre une résolution d'environ 40 – 50 nm. Bien que cela présente une amélioration nette de la résolution par rapport à l'imagerie conventionnelle, elle reste insuffisante pour l'imagerie de nos porines dans les biofilms. D'autres techniques de SR notamment la microscopie par localisation de molécules uniques (Chapitre III.4.3.3.2) comme le PALM ou le STORM, permettent l'obtention d'une résolution optimale de 10 nm idéale pour notre objectif.

Malheureusement, les rsFolders ne sont pas adaptées à l'imagerie par PALM. Ceci est dû à leur vitesse de commutation trop élevée. De ce fait, d'autres mutations rationnelles doivent être réalisées pour adapter les propriétés photophysiques (lente commutation, meilleur rendement quantique ...) des rsFolders à cette méthodologie – ou à d'autres – de SR. Finalement, des variants rsFolders rouges pourraient être développés pour l'imagerie multi-couleurs.

VI. Conclusions et perspectives

Les biofilms, communautés multicellulaires bactériennes, sont omniprésents. Malgré leur importance pour l'écosystème, ils présentent une menace aussi bien en industrie que pour la santé humaine. La virulence des biofilms procède surtout de leur résistance élevée aux antibiotiques rendant leur éradication quasiment impossible. Ainsi, les biofilms sont impliqués dans la plupart des infections bactériennes chroniques causant chaque année plus de 4000 décès en France. *P. stuartii* est une bactérie connue pour sa capacité à former des biofilms dans le tractus urinaire humain. Elle est responsable de 10% des INU chroniques et elle est décrite comme étant la plus résistante de son genre. Malgré ces faits, les études menées sur cette bactérie sont rares, freinant la compréhension du mécanisme de développement et de résistance de ses biofilms et compliquant ainsi l'avancement de nouvelles thérapies pour lutter ou prévenir ou éradiquer ces infections. *P. stuartii* exprime au niveau de sa membrane externe deux porines : Omp-Pst1 et Omp-Pst2 qui constituent 70% du contenu protéique membranaire. Ces porines sont le conduit principal permettant à la bactérie de communiquer et d'échanger avec son milieu environnant. Ainsi, les porines sont vitales pour la bactérie. Trois publications¹¹⁰⁻¹¹², qui se focalisent sur ces deux porines sont accessibles ; aucune n'a exploré l'influence de ces porines sur la formation des biofilms bactériens.

Les travaux effectués au cours de ma thèse et décrits dans ce manuscrit visent à réduire le manque de connaissance sur les biofilms de *P. stuartii* et à dévoiler le rôle des porines dans l'établissement et la résistance de ces biofilms. Pour cela, nous avons segmenté notre travail en trois parties ayant pour objectifs (1) de comprendre la formation des biofilms de *P. stuartii* et leur réponse aux stress du milieu environnant ; (2) de décrire l'effet de la suppression ou la surexpression des porines ; (3) d'étudier à l'échelle moléculaire et atomique le comportement des porines isolées et (4) de développer des outils pour étudier les porines à l'échelle moléculaire au sein d'un biofilm de *P. stuartii*.

1. Le biofilm de *P. stuartii*, une communauté soudées

Le prélude indispensable à nos études était la caractérisation de la croissance et des biofilms de *P. stuartii*. Nous avons donc, soumis *P. stuartii* à divers conditions mimant ou exagérant celles rencontrées dans son habitat le plus commun chez l'être humain, le tractus urinaire, et avons évalué sa capacité à croître et à former des biofilms. Comme contrôle, nous avons utilisé les bactéries BL21, une souche d'*E. coli* incapable de former des biofilms¹⁴¹. Sans surprise, nous avons observé que *P. stuartii* peut former des biofilms matures et adhérents en moins de 24h. Dans la littérature, l'adhésion des bactéries aux surfaces est décrite comme une étape préliminaire et décisive à l'établissement des biofilms, mais nos observations vont à l'encontre de ce postulat. Nous avons en effet observé l'assemblage de bactéries planctoniques en communautés bactériennes flottantes, bien avant l'adhésion des bactéries à la surface. Cette structuration souligne la sociabilité élevée de *P. stuartii* et suggère la communication bactérienne comme étape préliminaire à l'adhésion cellulaire aux surfaces.

Nous avons soumis *P. stuartii* et ses biofilms à plusieurs conditions de stress pour évaluer leur résistance face aux facteurs environnementaux rencontrés au cours de son cycle de vie. En se basant sur la composition du milieu naturel de *P. stuartii*, le tractus urinaire, riche en urée et en cations (notamment le calcium et le magnésium), nous avons assujéti les bactéries à des concentrations physiologiques et pathologiques d'urée, de calcium et de magnésium. De plus, puisque le pH de l'urine varie pendant la journée ainsi qu'au cours des infections urinaires (bactériennes ou non), nous avons testé la croissance et la formation des biofilms de *P. stuartii* sur une large gamme de pH. Cette bactérie a montré une résistance élevée qui a dépassé nos attentes. *P. stuartii* croit et forme des biofilms même à des pH basiques et à des concentrations élevés d'urée (500 mM) et de calcium (50 mM) ou de magnésium (50 mM). Les biofilms de *P. stuartii* sont d'autant plus résistants et répondent aux changements de conditions du milieu en se consolidant, se protégeant ainsi des stress imposés. Ce résultat confirme la résistance des biofilms aux facteurs environnementaux mais suggère également le biofilm comme une réponse des bactéries pour se protéger des conditions environnantes stressantes.

2. Les porines : un rôle vital et social pour la bactérie

Afin de faire la lumière sur le potentiel rôle d'Omp-Pst2 dans la formation de biofilms et dans leur résistance, nous avons soumis au même stress environnementaux une souche de *P. stuartii* délétée pour cette porine, *i.e.* $\Delta P2$. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir de mutant dépourvu de la porines Omp-Pst1. Cela suggère que cette dernière est une protéine essentielle pour la survie de *P. stuartii*. Nous avons aussi voulu vérifier si l'expression ectopique des porines de *P. stuartii* dans une souche d'*E. coli* délétée de ses porines principales, BL21 Δ Omp8, induisait des changements phénotypiques.

Bien que la délétion d'Omp-Pst2 n'induisse pas la mort des bactéries *P. stuartii*, elle résulte en un délai de croissance marqué par une prolongation de la phase de latence. Au delà de cette phase d'adaptation, les bactéries $\Delta P2$ présentent une capacité de croissance similaire à celle des bactéries sauvages (phase exponentielles et stationnaires similaires). Au bout de 24h de croissance, et contre nos attentes, les $\Delta P2$ forment davantage de biofilms par rapport à *P. stuartii*. Ce résultat, bien que surprenant, peut être expliqué comme étant une réponse physiologique et un moyen de protection de la bactérie contre le stress induit par la délétion d'Omp-Pst2. Nous avons également exploré l'effet de cette délétion sur la résistance des bactéries aux changements des conditions environnementales. Nos résultats ont montré que les bactéries $\Delta P2$ sont plus sensibles à ces changements, et notamment aux variations de pH et aux fortes concentrations d'urée. Tout comme *P. stuartii*, une fois les biofilms formés, ceux ci présentent une faible sensibilité aux changements de conditions environnementales. Pris ensemble, ces résultats soulignent l'importance d'Omp-Pst2 durant les phases précoces de croissance et son implication dans la résistance de la bactérie aux stress environnants pendant celles-ci. De plus, ils confirment la réponse adaptative rapide des *P. stuartii* et la résistance remarquable de ses biofilms à tout changement de ses conditions de vie. En revanche, *P. stuartii* n'a pas su survivre ni s'adapter face à la délétion d'Omp-Pst1 suggérant non seulement l'essentialité de cette protéine pour la bactérie mais aussi une implication probable d'Omp-Pst1 dans la réponse adaptative de *P. stuartii*. Il serait donc intéressant suite à ces résultats d'explorer l'effet des changements de

conditions de vie de *P. stuartii* ou de $\Delta P2$ sur l'expression d'Omp-Pst1. Une étude de la transcription d'Omp-Pst1 par RT-PCR (reverse transcription PCR) pourrait permettre de quantifier cette expression et de dévoiler ou non une implication d'Omp-Pst1 dans ce phénomène d'adaptation des bactéries et de résistance des biofilms.

La souche BL21 Δ Omp8 présente des retards de croissance et une mortalité cellulaire précoce. L'expression ectopique d'Omp-Pst1 et d'Omp-Pst2 par ces bactéries améliore leur croissance en réduisant la phase de latence et en restaurant leur viabilité cellulaire. Ces résultats confirment l'importance des porines pour la viabilité cellulaire et la croissance bactérienne notamment durant les premières phases de leur cycle de vie. Cependant, notre résultat le plus inattendu concerne l'implication des porines dans la formation des communautés bactériennes flottantes. Bien que cette expression ne soit pas suffisante pour une adhésion des bactéries à la surface, elle induit l'assemblage des bactéries en radeaux cellulaires, un phénotype comparable à celui observé chez *P. stuartii* préalablement à l'adhésion des bactéries à la surface et la formation de biofilms adhérents. Au vu du contact étroit entre les bactéries et considérant que les membranes externes des bactéries Gram-négatifs peuvent contenir jusqu'à 100 000 porines par cellule, notre observation suggère un rôle inédit des porines dans l'établissement de la sociabilité bactérienne, une étape que nous proposons préliminaire à l'adhésion des bactéries aux surfaces. En d'autres termes, les porines joueraient un rôle dans l'induction de la sociabilité bactérienne durant les phases précoces de croissance, c'est à dire avant l'adhésion des bactéries à des surfaces facilitant ainsi l'établissement du biofilm adhérent.

3. Les DOTs : une structure pour une mission

Pour soutenir notre hypothèse, il était indispensable d'obtenir des informations structurales sur nos porines et de caractériser leur capacité à associer des membranes lipidiques *in vitro*.

L'étude cristallographique d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 a été réalisée durant les travaux de thèse de mon collègue Dr. Chady Nasrallah, également conduite sous la direction de Dr. Jacques-Philippe Colletier. La résolution structurale de ces deux porines s'est révélée très pertinente à l'époque, d'autant plus qu'elle a pris des significations physiologiques suite aux résultats cellulaires détaillés ci-dessus. La structure d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 a dévoilé l'organisation des trimères de porines en un dimère associé face à face (DOT) par leurs boucles extracellulaires. Nos micrographies montrent un contact membranaire étroit entre cellules adjacentes. En projetant le résultat cristallographique dans un contexte cellulaire, cette dimérisation pourrait contribuer au contact inter-cellulaire, participer à la communication cellulaire et favoriser la formation de biofilms.

La vérification de cette hypothèse s'est avérée plus compliquée que ce que nous imaginons. Ce que nous proposons est un rôle potentiel inédit des porines dans l'établissement de la communication cellulaire ; elles seraient donc l'équivalent procaryote des jonctions gap des cellules eucaryotes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi une approche multi-disciplinaire allant de l'échelle moléculaire jusqu'à l'étude cellulaire, en passant par une caractérisation biochimique et biophysique. En se basant sur la structure des DOTs, nous avons calculé la surface d'interaction entre les trimères. Cette surface étant supérieure à la valeur seuil admise pour différencier les interfaces cristallines des interfaces biologiques, nous avons approfondi notre étude. Dans les DOTs, les deux trimères associés face à face interagissent via des « steric-zipper », contribués par les résidus 205-AGVVTSR-210 et 283-LGNY-286 d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 respectivement. La cristallisation de ces segments isolés nous a permis de confirmer leur potentiel à former des interactions « steric-zipper ». Cependant, les premières mutations ponctuelles que nous avons effectuées avec pour but de rompre ces interactions

(Omp-Pst1-N293G, Omp-Pst1- Δ 207-216/N293G et Omp-Pst2-N283G) n'ont pas suffi à rompre la dimérisation soulignant que la force motrice menant à la formation des DOTs n'est pas le stéric zipper. D'autres interactions doivent donc permettre de maintenir la structure des DOTs. Le plus probable est que la « self-attraction » des porines pour elles mêmes (et donc la formation des DOTs) soit médiée par des forces électrostatiques (Dock). Le stéric zipper ne servirait alors qu'à verrouiller l'interaction (Lock).

Nous avons donc procédé à une deuxième série de mutations (Omp-Pst1.3, Omp-Pst1.4, Omp-Pst2.2 et Omp-Pst2.3) visant à remplacer un acide aminé non chargé du « steric-zipper » par un autre chargé positivement (l'arginine) dans le but de créer une répulsion entre les trimères. Nous avons d'abord évalué la capacité de ces mutants à former des DOTs en suivant l'agrégation de liposomes après reconstitution des porines dans leur membrane (Figure VI.1). Nous avons pu mettre en évidence l'incapacité des mutants Omp-Pst1-D213R/N293R et Omp-Pst2-G282R/N283K à promouvoir l'agrégation des liposomes, suggérant une incapacité à former des DOTs. L'expression ectopique de ces mutants dans les bactéries BL21 Δ Omp8 ne s'accompagne pas de la formation de communautés multicellulaires flottantes, contrairement aux porines sauvages et aux mutants retenant la capacité à agréger des liposomes. Ces observations supportent notre hypothèse du rôle des DOTs de porines dans l'interaction inter-cellulaire et suggèrent ces structures comme un moyen de communication entre les bactéries adjacentes. La confirmation de ce dernier rôle est loin d'être aisée et nécessite une exploration cellulaire et physiologique des DOTs à l'échelle de la molécule unique.

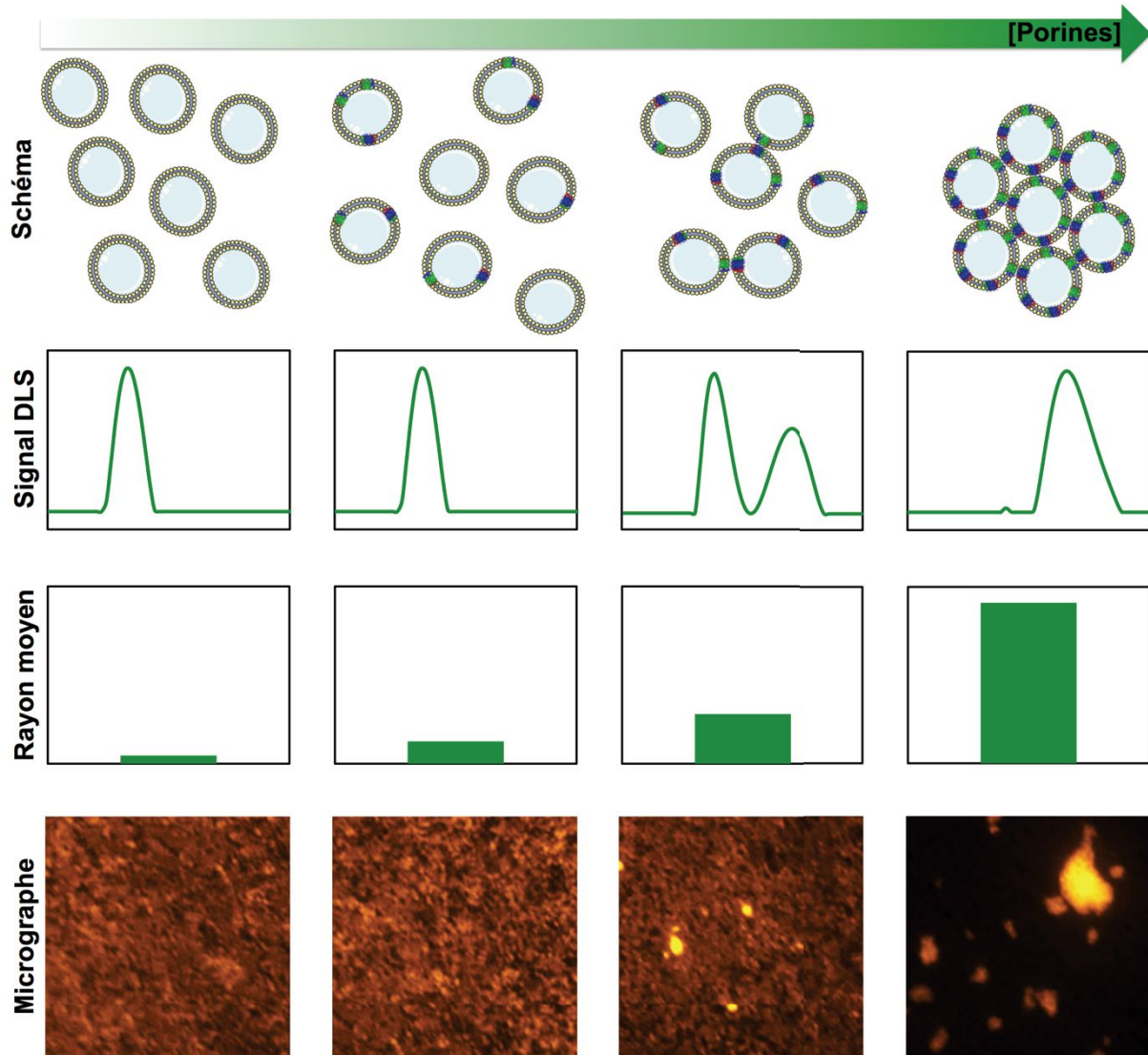


Figure VI.1. La formation d'agrégats de protéoliposomes est induite par les DOTs de porines. Les LUV libres en solution donnent un signal DLS correspondant à leur rayon moyen d'environ ≈ 60 nm. Le micrographe de cette solution confirme l'homogénéité de cette solution. L'ajout de concentrations croissantes de porines et leur insertion au niveau des LUV induisent un changement du signal DLS. Il se manifeste par l'apparition d'un nouveau pic correspondant au début de l'assemblage des LUV sous l'effet de la formation des DOTs. Ceci entraîne une augmentation du rayon moyen des particules en solution et l'apparition de quelques agrégats visible en microscopie. L'assemblage de protéoliposomes se transforme en agrégats à une concentration de $1 \mu\text{M}$ de porines marqué par un signal DLS en un seul pic et un rayon moyen supérieur à 200 nm mais pouvant atteindre l'échelle du « mm » visible à l'œil nu. Le micrographe confirme la présence de ces gros agrégats. À noter que la limite de résolution de 250 nm des micrographes ne permet pas une mesure quantitative de la taille mais uniquement une description qualitative de la présence d'agrégats en solution. Échelle : $20\mu\text{m}$.

4. rsFolders : un outil potentiel pour l'imagerie des porines

Une étude *in vivo* hautement résolutive s'est imposée en continuité avec ce qui a été décrit. Le chemin vers ce but fut laborieux en raison des contraintes liées à l'ambition d'imager une protéine membranaire qui s'exprime dans un micro-organisme de petite taille, qui traverse le périplasma bactérien et contre laquelle il n'y a pas d'anticorps spécifique. Face à ces défis nous avons développé, en étroite collaboration avec le Dr. Virgile Adam, deux nouvelles RSFPs que nous avons baptisées rsFolder et rsFolder2. Ces protéines sont capables de rester fluorescentes et phototransformables au cours de leur passage dans le périplasma et donc adaptées à la microscopie de SR dans les milieux oxydants tel le périplasma.

Nos résultats ont montré l'utilité des rsFolders comme marqueur des porines mais aussi pour d'autres travaux de recherche dans les compartiments cellulaires oxydatifs comme le périplasma, le réticulum endoplasmique (Figure VI.2) ainsi que le péroxysome, l'espace inter-mitochondriale... jusqu'à aujourd'hui non exploités. Bien que les rsFolders soient adaptées à l'imagerie par RESOLFT permettant l'obtention d'une résolution optimale de 70 nm, elles ne sont pas adaptées à l'imagerie de particules uniques comme le PALM, qui permet d'atteindre la résolution de 10 nm requise pour l'imagerie des DOTs au sein des bactéries. Cette limitation est en partie due à la vitesse de commutation des rsFolders trop rapides par rapport à la vitesse de la caméra CCD. Des travaux d'optimisation de cette vitesse par mutagenèse rationnelle sont en cours pour étendre le spectre d'utilisation des rsFolders.

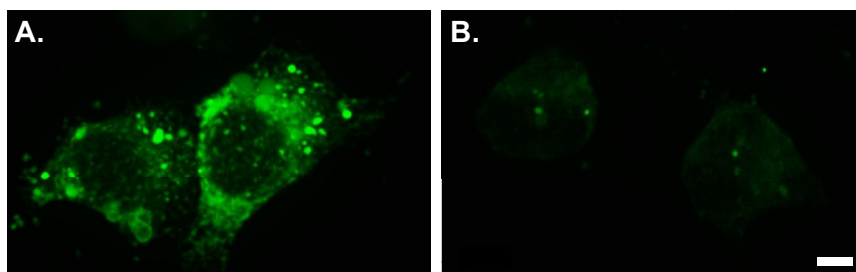


Figure VI.2. rsFolder2 est mieux adaptée pour l'imagerie du réticulum endoplasmique. Des cellules HEK293T ont été transfectées par un plasmide adressant rsFolder2 ou rsEGFP2 au réticulum endoplasmique par l'intermédiaire d'une séquence signal. Le réticulum endoplasmique de ces cellules a été imagé par microscopie confocale. Tous les micrographes ont été obtenus en utilisant les mêmes conditions de cultures, d'illumination et de traitement d'image. Échelle : 5 μ m.

Parallèlement à l'optimisation de nos RSFPs, nous nous sommes intéressés à une autre FP : mCherry. Comme Superfolder-GFP, cette dernière, a été utilisée pour imager le périplasme bactérien¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ mais ces FPs ne sont pas utilisables pour l'imagerie de SR. Une variante de mCherry, PAmCherry, a été introduite par Subach et ses collègues en 2009¹³⁰. Cette variante a montré son efficacité pour l'imagerie de SR notamment le PALM. Cependant, elle n'a à ce jour jamais été utilisée pour imager des protéines dans les milieux oxydatifs. Nous avons donc cloné le gène codant pour cette PAFP en aval de celui d'Omp-Pst1, avons exprimé la protéine chimère dans des BL21ΔOmp8 et avons procédé à une imagerie par nanoscopie PALM. Nos résultats préliminaires sont prometteurs (Figure VI.3). Nous avons réussi à étiqueter spécifiquement les porines et à les imager par PALM au sein d'une micro-colonie de bactéries vivantes. Une exploitation plus approfondie est cependant nécessaire pour conclure sur la formation des DOTs *in vivo*. En outre, le développement d'un variant lent de rsFolder et l'optimisation des conditions d'imagerie des colonies bactériennes pourraient permettre de réaliser des expériences PALM bicouleur sur les biofilms bactériens d'une part, et sur les protéoliposomes formés à partir des protéines chimères purifiées d'autre part.

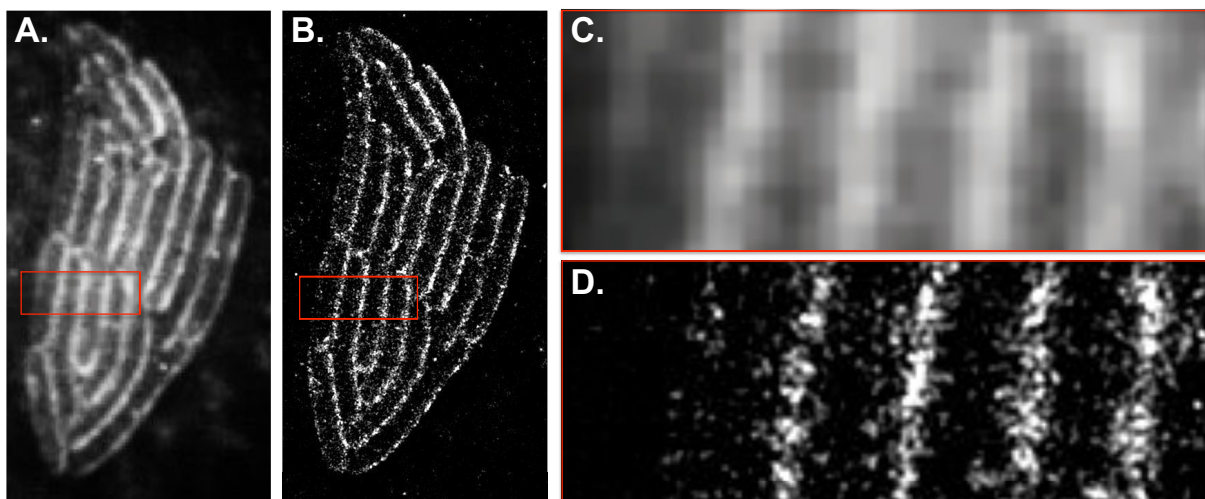


Figure VI.3. Imagerie PALM d'Omp-Pst1 exprimée au niveau de la membrane externe d'une micro-colonie bactérienne. PAmcherry a été utilisé comme étiquette pour marquer Omp-Pst1. Les bactéries BL21ΔOmp8 exprimant cette protéine chimère ont été mise en culture sur une nuit à 20°C entre lame et lamelle séparées d'une couche de LB-Gelzan[®]. L'acquisition des images est faite en alternant les lasers 405 et 564 nm pour activer et exciter PAmCherry respectivement. Le traitement des images par thunderstorm montre l'amélioration nette de la résolution et la distribution des porines au niveau de la membrane externe des bactéries.

Dans leur ensemble, mes travaux de thèse ont permis de confirmer plusieurs propositions concernant *P. stuartii*, sa résistance, ses biofilms et ses porines. Nos résultats confirment la haute capacité de cette bactérie à former des biofilms et la forte capacité de ces derniers à résister dans des conditions défavorables. Notre travail a également montré l'importance des porines de *P. stuartii*, celles-ci permettant de restaurer chez les BL21ΔOmp8, une croissance normale. Nos résultats les plus importants restent cependant, la mise en évidence d'un rôle inédit des porines dans l'établissement de communautés cellulaires flottantes grâce à la formation de DOTs. Ces derniers promeuvent non seulement le contact mais aussi la communication inter-cellulaire. Nos résultats suggèrent une étape supplémentaire au postulat de la formation de biofilm durant laquelle le rôle joué par les porines est déterminant (Figure VI.4). Cette étape serait précoce à l'adhésion cellulaire. Elle consiste en l'établissement d'une communication cellulaire par le biais d'un contact inter-bactérien direct facilité par l'expression et la dimérisation des porines au niveau des membranes externes des bactéries adjacentes.

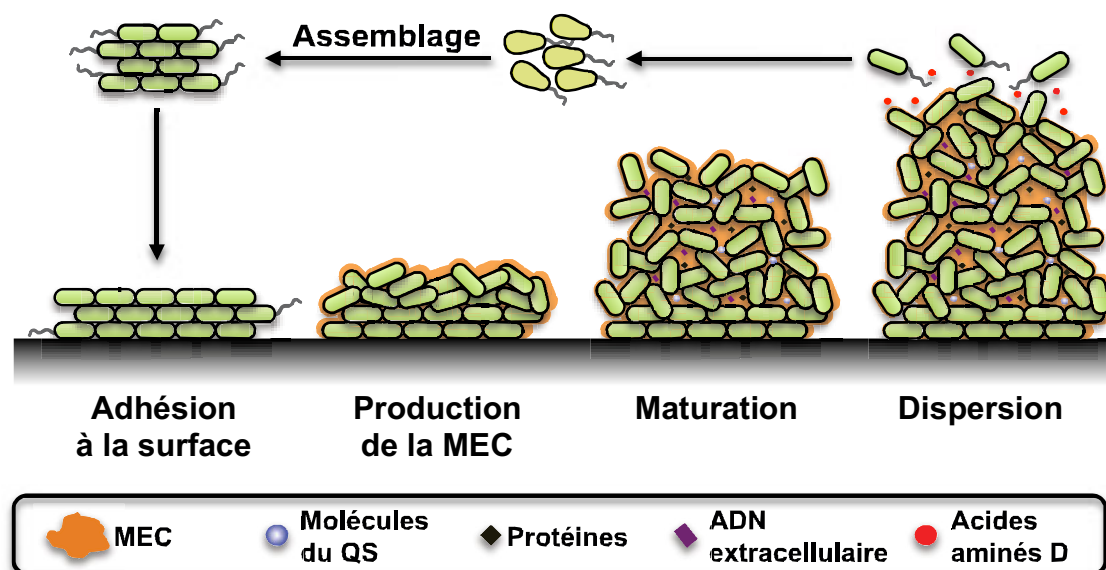


Figure VI.4. La formation des biofilms matures commencerait par la formation de communautés cellulaires flottantes.

VII. Références

1. van Leeuwenhoek, A. An abstract of a letter from antonie van leeuwenhoek, Sep. 12, 1683. about animals in the scruff of the teeth. *Philos Trans R Soc Lond* **14**, 568–574
2. Henrici, A. T. Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *J. Bacteriol.* **25**, 277 (1933).
3. Zobell, C. E. & Allen, E. C. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *J. Bacteriol.* **29**, 239–251 (1935).
4. Heukelekian, H. & Heller, A. Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *J. Bacteriol.* **40**, 547–558 (1940).
5. Mack, W. N., Mack, J. P. & Ackerson, A. O. Microbial film development in a trickling filter. *Microb. Ecol.* **2**, 215–226 (1975).
6. Costerton, J. W., Geesey, G. G. & Cheng, K. J. How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**, 86–95 (1978).
7. Westall, F. *et al.* Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Res.* **106**, 93–116 (2001).
8. Rasmussen, B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature* **405**, 676–679 (2000).
9. Thomas, D. N. & Dieckmann, G. S. Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles. *Science* **295**, 641–644 (2002).
10. Boomer, S. M., Noll, K. L., Geesey, G. G. & Dutton, B. E. Formation of Multilayered Photosynthetic Biofilms in an Alkaline Thermal Spring in Yellowstone National Park, Wyoming. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2464–2475 (2009).
11. Xu, Y., Miao, L., Li, X.-C., Xiao, X. & Qian, P.-Y. Antibacterial and antilarval activity of deep-sea bacteria from sediments of the West Pacific Ocean. *Biofouling* **23**, 131–137 (2007).
12. Kuhlman, K. R. *et al.* Diversity of Microorganisms within Rock Varnish in the Whipple Mountains, California. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1708–1715 (2006).
13. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).
14. Kelley, S. T., Theisen, U., Angenent, L. T., Amand, A. S. & Pace, N. R. Molecular Analysis of Shower Curtain Biofilm Microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4187–4192 (2004).
15. Bixler, G. D. & Bhushan, B. Biofouling: lessons from nature. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **370**, 2381–2417 (2012).
16. Bixler, G. D. & Bhushan, B. Biofouling: lessons from nature. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **370**, 2381–2417 (2012).
17. Cunningham, A. B., Lennox, J. E. & Ross, R. J. Biofilms: The hypertextbook.
18. STAVREVA-VESELINOVSKA, S. & ĐOKIK, M. MICROBES AND GLOBAL CHANGE.
19. Singh, R., Paul, D. & Jain, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* **14**, 389–397 (2006).
20. Lazarova, V. & Manem, J. Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment. *ChemInform* **31**, (2000).
21. Odegaard, H. Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* **53**, 17–33 (2006).
22. Romeo, T. *Bacterial biofilms*. (Springer, 2008).

23. Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R. & Kolter, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 157–168 (2013).
24. O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295–304 (1998).
25. Davies, D. G. & Geesey, G. G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 860–867 (1995).
26. Maldonado, R. F., Sá-Correia, I. & Valvano, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol. Rev.* fuw007 (2016). doi:10.1093/femsre/fuw007
27. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).
28. Lemon, K. P., Higgins, D. E. & Kolter, R. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* **189**, 4418–4424 (2007).
29. Varga, J. J. *et al.* Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other *Clostridia*. *Mol. Microbiol.* **62**, 680–694 (2006).
30. Finelli, A., Gallant, C. V., Jarvi, K. & Burrows, L. L. Use of In-Biofilm Expression Technology To Identify Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* **185**, 2700–2710 (2003).
31. Yoon, S. S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms. *Dev. Cell* **3**, 593–603 (2002).
32. Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**, 20–26 (2005).
33. Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R. & Lasa, I. Biofilm-associated proteins. *C. R. Biol.* **329**, 849–857 (2006).
34. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487–1487 (2002).
35. Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35–58 (1991).
36. Tal, R. *et al.* Three *cdg* Operons Control Cellular Turnover of Cyclic Di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic Organization and Occurrence of Conserved Domains in Isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**, 4416–4425 (1998).
37. Friedman, L. & Kolter, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**, 675–690 (2004).
38. Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. Identification of *psl*, a Locus Encoding a Potential Exopolysaccharide That Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* **186**, 4466–4475 (2004).
39. Mah, T.-F. C. & O'Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39 (2001).
40. Leid, J. G. *et al.* The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *J. Immunol.* **175**, 7512–7518 (2005).
41. Sauer, K. & Camper, A. K. Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth. *J. Bacteriol.* **183**, 6579–6589 (2001).
42. Whiteley, M. *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860–864 (2001).

43. Cattelan, N. *et al.* Outer membrane protein OmpQ of *Bordetella bronchiseptica* is required for mature biofilm formation. *Microbiol. Read. Engl.* **162**, 351–363 (2016).
44. Banerjee, G. & Ray, A. K. The talking language in some major Gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* (2016). doi:10.1007/s00203-016-1220-x
45. Sifri, C. D. Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **47**, 1070–1076 (2008).
46. Banerjee, G. & Ray, A. K. The talking language in some major Gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* (2016). doi:10.1007/s00203-016-1220-x
47. Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H. & Prince, A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* **68**, 4331–4334 (2000).
48. Kolodkin-Gal, I. *et al.* d-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science* **328**, 627–629 (2010).
49. Nicolle, L. E. Resistant Pathogens in Urinary Tract Infections. *J. Am. Geriatr. Soc.* **50**, 230–235 (2002).
50. Taraszkievicz, A., Fila, G., Grinholc, M. & Nakonieczna, J. Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. *BioMed Res. Int.* **2013**, 1–13 (2013).
51. Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A. & Hamood, A. N. Contribution of the regulatory gene *lasR* to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection of burned mice. *J. Burn Care Rehabil.* **20**, 42–49 (1999).
52. Miller, M. B. & Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–199 (2001).
53. Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S. & Jacques, M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.* **78**, 110–116 (2014).
54. Davies, D. G. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**, 295–298 (1998).
55. Liu, J. *et al.* Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature* **523**, 550–554 (2015).
56. Prindle, A. *et al.* Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature15709
57. Lasa, I. & Penadés, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* **157**, 99–107 (2006).
58. Khoury, A. E., Lam, K., Ellis, B. & Costerton, J. W. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1992** **38**, M174-178 (1992).
59. Abraham, W.-R. Going beyond the Control of Quorum-Sensing to Combat Biofilm Infections. *Antibiotics* **5**, 3 (2016).
60. Mishra, B., Golla, R. M., Lau, K., Lushnikova, T. & Wang, G. Anti-Staphylococcal Biofilm Effects of Human Cathelicidin Peptides. *ACS Med. Chem. Lett.* (2015). doi:10.1021/acsmchemlett.5b00433
61. Ostrowska, K., Kamysz, W., Dawgul, M. & Różalski, A. Synthetic amphibian peptides and short amino-acids derivatives against planktonic cells and mature biofilm of *Providencia stuartii* clinical strains. *Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* **63**, 423–431 (2014).

62. Chapman, C. M. C., Gibson, G. R. & Rowland, I. Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. *Anaerobe* **27**, 71–76 (2014).
63. Buttiaux, R., Osteux, R., Fresnoy, R. & Moriamez, J. [The characteristic biochemical properties of the genus *Proteus*; desirable inclusion of the *Providencia* in this group]. *Ann. Inst. Pasteur* **87**, 375–386 (1954).
64. De Vecchi, E. *et al.* Aetiology and antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in the elderly: a 6-month study. *J. Med. Microbiol.* **62**, 859–863 (2013).
65. STOCK, I. & WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* strains. *J. Med. Microbiol.* **47**, 629–642 (1998).
66. Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**, 239–253 (2000).
67. Whitfield, C. & Trent, M. S. Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 99–128 (2014).
68. Lee, B. *et al.* Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5247–5255 (2005).
69. Wie, S.-H. Clinical significance of *Providencia* bacteremia or bacteriuria. *Korean J. Intern. Med.* **30**, 167–169 (2015).
70. O’Hara, C. M., Brenner, F. W. & Miller, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 534–546 (2000).
71. Armbruster, C. E., Smith, S. N., Yep, A. & Mobley, H. L. T. Increased Incidence of Urolithiasis and Bacteremia During *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* Coinfection Due to Synergistic Induction of Urease Activity. *J. Infect. Dis.* **209**, 1524–1532 (2014).
72. Rettger, L. F. On the Autolysis of Yeasts and Bacteria. *J. Med. Res.* **13**, 79–92 (1904).
73. Hadley, P. Studies on Fowl Cholera: V. The Toxins of *Bacillus avisepticus*. *J. Bacteriol.* **3**, 277–291 (1918).
74. Warren, J. W. *Providencia stuartii*: A Common Cause of Antibiotic-Resistant Bacteriuria in Patients with Long-Term Indwelling Catheters. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 61–67 (1986).
75. Chamberland, R. R., McElvania TeKippe, E., Burnham, C.-A. D. & Kennedy, D. J. Renal abscess caused by a *Providencia stuartii* isolate biochemically misidentified as *Pasteurella*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2775–2777 (2013).
76. Krake, P. R. & Tandon, N. Infective endocarditis due to *Providencia stuartii*. *South. Med. J.* **97**, 1022–1023 (2004).
77. Simon, C. *et al.* Images in cardiovascular medicine. Bacterial pericarditis due to *Providencia stuartii*: an atypical case of relapsing pericarditis. *Circulation* **122**, e401-403 (2010).
78. Unverdi, S. *et al.* Peritonitis due to *Providencia stuartii*. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **31**, 216–217 (2011).
79. Waldhalm, D. G., Meinershagen, W. A. & Frank, F. W. *Providencia stuartii* as an etiologic agent in neonatal diarrhea in calves. *Am. J. Vet. Res.* **30**, 1573–1575 (1969).
80. Stickler, D. J. Susceptibility of antibiotic-resistant gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **92**, (2002).

81. MOBLEY, H. L., CHIPPENDALE, G. R., TENNEY, J. H. & WARREN, J. W. Adherence to uroepithelial cells of *Providencia stuartii* isolated from the catheterized urinary tract. *Microbiology* **132**, 2863–2872 (1986).
82. Stickler, D. J. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J. Intern. Med.* **276**, 120–129 (2014).
83. Tumbarello, M. *et al.* ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 277–282 (2004).
84. Lahlaoui, H. *et al.* Nosocomial dissemination of extended-spectrum β -lactamase VEB-1a-producing *Providencia stuartii* isolates in a Tunisian hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 1267–1270 (2011).
85. Jones, G. L., Muller, C. T., O'Reilly, M. & Stickler, D. J. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 266–272 (2006).
86. Nakae, T. Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J. Biol. Chem.* **251**, 2176–2178 (1976).
87. Zeth, K. & Thein, M. Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochem. J.* **431**, 13–22 (2010).
88. Nabedryk, E., Garavito, R. M. & Breton, J. The orientation of beta-sheets in porin. A polarized Fourier transform infrared spectroscopic investigation. *Biophys. J.* **53**, 671 (1988).
89. Engel, A., Massalski, A., Schindler, H., Dorset, D. L. & Rosenbusch, J. P. Porin channel triplets merge into single outlets in *Escherichia coli* outer membranes. *Nature* **317**, 643–645 (1985).
90. Chalcraft, J. p., Engelhardt, H. & Baumeister, W. Structure of the porin from a bacterial stalk. *FEBS Lett.* **211**, 53–58 (1987).
91. Garavito, R. M., Jenkins, J., Jansonius, J. N., Karlsson, R. & Rosenbusch, J. P. X-ray diffraction analysis of matrix porin, an integral membrane protein from *Escherichia coli* outer membranes. *J. Mol. Biol.* **164**, 313–327 (1983).
92. Weiss, M. S., Wacker, T., Weckesser, J., Welte, W. & Schulz, G. E. The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3 Å resolution. *FEBS Lett.* **267**, 268–272 (1990).
93. Galdiero, S. *et al.* Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 843–854 (2012).
94. Yildiz, O., Vinothkumar, K. R., Goswami, P. & Kühlbrandt, W. Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. *EMBO J.* **25**, 3702–3713 (2006).
95. Zachariae, U., Klühspies, T., De, S., Engelhardt, H. & Zeth, K. High resolution crystal structures and molecular dynamics studies reveal substrate binding in the porin Omp32. *J. Biol. Chem.* **281**, 7413–7420 (2006).
96. Moraes, T. F., Bains, M., Hancock, R. E. W. & Strynadka, N. C. J. An arginine ladder in OprP mediates phosphate-specific transfer across the outer membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 85–87 (2007).
97. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **67**, 593–656 (2003).
98. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).

99. Im, W. & Roux, B. Ions and Counterions in a Biological Channel: A Molecular Dynamics Simulation of OmpF Porin from *Escherichia coli* in an Explicit Membrane with 1M KCl Aqueous Salt Solution. *J. Mol. Biol.* **319**, 1177–1197 (2002).
100. Im, W. & Roux, B. Ion permeation and selectivity of OmpF porin: a theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *J. Mol. Biol.* **322**, 851–869 (2002).
101. Alcaraz, A., Nestorovich, E. M., Aguilera-Arzo, M., Aguilera, V. M. & Bezrukov, S. M. Salting Out the Ionic Selectivity of a Wide Channel: The Asymmetry of OmpF. *Biophys. J.* **87**, 943–957 (2004).
102. Pagès, J.-M. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *médecine/sciences* **20**, 346–351 (2004).
103. Pagès, J.-M., James, C. E. & Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 893–903 (2008).
104. Fernandez, L. & Hancock, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 661–681 (2012).
105. Rebière-Huët, J. *et al.* Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 121–126 (2002).
106. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
107. Faulstich, M. *et al.* Neutral sphingomyelinase 2 is a key factor for PorB-dependent invasion of *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell. Microbiol.* **17**, 241–253 (2015).
108. Tommassen, J., Overduin, P., Lugtenberg, B. & Bergmans, H. Cloning of *phoE*, the structural gene for the *Escherichia coli* phosphate limitation-inducible outer membrane pore protein. *J. Bacteriol.* **149**, 668–672 (1982).
109. Dedieu, L., Pages, J.-M. & Bolla, J.-M. Environmental Regulation of *Campylobacter jejuni* Major Outer Membrane Protein Porin Expression in *Escherichia coli* Monitored by Using Green Fluorescent Protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4209–4215 (2002).
110. Tran, Q.-T. *et al.* Implication of Porins in β -Lactam Resistance of *Providencia stuartii*. *J. Biol. Chem.* **285**, 32273–32281 (2010).
111. Song, W. *et al.* Understanding Voltage Gating of *Providencia stuartii* Porins at Atomic Level. *PLOS Comput Biol* **11**, e1004255 (2015).
112. Bajaj, H. *et al.* Antibiotic Uptake through Membrane Channels: Role of *Providencia stuartii* OmpPst1 Porin in Carbapenem Resistance. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 10244–10249 (2012).
113. King, J. B. & Stickler, D. J. The effect of repeated instillations of antiseptics on catheter-associated urinary tract infections: a study in a physical model of the catheterized bladder. *Urol. Res.* **20**, 403–407 (1992).
114. Di Martino, P., Fursy, R., Bret, L., Sundararaju, B. & Phillips, R. S. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can. J. Microbiol.* **49**, 443–449 (2003).
115. Bret, L. & Di Martino, P. Effect of Ceftazidime, Amikacin and Ciprofloxacin on Biofilm Formation by Some Enterobacterial Clinical Isolates. *Chemotherapy* **50**, 255–259 (2004).
116. Macleod, S. M. & Stickler, D. J. Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1549–1557 (2007).

117. Broomfield, R. J., Morgan, S. D., Khan, A. & Stickler, D. J. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1367–1375 (2009).
118. Rather, P. Role of rhomboid proteases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2849–2854 (2013).
119. Sturgill, G., Toutain, C. M., Komperda, J., O'Toole, G. A. & Rather, P. N. Role of CysE in Production of an Extracellular Signaling Molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: Loss of *cysE* Enhances Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 7610–7617 (2004).
120. Kateete, D. P. *et al.* Rhomboids of Mycobacteria: Characterization Using an *aarA* Mutant of *Providencia stuartii* and Gene Deletion in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS ONE* **7**, e45741 (2012).
121. Khatib, M. E. *et al.* *Providencia stuartii* form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults. *PLOS ONE* **12**, e0174213 (2017).
122. El Khatib, M., Martins, A., Bourgeois, D., Colletier, J.-P. & Adam, V. Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm. *Sci. Rep.* **6**, 18459 (2016).
123. Danna, K. & Nathans, D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2913–2917 (1971).
124. Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. & Helling, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 3240–3244 (1973).
125. Prilipov, A., Phale, P. S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J. P. & Koebnik, R. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 65–72 (1998).
126. Taylor, G. The phase problem. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1881–1890 (2003).
127. Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239 (1962).
128. Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* **9**, 413–418
129. Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H. & Miyawaki, A. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12651–12656 (2002).
130. Subach, F. V. *et al.* Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **6**, 153–159 (2009).
131. Andresen, M. *et al.* Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1035–1040 (2008).
132. Stiel, A. C. *et al.* Generation of Monomeric Reversibly Switchable Red Fluorescent Proteins for Far-Field Fluorescence Nanoscopy. *Biophys. J.* **95**, 2989–2997 (2008).
133. Adam, V. *et al.* Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18343–18348 (2008).

134. Gustafsson, M. G. L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13081–13086 (2005).
135. Klar, T. A. & Hell, S. W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**, 954–956 (1999).
136. Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S. & Hell, S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17565–17569 (2005).
137. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nat. Methods* **3**, 793–795 (2006).
138. Hess, S. T., Girirajan, T. P. K. & Mason, M. D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* **91**, 4258–4272 (2006).
139. Betzig, E. *et al.* Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
140. Fernholm, A. How the optical microscope became a nanoscope. (2014).
141. Zalewska-Piatek, B. M., Wilkanowicz, S. I., Piatek, R. J. & Kur, J. W. Biofilm formation as a virulence determinant of uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains. *Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* **58**, 223–229 (2009).
142. de Jong, I. G., Beilharz, K., Kuipers, O. P. & Veening, J.-W. Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae*; using Automated Time-lapse Microscopy. *J. Vis. Exp.* (2011). doi:10.3791/3145
143. Ward, W. Properties of the coelenterate Green-Fluorescent Proteins. *Bioluminescence and chemiluminescence: basic chemistry and analytical applications* (ed[^](eds DeLuca M. A., McElroy W. D.)). *Academic Press* 235–242 (1981).
144. Williams, A. T. R., Winfield, S. A. & Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **108**, 1067–1071 (1983).
145. Moore, M. M., Oteng-Pabi, S. K., Pandelieva, A. T., Mayo, S. L. & Chica, R. A. Recovery of Red Fluorescent Protein Chromophore Maturation Deficiency through Rational Design. *PLoS ONE* **7**, e52463 (2012).
146. de Sanctis, D. *et al.* ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering. *J. Synchrotron Radiat.* **19**, 455–461 (2012).
147. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800 (1993).
148. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
149. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
150. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
151. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
152. Dammeyer, T. & Tinnefeld, P. ENGINEERED FLUORESCENT PROTEINS ILLUMINATE THE BACTERIAL PERIPLASM. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, 1–6 (2012).

153. Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **24**, 79–88 (2006).
154. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572 (2004).
155. Peters, N. T., Dinh, T. & Bernhardt, T. G. A Fail-Safe Mechanism in the Septal Ring Assembly Pathway Generated by the Sequential Recruitment of Cell Separation Amidases and Their Activators. *J. Bacteriol.* **193**, 4973–4983 (2011).
156. Ducret, A., Fleuchot, B., Bergam, P. & Mignot, T. Direct live imaging of cell-cell protein transfer by transient outer membrane fusion in *Myxococcus xanthus*. *eLife* **2**, e00868 (2013).
157. Dinh, T. & Bernhardt, T. G. Using Superfolder Green Fluorescent Protein for Periplasmic Protein Localization Studies. *J. Bacteriol.* **193**, 4984–4987 (2011).
158. Aronson, D. E., Costantini, L. M. & Snapp, E. L. Superfolder GFP Is Fluorescent in Oxidizing Environments When Targeted via the Sec Translocon. *Traffic* **12**, 543–548 (2011).

Résumé

Les biofilms, communautés multicellulaires bactériennes, sont omniprésents. Malgré leur importance pour l'écosystème, ils présentent une menace pour l'industrie autant que pour la santé humaine. La virulence des biofilms procède surtout de leur résistance élevée aux antibiotiques, qui rend leur éradication quasiment impossible. Ainsi, les biofilms sont impliqués dans la plupart des infections bactériennes chroniques, causant chaque année plus de 4000 décès en France. *P. stuartii* est une bactérie connue pour sa capacité à former des biofilms dans le tractus urinaire humain. Elle est responsable de 10% des INU chroniques et est décrite comme étant la plus résistante de son genre. Malgré ces faits, les études menées sur cette bactérie sont rares, freinant la compréhension du mécanisme de développement et de résistance de ses biofilms et compliquant ainsi l'avancement de nouvelles thérapies pour lutter, prévenir ou éradiquer ces infections. *P. stuartii* exprime au niveau de sa membrane externe deux porines, Omp-Pst1 et Omp-Pst2, qui constituent 70% du contenu protéique membranaire. Ces porines sont le conduit principal permettant à la bactérie de communiquer et d'échanger avec son milieu environnant. Ainsi, les porines sont vitales pour la bactérie. A ce jour, trois publications sont disponibles qui traitent de ces deux porines, mais aucune n'a exploré leur influence sur la formation des biofilms bactériens. Les travaux effectués au cours de ma thèse ont ainsi visé à réduire le manque de connaissance sur les biofilms de *P. stuartii* et à dévoiler le rôle des porines dans l'établissement et la résistance de ces biofilms. Pour cela, nous avons segmenté notre travail en quatre parties ayant pour objectifs (1) de comprendre la formation des biofilms de *P. stuartii* et leur réponse aux stress du milieu environnant ; (2) de décrire l'effet de la suppression ou la surexpression des porines ; (3) d'étudier à l'échelle moléculaire et atomique le comportement des porines isolées ; et (4) de développer des outils pour étudier les porines à l'échelle moléculaire au sein d'un biofilm de *P. stuartii*.

Abstract

Biofilms, bacterial multicellular communities, are ubiquitous. Despite their importance to the ecosystem, they pose a threat to both industry and human health. The virulence of biofilms is mainly due to their high resistance to antibiotics, which makes their eradication virtually impossible. Thus, biofilms are involved in most chronic bacterial infections, causing each year more than 4,000 deaths in France. *P. stuartii* is a bacterium known for its ability to form biofilms in the human urinary tract. It is responsible for 10% of chronic nosocomial urinary infections and is described as the most resistant of its kind. Despite these facts, studies on this bacterium are rare, hampering the understanding of the mechanism of development and resistance of its biofilms and thus complicating the advancement of new therapies to fight, prevent or eradicate these infections. *P. stuartii* expresses at its outer membrane two porins, Omp-Pst1 and Omp-Pst2, which constitute 70% of the membrane protein content. These porins are the main conduit allowing the bacterium to communicate and exchange with its surrounding environment. Thus, porins are vital for the bacteria. To date, three publications are available that deal with these two porins, but none have explored their influence on the formation of bacterial biofilms. The work carried out during my thesis thus aimed to reduce the lack of knowledge about *P. stuartii*'s biofilms and to unveil the role of porins in the establishment and resistance of these biofilms. For this, we have divided our work into four parts aiming at (1) understanding the formation of *P. stuartii* biofilms and their response to the stresses of the surrounding environment; (2) describing the effect of suppression or overexpression of porins; (3) studying the behavior of isolated porins on a molecular and atomic scale; and (4) developing tools for studying porins on a molecular scale within a biofilm of *P. stuartii*.